

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO ALEXANDRE FUCHS

PECTINA EXTRAÍDA DO BAGAÇO DE LARANJA (*Citrus sinensis* L. Osbeck):
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E REOLÓGICA E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

CURITIBA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO ALEXANDRE FUCHS

PECTINA EXTRAÍDA DO BAGAÇO DE LARANJA (*Citrus sinensis* L. Osbeck):
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E REOLÓGICA E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica pelo Programa de Pós-Graduação Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Joana Léa Meira
Silveira

CURITIBA

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Fuchs, Gustavo Alexandre.

Pectina extraída do bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck):
caracterização química e reológica e hidrólise enzimática. / Gustavo
Alexandre Fuchs. – Curitiba, 2020.

101 f. : il.

Orientadora: Nadia Krieger

Coorientadora: Joana Léa Meira Silveira. .

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –
Bioquímica.

1. Suco de laranja - Indústria. 2. Hidrólise. 3. Pectina. 4. Análise
enzimática. 5. Reologia (Biologia). 6. Viscosidade. 7. Reômetros. 8. Laranja
– Frutas. I. Título. II. Krieger, Nadia. III. Silveira, Joana Léa Meira. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (20. ed.) 572.5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **GUSTAVO ALEXANDRE FUCHS** intitulada: **PECTINA EXTRAÍDA DO BAGAÇO DE LARANJA (*Citrus sinensis* L. Osbeck): CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E REOLÓGICA E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**, sob orientação da Profa. Dra. NADIA KRIEGER, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de dezembro de 2020.

Assinatura Eletrônica

01/03/2021 10:05:11.0

NADIA KRIEGER

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/03/2021 16:37:20.0

ALINE BESCROVAINE PEREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Assinatura Eletrônica

19/01/2021 22:27:59.0

DIOGO RICARDO BAZAN DUCATTI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 78569

Para autenticar este documento/assinatura, acesse

<https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 78569

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marciana e José, ao meu irmão, Tiago, e a minha companheira, Gabriela, pelos apoios, carinhos, incentivos e compreensões durante está parte da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser minha fonte de amparo e força nos momentos mais difíceis, me ajudando e guiando para que eu alcance todas as minhas metas.

À Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger, minha orientadora, por sempre me lembrar que eu poderia ser muito mais do que eu mesmo imaginava, e assim, sempre me oferecendo novos desafios. Sou grato pelos seus ensinamentos, dedicação, compreensão e amizade!

À Prof.^a Dr.^a Joana Léa Meira Silveira, minha coorientadora, por se disponibilizar e aceitar essa posição após a correção do projeto. Toda a sua expertise se mostrou fundamental para o desenvolvimento desse trabalho! Agradeço por seus ensinamentos e amizade!

Ao Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti, pela ótima correção do relatório anual do trabalho.

À banca examinadora, Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti e Prof.^a Dr.^a Aline Bescrovaine Pereira, por aceitarem avaliar o trabalho aqui apresentado. As críticas apontadas por vocês são de grande importância para o aprimoramento dele.

À Dr.^a Shayla Fernanda Barbieri, colaboradora do trabalho, pela imensa ajuda em todas as análises relacionadas à carboidratos e reologia, além de inúmeras outras dicas! Sei que não foi fácil, mas sua perseverança é contagiante. Sou imensamente grato!

Ao Dr. Robson Carlos Alnoch, pela grande ajuda no laboratório, tirando dúvidas ou me ensinando a lidar com os equipamentos do laboratório. Além disso, é uma pessoa que me rendeu bons conselhos perante os meus desabafos. Sou muito grato por isso!

Aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Em especial à Rosane, pelas análises de GC-MS e à Keyla, pelas análises de HPSEC-MALLS-RI e HPAEC-PAD, pelo carinho e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, representado no momento da defesa pela Prof.^a Dr.^a Maria Berenice Reynaud Steffens e pelo Prof. Dr. Marcelo Müller Dos Santos, pelo suporte durante o período do mestrado.

À CAPES, pelo auxílio financeiro e apoio durante o período da pandemia de 2020.

À minha família, em especial minha mãe, Marciana Reichardt Fuchs, meu pai, José Antonio Fuchs, e meu irmão, Tiago Antonio Fuchs, pelo apoio, amor, carinho, proteção e compreensão que recebi de vocês todos nesta jornada! As mudanças e dificuldades passadas nestes últimos anos nos tornaram ainda mais fortes e unidos, apesar da distância! AMO VOCÊS do fundo do meu coração!

À Gabriela Conon Figueiredo, minha companheira, pelo seu imenso amor, compreensão e, com toda certeza, paciência! Durante os anos que passaram, durante o desenvolvimento desse trabalho, você sempre me fez acreditar que era possível! Agradeço também por me auxiliar no desenvolvimento laboratorial! Tenho orgulho da mulher forte, decidida, estudiosa e carinhosa que é você! TE AMO MUITO!

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Bioquímica, os quais eu sempre posso contar para o que der e vier!

Ao laboratório E2, do Grupo de Química de Carboidratos (Shayla, Isabela e Sarah), pela ajuda, companheirismo e amizade! Tive a oportunidade de viver e aprender, neste último ano, com cientistas incríveis que vocês são! O destino reserva a vocês um mundo de conquistas!

Ao Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática (Gabriela, Leonardo, Marcos, Welton, Fernanda, Janaína, Glauco e demais), pela amizade desenvolvida nesses anos! Os temas dos trabalhos podem até ser diferentes, mas as dificuldades são equivalentes. Neste âmbito, compreensão e companheirismo são extremamente fundamentais! Digamos que essa amizade tem cheiro de “verniz”.

Ao Departamento de Química, em especial ao Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (Glêydison, Leandro, Allyson e Dominicky), pela amizade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho, tanto na parte prática quando na parte escrita.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado com sucesso até o fim, meu muitíssimo OBRIGADO!

“Aceite as coisas que não pode mudar,
Tenha coragem para mudar as que forem possíveis
E sabedoria para saber distinguir entre elas.”
Oração da Serenidade - *Reinhold Niebuhr*[†] (1892–1971)

RESUMO

O Brasil é o principal produtor de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) do mundo e, conseqüentemente, também é o país que mais processa esse fruto. A laranja é destinada principalmente para a produção de suco, gerando cerca de 5,6 milhões de toneladas de bagaço úmido de laranja ao ano, composto por casca, polpa e sementes. Esse bagaço é rico em polissacarídeos, principalmente a pectina. A pectina é composta diversos monossacarídeos, porém o ácido D-galacturônico (D-GalA) é o mais abundante, chegando a compor cerca de 70% dos monômeros da pectina da laranja. D-GalA pode ser utilizado como agente acidificante e como surfactante nas indústrias alimentícias e químicas, respectivamente. Além disso, D-GalA também pode ser convertido para os ácidos múcico e L-galactônico, importantes precursores de bioplásticos e aditivos cosméticos. O D-GalA pode ser obtido através da hidrólise da pectina, que pode ocorrer de duas formas: química e enzimática. A hidrólise química utiliza ácidos em altas temperaturas (80 a 100°C) e baixos valores de pH (1,0 a 3,0), podendo ocasionar a degradação dos produtos gerados, formando lactonas. A hidrólise enzimática utilizando pectinases evita estas condições drásticas, com temperaturas mais baixas (20 a 40°C) e valores pH mais altos (4,0 a 6,0). Contudo, a concentração de pectina na dispersão pode dificultar o processo de hidrólise enzimática, pois o aumento da viscosidade da suspensão pode causar problemas de transferência de massa, com conseqüente diminuição da atividade enzimática. Desse modo, a proposta do presente trabalho foi realizar uma extração com ácido cítrico do bagaço de laranja úmido, na forma em que é originado como resíduo pela indústria de suco, e realizar uma caracterização química e reológica da pectina extraída deste resíduo. Além disso, analisar o comportamento reológico desta pectina durante hidrólise enzimática com pectinases utilizando um reômetro rotacional. Os produtos da hidrólise foram analisados por HPLC o que possibilitou o estabelecimento de correlação entre a queda da viscosidade complexa com o teor de D-GalA produzido na hidrólise. As frações de pectinas do bagaço de laranja úmido (WOP-DI) e pectina cítrica da Sigma (CP) apresentaram perfis de eluições com um único pico alargado por HPSEC-MALLS-RI. A composição monossacarídica mostrou que a fração WOP-DI apresentou 69% de D-GalA, valor mais próximo ao padrão CP utilizado, com cerca de 79% de D-GalA. O grau de metil-esterificação das amostras foi de 74% e 48%, respectivamente. Durante o ensaio de hidrólise enzimática, a viscosidade complexa da fração WOP-DI apresentou maior redução em relação à encontrada na fração CP. Os testes de HPLC confirmaram que houve a liberação de D-GalA durante a hidrólise enzimática para WOP-DI e CP. Ressalta-se que esse estudo foi o primeiro a propor a utilização da reologia para acompanhar a ação de pectinases com base na queda da viscosidade complexa de dispersões de pectina de bagaço de laranja em diferentes concentrações.

Palavras-chave: Bagaço de laranja, pectina, hidrólise enzimática, ácido D-galacturônico, reologia, viscosidade complexa, reômetro rotacional

ABSTRACT

Brazil is the main orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) producer in the world and consequently is also the country that processes this fruit the most. The orange is mainly destined to the production of orange juice, generating about 5.6 million tons per year of moist orange bagasse, composed of peel, pulp and seeds. This bagasse is rich in polysaccharides, mainly pectin. Pectin is composed of several monosaccharides, but D-galacturonic acid (D-GalA) is the most abundant, composing about 70% of monomers of orange pectin. D-GalA can be used as an acidifier and surfactant in the food and chemical industries, respectively. In addition, D-GalA can also be converted to mucic and L-galactonic acids, important precursors of bioplastics and cosmetic additives. D-GalA can be obtained by hydrolysis of pectin either by chemical or enzymatic processes. Chemical hydrolysis uses acids at high temperatures (80 to 100°C) and low pH values (1.0 to 3.0) that can cause degradation of the products into lactones.- Enzymatic hydrolysis using pectinases avoids these drastic conditions, with lower temperatures (20 to 40°C) and higher pH values (4.0 to 6.0) are used. However, the concentration of pectin in the dispersion can interfere with the enzymatic hydrolysis, decreasing enzyme activity due to mass transfer problems. Thus, the purpose of this work was to perform an extraction with citric acid from the wet orange bagasse, in the form in which it is originated as a residue by the juice industry, and to perform a chemical and rheological characterization of the pectin extracted from this residue. In addition, to analyze the rheological behavior of this pectin during enzymatic hydrolysis with pectinases using a rotational rheometer. The hydrolysis products were analyzed by HPLC which made it possible to establish a correlation between the drop in complex viscosity and the D-GalA content produced by the hydrolysis. The fractions of pectin from wet orange bagasse (WOP-DI) and citric pectin from Sigma (CP) presented a broad peak elution profiles by HPSEC-MALLS-RI. The monosaccharide composition showed that the WOP-DI fraction presented 69% (w/w) of D-GalA, a value closer to the CP standard used, with about 79% (w/w) of D-GalA. The degree of methylesterification of the samples was 74% and 48%, respectively. During the enzymatic hydrolysis assay, the complex viscosity of the WOP-DI fraction showed a greater reduction in relation to that found in the CP fraction. HPLC tests confirmed that D-GalA was released during enzymatic hydrolysis for WOP-DI and CP. It should be noted that this study was the first to propose the use of rheology to follow the action of pectinases based on the drop in complex viscosity of pectin dispersions from orange bagasse at different concentrations.

