

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

**IMOBILIZAÇÃO DE PECTINASES PARA A CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE  
LARANJA: INFLUÊNCIA DO SUPORTE NAS PROPRIEDADES DOS  
SUCOS CLARIFICADOS**

**PÂMELA MEDEIROS DA SILVA**

PORTO ALEGRE

2023

**PÂMELA MEDEIROS DA SILVA**

**IMOBILIZAÇÃO DE PECTINASES PARA A CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE  
LARANJA: INFLUÊNCIA DO MATERIAL DE SUPORTE NAS  
PROPRIEDADES DOS SUCOS CLARIFICADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Lucas Dal Magro

PORTO ALEGRE

2023



#### CIP - Catalogação na Publicação

Da Silva , Pâmela Medeiros  
IMOBILIZAÇÃO DE PECTINASES PARA A CLARIFICAÇÃO DE  
SUCO DE LARANJA: INFLUÊNCIA DO SUPORTE NAS PROPRIEDADES  
DOS SUCOS CLARIFICADOS / Pâmela Medeiros Da Silva . --  
2023.

86 f.

Orientador: Rafael Costa Rodrigues.

Coorientador: Lucas Dal Magro.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Biocatalisadores enzimáticos . 2. Clarificação  
de Sucos. 3. Glutaraldeído. 4. Sílica . 5. Genipina.  
I. Rodrigues, Rafael Costa, orient. II. Dal Magro,  
Lucas, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Beroci e Ionete, pelo incentivo a sempre estudar e à minha filha Ísis, que lá do céu, segue sendo meu maior incentivo para seguir em frente.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todas as coisas boas que Ele tem proporcionado na minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Costa Rodrigues e ao meu coorientador Prof. Dr. Lucas Dal Magro, pela dedicação na minha orientação durante todo o mestrado e pelo apoio e compreensão durante os momentos mais difíceis que eu passei.

Aos membros da banca, pela disponibilidade, meus sincero sentimento de gratidão e respeito.

Aos meus pais, por todo carinho, incentivo e educação que me deram e por abdicarem de muitas coisas para que eu pudesse me tornar quem sou hoje.

Aos queridos colegas do laboratório 016: Denise, Carol e Vini, pela parceria, ajuda, risadas e incentivo. Ao colega Dr. Eli Emanuel pela ajuda e pelos vários empréstimos da centrífuga.

À UFRGS pela estrutura física e por propiciar ensino e pesquisa de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, em especial aos seus professores e funcionários, pela presteza, ao ICTA pelos equipamentos disponibilizados e à Capes pelo suporte financeiro.

Aos colegas de mestrado e doutorado que ingressaram em 2020, em meio a pandemia, nesta jornada totalmente EAD, mas que se fizeram presentes em vários momentos (que turma incrível).

## RESUMO

Atualmente, pode-se observar uma crescente demanda por produtos saudáveis e com características nutricionais e sensoriais próximas dos alimentos *in natura*. Dentre estes, os sucos de frutas apresentam inúmeros benefícios para a saúde e o bem estar da população, fazendo com que a indústria alimentícia esteja cada vez mais atenta aos desejos dos consumidores, investindo na formulação de novos produtos com apelo mais saudável, sendo o suco de laranja um dos mais consumidos no Brasil. Desta forma, o presente trabalho busca, através da aplicação de pectinases imobilizadas em suco de laranja, verificar qual a influência do material de suporte nas propriedades nutricionais e sensoriais dos sucos de laranja clarificados. Para a clarificação do suco de laranja foram utilizados preparados enzimáticos comerciais de pectinases, que foram imobilizados utilizando suportes à base de sílica ou quitosana, ativados com genipina ou glutaraldeído. Através deste estudo, foi desenvolvida uma metodologia a clarificação do suco de laranja, e, além disso, foram analisados os parâmetros de qualitativos e nutricionais do suco como: cor, turbidez, pH, grau Brix, vitamina C, açúcares redutores e compostos fenólicos em comparação ao suco puro. Após a realização das análises, verificou-se que os tratamentos os tratamentos envolvendo a enzima imobilizada, reduziram significativamente a turbidez em comparação com o suco de laranja não clarificado. Os maiores percentuais de redução de turbidez foram observados com os tratamentos CH-GEN-E (93%) e CH-GLU-E (94%), indicando sua eficácia em melhorar a aparência visual. O teor de sólidos solúveis (Brix), o pH e a concentração de açúcares redutores permaneceram comparáveis ao suco não-clarificado, indicando impacto mínimo nesses parâmetros. As diferenças de cor entre as amostras de suco tratado e puro estavam dentro de uma faixa aceitável, mantendo a qualidade geral da cor. Através da análise de compostos fenólicos, pode-se perceber que não houveram alterações significativas na composição. É importante ressaltar que as amostras tratadas exibiram níveis de vitamina C comparáveis ao suco não clarificado, preservando seu valor nutricional. Essas descobertas demonstram a eficácia dos tratamentos com biocatalisadores na clarificação do suco de laranja sem comprometer a qualidade do produto.

**Palavras-chaves:** biocatalisadores enzimáticos; clarificação de sucos; genipina; glutaraldeído; sílica; quitosana.

## ABSTRACT

Currently, we can observe a growing demand for healthy products with nutritional and sensory characteristics close to fresh foods. Among these, fruit juices have numerous benefits for the health and well-being of the population, making the food industry increasingly attentive to consumers' desires, investing in the formulation of new products with healthier appeal, with juice orange, one of the most consumed in Brazil. Therefore, the present work seeks, through the application of pectinases immobilized in orange juice, to verify the influence of the support material on the nutritional and sensorial properties of clarified orange juices. To clarify the orange juice, commercial enzyme preparations of pectinases were used, which were immobilized using silica or chitosan-based supports, activated with genipin or glutaraldehyde. Through this study, a methodology was developed to clarify orange juice, and, in addition, the qualitative and nutritional parameters of the juice were analyzed, such as: color, turbidity, pH, Brix degree, vitamin C, reducing sugars and phenolic compounds compared to pure juice. After carrying out the analyses, it was found that treatments involving the immobilized enzyme significantly reduced turbidity compared to unclarified orange juice. The highest percentages of turbidity reduction were observed with the CH-GEN-E (93%) and CH-GLU-E (94%) treatments, indicating their effectiveness in improving visual appearance. The soluble solids content (Brix), pH and reducing sugar concentration remained comparable to unclarified juice, indicating minimal impact on these parameters. Color differences between the treated and pure juice samples were within an acceptable range while maintaining overall color quality. Through the analysis of phenolic compounds, it can be seen that there were no significant changes in the composition. Importantly, the treated samples exhibited vitamin C levels comparable to unclarified juice, preserving its nutritional value. These findings demonstrate the effectiveness of biocatalyst treatments in clarifying orange juice without compromising product quality.

Keywords: enzyme biocatalysts; juice clarification; genipin; glutaraldehyde; silica; chitosan.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ação das celulasas sobre as moléculas de celulose .....	22
Figura 2 - Métodos para imobilização de enzimas .....	25
Figura 3 - Estrutura dos biopolímeros: quitosana, quitina e celulose .....	29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos bioativos de origem natural: fontes e benefícios ao organismo .....	13
Tabela 2 - Padrão de identidade e qualidade do suco de laranja (PIQ).....	17
Tabela 3 - Funções e aplicações de enzimas na indústria de alimentos e de vinhos.....	18
Tabela 4 - Classificação dos suportes de acordo com a composição .....	28
Tabela 5 - Immobilization parameters for pectinase immobilized on chitosan and silica.....	48
Tabela 6 - Effects of different biocatalyst treatments on orange juice parameters .....	51
Tabela 7 - Analysis of phenolic compounds at different wavelength for the treatments on orange juice.....	54
Tabela 8 - Analysis of vitamin C for the different treatments on orange juice .....	56

## LISTA DE SIGLAS

PIQ	Padrão de Identidade e Qualidade
GLU	Glutaraldeído
GEN	Genipina
CH	Quitosana
E	Enzima

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
2.1 . OBJETIVO GERAL .....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
3.1. SUCO DE FRUTAS: LEGISLAÇÃO E PRODUÇÃO .....	11
3.2. CARACTERÍSTICAS DO SUCO DE LARANJA E PROPRIEDADES NUTRICIONAIS E QUALITATIVAS.....	12
3.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO SUCO DE LARANJA .....	17
3.4 APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM SUCOS .....	17
<b>3.4.1. Utilização de pectinases e celulasas em sucos de frutas</b> .....	<b>20</b>
3.4.1.1 <i>Tipos de pectinases</i> .....	20
3.4.1.2 <i>Tipos de celulasas</i> .....	21
3.5 CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE FRUTAS .....	22
3.6 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....	23
<b>3.6.1 Métodos de imobilização enzimática</b> .....	<b>24</b>
3.6.1.1 <i>Adsorção</i> .....	25
3.6.1.2 <i>Ligação covalente</i> .....	25
3.6.1.3. <i>Encapsulação e confinamento</i> .....	25
3.6.1.4. <i>Reticulação</i> .....	26
<b>3.6.2 Tipos de suporte para imobilização de enzimas</b> .....	<b>27</b>
3.6.2.1. <i>Quitosana</i> .....	28
3.6.2.2 <i>Sílica</i> .....	29

<b>3.6.3 Agentes de reticulação</b> .....	<b>29</b>
3.6.3.1 <i>Glutaraldeído</i> .....	29
3.6.3.2 <i>Genipina</i> .....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1. MATERIAIS .....	31
<b>4.1.1. Enzimas</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.2. Sucos de frutas</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.3 Pectina, ácido galacturônico, quitosana, APTMS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.4 Genipina</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.5 Esferas de quitosana</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1.6 Sílica</b> .....	<b>32</b>
4.2 ATIVAÇÃO DE SUPORTE E IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	33
<b>4.2.1. Ativação com glutaraldeído</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2.2 Ativação com genipina</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2.3 Imobilização de enzimas</b> .....	<b>33</b>
<b>4.3 MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3.1 Atividade de pectinase</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3.2 Clarificação de suco de frutas</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3.3 Propriedades qualitativas e nutricionais</b> .....	<b>35</b>
4.3.3.1 <i>Quantificação de turbidez</i> .....	35
4.3.3.2 <i>Cor</i> .....	35
4.3.3.3 <i>Quantificação de açúcares redutores</i> .....	35
4.3.3.4 <i>Vitamina C</i> .....	36
4.3.3.5 <i>Compostos fenólicos</i> .....	36
4.3.3.6 <i>Sólidos solúveis totais (Brix)</i> .....	36

4.3.3.7 <i>pH</i> .....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento no interesse em temas relacionados à saúde e bem estar do ser humano (CAMARGO *et al.*, 2007). Quando buscamos por qualidade de vida, os cuidados se estendem à alimentação (consumo de alimentos com baixo teor de gorduras saturadas e ricos em fibras, como frutas, legumes, verduras e cereais integrais), juntamente com um estilo de vida saudável (exercícios físicos regulares, ausência de fumo e moderação no álcool) são pontos indispensáveis na diminuição do risco de doenças crônicas e na promoção da qualidade de vida, desde a infância até o envelhecimento (MATTOS, 1997).

Dessa forma, a indústria alimentícia está cada vez mais atenta aos desejos dos consumidores, observando uma crescente demanda por produtos saudáveis e com características nutricionais e sensoriais próximas dos alimentos *in natura*, investindo recursos e esforços na formulação de novos produtos e concentrando seu marketing no apelo à vida saudável (WANSINK, 2004; MACHADO, 2013).

Neste contexto, as frutas podem se tornar uma fonte inesgotável de recursos nutricionais, tendo em vista sua rica concentração em compostos bioativos, tais como: compostos fenólicos, vitaminas, carotenoides e minerais, e reconhecidas como fontes de fibras alimentares solúveis e insolúveis, que desempenham um papel importante na alimentação (SCHIASSI *et al.*, 2018).

Dentre os produtos derivados de frutas, os sucos merecem destaque, sendo consumidos e apreciados em todo o mundo, e facilmente incluídos na dieta das pessoas. O suco, ou sumo, é uma bebida não fermentada feita exclusivamente por fruta madura e sadia, com grande quantidade de nutrientes. Esta não possui corantes, aromatizantes nem grandes quantidades de açúcares, que podem ser adicionados, mas não podem atingir mais que 10 % em peso (ABIR, 2020).

No Brasil, apenas em 2021, foram produzidos mais de 500 milhões litros de sucos concentrados, segundo a Associação brasileira de refrigerantes e bebidas não alcólicas, o que pode estar favorecendo este crescimento é a busca por diversificação e pelas características intrínsecas aos sucos, que permitem o desenvolvimento de produtos naturalmente saborosos, nutritivos, saudáveis e funcionais (ABIR, 2023).

O mercado brasileiro de sucos prontos para beber está em expansão, e esta é uma das bebidas que mais crescem no setor das não alcoólicas (CARMO *et al.*, 2014), o seu consumo acaba sendo motivado pela falta de tempo da população em preparar o suco das frutas *in natura*. Além da praticidade oferecida pelos produtos, a substituição do consumo de bebidas

carbonatadas, o seu valor nutritivo e a preocupação no consumo de alimentos mais saudáveis pela população, também contribuem para esse crescimento (MATSUURA e ROLIM, 2002).

Em relação ao suco de laranja, segundo a Citrus BR (2023), nos anos de 2022/2023 houve uma produção de mais de 1 milhão de toneladas de suco de laranja no Brasil. Além disso, o Brasil também é líder na exportação mundial de suco de laranja concentrado e responde por 79 % do suco de laranja comercializado no mundo.

O suco de laranja é um suco de fruta popular e amplamente consumido devido ao seu alto valor nutricional e benefícios à saúde (KIRCHER 2014; NEVES *et al.* 2020). Este suco é considerado uma boa fonte de vitaminas, particularmente a vitamina C, que desempenha um papel crucial em vários processos fisiológicos, como síntese de colágeno, função imunológica e proteção antioxidante (PAN *et al.* 2023). Além disso, o suco de laranja é rico em compostos fenólicos, que têm sido associados a uma ampla gama de benefícios à saúde, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (ALHABEEB *et al.* 2022; MILES e CALDER 2021; SARVARIAN *et al.* 2022).

Na indústria de sucos de frutas, as enzimas são utilizadas para aumentar a produtividade, melhorar a dissolução, clarificação, filtração, maceração e extração dos tecidos vegetais (BHAT, 2000; UENOJO e PASTORE, 2007). As enzimas de maceração desempenham um papel fundamental no processamento, reduzindo a viscosidade da polpa, o que ajudará na filtração e clarificação de sucos (PANDA *et al.*, 1999). O processo representa a mais antiga aplicação destas enzimas (PILNIK e ROMBOUTS, 1981).

Em comparação com as enzimas solúveis, as enzimas imobilizadas são mais robustas e mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, de temperatura, pH e solventes orgânicos, tornando-as mais atraentes para aplicação industrial. Além disso, existe ainda a possibilidade de reutilização do biocatalisador e de interrupção da reação, visto a facilidade de separação das enzimas imobilizadas do meio, quando se atinge um determinado grau de conversão; além da possibilidade de conduzir processos contínuos (BRADY; JORDAN, 2009; MENDES *et al.*, 2011).

Para a obtenção de biocatalisadores eficientes, a seleção de um suporte adequado para imobilização de enzimas é importante, o qual deve apresentar elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, capacidade de regeneração, morfologia e composição apropriada, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes em sua superfície, dentre outras, podendo ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, podem ser



porosos, não porosos e de estrutura em gel (MATEO *et al*, 2007; MENDES *et al*, 2011; TALBERT; GODDARD, 2012).

Considerando estes aspectos, o trabalho tem como objetivo verificar a influência de dois suportes utilizados na imobilização das enzimas e seus efeitos no processo de clarificação, na qualidade e nas propriedades nutricionais do suco de laranja.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral:**

O objetivo geral deste trabalho é analisar os efeitos do processo de clarificação, com pectinases imobilizadas em dois diferentes suportes, sobre a composição nutricional e qualidade do suco de laranja.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Estudar a imobilização de pectinases em um suporte inorgânico à base de sílica e um suporte orgânico a base de quitosana, ambos ativados com genipina ou glutaraldeído.
- Aplicar as enzimas imobilizadas no processo de clarificação de suco de laranja;
- Avaliar os efeitos dos diferentes biocatalisadores na clarificação do suco de laranja;
- Avaliar os efeitos nas propriedades nutricionais, físico-químicas e na qualidade do suco de laranja clarificados em comparação ao suco não-clarificado;
- Avaliar a quantidade de vitamina C nos sucos clarificados em comparação ao suco não-clarificado
- Avaliar os compostos fenólicos nos sucos clarificados em comparação ao suco não-clarificado
- Avaliar a turbidez nos sucos clarificados em comparação ao suco não-clarificado;
- Avaliar a cor dos sucos clarificados em comparação ao suco não-clarificado;
- Avaliar a quantidade de açúcares redutores nos sucos clarificados em comparação ao suco não-clarificado;
- Avaliar o grau Brix nos sucos clarificados em comparação ao suco não-clarificado;
- Avaliar o pH dos sucos clarificados em comparação ao suco não-clarificado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 SUCO DE FRUTAS: LEGISLAÇÃO E PRODUÇÃO

Segundo a legislação brasileira (decreto 6.871/2009), suco ou sumo é a bebida não fermentada, não concentrada, e não diluída, destinada ao consumo, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo. Além disso, os sucos de frutas devem atender à legislação específica, estando de acordo com definição, classificação, registro, padronização e requisitos de qualidade, devendo também atender à legislação sobre rotulagem de alimentos embalados (MAPA, 2020).

As composições dos sucos variam de acordo com as variedades ou espécies de frutas, bem como pela sua maturidade, resultado de efeitos ambientais e climáticos da estação de crescimento (BROEK, 1993). Já a qualidade dos sucos processados depende também das propriedades físico-químicas (acidez, pH, sólidos solúveis, açúcares, cor, viscosidade e vitamina C) e das características microbiológicas e sensoriais. A Instrução Normativa Nº 12, de 4 de Setembro de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, fixa os padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical (MAPA, 2020).

A *Mintel* - empresa fornecedora de dados, pesquisa e análise de mercado em nível global - divulgou um relatório (2022) sobre o consumo de sucos no Brasil em que revela os seguintes dados:

- 28 % dos brasileiros reduziram o consumo da bebida por terem a percepção de que é um produto rico em açúcar;
- Muitos consumidores percebem a bebida como aliada de uma dieta saudável;
- 33 % dos consumidores estão dispostos a pagar mais por sucos feitos a partir de ingredientes sustentáveis;
- 27 % dos consumidores pagariam mais por sucos envasados em embalagens sustentáveis (SEBRAE, 2023).

Segundo uma pesquisa realizada pela *Brazil Food Trends (2020)*, os sucos prontos para beber estão na categorias de produtos a serem mais consumidos levando em consideração os impactos da tendência de saudabilidade e bem-estar.

A citricultura possui uma importância relevante na economia brasileira, gerando 9 bilhões de reais anuais ao PIB do país, contribuindo com a balança comercial nacional e, principalmente, como geradora direta e indireta de 400.000 empregos na área rural (Lopes et al., 2011).

### **3.2 CARACTERÍSTICAS DO SUCO DE LARANJA, PROPRIEDADES NUTRICIONAIS E QUALITATIVAS**

Nos últimos anos, maior atenção tem sido dada às frutas e verduras, uma vez que evidências epidemiológicas têm demonstrado que o consumo regular de vegetais está associado à redução da mortalidade e morbidade por algumas doenças crônicas não transmissíveis (MELO *et al*, 2008).

Esses resultados estão relacionados, em grande parte, com a presença de compostos bioativos nesses alimentos. Os compostos bioativos, também conhecidos por fitoquímicos, são compostos presentes em frutas e hortaliças, que exercem uma potente atividade biológica, e podem desempenhar diversos papéis em benefício da saúde humana (CARRATU; SANZINI, 2005).

As frutas e vegetais contêm muitos compostos com potencial atividade antioxidante, como vitamina C, carotenoides, clorofilas e compostos fenólicos (PELLEGRINI, 2007). Dentre estes, os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização, sendo caracterizados como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substitutos hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SOARES *et al.*,2008).

Os compostos fenólicos do suco de laranja são influenciados pela variedade, estado de maturação da fruta, pelas condições edafoclimáticas, pelo sistema de cultivo, pelo período pós-colheita e ainda pelas condições de processamento. (HAARD, 1984; BALDWIN *et al*, 2000; MACORIS *et al*, 2011).

