

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**VINÍCIUS ZIMMERMANN SIMÕES DA COSTA**

**IMOBILIZAÇÃO DE PECTINASES EM PARTÍCULAS DE QUITOSANA ATIVADAS POR  
GENIPINA E APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS: estudo dos  
parâmetros geométricos dos biorreatores**

PORTO ALEGRE

2023

**VINÍCIUS ZIMMERMANN SIMÕES DA COSTA**

**IMOBILIZAÇÃO DE PECTINASES EM PARTÍCULAS DE QUITOSANA ATIVADAS POR GENIPINA E APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS: estudo dos parâmetros geométricos dos biorreatores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre.

Orientador: Rafael C. Rodrigues

PORTO ALEGRE

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

ZIMMEERMANN SIMÕES DA COSTA, VINICIUS  
IMOBILIZAÇÃO DE PECTINASES EM PARTÍCULAS DE  
QUITOSANA ATIVADAS POR GENIPINA E APLICAÇÃO NA  
CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS: estudo dos parâmetros  
geométricos dos biorreatores / VINICIUS ZIMMEERMANN  
SIMÕES DA COSTA. -- 2023.  
99 f.  
Orientador: RAFAEL COSTA RODRIGUES.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Pectinase. 2. Genipina. 3. Quitosana. 4.  
Reatores. 5. Clarificação. I. COSTA RODRIGUES, RAFAEL,  
orient. II. Título.



ATA PARA ASSINATURA Nº \_\_\_\_\_

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - Mestrado Acadêmico  
Ata de defesa de Dissertação

Aluno: Vinicius Zimmermann Simões da Costa, com ingresso em 02/06/2021  
Título: **Imobilização de pectinases em partículas de quitosana ativadas por genipina e aplicação na clarificação de sucos de frutas: estudo dos parâmetros geométricos dos biorreatores.**  
Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Data: 28/08/2023  
Horário: 09:30  
Local: AUDITÓRIO ICTA

<u>Banca Examinadora</u>	<u>Origem</u>
Plinho Francisco Hertz	UFRGS
Manuela Poletto Klein	UFCSA
Lucas Dal Magro	IFSUL

Porto Alegre, 28 de agosto de 2023

<u>Membros</u>	<u>Assinatura</u>	<u>Avaliação</u>
Plinho Francisco Hertz		Aprovado
Manuela Poletto Klein		Aprovado
Lucas Dal Magro		Aprovado

Conceito Geral da Banca: ( APROVADO )      Correções solicitadas: ( X ) Sim (    ) Não

**Observação:** Esta Ata não pode ser considerada como instrumento final do processo de concessão de título ao aluno.

\_\_\_\_\_  
Aluno

\_\_\_\_\_  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

A eles, pessoas extraordinárias que têm sido uma presença constante ao meu lado, sustentando-me com seu inabalável apoio e incansável incentivo ao longo desta intensa jornada acadêmica, desejo expressar minha gratidão profunda e sincera. Cada passo que dei em direção a esta conquista foi moldado pelo amor incondicional que generosamente compartilharam comigo, amo vocês mãe e pai.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos meus queridos colegas de laboratório, em especial a Carol, a Ellen e ao Eli, cujo apoio e amizade foram pilares fundamentais ao longo destes últimos dois anos. A jornada não teria sido a mesma sem a ajuda, a troca de ideias e espírito de equipe que compartilhamos diariamente. Suas contribuições inestimáveis não apenas facilitaram o progresso dos meus experimentos, mas também enriqueceram minha experiência pessoal e profissional. Sou imensamente grato por ter compartilhado esse capítulo de minha vida ao lado de indivíduos tão excepcionais.

Gostaria de dedicar um profundo agradecimento à Raíssa, que tem sido uma presença ímpar nesse processo de desenvolvimento acadêmico e pessoal. Sua paciência e determinação em tentar elucidar as questões que me perturbam, mesmo que não sejam de seu campo de conhecimento, mostram o quanto você valoriza meu progresso e escolha profissional. Sua presença ao meu lado transforma obstáculos em oportunidades e me inspira a enfrentar qualquer desafio. Obrigado por ser meu apoio emocional e intelectual, por sempre estar ao meu lado, iluminando o caminho com seu amor e compreensão.

A minha mais profunda gratidão ao meu orientador, Rafael, cuja orientação e amizade têm sido fundamentais. Sua sabedoria, orientação e apoio inabalável foram a força motriz por trás dos meus esforços. Além de ser um mentor, tu te tornaste um amigo confiável, sempre pronto para oferecer insights valiosos e incentivo encorajador.

Agradeço, por fim, sinceramente aos órgãos de incentivo à pesquisa, cruciais em um país como o Brasil, onde o apoio governamental é essencial para a pesquisa. Destaco o presidente Lula, desde janeiro de 2023, por seu comprometimento em fortalecer os investimentos na pesquisa nacional, impulsionando a ciência e a inovação no país. Obrigado por investirem no potencial do nosso país.

*“É uma verdade profunda e necessária que as coisas importantes na ciência não são descobertas porque são úteis; elas são descobertas porque foi possível encontrá-las.”*

*Robert Oppenheimer.*

## RESUMO

A clarificação enzimática de sucos já é amplamente difundida, entretanto, a imobilização de enzimas para este fim, utilizando materiais atóxicos (como a genipina), bem como a aplicação destes biocatalisadores em biorreatores para uso contínuo ainda carecem de estudos. Somado a isso, o desconhecimento da relação entre a geometria e a fluidodinâmica do biorreator, e o impacto desta na clarificação contínua de sucos, motivaram este trabalho. Neste estudo, investigou-se o potencial de esferas de quitosana ativadas com genipina como suporte para a imobilização de pectinase, e sua aplicação subsequente na clarificação de suco de frutas, especialmente na utilização desses biocatalisadores em reatores de leito fixo e o impacto da geometria do reator no processo de clarificação. A etapa inicial envolveu a ativação do suporte com genipina e a avaliação de parâmetros de imobilização, incluindo o pH de ativação do suporte, a carga enzimática e o pH de imobilização. Na sequência, estudou-se a estabilidade térmica e operacional da enzima, além da clarificação contínua de sucos de frutas. Cinco reatores de leito fixo distintos foram utilizados para observar o impacto da geometria na fluidodinâmica e, conseqüentemente, no processo de clarificação. Para isso, os reatores foram analisados em dois diferentes grupos: reatores com mesmo volume (40 mL – A:  $r = 0,64$  cm,  $L = 31,5$  cm; B:  $r = 0,80$  cm,  $L = 20$  cm; C:  $r = 1,13$  cm,  $L = 10$  cm) e reatores com a mesma área da seção transversal ( $2\text{ cm}^2$  – B:  $V = 40$  mL; D:  $V = 60$  mL; E:  $V = 20$  mL). Quando analisada a carga enzimática oferecida ao suporte, quantidades superiores a 100 mg de proteína /g de suporte não demonstraram aumento na atividade imobilizada, e a atividade recuperada observada foi em torno de 1 %. A enzima imobilizada apresentou estabilidade notável, retendo cerca de 60 % de sua atividade inicial após suportar 5 h a 60°C, em contraste com a rápida inativação da enzima livre em menos de 1 h. Não houve diferença estatística significativa entre a enzima livre e imobilizada em relação à eficiência de clarificação (redução da turbidez) do suco de laranja, já a eficiência de clarificação do suco de uva usando a enzima imobilizada foi estatisticamente maior do que com a enzima livre. No teste de estabilidade da atividade enzimática em batelada, a enzima imobilizada manteve 40 % de sua atividade relativa inicial ao longo de 20 ciclos, demonstrando seu potencial para uso prolongado. A clarificação de sucos de frutas, no entanto, apresentou desafios devido à adsorção de partículas do suco nos biocatalisadores, reduzindo sua atividade. Uma abordagem aprimorada de lavagem ajudou a remover as partículas adsorvidas e manteve 40 % das capacidades iniciais, mesmo após 10 ciclos. Para os reatores, avaliações do tempo de residência revelaram, nos reatores com volumes iguais, variações na capacidade de clarificação atribuídas a diferenças de geometria. Testes de estabilidade da atividade enzimática demonstraram manutenção da atividade ao longo de 100 h, no entanto, para a estabilidade da clarificação de sucos de frutas, a acumulação de partículas prejudicou a clarificação contínua de sucos dentro de sistemas de leito fixo, levando à necessidade de soluções inovadoras. Para mitigar isso, uma abordagem inovadora envolveu a alteração da orientação da bomba, redirecionando o fluxo de suco (descendente) e um período de hidrólise prolongado de 80 h, até que não houvesse mais clarificação observada. Em resumo, este estudo revelou o potencial das esferas de quitosana ativadas com genipina para a imobilização de pectinase e a clarificação de sucos de frutas. Ele enfatiza a importância do projeto do reator e a necessidade de abordar desafios como a acumulação de partículas. Os resultados destacam o valor das enzimas imobilizadas na melhoria do processamento de sucos e na otimização da estabilidade e configuração do reator para processos de clarificação bem-sucedidos e sustentáveis.

**Palavras-chave:** Pectinase. Genipina. Quitosana. Reatores. Geometria. Clarificação.

## ABSTRACT

Enzymatic clarification of juices is already widely practiced. However, the immobilization of enzymes for this purpose using non-toxic materials (such as genipin), as well as the application of these biocatalysts in continuous-use bioreactors, still lack comprehensive studies. Furthermore, the lack of knowledge regarding the relationship between the geometry and fluid dynamics of the bioreactor, and its impact on the continuous clarification of juices, has motivated this research. This study investigated the potential of chitosan beads activated with genipin as a support for pectinase immobilization and their subsequent application in fruit juice clarification, particularly in the utilization of these biocatalysts in packed-bed reactors and the impact of reactor geometry on the clarification process. The initial stage involved support activation with genipin and the assessment of immobilization parameters, including support activation pH, enzyme loading, and immobilization pH. Subsequently, thermal and operational stability of the enzyme was studied, as well as continuous fruit juice clarification. Five different packed-bed reactors were employed to observe the impact of geometry on fluid dynamics and, consequently, the clarification process. For this purpose, the reactors were analyzed in two different groups: reactors with the same volume (40 mL - A:  $r = 0.64$  cm,  $L = 31.5$  cm; B:  $r = 0.80$  cm,  $L = 20$  cm; C:  $r = 1.13$  cm,  $L = 10$  cm) and reactors with the same cross-sectional area (2 cm<sup>2</sup> - B:  $V = 40$  mL; D:  $V = 60$  mL; E:  $V = 20$  mL). Regarding the enzyme loading on the support, quantities exceeding 100 mg of protein per gram of support did not show an increase in immobilized activity, and the observed recovered activity was approximately 1%. The immobilized enzyme exhibited remarkable stability, retaining about 60% of its initial activity after enduring 5 hours at 60°C, in contrast to the rapid inactivation of free enzyme in less than an hour. There was no statistically significant difference between free and immobilized enzyme in terms of juice clarification efficiency (reduction of turbidity) for orange juice, while the clarification efficiency of grape juice using immobilized enzyme was statistically higher than with free enzyme. In the batch stability test of enzyme activity, the immobilized enzyme maintained 40% of its initial relative activity over 20 cycles, demonstrating its potential for extended use. However, fruit juice clarification presented challenges due to the adsorption of juice particles on the biocatalysts, reducing their activity. An improved washing approach helped remove adsorbed particles and maintained 40% of initial capacities even after 10 cycles. For the reactors, residence time evaluations revealed variations in clarification capacity attributed to geometric differences in reactors with equal volumes. Stability tests of enzyme activity demonstrated maintenance of activity over 100 hours; however, for the stability of fruit juice clarification, particle accumulation hindered continuous juice clarification within fixed-bed systems, necessitating innovative solutions. To mitigate this issue, an innovative approach involved altering the pump orientation, redirecting the juice flow (downward) and an extended hydrolysis period of 80 hours until no further clarification was observed. In summary, this study revealed the potential of genipin-activated chitosan beads for pectinase immobilization and fruit juice clarification. It underscores the importance of reactor design and the need to address challenges such as particle accumulation. The results highlight the value of immobilized enzymes in improving juice processing and optimizing reactor stability and configuration for successful and sustainable clarification processes.

**Keywords:** Pectinase. Genipin. Chitosan. Reactors. Geometry. Clarification.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modo de Ação Enzimático das Despolimerases Mais Frequentes na Molécula de Pectina.....	15
Figura 2 - Reação de Catálise Realizada pelas Pectinesterases .....	16
Figura 3 - Métodos Básicos de Imobilização de Enzima.....	21
Figura 4 - Estrutura da Quitina e Quitosana .....	22
Figura 5 - Métodos de Obtenção da Genipina.....	25
Figura 6 - Mecanismo de Reação Entre Genipina e Quitosana em pH Ácido/Neutro.....	26
Figura 7 - Mecanismo De Reação Entre Genipina e Quitosana em pH Alcalino .....	27
Figura 8 - Esquema Operacional do Reator de Leito Empacotado. ....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificações dos Biorreatores .....	37
Tabela 2 – Tempos de Residência e Taxas de Fluxo para Cada Biorreator .....	37

## SUMÁRIO

CAPITULO I - INTRODUÇÃO .....	10
CAPITULO II – OBJETIVOS .....	13
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
CAPITULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
3.1 – ENZIMAS PECTINOLÍTICAS .....	14
3.1.1 – PECTINESTERASES (PE).....	15
3.1.2 - PECTINASES DESPOLIMERIZANTES .....	16
3.1.2.1 - HIDROLASES .....	16
3.1.2.2 – LIASES .....	17
3.1.3 – PROTOPECTINASES .....	17
3.2 APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM SUCOS .....	18
3.3 – ENZIMAS IMOBILIZADAS .....	19
3.3.1 - QUITOSANA COMO SUPORTE .....	22
3.3.2 - GENIPINA COMO AGENTE DE ATIVAÇÃO .....	24
3.4 – BIORRETORES ENZIMÁTICOS CONTÍNUOS .....	28
3.4.1 – FLUIDODINÂMICA DE REATORES DE LEITO FIXO .....	30
CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 – MATERIAIS.....	32
4.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	32
4.3 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	32
4.4 – PREPARAÇÃO DE ESFERAS DE QUITOSANA .....	33
4.5 – INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVAÇÃO DAS ESFERAS DE QUITOSANA .....	33
4.6 – IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....	33
4.7 – ESTABILIDADE TÉRMICA.....	34
4.8 – APLICAÇÃO DO BIOCATALISADOR.....	35
4.8.1 – ESTABILIDADE OPERACIONAL EM BATELADA.....	35
4.8.2 – MEV – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	36