Keyword: Orange bagasse, pectin, enzymatic hydrolysis, D-galacturonic acid, rheology, complex viscosity, rotational rheometer

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DA LARANJA.....	18
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA PECTINA.....	22
FIGURA 3 - HIDRÓLISE DA PECTINA POR ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	27
FIGURA 4 - ATUAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE ENZIMAS NA ESTRUTURA DA PECTINA.....	28
FIGURA 5 - ESTRUTURAS DOS ÁCIDOS D-GALACTURÔNICO, MESO-GALACTÁRICO E GALACTÔNICO	30

ARTIGO

Pectin extracted from orange bagasse (*Citrus sinensis* L. Osbeck):
Chemical and Rheological Characterization and Enzymatic Hydrolysis

FIGURE 1 - ACID-EXTRACTED POLYSACCHARIDES FROM WET ORANGE BAGASSE.....	40
FIGURE 2 - HPSEC ELUTION PROFILE. COMPARISON BETWEEN REFRACTION INDEX (R.I., CONTINUOUS LINE) AND LIGHT SCATTERING (L.S., DOTTED LINE) SAMPLE PROFILES BETWEEN PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP, PURPLE), DIALYZED PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI, GREEN) AND SIGMA CITRIC PECTIN (CP, BLACK).....	46
FIGURE 3 - ¹ H-NMR SPECTRA OF THE FRACTIONS PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI) AND SIGMA CITRIC PECTIN (CP); OBTAINED AT 70 °C IN D ₂ O (CHEMICAL SHIFTS ARE EXPRESSED IN Δ, PPM)	49

FIGURE 4 - INFLUENCE OF SHEAR RATE ($0.01 - 1000 \text{ S}^{-1}$) A) ON THE FLOW CURVE AND B) ON THE VISCOSITY CURVE OF PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI, CONTINUOUS LINE) AND SIGMA CITRIC PECTIN (CP, DOTTED LINE) AT 30°C IN DIFFERENT CONCENTRATIONS OF 3% (BLUE), 5% (GREEN), 7% (RED) AND 10% (PURPLE) IN ACETATE BUFFER PH 4.5 0.2 MOL L^{-1}	51
FIGURE 5 - FREQUENCY SWEEP PROPERTIES OF SAMPLES IN CONCENTRATIONS OF 3% (BLUE), 5% (GREEN), 7% (RED) AND 10% (PURPLE) (W/V) TO PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI) AND SIGMA CITRIC PECTIN (CP). FREQUENCY SWEEP ($0.02-100 \text{ HZ}$) AT 30°C , SHOWING THE FREQUENCY DEPENDENCE OF THE ELASTIC MODULUS (G' , FULL SYMBOLS), VISCOUS MODULUS (G'' , OPEN SYMBOLS) AND COMPLEX VISCOSITY (H^* , DASHED LINE).....	54
FIGURE 6 - COX-MERZ RULE GRAPH FOR PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI) AND SIGMA CITRIC PECTIN (CP) SAMPLES IN CONCENTRATIONS OF 3% (BLUE), 5% (GREEN), 7% (RED) AND 10% (PURPLE) (W/V). THIS GRAPH CORRESPONDS TO AN APPARENT VISCOSITY (H^A , CONTINUOUS LINE) PLOTTED AGAINST THE SHEAR RATE, $\dot{\gamma}$, AND THE MAGNITUDE OF THE COMPLEX VISCOSITY (H^* , DOTTED LINE) PLOTTED AGAINST THE ANGULAR FREQUENCY, HZ	56
FIGURE 7 - DROP IN THE COMPLEX VISCOSITY OF SAMPLES DIALYZED PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI) AND SIGMA CITRUS PECTIN (CP), IN CONCENTRATIONS OF 3% (BLUE) , 5% (GREEN), 7% (RED) AND 10% (PURPLE), THE DILUTIONS OF ENZYMES 1:100 (FULL SYMBOLS) AND 1:1000 (OPEN SYMBOLS), BY THE ENZYMATIC REACTION TIME.....	59

FIGURE 8 - HPSEC-MALLS-RI ELUTION PROFILE. COMPARISON BETWEEN REFRACTION INDEX (R.I., CONTINUOUS LINE) AND LIGHT SCATTERING (L.S., DOTTED LINE). A) PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI, BLACK) AND HYDROLYZED PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI+E, ORANGE); B) SIGMA CITRIC PECTIN (CP, GREEN) AND HYDROLYZED SIGMA CITRIC PECTIN (CP+E, BROWN).....61

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 - QUANTIDADE DE PECTINA EM FRUTAS CÍTRICAS.	23
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ESTUDOS RELACIONADOS À EXTRAÇÃO DE PECTINA DE LARANJA.....	24
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	28

ARTIGO

Pectin extracted from orange bagasse (*Citrus sinensis* L. Osbeck):
Chemical and Rheological Characterization and Enzymatic Hydrolysis

TABLE 1 - MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP), DIALYZED PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI), AND SIGMA CITRIC PECTIN (CP)..	47
TABLE 2 - RHEOLOGICAL DATA OF PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI) AND SIGMA CITRIC PECTIN (CP) SAMPLES MEASURED BY THE OSTWALD-DE-WAELE AND HERSCHEL-BULKLEY MODELS	53
TABLE 3 - ELASTIC (G') AND VISCOUS (G'') MODULES FOR THE 0.02 HZ AND 10 HZ FREQUENCIES OF THE PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE (WOP-DI) AND SIGMA CITRIC PECTIN (CP) SAMPLES IN DIFFERENT CONCENTRATIONS.....	55
TABLE 4 - COMPLEX VISCOSITY DATA OBTAINED FOR PECTIN FROM WET ORANGE BAGASSE AND SIGMA CITRIC PECTIN DURING THE ENZYMATIC HYDROLYSIS	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac₂O	–	Anidrido acético
AIR	–	Resíduos insolúveis em álcool
ARA	–	Arabinose
CDTA	–	Ácido ciclohexano-1,2-dinitrilo tetracético
CP	–	Pectina cítrica comercial da Sigma-Aldrich
D-GalA	–	Ácido D-galacturônico
DHA	–	Ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico)
DM	–	Grau de metil-esterificação
DNS	–	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FDCA	–	Ácido 2,5-furandicarboxílico
FUC	–	Fucose
G'	–	Módulo de armazenamento ou elástico
G''	–	Módulo de perda ou viscoso
GAL	–	Galactose
GLC	–	Glucose
HG	–	Homogalacturonana
HM	–	Pectina com alto grau de metilação
HPLC	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC	–	Cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência
HSQC	–	Espectroscopia de correlação heteronuclear <i>Single-Quantum</i>
KDO	–	Ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico
LM	–	Pectina com baixo grau de metilação
MALLS	–	Espalhamento de luz laser com multiângulos
MAN	–	Manose
n	–	Índice de comportamento de fluxo
PBT	–	Tereftalato de polibutileno
PET	–	Tereftalato de polietileno
PS	–	Peso Seco
PUC	–	Pectinex Ultra Clear
RG-I	–	Ramnogalacturonana Tipo 1
RG-II	–	Ramnogalacturonana Tipo 2
RHA	–	Ramnose

RI –	Índice de refração
TFA –	Trifluoroacético
WOB –	Bagaço de laranja úmido
WOP –	Pectina de bagaço de laranja úmido
WOP-DI –	Pectina dialisada de bagaço de laranja úmido
XG –	Xilogalacturonana
XYL –	Xilose
$\dot{\gamma}$ –	Taxa de cisalhamento
δ –	Deslocamento químico
η^* –	Viscosidade Complexa
η^a –	Viscosidade Aparente
τ –	Tensão de cisalhamento
τ_0 –	Tensão de deformação
K –	Coeficiente de consistência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	LARANJA DOCE (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck).....	18
3.2	PECTINA	19
3.2.1	Histórico.....	19
3.2.2	Estrutura da Pectina	21
3.2.3	Extração da pectina	23
3.2.4	Aplicações da Pectina.....	25
3.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PECTINA	27
3.4	ÁCIDO D-GALACTURÔNICO	29
3.5	REOLOGIA DE PECTINAS	32
4	ARTIGO	35
	ABSTRACT	36
1	INTRODUCTION	37
2	MATERIAL AND METHODS	39
2.1	REAGENTS AND MATERIALS	39
2.2	MOISTURE DETERMINATION	39
2.3	EXTRACTION OF PECTIN FROM ORANGE BAGASSE.....	40
2.4	QUANTIFICATION AND IDENTIFICATION OF URONIC ACIDS.....	41
2.5	DETERMINATION OF NEUTRAL MONOSACCHARIDES.....	41
2.6	HIGH PERFORMANCE SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY – HPSEC.....	42
2.7	ANALYSIS OF DEGREE OF METHYL-ESTERIFICATION BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY	42
2.8	DETERMINATION OF PECTINOLYTIC ACTIVITY	43
2.9	RHEOLOGICAL ANALYZES	43
2.9.1	Steady-state shear measurements	44
2.9.2	Dynamic shear measurements	44
2.9.3	Rheological measurements during enzymatic hydrolysis	44

2.10	HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – HPLC.....	45
3	RESULTS AND DISCUSSION	45
3.1	EXTRACTION, ELUTION PROFILE AND CHEMICAL COMPOSITION OF THE PECTINS OBTAINED FROM ORANGE BAGASSE	45
3.2	DEGREE OF METHYL-ESTERIFICATION – DM	48
3.3	RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION.....	50
3.4	RHEOLOGICAL ANALYSIS DURING ENZYMATIC HYDROLYSIS.....	57
4	CONCLUSION.....	63
	ACKNOWLEDGEMENTS	64
	REFERENCES	65
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	70
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE	85

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo produzindo cerca 15,7 milhões de toneladas na safra de 2019 (FUNDECITRUS, 2020). Cerca de 70% desse montante são destinados à indústria de processamento para produção de suco, gerando cerca de 5,6 milhões de toneladas de bagaço úmido de laranja (BARROS; BERK, 2018; FUNDECITRUS, 2020). Esse bagaço, composto de casca, polpa e sementes, é rico em carotenóides, óleos essenciais e polissacarídeos onde destaca-se a pectina (KUTE et al., 2019; POURBAFRANI et al., 2010).

A casca de laranja é composta basicamente pelo flavedo (parte externa com coloração – epicarpo) e pelo albedo (parte interna branca – mesocarpo). No endocarpo, constituído pelos gomos do fruto, encontram-se as vesículas de suco, separadas por membranas que recobrem os gomos. No flavedo estão presentes os carotenóides e os óleos essenciais, enquanto que a pectina localiza-se no albedo das frutas cítricas (DEITOS et al., 2014).

Na indústria, a pectina de laranja é extraída principalmente da casca, da região do albedo (DE OLIVEIRA; WILLMS, 2016). Os processos de obtenção da pectina atualmente utilizados são patenteados e consistem em extração aquosa, seguida por uma extração ácida, utilizando ácido oxálico ou o nítrico, em condições de alta temperatura (80°C a 100°C) e baixo pH (1,5 a 4,0). Porém, devido a força desses ácidos, é necessário realizar tratamentos dos efluentes gerados, para minimizar os impactos ambientais negativos (STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2016; BUCHHOLT, 2016; JENSEN; SORENSEN; ROLIN, 2012).

Na maioria dos processos, descritos na literatura, são utilizadas as cascas (albedo com ou sem flavedo) para realizar a extração da pectina de laranja (PRABASARI et al., 2011; SABERIAN et al., 2017; TIWARI; SAHA; YADAV, 2017; DE OLIVEIRA; WILLMS, 2016). Desse modo, o presente trabalho propõe a utilização do bagaço de laranja como fonte de matéria-prima para obtenção de pectina cítrica, visando um maior aproveitamento do resíduo e aumento da produção de pectina. Esta estratégia poderá impactar na aplicação da pectina, bem como na produção de ácido D-galacturônico (D-GalA) a partir da hidrólise enzimática da pectina.

Dentre as diferentes produtos obtidos a partir da hidrólise da pectina, destacam-se o D-GalA e arabinose, por apresentarem maiores valores agregados. A arabinose, na indústria alimentícia, é utilizada como adoçante *diet*, sendo capaz de

inibir a enzima sucrase, responsável pela decomposição da sucrose em glicose e frutose no intestino delgado (KROG-MIKKELSEN et al., 2011). O D-GalA é utilizado comercialmente como agente acidificante e surfactante, porém pode ser convertidos em outros componentes, como ácido místico e ácido L-galactônico (MOJZITA et al., 2010; RICHARD; HILDITCH, 2009).

A hidrólise da pectina pode ser realizada de duas formas: quimicamente e enzimaticamente. Na hidrólise química, são utilizados nos processos os ácidos clorídrico e sulfúrico, entre 80 a 100 °C e pH entre 1,0 a 3,0 (RUANO et al., 2019). Porém, nessas condições de hidrólise ácida e elevada temperatura pode ocorrer a degradação do D-GalA em lactonas e furfurais, com conseqüente perda de valor econômico (BLAKE, J.D.; RICHARDS, 1968). Neste contexto a hidrólise enzimática é uma alternativa à obtenção de D-GalA. Na hidrólise enzimática de pectina são utilizadas pectinases (EC 3.2.1.15) nas temperatura de 20 a 40°C e pH de 4,0 a 6,0, sendo estas as condições que evitam a degradação do D-GalA (STOCK et al., 2017).

Contudo, sabe-se que eficiência de uma hidrólise enzimática é influenciada diretamente por diversos fatores, entre eles a concentração de sólidos em solução, a estrutura química e viscosidade da pectina (MINJARES-CARRANCO et al., 1997; BERGER, 2014; STOCK, 2013). A concentração de sólidos totais pode interferir diretamente na transferência de massa entre enzima-substrato, enquanto que a estrutura química pode interferir na atividade da enzima.

Tendo em vista o potencial econômico do conversão da pectina em D-GalA e a necessidade do maior aproveitamento do bagaço de laranja originado pelas indústrias de processamento de laranja, no presente trabalho foram realizadas a obtenção, caracterização química e reológica de pectina do bagaço de laranja úmido. Além disso foi realizada a hidrólise enzimática da pectina tendo o perfil da queda da viscosidade complexa monitorado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar a estrutura química e reológica de pectina de bagaço de laranja úmido, gerado por indústria de processamento de suco de laranja, e avaliar a cinética de hidrólise enzimática da pectina através do perfil de queda da viscosidade complexa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair a pectina do bagaço de laranja úmido utilizando ácido cítrico;
- Caracterizar quimicamente a pectina extraída do bagaço de laranja;
- Analisar as propriedades reológicas das dispersões de pectina de laranja;
- Avaliar o comportamento da viscosidade complexa das dispersões de pectina de laranja durante a hidrólise enzimática por pectinases;
- Analisar a produção de ácido D-galacturônico por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após hidrólise enzimática das dispersões de pectina de laranja.