Entre os compostos fenólicos, as flavanonas são a classe mais abundante, das quais a hesperidina e narirutina, e naringina e neohesperidina são os compostos mais importantes, presentes principalmente em laranjas doces e azedas, respectivamente. Eriocitrina, didimina, poncirina e neoeriocitrina também foram identificadas em laranjas e sucos de laranja em diferentes espécies, e estão presentes em quantidades menores (KHAN, *et al*, 2014; GATTUSO, *et al*, 2007; PETERSON *et al*, 2006).

Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes e, quando incorporados na alimentação, reduzem o risco de desenvolvimento de algumas doenças, como arteriosclerose e câncer, além de proteger a saúde humana contra doenças degenerativas crônicas (LAKO *et al.*, 2007). Compostos antioxidantes são substâncias químicas que inibem o processo de oxidação, ou ainda qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, podemos defini-los como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos danosos de reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALLA; FAINE, 2008).

Desta forma, os antioxidantes podem prevenir ou diminuir os danos oxidativos de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos causados por espécies de oxigênio reativo, que incluem os radicais livres, ou seja, possuem a capacidade de reagir com os radicais livres restringindo os efeitos maléficos ao organismo. Assim, os citros, como muitas frutas, são ricos em substâncias antioxidantes que ajudam a diminuir a incidência de doenças degenerativas, como o câncer, as doenças cardiovasculares, inflamações, disfunções cerebrais, e a retardar o envelhecimento precoce (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, tendo como principal ação a inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Além disso, os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Na Tabela 1 podemos ter uma visão geral dos compostos bioativos, bem como de suas fontes naturais e benefícios.

Tabela 1. Compostos bioativos de origem natural: fontes e benefícios ao organismo.

<b>Compostos</b>	<b>Possível efeito</b>	<b>Fonte</b>
<b>TERPENÓIDES</b>		
Carotenóides	Antioxidantes que protegem contra câncer e podem reduzir a placa arterial	Salsa, cenoura, abóbora, batata doce, inhame, espinafre, couve, nabo, damasco e frutas cítricas
Limonóides	Estimulam a produção de enzimas protetoras	Frutas cítricas

Licopeno	Antioxidante, aumenta a resistência ao câncer	Tomate, melancia e goiaba
Monoterpenos	Antioxidantes que combatem câncer, inibem a produção de colesterol e promovem enzimas protetoras	Brócolis, salsa, cenoura, couve, pepino, abóbora, inhame, tomate, berinjela, uva, frutas cítricas, hortelã, manjericão
Esteróides vegetais	Bloqueiam a ação do estrogênio no câncer de mama, ajudam a bloquear a absorção do colesterol	Brócolis, couve, pepino, abóbora, inhame, tomate, berinjela, soja, cereais integrais
Triterpenois	Previnem a queda dos dentes e atuam como agentes anti-úlceras. Ligam-se ao estrogênio e inibem o câncer	Frutas cítricas, raiz de alcaçuz, soja

---

### TIÓIS

---

Sulfetos alílicos	Promovem a atividade das enzimas protetoras, inibem a síntese de colesterol e atividade inflamatória	Cebola, alho
$\gamma$ -glutamil cisteína	Pode baixar a pressão arterial e elevar a atividade do sistema imunológico	Alho
Isotiocianatos	Induzem enzimas protetoras	Mostarda, rábano, rabanete

---

### FENÓLICOS

---

Catequinas	Previnem o câncer gastrointestinal, podem modificar a resposta imunológica e baixam os níveis de colesterol	Chá verde, uva, cerejas
Cumarinas	Previnem a coagulação sanguínea e podem atuar como anticancerígenos	Salsa, cenoura, frutas cítricas
Flavonoides	Dificultam a absorção de certos hormônios que promovem o câncer	Soja, cenoura, uva, frutas cítricas, brócolis, pepino, abóbora, inhame, tomate, couve, berinjela, pimenta, salsa, cerejas

Genisteína	Pode bloquear a disseminação de tumores, detendo a proliferação de células cancerosas	Soja e vegetais da família da couve
Ácidos fenólicos	Podem auxiliar na resistência ao câncer por inibir nitrosamina e afetar atividades enzimáticas	Salsa, cenoura, brócolis, couve, tomate, berinjela, pimenta, uva, frutas cítricas, cereais integrais, cereja

---

### OUTROS

---

Fibras	Diluem carcinógenos no cólon e aceleram sua passagem pelo sistema digestivo; impedem o crescimento de bactérias nocivas e estimulam as saudáveis	Cereais integrais, vegetais, frutas
Indóis	Estimulam a produção de enzimas protetoras que inativam o estrogênio	Couve, couve de bruxelas, repolho
Ácido linolênico	Agente anti-inflamatório	Vegetais folhosos, sementes
Ftalídeos	Estimulam a produção de enzimas que desintoxicam carcinógenos	Salsa, cenoura, aipo
Poliacetilenos	Protegem da ação de carcinógenos do tabaco e regulam prostaglandinas	Salsa, cenoura, aipo

Fonte: Camargo et al. (2007).

Os citros, principalmente laranjas e tangerinas, fazem parte da dieta dos brasileiros e são importante fonte de vitaminas e fibras. As frutas e sucos cítricos recentemente possuem importante reconhecimento por conterem metabólitos secundários, incluindo antioxidantes, como ácido ascórbico, compostos fenólicos e limonóides, que são importantes para a nutrição humana (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007). Além disso, o suco de laranja é um alimento conhecido por seu alto conteúdo de vitamina C, carotenóides, folato e potássio. Junto com outras frutas cítricas, o suco de laranja é também fonte de flavonoides, hesperidina e naringinina, que protegem contra o câncer e a arterosclerose (USDA-2007; SILALAH, J; 2002).

O estudo de Cesar e colaboradores (2010), mostrou que o suco de laranja apresenta propriedade redutora sobre o colesterol, e neste mesmo estudo, foi sugerido que a associação dos flavonóides cítricos com a vitamina C previne o estresse oxidativo e o desenvolvimento da aterosclerose.

A vitamina C é uma molécula hidrossolúvel, também conhecida como ácido ascórbico, e sua importância nutricional está estabelecida há muito tempo. Sabe-se que sua deficiência causa escorbuto, enfermidade caracterizada por sangramento da gengiva, dificuldade na cicatrização de feridas, fadiga e anemia, podendo ser fatal (PHILLIPS *et al.*, 2010).

O ácido ascórbico é um cofator em diversos processos fisiológicos, incluindo a hidroxilação de prolina e lisina na síntese de colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo, a síntese de norepinefrina e de hormônios adrenais, a ativação de hormônios peptídicos e a síntese de carnitina, age ainda como antioxidante, facilitando a absorção intestinal de ferro e a manutenção do íon ferroso no plasma sanguíneo (TARRAGO-TRANI *et al.*, 2012).

A vitamina C é fundamental para a imunidade e participa ainda de inúmeras ações fisiológicas e antioxidantes. Por esse motivo, tem havido uma corrida por suplementos nas farmácias, quando na verdade, os alimentos já a oferecem em níveis adequados. A ingestão muito acima do recomendado pode também prejudicar o organismo. A orientação é ingerir diariamente 75mg, no caso das mulheres, e 90 mg, homens (ASBRAN, 2020) A legislação brasileira vigente (BRASIL, 2012) dispõe regulamentos para que um alimento seja considerado “fonte” ou com “alto conteúdo” de vitaminas, o qual deve representar no mínimo 15 % ou 30 % da IDR (Ingestão Diária Recomendada), respectivamente, em 100 g ou 100 mL. Desta forma, o consumo de 100 mL de suco de laranja bahia, por exemplo, corresponde a 94,5 mg, o que atende as necessidades de mulheres e homens.

Conforme a tabela TACO - Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (UNICAMP, 2006), o teor de ácido ascórbico na laranja-bahía e na laranja-pêra são 94,50 e 73,30 mg.100 mL<sup>-1</sup> de suco, respectivamente; em relação à laranja-lima, o teor de vitamina C é de 41,3 mg.100 mL<sup>-1</sup> de suco. Essas variações podem ocorrer entre as cultivares, local e ano de produção, além do grau de maturação dos frutos.

Estudos mostraram que a vitamina C desempenha um papel importante na função vascular, modulando a barreira celular endotelial e regulando a atividade das NADPH oxidases (NOXs) envolvidas na resposta gênica inflamatória (TVEDEN-NYBORG , LYKKESFELDT, 2013).



### 3.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO SUCO DE LARANJA

O PIQ (Padrão de Identidade e Qualidade) do suco de laranja, estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2018), deve ser usado como parâmetro para a análise físico-química e controle de qualidade dos sucos, permitindo caracterizar as bebidas e estabelecer diferenças entre as mesmas.

O suco de laranja é o produto definido no art. 18 do Decreto nº 6.871, de 2009, obtido da parte comestível da laranja (*Citrus sinensis*), por meio de processo tecnológico adequado.

O suco de laranja deve obedecer às características e composição abaixo (tabela 2), além de possuir cor amarela, sabor e aroma próprios.

Tabela 2: Padrão de identidade e qualidade do suco de laranja (PIQ)

<b>Parâmetro</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Sólidos solúveis em °Brix, a 20° C	10	-
Relação de sólidos solúveis em brix/acidez em g/100g de ácido cítrico anidro	7	-
Ácido ascórbico (mg/100mg)	25	-
Açúcares totais naturais da laranja (g/100g)	-	13
Óleo essencial de laranja (% v/v)	0	0,035

### 3.4 APLICAÇÃO DE ENZIMAS EM SUCOS

O primeiro grande avanço do uso das enzimas na indústria de alimentos ocorreu por volta dos anos 1960 com o lançamento da glicoamilase para hidrólise do amido, resultando em glicose. Depois disso, quase toda a produção de glicose mudou para hidrólise enzimática, ao invés da hidrólise ácida tradicional (NOVOZYMES, 2013).

ENZIMA	FUNÇÃO	APLICAÇÃO
Enzima de maceração (pectinases, celulases e hemicelulases)	Hidrólise de pectina solúvel e de componentes de paredes celulares, diminuição de viscosidade e manutenção de textura de sucos de frutas	Melhoramento na extração de sucos de frutas e óleo de oliva, liberação de aromas, enzimas, proteínas, polissacarídeos, amido e ágar
Pectinase ácida e termo-estável como poligalacturonase, pectina esterase e pectina transeliminase	Rápida diminuição de viscosidade e hidrólise dos tecidos vegetais	Melhora o rompimento da fruta e aumenta a extração de pigmentos de cor
Poligalacturonase com alta atividade de pró-pectinase e baixa celulase	Hidrólise parcial de pró-pectina	Produção de purês com alta viscosidade
Poligalacturonase e pectina trans-eliminase com baixa atividade de pectina esterase e hemicelulase	Hidrólise parcial de pró-pectina e de pectina solúvel em fragmentos de tamanho médio, formação de precipitado e remoção de hidrocolóides de celulose	Produção de sucos vegetais não clarificados de baixa viscosidade
Poligalacturonase, pectina trans-eliminase e hemicelulase	Hidrólise completa de pectina e de polissacarídeos ramificados	Clarificação de sucos de frutas
Pectinase e $\beta$ -glicosidade	Infusão de pectinase e glicosidase para facilitar o descascamento e melhorar a firmeza de frutas	Alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais
Pectina esterase com atividade de poligalacturonase e de pectina liase	Processamento de frutas	Produção de ketchup de alta qualidade e de polpa de frutas
Pectina esterase	Desesterificação e gelificação de pectina	Melhoramento na clarificação de sidra

Enzima de maceração (pectinases, celulasas e hemicelulasas)	Hidrólise de polissacarídeos das paredes celulares vegetais	Melhoramento da maceração da casca e extração de pigmentos de cor das uvas, qualidade, estabilidade, filtração e clarificação dos vinhos
---	---	--

---

Desde então, a procura de alimentos com boa qualidade e saudáveis por parte do consumidor, proporcionou um grande crescimento no uso de enzimas. As aplicações enzimáticas na indústria alimentícia são diversificadas, melhorando a textura, sabor e até favorecendo o processo de fabricação (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; LI *et al.*, 2012).

Segundo a Novozymes (2013), as enzimas são muito utilizadas na indústria de sucos, onde são empregadas com o objetivo de melhorar a qualidade e a composição físico-química, clarificando o produto e diminuindo a viscosidade para melhorar o processo de filtração. Preparados enzimáticos comerciais utilizados na produção de suco são constituídos de um complexo de enzimas pectinolíticas, celulolíticas e hemicelulolíticas que atuam de modo combinado para a hidrólise dos polissacarídeos das frutas (SANKARAN *et al.*, 2015).

Outra aplicação das enzimas no processamento dos sucos é na etapa de extração. Olivier *et al.* (2008) ressaltam que a extração do suco envolve o processo de maceração, seguida por processamento e decantação, para separar o suco das partes sólidas. A maceração enzimática pode resultar na extração de 95 % ou mais de sólidos solúveis das frutas.

Na tabela 3 podemos observar as funções e aplicações de enzimas na indústria de alimentos e vinhos.

Tabela 3. Funções e aplicações de enzimas na indústria de alimentos e de vinhos.

Fonte: Uenojo e Pastore (2007).

### 3.4.1 Utilização de Pectinases e Celulasas em Sucos de Frutas

O uso das pectinases na indústria iniciou por volta de 1930, sendo utilizadas nas preparações de sucos e vinhos (KASHYAP, 2000). Estudos destacam o uso da enzima pectinase visando uma maior extração de materiais corantes e compostos químicos em geral. As enzimas desempenham papel fundamental no processo de elaboração de sucos, atuando na clarificação, filtração, extração e estabilidade do suco (Almeida, et al; 2005).

O uso de enzimas, como as pectinases, foi estabelecido como um método eficaz para a clarificação do suco de laranja (BAKSHI e ANANTHANARAYAN 2022; DAL MAGRO *et al.* 2021; ESAWY *et al.* 2013). Essas enzimas quebram a pectina alterando sua estrutura e composição, resultando em maior limpidez e estabilidade do suco. Essas enzimas são geralmente sintetizadas por bactérias, leveduras, fungos, plantas e por alguns insetos herbívoros (PAUCHET, *et al* 2010; GAINVORS *et al*, 1994).

As pectinases também são utilizadas para reduzir o amargor em excesso, resultante da casca de citrus, além de restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a firmeza de pêssego e pickles processados e sua infusão junto a  $\beta$ -glicosidase aumenta o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais, aumenta a quantidade de agentes antioxidantes em óleo de oliva extravirgem e reduz a indução ao ranço (BHAT, 2000).

#### 3.4.1.1 Tipos de Pectinases

- **Hidrolases:** As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases.

A polimetilgalacturonase (PMG), de forma resumida, hidrolisa polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos (RIZZATO, 1999) por clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4, podendo ser endo- ou exo-PMG (Kayshap *et al*, 2001).

As poligalacturonases (PG) hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico (MUTLU, 1999). É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido pécico (KAYSHAP *et al*, 2001).

- **Liases:** as liases, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (KAYSHAP *et al*, 2001).
- **Esterases:** a pectina metil esterase (polimetilgalacturonato esterase, PME) possui atividade desesterificante ou desmetoxilante, removendo os grupos metílicos e convertendo pectina em pectato (polímero não esterificado) (JAYANI *et al.*, 2005;

Uenojo e Pastore, 2007). Age preferencialmente no grupo metálico próximo a uma unidade não esterificada (KASHYAP *et al.*, 2001).

- **Protopectinases:** estas enzimas solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada (KAYSHAP *et al.*, 2001). As protopectinases não são tão abundantes e na indústria, estas enzimas possuem pouco interesse na degradação da pectina (ALKORTA *et al.*, 1998).

### 3.4.1.2 Tipos de Celulases

As celulases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, promovendo a hidrólise das ligações químicas existentes entre as unidades de glicose. Estas enzimas são biocatalisadores com alta especificidade que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, sendo suas atividades combinadas maior que a soma das atividades individuais de cada componente (ORTEGA *et al.*, 2001, GALBE & ZACHI, 2002).

As celulases são utilizadas na indústria de bebidas para produção de sucos de frutas e nos processos de vinificação. São enzimas que facilitam a extração e a maceração de sucos de frutas por romperem a rede de celulose que ajuda reter o líquido nas células vegetais (ZANCHETTA, 2013).

- **Endoglucanases:** As endoglucanases são as enzimas do complexo celulásico responsáveis por iniciar a hidrólise. Estas enzimas hidrolisam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos (LYND *et al.*, 2002).
- **Exoglucanases:** São enzimas que atuam na porção cristalina da molécula de celulose e catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas, liberando celobiose das extremidades das cadeias. Estas enzimas ainda podem ser divididas em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa terminais redutores, enquanto que a do tipo II (CBH II) hidrolisa terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).
- **Beta-glicosidases:** As  $\beta$ -glicosidases, ou  $\beta$ -glicosídeo glucohidrolases, que é seu nome sistemático, possuem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Estas enzimas são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise (LYND *et al.*, 2002).

A figura abaixo (Fig. 1), mostra a ação das celulases sobre as moléculas de celulose.

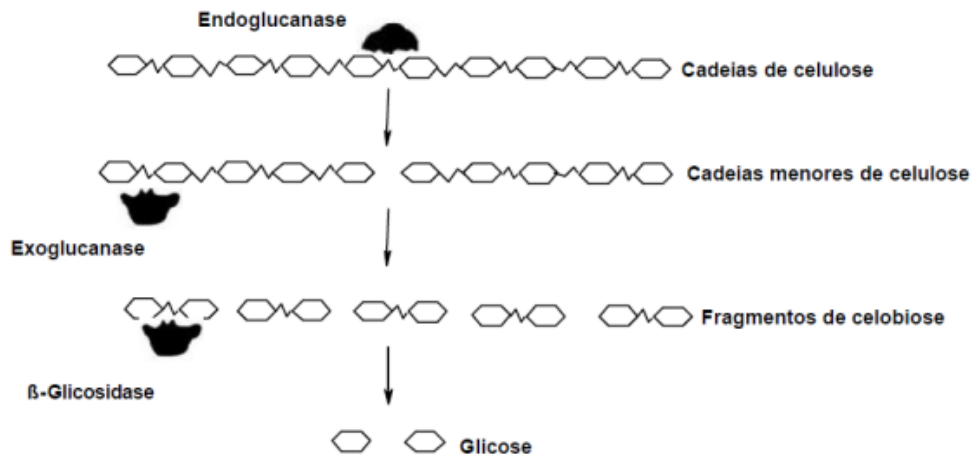


Figura 1. Ação das celulases sobre as moléculas de celulose (modificado de Wright et al, 1988).

### 3.5 CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE FRUTAS

Os sucos de frutas são naturalmente turvos, porém em diferentes graus, principalmente pela presença de polissacarídeos (pectina, celulose, hemiceluloses, lignina e amido), proteínas, taninos e metais (VAILLANT *et al.*, 2001). Se o aspecto límpido do suco é fator determinante para consumidores, a indústria de sucos de frutas vem investindo em métodos que otimizem esse recurso (TRIBESS E TADINI, 2006).

A demanda do mercado por sucos com aspectos visuais mais atrativos aos olhos dos consumidores, levou pesquisadores a estudarem processos de clarificação com mínimas intervenções sensoriais, minimizando as perdas de suas características organolépticas e nutricionais. A clarificação se dá através dos seguintes processos:

- Processos físicos: decantação, centrifugação e filtração.
- Processos bioquímicos: utilização de enzimas como as pectinases, amilases, celulases e hemicelulases.
- Processos químicos: agentes de refinamento como PVPP (polivinilpolipirrolidona), terra diatomácea, gelatina, entre outros.

Para se obter melhores resultados, estes processos podem ser utilizados em associação.

A alta concentração de pectina leva à formação de colóides, que constitui um dos principais problemas durante o processamento de sucos de frutas. Embora as partículas

suspensas da polpa possam ser removidas por filtração, a presença de pectina pode dificultar esse método (SULAIMAN *et al.*, 1998).

Durante o processamento, o suco de laranja passa por clarificação para remover partículas suspensas e impurezas, que podem afetar sua aparência, estabilidade e atributos sensoriais (BAKSHI E ANANTHANARAYAN 2022; SATYANNARAYANA *et al.* 2023).

O método tradicional de clarificação consiste em adicionar um agente coagulante para, então, decantar ou filtrar o suco. A filtração realizada de forma convencional é geralmente realizada em filtros rotativos a vácuo, entretanto, existem várias limitações aos métodos, empregados, tais como: lentidão do processo de decantação, que requer um número elevado de tanques e uso de auxiliares de filtração que podem modificar o sabor dos sucos, além de que, o processo de clarificação convencional apresenta um elevado custo devido ao tempo, ao consumo de energia e a necessidade de adição de agentes coagulantes (BORGES, 1998).