4.9 – BIORREADORES .....	36
4.10 – AVALIAÇÃO DA VAZÃO DE SUBSTRATO NO BIORREATOR.....	37
4.11 – ESTABILIDADE OPERACIONAL EM REATOR CONTÍNUO .....	38
4.11.1 – HIDRÓLISE DA PECTINA .....	38
4.11.2 - CLARIFICAÇÃO CONTÍNUA DE SUCO DE LARANJA .....	39
4.11.2.1 – IMPACTO DO FLUXO ALTERNADO .....	40
4.12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
CAPÍTULO V – ARTIGO: GENIPIN-ACTIVATED CHITOSAN BEADS AS SUPPORT OF PECTINASE IMMOBILIZATION AND THEIR APPLICATION AS STABLE BIOCATALYST FOR FRUIT JUICE CLARIFICATION .....	41
CAPÍTULO VI – ARTIGO: IMPACT OF PACKED-BED REACTOR DIMENSION RATIO ON ORANGE JUICE CLARIFICATION USING PECTINASE IMMOBILIZED ON GENIPIN- ACTIVATED CHITOSAN BEADS .....	64
CAPÍTULO VII – DISCUSSÃO GERAL .....	87
CAPÍTULO VIII – CONCLUSÃO .....	90
CAPÍTULO IX – PERSPECTIVAS FUTURAS .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

## CAPITULO I - INTRODUÇÃO

A crescente demanda por uma dieta saudável, com alimentos naturais impulsiona a indústria alimentícia no fornecimento de produtos para atender este anseio da população. Um exemplo disso são os sucos de frutas, ricos em nutrientes e similares às características naturais, essas bebidas refrescantes fornecem carboidratos, carotenoides, vitaminas, polifenóis e minerais, atendendo às necessidades nutricionais e sensoriais da população (CARMO; DANTAS; RIBEIRO, 2014; RUXTON; MYERS, 2021). A busca por uma maior limpidez nos sucos, minimizando a quantidade de partículas suspensas, levou a diferentes abordagens industriais, como a microfiltração, a ultrafiltração, a centrifugação e clarificação enzimática (ABDULLAH et al., 2022; KALLEL et al., 2023). Embora amplamente usada, a clarificação enzimática ainda enfrenta desafios em sua aplicação (BHAT, 2000; SHELDON, 2007; TAPRE; JAIN, 2014; UENOJO; PASTORE, 2007).

Os desafios nesse contexto estão primordialmente relacionados à estabilidade da enzima durante os processos, à viabilidade da recuperação e à dificuldade de implementar processos contínuos de maneira eficaz. Essas questões emergem, sobretudo, devido à forma predominante das enzimas, frequentemente solúveis. Por conseguinte, assegurar sua estabilidade e preservar sua atividade por longos períodos de tempo apresenta barreiras substanciais para a aplicação industrial (ASGHER et al., 2014; GARCIA-GALAN et al., 2011; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; SHELDON, 2007).

O processo de imobilização consiste em ligar as enzimas a um suporte sólido (RODRIGUES et al., 2013). Este apresenta uma abordagem altamente vantajosa para a aplicação prática de enzimas, pois a técnica de imobilização proporciona a separação eficaz das partículas de enzima imobilizadas do meio aquoso, permitindo a subsequente reutilização do biocatalisador por vários ciclos, seu uso em processos contínuos e a possibilidade de modificar suas propriedades (por exemplo, possibilitando hidrólise seletiva ou síntese cineticamente controlada) (GARCIA-GALAN et al., 2011; HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; MATEO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013; SHELDON, 2007). No contexto da clarificação de sucos de frutas, a imobilização de enzimas surge como uma técnica promissora para melhorar a eficiência (DENG et al., 2019; WHITAKER, 1984).

Uma escolha viável de material para atuar como matriz de suporte no processo de imobilização enzimática é a quitosana. Ela é obtida a partir da quitina, um biopolímero natural amplamente disponível (ADRIANO et al., 2008; FANG et al., 2009; KRAJEWSKA, 2004). A quitosana apresenta várias características relevantes que a tornam apropriada para a imobilização de enzimas, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade, material inerte, propriedades antibacterianas, habilidade para quelar íons de metais pesados, formação de gel, hidrofobicidade e forte afinidade por proteínas (BIRO et al., 2008; GRENHA, 2012; KRAJEWSKA, 2004; LEI; BI, 2007; XIE; WANG, 2012).

A ligação entre o suporte e a enzima pode ser facilitada pela ação de um agente de ligação. Agentes de ligação cruzada sintéticos como o glutaraldeído, o tripolifosfato, o etilenoglicol, o éter diglicidílico e o diisocianato foram empregados para estabelecer ligações cruzadas entre enzimas e materiais de suporte. No entanto, esses reagentes demonstraram ser citotóxicos e podem ter impactos adversos na biocompatibilidade do sistema (CAVELLO; CONTRERAS-ESQUIVEL; CAVALITTO, 2014; MUZZARELLI, 2009), especialmente para aplicações em alimentos. Por outro lado, a genipina, um composto natural, tem a habilidade de promover a ligação cruzada de proteínas, como o colágeno e a gelatina com a quitosana, sem a necessidade de reagentes tóxicos (NERI-NUMA et al., 2017). A genipina emergiu como uma alternativa ao glutaraldeído para ativar partículas de quitosana, uma vez que é consideravelmente menos citotóxica, sendo até 5.000 a 10.000 vezes menos tóxica que o glutaraldeído (SUNG et al., 1999), o que a torna uma opção excelente no desenvolvimento de um biocatalisador para a indústria alimentícia.

Processos contínuos envolvendo enzimas imobilizadas e a clarificação de sucos são de extrema importância quando se visa um maior rendimento. Reatores de leito fixo e fluidizado são usados para reações com enzimas imobilizadas, permitindo operações contínuas. No leito fixo, há partículas de catalisadores variados para critérios de engenharia específicos. A circulação da solução ocorre via bombeamento. Essa configuração (leito fixo) oferece características, como maior área superficial e custos mais baixos, mas têm limitações, como compactação do leito e a formação de caminhos preferenciais que afetam a transferência de massa e calor (DIXON; PARTOPOUR, 2020; ILLANES; ILLANES, 2008; LAUDANI et al., 2007; POPPE et al., 2015; WATANABE et al., 2001). Modelos computacionais existentes buscam explorar vários parâmetros relacionados aos processos com reatores de leito fixo. Alguns

desses estudos revelam uma correlação entre os parâmetros geométricos do reator, como altura e diâmetro, e a distribuição do fluxo no interior do reator, o que pode levar a desigualdades na distribuição do fluxo e afetar a eficiência do reator (DIXON; PARTOPOUR, 2020; DONATO et al., 2016). Entretanto, estudos práticos envolvendo a catálise enzimática contínua e os parâmetros geométricos de um reator ainda não foram feitos.

Desse modo, este trabalho busca estudar, de maneira inédita, a imobilização de pectinases para clarificação de sucos de fruta em esferas de quitosana ativadas com genipina, um agente de ativação menos tóxico do que os comumente usados (como glutaraldeído). Além disso, tem-se como objetivo aplicar estes biocatalisadores desenvolvidos em reatores de leito fixo e estudar de que forma os parâmetros geométricos podem interferir no processo de clarificação.

## **CAPITULO II – OBJETIVOS**

### **2.1 – OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a influência da geometria do biorreator no processo de clarificação contínuo de sucos de frutas com pectinases imobilizadas em partículas de quitosana ativadas com genipina.

### **2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Imobilizar pectinases em esferas de quitosana ativadas com genipina;
- Caracterizar o biocatalisador preparado com relação a sua atividade e estabilidade térmica;
- Avaliar a estabilidade operacional dos biocatalisadores na clarificação de sucos de frutas em processos em batelada;
- Desenhar reatores enzimáticos com diferentes dimensões geométricas para aplicação na clarificação contínua de suco de frutas;
- Avaliar o efeito de diferentes geometrias dos reatores no processo de clarificação dos sucos de frutas.
- Avaliar a estabilidade operacional dos biocatalisadores no processo de clarificação contínuo de suco de frutas.

## CAPITULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 – ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

O início do uso comercial de enzimas pectinolíticas é datado da década de 1930, na preparação de sucos de frutas e vinhos. Com o avançar dos anos, na década de 1960 é que os pesquisadores puderam entender de maneira mais completa a natureza química e as interações entre as enzimas e o tecido vegetal. Como resultado, as enzimas pectinolíticas são, hoje, uma das principais enzimas comerciais utilizadas na indústria alimentícia (BHAT, 2000; KASHYAP et al., 2001).

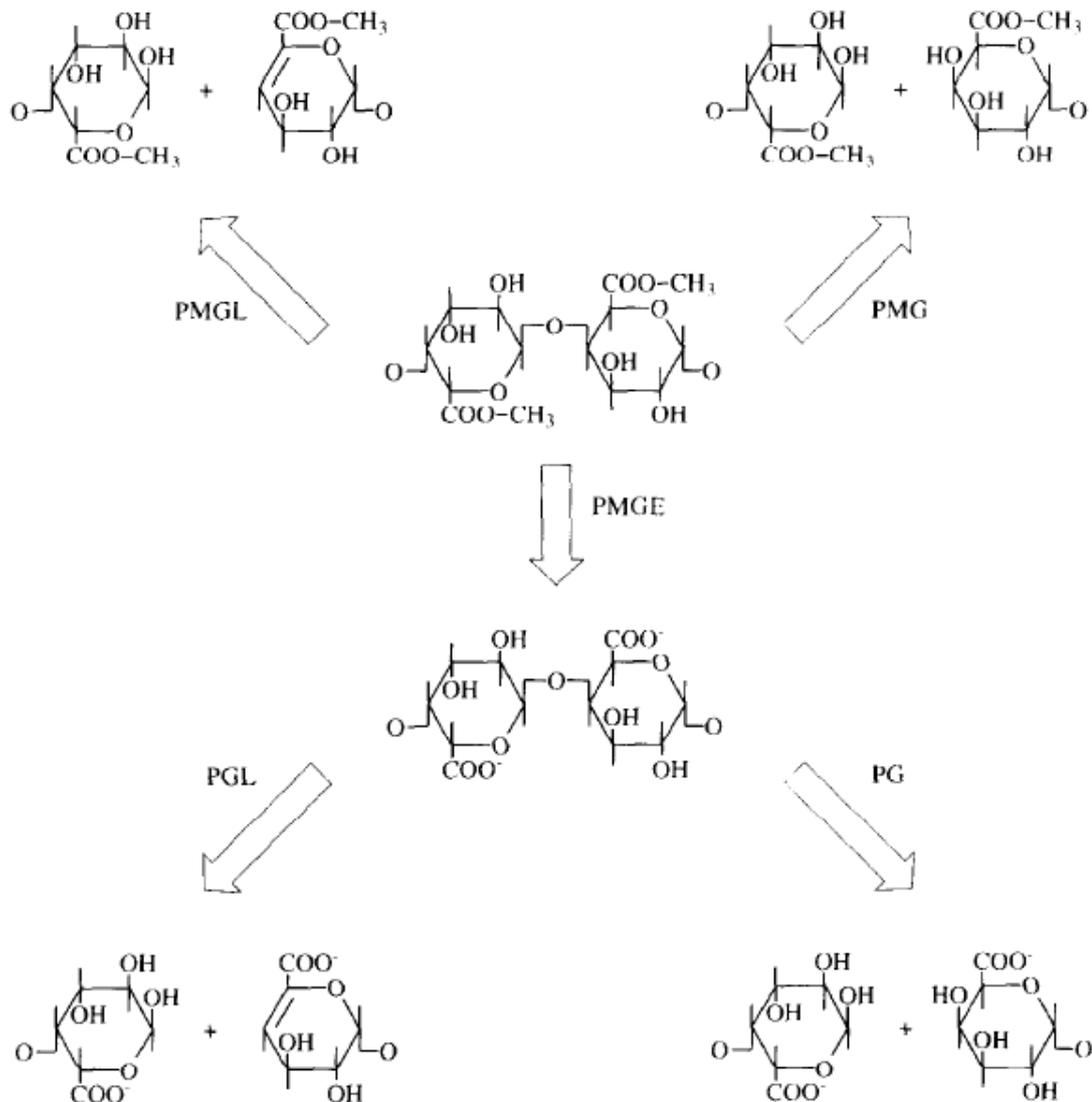
As enzimas pectinolíticas ou pectinases são enzimas capazes de quebrar complexos polissacarídeos do tecido vegetal e transforma-los em moléculas menores, como o ácido galacturônico (KASHYAP et al., 2001). Seu uso comercial na clarificação de sucos e vinhos já é bastante difundido e estudado (BHAT, 2000). Em sucos, são utilizadas tanto para aumentar a extração dos sucos como para a clarificação (KASHYAP et al., 2001).

As pectinases podem ser classificadas em diferentes grupos, de acordo com a forma que agem na cadeia da estrutura da pectina (ALKORTA et al., 1998). São observados três principais aspectos para a classificação das pectinases (KASHYAP et al., 2001):

- Substrato de preferência: pectina, ácido péctico ou oligo-D-galacturonato;
- Forma de ação: trans-eliminação ou hidrólise;
- Ordem de ação: aleatória (endo-) ou específica (exo-)

Dessa forma, as pectinases podem ser divididas em três principais grupos, sendo eles: pectinesterases (PE), pectinases despolimerizantes (como as poligalacturonases (PG), as polimetilgalacturonases (PMG), as polimetilgalacturonato liases (PMGL), as poligalacturonato liases (PGL) e as protopectinases (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; TAPRE; JAIN, 2014; WHITAKER, 1984). Um esquema representando a ação das pectinases é visto na Figura 1 a seguir.

Figura 1 - Modo de Ação Enzimático das Despolimerases Mais Frequentes na Molécula de Pectina.