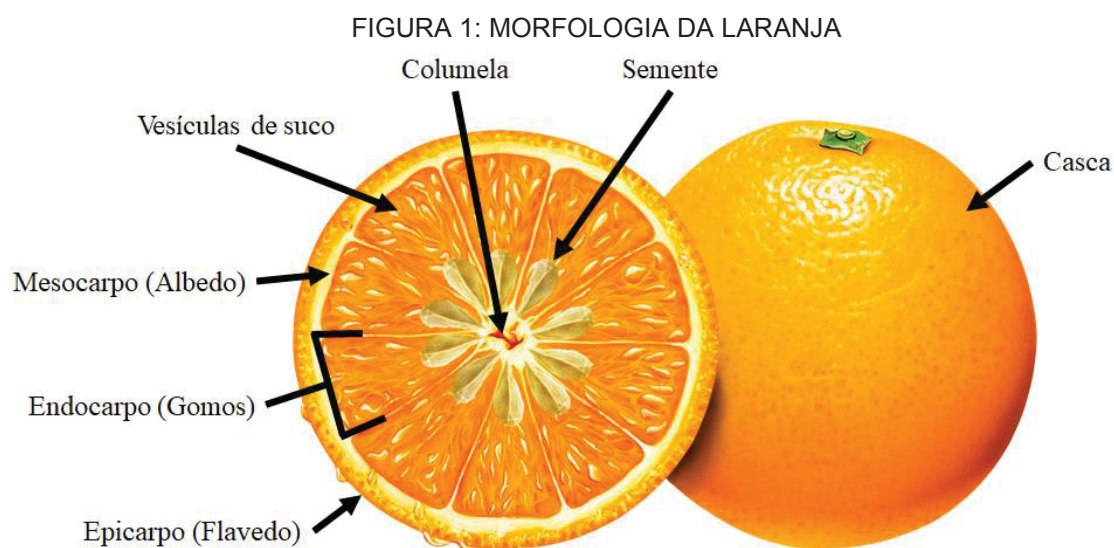
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LARANJA DOCE (*Citrus sinensis* L. Osbeck)

A laranja é originária do sudeste asiático e era cultivada na China desde 2500 a.C. onde era conhecida como “maçã chinesa” (NICOLSI et al., 2000). Atualmente a laranja é cultivada em quase todo o mundo como alimento com alto valor nutricional para humanos sendo fonte de vitaminas A, C e E, além de apresentar propriedades com ação anti-inflamatória, antitumoral e antiobesidade (ETEBU; NWAUZOMA, 2014).

Botanicamente, a laranja doce possui o nome científico de *Citrus sinensis* L. Osbeck, e pertence à família das Rutáceas (*Rutaceae*). As laranjas conhecidas popularmente como Pêra, Bahia (sem sementes), Moro (sanguínea) e a laranja Lima (sem acidez) são denominadas cientificamente como *Citrus sinensis* (L) Osbeck (EMBRAPA, 2005).

Dentre as partes anatômicas da laranja, está a casca, que é composta pelo flavedo (parte externa com coloração – epicarpo) e pelo albedo (parte interna branca – mesocarpo). O endocarpo é constituído pelos gomos do fruto, onde se têm as vesículas de suco separadas por membranas que recobrem os gomos e os separam do albedo (FIGURA 1) (LADANIYA, 2008). A pectina localiza-se no albedo. Já no flavedo estão presentes os carotenoides e os óleos essenciais (DEITOS et al., 2014).



Em relação à produção e processamento de laranja, o Brasil é referência mundial nessas áreas. Estimou-se que na colheita de 2019/2020, período de maio de 2019 até abril de 2020, foram produzidas cerca de 15,7 milhões de toneladas de laranja (FUNDECITRUS, 2020). Deste valor de produção, cerca de 71% foram destinados ao processamento para obtenção de suco industrializado (BARROS; BERK, 2018).

O Brasil é o maior produtor de suco de laranja do mundo, com 60% do volume produzido mundialmente. Os principais mercados importadores da *commodity* Nacional são a União Europeia, Estados Unidos, Suíça, Japão, China e Coréia do Sul (SECEX, 2020). Durante o processamento do suco, aproximadamente 50% da quantidade de laranja utilizada acaba se transformando em bagaço úmido, pois, para a indústria de sucos, apenas a fração líquida é importante (CIRIMINNA et al., 2016). Assim, no Brasil, estima-se que são gerados cerca de 5,6 milhões de toneladas de bagaço úmido de laranja por ano, composto por casca, polpa e sementes.

O bagaço de laranja é utilizado diretamente ou após tratamentos simplificados como ração animal ou fertilizante para solos, sendo este último o destino mais comum. Entretanto, devido ao enorme excedente de resíduos produzidos pela indústria de cítricos, este resíduo também poderia ser utilizado como matéria-prima nos projetos de biorrefinarias para obtenção de produtos com alto valor agregado, sendo esta aplicação ainda dificultada devido a restrições econômicas (ZEMA et al., 2018).

Dessa forma, visando minimizar os custos de gestão e reduzir a poluição ambiental, várias estratégias de aplicação dos resíduos cítricos, originados principalmente do processamento de laranja, têm sido avaliados nas últimas décadas. No entanto, as formas de tratamento e valorização deste resíduo dependem de muitos fatores que afetam a sua viabilidade econômica (ZEMA et al., 2018). Atualmente, o produto mais importante dos resíduos cítricos é a pectina, objeto de estudo do presente trabalho.

3.2 PECTINA

3.2.1 Histórico

A história da pectina começa no século XVIII, quando foi descoberta em sucos de maçã por Nicholas Vauquelin, em 1790. Entretanto, foi Braconnot, em 1824, que a

caracterizou e sugeriu o seu nome, que foi derivado da palavra *pektikos*, devido à sua consistência viscosa, que significa “solidificar ou congelar” em grego (NUSSINOVITCH, 1997; CANTERI et al., 2012).

Até o início do século XX, acreditava-se que a pectina era uma molécula cíclica. Contudo, após as análises de raio-X, descobriu-se que a pectina apresentava estrutura semelhante à da celulose (OWENS et al., 1946). No ano de 1924, a pectina foi considerada um polímero composto por ácido poligalacturônico. Em 1930, descobriu-se que a pectina poderia ter cadeias laterais (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014). Por fim, em 1937, a estrutura da pectina foi definida como sendo formada por monômeros de ácido D-galacturônico metil-esterificados, ligados por ligações glicosídicas do tipo α -(1→4) (BAKER, 1948).

O primeiro registro da produção de um extrato líquido de pectina foi na Alemanha em 1908, ao se cozinhar bagaço seco da maçã, um subproduto gerado no processamento de sucos (CIRIMINNA et al., 2016). Porém, esse extrato só foi patenteado nos Estados Unidos em 1913 (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014). A pectina, naquela época, era vendida como um agente gelificante devido à sua propriedade de formar um hidrocóide capaz de aprisionar a água e formar géis em baixa concentração (<1% m/m) (ABID et al., 2017).

A produção de pectina, no início do século XX, se desenvolveu na Europa e nos Estados Unidos utilizando bagaço de maçã. Porém, a pectina originada de resíduos cítricos começou a ganhar cada vez mais destaque devido à abundância de matéria-prima gerada pelas indústrias de sucos. A primeira fábrica de pectina cítrica foi construída em 1926, no estado da Califórnia, USA (KERTESZ, 1951). Ressalta-se que, em 1940, 60% da pectina produzida no mundo era de origem cítrica, principalmente laranja (HERBSTREITH & FOX, 2009).

No Brasil, a produção industrial de pectina teve início em 1954, na cidade de Limeira, em São Paulo, com a fábrica da CPKelco (CPKELCO, 2019). A CPKelco é, até o momento, a única fábrica de pectina no País. Contudo, a Cargill anunciou a construção de uma nova unidade destinada à produção de pectina com alto grau de metil esterificação, em junho de 2019, na cidade de Bebedouro, no interior de São Paulo (CARGILL, 2019), com perspectiva de início das operações para o primeiro semestre de 2021 (BAASCH, 2020).

3.2.2 Estrutura da Pectina

A pectina (FIGURA 2) é definida como um polissacarídeo aniônico formada por monômeros de ácido D-galacturônico (D-GalA) unidos por ligações glicosídicas α - (1 \rightarrow 4), podendo apresentar ramificações a partir da cadeia principal (VORAGEN et al., 2009). Pode ser composta por até 17 monossacarídeos diferentes, dentre os quais o ácido D-galacturônico (D-GalA) é o mais abundante, seguido por D-galactose (D-Gal) e L-arabinose (L-Ara) (YAPO, 2011). As estruturas da pectina variam entre as espécies vegetais, tecidos e partes de um fruto. As principais regiões que compõem a estrutura da pectina são: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana do tipo I (RG-I), ramnogalacturonana do tipo II (RG-II) e xilogalacturonana (XG) (FIGURA 2) (CARPITA; GIBEAUT, 1993; CAFFALL; MOHNEN, 2009).

A HG representa cerca de 65% da estrutura da pectina presente na parede celular da laranja, constituindo a região linear ou *smooth region* da pectina (YAPO, 2011). As unidades de D-GalA da cadeia linear de HG podem estar parcialmente metil-esterificadas em C-6 e acetil-esterificadas nas posições O-2 e/ou O-3 (VORAGEN et al., 2009).

A RG-I representa cerca de 20% a 35% da pectina (FARIAS, 2014) e constituem as regiões denominadas ramificadas ou *hairy regions* da pectina (YAPO, 2011). A RG-I é formada por uma cadeia principal de unidades alternadas de α -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas, e unidades de α -L-Rhap (1 \rightarrow 2) ligadas, as quais podem estar substituídas nas posições O-4 e/ou O-3 (menos frequente), por cadeias laterais formadas por arabinanas, galactanas, arabinogalactanas do tipo I (AG-I) ou arabinogalactanas do tipo II (AG-II) (VORAGEN et al., 2009; YAPO, 2011).

Já a RG-II compreende cerca de 10% da pectina, sendo formadas por 8 a 10 unidades de α -D-Galp (1 \rightarrow 4) ligadas, substituídas em O-2 e/ou O-3 por cadeias laterais heteropoliméricas. As cadeias laterais da RG-II podem conter fucose e xilose, além de monossacarídeos raros como apiose (3-C-hidroximetil- β -D-eritriose), ácido acérico (3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose), ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico (Kdo), L-ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptolosárico (Dha), 2-O-metil-L-Fucp e 2-O-metil-D-Xylp, unidos por mais de 20 ligações distintas (YAPO, 2011).

As XG são uma variação das HG, constituídas por uma cadeia principal de D-galA parcialmente substituída na posição O-3 por unidades β -Xylp (YAPO, 2011).

TABELA 1: QUANTIDADE DE PECTINA EM FRUTAS CÍTRICAS.

Frutas cítricas	Fração	% de pectina (PS)	Referência
Laranja (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	Casca	23	MARÍN et al. (2007)
	Casca	17-25	KAYA et al. (2014)
	Polpa	11-18	VENZON et al. (2015)
	Polpa	12	MARÍN et al. (2007)
Limão (<i>Citrus limon</i> (L.) Burm f)	Casca	13	MARÍN et al. (2007)
	Casca	21-31	KAYA et al. (2014)
	Polpa	22	MARÍN et al. (2007)
Toranja (<i>Citrus paradisi</i> Macf)	Casca	22-28	KAYA et al. (2014)
	Toda	9	MARÍN et al. (2007)
Laranja Azeda (<i>Citrus aurantium</i> L.)	Toda	3-7	MARÍN et al. (2007)
Mikan (<i>Citrus unshiu</i> (Mak) Marc.)	Casca	3-16	MARÍN et al. (2007)
Lima (<i>Citrus aurantifolia</i> (Christmas) Swingle)	Casca	27-34	KAYA et al. (2014)

LEGENDA: PS = Peso seco

3.2.3 Extração da pectina

A extração de pectina varia de acordo com a matéria-prima utilizada. Em geral, o processo consiste em (1) extração a partir do resíduo de origem em meio aquoso ácido e (2) purificação da fração líquida e isolamento da pectina por precipitação em álcool através da remoção da água de hidratação (CANTERI et al., 2012).

A casca de laranja (albedo com ou sem flavedo) é a fonte de matéria-prima majoritária no processo de extração de pectina, sendo relatados diferentes parâmetros e métodos de extração (TABELA 2).