A despectinização de sucos de frutas através do uso de pectinases têm se apresentado como uma alternativa eficiente para reduzir a turbidez, (KASHYAP *et al.*, 2001; LANDBO E MEYER, 2007). As pectinases degradam a pectina, portanto, resultando em redução da viscosidade e formação de aglomerados, o que facilita a separação através da decantação, centrifugação ou filtração. Como resultado, o suco apresenta maior limpidez, sem afetar as características sensoriais de sabor e aroma, devido a elevada seletividade na ação das enzimas (ABDULLAH *et al.*, 2007; KAUR *et al.*, 2004).

### **3.6 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

O uso de enzimas livres no processamento de sucos apresenta limitações, como degradação enzimática, atividade reduzida e baixa reutilização. Para superar esses desafios, a imobilização de enzimas foi proposta como uma abordagem promissora para a estabilização de enzimas. A imobilização de enzimas pode melhorar sua estabilidade, atividade e seletividade, enquanto reduz a degradação e perda de enzimas durante o processamento do suco (BOLIVAR *et al.* 2022; Garcia-Galan *et al.* 2011; RODRIGUES *et al.* 2013).

A imobilização de enzimas é uma poderosa ferramenta utilizada para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas para aplicação industrial (MATEO *et al.*, 2007). Pode-se definir como enzimas imobilizadas, aquelas fisicamente retidas, normalmente em uma matriz sólida, com manutenção da sua atividade catalítica, podendo ser utilizadas continuamente (GARCIA-GALAN *et al.*, 2011).

### 3.6.1 Métodos de Imobilização de Enzimas

Existem várias formas de classificar os métodos utilizados para imobilizar enzimas. Uma classificação proposta por Kennedy e White (1986), combina a natureza da interação responsável pela imobilização com a natureza do suporte utilizado.

Alguns dos métodos de imobilização de enzimas são: retenção física, que consiste no aprisionamento das moléculas de enzima em matriz polimérica, microcápsula ou membrana; a imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel, e pelo uso de um reagente multifuncional por ligações cruzadas (HAIDER, HUSAIN, 2008). Estes métodos podem ser observados na figura 2.

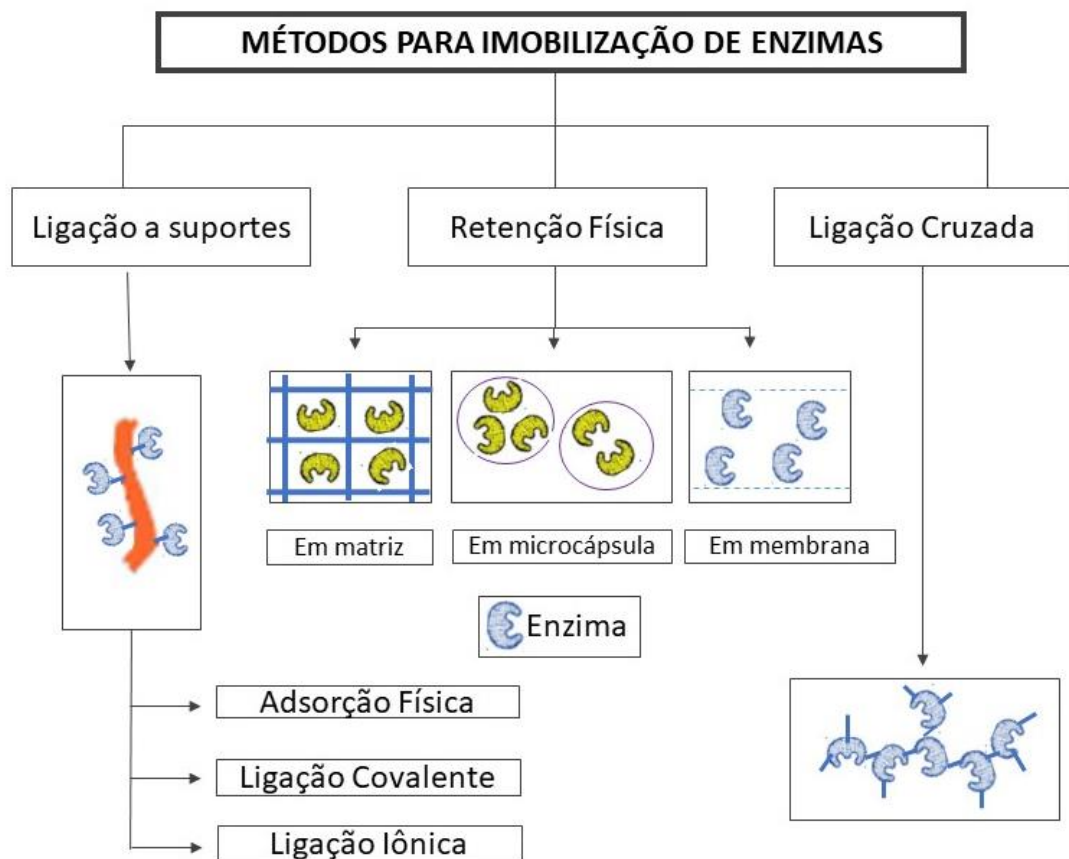


Figura 2 – Métodos para imobilização de enzimas (adaptado de Dalla Vecchia, 2004).



### 3.6.1.1 Adsorção

A adsorção é um método simples e muito empregado para imobilização de enzimas. Neste método, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio de ligações como interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (FERNANDEZ *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2012).

A adsorção possui algumas vantagens em seu uso, as principais são: a facilidade e simplicidade da técnica, o baixo custo associado a não necessidade de ativação do suporte e a possibilidade de reutilização do suporte após vários ciclos. Além disso, a adsorção promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável (ZHOU *et al.*, 2012).

### 3.6.1.2 Ligação Covalente

A imobilização covalente consiste na ligação da enzima ao suporte por ligações irreversíveis. Sua força é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez na sua estrutura. Esta por sua vez, pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros (MATEO *et al.*, 2007; MACARIO *et al.*, 2009; MELITIÉ *et al.*, 2009).

Os protocolos para a imobilização covalente da enzima, frequentemente, se iniciam com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, onde os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (FERNANDEZ *et al.*, 2013).

### 3.6.1.3 Encapsulação e Confinamento

Este tipo de imobilização de enzimas envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. À medida que a polimerização prossegue, a matriz polimérica se forma em torno da enzima, confinando-a em sua estrutura (KATO *et al.*, 2002; HODGSON *et al.*, 2004).

### 3.6.1.4 Reticulação

O agente de reticulação é uma molécula que tem pelo menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos na superfície da enzima. Estes agentes, que estão disponíveis comercialmente, podem ser classificados quanto aos grupos reativos presentes em suas extremidades (homobifuncional e heterobifuncional), a especificidade de seus grupos reativos, o comprimento do braço espaçador (*space arm*), solubilidade e reatividade (LA ROTTA HERNANDEZ, 2005; HAN *et al.*, 1984; WONG E WONG, 1992).

Um dos principais métodos de imobilização por reticulação é o CLEA – *cross-linked enzyme aggregates*, que trata-se de um agregado de enzimas reticuladas.

Os CLEAs foram inicialmente desenvolvidos por Cao e colaboradores em 2000, como uma alternativa aos CLEs (*cross-linked enzyme*), e CLECs (*Cross-linked enzyme crystals* - Cristais de enzimas reticuladas), na tentativa de contornar seus inconvenientes (CAO *et al.*, 2000).

A síntese dos CLEAs envolve a precipitação da enzima (sem a necessidade que estas estejam em sua forma pura), seguida de sua reticulação química por meio do uso de um reagente bifuncional, geralmente o glutaraldeído, resultando em agregados enzimáticos insolúveis (SHELDON *et al.*, 2005; FERNANDEZ–LAFUENTE *et al.*, 2009).

Os agentes de precipitação proporcionam uma agregação física das moléculas de enzima em grandes estruturas moleculares, sem perturbação da estrutura tridimensional original da proteína. Estes agregados sólidos são mantidos por ligação não covalente e facilmente se dissolvem, quando dispersos em meio aquoso. Desta forma a etapa de entrecruzamento é necessária para estabilizar os agregados por ligações covalentes, no qual as moléculas de enzimas são ligadas quimicamente umas às outras por um reagente bifuncional através da uma reação de grupos amino de resíduos de lisina presentes na superfície externa da enzima, tornando os agregados permanentemente insolúveis (SHELDON, 2007; KARTAL *et al.*, 2011; SHELDON, 2011).

Em baixas concentrações do agente de entrecruzamento, as ligações entre as enzimas são insuficientes para formação dos agregados, deixando muita enzima livre em solução. Já para altas concentrações, fortes ligações entre as enzimas são formadas, tornando o CLEA um agregado rígido, impedindo o acesso do substrato ao sítio ativo das enzimas imobilizadas no interior do agregado (YU *et al.*, 2006; DAL MAGRO *et al.*, 2016).

### 3.6.2 Tipos de Suportes para Imobilização de Enzimas

A utilização de um suporte adequado para a imobilização de enzimas é um fator-chave para o desenvolvimento de biocatalisadores eficientes (BICKERSTAFF, 1997).

A natureza física dos suportes pode variar, desde materiais gelatinosos até superfícies rígidas, recobertas com substâncias capazes de interagir com a enzima. A escolha do suporte também dependerá das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada (MILETIĆ et al., 2009).

Os suportes utilizados para imobilização se dividem em dois tipos principais, segundo Carvalho, Canilha e Silva, (2006).

1. Os que confinam fisicamente a enzima, ou seja, a enzima é encapsulada no suporte que pode ser glóbulos ou fibras feitas de polissacarídeos, de proteína ou de polímeros sintéticos
2. Os que aderem à superfície (adsorção física), no qual a enzima fixa-se ao suporte por ligação química (iônica ou covalente).

Os suportes utilizados para imobilização podem ser classificados de acordo com sua composição, conforme mostra a tabela 4.

Tabela 4: Classificação dos suportes de acordo com a composição.

SUPORTES				
ORGÂNICOS		INORGÂNICOS		
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Bentonita	Cerâmica
Agarose	Albumina	Polivinilos	Homeblenda	Sílica
Ágar	Gelatina	Nylon	Pedra-pome	Aluminossilicato
Quitosana	Seda	Poliamidas		Óxido de ferro
Amido		Policrilamidas		Óxido de Níquel

Fonte: Villeneuve et al. (2000).

Nesse contexto, a escolha da matriz do suporte é uma etapa crucial nesse processo, pois afeta diretamente a eficiência e a estabilidade da enzima imobilizada. Quitosana e sílica são duas matrizes de suporte comumente usadas para imobilização de enzimas no processamento de sucos (ALAGÖZ et al. 2022; L. DAL MAGRO et al. 2019).

A seguir uma breve descrição dos dois tipos de suportes utilizados na imobilização de enzimas e que foram utilizados neste trabalho:

### 3.6.2.1 Quitosana

A quitosana (Figura 3a) é a forma desacetilada da quitina (Figura 3b), a qual é considerada o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (Figura 3c). (KUMAR, M; 2000. GUPTA, K. ; TSIGO *et al.*, 2000)

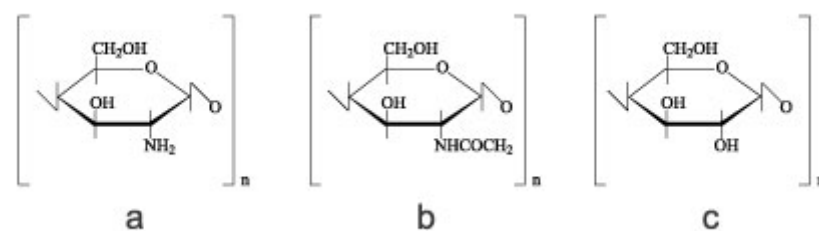


Fig. 3 Estrutura dos biopolímeros: quitosana (a), quitina (b) e celulose (c)

A quitosana é um polissacarídeo linear com um grupamento amino produzido por hidrólise alcalina da quitina de ocorrência natural no processo de despolimerização e N-desacetilação. Os grupos amino reativos presentes na quitosana podem servir prontamente como locais para modificação química, portanto, tornam a quitosana um dos poucos polieletrólitos catiônicos naturais (pKa-6,5) (BILAL *et al.*, 2017).

A quitosana é considerada um importante suporte para a engenharia de imobilização, devido às suas características estruturais e funcionais únicas, como: não toxicidade, compatibilidade, degradabilidade, etc (MONIER *et al.*, 2010). Além disso, é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável e de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira que, em muitos casos, as consideram um importante poluente (KUMAR, M; 2000).

Na clarificação de sucos de frutas, a quitosana pode ser usada como um agente coagulante eficaz, auxiliando na separação das partículas suspensas dos sucos (CHATTERJEE *et al.*, 2004 , DOMINGUES *et al.*, 2011 , RAI *et al.*, 2004 , RUNGSARDTHONG *et al.*, 2006). A quitosana demonstrou ser uma matriz de suporte eficaz devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de formar ligações estáveis com enzimas (HARUTYUNYAN e LASAREVA 2023; KRAJEWSKA 2004).

### 3.6.2.2 Sílica

A sílica ( $\text{SiO}_2$ ) é um dos materiais multifuncionais descritos na literatura com elevado potencial de aplicação para imobilização, principalmente devido à possibilidade de modificação da superfície deste suporte, atendendo assim a classificação da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), estabilidade térmica, estabilidade mecânica e segurança toxicológica (SOARES *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2014; VILAR *et al.*, 2008; BENVENUTTI *et al.*, 2009).

A sílica pode ser adquirida comercialmente ou produzida em escala laboratorial por diferentes técnicas, sendo a mais utilizada para imobilização de enzimas, a sílica produzida pela técnica sol-gel (ISPAS *et al.*, 2009; ZOU *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2014).

A sílica gel é um tipo amorfo de  $\text{SiO}_2$  que apresenta estrutura muito porosa. Sua formação se dá pela acidificação de soluções aquosas de silicato de sódio, gerando um precipitado gelatinoso, que é lavado com água para eliminar eletrólitos e depois desidratado, seja por aquecimento ou por secagem por pulverização, além de ser utilizada como dessecante, absorvente seletivo, suporte cromatográfico, substrato, catalisador e isolante (térmico e sonoro) (CHRISTY, 2012; RONDA *et al.*, 2015), é amplamente utilizada devido à sua alta área superficial e porosidade, o que permite uma eficiente imobilização de enzimas (HARTMANN 2005; MONTOYA *et al.* 2022; WU e MU 2022; ZUCCA e SANJUST 2014).

### 3.6.3 AGENTES DE RETICULAÇÃO

A imobilização de enzimas em matrizes de suporte requer o uso de um agente de reticulação para ligar covalentemente a enzima à matriz (ALAVARSE *et al.* 2022; GOVARDHAN, 1999). Neste trabalho, dois agentes de ativação foram utilizados: glutaraldeído e genipina.

#### 3.6.3.1 Glutaraldeído

O glutaraldeído é um agente de reticulação amplamente utilizado que forma uma ligação covalente entre a enzima e a matriz do suporte por meio da reação com os grupos amino e carboxila da superfície (Barbosa *et al.* 2014). É habitualmente utilizado também devido à sua

elevada estabilidade, apesar da sua citotoxicidade (LI *et al.*, 2013) e preocupações ambientais, o que limita seu uso em algumas aplicações (GOUGH *et al.* 2002).

O processo de reticulação envolve a formação de bases de Schiff, que são então convertidas em ligações de amina secundária estáveis por meio de redução. O glutaraldeído tem se mostrado eficaz na estabilização de enzimas, melhorando sua atividade e permitindo a reutilização do biocatalisador imobilizado (DAL MAGRO *et al.* 2020; de ANDRADES *et al.* 2019).

O glutaraldeído possui grande aplicabilidade e versatilidade como agente reticulante, alguns estudos já mostraram que ele pode atuar de forma negativa na imobilização de enzimas em suportes sólidos, causando a danificação dos seus sítios ativos, comprometendo a atividade catalítica das mesmas (KARNCHANAJINDANUN *et al.*, 2011; CAVELLO *et al.*, 2014).

De forma geral, o glutaraldeído é considerado um dos agentes reticulantes mais versáteis e empregados na ativação de suportes para a imobilização de biocatalisadores, apresentando relevância considerável na biotecnologia e engenharia enzimática (BARBOSA *et al.*, 2014)

### 3.6.3.2 Genipina

A genipina é um iridoide natural usado como agente de reticulação derivado do fruto do jenipapo, a *Genipa americana* (ALAVARSE *et al.* 2022; TACIAS-PASCACIO *et al.* 2019).

A genipina forma ligações covalentes com os grupos amino das enzimas por adição nucleofílica, resultando em reticulação estável sem a necessidade de redução (YU *et al.* 2021).

A genipina pode reagir espontaneamente com grupos amina primários de aminoácidos, peptídeos ou proteínas. Essa reação é muito útil para diversas aplicações biológicas devido a biodegradabilidade e baixa toxicidade da genipina, tornando-a um excelente reagente reticulante (TACIAS PASCACIA *et al.* 2019; NERI-NUMA *et al.* 2017).

Devido sua alta biocompatibilidade e baixa toxicidade, a genipina surge como um novo reagente bifuncional que substitui o clássico reagente glutaraldeído em reações de reticulação. Resultados obtidos em ensaios revelaram que a genipina pode apresentar cerca de 10000 vezes menos citotoxicidade que o glutaraldeído (SUNG *et al.* 2009).

Esse mecanismo único de reticulação permite que a genipina mantenha a atividade e a estabilidade da enzima (FLORES *et al.* 2019; HACKENHAAR *et al.* 2022; KLEIN *et al.* 2016),

com menos preocupações sobre toxicidade e impacto ambiental quando comparada ao glutaraldeído.

## **4.MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Enzimas**

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados preparados comerciais enzimáticos que possuem um complexo de enzimas, sendo as principais: pectinases, celulasas e hemicelulasas.

A preparação enzimática utilizada foi a Pectinex® Ultra SP-L (Novozymes), indicada pelo seu fabricantes para o uso na produção de sucos e gentilmente doada pela Novozymes (Espanha).

Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

#### **4.1.2 Suco de frutas**

Todo o experimento foi realizado em suco de laranja 100 % integral, recém-prensado sem nenhum tratamento, apenas prensado e gentilmente cedido pela empresa parceira Indústria de Sucos 4º Léguas Ltda., localizada na cidade de Caxias do Sul, RS. Os sucos cedidos foram fracionados em garrafas plásticas de 500 mL, identificados e congelados para serem utilizados ao longo do projeto.

#### **4.1.3 Pectina, ácido galacturônico, quitosana e APTMS**

Pectina de maçã, ácido galacturônico, quitosana (de cascas de camarão,  $\geq 75$  % desacetilado), tetraetilortosilicato 98 % (TEOS) e 3-aminopropiltrimetoxisilano 97 % (APTMS), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

#### **4.1.4 Genipina**

A genipina do jenipapo (*Genipa americana*), foi obtida por extração bifásica (Bellé et al. 2018). Todos os outros reagentes e solventes eram de grau analítico.

#### 4.1.5 Esferas de Quitosana

As partículas de quitosana foram preparadas pelo método de precipitação, segundo Klein et al, (2012) com modificações. Assim, 500 mg de quitosana foram dissolvidas em 20 mL de ácido acético (0,35 M). Essa solução foi sonicada por 30 min para remover as bolhas de ar. Em seguida, foi gotejada em solução de coagulação (hidróxido de sódio  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) sob agitação mecânica lenta. As partículas formadas, denominadas CH, foram separadas e lavadas com água destilada até atingir a neutralidade e armazenadas para ativação.

É importante mencionar que para obter atividades semelhantes em ambos os suportes para permitir a clarificação do suco, a concentração de proteína usada na imobilização da quitosana é 5 vezes maior do que no suporte de sílica.

#### 4.1.6 Sílica

A sílica foi preparada em parceria com o Laboratório de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo método sol-gel utilizando hidrólise e condensação de tetraetilortosilicato (TEOS) na presença de um catalisador de ácido mineral (HCl), para desenvolvimento de grupos silanol no suporte (HENCH E WEST 1990). O procedimento de síntese envolveu a mistura de 5 mL de TEOS, 5 mL de etanol e uma mistura de 36 gotas de HF/HCl ( $6/6 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em 2 mL de solução. O catalisador foi então adicionado, levando a uma gelificação quase instantânea. A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 14 dias. Posteriormente, a sílica foi triturada, lavada com água e etanol e seca a vácuo a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h. A sílica preparada foi organofuncionalizada com APTMS pelo seguinte processo: a sílica foi tratada termicamente a vácuo a  $140 \text{ }^\circ\text{C}$  por 4 horas, antes da organofuncionalização usando 1 mmol de APTMS por grama de sílica. A reação foi realizada em tolueno a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  com agitação mecânica sob atmosfera inerte por 24 h. Após a reação, o sobrenadante foi removido e os materiais foram lavados com tolueno, etanol e água. Por fim, a matriz, denominada, foi seca sob vácuo a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h.