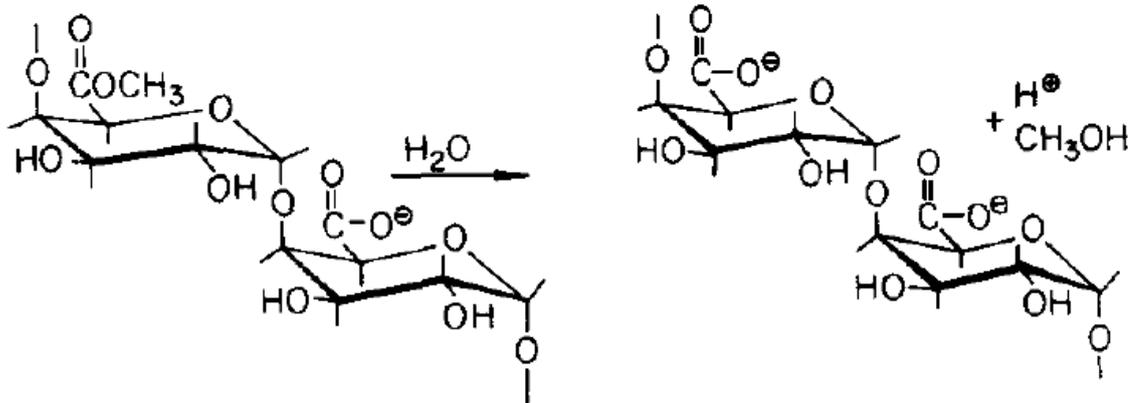


Fonte: Alkorta et al. (1998).

### 3.1.1 – PECTINESTERASES (PE)

As pectinesterases, também chamadas de pectinametil esterase, catalisam a desesterificação do grupo metoxila da pectina, formando o ácido péctico (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KASHYAP et al., 2001). É uma esterase de ácido carboxílico e pertence ao grupo de hidrolases. A reação catalisada é conhecida por estar de acordo com a figura 2 a seguir.

Figura 2 - Reação de Catálise Realizada pelas Pectinesterases



Fonte: Whitaker (1984).

O modo de ação das PEs varia de acordo com sua origem. As PEs fúngicas atuam por um mecanismo de múltiplas cadeias, removendo os grupos metil aleatoriamente. Em contraste, as PEs de plantas tendem a atuar na extremidade não redutora ou próximo a um grupo carboxila livre e prosseguir ao longo da molécula por um mecanismo de cadeia única (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Estas enzimas tem sua atividade máxima em pectinas 65 % a 75 % metiladas, uma vez que a enzima atua preferencialmente em um grupo éster metílico de uma unidade de galacturonato próximo a uma unidade de galacturonato não esterificado (WHITAKER, 1984).

### 3.1.2 - PECTINASES DESPOLIMERIZANTES

As pectinases despolimerizantes são aquelas pectinases capazes de romper as ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  entre os monômeros galacturônicos em substâncias pecticas por hidrólise (Hidrolases) ou por  $\beta$ -eliminação (Liasas) (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; UENOJO; PASTORE, 2007).

#### 3.1.2.1 - HIDROLASES

As pectina hidrolases também são divididas em dois principais grupos, de acordo com o substrato principal de ação. Quando elas atuam preferencialmente no ácido pectico, são chamadas de poligalactouranases (PG) ou então podem atuar diretamente na molécula de pectina, e são chamadas de polimetilgalacturonases

(PMG) (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; UENOJO; PASTORE, 2007). Elas são as mais extensivamente estudadas entre a família das enzimas pectinolíticas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As poligalactouranases (PG) são as enzimas responsáveis pela catálise da hidrólise de ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$ -glicosídicas em ácido péctico (ácido poli-galacturônico). Estas, então, se dividem em dois grupos, de acordo com a ordem de ação. Podem ser Endo-PG, quando agem de maneira aleatória, ou podem ser Exo-PG quando agem especificamente, catalisando a hidrólise de uma forma sequencial de ligações  $\alpha(1,4)$ -glicosídicas no ácido péctico (KASHYAP et al., 2001).

Quanto às enzimas classificadas como polimetilgalacturonases (PMG), estas também catalisam a clivagem hidrolítica de ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$ -glicosídicas, porém não fazem distinção se o radical éster da cadeia está metoxilado. Eles podem ser Endo-PMG, quando clivam de maneira aleatória ou Exo-PMG, quando causam a clivagem sequencial da ligação  $\alpha(1\rightarrow4)$ -glicosídica da pectina nas extremidades não redutoras da cadeia da pectina (KASHYAP et al., 2001).

### **3.1.2.2 – LIASES**

As liases, também chamadas de trans-eliminases, são enzimas pectinolíticas que promovem a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  por trans-eliminação, resultando em em galacturonídeo com uma ligação insaturada entre C4 e C5 na extremidade não redutora do ácido galacturônico formado (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KASHYAP et al., 2001). Estas podem ser classificadas da mesma maneira que as hidrolases, de acordo com o substrato de preferência. Então, as polimetilgalacturonato liases (PMGL) são as enzimas que promovem a catálise da degradação da pectina por clivagem trans-eliminativa. Estas podem ser Endo-PMGL quando agem de maneira aleatória ou Exo-PMGL quando agem de maneira específica. Além disto, existem as poligalacturonato liases (PGL) que catalisam a clivagem da ligação glicosídica  $\alpha(1\rightarrow4)$  em ácido péctico por trans-eliminação. Da mesma forma, existem as Endo-PGL e Exo-PGL, seguindo a mesma lógica das demais (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001).

### **3.1.3 – PROTOPECTINASES**

As protopectinases são as enzimas capazes de solubilizar a fração insolúvel da pectina, conhecida por protopectina. Estas são capazes de promover a solubilização,

liberando pectina solúvel e altamente polimerizada (ALKORTA et al., 1998; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KASHYAP et al., 2001). Podem ser divididas em dois tipos:

- Tipo A: que reagem com a região de ácido poligalacturônico da protopectina;
- Tipo B: que reage com as cadeias polissacarídicas que conectam o ácido poligalacturônico e os constituintes da parede celular (ALKORTA et al., 1998).

### **3.2 APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM SUCOS**

A aplicação de enzimas no tratamento de sucos é uma prática já consolidada há muitas décadas e visa atuar de diversas maneiras para ganhos de rendimento, melhorias tecnológicas e alterações sensoriais (UENOJO; PASTORE, 2007; WHITAKER, 1984). Os preparados enzimáticos para aplicação em sucos geralmente são compostos por diferentes tipos de enzimas (pectinases, celulasas e hemicelulasas) pois seus usos combinados geram melhores resultados nos processos, uma vez que o efeito sinérgico promovido por diferentes enzimas é mais vantajoso do que o efeito produzido por apenas uma enzima purificada (SANKARAN et al., 2015). Olsen (1995) lista as principais utilizações de enzimas no processamento de sucos como sendo:

- Melhorar o rendimento do suco;
- Liquefazer a fruta inteira para utilização máxima da matéria-prima;
- Melhorar a cor e o aroma;
- Clarificar o suco;
- Hidrolisar todos os carboidratos insolúveis (pectina, amido, celulose e hemicelulose);

A aplicação de enzimas no processamento de sucos desempenha um papel fundamental em várias etapas. Na maceração, enzimas como pectinases, celulasas e hemicelulasas são usadas para melhorar a extração de sucos, aumentando o rendimento (KAUR; KUMAR; SATYANARAYANA, 2004; MIESZCZAKOWSKA-FRĄC, 2011). Além disso, a ação das enzimas promove a liberação de compostos bioativos ligados a polissacarídeos nas paredes celulares das frutas (BAUTISTA-ORTIN et al.,

2005; SOWBHAGYA; CHITRA, 2010). Outra aplicação é a utilização de  $\beta$ -glicosidases para extrair compostos aromáticos, melhorando o sabor e a qualidade sensorial do suco, especialmente em vinhos (BHAT, 2000; DAROIT et al., 2007).

Além disso, uma das principais aplicações de enzimas em sucos é na etapa de clarificação. Para esta etapa, uma mistura de pectinases - pectina liase, poligalacturonase (PG) e pectina metilesterase (PE) - devem estar presentes (OLSEN, 1995). Durante a etapa de maceração, partículas da fruta migram para a polpa, gerando aumento da viscosidade e da turbidez do produto final (KASHYAP et al., 2001). A turbidez é causada especialmente pela presença de polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina, lignina e amido) (VAILLANT et al., 2001; WHITAKER, 1984). Estas partículas se apresentam, majoritariamente, como substâncias coloidais, cuja estrutura consiste em um núcleo positivo cercado por moléculas de pectina com carga negativa. A degradação da pectina permite uma atração entre as moléculas, formando partículas de maior peso molecular que, com o tempo, tendem a precipitar. A precipitação também pode ser auxiliada por agentes flocculantes como bentonite, gelatina entre outros (KASHYAP et al., 2001; SIMPSON; RUI; KLOMKLAO, 2012). Desta forma, a utilização de enzimas, em especial as pectinases, na etapa de clarificação de sucos, para auxiliar na precipitação das partículas coloidais revestidas por pectina, se faz bastante interessante e é conhecida por ter sido primeira aplicação comercial de enzimas em sucos de frutas (UENOJO; PASTORE, 2007).

Além disso, enzimas pectinolíticas foram relatadas por Alkorta et al. (1998) como capazes de reduzir significativamente a viscosidade de sucos, oferecendo vantagens em processos sensíveis à alta viscosidade, como a concentração. Nesse caso, a abundância de polissacarídeos pode obstruir filtros, dificultar a extração de água e retardar o processamento.

Em suma, as enzimas desempenham um papel crucial na otimização do processamento de sucos de frutas, desde a extração até a clarificação e aprimoramento sensorial.

### **3.3 – ENZIMAS IMOBILIZADAS**

Mais de 3.000 diferentes enzimas têm sido identificadas e muitas isoladas em sua forma pura. As enzimas podem ser encontradas em células animais ou de plantas, bem como em microrganismos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). As enzimas são catalisadores naturais que aceleram o alcance do equilíbrio em reações

(HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009). Além de catalisadores naturais, as enzimas são biodegradáveis, biocompatíveis e derivam de fontes renováveis (SHELDON; VAN PELT, 2013). A utilização de enzimas também é bastante valorizada por sua especificidade, por não oferecer sérios riscos ambientais, por serem mais economicamente eficientes e, por consequência, mais sustentáveis (SHELDON, 2007).

Entretanto, o uso industrial de enzimas sofre com a dificuldade operacional, com relação a estabilidade durante os processos, a possibilidade de recuperação e impossibilidade da adoção de processos contínuos, uma vez que as enzimas, em sua maioria, se apresenta na forma de solução aquosa (ASGHER et al., 2014; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009; SHELDON; VAN PELT, 2013). Como forma de resolver tais questões, a imobilização de enzimas surge como uma alternativa viável (GARCIA-GALAN et al., 2011; HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009; SHELDON, 2007).

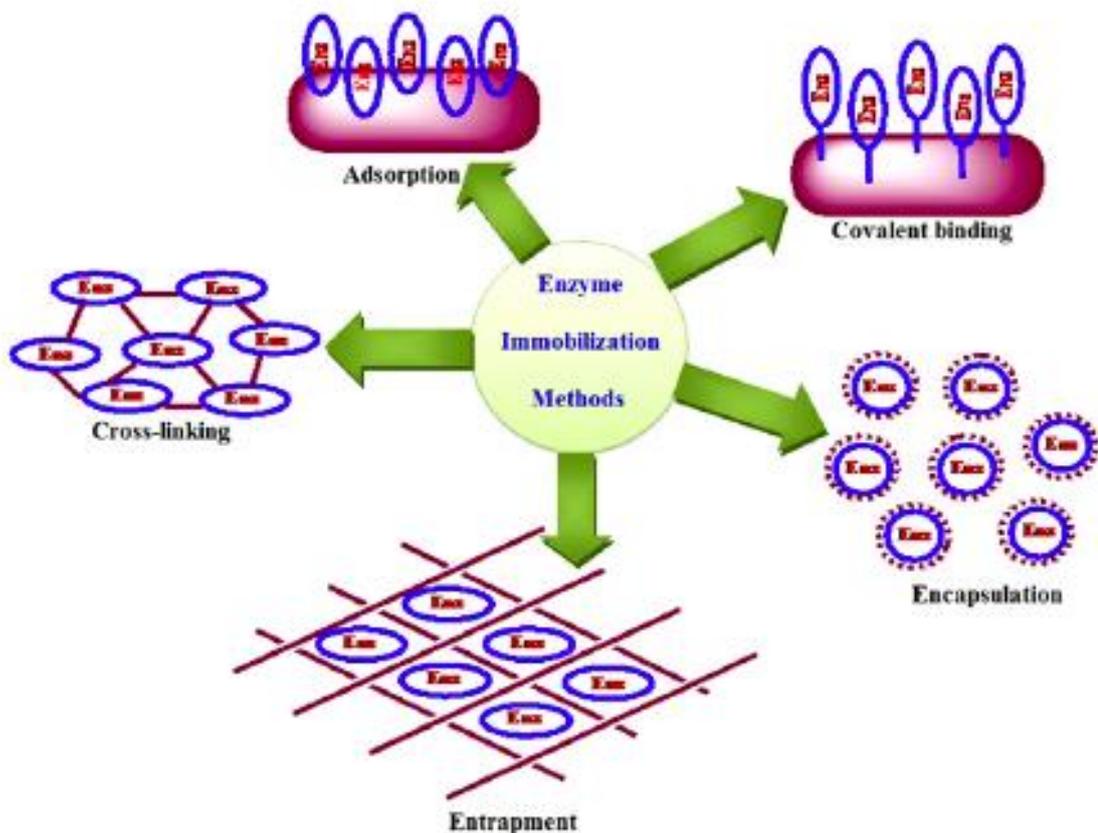
A imobilização de enzimas consiste na ligação entre a enzima e um suporte, seja por meio de ligação superficial ou por encapsulamento, ou da junção de várias enzimas, na forma de um agregado enzimático (crosslinking), formando partículas sólidas de maior tamanho. De todos os modos, a imobilização de enzimas consiste em tornar os preparados enzimáticos, até então em fase aquosa, em partículas sólidas (GARCIA-GALAN et al., 2011; SHELDON, 2007; SHELDON; VAN PELT, 2013).