TABELA 2: COMPARAÇÃO DE DIFERENTES ESTUDOS RELACIONADOS À EXTRAÇÃO DE PECTINA DE LARANJA

Espécie	Parte da fruta	Extração de pectina	Rendimento de pectina	Teor de D-GaIA	Grau de esterificação	Observações	Referências
Laranja-Pera (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	Casca seca (Albedo)	Ácido Cítrico pH 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5; 65 °C; 30 min	53%, 35%, 28% e 8%	---	5%, 10%, 62% e 69%	Valores para a granulometria de 60 MESH	PRABASARI et al., (2011)
Laranja Valência (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	Casca (albedo)	Ácido Cítrico 2,6 M, pH 2,0, 1:2 m/v, 100 °C, 30 min	6%	---	20%,	---	SABERIAN et al., (2017)
	Farinha da casca (Albedo)	Ácido Cítrico 0,26 M, pH 2,0, 1:40 m/v, 100 °C, 30 min	49%	147%	10%	Teores de ácido galacturônico acima de 100%, provável extração de outros compostos	
Laranja Valência (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	Casca (albedo)	Etanol 1:6 m/v, 80 °C, 30 min	100%	44%	73%		TIWARI; SAHA; YADAV, (2017)
	Resíduo 1	50 mM NaOAc, pH 5, 100 mL, 0,1% NaN ₃ , 12 h	16%	83%	69%		
	Resíduo 2	50 mM CDTA, pH 6,5, 100 mL, 0,1% NaN ₃ , 6 h	14%	85%	65%	Extração sequencial	
	Resíduo 3	50 mM Na ₂ CO ₃ , 20 mM NaBH ₄ , pH 6,8, 100 mL, 0,1% NaN ₃ , 4 °C	10%	25%	---		
	Resíduo 4	1 M KOH, 20 mM NaBH ₄ , 12 h	6%	2%	---		
	Resíduo 5	4 M KOH, 20 mM NaBH ₄ , 12 h	8%	8%	---		
Laranja (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	Casca (Albedo e flavedo)	Soxhlet, Água, 1:16 m/v, 100 °C, 1, 3 e 6 h	16%, 18% e 0,4%	---	---	Degradação térmica do extrato pécico devido ao tempo excessivo de 6 h	DE OLIVEIRA; WILLMS, (2016)
Laranja (<i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck)	Casca (Albedo)	Água, pH 2,5 ajustado com ácido cítrico; 80 °C; m/v 1:70; 2 h	38%	78%	71%	Secagem convectiva: 70 °C; 0,1 m.s ⁻¹	ZANELLA, (2013)
	Casca (Flavedo)	Água, pH 2,5 ajustado com ácido cítrico; 80 °C; m/v 1:70; 2h	29%	89%	70%	Secagem convectiva: 40 °C; 0,1 m.s ⁻¹	

A utilização de ácido é o método mais comum para extração de pectina a partir de resíduos industriais de sucos de frutas, sendo que diferentes ácidos podem ser utilizados, como cítrico, láctico, tartárico, oxálico e nítrico (THIBAUT et al., 1991; JENSEN; SORENSEN; ROLIN, 2012; BUCHHOLT, 2016; STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2016;). Além desses, pode-se utilizar também os ácidos clorídrico e sulfúrico, dependendo do produto que se deseja obter. A faixa do pH utilizada nos processos é de 1,5 e 4,0 e temperatura entre 60 a 100 °C e tempo variando de 0,5 a 6,0 h (VRIESMANN; TEÓFILO; PETKOWICZ, 2011; STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2016). A razão encontrada entre sólido-líquido (peso seco/volume) é geralmente de 1:18, porém, há variantes com 1:15 para bagaço desidratado de maçã e 1:35 para bagaço desidratado cítrico (SAKAI et al., 1993).

Após o processo de extração, a pectina é separada do resíduo através de prensas e centrífugas e a sua precipitação ocorre com adição de metanol, etanol ou 2-propanol acima de 45% (m/v). O precipitado é lavado para remoção de contaminantes, como metais pesados, resíduos de agrotóxicos, ácidos, compostos fenólicos, pigmentos, oligossacarídeos e proteínas. Por fim, a pectina precipitada é coletada, seca e moída (SAKAI et al., 1993).

3.2.4 Aplicações da Pectina

O mercado de produção da pectina está em constante crescimento devido ao desenvolvimento de técnicas que aprimoram a sua extração de resíduos agroindustriais. Entre os anos de 2005 a 2015, a produção mundial de pectina cresceu de 4×10^4 toneladas até 5×10^4 toneladas por ano (CIRIMINNA et al., 2016). Em 2019, o mercado mundial de pectina chegou a $7,7 \times 10^4$ toneladas. A previsão ainda é que, entre os anos de 2020 e 2025, o mercado mundial de pectina chegue em 1×10^5 toneladas (IMARC, 2020). O preço de 1 kg de pectina cítrica de alto grau de metil-esterificação no Brasil, em 2020, destinada indústria de alimentos, está em torno de R\$ 118,12 (QUIMIBRÁS, 2020). Projeta-se que, entre 2020 e 2025, o mercado mundial de pectina chegue de 1,1 até 1,5 bilhões de dólares (MARKETS AND MARKETS, 2018).

Na indústria alimentícia, a pectina é utilizada para promover o aumento de viscosidade, funcionando como um estabilizante e protetor nos alimentos e bebidas, sendo aplicada em iogurtes, bebidas e sucos de frutas concentrados, sobremesas de

frutas e leite, produtos lácteos e de confeitaria. Dentre outras propriedades, pode ser utilizada também para prevenir a flotação em preparados de frutas, estabilizar produtos de panificação, controlar a sinérese e otimizar da textura dos alimentos (CANTERI et al., 2012).

Diversos estudos estão sendo realizados buscando ampliar a aplicação da pectina na área farmacêutica, onde está sendo testada na formulação de alguns antibióticos, com a anfotericina B (AmB), pois o conjugado pectina-AmB apresenta menor toxicidade (KOTHANDARAMAN et al., 2017). Além disso, a pectina atua como auxiliar na liberação controlada de fármacos no aparelho gastrointestinal, quando em conjunto com gel de sílica (VITYAZEV et al., 2017); agente anticoagulante, após passar pelo processo de sulfatação (ROMÁN et al., 2017); no combate ao câncer de mama e outros tumores primários, por apresentar atividade quimioprotetora (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013); na redução do colesterol, por aumentar a excreção do ácido da bile (THEUWISSEN; MENSINK, 2008); na remoção de íons metálicos do organismo, como o mercúrio e arsênio e como substrato para elaboração de compósitos com outros materiais, para elaboração de plataformas para fármacos (LARA-ESPINOZA et al., 2018).

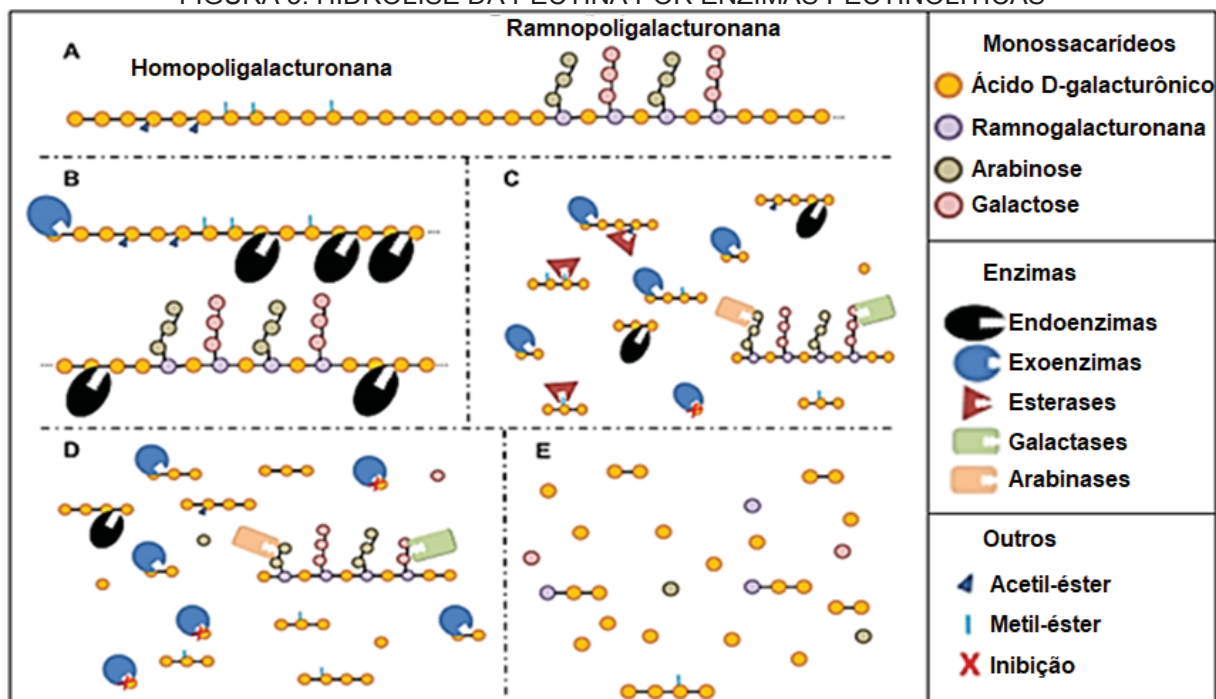
Além disso, outras pesquisas estudam a possibilidade da utilização da pectina como substrato base para obtenção de monossacarídeos de interesse comercial presentes na sua estrutura (BIZ, 2015; STOCK et al., 2017). Levando em consideração a produção de bagaço de laranja devido ao processamento da fruta, de aproximadamente 7×10^6 toneladas ao ano (BATTISON, 2011), o Brasil teria a capacidade de gerar cerca de $3,5 \times 10^5$ toneladas de pectina ao ano (POURBAFRANI et al., 2010), caso utilizasse todo esse resíduo para esta finalidade. Isso equivaleria cerca de 7 vezes a quantidade da demanda mundial de pectina, que é aproximadamente de 5×10^4 toneladas ao ano. A utilização desse volume excedente poderia ser destinada a hidrólise da sua molécula para obtenção de monossacarídeos isolados, como o D-GalA. Dessa forma, impactaria positivamente no mercado nacional, pois não desviaria substratos alimentícios já utilizados para outras áreas, mas sim um substrato excedente que poderia gerar novos produtos com um valor agregado maior.

3.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PECTINA

Devido à possível geração de lactonas resultantes da hidrólise ácida, a hidrólise enzimática é uma das alternativas mais eficientes para hidrolisar a pectina, uma vez que possui alta especificidade, condições brandas de processo e não gera subprodutos indesejáveis.

Para uma completa hidrólise da pectina a monossacarídeos, é necessário um conjunto de enzimas (FIGURA 3), as quais apresentam constantes catalíticas diferentes, podendo limitar o rendimento do processo (MICARD et al., 1997). Além disso, diferentes fatores podem impactar na hidrólise, como a inibição pelos produtos formados, inibição por presença de esterificações. As enzimas envolvidas na degradação da pectina são divididas em categorias definidas por suas ações em esterases, hidrolases e liases (TABELA 3).

FIGURA 3: HIDRÓLISE DA PECTINA POR ENZIMAS PECTINOLÍTICAS



LEGENDA: (A) Estrutura da pectina (regiões de homopoligalacturonana e ramnopoligalacturonana); (B) Ação das enzimas endoenzimas na degradação da pectina; (C) Ação das exoenzimas e enzimas auxiliares (ramnogalacturonases, arabinases, galactases, xilanases e esterases); (D) Limitação da ação das exoenzimas pela dependência da catálise promovida pelas enzimas auxiliares e pela inibição causada pelo produto; (E) Meio reacional após a reação enzimática, com alguns oligômeros recalcitrantes restantes e muitos monossacarídeos liberados.

FONTE: Adaptado pelo autor a partir de FARIAS (2014).