## **4.2. Ativação de suporte e imobilização de enzimas**

### **4.2.1. Ativação com glutaraldeído**

As partículas de quitosana e sílica foram ativadas com glutaraldeído usando o seguinte procedimento descrito por Dal Magro *et al.* (2018): 50 esferas de quitosana ou 100 mg de sílica foram incubados em tampão de fosfato-potássio  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 7,0) com 1 % (v/v) de glutaraldeído a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  sob agitação por 2 h. Em seguida, os suportes, denominados CH-GLU e S-GLU, foram separados e lavados 3 vezes com tampão citrato de sódio ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,8) para retirada do excesso de glutaraldeído e utilizados para imobilização das enzimas.

### **4.2.2. Ativação com genipina**

Da mesma forma, as partículas foram ativadas com genipina seguindo o descrito por Flores *et al.* (2019): 50 partículas de quitosana ou 100 mg de sílica foram adicionados à solução de genipina ( $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  em 5 mL de tampão fosfato  $0,1 \text{ M}$ , pH 9,0) e a reação foi realizada a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1 h sob agitação. Em seguida, os suportes, denominados CH-GEN e S-GEN, foram separados e lavados 3 vezes com tampão citrato de sódio ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,8) para retirada do excesso de genipina e utilizados para imobilização da enzima.

### **4.2.3. Imobilização de enzimas**

Para imobilização da preparação enzimática, os suportes ativados, seja por genipina ou glutaraldeído, foram misturados à solução enzimática previamente diluída em tampão citrato de sódio ( $50 \text{ mmol}$ , pH 4,8), 1:10 (m:v), (10 mg de proteína por g de suporte), à temperatura ambiente sob leve agitação em um misturador de rolos por 12 horas, durante a noite. Ao final, os biocatalisadores foram separados e lavados 3 vezes com tampão citrato de sódio ( $50 \text{ mmol}$ , pH 4,8) para remover as enzimas não ligadas. Finalmente, os biocatalisadores (CH-GEN-E, CH-GLU-E, S-GEN-E, S-GLU-E) foram suspensos em tampão citrato de sódio ( $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 4,8) e armazenados a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O rendimento de imobilização (RI), eficiência de imobilização (EI) e atividade recuperada (AR) foram calculados de acordo com Sheldon e Van Pelt, 2013, seguindo as equações:

$$RI (\%) = \frac{\text{atividade imobilizada (U)}}{\text{atividade inicial (U)}} \times 100 \quad (1)$$

$$EI (\%) = \frac{\text{atividade medida (U)}}{\text{atividade imobilizada (U)}} \times 100 \quad (2)$$

$$AR (\%) = \frac{\text{atividade medida (U)}}{\text{atividade inicial (U)}} \times 100 \quad (3)$$

A atividade imobilizada refere-se à diferença de atividade observada entre a solução enzimática livre e o somatório das atividades determinadas no sobrenadante nas frações de lavagem. A atividade inicial corresponde à atividade da enzima em sua forma livre, antes da mistura com o material de suporte. A atividade do biocatalisador é a atividade medida no material de suporte após a imobilização.

### 4.3 Métodos

#### 4.3.1 Atividade de pectinase

A atividade de pectinase total foi medida usando pectina como substrato conforme descrito por Dal Magro et al (2016). Para isso, 0,1 mL de enzima diluída foi adicionado a 0,9 mL de substrato (1 g.L<sup>-1</sup> de pectina) em tampão citrato de sódio (50 mM, pH 4,8). A reação foi incubada a 37 °C, por 1 min, sob agitação. A quantidade de grupos redutores foi estimada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) de acordo com Miller (1959), usando ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de atividade pectinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido galacturônico por minuto nas condições de reação.

#### 4.3.2 Clarificação do suco de frutas

Para clarificação dos sucos de frutas foram utilizadas enzimas imobilizadas preparadas conforme o item anterior. Os sucos previamente extraídos foram encaminhados a reatores em batelada para despectinização e clarificação. Os sucos clarificados foram avaliados em função de suas propriedades nutricionais e qualitativas, conforme os protocolos descritos abaixo.

Para a clarificação, 5 U de pectinase (CH-GEN-E, CH-GLU-E, S-GEN-E, S-GLU-E) foram adicionados a 1 mL de suco de laranja puro e incubados a 40 °C por 1 h. Adicionalmente, para medir o efeito de suporte, partículas não ativadas (CH ou S) e partículas ativadas sem

enzima (CH-GEN, CH-GLU, S-GEN, S-GLU) também foram utilizadas no processo de clarificação.

### **4.3.3 Propriedades qualitativas e nutricionais**

#### **4.3.3.1 Quantificação de turbidez**

Ao final da clarificação, as partículas do suporte foram separadas e as amostras foram centrifugadas por 2 min a 5000g. Posteriormente, os sobrenadantes foram analisados através da luz dispersa por espectrofotometria, como proposto por Anderson (2005) e suas absorvâncias foram detectadas a 860 nm. A redução percentual da turbidez foi calculada considerando a absorvância do controle (suco sem nenhum tratamento) e a absorvância das amostras tratadas.

#### **4.3.3.2 Cor**

A determinação da cor do suco foi realizada através de um Colorímetro Minolta (modelo CR-400, Minolta Sensing Konica, Inc., Osaka, Japão), segundo Tiwari et al. (2010), com base em três coordenadas,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , que significam respectivamente luminosidade, que varia de 0 a 100 (preto/branco); intensidade de vermelho/verde (+/-) e intensidade de amarelo/azul (+/-). Antes da medição das coordenadas, as amostras de suco foram homogeneizadas e adicionadas com auxílio de uma pipeta de Pasteur na cubeta que será acoplada ao colorímetro. O Cromo ( $C^*$ ) foi calculado seguindo a equação 4.

$$\text{Chroma } (C^*) = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

#### **4.3.3.3 Quantificação de açúcares redutores**

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto por Miller (1959). Para a medição, 1 mL de suco diluído foi adicionado a 1 mL de DNS em tubos de ensaio. A mistura foi incubada a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriada em banho de gelo. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, a 540 nm, contra uma amostra controle preparada com água destilada, submetida ao mesmo procedimento. Os valores de absorvância encontrados em cada amostra foram convertidos em concentração através de uma curva de calibração construída com soluções de glicose.

#### 4.3.3.4 Vitamina C

A determinação de vitamina C foi realizada usando um sistema Waters HPLC série 2695 (Wilmington, EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodos Waters DAD 2998 (Wilmington, EUA) e setado para comprimentos de onda de 254nm. No sistema de HPLC, a separação foi obtida usando a coluna seletiva Aminex (HPX-87H, 300 mm × 7,8 mm, tamanho de partícula 9 µm, Bio-Rad Lab., Richmond, CA, EUA). A fase móvel foi 0,009 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> filtrada em filtro de 0,45 µm.

Antes de realizar a análise, as amostras foram diluídas, centrifugadas, desgaseificadas e filtradas em membrana de acetato de celulose (0,22 µm) (Millipore, Massachusetts, EUA). Como fase móvel utilizou-se água ultrapura (Água Miliq), contendo 0,5 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila contendo 0,5 % de ácido fórmico (B). A separação foi realizada por meio de um programa de gradiente de eluição. Os cromatogramas foram processados a 254 nm. Uma curva padrão de ácido ascórbico foi utilizada para quantificação.

#### 4.3.3.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com o protocolo descrito por Rodrigues et al. (2013). As análises cromatográficas foram realizadas usando um HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão), com coluna Synergi Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 4 µm, Phenomenex, Torrance, CA) a 0,7 mL min<sup>-1</sup> a 35 °C, coluna Synergi Hydro-RP (250 x 4,6 mm, 4 µm, Phenomenex, Torrance, CA) a 0,7 mL min<sup>-1</sup> a 35 °C, equipado com duas colunas iguais ligadas em série a um detector de arranjo de diodo e um espectrômetro de massas com analisador Q-TOF e fonte de ionização por electrospray (ESI) (Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QII, Bremen, Alemanha). Água ultrapura, contendo 0,5% de ácido fórmico (A) e acetonitrila contendo 0,5% de ácido fórmico (B) foram utilizados como fase móvel. A separação foi realizada por meio de um programa de gradiente de eluição.

Os cromatogramas foram processados a 280 nm, 320 nm e 360 nm.

#### 4.3.3.6 Sólidos solúveis totais (Brix)

O teor de sólidos solúveis totais em graus brix foi medido utilizando um refratômetro portátil 0 – 32 Brix da marca Lorben com precisão de + - 0,2 (Brix), onde uma pequena quantidade da amostra foi inserida na superfície do prisma e após alguns segundos foi observada a marcação na escala.

#### **4.3.3.7. pH**

A determinação do pH foi realizada através do método potenciométrico utilizando peagâmetro calibrado com padrões pH 4 e 7.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Effect of Support Matrix and Crosslinking Agents on Nutritional Properties of Orange Juice during Enzyme Clarification: A Comparative Study**

Pâmela M. da Silva<sup>1</sup>, Eli Emanuel Esparza-Flores<sup>1</sup>, Anike H. Virgili<sup>2</sup>, Eliana W. de Menezes<sup>2</sup>, Roberto Fernandez-Lafuente<sup>3</sup>, Lucas Dal Magro<sup>4</sup>, Rafael C. Rodrigues<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Biocatalysis and Enzyme Technology Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 9500 Bento Gonçalves Avenue, P. O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> LSS - Laboratory of Solids and Surfaces, Instituto de Química, UFRGS, CP 15003, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM-CSIC Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Sul-Rio-grandense – IFSul, ZC 96015-360, Pelotas, RS, Brazil.

\* Corresponding author: Prof. Dr. Rafael C. Rodrigues, [rafaelcrodrigues@ufrgs.br](mailto:rafaelcrodrigues@ufrgs.br)

ORCID: 0000-0001-8592-850X

#### **Abstract:**

This study investigated the impact of support matrix and active group on the support on the nutritional properties of orange juice after juice clarification. Pectinase was immobilized on chitosan and aminated silica supports, activated with genipin or glutaraldehyde, and applied for juice clarification. The effects on various juice properties, including reducing sugars, total soluble solids, vitamin C, and phenolic compounds, juice color and pH were evaluated. The results revealed that the immobilization on chitosan activated using genipin resulted in the highest biocatalyst activity (1211.21 U.g<sup>-1</sup>). The juice treatments using the biocatalysts led to turbidity reduction in the juice (up to 90 %), with the highest reductions observed in treatments involving immobilized enzyme on chitosan. Importantly, the enzymatic treatments preserved the natural sugar content, total soluble solids, and pH of the juice. Color differences between treated and raw juice samples were especially relevant for those treated using enzyme, with

significant differences in  $L^*$  and  $b^*$ , showing loss of yellow vivid color. Analysis of phenolic compounds and vitamin C showed no significant alterations after enzymatic treatment to the raw juice. According to our results, the clarification of orange juice using immobilized enzyme can be a compromise in turbidity reduction and color reduction to maintain juice quality.

**Keywords:** pectinase; enzyme immobilization, orange juice, clarification, chitosan, silica, genipin, glutaraldehyde; nutritional properties.

## 1. Introduction

Orange juice is a popular and widely consumed fruit juice due to its high nutritional value and health benefits [1,2]. It is a good source of vitamins, particularly vitamin C, which plays a crucial role in various physiological processes, such as collagen synthesis, immune function, and antioxidant protection [3]. In addition, orange juice is rich in phenolic compounds, which have been associated with a wide range of health benefits, such as antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties [4–6]. Given the importance of orange juice as a nutritional beverage, it is essential to maintain its quality and nutritional value during processing and storage [3,7].

During its processing, orange juice undergoes clarification to remove suspended particles and impurities, which can affect its appearance, stability, and sensory attributes [8,9]. The clarification of fruit juices can be performed by membrane technology, using especially ultrafiltration (UF) membranes by eliminating yeast, molds, microorganisms, colloids, as well as insoluble proteins, tannins, and polysaccharides. Additionally, these membranes are used to concentrate the juice. [10–13]. Nonetheless, UF encounters the challenge of fouling. The fouling of the membrane leads to a reduction in flux and product rejection during operation, thereby resulting in elevated energy consumption [14]. The use of enzymes, such as pectinases, has been established as an effective method for clarification of orange juice [8,15]. By adding pectinases, the viscosity decreases and turbid particles are precipitated, making it easier to eliminate them through filtration or centrifugation. This enhances the yield of clarified juice and prolongs the lifespan of equipment such as filters [16]. However, the use of free enzymes in juice processing has limitations, such as enzyme degradation, reduced activity, and low reusability. To overcome these challenges, enzyme immobilization has been proposed as a promising approach for enzyme stabilization and reuse. Immobilization of enzymes can improve their stability by diverse reasons (as recently reviewed in [17], activity, and selectivity, while reducing enzyme degradation and loss during the juice processing [18].

In this context, the choice of an adequate support matrix is a crucial step in this process, as it directly affects the efficiency and stability of the immobilized enzyme [19]. Chitosan and silica are two commonly used support matrices for enzyme



immobilization in juice processing [20–24]. Chitosan, a biopolymer derived from chitin, has been shown to be an effective support matrix due to its biocompatibility, biodegradability, and ability to be activated with different reactive moieties able to form stable bonds with enzymes [25,26]. Silica, on the other hand, is an inorganic support matrix widely used due to its high surface area and porosity, which allows for efficient enzyme immobilization, mainly after its amination [27–30].

The covalent immobilization of enzymes on support matrices requires the use of a activating agent to covalently attach the enzyme to the matrix [31,32]. Glutaraldehyde is a widely used crosslinking agent that forms a covalent bond between the enzyme and support matrix by reacting with the amino groups on the enzyme surface [33]. Glutaraldehyde has been shown to be effective in stabilizing enzymes, improving their activity, and allowing for reuse of the immobilized enzyme [34]. However, glutaraldehyde has also been associated with toxicity and environmental concerns, which limits its use in some applications [35]. In a recent study by Hosseine et al. [36], an alternative support activating agent was proposed for the immobilization of pectinases. They synthesized a polyaldehyde pullulan through the oxidation of pullulan. While they propose its potential application as an alternative to glutaraldehyde for enzyme immobilization, the control of carbohydrate oxidation may be a challenge.

On the other hand, genipin is a natural iridoid used as crosslinking agent derived from the fruit of *Genipa americana* [32]. Genipin forms covalent bonds with the amino groups of enzymes through nucleophilic addition, resulting in stable crosslinking [37]. This unique reaction mechanism allows genipin to maintain enzyme activity and stability [38], with fewer concerns about toxicity and environmental impact compared to glutaraldehyde. Despite these advantages, genipin is more expensive than glutaraldehyde, which may limit its use in large-scale industrial applications, usually for mainly biocatalysts used in biomedicine [32].

Previous studies have been reported the successful use of immobilized enzymes for juice clarification, including pectinase immobilized on chitosan and silica supports [23,24]. However, these studies focused mainly on the clarification potential of the biocatalyst, without considering its effects on other important juice properties, such as possible alterations of nutritional content, color and taste. Therefore, it is important to

investigate the effect of immobilized enzymes on these juice properties to fully understand the potential benefits of this approach for juice processing. To the best of our knowledge, there is currently no published literature addressing the effect of immobilized biocatalysts on the sensory and nutritional properties of orange juice following clarification.

In this sense, we aimed to investigate the effect of support matrix and support activating agent on the nutritional properties of orange juice during enzyme clarification. Specifically, we immobilized pectinase on chitosan and silica supports activated with either genipin or glutaraldehyde and applied these biocatalytic particles to orange juice clarification. We then evaluated the effect of these immobilized enzymes on the juice clarification, as well as on other properties of the juice, including reducing concentrations of sugars, total soluble solids, vitamin C and phenolic compounds, and also color and pH. The results of this study will provide valuable insights into the development of improved enzyme immobilization techniques for juice processing, with the potential to improve both the quality and nutritional value of orange juice.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Materials*

Freshly pressed orange juice without any additional treatment was kindly donated by Hugo Pietro (Caxias do Sul RS, Brazil). Pectinex Ultra SP-L was kindly donated by Novozymes (Spain). Pectin from apple, galacturonic acid, chitosan (from shrimp shells,  $\geq 75\%$  deacetylated), tetraethylorthosilicate 98% (TEOS) and 3-aminopropyltrimethoxysilane 97% (APTMS), were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Genipin from *Genipa americana* was obtained by biphasic extraction method [39]. All other reagents and solvents were of analytical grade.

The results presented in this study represent the mean of three experiments, along with their respective standard deviations. Whenever applicable, the data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons.

### *2.2. Pectinase activity*

Total pectinase activity was measured using pectin as substrate based on Dal Magro et al [40]. For this, 0.1 mL of diluted enzyme was added to 0.9 mL of 1

g.L<sup>-1</sup> of pectin in 50 mM sodium citrate at pH 4.8. The reaction mixture was incubated at 37 °C, for 1 min, under agitation. The amount of reducing groups was estimated by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method according to Miller [41] using galacturonic acid as standard. One unit of pectinase activity was defined as the amount of enzyme needed to produce 1 μmol of reducing groups per min under the reaction conditions.

### *2.3. Support preparation*

#### *2.3.1. Chitosan beads*

Chitosan particles were prepared by the precipitation method, according to Klein et al. [42]. A solution of chitosan (2 % w/v) dissolved in 0.35 M acetic acid was sonicated for 30 min to remove the air bubbles. Then, it was dripped in 1 M sodium hydroxide (coagulation solution) under slow mechanical stirring. The formed particles, named as CH, were separated by filtration and washed with distilled water until neutrality was reached and stored for activation.

#### *2.3.2. Silica particles*

Silica was prepared through a sol-gel method utilizing tetraethylorthosilicate (TEOS) hydrolysis and condensation in the presence of HCl as catalyst, for development of silanol groups on the support [43]. The synthesis procedure involved mixing 5 mL of TEOS, 5 mL of ethanol, and a mixture of 36 drops of HF/HCl (6/6 M) in 2 mL of solution. HCl was then added, leading to almost instantaneous gelation. The mixture was left to sit at room temperature for 14 days. Subsequently, the silica was ground by mortar and pestle, washed with water and ethanol, and vacuum-dried at 90 °C for 2 h. The prepared silica was organofunctionalized with APTMS by the following process: the silica was heat treated in vacuum at 140 °C for 4 h, prior to organofunctionalization using 1 mmol of APTMS per gram of silica. The reaction was carried out in toluene at 80 °C with mechanical stirring under an inert atmosphere for 24 h. After the reaction, the supernatant was removed, and the materials were washed with toluene, ethanol, and water. Finally, the matrix, named as S, was dried under vacuum at 80 °C for 2 h.

### *2.4. Support activation and enzyme immobilization*

#### 2.4.1. Support activation with glutaraldehyde

Both chitosan and silica particles were activated with glutaraldehyde using the procedure described by Dal Magro et al [44]: 50 chitosan beads (20 mg dry mass) or 100 mg of silica were incubated in 0.1 M phosphate-potassium at pH 7.0 with 1 % (v/v) glutaraldehyde at 37 °C under gentle stirring for 2 h. After, the supports, named as CH-GLU and S-GLU, were recovered by filtration and washed 3 times with 50 mM sodium citrate at pH 4.8 to remove the excess of glutaraldehyde and used for enzyme immobilization.

#### 2.4.2. Support activation with genipin

In the same way, both particles were activated with genipin following the protocol described by Flores et al. [45]: 50 chitosan beads (20 mg dry mass) or 100 mg of silica were added to genipin solution (1.5 mg.mL<sup>-1</sup> in 0.1 M phosphate buffer at pH 9.0) and the reaction was performed at 60 °C for 1 h under gentle stirring. After, the supports, named as CH-GEN and S-GEN, were recovered and washed 3 times with sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) to remove the excess of genipin and used for enzyme immobilization.