A imobilização permite uma utilização mais conveniente das enzimas, na forma de um sólido, facilitando a separação do meio aquoso, minimizando ou eliminando o risco de contaminação do meio (reduzindo a alergenicidade) (SHELDON; VAN PELT, 2013). Além disso, a imobilização concede a possibilidade de separação das partículas imobilizadas e futuras reutilizações (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009). Tal característica apresenta significativa vantagem financeira (SHELDON; VAN PELT, 2013).

No processo de imobilização, precisam ser levadas em conta as propriedades da enzima, do material de suporte e do agente de ativação (usado em alguns casos para facilitar a ligação entre a enzima e o suporte) (ASGHER et al., 2014). Em se tratando de imobilizações em um suporte, deve-se considerar a necessidade de uma boa área superficial (seja com partículas pequenas ou materiais porosos). Além disso, o material de suporte precisa ser química e mecanicamente estável (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (ASGHER et al., 2014; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). A figura 3 a seguir ilustra os tipos de imobilizações de enzimas.

Figura 3 - Métodos Básicos de Imobilização de Enzima.



Fonte: Asgher et al. (2014).

Como não há nenhuma abordagem direta para escolher o melhor método de imobilização para uma determinada enzima, isso deve ser determinado experimentalmente (LIESE; HILTERHAUS, 2013). De acordo com Garcia-Galan et al. (2011), a utilização de suportes sólidos para a imobilização de enzimas é um dos métodos mais difundidos atualmente. Dal Magro et al. (2021) estudaram a imobilização de enzimas pectinolíticas voltadas à clarificação de sucos e obtiveram resultados satisfatórios com a utilização de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas. Além disto, Flores et al. (2018) utilizaram a genipina como

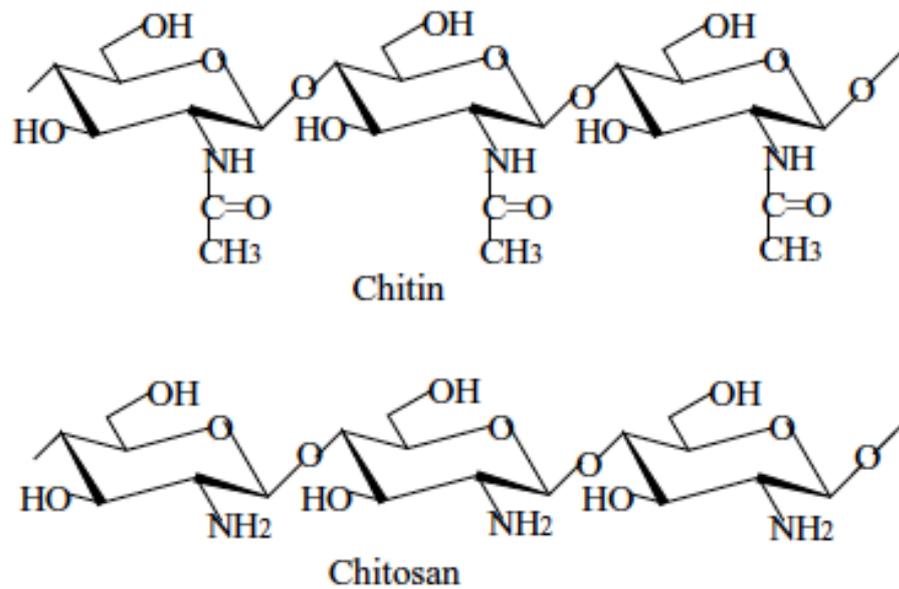
agente de ativação de esferas de quitosana para a imobilização de enzimas e também obtiveram resultados satisfatórios. Desta forma, a abordagem deste trabalho, no que diz respeito à imobilização de enzimas pectinolíticas, será voltada para a utilização de quitosana como suporte de imobilização e genipina como agente de ativação.

### 3.3.1 - QUITOSANA COMO SUPORTE

A quitosana (poli- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-amino-2-desoxi-D-glicose) é um biopolímero natural proveniente da de-acetilação da quitina (ADRIANO et al., 2008; FANG et al., 2009; KRAJEWSKA, 2004). É considerado, junto com a celulose, um dos biopolímeros mais abundantes e de mais fácil obtenção (FANG et al., 2009). Devido a esta característica, a quitosana tem grande disponibilidade comercial e baixo custo (FANG et al., 2009; KRAJEWSKA, 2004).

Em suas cadeias lineares de poliglucosamina de alto peso molecular, a quitosana possui grupos amino e hidroxila reativos, passíveis de modificações químicas. Os grupos amino fazem da quitosana um polieletrólito catiônico ( $pK_a \approx 6.5$ ), um dos poucos encontrados na natureza. Essa basicidade dá à quitosana propriedades singulares: a quitosana é solúvel em meio ácido aquoso a  $pH < 6.5$  e, quando dissolvida, possui alta carga positiva nos grupos  $-NH_3^+$  (BIRO et al., 2008; KRAJEWSKA, 2004; LEI; BI, 2007; LI et al., 2007). A estrutura molecular da quitina e da quitosana é demonstrada na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura da Quitina e Quitosana



Fonte: Krajewska (2004).

Por conta de sua estrutura, a quitosana oferece uma série de características importantes para a sua utilização como suporte em imobilização de enzimas: biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, propriedades antibacterianas, quelação de íons de metais pesados, propriedades de formação de gel e hidrofiliçidade e notável afinidade para proteínas (GRENHA, 2012; IBRAHIM et al., 2023; XIE; WANG, 2012).

As partículas de quitosana podem ser formadas por diversos métodos, como precipitação, reticulação por emulsão, secagem por pulverização, gelificação ionotrópica, coalescência e método micelar reverso. Seus grupos reativos amino e hidroxila - após modificações químicas - possibilitam o acoplamento de enzimas (IBRAHIM et al., 2023). Portanto, a quitosana é frequentemente usada como material de suporte para imobilização de enzimas (BAI et al., 2023; ESPARZA-FLORES et al., 2023; PINHEIRO et al., 2023).

A quitosana pode ser facilmente reticulada por reagentes como o glutaraldeído para formar aquagéis rígidos. Na verdade, a quitosana tem se mostrado um suporte superior para a imobilização da enzima, em comparação com polissacarídeos como o alginato (LEI; BI, 2007). Estudos recentes mostram que a quitosana exibiu uma considerável capacidade de ligação a proteínas e uma alta recuperação da atividade enzimática, permitindo que a enzima imobilizada nela permanecesse

consideravelmente ativa. Além disso, experimentos mostraram que a pectinase imobilizada no suporte de quitosana exibe uma resistência melhorada contra a desnaturação térmica e de pH (DAL MAGRO et al., 2021; LEI; BI, 2007).

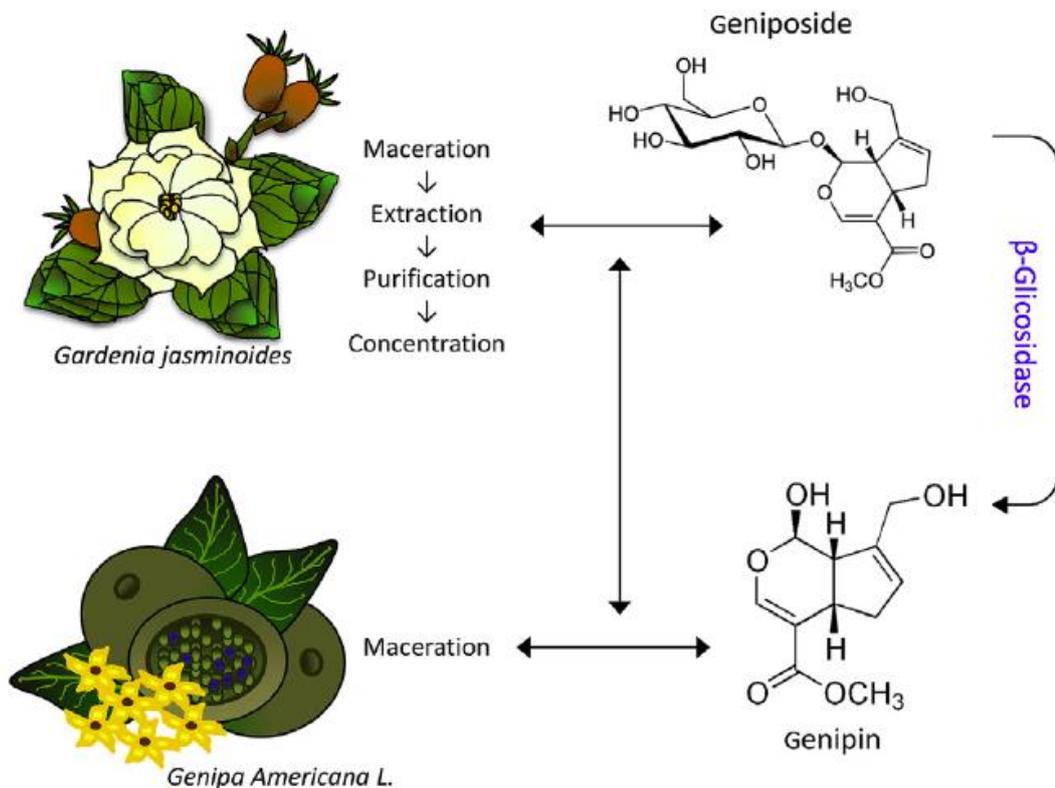
### 3.3.2 - GENIPINA COMO AGENTE DE ATIVAÇÃO

Polímeros biodegradáveis, como a quitosana, que possuem grupamentos amino disponíveis para a imobilização de enzimas, podem ter estes grupamentos modificados pela introdução de reagentes bifuncionais que promovem a ligação cruzada entre a enzima e o suporte (LEI; BI, 2007; MUZZARELLI, 2009). Os reagentes, tais como glutaraldeído, tripolifosfato, etilenoglicol, éter diglicídico e diisocianato, têm sido empregados na realização deste processo de entrecruzamento. Contudo, pesquisas indicaram que esses agentes de entrecruzamento sintéticos apresentam algum grau de citotoxicidade e podem comprometer a biocompatibilidade do sistema (CAVELLO; CONTRERAS-ESQUIVEL; CAVALITTO, 2014; MUZZARELLI, 2009; NERI-NUMA et al., 2017).

Sendo assim, muitos estudos buscam encontrar um agente de ativação natural e com baixa toxicidade. A genipina é um composto que pode ser extraído da fruta do jenipapo (*Genipa americana* L), que cresce naturalmente nas terras baixas da floresta amazônica e outras partes da América Latina, e dos frutos de *Gardenia jasminoides* Ellis (*Gardenia augusta* Merrill), uma planta com flores perenes da Ásia (BELLÉ et al., 2018; BRAUCH et al., 2016; HOBBS et al., 2018; NERI-NUMA et al., 2017; RAMOS-DE-LA-PEÑA et al., 2015). É um composto incolor da classe dos monoterpenos, caracterizado pela presença de uma unidade ciclopentanoide fundida com um anel dihidropirano cujo grupo hidroxila na posição C1 do anel genipina pirano pode ser substituído por frações 1-2 formando os glicosídeos de genipina: genipina-1-O- $\beta$ -glucosídeo (geniposídeo) e genipina-1-O- $\beta$ -D-gentibiosídeo, respectivamente (DINDA; DEBNATH; HARIGAYA, 2007). Particularmente, os frutos de gardênia apresentam a forma glicosilada (geniposídeo), necessitando de tratamento enzimático com  $\beta$ -glicosidase para liberar a aglicona, enquanto os frutos de jenipapo possuem genipina livre (NERI-NUMA et al., 2017). A extração assistida por enzima pode ser usada tanto para romper a parede celular para expor os componentes de interesse, quanto para hidrolisar a fração de açúcar, liberando assim glicose do geniposídeo para formar genipina. Diferentes enzimas têm sido utilizadas para esse fim (BELLÉ et al., 2018). A genipina pode ser obtida a partir de jenipapo por meio de extração de

solvente orgânico, incluindo etapas de purificação bastante complexas. A extração deve ser conduzida de maneira muito cuidadosa pois proteínas liberadas pelos extratos podem reagir, levando à reticulação da genipina antes da recuperação, resultando na formação da coloração azul, indesejada (RAMOS-DE-LA-PEÑA et al., 2015). A figura 5 a seguir esquematiza os métodos de obtenção da genipina.

Figura 5 - Métodos de Obtenção da Genipina



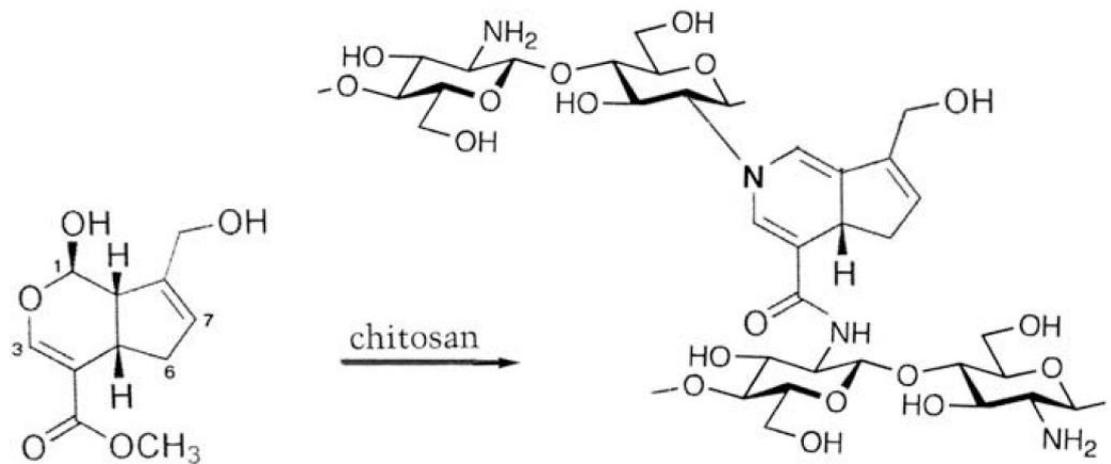
Fonte: Neri-Numa et al. (2017).