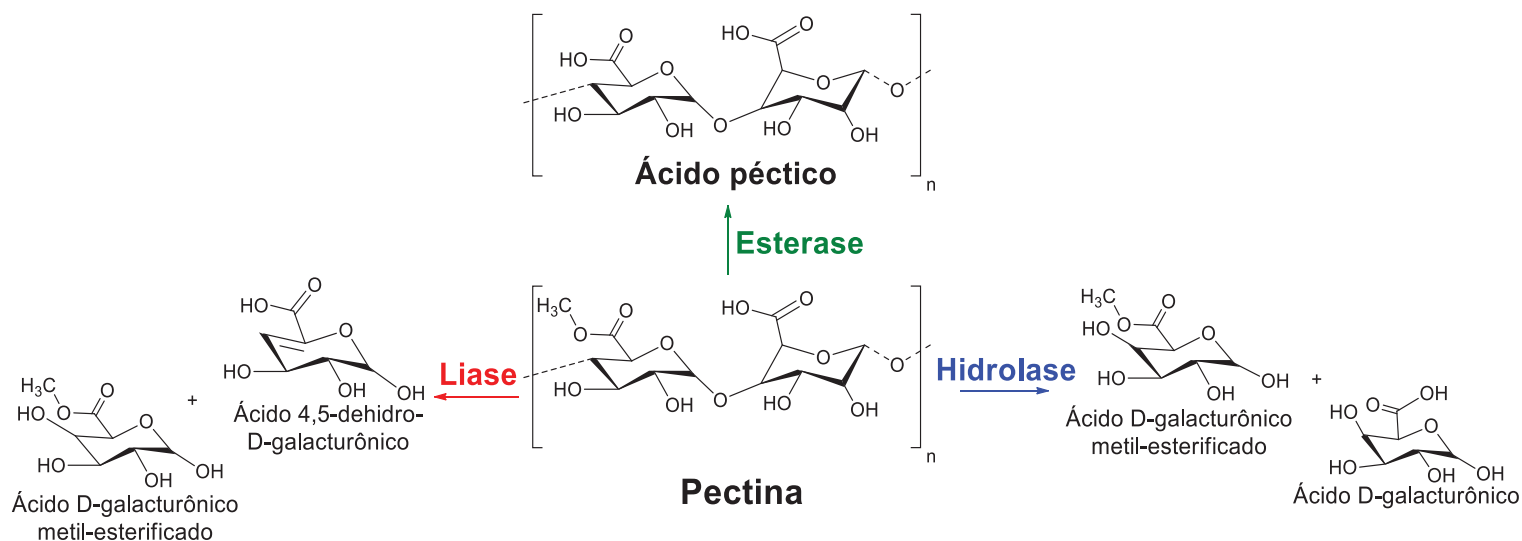
TABELA 3: CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Enzima	Número EC	Mecanismo de ação	Produto
Pectina metil esterase	3.1.1.11	Hidrólise	Ácido péctico + Metanol
Endopoligalacturonase	3.2.1.15	Hidrólise	Oligogalacturanatos
Exopoligalacturonase	3.2.1.67	Hidrólise	Monogalacturonatos
Endopolimetilgalacturonase	ND	ND	Oligometilgalacturonatos
Endopoligalacturonase liase	4.2.2.2	Trans-eliminação	Oligogalacturanatos insaturados
Exodopoligalacturonase liase	4.2.2.9	Trans-eliminação	Monogalacturonatos insaturados

LEGENDA: ND = Não Definido; EC = *Enzyme Commission*
 FONTE: JAYANI, SAXENA e GUPTA (2005).

As enzimas pectinolíticas são classificadas em dois grandes grupos, esterases e despolimerases (hidrolases e liases) (FIGURA 4). Estas enzimas podem apresentar o mecanismo de endo, agindo randomicamente na parte central, ou exo, agindo a partir das extremidades (ALKORTA et al., 1998). As esterases (EC 3.1.1.11) são responsáveis de removerem os grupamentos metil-éster nos resíduos de D-GalA, liberando metanol (SAKAI et al., 1993). As pectinas liases (EC 4.2.2.10), do grupo das liases, realizam uma clivagem transeliminativa, despolimerizando a pectina ao clivar as ligações glicosídicas através da β -eliminação. Isto gera oligômeros não saturados de pectina (SOLÍS et al., 2009). As poligalacturonases (EC 3.2.1.15), do grupo das hidrolases, realizam uma clivagem hidrolítica, tendo a capacidade de despolimerizar a pectina a partir da hidrólise das ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4), gerando oligômeros saturados (VORAGEN et al., 2009).

FIGURA 4: ATUAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE ENZIMAS NA ESTRUTURA DA PECTINA



FONTE: Adaptado de JAYANI, SAXENA e GUPTA (2005).

Pertencente à família de enzimas que contribuem para a degradação da pectina em inúmeras plantas, as poligalacturonases agem sobretudo nas regiões HG e RG da pectina. A utilização delas por parte das plantas superiores se deve ao fato de elas estarem envolvidas na modificação de substâncias pécnicas fundamentais para o processo de amadurecimento das frutas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Desde de 2012, o Grupo de pesquisa Tecnologia Enzimática e Biotecnologia (LTEB) da Universidade UFPR investiga a cinética da hidrólise enzimática da pectina, assim como a produção via fermentação em estado sólido destas enzimas (BIZ et al., 2014; STOCK et al., 2017) usando como substratos de reação a pectina e o ácido poligalacturônico da Sigma-Aldrich (P9135 e 81325, respectivamente).

Muitos trabalhos que estudam a hidrólise enzimática da pectina possuem o objetivo de aperfeiçoar a produção de etanol a partir da fermentação de resíduos agroindustriais ricos em glucose, frutose e sacarose. Nestes trabalhos, a presença do D-GalA não é vantajosa, pois as leveduras utilizadas nestes processos, se não forem modificadas geneticamente, não são capazes de metabolizar D-GalA, levando à inibição das enzimas durante o processo (ALVIRA et al., 2010; WIDMER; ZHOU; GROHMANN, 2010; PROTZKO et al., 2018;). Além disso, a hidrólise enzimática da pectina tem aplicação na indústria têxtil e de papel, para separação de fibras finas presentes no tecido vegetal, (JACOB et al., 2008) e na clarificação de sucos e vinhos (RODRIGUEZ-NOGALES et al., 2008; UMSZA-GUEZ et al., 2011; ONGARATTO; VIOTTO, 2015; AHMED; SOHAIL, 2020). Apesar dos vários estudos desenvolvidos sobre a hidrólise da pectina, poucos objetivam a produção do D-GalA como produto primário e de valor agregado, limitando-se aos sistemas de separação do produto, ou seja, na forma de remover o D-GalA do meio reacional.

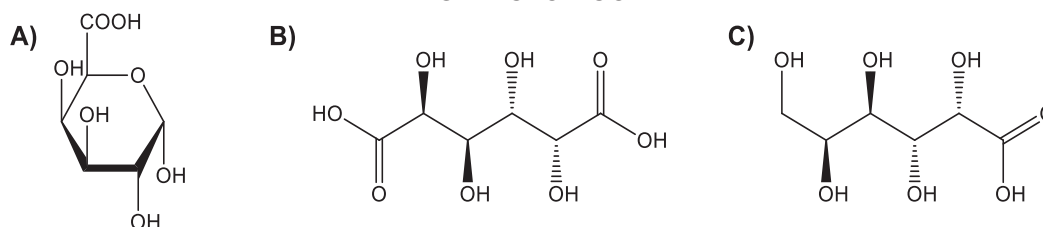
3.4 ÁCIDO D-GALACTURÔNICO

O ácido D-galacturônico (D-GalA) é o principal componente da estrutura de HG na pectina, sendo aproximadamente 70% da sua massa total (YAPO, 2011; MARTINS et al., 2020; VIDGREN et al., 2020). A hidrólise da pectina para produção de D-GalA é feita com um pool de enzimas chamado genericamente de “pectinases ou extrato pectinolítico” contendo metil esterases, poligalacturonases e liases (ALKORTA et al., 1998).

A aplicação de D-GalA é na indústria alimentícia, como agente acidificante, e na indústria química, como surfactante e agente tensoativo (RICHARD; HILDITCH, 2009; MOJZITA et al., 2010;). Outra aplicação potencial para o D-GalA é a sua utilização como substrato de fermentação para geração de etanol na presença de outros carboidratos. Contudo, a presença do D-GalA no meio reacional pode inibir o processo de fermentação dos demais carboidratos em solução. A elaboração de cepas modificadas de *Saccharomyces cerevisiae* pode tornar viável a fermentação concomitante do D-GalA na presença de outros carboidratos (PROTZKO et al., 2018; JEONG et al., 2020).

D-GalA também pode ser biotransformado por microrganismos geneticamente modificados, tornando-se precursor de substâncias com maior valor agregado (RICHARD; HILDITCH, 2009; MOJZITA et al., 2010). A expressão da D-galacturônico redutase de *Aspergillus niger* ou da uronato desidrogenase de *Agrobacterium tumefaciens* em *S. cerevisiae* leva à conversão de D-GalA a metabólitos mais reduzidos ou oxidados, como os ácidos L-galactônico e múcido (meso-galactárico), respectivamente (FIGURA 5) (MARTINS et al., 2020).

FIGURA 5: ESTRUTURAS DOS ÁCIDOS D-GALACTURÔNICO, MESO-GALACTÁRICO E GALACTÔNICO



LEGENDA: (A) Ácido D-galacturônico; (B) Ácido múcido e (C) Ácido L-galactônico

No início do século XX, o ácido múcido era utilizado em combinação com carbonato na preparação de massas. Essa combinação liberava dióxido de carbono lentamente, sendo considerado um agente para auto crescimento em massas de pães (WILLIAM, 1929). Atualmente, o ácido múcido é utilizado como aditivo alimentar, possuindo características semelhantes ao ácido L-tartárico, sendo responsável pelo sabor azedo em doces, estabilidade da clara de ovo e ingrediente ativo no fermento em pó. Na indústria de cosméticos, é utilizado como ingrediente em produtos para cuidado da pele, apresentando funções de proteção à poluição e ao envelhecimento (LEWKOWSKI, 2001).

O ácido múcido pode ser convertido em ácido adípico (LI et al., 2014), precursor do poli(hexametileno adipamida) (Nylon 6,6), ou no ácido 2,5-furandicarboxílico (em inglês, *furandicarboxylic acid*, FDCA) (VIDGREN et al., 2020), que apresenta um grande potencial para substituir o ácido tereftálico. Este último é usado na produção de poliésteres, como o tereftalato de polietileno (PET) e o tereftalato de polibutileno (PBT). O mercado mundial de PET é de aproximadamente \$ 25,5 bilhões, enquanto que o de PBT é de \$ 2,4 bilhões (BUSINESSWIRE, 2018; GRAND VIEW RESEARCH, 2019).

Além disso, o FDCA pode ser transformado através de reações químicas relativamente simples, gerando um número considerado de derivados. Quando reduzido seletivamente, pode-se produzir compostos parcialmente hidrogenados, como o 2,5-di(hidroximetil)furano, ou totalmente hidrogenados, como o 2,5-bis(hidroximetil)tetrahydrofurano. Esses dois tipos de materiais podem atuar como álcoois na produção de poliésteres. Deste modo, o FDCA e seus derivados podem levar à criação de uma nova família de polímeros a partir de fontes renováveis, derivados exclusivamente do bagaço de laranja (WERPY; PETERSEN, 2004).

O ácido L-galactônico, outro composto que pode ser obtido a partir de D-GalA, é um intermediário na via de redução do D-GalA em *Aspergillus niger*. Ele apresenta propriedades similares às do ácido D-glucônico, que tem um mercado bem estabelecido na indústria de cosméticos como aditivo, na indústria alimentícia como acidulante, na indústria de produtos de limpeza devido às propriedades como agente quelante, e na construção civil, como aditivo na formulação de concreto (RICHARD; HILDITCH, 2009). Além disso, o ácido L-galactônico é também um precursor da síntese do ácido L-ascórbico (vitamina C) (DI MATTEO et al., 2010; KUIVANEN et al., 2012). A L-galactono-1,4-lactona, a forma do ácido L-galactônico em pH ácido, pode ser oxidada em L-ascórbico quimicamente ou através de processo fermentativo (ROLAND et al., 1986; CSIBA et al., 1993).

Uma outra aplicação do ácido L-galactônico é a produção de ácido L-treo-3-deoxi-hexulosônico/2-ceto-3-desoxi-L-galactônico (L-2KDGal), através da expressão da L-galactônico hidratase em *S. cerevisiae* (MATSUBARA; KATAOKA; KISHIDA, 2019). Como os carboidratos ceto-deoxi ácidos têm sido considerados como potenciais compostos líderes para o desenvolvimento de antibióticos, agentes virais e medicamentos, o L-2KDGal pode se tornar um novo composto líder para reagentes

bioativos (NISHIYAMA; INOUE; OJIMA, 2017). Infelizmente, o ácido L-galactônico é atualmente caro e não amplamente utilizado.

Considerando as aplicações acima, D-GalA se apresenta como um composto intermediário para a produção de outros compostos de alto valor agregado. Assim sendo, é fundamental encontrar uma rota de obtenção de baixo custo e ecologicamente correta, como um sistema de biorrefinarias utilizando matérias-primas ricas em pectina, como o bagaço de laranja.

3.5 REOLOGIA DE PECTINAS

A reologia é definida como a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais quando estes são submetidos a uma determinada tensão (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2006). Deste modo, os materiais podem ser divididos em sólidos e líquidos. Em geral, os sólidos ideais apresentam deformação elástica, na qual o material volta a forma original após a remoção da tensão inicialmente aplicada. Por outro lado, os líquidos considerados fluidos ideais apresentam deformação irreversível, quando submetidos a uma tensão, sem retornar ao estado original, pois a energia aplicada sobre a solução é dissipada em forma de calor, sem ser recuperada após a retirada da tensão (SCHRAMM, 2006).

Além disso, alguns materiais, como a pectina, são considerados intermediários e denominados como viscoelásticos. Estes materiais, por serem intermediários (ou um estágio de transição), podem apresentar comportamentos reológicos mais próximos ao elástico, como os sólidos, ou mais viscoso, como os líquidos. Esses comportamentos são diretamente relacionados com a tensão, frequência e temperatura aplicados ao sistema, além da concentração e do tipo de material em solução (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989; SCHRAMM, 2006).