#### 2.4.3. Enzyme immobilization on the activated supports

For immobilization of the enzyme preparation, the genipin or glutaraldehyde activated supports were added to enzyme solutions previous diluted 1:10 (m:v) in 50 mM sodium citrate buffer at pH 4.8 and room temperature in a roller mixer overnight. At the end, the biocatalysts were recovered and washed 3 times with 50 mM sodium citrate buffer (at pH 4.8 to remove the non-bound enzymes. Finally, the different biocatalysts (CH-GEN-E, CH-GLU-E, S-GEN-E, S-GLU-E) were suspended in 50 mM sodium citrate buffer at pH 4.8 and stored at 4 °C. The immobilization yield (IY), immobilization efficiency (IE) and recovered activity (RA) were calculated according to Sheldon and Van Pelt [46,47], following the equations:

$$IY (\%) = \frac{\text{Immobilized activity (U)}}{\text{Initial activity (U)}} \times 100 \quad (1)$$

$$IE (\%) = \frac{\text{Biocatalyst activity (U)}}{\text{Immobilized activity (U)}} \times 100 \quad (2)$$

$$RA (\%) = \frac{\text{Biocatalyst activity (U)}}{\text{Initial activity (U)}} \times 100 \quad (3)$$

The immobilized activity refers to the difference in activity observed between the initial free enzyme solution and the activity determined in the supernatant and washing fractions. The initial activity corresponds to the enzyme activity in its free form, before mixing to the support material. The biocatalyst activity is the activity measured on the support material after immobilization.

### 2.5. Juice clarification

The orange juice clarification was carried out as reported by Dal Magro et al. [48], considering the clarification in terms of turbidity reduction, being 100 % the turbidity of the juice without any treatment. Briefly, 5 U of pectinase (CH-GEN-E, CH-GLU-E, S-GEN-E, S-GLU-E), were added to 1 mL of raw orange juice and incubated at 40 °C for 1 h. Additionally, in order to measure the matrix effect, non-activated particles (CH or S) and activated particles without enzyme (CH-GEN, CH-GLU, S-GEN, S-GLU) were also used in the clarification process.

### 2.6. Analytical Determinations

#### 2.6.1. Turbidity

Juice turbidity was measured using spectrophotometric analysis, based on light scattering, as proposed by Anderson [49], with some modifications. At the end of clarification, support particles were recovered, by centrifugation for 2 min at 5000 g. Subsequently, the supernatants were analyzed using a spectrophotometer at 860 nm. The percentage of reduction in juice turbidity was calculated considering the absorbance of the control (juice without any treatment) and the absorbance of the treated samples.

#### 2.6.2. Total soluble solids (°Brix), reducing sugars, and pH of the juice

Soluble solids (°Brix) were measured using a refractometer at  $20.0 \pm 0.5$  °C. The reducing sugars were quantified by the DNS method, proposed by Miller [41]. The pH of the juice was measured using a digital pHmeter.

#### 2.6.3. Color determination

Determination of juice color was performed in a Minolta Colorimeter (Model CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan). It was based on 3 color coordinates:  $L^*$  (whiteness or brightness/darkness),  $a^*$  (redness/greenness) and  $b^*$  (yellowness/ blueness). The Chroma ( $C^*$ ) was calculated following the equation 4:

$$\text{Chroma } (C^*) = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (4)$$

#### 2.6.4. Ascorbic acid analysis by HPLC-DAD

The quantification of acid ascorbic acid was performed in HPLC using the method proposed by Osturk et al. [50] with some modifications. The analysis was performed using a Waters HPLC 2695 series system (Wilmington, EUA) coupled with a diode array detector Waters DAD 2998 (Wilmington, EUA), and arranged to 254 nm wavelengths. In the HPLC system, separation was achieved by using the selective Aminex column (HPX-87H, 300mm×7.8 mm, particle size 9 µm, Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA). The mobile phase was 0.009 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> filtered at 0.45 µm filter.

#### 2.6.5. HPLC-DAD analysis of phenolic compounds

Phenolic compounds determination was performed using a Shimadzu high-performance liquid chromatographer (HPLC) (Kyoto, Japan), connected in series to a DAD detector (SPD-M20A). The chromatographic separation conditions were previously described by Rodrigues et al. [51]. Phenolic compounds were separated in a Synergi Hydro-RP column (250 x 4.6 mm, 4 µm, Phenomenex, Torrance, CA) at 0.7 mL.min<sup>-1</sup> at 35 °C, using as mobile phase a linear gradient of water:formic acid (99.9:0.1, v/v, solvent A) and acetonitrile:formic acid (99.9:0.1, v/v, solvent B). The UV-vis spectra were obtained between 200 and 800 nm, and the chromatograms were processed at 280, 320, 360 nm.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Enzyme immobilization

Initially, pectinase was immobilized on both supports, chitosan and silica, using both activating agents, the most used crosslinking agent, glutaraldehyde [33], and the less toxic alternative, genipin [52]. The results for the immobilization parameters are presented in Table 5.

**Table 5.** Immobilization parameters for pectinase immobilized on chitosan and silica

	<b>Biocatalyst Activity (U.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>IY (%)</b>	<b>IE (%)</b>	<b>RA (%)</b>
Chitosan				
Genipin	1211.21 ± 22.56	30.37	27.3	8.3
Glutaraldehyde	535.17 ± 17.88	91.17	3.1	2.9
Silica				
Genipin	263.78 ± 7.23	20.12	44.02	8.86
Glutaraldehyde	152.21 ± 12.49	8.86	57.66	5.11

Analyzing the results presented in Table 1, it is possible to observe that the biocatalysts immobilized using genipin presented higher activity than those immobilized using glutaraldehyde. For the pectinase immobilization on cationic PS resin activated with glutaraldehyde, Miao et al. [53] found around 550 U.g<sup>-1</sup>. The mechanism of immobilization is similar to used for chitosan activated with glutaraldehyde in our work: modification of a cationic amino surface with glutaraldehyde, and immobilization by Schiff's base formation with amino groups between glutaraldehyde and the enzyme. The immobilization yield represents the efficiency of the immobilization process in terms of the proportion of the initial activity that is immobilized. The immobilization on chitosan-glutaraldehyde shows the highest immobilization yield. This could be attributed to the chemical properties of glutaraldehyde, which is known for its effectiveness in binding biomolecules by multifunctional factors [33]. Using silica activated with amino groups, Muller et al. [54] found 7.7 % of immobilization yield. On the other hand, the same support showed the highest immobilization efficiency compared to chitosan. These

differences might be attributed to the enzyme loading and the generation of substrate diffusional limitations, considering the large size of this molecule: the higher the enzyme load, the higher the effects of diffusional limitations on enzyme activity. Navarro-López et al. [55] immobilized the pectinase on chitosan-magnetic nanoparticles coupled with glutaraldehyde and found 65.6 % of efficiency. Although the authors used chitosan-based support, the mechanism was similar to used for silica in our work: functionalization with 3-APTMS and coupling with glutaraldehyde. The immobilization efficiency was similar for our study (57.6 %). Concerning the support activating agents, genipin is relatively stable under physiological conditions and provides long-term stability to the cross-linked products [45], while glutaraldehyde is a highly reactive compound that rapidly reacts with biomolecules. Both are widely used for enzyme immobilization presenting different results depending on the biocatalyst, the immobilization conditions and the nature of the support.

### *3.2 Juice clarification*

In order to investigate the effects of support matrix, activating agent and the enzyme on the properties of the orange juice after enzymatic clarification, the chitosan and silica particles were applied to juice clarification. The particles were used as prepared, after activation or after enzyme immobilization. The results for turbidity reduction after clarification are presented in Table 6. When naked chitosan or silica were used for juice clarification the results of turbidity reduction were very low, as well as for the particles activated but without enzyme.



**Table 6.** Effects of different treatments on orange juice parameters

Treatment	Turbidity reduction (%)	TSS (°Brix)	Reducing sugars (g.L <sup>-1</sup> )	pH	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *
Orange juice	0.00 <sup>d</sup>	10.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.20 ± 0.13 <sup>c,d</sup>	3.47 ± 0.27 <sup>a</sup>	68.81 ± 1.43 <sup>b</sup>	-5.01 ± 0.03 <sup>b</sup>	30.08 ± 1.22 <sup>a</sup>	30.49
CH	3.67 ± 0.43 <sup>c,d</sup>	9.3 ± 0.4 <sup>a,b,c</sup>	5.30 ± 0.01 <sup>a,b,c,d</sup>	3.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	63.95 ± 2.23 <sup>b</sup>	-4.45 ± 0.42 <sup>b</sup>	35.82 ± 0.31 <sup>a</sup>	36.10
CH-GEN	5.56 ± 0.33 <sup>c,d</sup>	8.9 ± 0.1 <sup>a,b,c</sup>	5.40 ± 0.07 <sup>a,b,c,d</sup>	3.37 ± 0.12 <sup>a</sup>	63.65 ± 1.66 <sup>b</sup>	-4.61 ± 0.21 <sup>b</sup>	37.74 ± 0.88 <sup>a</sup>	38.02
CH-GLU	6.14 ± 1.21 <sup>c</sup>	10.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.17 ± 0.12 <sup>d</sup>	3.36 ± 0.01 <sup>a</sup>	66.5 ± 2.98 <sup>b</sup>	-4.89 ± 0.55 <sup>b</sup>	31.57 ± 0.92 <sup>a</sup>	31.95
CH-GEN-E	93.57 ± 2.27 <sup>a</sup>	9.0 ± 0.9 <sup>a,b,c</sup>	5.21 ± 0.15 <sup>c,d</sup>	3.36 ± 0.04 <sup>a</sup>	78.93 ± 2.40 <sup>a</sup>	-2.42 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.76 ± 0.25 <sup>b</sup>	6.25
CH-GLU-E	94.15 ± 4.11 <sup>a</sup>	9.4 ± 0.5 <sup>a,b</sup>	5.51 ± 0.04 <sup>a,b</sup>	3.45 ± 0.13 <sup>a</sup>	78.6 ± 1.41 <sup>a</sup>	-2.13 ± 0.15 <sup>a</sup>	4.18 ± 0.13 <sup>b</sup>	4.69
S	6.88 ± 0.66 <sup>c</sup>	10.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.47 ± 0.03 <sup>a,b,c</sup>	3.34 ± 0.11 <sup>a</sup>	67.14 ± 1.83 <sup>b</sup>	-4.96 ± 0.65 <sup>b</sup>	33.94 ± 2.01 <sup>a</sup>	34.30
S-GEN	8.61 ± 0.91 <sup>c</sup>	8.5 ± 0.7 <sup>b,c</sup>	5.34 ± 0.12 <sup>a,b,c,d</sup>	3.27 ± 0.08 <sup>a</sup>	63.68 ± 3.22 <sup>b</sup>	-4.5 ± 0.31 <sup>b</sup>	36.22 ± 0.33 <sup>a</sup>	36.50
S-GLU	8.95 ± 0.87 <sup>c</sup>	7.9 ± 0.4 <sup>c</sup>	5.25 ± 0.11 <sup>b,c,d</sup>	3.25 ± 0.02 <sup>a</sup>	63.99 ± 1.89 <sup>b</sup>	-4.57 ± 0.27 <sup>b</sup>	35.7 ± 1.66 <sup>a</sup>	35.99
S-GEN-E	89.33 ± 3.65 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.5 <sup>b,c</sup>	5.40 ± 0.10 <sup>a,b,c,d</sup>	3.28 ± 0.00 <sup>a</sup>	78.43 ± 0.33 <sup>a</sup>	-2.15 ± 0.12 <sup>a</sup>	4.19 ± 0.72 <sup>b</sup>	4.71
S-GLU-E	82.90 ± 2.13 <sup>b</sup>	5.7 ± 0.5 <sup>d</sup>	5.55 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.28 ± 0.14 <sup>a</sup>	78.55 ± 1.54 <sup>a</sup>	-2.66 ± 0.19 <sup>a</sup>	7.22 ± 0.64 <sup>b</sup>	7.69

Results are the mean ± standard deviation. Means followed by the same letters in the same columns do not differ by Tukey's test at 5% probability.

The presence of enzymes in the particles led to a significant turbidity reduction for both chitosan and silica biocatalysts. Pectinase is responsible to breaking down the pectin and removing some of the turbidity-causing components in the orange juice [56]. Interestingly, the results indicated that there is no matrix effect on turbidity reduction. This suggests that the support materials (chitosan and silica) and activating agents (genipin and glutaraldehyde) primarily act as carriers for the enzyme, providing a suitable environment for its activity rather than directly contributing to the turbidity reduction process. The absence of a matrix effect implies that the immobilized enzyme retains its ability to clarify the juice, regardless of the support material or activating agent used. This finding reinforces the interest of utilizing immobilized enzymes for juice clarification.

When comparing both supports, the enzyme immobilized on chitosan exhibited slightly higher turbidity reduction compared to the enzyme immobilized on silica, around 8 %, considering the mean of the biocatalysts. This observation is consistent with previous studies where chitosan-immobilized enzymes [48] demonstrated greater efficiency than silica-immobilized enzymes [23]. In a multi-enzymatic system composed of pectinase and protease immobilized on chitosan particles, the authors observed that the immediate reduction in turbidity after the enzymatic treatment (49 %) was lower than that found in the present study. However, they noted a gradual reduction in turbidity over time, reaching 70 % after 21 days of storage [24].

### *3.3. Total soluble solids, reducing sugars and color parameters*

The results of the treated juice for its physicochemical analysis are presented in Table 6. The results showed relatively minor variations in juice TSS, reducing sugars, and pH values among the different biocatalyst combinations. Although the results for TSS and reducing sugars presented statistically difference, there is no correlation considering the supports, activating agent or presence of enzymes. This suggests that the clarification process, regardless of the support nature or crosslinking agent used, did not significantly alter the sweetness, sugar content, or acidity of the juice. This is positive, as it is desired that the clarification treatment does not affect the nutritional and sensorial parameters of juice. Using a pectinase immobilized on glass beads, Azimi et al [57] found a small reduction on TSS after clarification. The authors attributed to the deposition of suspended compounds with pectin hydrolysis [57].

Regarding the color parameters, most of the treated juice presented similar values compared to raw orange juice. The main changes are in the  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  parameters in the treatments using enzymes which are statistically different from the rest of treatments and raw juice. It can be related to the effects of the enzymatic clarification process and turbidity reduction. The  $L^*$  parameter represents the lightness of the sample, where higher values indicate a brighter appearance [58]. Comparing the treatments using enzymes to the raw orange juice, it can be observed that the  $L^*$  values generally increased in the treatments. This suggests that the enzymatic clarification process, and the consequent turbidity reduction, contributed to a brighter appearance of the juice. On the other hand, the decrease in Chroma\* values for the samples treated with enzymes indicates that the clarified juice presents a less vivid color [59]. This could be attributed to the decrease in the  $b^*$  parameter, as presented in Table 6.

The  $b^*$  parameter represents the position between yellow and blue, with positive values indicating more yellowness and negative values indicating more blueness [58]. In the context of orange juice, a higher positive value for  $b^*$  reflects a more vibrant and intense yellow color, which is desirable and commonly associated with fresh and high-quality juice. The results indicated that the treatments involving the enzyme (for chitosan or silica supports) exhibit considerably lower  $b^*$  values compared to the raw juice. This suggests a reduction in the yellowness of the juice when the enzyme is present during the clarification process. This reduction can be attributed to the hydrolysis of pectin. Pectinase hydrolyzes the pectin, which is responsible for the structural integrity of cell walls. As a result, the cell contents, including carotenoids, are released [60,61].

An optimized clarification process has the potential to significantly enhance the color of orange juice by achieving an appropriate balance between turbidity reduction and maintaining the desired vibrant and vivid yellow appearance.

### *3.4 Analysis of Phenolic Compounds in Orange Juice*

The phenolic compounds in orange juice and the treated samples were analyzed using HPLC-DAD at three different wavelengths, 280 nm, 320 nm, and 360 nm. The results are presented in the Table 7, with the sum of the areas for each wavelength expressed as a percentage of the raw orange juice (considered as 100%).

**Table 7.** Analysis of phenolic compounds, as percentages, at different wavelength for the treatments on orange juice

Treatment	280 nm	320 nm	360 nm	Mean
Orange juice	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	100.0 <sup>a</sup>	100.0
CH	95.3 ± 3.4 <sup>a</sup>	104.0 ± 2.1 <sup>a</sup>	93.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	97.5
CH-GEN	62.4 ± 2.8 <sup>c</sup>	76.6 ± 3.7 <sup>c</sup>	63.5 ± 2.4 <sup>d</sup>	67.5
CH-GLU	87.4 ± 1.5 <sup>b</sup>	99.5 ± 5.4 <sup>a</sup>	92.2 ± 4.7 <sup>b</sup>	93.0
CH-GEN-E	59.4 ± 3.1 <sup>d</sup>	67.3 ± 3.9 <sup>d</sup>	59.8 ± 3.4 <sup>d</sup>	62.2
CH-GLU-E	80.7 ± 2.9 <sup>b</sup>	87.0 ± 4.4 <sup>b</sup>	78.6 ± 2.8 <sup>c</sup>	82.1
S	87.4 ± 4.4 <sup>b</sup>	91.9 ± 1.8 <sup>b</sup>	87.3 ± 2.5 <sup>b</sup>	88.9
S-GEN	61.5 ± 1.2 <sup>c,d</sup>	70.7 ± 2.3 <sup>c,d</sup>	58.9 ± 5.1 <sup>d</sup>	63.7
S-GLU	81.6 ± 3.9 <sup>b</sup>	92.0 ± 1.6 <sup>b</sup>	79.6 ± 4.4 <sup>c</sup>	84.4
S-GEN-E	67.2 ± 4.1 <sup>c</sup>	74.6 ± 3.1 <sup>c</sup>	62.0 ± 3.6 <sup>d</sup>	67.9
S-GLU-E	84.3 ± 2.0 <sup>b</sup>	94.6 ± 3.4 <sup>a,b</sup>	79.1 ± 2.5 <sup>c</sup>	86.0

Results are the mean of three repetitions ± standard deviation. Means followed by the same letters in the same columns do not differ by Tukey's test at 5% probability.

In general, orange juices presents mainly flavones and flavanones linked to different substituents as phenolic compounds [62]. For all wavelengths, there is a statistically significant reduction in the phenolic compounds in the treated juices compared to the raw juices for most of treatments, particularly when the supports were activated with genipin. In this case, the samples treated with chitosan or silica activated with genipin, with or without enzyme, the reduction in the phenolic compounds was statistically lower than other samples. Phenolic compounds, such as anthocyanins, proanthocyanidins, monomeric catechins, and phenolic acids can interact with chitosan-genipin matrix [63,64], thus their content in the treated juice could be lower compared to raw sample. Comparing both matrices, when chitosan was used it resulted in a higher preservation of the phenolic compounds compared to silica. However, when the matrices were modified with genipin or glutaraldehyde there were no differences between chitosan and silica, indicating that the interactions between phenolic compounds and activating agents or even in the presence of the enzyme were more important. Similar results were found in apple juice manufacturing processes regarding enzymatic treatment. The authors observed a 19.9% reduction in the total procyanidin concentration in the juice through enzyme treatment [65]. In our study, using genipin-activated supports, the biocatalyst showed a 35% reduction in phenolic compounds, while for glutaraldehyde-activated matrices, the reduction was approximately 16%.

Overall, the results indicate that the choice of activating agent and support material (chitosan or silica) can influence the reduction of phenolic compounds, with potential preservation in specific cases. The presence of the enzyme did not alter, in general, the content of the phenolic compounds compared to the activated matrix, either with glutaraldehyde or genipin. However, the biocatalyst immobilized on glutaraldehyde-activated supports presented higher phenolic content compared to genipin-activated support. As mentioned before, this can be due to a higher reactivity and interaction between genipin and the phenolic compounds [63,64].

In a similar study, Benucci et al. [24] also observed that enzymatic treatment did not reduce the phenolic compounds indexes, Furthermore, the treated juices better preserved the anthocyanin pattern compared to the untreated juice over time [24].

### 3.5. Vitamin C

Vitamin C, also known as ascorbic acid, is an essential nutrient found in high concentrations in citrus fruits such as oranges [70]. It plays a crucial role in various physiological processes in the human body, including acting as an antioxidant, supporting the immune system, and aiding in the absorption of iron [71]. Therefore, the vitamin C content in orange juice is important. The content of ascorbic acid in the raw and treated juices was analyzed and the results are presented in Table 8, expressed as a percentage of the raw orange juice (considered as 100%).