A genipina tem a capacidade de gerar ligações cruzadas espontaneamente com proteína, colágeno, gelatina e quitosana (HOBBS et al., 2018). Devido à sua capacidade natural de reticulação, a genipina foi investigada como uma alternativa ao glutaraldeído como agente de ativação das esferas de quitosana, uma vez que, em comparação com o glutaraldeído, a genipina pode ser de significativamente menos citotóxica (BELLÉ et al., 2018; NERI-NUMA et al., 2017). Os mecanismos de reação de reticulação entre a quitosana e a genipina são diferentes em diferentes valores de pH:

- **Em condições ácidas e neutras:** a genipina atua como um dialdeído, mas seus produtos de condensação são muito mais estáveis em comparação com o glutaraldeído. No produto, cadeias curtas de genipina condensada atuam como pontes de reticulação (DELMAR; BIANCO-PELED, 2015; MUZZARELLI, 2009).
- **Sob condições básicas:** a reação de abertura do anel da genipina ocorre por meio de um ataque nucleofílico por íons hidroxila em solução aquosa para formar grupos aldeído intermediários, que subsequentemente sofrem condensação aldólica. Os grupos aldeído terminais na genipina polimerizada sofrem uma reação de Schiff com os grupos amino na quitosana para formar redes reticuladas (DELMAR; BIANCO-PELED, 2015; MUZZARELLI, 2009).

Delmar & Bianco-Peled (2015) avaliaram os parâmetros de pH e tempo de reação na formação de géis de quitosana-genipina e puderam concluir que a alteração do pH da solução de quitosana, mesmo em meio ponto de pH, provoca um efeito significativo no tempo de gelificação e nas propriedades do gel. A velocidade da reação aumenta com a elevação do pH. A eficiência da reação é influenciada pelo valor do pH, uma vez que os grupamentos amino protonados não são livres para reagir com a genipina. Além disso, Delmar & Bianco-Peled (2015) observaram que o tempo é um fator importante na criação de hidrogéis de quitosana reticulados com genipina. As figuras 6 e 7 demonstram os mecanismos de reação da genipina com a quitosana em meio ácido/neutro e em meio básico, respectivamente.

Figura 6 - Mecanismo de Reação Entre Genipina e Quitosana em pH Ácido/Neutro

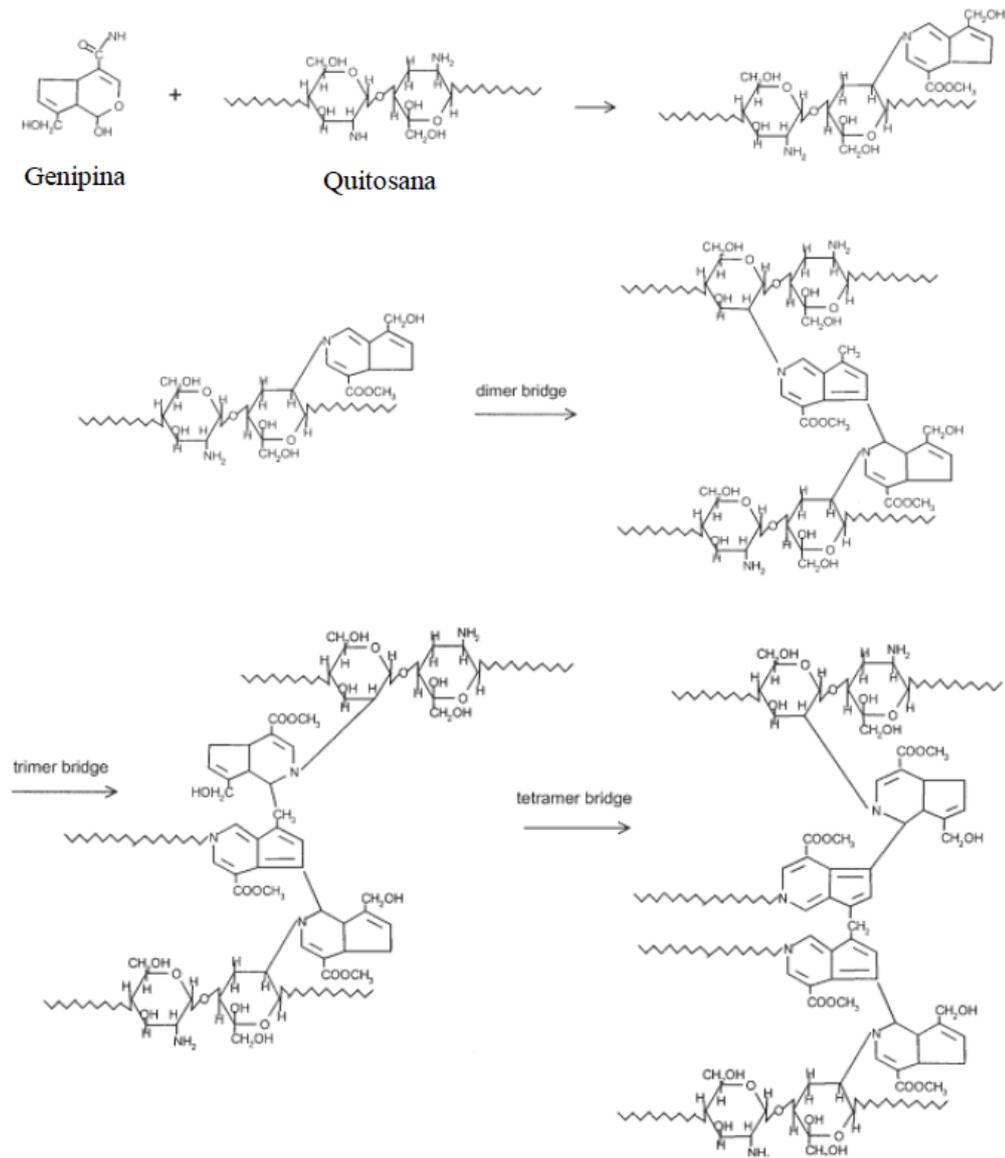


Fonte: Muzzarelli (2009).

Flores et al. (2018) avaliaram a utilização de genipina como agente de entrecruzamento para a imobilização de enzimas em esferas de quitosana, obtendo resultados satisfatórios para a imobilização de beta-galactosidase.

Dessa forma, a genipina apresenta as características necessárias para sua utilização como agente de ativação das esferas de quitosana na imobilização de enzimas, como a baixa toxicidade quando comparada ao glutaraldeído (NERI-NUMA et al., 2017), maior estabilidade da reação enzimática (MUZZARELLI, 2009) e fácil obtenção a partir de fontes naturais (BELLÉ et al., 2018).

Figura 7 - Mecanismo De Reação Entre Genipina e Quitosana em pH Alcalino



Fonte: Adaptado de Mi, Shyu & Peng (2005).

### 3.4 – BIORREATORES ENZIMÁTICOS CONTÍNUOS

A utilização de enzimas imobilizadas visando um maior controle do processo enzimático e a possibilidade de recuperação dos catalisadores para futura reutilização já é bastante estudada e difundida. Entretanto, é de interesse, principalmente visando processos industriais, a possibilidade de utilização destas enzimas imobilizadas em processos contínuos (DAL MAGRO et al., 2021; DIANO et al., 2008; KOSSEVA et al., 2009). Os reatores contínuos utilizando enzimas podem ser de diferentes tipos e apresentar diferentes configurações, entretanto, os modelos mais utilizados são os reatores de fluxo pistonado, também chamados de reatores em coluna como os

reatores de leito fixo (PBR - Packed-bed reactors) e os de leito fluidizado (FBR - Fluidized-bed reactors) (KOSSEVA et al., 2009).

- **REATORES DE LEITO FIXO (PBR- Packed Bed Reactor):** Este tipo de reator, também chamado de reator de fluxo em pistão, contém um leito sedimentado de partículas de enzimas imobilizadas (GUEGUEN et al., 1997). É o tipo de reator mais frequentemente empregado para sistemas imobilizados. Quando o biocatalisador está na forma de esferas, chips, discos, folhas, grânulos ou pellets, ele pode ser prontamente empacotado em uma coluna (KOSSEVA et al., 2009; POPPE et al., 2015). Esses reatores são preferidos em relação a outros tipos de reatores devido à tecnologia mais simples, alto volume de leito, facilidade de operação e aumento de escala (DAL MAGRO et al., 2021; KOSSEVA et al., 2009; LAUDANI et al., 2007; LORENZONI et al., 2015). Esses reatores são adequados para uso em escala industrial, pois possuem maior área superficial por unidade de volume de reação, menor custo operacional e os danos do biocatalisador são minimizados devido ao menor cisalhamento em relação aos reatores de leito fluidizado (DAL MAGRO et al., 2021; WATANABE et al., 2001). Conforme Grosová et al. (2008), a principal dificuldade dos PBRs é que a temperatura ou o pH não são facilmente regulados.
- **REATORES DE LEITO FLUIDIZADO (FBR – Fluidized Bed Reactor):** Neste tipo de reator o biocatalisador imobilizado é mantido em suspensão pela recirculação do ar ou da solução do substrato no sistema com a entrada no fundo do reator, proporcionando a livre circulação das partículas em todo o leito, evitando a decantação das partículas com enzima imobilizada na parte inferior do reator (DAL MAGRO et al., 2021; GUEGUEN et al., 1997; KOSSEVA et al., 2009). As partículas são retidas por um equilíbrio hidrodinâmico entre a gravidade e as forças de arrasto promovidas pelo fluxo ascendente do substrato (CAPPANNELLA et al., 2016; ILLANES; ILLANES, 2008; VAN ZESSEN et al., 2005). O reator permite o movimento livre das partículas de catalisador ao longo do leito. Os FBRs oferecem a vantagem de uma boa mistura sólido-fluido e quedas de pressão mínimas (KOSSEVA et al., 2009).

Conforme observado em alguns estudos, uma das principais desvantagens do reator de leito fixo é a possibilidade de partículas presentes no substrato líquido fluindo através do reator obstruírem poros do material que compõe o leito, criando caminhos preferenciais para escoamento e dificultando a reação enzimática. Diano et al. (2008) trabalharam com a clarificação de sucos de maçã com reatores de leito fixo e reatores de leito fluidizado e puderam observar que, devido à grande quantidade de partículas em suspensão na matéria-prima, os reatores de leito fixo acabavam por apresentar acúmulo de sedimentos, impedindo a completa circulação no reator. Da mesma forma, Dal Magro et al. (2021) avaliaram a clarificação de sucos de laranja com a utilização de reatores de leito fixo e leito fluidizado e puderam observar o mesmo fenômeno. Kosseva et al. (2009) sugerem que uma das vantagens dos reatores de leito fluidizado seria o fato de que estes não necessitam de tratamento prévio (como uma etapa de filtração para evitar o acúmulo de partículas). Roy & Gupta (2003) observaram que leitos fluidizados oferecem um *design* atraente para reatores enzimáticos, especialmente quando se trata de fluidos de substrato não clarificados. Além disso, Gómez et al. (2007) indicaram que um reator de leito fluidizado (FBR) é especialmente recomendado quando os substratos são viscosos ou contêm partículas suspensas.

Vários estudos relataram a aplicação ampla e bem-sucedida de FBRs na indústria de alimentos, por exemplo, para clarificação de suco de maçã (DIANO et al., 2008), a produção de fruto-oligossacarídeos e açúcares invertidos (LORENZONI et al., 2015), hidrólise de lactose (ROY; GUPTA, 2003), o realce de sabor de bebidas (GUEGUEN et al., 1997), a clarificação de sucos de laranja (DAL MAGRO et al., 2021) e outras reações catalíticas (SAPONJIC et al., 2010). Os benefícios derivam do modo operacional contínuo, bem como da transferência de massa aprimorada (LORENZONI et al., 2015). Entretanto, alguns parâmetros sobre o funcionamento de biorreatores enzimáticos dependem de propriedades geométricas do reator, desta forma este trabalho buscará avaliar de que maneira o funcionamento do biorreator é influenciado pela sua geometria.

### **3.4.1 – FLUIDODINÂMICA DE REATORES DE LEITO FIXO**

A viabilidade industrial de processos biocatalíticos enzimáticos é dependente da eficiência da imobilização, da estabilidade operacional e da produtividade. É

interessante desenvolver um reator bioquímico eficiente, buscando reduzir as limitações hidrodinâmicas e assim produzir uma alta capacidade de operação por um longo tempo operacional (LOZANO et al., 1990). Compreender a hidrodinâmica dos reatores de leito fixo é essencial para escolher os parâmetros operacionais corretos para melhores resultados no processo catalítico (ZIMMERMANN; TAGHIPOUR, 2005).

Alguns autores propõem modelagens matemáticas e simulações computadorizadas que visam compreender melhor a relação entre as partículas que compõe o reator e o escoamento nos reatores de leito fixo (JONDHALE et al., 2021; LI; CLERCX; TOSCHI, 2022). Li et al. (2022) desenvolveram modelos matemáticos para avaliar a eficiência de conversão usando diferentes orientações do leito fixo e puderam observar que a eficiência de conversão do reator é sensível à forma, orientação e tamanho dos grânulos e à porosidade do reator de leito fixo.

Além disso, Jondhale et al. (2021) estudaram a influência da geometria convergente e divergente das partículas na distribuição da queda de pressão em leitos aleatoriamente compactados e observaram que a queda de pressão em leitos fixo com partículas cilíndricas é maior em comparação com a queda de pressão com partículas esféricas. Apesar da observação quanto a geometria das partículas, não foram avaliados parâmetros geométricos do reator.

Donato et al. (2016) observaram que, dentre outros fatores, o parâmetro adimensional  $L$  (altura)/ $r$  (raio), chamada de razão de aspecto do construto, de um reator pode influenciar na má distribuição do fluxo no interior do reator de leito fixo.

Entretanto, até o presente momento não foram encontrados registros de trabalhos na literatura que tenham avaliado de que forma a geometria do reator de leito fixo pode interferir no processo enzimático. Sendo assim, com base no observado por alguns pesquisadores, a relação entre o diâmetro do reator e a homogeneidade do escoamento passam a ser de interesse deste estudo, que se propõe a avaliar de que forma, para um mesmo tempo de residência, como a variação na geometria do reator pode interferir no desempenho da reação catalítica.

## CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 – MATERIAIS

A Novozymes generosamente forneceu a solução enzimática comercial (Pectinex Ultra pulp), que contém  $14.63 \pm 0.074$  mg/mL (mg de proteína por mL de preparação enzimática) com uma atividade enzimática específica de 49.18 U/mg de proteína. Pectina de maçã, ácido galacturônico e quitosana derivada de cascas de camarão com um nível de desacetilação de pelo menos 75 % foram adquiridas da Sigma Aldrich (St. Louis, MO). A extração da genipina foi realizada através da extração enzimática da fruta jenipapo (*Genipa americana*), conforme descrito no trabalho de Bellé et al. (2018). Os sucos de laranja e de uva frescos, obtidos sem nenhum processamento, foram gentilmente doados por Hugo Pietro de Caxias do Sul, RS, Brasil. Os biorreatores foram feitos sob medida por um fabricante especializado em vidraria localizado em Porto Alegre (Brasil), garantindo conformidade com as dimensões especificadas. Todos os outros produtos químicos e solventes utilizados nesta pesquisa eram de grau analítico.

### 4.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da pectinase foi feita pela hidrólise da pectina, utilizando uma solução de pectina com uma concentração de 1 mg/mL em um tampão de citrato 0.1 M a pH 4.8, no qual a presença de açúcares redutores liberados foi quantificada usando o método do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959). Para avaliar a atividade da enzima livre, um volume de 0.1 mL da enzima diluída foi misturado com 0.9 mL de uma solução de substrato. Para avaliar a atividade da enzima imobilizada, 5 esferas de biocatalisadores foram misturadas a 1 mL de solução de substrato. Uma unidade de atividade de pectinase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de grupos redutores, expressos como ácido galacturônico, por minuto a 37 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 4.3 – QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi determinada usando o método de Bradford, no qual 20  $\mu\text{L}$  da amostra foram misturados com 1 mL de reagente de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma vez alcançada a estabilidade da cor (5 min), as amostras foram medidas por espectrofotômetro a 595 nm. As absorbâncias foram então convertidas em concentração de proteína por meio da curva-padrão usando a albumina sérica bovina como padrão de proteína, de 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL.

#### **4.4 – PREPARAÇÃO DE ESFERAS DE QUITOSANA**

As esferas de quitosana foram preparadas conforme descrito por Flores et al. (2019). Uma solução de quitosana a 3 % (p/v) foi dissolvida em ácido acético a 2 % (p/v) por agitação mecânica e, em seguida, sonificada por 30 min para remover as bolhas de ar. A solução de quitosana foi gotejada em uma solução de NaOH 1 M sob agitação para coagulação. As esferas de quitosana formadas foram então lavadas com água destilada e armazenadas na geladeira até o uso.

#### **4.5 – INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVAÇÃO DAS ESFERAS DE QUITOSANA**

As esferas de quitosana foram ativadas com uma solução de genipina (0.1 % p/v). Para investigar a influência do pH na ativação das esferas de quitosana, foram testadas cinco diferentes soluções de pH (tampão citrato 0.1 M a pH 4,0 e 5,0 e tampão fosfato 0.1 M nos pHs 6,0, 8,0, 10,0 e 11,0) durante a etapa de ativação. O processo de ativação dos suportes de quitosana foi conduzido a uma temperatura de 60°C por 1 h (FLORES et al., 2019). Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

#### **4.6 – IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

A enzima, previamente diluída em solução de tampão, foi misturada com os suportes de quitosana ativados com genipina por 15 h à temperatura ambiente sob agitação suave em um agitador de rolos. Após esse período, as enzimas imobilizadas foram separadas da solução e lavadas com solução salina (NaCl 1 M), seguida por lavagens com solução de etilenoglicol (30 %, v/v) e finalmente lavadas com tampão citrato pH 4.8, 0.1 M para remover proteínas ligadas de forma não covalente.

Para o teste de pH de imobilização, 5 mL de solução de enzima pectinase misturada em tampão citrato 0.1 M (nos pHs 4.0 e 5.0) e tampão fosfato 0.1 M (nos pHs 6.0, 7.0 e 8.0) foram adicionados a 50 esferas de quitosana previamente ativadas com genipina. O processo de imobilização e lavagem das esferas foi realizado como indicado acima.

Para o teste de carga de proteína, 20 mL de solução de pectinase em tampão fosfato pH 8.0, 0.1 M foram adicionados a 200 esferas de quitosana, variando a concentração de proteína (25, 50, 100 e 200 mg de proteína por grama de suporte seco). O processo de imobilização e lavagem das esferas foi realizado como indicado acima.

Ao final, as enzimas imobilizadas foram analisadas quanto à atividade enzimática. Os parâmetros de imobilização foram definidos de acordo com Sheldon & Van Pelt (2013), como segue:

$$\text{Rendimento de Imobilização (\%)} = \frac{\text{Atividade Imobilizada (U)}}{\text{Atividade Inicial (U)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Eficiência de Imobilização (\%)} = \frac{\text{Atividade do Biocatalisador (U)}}{\text{Atividade Imobilizada (U)}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Atividade Recuperada (\%)} = \frac{\text{Atividade do Biocatalisador (U)}}{\text{Atividade Inicial (U)}} \times 100 \quad (3)$$

A atividade imobilizada refere-se à diferença entre a atividade fornecida ao suporte e a atividade determinada nas frações de sobrenadante e lavagem. A atividade inicial é a atividade da enzima fornecida ao suporte. A atividade do biocatalisador é a atividade medida no suporte após a imobilização (SHELDON; VAN PELT, 2013).

#### 4.7 – ESTABILIDADE TÉRMICA

A estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foi determinada medindo a atividade residual dos biocatalisadores após a incubação em recipientes selados contendo tampão citrato (pH 4.8, 0.1 M) em um banho-maria termostaticamente controlado a 60°C. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

#### **4.8 – APLICAÇÃO DO BIOCATALISADOR**

Primeiramente, para avaliar a capacidade de clarificação das esferas ativadas com genipina (sem enzima), um teste foi conduzido utilizando 100 esferas incubadas em 20 mL de suco de fruta (laranja e uva) por 30 min a 40°C. Após o período de incubação, as amostras foram coletadas e então centrifugadas a 2700 x g por 2 min. A turbidez nas amostras foi determinada espectrofotometricamente, detectando a luz dispersa a 860 nm para suco de laranja (ANDERSON; SURVEY, 2005) e a 650 nm para suco de uva. A porcentagem de clarificação do suco foi calculada usando a Equação 4, que considera a turbidez inicial e final do suco.

$$\text{Percentual de Clarificação (\%)} = \frac{\text{Turbidez Inicial} - \text{Turbidez Final}}{\text{Turbidez Inicial}} \times 100 \quad (4)$$

A clarificação de suco de fruta foi realizada utilizando duas abordagens enzimáticas: enzima imobilizada e enzima livre. O sistema de enzima imobilizada envolveu o uso de 100 esferas de biocatalisador, pesando 50 mg em base seca, com uma atividade enzimática de 851 U/g, resultando em uma atividade enzimática total de 42.5 U. Essas esferas foram submetidas a uma incubação de 30 min a 40 °C em 20 mL de suco de fruta, compreendendo tanto as variedades de laranja quanto de uva. A clarificação com enzima livre utilizou 60 µL de Pectinex Ultrapulp (equivalente a 42.5 U de atividade enzimática) incubada em 20 mL de suco de fruta (suco de laranja e suco de uva, separadamente) também por 30 min a 40°C. Ao final do processo de clarificação, as amostras foram coletadas e analisadas conforme descrito anteriormente.

##### **4.8.1 – ESTABILIDADE OPERACIONAL EM BATELADA**

Para a estabilidade operacional da atividade enzimática, uma solução de pectina foi preparada com uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida, 50 esferas de biocatalisador foram adicionadas a 10 mL da solução de pectina. A reação foi conduzida por 15 min a 40 °C sob agitação. Os açúcares redutores produzidos foram então medidos usando o método DNS. Ao final, os biocatalisadores foram recuperados do meio de reação, lavados com tampão citrato pH 4.8, 0.1 M e então adicionados nova solução de substrato. A atividade enzimática de cada ciclo foi comparada em relação ao primeiro ciclo, sendo o primeiro ciclo considerado como 100 %. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A estabilidade operacional também foi investigada na clarificação de suco de fruta. Para isso, a enzima imobilizada foi avaliada por meio de ciclos em batelada, incubando 100 esferas de biocatalisador (50 mg em base de massa seca, 851 U/g) em 20 mL de suco de fruta (laranja e uva). Cada ciclo foi realizado por 30 min a 40 °C sob agitação. Ao final de cada ciclo, amostras foram coletadas, centrifugadas a 2700 × g por 2 min, e a turbidez foi medida espectrofotometricamente, como descrito anteriormente. Após cada ciclo, os biocatalisadores foram lavados com tampão citrato 0.1 M a pH 4.8 ou solução de NaCl 1M, seguido por uma lavagem com tampão citrato 0.1 M a pH 4.8, e então adicionados a nova amostra de substrato.

#### **4.8.2 – MEV – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em um microscópio de mesa Hitachi TM3000 (Tóquio, Japão) com ampliações de 60× e 180× e energia de 5 kEV para observar o efeito de cada tratamento de lavagem nos biocatalisadores.

#### **4.9 – BIORREATORES**

Foram fabricados cinco biorreatores para investigar duas potenciais variações relacionadas à geometria. Para manter um volume constante de 40 mL, os reatores A, B e C foram ajustados em termos de altura (L) e raio (r). Além disso, a influência da variação de altura no desempenho do biorreator foi examinada, com três configurações (B, D e E) apresentando o mesmo raio (0.80 cm), mas alturas diferentes (10, 20 e 30 cm). Informações detalhadas sobre as configurações do reator podem

ser encontradas na Tabela 1. Todos os cinco reatores foram encamisados para recirculação de água a uma temperatura controlada de 40 °C.

Tabela 1 – Especificações dos Biorreatores

Reactor	Radius (r) (cm)	Height (L) (cm)	Volume (mL)	Porosity	Amount of Biocatalysts (mg)	L/r ratio
A	0.64	31.5	40	0.37	1763.64	49.5
B	0.80	20	40	0.41	1777.27	24.9
C	1.13	10	40	0.37	1754.55	8.9
D	0.80	30	60	0.41	2236.36	37.4
E	0.80	10	20	0.37	650.91	12.5

Todos os cinco reatores foram preenchidos com biocatalisadores dispostos em uma configuração de leito empacotado. A quantidade específica de esferas necessárias para cada reator pode ser encontrada na Tabela 1 em base seca.

#### 4.10 – AVALIAÇÃO DA VAZÃO DE SUBSTRATO NO BIORREATOR

Este experimento teve como objetivo observar possíveis diferenças na eficiência de clarificação contínua entre os biorreatores. Utilizando uma configuração de leito fixo e ajustando as taxas de fluxo de acordo com a porosidade de cada reator (medida pelo volume de vazio preenchido com água), o tempo de residência foi padronizado. Isso permitiu uma comparação mais precisa do desempenho dos biorreatores em termos de clarificação contínua de suco de laranja. As taxas de fluxo e os tempos de residência estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Tempos de residência e taxas de fluxo para cada biorreator

RT (min)	Flow Rates (mL/min)				
	Reactor A	Reactor B	Reactor C	Reactor D	Reactor E
12.75	1.18	1.35	1.02	2.08	0.59
9.1875	1.63	1.87	1.41	2.88	0.82
5.625	2.67	3.06	2.31	4.71	1.33
2.5	6.00	6.90	5.20	10.60	3.00
1.25	12.00	13.80	10.40	21.20	6.00

0.625	24.00	27.60	20.80	42.40	12.00
0.50	30.00	34.50	26.00	53.00	15.00
0.42	36.00	41.40	31.20	63.60	18.00

A sigla "TR" representa os Tempos de Residência. As unidades estão em min para os tempos de residência e mL/min nas taxas de fluxo de cada reator. Para este experimento, uma bomba peristáltica (BP1-EG1.3 da ENGCO) foi utilizada. Um banho de circulação manteve a temperatura do sistema a 40 °C. As diferenças entre os reatores foram medidas pela eficácia da clarificação do suco de fruta através da medição da redução da sua turbidez. A análise da turbidez foi realizada espectrofotometricamente, medindo a absorvância em um comprimento de onda de 860 nm nas amostras coletadas. Antes da análise, as amostras foram centrifugadas a 2700 × g por 2 min, seguindo o procedimento descrito por Anderson & Survey (2005).

#### **4.11 – ESTABILIDADE OPERACIONAL EM REATOR CONTÍNUO**

Para avaliar a estabilidade do biocatalisador durante processos contínuos de clarificação, foram empregados experimentos específicos.

Como controle, o efeito das esferas ativadas com genipina no processo de clarificação contínua foi avaliado para investigar seu potencial de clarificação. Para isso, o Reator E foi preenchido com esferas ativadas com genipina dispostas em uma configuração de leito empacotado, seguindo as quantidades especificadas na Tabela 1. Para isso, durante três dias, suco de laranja foi continuamente bombeado através do biorreator preenchido com as esferas ativadas.

Amostras foram coletadas periodicamente durante o experimento. Em seguida, essas amostras coletadas foram submetidas a centrifugação a 2700 × g por 2 min. A turbidez das amostras foi então medida espectrofotometricamente, detectando a luz dispersa a 860 nm, seguindo o método descrito por Anderson & Survey (2005).

Para quantificar a porcentagem de clarificação do suco, os valores de turbidez inicial e final do suco foram utilizados, e esse cálculo foi realizado usando a Eq. 4.

##### **4.11.1 – HIDRÓLISE DA PECTINA**

Para investigar o impacto do fluxo contínuo prolongado nos biocatalisadores, uma solução de pectina a 0.1 % foi preparada dissolvendo a pectina em um tampão citrato 0.1 M com pH 4.8. Os biocatalisadores foram introduzidos no reator E, dispostos em uma configuração de leito empacotado, com a quantidade de biocatalisadores especificada na Tabela 1. O reator E foi selecionado para este estudo com base no desempenho favorável observado em testes de fluxo anteriores. Ao longo do experimento, a camisa externa de água do reator foi mantida a uma temperatura constante de 40 °C através da circulação de água.