A pectina é principalmente utilizada como gelificante e espessante. Dessa forma, este polissacarídeo modifica o meio físico de onde se encontra, formando soluções viscosas ou rede intermoleculares de géis. As principais fontes de pectina para estas finalidades são as de origem cítrica e de maçã (CHAN et al., 2017).

Vários fatores podem influenciar no mecanismo de gelificação da pectina como o seu grau de meti-esterificação, a concentração, o pH e a temperatura do meio e o método de extração. Assim, há trabalhos que analisam as características gelificante e espessante da pectina em diferentes concentrações e temperaturas

(BALDINO et al., 2018), métodos de extração e modificação estrutural da pectina; (KAYA et al., 2014; VENZON et al., 2015; FRACASSO et al., 2018), valores de pH (YEOH; SHI; LANGRISH, 2008; TIWARI; SAHA; YADAV, 2017; YULIARTI; HOON; CHONG, 2017), e variação do grau de metil-esterificação (MORRIS; FOSTER; HARDING, 2000; ROSENBOHM et al., 2003; CHAN et al., 2017).

A análise do comportamento reológico de sistemas pécticos desempenha um importante papel para a qualidade do produto final, permitindo determinar-se capacidade de formação de géis, além de auxiliar na elaboração e avaliação de equipamentos de processos, como bombas, tubulações, trocadores de calor, evaporadores, esterilizadores e agitadores (AHMED; RAMASWAMY; NGADI, 2005). Além disso, as propriedades reológicas também desempenham um papel fundamental na análise das condições de fluxo nos processos alimentícios, tais como pasteurização, evaporação e secagem (FANI, 2017).

Devido à importância dos parâmetros reológicos em processos industriais, pectinas oriundas de diferentes variedades de frutas são analisadas reologicamente (VRIESMANN; TEÓFILO; PETKOWICZ, 2012; RAO, 2014; YULIARTI; HOON; CHONG, 2017; BARBIERI et al., 2019). Além disso, a reologia também é utilizada para avaliar o impacto de tratamento enzimáticos nos processos de clarificações de sucos (UMSZA-GUEZ et al., 2011; ONGARATTO; VIOTTO, 2015; AHMED; SOHAIL, 2020;).

Para pectina de laranja, a reologia geralmente é empregada para análise de comportamento de fluxo em sistema estacionário e para avaliar o mecanismo de gelificação em sistema oscilatório dinâmico (SOUSA et al., 2015; VENZON et al., 2015; CHAN et al., 2017; BALDINO et al., 2018; FRACASSO et al., 2018).

A atividade de pectinases pode ser mensurada através da queda da viscosidade, utilizando a análise viscosimétrica. Pectinas de cítricos foram diluídas em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 na concentração de 0,5% (m/v) e analisadas por viscosímetro capilar com termostato acoplado. Após a adição da pectina liase (Bio-Prep 3000 L, Novo Nordisk, Denmark), a atividade foi calculada com base nos diferentes tempos de escoamento, de reação e concentração de enzima (GUSAKOV et al., 2002). Utilizando o viscosímetro capilar, pode-se também calcular a atividade das pectinases através da redução da viscosidade do meio reacional. Neste caso, utilizou-se pectina na concentração de 1% (m/v) em tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,0 com adição de 0,5 mL da solução enzimática (poligalacturonases produzidas por

Corticium rolfsii). Arbitrariamente, uma unidade viscosimétrica foi definida como a quantidade de enzima capaz de reduzir a viscosidade inicial em 50% em 1 minuto de reação (TAGAWA; KAJI, 1988).

O viscosímetro rotacional também é outra ferramenta que já foi utilizada para determinação de atividade de pectinases através da viscosidade. Para a obtenção da atividade e das variáveis cinéticas da pectinase, foram utilizadas diferentes concentrações de pectina (0,5 até 4% (m/v)) e uma concentração fixa de enzima (0,1% (v/v)), diluídas em tampão citrato pH 3,5, em diferentes temperaturas (15 °C até 45 °C). A atividade de pectinase foi definida como a concentração de enzimas capaz de hidrolisar 0,0025% de pectina (m/v) por segundo, entre 0% e 0,5% de concentração enzimática a pH 3,5 e 35 °C (MUTLU et al., 1999).

Contudo, para determinação de atividade de pectinases por viscosímetro rotacional, não existe um consenso de quais seriam as melhores condições de ensaio e de cálculo de atividade, como a concentração, quantidade de enzima para reduzir a viscosidade, dificultando a comparação dos resultados (GUSAKOV et al., 2002). Entretanto, não existem trabalhos publicados de estudo da atividade de enzimas pectinolíticas por reômetro rotacional. Deste modo, no presente estudo, foi desenvolvida uma patente (APÊNDICE), que busca quantificar a atividade enzimática de pectinases em dispersões de pectina através da queda da viscosidade complexa determinada por reômetro rotacional.

4 ARTIGO

Este capítulo é uma reprodução do manuscrito:

“Pectin extracted from orange bagasse (*Citrus sinensis* L. Osbeck):
Chemical and Rheological Characterization and Enzymatic Hydrolysis”

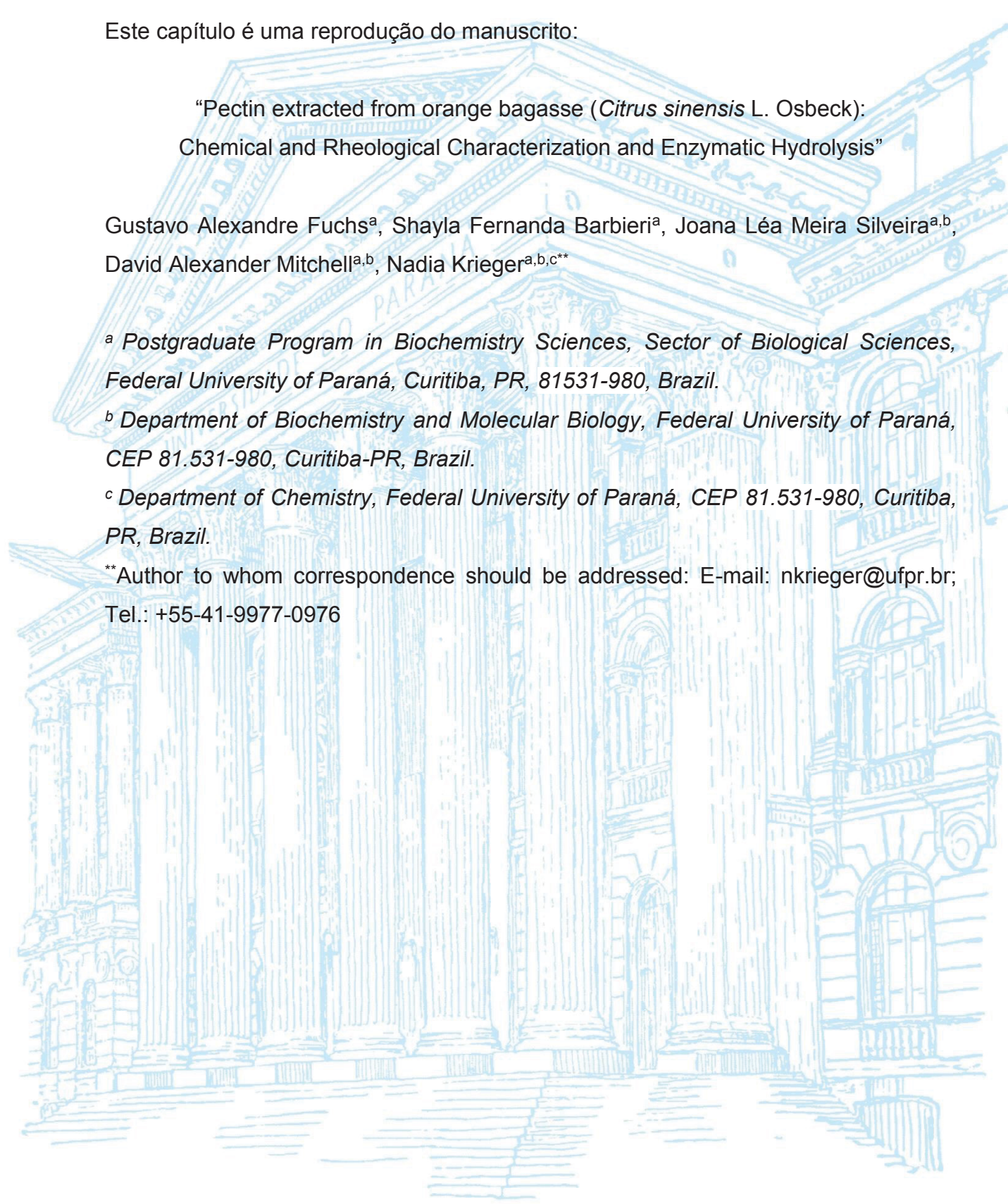
Gustavo Alexandre Fuchs^a, Shayla Fernanda Barbieri^a, Joana Léa Meira Silveira^{a,b},
David Alexander Mitchell^{a,b}, Nadia Krieger^{a,b,c**}

^a *Postgraduate Program in Biochemistry Sciences, Sector of Biological Sciences, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81531-980, Brazil.*

^b *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, CEP 81.531-980, Curitiba-PR, Brazil.*

^c *Department of Chemistry, Federal University of Paraná, CEP 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

** Author to whom correspondence should be addressed: E-mail: nkrieger@ufpr.br;
Tel.: +55-41-9977-0976



ABSTRACT

Brazil is the main orange producer in the world and consequently is also the country that processes this fruit the most. The orange is mainly destined to the production of orange juice, generating about 5.6 million tons per year of moist orange bagasse, composed of peel, pulp and seeds. This bagasse is rich in polysaccharides, mainly pectin. Pectin is composed of several monosaccharides, but D-galacturonic acid (D-GalA) is the most abundant, composing about 70% of monomers in orange pectin. D-GalA can be used as an acidifier and surfactant in the food and chemical industries, respectively. In addition, D-GalA can also be converted to mucic and L-galactonic acids, important precursors of bioplastics and cosmetic additives. D-GalA can be obtained by hydrolysis of pectin either by chemical or enzymatic processes. Chemical hydrolysis uses acids at high temperatures (80 to 100°C) and low pH values (1.0 to 3.0) that can cause degradation of the products into lactones. Enzymatic hydrolysis does not present this problem since lower temperatures (20 to 40°C) and higher pH values (4.0 to 6.0) are used. However, the concentration of pectin in the dispersion can interfere with the enzymatic hydrolysis, decreasing enzyme activity due to mass transfer problems. Thus, the purpose of this study was to perform a chemical and rheological characterization of pectin extracted from orange bagasse and to follow the complex viscosity drop during enzymatic hydrolysis using a rotational rheometer. The pectin from wet orange bagasse (WOP-DI) and Sigma citric pectin (CP) fractions presented a broad peak profile in HPSEC-MALLS-RI.—The monosaccharide composition showed that the WOP-DI fraction presented 69% (w/w) D-GalA, a value closer to the CP used, with about 79% (w/w) D-GalA. The degree of methyl esterification of the samples was 74% and 48%, respectively. During the enzymatic hydrolysis assay, the WOP-DI fraction presented a reduction higher than that found in the CP fraction. HPLC tests confirmed that D-GalA was released in the samples during enzymatic hydrolysis for WOP-DI and CP. The enzymatic activity was calculated based on the reduction of complex viscosity, reaction time and volume of enzyme used. This study is the first to propose the use of rheology to follow pectinase action based on the complex viscosity drop of pectin dispersions from orange bagasse in different concentrations.

Keyword: Orange bagasse, pectin, enzymatic hydrolysis, D-galacturonic acid, rheology, complex viscosity, rotational rheometer

1 INTRODUCTION

Brazil is the largest orange juice producer in the world with about 60% of the volume produced globally. It is estimated that in the harvest between May 2019 to April 2020, around 15.7 million tons of orange were produced (FUNDECITRUS, 2020) with 71% this total destined to processing the industrialized juice (BARROS; BERK, 2018).

Approximately 50% of orange used for juice processing ends up as wet bagasse (peel, pulp and seeds) (CIRIMINNA et al., 2016). In the country, this industrial waste is generally intended for production of animal feed (POURBAFRANI et al., 2010) and obtention of pectin, mainly from the peels, for the food industry (RICHARD; HILDITCH, 2009; MOJZITA et al., 2010; KUTE et al., 2019). Orange bagasse (peel and pulp) can produce around 11 to 25% yield pectin (MARÍN et al., 2007; KAYA et al., 2014; VENZON et al., 2015). However, despite these relevant applications, the majority of the orange bagasse is still disposed of in landfills, due to the excessive amount of this waste produced by the industry (BATTISON, 2011).