Table 8: Analysis of vitamin C, as percentage, for the different treatments on orange juice

<b>Treatment</b>	<b>Vitamin C</b>
Orange juice	100.0 <sup>a</sup>
CH	101.0 ± 2.4 <sup>a</sup>
CH-GEN	102.6 ± 1.6 <sup>a</sup>
CH-GLU	82.0 ± 4.3 <sup>c</sup>
CH-GEN-E	88.8 ± 2.8 <sup>b</sup>
CH-GLU-E	102.5 ± 3.1 <sup>a</sup>
S	105.0 ± 3.3 <sup>a</sup>
S-GEN	90.5 ± 2.5 <sup>b</sup>

S-GLU	103.1 ± 5.1 <sup>a</sup>
S-GEN-E	103.0 ± 3.7 <sup>a</sup>
S-GLU-E	102.0 ± 2.2 <sup>a</sup>

---

Results are the mean of three repetitions ± standard deviation. Means followed by the same letters in the same columns do not differ by Tukey's test at 5% probability.

Looking at the results, vitamin C content was similar to the raw orange juice for most of treatments. The vitamin C content in all the treated samples remains relatively consistent, ranging from 82.0 % to 105 % of the vitamin C content in the raw juice, mostly being statistically equal to raw juice. This suggests that the treatment processes, including the use of chitosan or silica supports and activating agents, do not have a substantial impact on degradation of vitamin C, since in most cases, especially using enzyme, values were around 100 %. Exceptions were the treatments with CH-GLU, CH-GLU-E and S-GEN. The consistency in vitamin C content across the samples is crucial for the quality of clarified orange juice. Vitamin C is a highly valued and sensitive nutrient that is susceptible to degradation during processing [66]. The fact that the treated samples exhibit similar vitamin C levels as the raw juice indicates that the chosen treatments have effectively preserved the vitamin C content. This is highly desirable as it ensures that the clarified orange juice retains its nutritional value and provides consumers with the expected health benefits associated with vitamin C consumption.

#### 4. Conclusions

This study investigated the effects of different biocatalyst treatments on orange juice quality. Treatments involving chitosan and silica supports activated with genipin and glutaraldehyde, along with enzyme immobilization, significantly reduced turbidity compared to the raw juice. The highest turbidity reduction percentages were observed in CH-GEN-E and CH-GLU-E treatments, indicating their effectiveness in improving visual appearance. Soluble solids content (°Brix), pH, and reducing sugar concentration remained comparable to the raw juice, indicating minimal impact on these parameters. Analysis of phenolic compounds showed that samples treated with genipin activated supports presented significant alterations in composition. Importantly, treated samples exhibited comparable vitamin C levels to the raw juice, preserving its nutritional value. These findings demonstrate the effectiveness of biocatalyst treatments in clarifying orange juice without compromising quality. Understanding

the matrix effect in immobilized enzyme juice clarification is crucial for future process development.

**Author Contributions:** Pâmela M. da Silva.: Investigation, Data curation, Writing – Original Draft; Eli Emanuel Esparza-Flores: Investigation, Data curation; Anike H. Virgili: Investigation, Data curation; Eliana W. de Menezes: Conceptualization, Methodology; Roberto Fernandez-Lafuente: Conceptualization, Writing – Review & Editing; Lucas Dal Magro: Conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing; Rafael C. Rodrigues: Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – Review & Editing, Supervision, Visualization, Funding acquisition.

**Funding:** This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grant number 405418/2021-3; Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Grant number 21/2551-0002270-1 and 22/2551-0000397-4; Ministerio de Ciencia e Innovación and Agencia Estatal de Investigación (Spanish Government), Grant number PID2022-136535OB-I00.

**Data Availability Statement:** The data used in this study is available upon request.

**Acknowledgments:** We would like to thank the financial support by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – process 405418/2021-3) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS – processes 21/2551-0002270-1 and 22/2551-0000397-4) from Brazilian Government and Ministerio de Ciencia e Innovación and Agencia Estatal de Investigación (PID2022-136535OB-I00) fom Spanish Government.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Kircher, M. The Emerging Bioeconomy: Industrial Drivers, Global Impact, and International Strategies. *Ind. Biotechnol.* **2014**, *10*, 11–18, doi:10.1089/ind.2014.1500.
2. Neves, M.F.; Trombin, V.G.; Marques, V.N.; Martinez, L.F. Global Orange Juice Market: A 16-Year Summary and Opportunities for Creating Value. *Trop. Plant Pathol.* **2020**, *45*, 166–174, doi:10.1007/s40858-020-00378-1.
3. Pan, X.; Bi, S.; Lao, F.; Wu, J. Factors Affecting Aroma Compounds in Orange Juice and Their Sensory Perception: A Review. *Food Res. Int.* **2023**, *169*, doi:10.1016/j.foodres.2023.112835.
4. Miles, E.A.; Calder, P.C. Effects of Citrus Fruit Juices and Their Bioactive Components on Inflammation and Immunity: A Narrative Review. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, doi:10.3389/fimmu.2021.712608.
5. Alhabeeb, H.; Sohoul, M.H.; Lari, A.; Fatahi, S.; Shidfar, F.; Alomar, O.; Salem, H.; Al-Badawi, I.A.; Abu-Zaid, A. Impact of Orange Juice Consumption on Cardiovascular Disease Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized-Controlled Trials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 3389–3402, doi:10.1080/10408398.2020.1865263.
6. Sarvarian, M.; Jafarpour, A.; Awuchi, C.G.; Adeleye, A.O.; Okpala, C.O.R. Changes in Physicochemical, Free Radical Activity, Total Phenolic and Sensory Properties of Orange (*Citrus Sinensis* L.) Juice Fortified with Different Oleaster (*Elaeagnus Angustifolia* L.) Extracts. *Molecules* **2022**, *27*, doi:10.3390/molecules27051530.
7. Pereira, G.S.; Honorio, A.R.; Gasparetto, B.R.; Lopes, C.M.A.; Lima, D.C.N.D.; Tribst, A.A.L. Influence of Information Received by the Consumer on the Sensory Perception of Processed Orange Juice. *J. Sens. Stud.* **2019**, *34*, doi:10.1111/joss.12497.
8. Bakshi, G.; Ananthanarayan, L. Cloud Stabilization of Citrus Fruit Juices Treated with Purified Pectin Methyltransferase Inhibitor from Lemon (*Citrus Limon* L.). *J. Sci. Food Agric.* **2022**, *102*, 6156–6162, doi:10.1002/jsfa.11969.
9. Satyannarayana, K.V. V; Sandhya Rani, S.L.; Vinoth Kumar, R. Clarification of Citrus Fruit Juices Using Microfiltration Technique Equipped with Indigenously Developed Novel Ceramic Membrane. *J. Food Sci. Technol.* **2023**, *60*, 2001–2011,



doi:10.1007/s13197-023-05734-y.

10. Severcan, S.S.; Uzal, N.; Kahraman, K. Clarification of Apple Juice Using New Generation Nanocomposite Membranes Fabricated with TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles. *Food Bioprocess Technol.* **2020**, *13*, 391–403, doi:10.1007/s11947-019-02373-0.
11. Ghosh, P.; Pradhan, R.C.; Mishra, S.; Rout, P.K. Quantification and Concentration of Anthocyanidin from Indian Blackberry (Jamun) by Combination of Ultra- and Nano-Filtrations. *Food Bioprocess Technol.* **2018**, *11*, 2194–2203, doi:10.1007/s11947-018-2176-4.
12. Gulec, H.A.; Bagci, P.O.; Bagci, U. Clarification of Apple Juice Using Polymeric Ultrafiltration Membranes: A Comparative Evaluation of Membrane Fouling and Juice Quality. *Food Bioprocess Technol.* **2017**, *10*, 875–885, doi:10.1007/s11947-017-1871-x.
13. Sagu, S.T.; Karmakar, S.; Nso, E.J.; Kapseu, C.; De, S. Ultrafiltration of Banana (*Musa Acuminata*) Juice Using Hollow Fibers for Enhanced Shelf Life. *Food Bioprocess Technol.* **2014**, *7*, 2711–2722, doi:10.1007/s11947-014-1309-7.
14. Lipnizki, F. Cross-Flow Membrane Applications in the Food Industry. In *Membrane Technology*; Peinemann, K.-V., Nunes, S.P., Giorno, L., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2010; pp. 1–24.
15. Esawy, M.A.; Gamal, A.A.; Kamel, Z.; Ismail, A.-M.S.; Abdel-Fattah, A.F. Evaluation of Free and Immobilized *Aspergillus Niger* NRC1ami Pectinase Applicable in Industrial Processes. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1463–1469, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.061.
16. de Souza, T.S.P.; Kawaguti, H.Y. Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. *Food Bioprocess Technol.* **2021**, *14*, 1446–1477, doi:10.1007/s11947-021-02678-z.
17. Rodrigues, R.C.; Berenguer-Murcia, Á.; Carballares, D.; Morellon-Sterling, R.; Fernandez-Lafuente, R. Stabilization of Enzymes via Immobilization: Multipoint Covalent Attachment and Other Stabilization Strategies. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *52*, 107821, doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107821.

18. Bolivar, J.M.; Woodley, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Is Enzyme Immobilization a Mature Discipline? Some Critical Considerations to Capitalize on the Benefits of Immobilization. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 6251–6290, doi:10.1039/d2cs00083k.
19. dos Santos, J.C.S.; Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2413–2432, doi:10.1002/cctc.201500310.
20. Verma, M.L.; Kumar, S.; Das, A.; Randhawa, J.S.; Chamundeeswari, M. Chitin and Chitosan-Based Support Materials for Enzyme Immobilization and Biotechnological Applications. *Environ. Chem. Lett.* **2020**, *18*, 315–323, doi:10.1007/s10311-019-00942-5.
21. Ribeiro, E.S.; de Farias, B.S.; Sant’Anna Cadaval Junior, T.R.; de Almeida Pinto, L.A.; Diaz, P.S. Chitosan-Based Nanofibers for Enzyme Immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *183*, 1959–1970, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.214.
22. Zhao, L.; Zhang, Y.; Yang, Y.; Yu, C. Silica-based Nanoparticles for Enzyme Immobilization and Delivery. *Chem. – An Asian J.* **2022**, *17*, doi:10.1002/asia.202200573.
23. Alagöz, D.; Varan, N.E.; Toprak, A.; Yildirim, D.; Tukul, S.S.; Fernandez-Lafuente, R. Immobilization of Xylanase on Differently Functionalized Silica Gel Supports for Orange Juice Clarification. *Process Biochem.* **2022**, *113*, 270–280, doi:10.1016/j.procbio.2021.12.027.
24. Benucci, I.; Mazzocchi, C.; Lombardelli, C.; Cacciotti, I.; Esti, M. Multi-Enzymatic Systems Immobilized on Chitosan Beads for Pomegranate Juice Treatment in Fluidized Bed Reactor: Effect on Haze-Active Molecules and Chromatic Properties. *Food Bioprocess Technol.* **2019**, *12*, 1559–1572, doi:10.1007/s11947-019-02315-w.
25. Harutyunyan, L.R.; Lasareva, E. V Chitosan and Its Derivatives: A Step Towards Green Chemistry. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2023**, *13*, doi:10.33263/BRIAC136.578.
26. Krajewska, B. Application of Chitin- and Chitosan-Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 126–139, doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.

27. Wu, H.; Mu, W. Application Prospects and Opportunities of Inorganic Nanomaterials for Enzyme Immobilization in the Food-Processing Industry. *Curr. Opin. Food Sci.* **2022**, *47*, doi:10.1016/j.cofs.2022.100909.
28. Montoya, N.A.; Roth, R.E.; Funk, E.K.; Gao, P.; Corbin, D.R.; Shiflett, M.B. Review on Porous Materials for the Thermal Stabilization of Proteins. *Microporous Mesoporous Mater.* **2022**, *333*, doi:10.1016/j.micromeso.2022.111750.
29. Zucca, P.; Sanjust, E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. *Molecules* **2014**, *19*, 14139–14194, doi:10.3390/molecules190914139.
30. Hartmann, M. Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4577–4593, doi:10.1021/cm0485658.
31. Govardhan, C.P. Crosslinking of Enzymes for Improved Stability and Performance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 331–335.
32. Alavarse, A.C.; Frachini, E.C.G.; da Silva, R.L.C.G.; Lima, V.H.; Shavandi, A.; Petri, D.F.S. Crosslinkers for Polysaccharides and Proteins: Synthesis Conditions, Mechanisms, and Crosslinking Efficiency, a Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *202*, 558–596, doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029.
33. Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, A.; Torres, R.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Glutaraldehyde in Bio-Catalysts Design: A Useful Crosslinker and a Versatile Tool in Enzyme Immobilization. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1583–1600, doi:10.1039/C3RA45991H.
34. Dal Magro, L.; Kornecki, J.F.J.F.; Klein, M.P.M.P.; Rodrigues, R.C.R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Pectin Lyase Immobilization Using the Glutaraldehyde Chemistry Increases the Enzyme Operation Range. *Enzyme Microb. Technol.* **2020**, *132*, 109397, doi:10.1016/j.enzmictec.2019.109397.
35. Gough, J.E.; Scotchford, C.A.; Downes, S. Cytotoxicity of Glutaraldehyde Crosslinked Collagen/Poly(Vinyl Alcohol) Films Is by the Mechanism of Apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *61*, 121–130, doi:10.1002/jbm.10145.
36. Hosseini, S.S.; Khodaiyan, F.; E. Mousavi, S.M.; Kennedy, J.F.; Azimi, S.Z. A Health-

- Friendly Strategy for Covalent-Bonded Immobilization of Pectinase on the Functionalized Glass Beads. *Food Bioprocess Technol.* **2021**, *14*, 177–186, doi:10.1007/s11947-020-02524-8.
37. Yu, Y.; Xu, S.; Li, S.; Pan, H. Genipin-Cross-Linked Hydrogels Based on Biomaterials for Drug Delivery: A Review. *Biomater. Sci.* **2021**, *9*, 1583–1597, doi:10.1039/d0bm01403f.
  38. Klein, M.P.; Hackenhaar, C.R.; Lorenzoni, A.S.G.G.; Rodrigues, R.C.; Costa, T.M.H.H.; Ninow, J.L.; Hertz, P.F. Chitosan Crosslinked with Genipin as Support Matrix for Application in Food Process: Support Characterization and  $\beta$ -d-Galactosidase Immobilization. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 184–190, doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.069.
  39. Bellé, A.S.; Hackenhaar, C.R.; Spolidoro, L.S.; Rodrigues, E.; Klein, M.P.; Hertz, P.F. Efficient Enzyme-Assisted Extraction of Genipin from Genipap (*Genipa Americana* L.) and Its Application as a Crosslinker for Chitosan Gels. *Food Chem.* **2018**, *246*, 266–274, doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.028.
  40. Dal Magro, L.; Goetze, D.; Ribeiro, C.T.; Paludo, N.; Rodrigues, E.; Hertz, P.F.; Klein, M.P.; Rodrigues, R.C. Identification of Bioactive Compounds From *Vitis Labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters. *Food Bioprocess Technol.* **2016**, *9*, 365–377, doi:10.1007/s11947-015-1634-5.
  41. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–428, doi:10.1021/ac60147a030.
  42. Klein, M.P.; Nunes, M.R.; Rodrigues, R.C.; Benvenutti, E. V.; Costa, T.M.H.H.; Hertz, P.F.; Ninow, J.L. Effect of the Support Size on the Properties of  $\beta$ -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2456–2464, doi:10.1021/bm3006984.
  43. Hench, L.L.; West, J.K. The Sol-Gel Process. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 33–72, doi:10.1021/cr00099a003.
  44. Dal Magro, L.; Silveira, V.C.C.; de Menezes, E.W.; Benvenutti, E.V.; Nicolodi, S.; Hertz, P.F.; Klein, M.P.; Rodrigues, R.C. Magnetic Biocatalysts of Pectinase and

- Cellulase: Synthesis and Characterization of Two Preparations for Application in Grape Juice Clarification. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *115*, 35–44, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.028.
45. Flores, E.E.E.; Cardoso, F.D.; Siqueira, L.B.; Ricardi, N.C.; Costa, T.H.; Rodrigues, R.C.; Klein, M.P.; Hertz, P.F. Influence of Reaction Parameters in the Polymerization between Genipin and Chitosan for Enzyme Immobilization. *Process Biochem.* **2019**, *84*, 73–80, doi:10.1016/j.procbio.2019.06.001.
  46. Sheldon, R.A.; van Pelt, S. Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223–6235, doi:10.1039/c3cs60075k.
  47. Boudrant, J.; Woodley, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Parameters Necessary to Define an Immobilized Enzyme Preparation. *Process Biochem.* **2020**, *90*, 66–80, doi:10.1016/j.procbio.2019.11.026.
  48. Dal Magro, L.; Pessoa, J.P.S.P.S.; Klein, M.P.P.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R.C.C. Enzymatic Clarification of Orange Juice in Continuous Bed Reactors: Fluidized-Bed versus Packed-Bed Reactor. *Catal. Today* **2021**, *362*, 184–191, doi:10.1016/j.cattod.2020.02.003.
  49. Anderson, C.W.; Geological, S. Turbidity. In *Techniques of Water-Resources Investigations*; Geological Survey (U.S.), 2005; Vol. 2.1, p. 55 ISBN 09-A6.7.
  50. Ozturk, A.; Yildiz, K.; Ozturk, B.; Karakaya, O.; Gun, S.; Uzun, S.; Gundogdu, M. Maintaining Postharvest Quality of Medlar (*Mespilus Germanica*) Fruit Using Modified Atmosphere Packaging and Methyl Jasmonate. *LWT* **2019**, *111*, 117–124, doi:10.1016/j.lwt.2019.05.033.
  51. Rodrigues, E.; Mariutti, L.R.B.; Mercadante, A.Z. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3022–3029, doi:10.1021/jf3054214.
  52. Tacias-Pascacio, V.G.; García-Parra, E.; Vela-Gutiérrez, G.; Virgen-Ortiz, J.J.; Berenguer-Murcia, Á.; Alcántara, A.R.; Fernandez-Lafuente, R. Genipin as An Emergent Tool in the Design of Biocatalysts: Mechanism of Reaction and Applications. *Catalysts* **2019**, *9*, 1035, doi:10.3390/catal9121035.

53. Miao, Q.; Zhang, C.; Zhou, S.; Meng, L.; Huang, L.; Ni, Y.; Chen, L. Immobilization and Characterization of Pectinase onto the Cationic Polystyrene Resin. *ACS Omega* **2021**, *6*, 31683–31688, doi:10.1021/acsomega.1c04374.
54. Muller, S.; Concha, D.; Vasquez, P.; Rodriguez-Nuñez, K.; Martinez, R.; Bernal, C. Effect of the Immobilization of Pectinase on the Molecular Weight Distribution of Pectin Oligosaccharides Obtained from Citrus Pectin. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2022**, *43*, 102389, doi:10.1016/j.bcab.2022.102389.
55. Navarro-López, D.E.; Bautista-Ayala, A.R.; Rosales-De la Cruz, M.F.; Martínez-Beltrán, S.; Rojas-Torres, D.E.; Sanchez-Martinez, A.; Ceballos-Sanchez, O.; Jáuregui-Jáuregui, J.A.; Lozano, L.M.; Sepúlveda-Villegas, M.; et al. Nanocatalytic Performance of Pectinase Immobilized over in Situ Prepared Magnetic Nanoparticles. *Heliyon* **2023**, *9*, e19021, doi:10.1016/j.heliyon.2023.e19021.
56. Himmel, M.E.; Baker, J.O.; Adney, W.S.; Decker, S.R. Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases. In *Methods for General and Molecular Microbiology*; Reddy, C., Beveridge, T., Breznak, J., Marzluf, G., Schmidt, T., Snyder, L., Eds.; ASM Press: Washington, DC, 2007; pp. 596–610.
57. Azimi, S.Z.; Hosseini, S.S.; Khodaiyan, F. Continuous Clarification of Grape Juice Using a Packed Bed Bioreactor Including Pectinase Enzyme Immobilized on Glass Beads. *Food Biosci.* **2021**, *40*, 100877, doi:10.1016/j.fbio.2021.100877.
58. Pathare, P.B.; Opara, U.L.; Al-Said, F.A.-J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 36–60, doi:10.1007/s11947-012-0867-9.
59. Mejia, J.A.A.; Yáñez-Fernandez, J. Clarification Processes of Orange Prickly Pear Juice (*Opuntia* Spp.) by Microfiltration. *Membranes (Basel)*. **2021**, *11*, 354, doi:10.3390/membranes11050354.
60. Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A.R.; Paredes-López, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40*, 173–289, doi:10.1080/10408690091189257.
61. Macedo, M.; Robrigues, R.D.P.; Pinto, G.A.S.; de Brito, E.S. Influence of Pectinolytic and Cellulolytic Enzyme Complexes on Cashew Bagasse Maceration in Order to Obtain

- Carotenoids. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, doi:10.1007/s13197-014-1411-x.
62. Mallmann, L.P.; O. Rios, A.; Rodrigues, E. MS-FINDER and SIRIUS for Phenolic Compound Identification from High-Resolution Mass Spectrometry Data. *Food Res. Int.* **2023**, *163*, 112315, doi:10.1016/j.foodres.2022.112315.
  63. Popa, M.-I.; Aelenei, N.; Popa, V.I.; Andrei, D. Study of the Interactions between Polyphenolic Compounds and Chitosan. *React. Funct. Polym.* **2000**, *45*, 35–43, doi:10.1016/S1381-5148(00)00009-2.
  64. Nunes, C.; Maricato, É.; Gonçalves, F.J.F.J.; da Silva, J.A.L.J.A.L.; Rocha, S.M.S.M.; Coimbra, M.A.M.A. Properties of Chitosan-Genipin Films Grafted with Phenolic Compounds from Red Wine. *Trends Carbohydr. Res.* **2015**, *7*, 25–32.
  65. Okino, S.; Kokawa, M.; Islam, M.Z.; Kitamura, Y. Effects of Apple Juice Manufacturing Processes on Procyanidin Concentration and Nondestructive Analysis by Fluorescence Fingerprint. *Food Bioprocess Technol.* **2021**, *14*, 692–701, doi:10.1007/s11947-021-02601-6.
  66. Timmermans, R.A.H.; Roland, W.S.U.; van Kekem, K.; Matser, A.M.; van Boekel, M.A.J.S. Effect of Pasteurization by Moderate Intensity Pulsed Electric Fields (PEF) Treatment Compared to Thermal Treatment on Quality Attributes of Fresh Orange Juice. *Foods* **2022**, *11*, 3360, doi:10.3390/foods11213360.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo analisou os diferentes efeitos da clarificação do suco de laranja, com o uso de biocatalisadores. Foram analisados parâmetros de qualidade e parâmetros nutricionais, utilizando os suportes de sílica e quitosana com os agentes ativadores genipina e glutaraldeído.