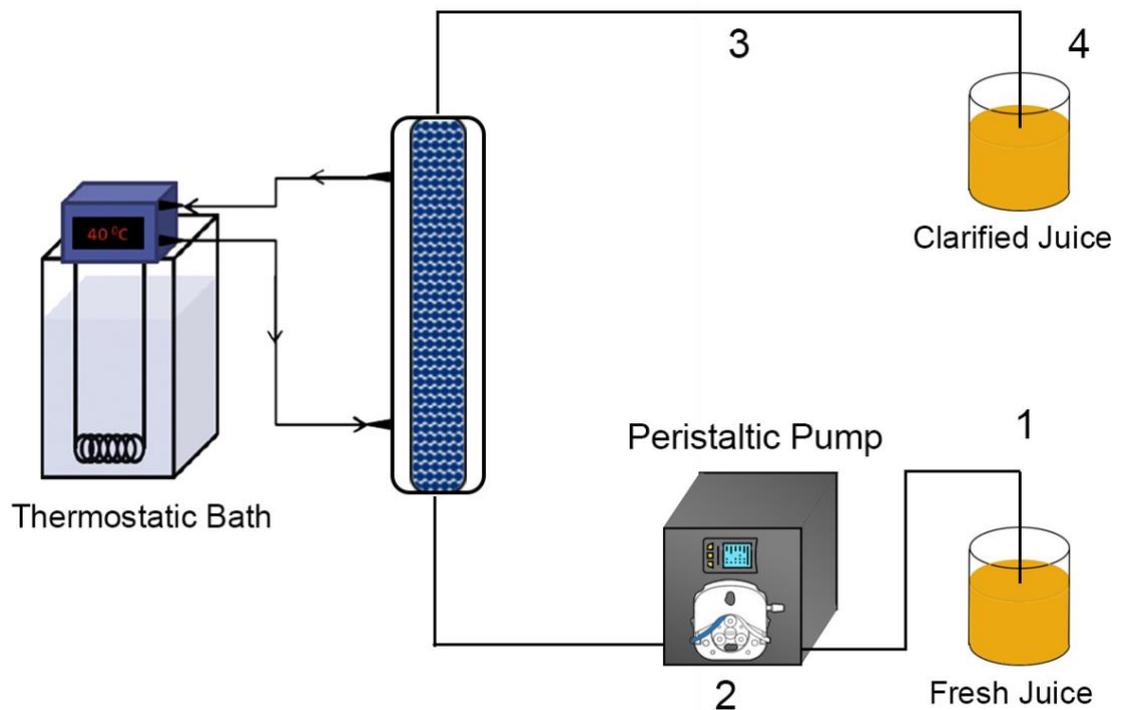
A solução de pectina foi continuamente bombeada através do reator, permitindo um tempo de residência de 5 min, e amostras foram coletadas em intervalos regulares. A amostra inicial, referida como "tempo zero", foi coletada após 2 h do início do experimento, com o objetivo de avaliar as condições de estado estável do biocatalisador. O experimento teve uma duração de 168 h. O grau de hidrólise da pectina foi quantificado usando o método DNS, previamente descrito.

#### **4.11.2 - CLARIFICAÇÃO CONTÍNUA DE SUCO DE LARANJA**

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada em condições de fluxo contínuo usando suco de laranja como substrato. O reator E foi selecionado com base em experimentos anteriores de fluxo e foi preenchido com os biocatalisadores de acordo com as quantidades especificadas na Tabela 1. As amostras coletadas de suco de laranja clarificado foram analisadas como descrito acima, e sua clarificação foi calculada usando a Equação 4.

O suco de laranja do recipiente de suco fresco (1), passou pela bomba (2) e atravessou o reator de leito empacotado, entrando pela parte inferior e saindo pela parte superior. Em seguida, chegou ao recipiente de suco clarificado (4), onde as amostras foram coletadas ao longo do tempo, conforme ilustrado na Figura 8. O tempo de residência selecionado para o experimento foi de 5 min, e a taxa de fluxo foi ajustada de acordo para atingir o tempo de residência desejado.

Figura 8 - Esquema Operacional do Reator de Leito Empacotado.



#### 4.11.2.1 – IMPACTO DO FLUXO ALTERNADO

Para evitar sedimentação e obstrução dentro do biorreator durante o processo de clarificação do suco de laranja, foi realizado um teste de fluxo alternativo. Nesse teste, uma abordagem de entrada alternativa ao biorreator foi empregada. Os mesmos parâmetros de clarificação de suco, conforme mencionado anteriormente, foram mantidos. Para este experimento em particular, a bomba peristáltica foi conectada à entrada superior do biorreator (3), permitindo o fluxo de suco fresco da posição 4 para a posição 1 na Figura 8.

#### 4.12 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software SAS (versão 9.3) foi utilizado para realizar a análise estatística. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, uma comparação das médias para diferentes tratamentos foi realizada utilizando o teste de Tukey ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ).

## CAPÍTULO VII – DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação de Mestrado teve como objetivo imobilizar pectinase em partículas de quitosana ativadas com genipina, avaliar a aplicação dos biocatalisadores devolvidos na clarificação de sucos (em batelada e em modo contínuo), e avaliar a influência da geometria de diferentes biorreatores no processo de clarificação contínuo de suco de laranja usando estes biocatalisadores. Dentro do tema proposto, investigou-se os efeitos do pH de ativação das esferas de quitosana com genipina, do pH e carga durante a imobilização, a estabilidade térmica dos biocatalisadores obtidos, além da estabilidade operacional em batelada dos biocatalisadores preparados. Subsequentemente, estes biocatalisadores foram aplicados em processos contínuos de clarificação, onde foram avaliados reatores com diferentes parâmetros geométricos para, através de teste de vazão, avaliar o impacto desses na eficiência do processo de clarificação dos sucos.

Inicialmente o pH de ativação das esferas foi objeto de estudo, utilizando-se 5 diferentes faixas de pHs, que variaram entre 5.0 e 11.0, e com uma concentração de genipina fixada em 0.1 %. Estes testes revelaram não haver diferença estatística na imobilização da pectinase entre os pHs. Sendo assim, foi definido o pH 8 como o escolhido para ativação das esferas. Da mesma forma, o pH de imobilização foi avaliado, dessa vez com 6 faixas de pHs, variando entre 4.0 a 11.0. Novamente, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, provavelmente devido à natureza da enzima e do substrato utilizados neste trabalho. Uma vez que não houve diferença estatística observada, o pH escolhido para imobilização foi o pH ótimo da enzima, o pH 4.8.

Na etapa seguinte, a concentração de proteína para a imobilização foi estudada, buscando otimizar a atividade do biocatalisador. Testou-se concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg de proteína por grama de suporte. Identificou-se que a atividade máxima foi alcançada com 100 mg/g, e concentrações mais altas não aumentaram a atividade. Possíveis modificações na estrutura enzimática, interações que limitam o contato com o substrato e problemas de difusão devido ao tamanho da pectina na estrutura da quitosana podem explicar esses resultados. Foi observado que, embora o rendimento de imobilização tenha sido similar para 100 e 200 mg/g, a atividade específica não seguiu a mesma tendência. Isso se deve à dificuldade de difusão da pectina na quitosana, o que limita a acessibilidade do substrato a enzimas no interior da esfera.

Devido a essas limitações, os experimentos prosseguiram com 100 mg/g de proteína para os experimentos subsequentes.

Em seguida, a estabilidade térmica dos biocatalisadores desenvolvidos foi avaliada, o que é crucial para sua aplicação industrial. O comportamento das enzimas imobilizadas em comparação com as livres foi analisado devido à conformação enzima-suporte, que confere maior resistência térmica. Testes foram realizados, incubando enzimas imobilizadas e livres em tampão pH 4,8 a 60 °C, com coleta de amostras ao longo do tempo. A atividade das enzimas livres experimentou uma queda para aproximadamente 10 % em 1 h. Por outro lado, as enzimas imobilizadas tiveram um declínio nos primeiros 30 min, mantendo uma atividade em torno de 55 % por cerca de 6 h antes de diminuir gradualmente. Após 24 h, a atividade foi nula em ambas as formas. A rápida diminuição inicial na atividade das enzimas imobilizadas, seguida por estabilização, pode ser atribuída à heterogeneidade na enzima imobilizada. A mistura de enzimas pectinases pode resultar em ligações covalentes variáveis, influenciando a estabilidade térmica geral.

Após a análise dos parâmetros de ativação, imobilização e estabilidade térmica, procedeu-se à realização de testes práticos relacionados com a aplicação dos biocatalisadores desenvolvidos. Inicialmente, a estabilidade da atividade enzimática foi avaliada. Os biocatalisadores foram adicionados a uma solução de pectina (0.1 % p/v) e, após 30 min, os açúcares redutores liberados foram medidos. A concentração inicial de açúcares redutores liberados foi estabelecida como 100 %, enquanto as subsequentes foram expressas em relação à primeira. Foi observado um declínio gradual na atividade enzimática dos biocatalisadores. No entanto, após 30 ciclos, foi detectada alguma atividade nos biocatalisadores (em torno de 30 %). A perda de atividade pode ser resultado da desnaturação das proteínas causada pela temperatura de operação, pelo estresse hidrodinâmico ou pela lixiviação durante os processos de clarificação ou lavagem. Devido à demonstração de boa estabilidade pelo biocatalisador, procedeu-se aos testes de clarificação de sucos de frutas.

A clarificação de sucos de uva e laranja foi testada utilizando enzimas imobilizadas e livres. Em ambos os tratamentos, uma atividade enzimática total de 42.5 U foi incubada em 20 mL de sucos de laranja e uva (separadamente) durante 30 min a 40 °C sob agitação. A turbidez foi avaliada como parâmetro para avaliar a clarificação. A turbidez do suco de laranja foi avaliada conforme descrito anteriormente. Para se observar a variação de turbidez do suco de uva, uma varredura

de comprimentos de onda foi realizada para que se pudesse estabelecer qual melhor comprimento de onda para esta análise. Além disso, o potencial de adsorção das esferas ativadas e sem enzima foi testado antes da clarificação dos sucos. Os resultados mostraram que as partículas ativadas com genipina e quitosana não tiveram efeito significativo na clarificação. A clarificação, então, foi atribuída à atividade do biocatalisador. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o uso de enzima imobilizada e livre na clarificação do suco de laranja. No entanto, ao clarificar o suco de uva, a enzima imobilizada demonstrou aumento significativo na capacidade de clarificação, possivelmente devido a uma reatividade aprimorada pela imobilização da enzima ou uma proteção da enzima a algum inibidor do meio. Posteriormente, os biocatalisadores foram sujeitos a análises de estabilidade operacional para a clarificação em batelada de sucos de frutas.

Para avaliar a reutilização dos biocatalisadores na clarificação de sucos de frutas, as esferas com enzima imobilizada foram incubadas separadamente em 20 mL de suco (uva e laranja) a 40 °C por 30 min. Após cada ciclo, os biocatalisadores foram separados e lavados com um tampão de citrato de sódio 0,1 M a pH 4,8. Observou-se uma queda significativa na atividade dos biocatalisadores em ambos os ciclos de suco de uva e laranja. Evidenciou-se visualmente que os biocatalisadores sofreram adsorção de partículas do suco, levando a pequenas alterações de cor. Esse fenômeno pode ser atribuído à adsorção de várias partículas nos biocatalisadores durante a imersão nos sucos de frutas. Essa adsorção pode diminuir a atividade dos biocatalisadores ao bloquear o sítio ativo da enzima, limitando assim sua reatividade. A obstrução do sítio ativo compromete a eficácia da enzima na catálise das reações. A análise das amostras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou esse comportamento.

Com o objetivo de melhorar a reutilização dos biocatalisadores, avaliou-se uma abordagem alternativa de lavagem. Após cada ciclo, os biocatalisadores foram submetidos a uma lavagem de duas etapas. Inicialmente, foi empregada uma solução de NaCl 1 M para remover moléculas fisicamente adsorvidas e, em seguida, um tampão de citrato de sódio pH 4,8 com concentração de 0,1 M. Esse processo visava limpar eficientemente os biocatalisadores, preparando-os para ciclos subsequentes. Visualmente podia se observar uma mudança de coloração da solução salina quando em contato com as esferas, indicando um desprendimento das partículas adsorvidas para o meio. Foram realizados 10 ciclos sucessivos de clarificação de suco de frutas.

Os resultados indicaram uma diminuição mais estável e gradual na atividade do biocatalisador com o uso do procedimento de lavagem incorporando a etapa de enxágue com NaCl, em comparação com os resultados anteriores. Isso sugere a viabilidade de reutilização dos biocatalisadores por diversos ciclos, uma vez que, após 10 ciclos de clarificação, a clarificação relativa foi aproximadamente 50 % e 40 % do potencial inicial para os sucos de laranja e uva, respectivamente.

Para entender melhor as mudanças nos biocatalisadores após a repetida aplicação na clarificação de sucos e lavagens, examinamos amostras iniciais e após cinco usos com diferentes sucos e protocolos de lavagem usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Mostrou-se que os biocatalisadores lavados apenas com tampão de citrato acumularam partículas de suco em suas superfícies, afetando a consistência da atividade. Isso ocorreu devido à obstrução da interação entre a enzima e o substrato por partículas de pectina e cor. Por outro lado, biocatalisadores lavados com solução de NaCl e tampão de citrato mantiveram suas estruturas de superfície, indicando que a solução de NaCl eficazmente removeu as partículas de suco adsorvidas. Essa remoção eficiente provavelmente contribuiu para a atividade consistente após a lavagem.

Após avaliar os biocatalisadores em termos de clarificação em batelada, surge a possibilidade de empregá-los em processos contínuos de clarificação por meio de biorreatores. Nesse sentido, examinou-se como a geometria dos biorreatores em condições de leito fixo poderia afetar a clarificação contínua do suco de laranja. Um teste de fluxo foi realizado para investigar variações na clarificação entre diferentes geometrias de biorreatores, mantendo um tempo de residência uniforme. Os resultados dos testes de fluxo são organizados em dois grupos para analisar as diferenças nas geometrias dos reatores: um grupo compreende reatores com o mesmo raio (Tabela 1, reatores B, D e E), enquanto o outro grupo envolve reatores com o mesmo volume (Tabela 1, reatores A, B e C).

Ao considerar reatores com o mesmo raio, as diferenças entre eles foram mínimas, independentemente dos tempos de residência. No entanto, reatores com alturas maiores e taxas de fluxo mais lentas apresentaram deposição visual de partículas de pectina nas partes superiores, o que pode afetar a estabilidade operacional em processos prolongados de clarificação. Reatores com raios menores mostraram menor porcentagem de clarificação em tempos de residência curtos, provavelmente devido à má distribuição de fluxo radial observada quando a razão  $L/r$

(aspecto de construção) aumenta. Resultados indicam que tempos de residência acima de 2,5 min foram consistentemente eficazes na clarificação. Para tempos de residência maiores, as diferenças entre reatores com o mesmo volume foram mínimas. Em síntese, os resultados sugerem que controlar a razão L/R (aspecto de construção) é fundamental para atingir um desempenho satisfatório de clarificação em biorreatores com o mesmo volume, especialmente em tempos de residência curtos.