Pectin, a complex polysaccharide present in the primary cell wall of plants, one of the high value-added products from industrial orange waste, are comprised of three main classes of polymers: homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan I (RG-I) and rhamnogalacturonan II (RG-II) (CARPITA; MCCANN, 2000; CAFFALL; MOHNEN, 2009). Regarding their monosaccharide composition, these structures are mainly constituted of galacturonic acid (D-GalA), galactose (Gal), arabinose (Ara), and rhamnose (Rha). These polysaccharides are soluble dietary fibers widely used in the food industry as emulsifier, texturizer, thickener, and gelling agent (STEFFE, 1992; CHAN et al., 2017). In addition, they can be applied in biomedical, pharmaceutical, and cosmetics fields (MUNARIN; TANZI; PETRINI, 2012; MUNARIN et al., 2015; CHAN et al., 2017; NOREEN et al., 2017). Additionally, products with high added value such as the monosaccharides arabinose, rhamnose and mainly D-galacturonic acid (D-GalA) have been produced from pectin (RICHARD; HILDITCH, 2009; POURBAFRANI et al., 2010; CIRIMINNA et al., 2016; STOCK et al., 2017).

D-GalA, one of these high value-added products, represents about 70% of the monomers in orange pectin structure (YAPO, 2011). The acid monosaccharide D-GalA is being used as acidifier, surfactant, and converted into other value-added compounds such as mucic acid and L-galactonic acid (MARTINS et al., 2020). L-galactonic acid can be converted into ascorbic acid (vitamin C) or in l-threo-3-deoxy-hexulosonic

acid/2-keto-3-deoxy-l-galactonic acid (KUIVANEN et al., 2012; MATSUBARA; KATAOKA; KISHIDA, 2019). The mucic acid is an important intermediate in the synthesis of bio-plastics due to its conversion into furan-2,5-dicarboxylic acid (FDCA) (RICHARD; HILDITCH, 2009; VIDGREN et al., 2020). Therefore, D-GalA presents itself as an important material for industrial applications. However, it is essential to find a low-cost and environmentally friendly route, using raw materials rich in pectin, such as orange bagasse.

Pectin can be hydrolysed either by chemical or enzymatic processes. In the chemical hydrolysis, hydrochloric and sulphuric acids are used, at high temperatures (80 to 100 °C) and low pH values (1.0 to 3.0) (RUANO et al., 2019). However, under these conditions, D-GalA can be degraded into lactones and furfurans, losing its economic value (BLAKE, J.D.; RICHARDS, 1968; FAZIO et al., 1982). The enzymatic hydrolysis using pectinases presents advantages in relation to the acid hydrolysis, given that the reaction conditions are milder, usually 20 to 40°C and pH 4.0 to 6.0. Under these conditions, degradation of D-GalA is avoided (STOCK et al., 2017).

The kinetics of enzymatic hydrolysis of pectin is followed usually by chemical analytical methods, such as colorimetric (MILLER, 1959) and chromatographic methods. However, these methods are often expensive, may suffer from interference from other compounds and may not quantify the activity simultaneously with the reaction. Alternatively, capillary viscosimeters have been used to follow enzymatic hydrolysis, but are restrict to low concentrations pectin samples (0.5% at 4% (w/v)) (GUSAKOV et al., 2002; JAKÓB; BRYJAK; POLAKOVIČ, 2009; PATIDAR et al., 2018). Therefore new strategies for monitoring the process of enzymatic hydrolysis in pectins are still needed.

Thus, this study has three main objectives: (1) to extract pectin with citric acid from orange bagasse; (2) to characterize the extracted pectin; and (3) to analyze the rheological behavior of pectin dispersions during enzymatic hydrolysis using a rotational rheometer.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 REAGENTS AND MATERIALS

Trifluoroacetic acid (TFA), glucose (purity >99 %), glucuronic acid (>99 %), xylose (>99 %), rhamnose (>99 %), mannose (>99 %), arabinose (>99 %), D-GalA (>97 %), citric pectin - CP (>74 %), citric acid (>99.5%), NaBH₄, acetic anhydride (>99%), NaNO₂ (>99%), pyridine (>99%), D₂O, m-hydroxybiphenyl (>90%) and CHCl₃ were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Ethanol (99.5 %) and acetic acid (99.7 %) were obtained from Biotec (Cotia, Brazil), while sodium acetate, sulfuric acid, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), sodium tetraborate decahydrate, NaOH and methanol (>99,8%) were obtained from VETEC (Duque de Caxias, Brazil). NaN₃ (>99%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The commercial pectinase extract Pectinex Ultra Clear (PUC), was provided by Novozymes (Araucária, Paraná, Brazil). This extract presented an activity of 10 768 U mL⁻¹, as determined by the DNS (2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoic acid) method (MILLER, 1959) using Sigma citric pectin as substrate.

The wet orange bagasse was supplied by the orange processing industry Super Suco - Indústria de Sucos Naturais (Fazenda Rio Grande, Brazil). This material was collected, immediately frozen and stored in plastic bags at -5 °C until use. Prior extraction, the orange bagasse was manually cut to produce particles between 0.5 cm and 1 cm in size.

2.2 MOISTURE DETERMINATION

The moisture of the wet orange bagasse was determined on a moisture analyzer with infrared-coupled detector B-TOP RAY W-13.2 VA (Bel Engineering, Italy). The equipment was set at an initial temperature of 105 °C, ending the analysis when the mass variation was less than 0.2% in a time interval greater than 15 s. The tests were performed with 3 g of samples, in duplicate.

2.3 EXTRACTION OF PECTIN FROM ORANGE BAGASSE

The acid extraction of pectin was carried out according to Figure 1. Wet orange bagasse (200 g) was treated with 99% ethanol (1:9) under reflux for 30 min at 80 °C, producing the ethanolic extract and alcohol insoluble residue (AIR). Pectin was extracted from the AIR with 5% (w/v) citric acid (1:12 v/v), pH 2.0 for 2 h at 80 °C. The acid extract was centrifuged ($12.000 \times g$; 20 min at 10 °C), and precipitated with 99% ethanol (3:1, v/v). The product obtained was denominated WOP (pectin from wet orange bagasse). WOP fraction was dialyzed with ultrapure water for 72 h (6-8 kDa), precipitated with 99% ethanol (3:1, v/v) and then lyophilized at 0.1 mbar, -45 °C for 24 h (Jouan LP3 lyophilizer Allerød- Frederiksborg, Denmark). The fraction obtained was named WOP-DI (dialyzed pectin from wet orange bagasse).

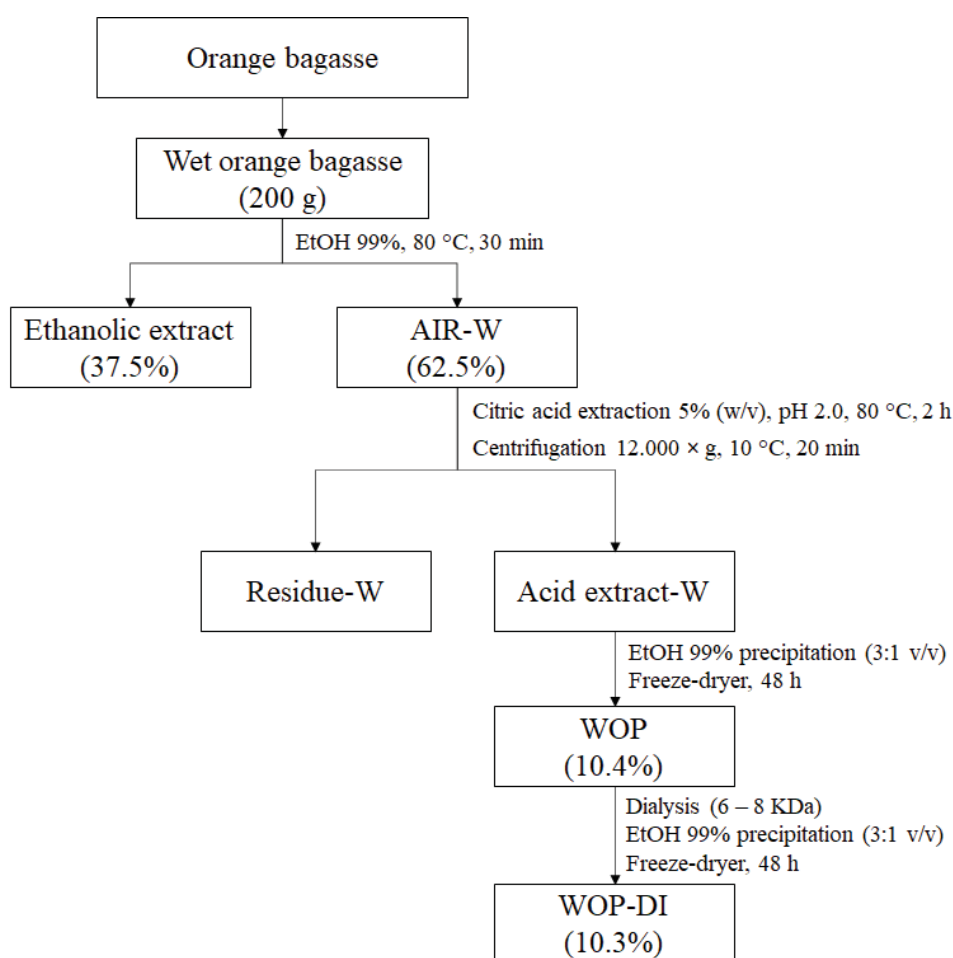


Figure 1 Acid-extracted polysaccharides from wet orange bagasse.

AIR-W = alcohol insoluble residues from wet bagasse; Residue-W = residue from wet bagasse; Acid extract-W = acid extract obtained from wet bagasse; WOP = pectin from wet orange bagasse; WOP-DI = dialyzed pectin from wet orange bagasse

2.4 QUANTIFICATION AND IDENTIFICATION OF URONIC ACIDS

To measure the uronic acid content of pectin fractions, the colorimetric *m*-hydroxybiphenyl method was used with D-GalA solution as standard (0-250 mg L⁻¹) (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973). Initially, 0.5 g NaOH was dissolved in approximately 80 mL distilled water. Then 0.15 g *m*-hydroxybiphenyl was added and placed under magnetic stirrer until dissolved. Next, 1.2 mL of 12.5 mmol L⁻¹ sodium tetraborate decahydrate in sulfuric acid was added to tubes containing of 200 μ L samples, then cooled in an ice-water bath. Next, the tubes were shaken in a vortex mixer, heated in a boiling water bath (5 min), and cooled in an ice-water bath. After that, 20 μ L of *m*-hydroxybiphenyl solution was added to the tubes, followed by shaking for 5 min. The absorbance of the samples was read at 520 nm. For standard, 0.5% NaOH was added in place of the sample.

The uronic acid type identification was determined by anion exchange chromatography with pulse amperometric detection (HPAEC-PAD). The samples WOP-DI and Sigma citric pectin (CP) were hydrolyzed with 2 mol L⁻¹ TFA (8 h, 100 °C), then dried and washed three times with methanol, until the acid was totally removed. Samples (1 mg mL⁻¹) were filtered with a 0.22 μ m membrane and then injected into a Thermo Scientific Dionex ICS-5000/DC/SP/ASDV(USA) with CarboPac PA20 column (3 \times 150 mm). The data were collected and analyzed using the Chromeleon TM 7.0 Chromatography Data System software.

2.5 DETERMINATION OF NEUTRAL MONOSACCHARIDES

Neutral monosaccharides were determined by total acid hydrolysis with 2 mol L⁻¹ TFA (8 h at 100 °C), followed by alditol acetates conversion by NaBH₄ reduction (10 min at 100 °C) and acetic anhydride (Ac₂O)-pyridine (1:1 v/v, 1 mL) acetylation, at 100 °C for 30 min. The resulting alditol acetates were extracted with CHCl₃, and the samples were analyzed in a Thermo Scientific Trace GC Ultra gas chromatograph, with a mixture of He and N₂ with compressed air (1 mL min⁻¹) as a carrier, detector and flame at 250 °C, fueled by H₂ and synthetic air (21% O₂ and 79% N₂) using a DB-225-MS column (0.25 mm internal diameter \times 30 m \times film thickness 0.25 μ m), programmed from 100 °C to 230 °C at a heating rate of 60 °C min⁻¹. The alditol

acetates were identified by their profiles, and the retention times were compared with standards.

The proportions of homogalacturonan (HG) and rhamnogalacturonan type I (RG-I) were calculated according to M'sakni et al. (2006):

$$\text{HG} = \text{D-GalA} - \text{Rha} \quad (1)$$

$$\text{RGI} = [\text{D-GalA} (\%) - \text{HG} (\%)] + \text{Rha} + \text{Ara} + \text{Gal} \quad (2)$$

Where:

HG = Homogalacturonan; RG-I = Rhamnogalacturonan type I; Rha = Ramnose;
Ara = Arabinose; Gal = Galactose; D-GalA = D-galacturonic acid

2.6 HIGH PERFORMANCE SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY– HPSEC

The elution profiles of the soluble pectin fractions (1 mg mL^{-1}) were analyzed by high performance size exclusion chromatography, coupled with multi-angle laser light scattering (DSP-F, Wyatt Technology, USA) and refractive index detectors (Waters 2410, USA) (HPSEC-MALLS-RI). The injected volume was $500 \mu\text{L}$. The chromatography was carried out on a Waters system containing four columns packed with Ultrahydrogel® 2000, 500, 250, and 120 connected in series, with exclusion limits of 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , and $5 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, respectively. The flow rate was 0.6 mL min^{-1} with $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaNO}_2$ in the mobile phase and $0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ NaN}_3$ as a preservative, at 25°C . The data were collected and processed using Wyatt Technology ASTRA software, version 4.70.07. The elution profile of CP was used as a standard.