A escolha dos suportes, bem como dos agentes ativadores foi feita levando em consideração outros estudos onde se tem evidenciado que os mesmos agem de forma satisfatória na realização da clarificação.

A análise dos parâmetros mostrou que a redução da turbidez, necessária para que o aspecto visual do suco seja satisfatório, foi observado nos tratamentos CH-GEN-E e CH-GLU-E, evidenciando a quitosana como suporte mais efetivo. Em grande parte, a turbidez dos sucos está relacionada a substâncias coloidais que tem por característica um núcleo proteico com carga positiva, revestido por moléculas de pectina com carga negativa. Essa carga negativa na superfície faz com que as moléculas sejam repelidas uma das outras (Pilnik and Voragen, 1993). Assim, através da degradação da pectina pelas pectinases, o núcleo proteico carregado positivamente é exposto, reduzindo a repulsão eletrostática e proporcionando a agregação em partículas maiores com moléculas de carga oposta, como os compostos fenólicos, que irão sedimentar.

A cor, que é outro parâmetro visual importante, não apresentou mudança com o tratamento, se comparado ao suco não clarificado, tornando os suportes e agentes ativadores satisfatórios para uso.

Em relação aos parâmetros: sólidos solúveis (Brix), as amostras tratadas com sílica independente do agente ativador e do uso da enzima, apresentou uma redução do Brix, logo, o suco estaria com sabor mais ácido. Os parâmetros de pH e açúcares redutores, estes permaneceram semelhantes ao suco não clarificado, ou seja, apresentando uma variação pequena entre as amostras.. Os métodos de análise dos sólidos solúveis e pH foram realizados sem nenhuma dificuldade, utilizando métodos tradicionais de aplicação. Para a análise de açúcares redutores foi necessário realizar algumas diluições para que as amostras ficassem dentro da curva.

Os compostos fenólicos, grupo de antioxidantes não enzimáticos que combatem os radicais livres e portanto um nutriente importante, apresentou uma diminuição de 40% quando



ativado com a genipina, desta forma, como houve perda significativa, este agente ativador não seria o mais indicado para ser utilizado.

A vitamina C, outro nutriente importante sobretudo em sucos cítricos, apresentou-se em níveis semelhantes nos sucos tratados e no suco não clarificado. A vitamina C é um nutriente muito sensível, havendo uma degradação desde o momento do corte da fruta por exemplo. Nesta análise o nível de vitamina C se manteve estável utilizando ambos suportes e agentes ativadores.

Desta forma, observamos que na maioria dos parâmetros houveram poucas alterações após a clarificação. Entretanto, tratando-se de compostos fenólicos, observamos uma redução considerável quando ativado com a genipina. Portanto os suportes de sílica e quitosana e o agente ativador glutaraldeído se mostraram mais efetivos. A cor e açúcares redutores se mantiveram com pouca alteração quando comparado o suco não clarificado com o suco clarificado.

## **7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Neste estudo foi possível:

- verificar que houve uma diminuição de 40% dos compostos fenólicos quando ativado com a genipina, tornando este agente ativador menos indicado a ser utilizado.
- análise de vitamina C mostrou pouca alteração entre os sucos clarificados e não clarificados independente do suporte e dos agentes ativadores;
- análise de cor mostrou pouca alteração entre os sucos clarificados e não clarificados independente do suporte e dos agentes ativadores;
- análise de sólidos solúveis (Brix) mostrou uma alteração mais significativa nas amostras utilizando a sílica como suporte independente do agente ativador e do uso da enzima.
- análise de vitamina C mostrou pouca alteração entre os sucos clarificados e não clarificados independente do suporte e dos agentes ativadores;
- análise de açúcares redutores mostrou pouca alteração significativas entre os sucos clarificados e não clarificados independente do suporte e dos agentes ativadores;
- análise dos parâmetros mostrou que a redução da turbidez foi observado nos tratamentos CH-GEN-E e CH-GLU-E, evidenciando a quitosana como suporte mais efetivo.
- De acordo com as análises, em relação a turbidez, a quitosana se mostrou mais eficaz independente do agente ativador. Já o agente ativador genipina, reduziu em 40% os compostos

fenólicos. Desta forma, levando em consideração todos os parâmetros, os sucos clarificados utilizando a quitosana como suporte e o glutaraldeído como agente ativador, seria o mais eficaz na clarificação do suco de laranja, preservando as características físico químicas e as propriedades nutricionais.

Outros parâmetros podem ser avaliados em trabalhos futuros, como por exemplo, o uso de outros suportes e análise sensorial, já que este é um fator importante para o consumidor, além do valor calórico e quantidade de carboidratos. Outros sucos também podem ser avaliados e comparados entre si, com o objetivo de obter um melhor resultado levando em consideração a tríade sabor/aparência/qualidade nutricional. É importante salientar que somente o uso de métodos analíticos, não é suficiente para analisar a qualidade do suco, uma vez que esses métodos não são capazes de avaliar alterações que afetam a aceitação do produto pelo consumidor, entretanto, do ponto de vista nutricional e visando a saúde e bem estar, as análises referidas neste estudo foram de muita relevância e satisfatórias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABDALLA, D. S. P.; FAINE, L. A. Radicais livres e antioxidantes. In: Oga, S; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª edição. São Paulo:Atheneu Editora, 2008. p. 37-58.
- ABDULLAH, A.G.L., SULAIMAN, N.M., AROUA, M.K., AND MEGAT MOHD NOOR, M.J. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. **Journal of Food Engineering**. 81: 65–71. 2007
- ABIR - Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas não alcólicas. Disponível em <https://abir.org.br/o-setor/dados/sucos-concentrados/> Acesso em 13 Jul. de 2023.
- ALAGÖZ, D., VARAN, N. E., TOPRAK, A., YILDIRIM, D., TUKEL, S. S., & FERNANDEZ-LAFUENT R. Immobilization of xylanase on differently functionalized silica gel supports for orange juice clarification. **Process Biochemistry**, 2022, *113*, 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.12.027>
- ALAVARSE, A. C., FRACHINI, E. C. G., DA SILVA, R. L. C. G., LIMA, V. H., SHAVANDI, A., PETRI, D. F. S.. Crosslinkers for polysaccharides and proteins: Synthesis conditions, mechanisms, and crosslinking efficiency, a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 558–596. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.029>
- ALHABEEB, H., SOHOULI, M. H., LARI, A., FATAHI, S., SHIDFAR, F., ALOMAR, O., ET AL. Impact of orange juice consumption on cardiovascular disease risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 62(12), 3389–3402. 2022 <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1865263>
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L.; **Process Biochemistry**. 1998.
- ANDERSON, C. W., & GEOLOGICAL, S. Turbidity. In *Techniques of Water-Resources Investigations (Version 2., Vol. 2.1, p. 55)*. **Geological Survey (U.S.)**. 2005. <http://pubs.er.usgs.gov/publication/twri09A6.7>
- AZIMI, S. Z., HOSSEINI, S. S., & KHODAIYAN, F. Continuous clarification of grape juice using a packed bed bioreactor including pectinase enzyme immobilized on glass beads. **Food Bioscience**, 2021, 40, 100877. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100877>
- BAKSHI, G., & ANANTHANARAYAN, L. Cloud stabilization of citrus fruit juices treated with purified pectin methylesterase inhibitor from lemon (*Citrus limon* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2022, 102(13), 6156–6162. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11969>
- BALDWIN EA, SCOTT JW, SHEWMAKER CK, SCHUCH W. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. **Hort Science**. 2000; 35(6): 1013-1022. .
- BARBOSA, O., ORTIZ, C., BERENGUER-MURCIA, A., TORRES, R., RODRIGUES, R. C., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, 2014, 4(4), 1583–1600.

<https://doi.org/10.1039/C3RA45991H>

BELLÉ, A. S., HACKENHAAR, C. R., SPOLIDORO, L. S., RODRIGUES, E., KLEIN, M. P., & HERTZ, P. F.. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. **Food Chemistry**, 2018, 246 (November 2017), 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.028>

BENVENUTTI, E. V.; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H.; **Quim. Nova** 2009, 32, 1926.

BERENGUER-MURCIA, Á.; ALCÁNTARA, A. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Catalysts** 2019, 9, 1–

BFT - Brasil Food Trends, 2020 – disponível em <https://alimentosprocessados.com.br/arquivos/Consumo-tendencias-e-inovacoes/Brasil-Food-Trends-2020.pdf>. Acesso em 01/11/2020 às 13:15

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BIANCHI, MARIA DE LOURDES PIRES; ANTUNES, LUSÂNIA MARIA GREGGI. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.** Campinas, v. 12, n. 2, pág. 123-130. 1999.

BICKERSTAFF, G. F. **Methods in Biotechnology**. Humana Press, New Jersey, v. 1, p. 7-19, 1997.

BILAL, M.; IQBAL, H.M.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X. Enhanced bio-catalytic performance and dye degradation potential of chitosan-encapsulated horseradish 60 peroxidase in a packed bed reactor system. *Science of the total environment*. v. 575, p. 1352-60, Jan. 2017.  
BOLIVAR, J. M., WOODLEY, J. M., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, 2022, 51(15), 6251–6290. <https://doi.org/10.1039/d2cs00083k>

BORGES, C. P. Curso Teórico-Prático em Engenharia de Bioprocessos. Centro Argentino Brasileiro de Biotecnologia (CABB) – Programa de Engenharia Química COPPE / UFRJ. Rio de Janeiro, 1998.

BRADY D.; JORDAAN J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnol Lett.** 31(11):1639-50. 2009.

BRASIL - Instrução Normativa N°12, de 4 de Setembro de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRASIL MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/aceso-a-informacao/participacao-social/tomada-publica-de-subsidios/2022/revisao-do-decreto-no-6-871-de-04-06-2009-que-regulamenta-a-lei-no-8-918-de-14-07-1994-lei-de-bebidas> acesso em 20/07/2023

BRASIL. Decreto 6.871/2009 disponível em : [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm) acesso em 01/11/2020 às 12:26

BRASIL. EPAGRI. A Cultura da Macieira. Florianópolis, 2002. <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va02-reportagem.pdf>

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n 37, de 1 de outubro de 2018. Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de fruta. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 08 out. 2018. [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/44304943/do1-2018-10-08-instrucao-normativa-n-37-de-1-de-outubro-de-2018-44304612](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/44304943/do1-2018-10-08-instrucao-normativa-n-37-de-1-de-outubro-de-2018-44304612)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [Internet] Lei nº 8.918, de 14 de Julho de 1994. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, autoriza a criação da comissão intersetorial de bebidas e dá outras providências. [acesso 2007 maio 17]. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=212>>

BROEK, A. Functional Foods. The Japanese Approach. **International Food Ingredients**. n. 1/2. p. 4-10, 1993.

CAMARGO, G. A.; CONSOLI, L.; LELLIS, I. C. S.; MIELI, J.; SASSAKI, É. K. Bebidas naturais de frutas: Perspectivas de mercado, componentes funcionais e nutricionais/natural fruits beverages: Market outlook, functional and nutritional components. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 1, p. 179-205, 2007.

CAO L.; VAN RANTWIJK F.; SHELDON R. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. **Org Lett**. 2(10):1361-4. 2000.

CARMO, M. C. L. D.; DANTAS, M. I. D. S.; RIBEIRO, S. M. R. Caracterização do mercado consumidor de sucos prontos para o consumo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, p. 305-309, 2014.

CARRATU, E.; SANZINI, E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetable. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, v. 41, n. 1, p. 7-16, 2005.

CARVALHO, N. B.; OLIVEIRA, M. A. S.; FRICKS, A. T.; FRANCESCHINI, E.; DARIVA, C.; ZANIN, G. M.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, 99, 130. 2014.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso de Biocatalisadores imobilizados:

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.

CESAR, T. et al. Suco de laranja reduz o colesterol em normolipidêmicos. **Revista de Nutrição. Campinas**, v. 23, n. 5, pág. 779-789. 2010.

CHATTERJEE S.; CHATTERJEE, B.; CHATTERJEE, AK GUHA Esclarecimento de suco de fruta com quitosana. *Processar Biochemistry*, 39, pp. 2229 – 2232. 2004.

CHRISTY, A. Effect of Heat on the Adsorption Properties of Silica Gel. **International Journal of Engineering and Technology**. 4, 484. 2012.

CITRUS BR. COM <https://citrusbr.com/estatisticas/producao-de-suco/> Acesso em 13 Jul 20232

COSTA, G. P., SPOLIDORO, L. S., MANFROI, V., RODRIGUES, R. C., & HERTZ, P. F.  $\alpha$ -Acetolactate decarboxylase immobilized in chitosan: A highly stable biocatalyst to prevent off-flavor in beer. **Biotechnology Progress**, 2022 38(6). <https://doi.org/10.1002/btpr.3295>

DAL MAGRO, L., DE MOURA, K. S. S., BACKES, B. E. E., DE MENEZES, E. W. W., BENVENUTTI, E. V. V., NICOLODI, S., et al. Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: Influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. **Biotechnology Reports**, 2019, 24. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00373>

DAL MAGRO, L., PESSOA, J. P. S. P. S., KLEIN, M. P. P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., & RODRIGUES, R. C. C.. Enzymatic clarification of orange juice in continuous bed reactors: Fluidized-bed versus packed-bed reactor. **Catalysis Today**, 2021 362, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.02.003>

DAL MAGRO, L., SILVEIRA, V. C. C., DE MENEZES, E. W., BENVENUTTI, E. V., NICOLODI, S., HERTZ, P. F., ET AL. Magnetic biocatalysts of pectinase and cellulase: Synthesis and characterization of two preparations for application in grape juice clarification. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018, 115, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.028>

DAL MAGRO, L.; KORNECKI, J. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 132, p. 109397, 2020.

DAL MAGRO, L.; MOURA, K. S. D.; BACKES, B. E.; MENEZES, E. W. D.; BENVENUTTI, E. V.; NICOLODI, S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C. "Immobilization of pectinase on chitosan-magnetic particles: influence of particle preparation protocol on enzyme properties for fruit juice clarification. **Biotechnology Reports**, In press, 2019.

DAL MAGRO, LUCAS, GOETZE, D., RIBEIRO, C. T., PALUDO, N., RODRIGUES, E., HERTZ, P. F., et al. Identification of Bioactive Compounds From *Vitis labrusca* L. Variety Concord Grape Juice Treated With Commercial Enzymes: Improved Yield and Quality Parameters. **Food and Bioprocess Technology**, 2016, 9(2), 365–377. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1634-5>

DAL MAGRO, LUCAS, HERTZ, P. F., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., KLEIN, M. P., & RODRIGUES, R. C. Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification. **RSC Advances**, 2016 6(32), 27242–27251. <https://doi.org/10.1039/C6RA03940E>

DAL MAGRO, LUCAS, KORNECKI, J. F. J. F., KLEIN, M. P. M. P., RODRIGUES, R. C. R. C., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. **Enzyme and Microbial Technology**, 2020 132, 109397. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109397>

DE ANDRADES, D., GRAEBIN, N. G. N. G., KADOWAKI, M. K. M. K., AYUB, M. A. Z. M. A. Z., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., & RODRIGUES, R. C. R. C. Immobilization and

stabilization of different  $\beta$ -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: Optimal protocol depends on the enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, 129, 672–678. 2019 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.057>

DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A. R., & PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 40(3), 173–289. 2000 <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

DOMINGUES R. C. C. JUNIOR, S.B.F., SILVA R.B.; CARDOSO V. L. , REIS M. H. M. Esclarecimento do suco de maracujá com quitosana: efeitos das variáveis do processo de coagulação e comparação com centrifugação e tratamentos enzimáticos. **Process Biochemistry** p. 1 – 30. 2011.

DOSEDĚL, M., JIRKOVSKÝ, E., MACÁKOVÁ, K., KRČMOVÁ, L., JAVORSKÁ, L., POUROVÁ, J., et al. Vitamin C—Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. **Nutrients**, 13(2), 615. 2021. <https://doi.org/10.3390/nu13020615>

DUARTE, L. S., SCHÖFFER, J. DA N., LORENZONI, A. S. G., RODRIGUES, R. C., RODRIGUES, E., & HERTZ, P. F. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized  $\beta$ -galactosidase. **Process Biochemistry**, 55, 96–103. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.015>

ESAWY, M. A., GAMAL, A. A., KAMEL, Z., ISMAIL, A.-M. S., & ABDEL-FATTAH, A. F. Evaluation of free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1ami pectinase applicable in industrial processes. **Carbohydrate Polymers**, 92(2), 1463–1469. 2013. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.061>

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ M.; SANROMÁN M.; MOLDES D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnol Adv. Dec**;31(8):1808-25. 2013.

FERNANDEZ-LAFUENTE Uma estratégia simples para a purificação de grandes proteínas termofílicas superexpressas em microrganismos mesofílicos: Aplicação a enzimas multiméricas de *Thermus* sp. cepa T2 expressa em *Escherichia coli* **Biotechnology Progress** , 20 pp. 1507 – 1511. 2004.

FLORES, E. E. E., CARDOSO, F. D., SIQUEIRA, L. B., RICARDI, N. C., COSTA, T. H., RODRIGUES, R. C., et al. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. **Process Biochemistry**, 84, 73–80. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.001>

GAINVORS A, FRÉZIER V, LEMARESQUIER H, LEQUART C, AIGLE M, BELARBI A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**. 1994.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 59, p. 618-628, 2002.

GARCIA-GALAN, C., BERENQUER-MURCIA, A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C., BERENQUER-MURCIA, Á., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., & RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, 353(16), 2885–2904. 2011. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>

GATTUSO G, BARRECA D, GARGIULLI C, LEUZZI U, CARISTI C. Flavonoid composition of citrus juices. **Molecules**. 2007; 12: 1641-1673

GOUGH, J. E., SCOTCHFORD, C. A., & DOWNES, S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. **Journal of Biomedical Materials Research**, 61(1), 121–130. 2002. <https://doi.org/10.1002/jbm.10145>

GOVARDHAN, C. P. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. **Current Opinion in Biotechnology**, 10(4), 331–335. 1999. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033179495&partnerID=40&md5=daa4eae0136c02c7560e0f18650a356a>

GUPTA, K. J. F.. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**. P. 43-54. 2006.

H. H., NINOW, J. L., & HERTZ, P. F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and  $\beta$ - d -galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, 137, 184–190. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.069>

HAARD NF. Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. **J Chem Educ**. 1984; 61(4): 277-283.

HACKENHAAR, C. R., ROSA, C. F., FLORES, E. E. E., SANTAGAPITA, P. R., KLEIN, M. P., & HERTZ, P. F. Development of a biocomposite based on alginate/gelatin crosslinked with genipin for  $\beta$ -galactosidase immobilization: **Performance and characteristics**. **Carbohydrate Polymers**, 291. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119483>

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hidrólise de leite / lactose de soro de leite por  $\beta$ -galactosidase: um estudo comparativo do processo de batelada agitada e reator de leito compactado preparado com enzima aprisionada de alginato de cálcio. **Engenharia Química e Processamento: Intensificação de Processo**, 48 (1), 576-580. 2008.