Para avaliar a capacidade catalítica das esferas ativadas em modo contínuo, conduziu-se um teste no reator E (Tabela 1), configurado em leito fixo com partículas ativadas com genipina (sem enzima). Assim como no teste em batelada, não houve clarificação do suco e o reator não apresentou deposição de partículas.

Foram realizados dois testes para avaliar a estabilidade operacional dos biorreatores. Um deles avaliou a estabilidade da atividade enzimática, em que uma solução de pectina 0.1 % foi bombeada pelo biorreator, e a geração de açúcares redutores foi monitorada ao longo do tempo. O outro teste consistiu na clarificação do suco de laranja, onde o suco foi bombeado pelo reator e amostras foram coletadas para avaliar a redução da turbidez. O teste de estabilidade da atividade enzimática mostrou promissor, com atividade observada no biorreator mesmo após 168 h. Houve um declínio gradual, conforme relatado em outros estudos de imobilização de pectinases. No entanto, os biocatalisadores mantiveram cerca de 50 % da atividade inicial após 100 h, indicando alta estabilidade operacional em fluxo contínuo.

O teste de estabilidade na clarificação do suco de laranja enfrentou desafios devido na configuração inicial, na qual o suco era bombeado pela entrada inferior do biorreator. Isso resultou em deposição significativa de partículas de pectina nas partes superiores, causando entupimento dos poros e interrompendo o fluxo de suco. A última amostra coletada, 27 h após o início do teste, ainda mostrou capacidade de clarificação em torno de 70 % da inicial. Sendo assim, outro teste de estabilidade foi realizado, com a alteração do fluxo para entrada superior do reator e coleta de amostras na parte inferior. Por meio dessa abordagem, o funcionamento do biorreator foi prolongado. Foi observado um declínio gradual na capacidade de clarificação, chegando a cerca de 30 % da capacidade inicial após 72 h. Esse declínio mais acentuado em comparação com a estabilidade da atividade enzimática ocorreu devido à deposição inevitável de partículas de suco no interior do reator, resultando na formação de caminhos preferenciais.

Do teste de clarificação, observa-se uma consideração relevante sobre a aparência do suco de laranja resultante. Clarificação intensa resultou em separação de fases e depósito de partículas, afetando negativamente a atratividade visual do suco. Para suco de laranja, alta clarificação pode não ser necessária, mas pode ser benéfica em outros sucos, como maçã ou mosto de uva para vinho. No processamento de suco de laranja, o uso de tempos de reação mais curtos pode aumentar a produtividade do biorreator.

## CAPÍTULO VIII – CONCLUSÃO

De forma geral, é possível concluir que os objetivos estabelecidos no início foram alcançados pelo presente trabalho, resultando nas considerações a seguir:

- A imobilização de enzimas pectinase em esferas de quitosana ativadas com genipina, foi realizada pela primeira vez.
- Houve um aumento da estabilidade térmica da enzima imobilizada, comparada a enzima livre, demonstrando 55 % da atividade inicial após 6 h a 60 °C.
- A estabilidade operacional do biocatalisador em batelada apresentou 30 % da atividade inicial mesmo após 30 reutilizações na hidrólise de pectina.
- Lavar os biocatalisadores com solução de NaCl 1M seguida de solução tampão citrato de sódio 0.1 M pH 4.8 aumentou a capacidade de reutilização dos biocatalisadores através da remoção das partículas adsorvidas.
- A aplicação dos biocatalisadores em reatores de leito fixo revelou uma relação entre o parâmetro adimensional L/r e o resultado da clarificação.
- Os biorreatores demonstraram uma significativa estabilidade na atividade enzimática, resultando em 50 % da atividade inicial após 100 h de operação contínua.
- A clarificação contínua de suco de laranja em reator de leito fixo com alimentação *bottom-top* resultou em uma deposição de partículas de suco dentro do reator que resultaram em entupimento após 40 h.
- Uma alteração no sentido do fluxo para *top-bottom* diminuiu a acumulação de partículas dentro do reator e permitiu a operação do reator por 80 h.

Assim, demonstrou-se a eficácia de imobilizar pectinases em esferas de quitosana ativadas com genipina, um agente de entrecruzamento menos tóxico que alternativas como o glutaraldeído. Essa imobilização resultou em um biocatalisador termicamente mais estável, adequado para clarificar sucos de frutas. Ao empregar esses biocatalisadores em reatores de leito fixo, evidenciou-se a relação entre clarificação do suco e parâmetros geométricos do reator.

## CAPÍTULO IX – PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir do realizado, pode se prever o seguinte como propostas de trabalhos e pesquisas futuras:

- Avaliar a aplicação das pectinases imobilizadas em quitosana ativada com genipina em outras matrizes, como sucos de maçã e mostos de uva branca para vinificação.
- Avaliar a alternância do sentido do fluxo nos reatores de leito fixo como uma forma de evitar a formação de caminhos preferenciais na clarificação.
- Testar os biorreatores (leito fixo) em uma orientação horizontal para avaliar a deposição de partículas durante a clarificação contínua.
- Estudar a possibilidade de lavagem do biorreator com solução salina (NaCl 1 M) seguida por lavagem de solução tampão (citrato 0.1 M pH 4.8) para remover as partículas depositadas durante o processo e buscar uma operação mais prolongada.
- Aplicar os biocatalisadores obtidos em reatores de leito fluidizado e avaliar de que forma os parâmetros geométricos podem interferir na clarificação utilizando esta condição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, S. et al. Pressure-driven crossflow microfiltration coupled with centrifugation for tannin reduction and clarification of cashew apple juice: Modeling of permeate flux decline and optimization of process parameters. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 6, p. e16497, 2022.
- ADRIANO, W. S. et al. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170–2179, 2008.
- ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21–28, 1998.
- ANDERSON, C. W.; SURVEY, U. S. G. **Chapter A6. Section 6.7. Turbidity Techniques of Water-Resources Investigations**. Reston, VA: USGS, 2005. Disponível em: <<http://pubs.er.usgs.gov/publication/twri09A6.7>>.
- ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56–66, 2014.
- BAI, X. et al. Immobilization of  $\alpha$ -galactosidase in polyvinyl alcohol-chitosan-glycidyl methacrylate hydrogels based on directional freezing-assisted salting-out strategy for hydrolysis of RFOs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, 2023.
- BAUTISTA-ORTIN, A. B. et al. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 40, n. 8, p. 867–878, 2005.
- BELLÉ, A. S. et al. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. **Food chemistry**, v. 246, p. 266–274, 2018.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355–383, 2000.
- BIRO, E. et al. Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 6, p. 1240–1246, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- BRAUCH, J. E. et al. Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? **Food Research International**, v. 89, p. 391–398, 2016.
- CAPPANNELLA, E. et al. Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: Bench-scale fluidized-bed reactor study. **Food chemistry**, v. 210, p. 49–55, 2016.
- CARMO, M.; DANTAS, M.; RIBEIRO, S. Caracterização do mercado consumidor de sucos prontos para o consumo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, p. 305–309, 2014.
- CAVELLO, I. A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CAVALITTO, S. F. Immobilization of a keratinolytic protease from *Purpureocillium lilacinum* on genipin activated-chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1332–1336, 2014.

- DAL MAGRO, L. et al. Enzymatic clarification of orange juice in continuous bed reactors: Fluidized-bed versus packed-bed reactor. **Catalysis Today**, v. 362, p. 184–191, 2021.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. DA G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.
- DAROIT, D. J. et al. Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 904–908, 2007.
- DELMAR, K.; BIANCO-PELED, H. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 28–37, 2015.
- DENG, Z. et al. Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 691–699, 2019.
- DIANO, N. et al. Apple Juice Clarification by Immobilized Pectolytic Enzymes in Packed or Fluidized Bed Reactors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 23, p. 11471–11477, 2008.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally Occurring Iridoids. A Review. Part 1. **Cheminform**, v. 38, n. 24, 2007.
- DIXON, A. G.; PARTOPOUR, B. Computational Fluid Dynamics for Fixed Bed Reactor Design. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 11, n. 1, p. 109–130, 2020.
- DONATO, D. et al. Optimization of construct perfusion in radial-flow packed-bed bioreactors for tissue engineering with a 2D stationary fluid dynamic model. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 197–211, 2016.
- ESPARZA-FLORES, E. E. et al. Chitosan with modified porosity and crosslinked with genipin: A dynamic system structurally characterized. **Food Hydrocolloids**, v. 144, 2023.
- FANG, H. et al. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles and immobilization of laccase. **Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.**, v. 24, n. 1, p. 42–47, 2009.
- FLORES, E. E. E. **Genipina como agente ativador de esferas de quitosana como suporte para a imobilização enzimática**. [s.l: s.n.].
- FLORES, E. E. E. et al. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 73–80, 2019.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.
- GÓMEZ, J. L. et al. Experimental behaviour and design model of a fluidized bed reactor with immobilized peroxidase for phenol removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 127, n. 1, p. 47–57, 2007.
- GRENHA, A. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 4, p. 291–300, 2012.
- GROSOVÁ, Z.; ROSENBERG, M.; REBROŠ, M. Perspectives and applications of immobilised  $\beta$ -galactosidase in food industry - A review. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 26, p. 1–14, 2008.
- GUEGUEN, Y. et al. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized  $\beta$ -glucosidase. **Journal of Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 151–156, 1997.

- HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.
- HOBBS, C. A. et al. Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant, gardenia blue, and its precursor, genipin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 695–708, 2018.
- IBRAHIM, M. A. et al. A Review of Chitosan and Chitosan Nanofiber: Preparation, Characterization, and Its Potential Applications. **Polymers**, v. 15, n. 13, 2023.
- ILLANES, A.; ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. New York, NY: Springer, 2008.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005.
- JONDALE, R. et al. Influence of converging and diverging geometry on the pressure drop distribution in randomly packed beds. **Particulate Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 344–361, 2021.
- KALLEL, F. et al. Effect of enzymatic treatments and microfiltration on the physicochemical properties and antioxidant activities of two Tunisian prickly pear juices. **Process Biochemistry**, v. 132, p. 140–151, 2023.
- KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 215–227, 2001.
- KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, n. 3, p. 239–243, 2004.
- KOSSEVA, M. R. et al. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437–447, 2009.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2, p. 126–139, 2004.
- LAUDANI, C. G. et al. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1, p. 74–81, 2007.
- LEI, Z.; BI, S. The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1442–1447, 2007.
- LI, H.; CLERCX, H. J. H.; TOSCHI, F. A study with the lattice Boltzmann method on the conversion efficiency of a packed-bed reactor with different oriented packed beads configurations. **Physics of Fluids**, v. 34, n. 11, p. 117114, 2022.
- LI, L. et al. Magnetic and fluorescent multifunctional chitosan nanoparticles as a smart drug delivery system. **Nanotechnology**, v. 18, p. 405102, 2007.
- LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236–6249, 2013.

- LORENZONI, A. S. G. et al. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 51–55, 2015.
- LOZANO, P. et al. Kinetic and operational study of a cross-flow reactor with immobilized pectolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 7, p. 499–505, 1990.
- MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MI, F.-L.; SHYU, S.-S.; PENG, C.-K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 1985–2000, 2005.
- MIESZCZAKOWSKA-FRĄC, M. Impact of enzyme on quality of blackcurrant and plum juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, p. 251–256, 2011.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009.
- NERI-NUMA, I. A. et al. Genipin: A natural blue pigment for food and health purposes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 271–279, 2017.
- OLSEN, H. S. Enzymes in Food Processing. Em: **Biotechnology**. [s.l.: s.n.]. p. 663–736.
- PINHEIRO, B. B. et al. Genipin and glutaraldehyde based laccase two-layers immobilization with improved properties: New biocatalysts with high potential for enzymatic removal of trace organic contaminants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 169, 2023.
- POPPE, J. K. et al. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511–525, 2015.
- RAMOS-DE-LA-PEÑA, A. M. et al. Recovery of genipin from genipap fruit by high pressure processing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1347–1350, 2015.
- RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.
- ROY, I.; GUPTA, M. N. Lactose hydrolysis by Lactozym™ immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 325–332, 2003.
- RUXTON, C. H. S.; MYERS, M. Fruit Juices: Are They Helpful or Harmful? An Evidence Review. **Nutrients**, v. 13, n. 6, 2021.
- SANKARAN, A. et al. Effect of Enzyme Homogenization on the Physical Properties of Carrot Cell Wall Suspensions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, p. 1377–1385, 2015.
- SAPONJIC, S. et al. Use of *Candida rugosa* lipase immobilized on sepabeads for the amyl caprylate synthesis: batch and fluidized bed reactor study. **Electron. J. Biotechnol.**, v. 13, n. 6, p. 0, 2010.
- SHELDON, R. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Cheminform**, v. 38, 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SIMPSON, B. K.; RUI, X.; KLOMKLAO, S. Enzymes in Food Processing. Em: **Food Biochemistry and Food Processing**. [s.l.: s.n.]. p. 181–206.

SOWBHAGYA, H. B.; CHITRA, V. N. Enzyme-Assisted Extraction of Flavorings and Colorants from Plant Materials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 2, p. 146–161, 2010.

SUNG, H.-W. et al. Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent. **Biomaterials**, v. 20, n. 19, p. 1759–1772, 1999.

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

UENOJO, M.; PASTORE, G. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quimica Nova - QUIM NOVA**, v. 30, 2007.

VAILLANT, F. et al. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 48, n. 1, p. 83–90, 2001.

{VAN ZESSEN}, E. et al. Fluidized-bed and packed-bed characteristics of gel beads. **Chemical Engineering Journal**, v. 115, n. 1, p. 103–111, 2005.

WATANABE, Y. et al. Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 7, p. 703–707, 2001.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, n. 8, p. 341–349, 1984.

XIE, W.; WANG, J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, p. 373–380, 2012.

ZIMMERMANN, S.; TAGHIPOUR, F. CFD Modeling of the Hydrodynamics and Reaction Kinetics of FCC Fluidized-Bed Reactors. **Industrial & Engineering Chemistry Research - IND ENG CHEM RES**, v. 44, 2005.