HAN K.; RICHARD C.; DELACOURTE A. Chemical cross-links of proteins by using bifunctional reagents. **Int J Biochem**.16(2):129-45. 1984

HARTMANN, M. Ordered mesoporous materials for bioadsorption and biocatalysis. **Chemistry of Materials**, 17(18), 4577–4593. 2005. <https://doi.org/10.1021/cm0485658>

HARUTYUNYAN, L. R., & LASAREVA, E. VChitosan and its Derivatives: A Step Towards Green Chemistry. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 13(6). 2023. <https://doi.org/10.33263/BRIAC136.578>

HENCH, L. L., & WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, 90(1), 33–72. 1990. <https://doi.org/10.1021/cr00099a003>

HIMMEL, M. E., BAKER, J. O., ADNEY, W. S., & DECKER, S. R.. Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases. In C. Reddy, T. Beveridge, J. Breznak, G. Marzluf, T. Schmidt, & L. Snyder (Eds.), **Methods for General and Molecular Microbiology** (3rd ed., pp. 596–610). Washington, DC: ASM Press. 2007. <https://doi.org/10.1128/9781555817497.ch24>

HODGSON RJ, CHEN Y, ZHANG Z, TLEUGABULOVA D, LONG H, ZHAO X, et al. Protein-doped monolithic silica columns for capillary liquid chromatography prepared by the



sol-gel method: Applications to frontal affinity chromatography. **Anal Chem.** P.2780-90. 2004.

ISPAS, C.; SOKOLOV, I.; ANDREESCU, S.; **Anal. Bioanal. Chem.** 2009. P. 393, 543.

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

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

KARNCHANAJINDANUN, J.; SRISA-ARD, M.; BAIMARK, Y. Genipin-cross-linked chitosan microspheres prepared by a water-in-oil emulsion solvent diffusion method for protein delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 674-680, 2011.

KARTAL, F.; JANSSEN, M. H. A.; HOLLMANN, F.; SHELDON, R. A.; KILINC, A. Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 85-89, 2011.

KASHYAP, D. R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S., AND TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**. 77: 215–227.

KATO M, SAKAI-KATO K, MATSUMOTO N, TOYO'OKA T. A protein-encapsulation technique by the sol-gel method for the preparation of monolithic columns for capillary electrochromatography. **Anal Chem.** P.1915-21. 2002.

KAUR, G., KUMAR, S., AND SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum Termophile*. **Bioresource Technology**, 94, 239-243. 2004.

KENNEDY, J. F. Enzyme Technology. In: reed G. (Eds), **Biotechnology**. V 7 A Wheinhain: VCH, 1987.

KHAN MK, HUMA ZE, DANGLES O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **J Food Compos Anal.** 2014; 33: 85-104.

KIRCHER, M. The Emerging bioeconomy: Industrial drivers, global impact, and international strategies. **Industrial Biotechnology**, 10(1), 11–18. 2014. <https://doi.org/10.1089/ind.2014.1500>

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG C. C. Industrial enzyme applications. **Elsevier Science Ltd.** 2002.

KLEIN, M. P., NUNES, M. R., RODRIGUES, R. C., BENVENUTTI, E. V., COSTA, T. M. H. H., HERTZ, P. F., & NINOW, J. L. Effect of the support size on the properties of  $\beta$ -galactosidase immobilized on chitosan: Advantages and disadvantages of macro and nanoparticles. **Biomacromolecules**, 13(8), 2456–2464. 2012. <https://doi.org/10.1021/bm3006984>

KRAJEWSKA, B. (Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, 35(2–3), 126–139. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>

KUMAR, M. N. V. R.; A Review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. 2000.

LA ROTTA HERNANDEZ CE, LÜTZ S, LIESE A, Bon EPS. Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking. **Enzyme Microb Technol**. 37(6): p.582-8. 2005.

LAKO, J. *et al.* Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chemistry**, v.101, p.1727- 1741, 2007.

LANDBO, A.K., KAACK, K., AND MEYER, A.S. Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 8: 135–142. 2007.

LOPES, J. M. S; DÉO, T. F. G; ANDRADE, B. J. M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E. I.; BUENO, C. E. M. S.; SILVA, T. F.; LIMA, F. C. C. Importância econômica do citrusno brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, n. 20, dezembro, 2011.

MACARIO A, MOLINER M, CORMA A, GIORDANO G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system. **Microporous Mesoporous Mat**. P. 334-40. 2019.

MACEDO, M., ROBRIGUES, R. D. P., PINTO, G. A. S., & DE BRITO, E. S. Influence of pectinolytic and cellulolytic enzyme complexes on cashew bagasse maceration in order to obtain carotenoids. **Journal of Food Science and Technology**. 2014. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1411-x>

MACHADO, J. G. D. C. F. Estratégias de marketing na indústria de amendoim: um estudo em empresas da Alta Paulista. Latin American. **Journal of Business Management**, v. 3, n. 2, p. 21-29, 2013.

MACORIS MS, DE MARCHI R, JANZANTTI NS, MONTEIRO M. The influence of ripening stage and cultivation system on the total antioxidant activity and total phenolic compounds of yellow passion fruit pulp. **J Sci Food Agric**. 2011; 92: 1886-1891.

MALLMANN, L. P., O. RIOS, A., & RODRIGUES, E. MS-FINDER and SIRIUS for phenolic compound identification from high-resolution mass spectrometry data. **Food Research International**, 163, 112315. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112315>

MATEO C, PALOMO JM, FERNANDEZ-LORENTE G, GUISAN JM, FERNANDEZ-LAFUENTE R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb Technol**. P.1451-63. 2007.

MATSUURA, F. C. A. U.; ROLIM, R. B. Avaliação da adição de suco de acerola em suco de abacaxi visando à produção de um "blend" com alto teor de vitamina C. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, p. 138-141, 2002.

MATTOS L. L. **Consumo de fibras alimentares em população adulta de região metropolitana de São Paulo** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ Faculdade de Economia e Administração e Faculdade de Saúde Pública da USP; 1997.

MEJIA, J. A. A., & YÁÑEZ-FERNANDEZ, J. Clarification Processes of Orange Prickly Pear Juice (*Opuntia* spp.) by **Microfiltration**. **Membranes**, 11(5), 354. 2021. <https://doi.org/10.3390/membranes11050354>

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J., GÓMEZ-ROBLEDOS, L., MELGOSA, M., VICARIO, I. M., HEREDIA, F. J. Color of orange juices in relation to their carotenoid contents as assessed from different spectroscopic data. **Journal of Food Composition and Analysis**, Volume 24, Issue 6, 2011

MELO, E. DE A., MACIEL, M. I. S., LIMA, V. L. A. G. DE ., & NASCIMENTO, R. J. DO Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**, 44(2), 193–201.2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000200005>

MENDES A.A., OLIVEIRA P.C.D., CASTRO H. F. D., GIORDANO RLC. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**. P 831-40. 2011.

MILES, E. A., & CALDER, P. C. Effects of Citrus Fruit Juices and Their Bioactive Components on Inflammation and Immunity: A Narrative Review. **Frontiers in Immunology**, 12. 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.712608>

MILETIĆ, N.; VUKOVIĆ, Z.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins—Versatile immobilization supports for biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 196-201, 2009.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. **Journal Article**. 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MONDINI L. ; MONTEIRO C. Mudanças no padrão de alimentação. São Paulo: **Hucitec**. 1995.

MONIER M. AYAD D. M., WEI Y., SARHAN A. A. Imobilização de peroxidase de rábano em grânulos de quitosana modificados **International Journal of Biology Macromol.** pp. 324 – 330. 2010.

MONTOYA, N. A., ROTH, R. E., FUNK, E. K., GAO, P., CORBIN, D. R., & SHIFLETT, M. B. Review on porous materials for the thermal stabilization of proteins. **Microporous and Mesoporous Materials**, 333. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2022.111750>

NERI-NUMA, I. A.; PESSOA, M. G.; PAULINO, B. N.; PASTORE, G. M. Trends Food Science.

NEVES, M. F., TROMBIN, V. G., MARQUES, V. N., & MARTINEZ, L. F. Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. **Tropical Plant Pathology**, 45(3), 166–174. 2020. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00378-1>

Novozymes. Enzymes at work. Novozymes A/S, 2013. Disponível em: <https://www.novozymes.com/pt/scientific-publications/enzymes-applications>. Acesso em 08/11/2020.

NUNES, C., MARICATO, É., GONÇALVES, F. J. F. J., DA SILVA, J. A. L. J. A. L., ROCHA, S. M. S. M., & COIMBRA, M. A. M. A. Properties of Chitosan-Genipin Films Grafted with

Phenolic Compounds from Red Wine. **Trends in Carbohydrate Research**, 7(1), 25–32. 2015.

OLIVIER, N. M. et al. Efeito da enzima pectinase na extração de suco de uva. In: Encontro De Iniciação Científica e Fórum De Pesquisa Da Unipar, 7., 7., 2008, Umuarama. Anais.Umuarama: UNIPAR, 2008. CD-ROM.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Kineticcs of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* celulasas. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 47, p. 7-14, 2001.

OZTURK, A., YILDIZ, K., OZTURK, B., KARAKAYA, O., GUN, S., UZUN, S., & GUNDOGDU, M. Maintaining postharvest quality of medlar (*Mespilus germanica*) fruit using modified atmosphere packaging and methyl jasmonate. **LWT**, 111, 117–124.2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.033>

PAN, X., BI, S., LAO, F., & WU, J. Factors affecting aroma compounds in orange juice and their sensory perception: A review. **Food Research International**, 169. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112835>

PANDA, T.; NAIDU, G. S. N.; SINHA, J. Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 187-195, 1999.

PATHARE, P. B., OPARA, U. L., & AL-SAID, F. A.-J. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, 6(1), 36–60. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>

PAUCHET Y, WILKINSON P, CHAUHAN R, FRENCH-CONSTANT RH. Diversity of Beetle Genes Encoding Novel Plant Cell Wall Degrading Enzymes. **Plos ONE** 5. 2010.

PELLEGRINI, N. et al. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 1, p. 103-111, 2007.

PEREIRA, G. S., HONORIO, A. R., GASPARETTO, B. R., LOPES, C. M. A., LIMA, D. C. N. D., & TRIBST, A. A. L. Influence of information received by the consumer on the sensory perception of processed orange juice. **Journal of Sensory Studies**, 34(3). 2019. <https://doi.org/10.1111/joss.12497>

PETERSON JJ, DWYER JT, BEECHER GR, BHAGWAT AS, GEBHARDT SE, HAYTOWITZ DB et al. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. **J Food Compos Anal**. 2006; 19: S66-S73.

PHILLIPS, K. M.; TARRAGO-TRANI, M. T.; GEBHARDT, S. E.; EXLER, J.; PATTERSON, K. Y.; HAYTOWITZ, D. B.; PEHRSSON, P. R.; HOLDEN, J. M. Stability of Vitamin C in Frozen Raw Fruit and Vegetable Homogenates. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 23, p. 253-259, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.018>

PILNIK, W., VORAGEN, A. G. J. Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. **Enzymes in food processing**, 3rd Edition. editor / T. Nagodawithana; G. Reed. Academic Press, 1993. pp. 363-399

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F. M. Pectic Enzymes. **Enzymes and Food Processing**. Springer Netherlands, Dordrecht, v. p. 105-128, 1981.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: **Editora Varela**, 2005.

POPA, M.-I., AELENEI, N., POPA, V. I., & ANDREI, D. Study of the interactions between polyphenolic compounds and chitosan. **Reactive and Functional Polymers**, 45(1), 35–43. 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00009-2](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00009-2)

RAI P. , MAJUMDAR G. C. , DASGUPTA S. Otimizando o uso de pectinase no pré-tratamento de suco de mosambi para clarificação por metodologia de superfície de resposta. **Journal of Food Engineering** , pp. 397 – 403. 2004.

RODRIGUES, E., MARIUTTI, L. R. B., & MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61(12), 3022–3029. 2013. <https://doi.org/10.1021/jf3054214>

RODRIGUES, R. C., ORTIZ, C., BERENQUER-MURCIA, Á., TORRES, R., & FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, 42(15), 6290–6307. 2013. <https://doi.org/10.1039/C2CS35231A>

RONDA, L. et al. Immobilization of Proteins in Silica Gel: Biochemical and Biophysical Properties. **Current Organic Chemistry**. 2015.

RUNGSARDTHONG V., WONGVUTTANAKU, N. ,KONGPIEN N. , CHOTIWARANON P. Aplicação de quitosana fúngica para clarificação de suco de maçã. **Process Biochemistry**. p. 589 a 593. 2006.

SANKARAN, A. K.; NIJSSE, J.; BIALEK, L.; BOUWENS, L.; HENDRICKX, M. E.; VAN LOEY, A. M. Effect of Enzyme Homogenization on the Physical Properties of Carrot Cell Wall Suspensions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, p. 1377-1385, 2015.

SARVARIAN, M., JAFARPOUR, A., AWUCHI, C. G., ADELEYE, A. O., & OKPALA, C. O. R. Changes in Physicochemical, Free Radical Activity, Total Phenolic and Sensory Properties of Orange (*Citrus sinensis* L.) Juice Fortified with Different Oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) Extracts. **Molecules**, 27(5). 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27051530>

SATYANNARAYANA, K. V. V, SANDHYA RANI, S. L., & VINOTH KUMAR, R. Clarification of citrus fruit juices using microfiltration technique equipped with indigenously developed novel ceramic membrane. **Journal of Food Science and Technology**, 60(7), 2001–2011. 2023. <https://doi.org/10.1007/s13197-023-05734-y>

SCHIASSI, M. C. E. V. *et al.* Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. **Food Chemistry**, V. 245, P. 305-311, 2018.

SCHÖFFER, J. D. N. J. DA N., MATTE, C. R., CHARQUEIRO, D. S. D. S., DE MENEZES, E. W. E. W., COSTA, T. M. H. T. M. H., BENVENUTTI, E. V. E. V., ET AL. Directed immobilization of CGTase: The effect of the enzyme orientation on the enzyme activity and its

use in packed-bed reactor for continuous production of cyclodextrins. **Process Biochemistry**, 58(May), 120–127. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.041>

Sebrae (2023) acesso em 17/07/2023  
<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/consumidores-querem-sucos-saudaveis,6d15e2d294406810VgnVCM1000001b00320aRCRD>

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). Consumo de suco cresce no Brasil. Disponível em: [http://www.sebrae.com.br/setor/fruticultura/osetor/mercado/panorama/integra\\_bia/ident\\_unico/18283](http://www.sebrae.com.br/setor/fruticultura/osetor/mercado/panorama/integra_bia/ident_unico/18283)>. Acesso em: 10 maio de 2020.

SHELDON RA, SCHOEVAART R, VAN LANGEN LM. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatal Biotransform.** P.141-7. 2005.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, p. 467-477, 2011. Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A., & VAN PELT, S.). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, 42(15), 6223–6235. 2013 <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>

SILALAH, JANSEN. (2002). Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. **Asia Pacific Journal Of Clinical Nutrition**. 11. 79-84. 10.1046/j.1440-6047.2002.

SOARES, C. M. F.; SANTOS, O. A.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M.; J. Mol. Catal. B: **Enzym.** 2006.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos Fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v, 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SULAIMAN, M. Z., SULAIMAN, N. M., AND LIEW, S. Y. (1998). Limiting permeate flux in the clarification of untreated starfruit juice by membrane ultrafiltration. **Chemical Engineering Journal**. 69(2), 145–148. 1998.

SUNG, H. W.; HUANG, R. N.; HUANG, L. H.; TSAI, C. C. J. *Biomater. Sci. Polym. Ed.*

SUTER P. M. Carbohydrates and dietary fiber. **Handb Exp Pharmacology**. P. 231-61. 2005.

TACIAS-PASCACIO, V. G., GARCÍA-PARRA, E., VELA-GUTIÉRREZ, G., VIRGEN-ORTIZ, J. J., BERENQUER-MURCIA, Á., ALCÁNTARA, A. R., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Genipin as An Emergent Tool in the Design of Biocatalysts: Mechanism of Reaction and Applications. **Catalysts**, 9(12), 1035. 2019. <https://doi.org/10.3390/catal9121035>

TALBERT JN, GODDARD JM. Enzymes on material surfaces. **Colloids Surf B**. p. 8-19. 2012.

TARRAGO-TRANI, M. T.; PHILLIPS, K. M.; COTTY, M. Matrix-Specific Method Validation for Quantitative Analysis of Vitamin C in Diverse Foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 26, n. 1-2, p. 12-25, 2012.

TIMMERMANS, R. A. H., ROLAND, W. S. U., VAN KEKEM, K., MATSER, A. M., & VAN BOEKEL, M. A. J. SEffect of Pasteurization by Moderate Intensity Pulsed Electric Fields (PEF) Treatment Compared to Thermal Treatment on Quality Attributes of Fresh Orange Juice. *Foods*, 11(21), 3360. 2022 <https://doi.org/10.3390/foods11213360>

TING, S. V. Nutrients and Nutrition of Citrus Fruits. In S. Nagy & J. A. Attaway (Eds.), **Citrus Nutrition and Quality** (pp. 3–24). Washington, DC, USA: 1980 American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1980-0143.ch001>

TIWARI, B. K.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; CULLEN, P. J.; O'DONNELL, C. P. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 598-604, 2010.

TRIBESS, T. B., AND TADINI, C. C. Inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice as a function of pH and temperature-time process conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 86: 1328-1335. 2006.

TSIGOS, I.; MARTINO, A.; KAFETZOPOULOS, D.; BOURIOTIS, V.; **Trends Biotechnol.** 2000.

TVEDEN-NYBORG P., LYKKESFELDT J. Does vitamin C deficiency increase lifestyle-associated vascular disease progression? Evidence based on experimental and clinical studies. **Antioxid. Redox Signal.** 2013.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.

Uma alternativa para a condução de bioprocessos, **Revista Analytica**, N°23, p. 60-70;

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos: TACO. 4 ed. Campinas, 2011. Disponível em: [https://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf?arquivo=1](https://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=1)

USDA. Department Of Health And Human Services And U.S. Department Of Agriculture. Database for the flavonoid content of selected foods, release 2, 2007. <https://www.fas.usda.gov/data/brazil-citrus-semi-annual-3 - acesso em 19/07/2020>

VAILLANT, F., MILLAN, A., DORNIER, M., DECLoux, M., & REYNES, M. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. **Journal of Food Engineering**, 48, 83e90. 2001.

VILAR, R. B. C.; JESUS, A.; BENVENUTTI, E. V.; SILVA, M. M.; **Quim. Nova.** 2008.

Vitamina C e imunidade: alimentos garantem doses recomendadas. Acesso em 21/03/2020 (ASBRAN) <https://www.asbran.org.br/noticias/vitamina-c-e-imunidade-alimentos-garantem-doses-recomendadas>

WANSINK, B. Environmental factors that increase the food intake and consumption volume of unknowing consumers. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 24, p. 455-479, 2004.

WONG S.S., WONG L-J.C. Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. **Enzyme Microbiology Technology**. p. 866-74. 1992.

WU, H., & MU, W. Application prospects and opportunities of inorganic nanomaterials for enzyme immobilization in the food-processing industry. **Current Opinion in Food Science**, 47. 2022 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100909>

YU, H. W.; CHEN, H.; WANG, X.; YANG, Y. Y.; CHING, C. B. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 124-127, 2006.

YU, Y., XU, S., LI, S., & PAN, H. Genipin-cross-linked hydrogels based on biomaterials for drug delivery: A review. **Biomaterials Science**, 9(5), 1583–1597. 2021 <https://doi.org/10.1039/d0bm01403f>

ZANCHETTA, ARIANE. 2013. Celulases e suas aplicações. **UNESP - Mundo Leveduras**. 2013.

ZHENG M-M, LU Y, DONG L, GUO P-M, DENG Q-C, LI W-L, et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Bioresour Technol**. p. 141-6. 2012.

ZHOU Z, INAYAT A, SCHWIEGER W, HARTMANN M. Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous Mesoporous Mat. P**. 133-41.2012.

ZOU, B.; SONG, C.; XU, X.; XIA, J.; HUO, S.; CUI, F.; Applied Surface. *Science*. 311, 62. 2014.

ZUCCA, P., & SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: **Methods and mechanisms**. **Molecules**, 19(9), 14139–14194. 2014 <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>