2.7 ANALYSIS OF DEGREE OF METHYL-ESTERIFICATION BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY

The values of degree of methyl-esterification (DM) of the samples WOP-DI and CP were determined by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy integrating the hydrogen areas corresponding to H-1 and H-5 of unesterified $\alpha\text{-D-GalAp}$ units and H-1 and H-5 of esterified $\alpha\text{-D-GalAp}$ units, $\text{DM} = (\text{J}_A - \text{J}_B) / (\text{J}_A + \text{J}_B)$, as described by Grasdalen, Bakøy and Larsen (1988).

The samples were deuterium-exchanged three times by freeze drying with a D₂O solution and finally dissolved in D₂O and transferred to a 5 mm NMR tube. Mono-dimensional (¹H-NMR) spectra were acquired at 70 °C with a Bruker Avance III 400 MHz equipped with a BBI 5mm probe (400 MHz) (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). The chemical shifts of the polysaccharide were expressed as δ (ppm) and the data was collected and processed using the Software TOPSPIN, version 3.1 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

2.8 DETERMINATION OF PECTINOLYTIC ACTIVITY

To evaluate the pectinolytic activity, the release of reducing carbohydrates from the hydrolysis of Sigma citric pectin (CP) was determined with the DNS colorimetric method (MILLER, 1959). A jacketed glass reactor with a maximum capacity of 50 mL was used, connected to a water bath at 32 °C, with circulation through silicone tubes. In the glass reactor, 20 mL of 1% (w/v) CP solution was added in 0.2 mol L⁻¹ pH 4.5 sodium acetate buffer. After stabilization at 30 °C, 1 mL of diluted (1:1000) enzymatic extract was added to the reactor. Aliquots of 0.5 mL were removed each 30 s, following the reaction for 5 min. Each aliquot was added in a 10 mL test tube, in an ice bath. The tubes received 0.5 mL of DNS and were then placed in a boiling bath for 5 min. After that, 4 mL of chilled distilled water was added. Finally, the samples were read in a spectrophotometer at 540 nm.

2.9 RHEOLOGICAL ANALYZES

Rheological analyzes of pectin dispersions of WOP-DI and CP were conducted on a HAAKE Mars II rheometer (Thermo Electron GmbH, Germany) coupled with a thermostatic bath (K15, HAAKE), water-circulator (DC5B3, HAAKE) and a Peltier temperature controller (TC 81, HAAKE). The sensor used was of the cone-plate type with a diameter of 60.0 mm and a cone angle of 2.0° (C60 2.0°/TiL) with an annular gap size of 1.0 mm. The data was collected and processed using the RheoWin Data Manager software (Version 4.86.0002, HAAKE)

2.9.1 Steady-state shear measurements

The steady-state shear experiments for dispersions of the extracted pectin samples WOP-DI and CP were carried out in the shear rate range of 0.01 - 100 s⁻¹ for 600 s in CR mode (BARBIERI et al., 2019). The rheological behavior of the pectin dispersions described by the flow curves were fitted to the Herschel-Bulkley and Ostwald-de-Waele models. The Herschel-Bulkley and Ostwald-de-Waele model are represented by the equations $\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$ and $\tau = K\dot{\gamma}^n$ respectively, where τ is shear stress (Pa), τ_0 is yield limit stress (Pa), $\dot{\gamma}$ is shear rate (s⁻¹), K is the consistency coefficient (Pa.s), and n is the flow behavior index (dimensionless) that signifies the extent of deviation from Newtonian behavior (RAO, 2014).

2.9.2 Dynamic shear measurements

Oscillatory stress sweeps between 0.001 and 100 Pa were performed for pectin dispersions from the extracted pectin sample WOP-DI and CP at a frequency of 1.0 Hz and at 30 °C to determine their linear viscoelastic range. Frequency sweep measurements were carried out at 0.1 Pa, a shear stress value within the linear viscoelastic range; the frequency sweeps were from 0.02 to 100 Hz, at 30 °C.

2.9.3 Rheological measurements during enzymatic hydrolysis

The rheological parameters were performed to follow the kinetic of the enzymatic hydrolysis of the pectin samples. The experiment was performed according to a modified methodology (BEUX, 2017). The experiments were done with pectin concentrations of 3%, 5%, 7% and 10% (w/v) of the extracted pectin sample WOP-DI and CP. The samples were solubilized and analyzed in acetate buffer pH 4.5, 0.2 mol L⁻¹ at 30 °C, optimal conditions for pectinase activity. Then, 150.0 μ L of the enzymatic extract PUC previously diluted in acetate buffer pH 4.5 0.2 mol L⁻¹, was added in order to obtain the ratio 1:100 and 1:1000 (v/v) in 3%, 5%, 7% and 10% (w/v) pectin at 3.0 mL of pectin dispersion. Then the samples were mixed for 5 s and immediately transferred to the rheometer plate. For each sample, time scans were performed with 8 measurements of the elastic module (G'), viscous module (G'') and complex viscosity (η^*) for 10 min at a fixed frequency of 1.0 Hz at 30 °C. The experiments were performed

in duplicate with mean and standard deviation evaluated by the statistical software Graphpad Prism 5.

2.10 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY – HPLC

HPLC analysis of pectin samples, before and after enzymatic hydrolysis, were conducted on a Agilent 1260 Infinity Bio-Inert Quaternary LC System (Santa Clara, USA) fitted with a Hi-Plex H Guard Cartridges 5x3 mm pre-column linked to an Hi-Plex H AGPL1170-6830 organic acid analysis column (300 x 7.7 mm; Agilent Technologies; Santa Clara, EUA), at 50 °C. The eluent was 1 mmol L⁻¹ H₂SO₄ at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ at 40 bar. Previously to injection, pectin samples (3 mL) were boiled for 10 min, cooled and filtered through a 0.45 µm PVDF (Hydrophobic Polyvinylidene Fluoride, Durapore) membrane. Different concentrations (0 - 2 mg mL⁻¹) of D-GalA from Sigma as standard for calibration of the curve. The GalA was identified by its profiles, and retention times were compared with standards.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 EXTRACTION, ELUTION PROFILE AND CHEMICAL COMPOSITION OF THE PECTINS OBTAINED FROM ORANGE BAGASSE

The pectin was extracted from wet orange bagasse by citric acid 5% (w/v), which presented 83.5% moisture (dry basis). The calculation of pectin yield was based on the dry mass of the orange bagasse. Thus, after the acid extraction (Fig. 1), the fraction WOP showed a 10.4% yield, and it was directed to a process of dialysis for the removal of low-content compounds giving rise to the fraction WOP-DI.

WOP and WOP-DI fractions were analyzed by high performance size exclusion chromatography (HPSEC-MALLS-RI) and their elution profiles were compared to a commercial sample Sigma citric pectin (CP) (Fig. 2).

The refractive index detector (RI) showed that WOP fraction presented a heterogeneous elution profile with a main peak eluting at retention time between 35 and 55 min and a high concentration of low molar mass compounds observed in approximately 60 min (Fig. 2).

However, after the dialysis process, as demonstrated by WOP-DI fraction, the absence of this low molar mass peak at 60 min can be observed, resulting a broad peak at retention time between 35 and 65 min. This result demonstrate that dialysis step was effective in removing them and avoiding their interference in subsequent tests.

CP fraction presented by RI detection a broad peak at retention time between 35 and 60 min resembling to WOP-DI elution profile.

The light scattering at 90° (LS) detector showed that all fractions presented similar profiles chromatogram showing one peak around 40 min corresponding to the high molar mass compounds (Fig. 2).

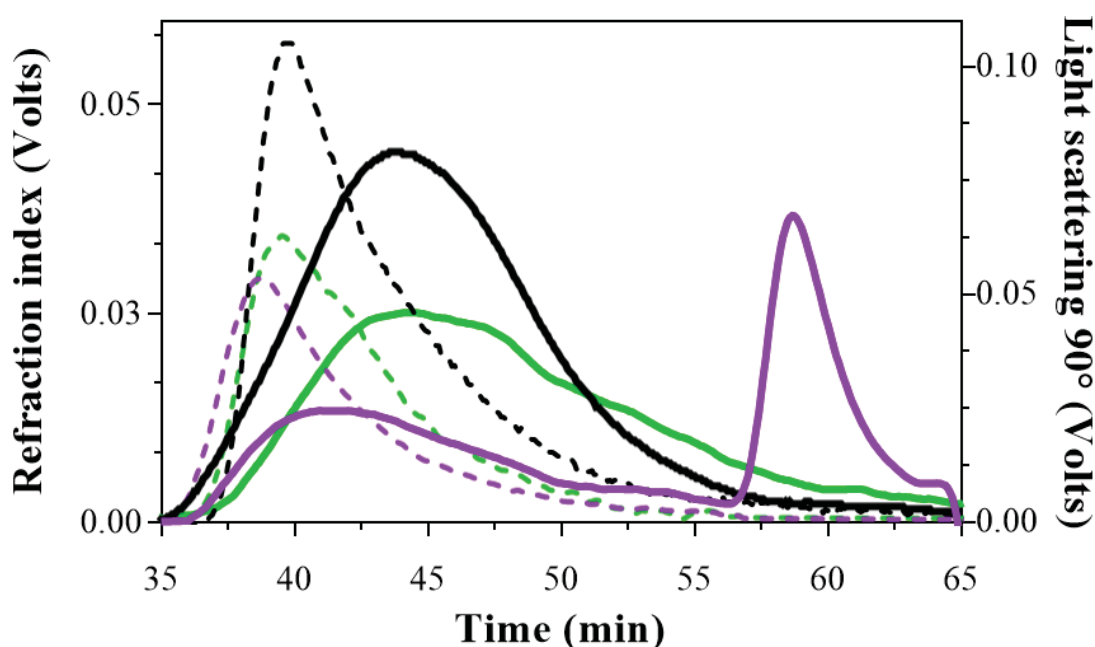


Figure 2 HPSEC elution profile. Comparison between refraction index (R.I., continuous line) and light scattering 90° (L.S., dotted line) sample profiles between pectin from wet orange bagasse (WOP, purple), dialyzed pectin from wet orange bagasse (WOP-DI, green) and Sigma citric pectin (CP, black)

The determination of monosaccharide composition (Table 1) revealed that pectin samples differ, principally in the amounts of D-galacturonic acid (D-GalA), arabinose (Ara) and galactose (Gal). WOP presented lower amounts of D-GalA (45.8%), and higher amounts of Ara (31.4%) and Gal (15.8%), compared to WOP-DI fraction that presented higher amounts of D-GalA, about 68.8% and lower of Ara (18.1%) and Gal (9.3). The dialysis process was efficient in removing lower molar mass fraction, as demonstrated by RI profile of HPSEC chromatograms, that can probably justify these differences in the monosaccharide composition. CP presented 79.3% of D-GalA as expected in accordance with the manufacturer's specifications.

Table 1

Monosaccharide composition of pectin from wet orange bagasse (WOP), dialyzed pectin from wet orange bagasse (WOP-DI), and Sigma citric pectin (CP).

Fraction	Monosaccharide composition (%) ^a								HG	RG-I ^c
	D-GalA ^b	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc		
WOP	45.8	1.2	0.3	31.4	0.6	0.5	15.8	4.4	44.6	49.6
WOP-DI	68.8	1.2	0.1	18.1	0.4	0.5	9.3	1.6	67.6	29.8
CP	79.3	2.3	-	2.1	0.3	0.1	14.4	1.5	77.0	21.1

D-GalA = D-galacturonic acid; Rha = Rhamnose; Fuc = Fucose; Ara = Arabinose; Xyl = Xylose; Man = Manose; Gal = Galactose; Glc = Glucose; HG = Homogalacturonan; RG-I = Rhamnogalacturonan type I;

^a % of peak area of neutral monosaccharide composition relative to the total peak area, determined by GLC.

^b Uronic acids, determined using the m-hydroxybiphenyl method (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973), and identified by HPAEC-PAD.

^c HG= GalA – Rha and RG-I= [GalA (%) – HG (%)] + Rha+Ara+Gal (M'sakni et al., 2006).

From the monosaccharide composition, it was possible to estimate the molar percentage corresponding to HG and RG-I domains of the pectin using the equations proposed by M'sakni et al. (2006). According to these calculations, HG domain represents 67.6% and the RG-I domain 29.8% to the WOP-DI fraction, while the CP fraction presented 77.0% HG and 21.1% of RG-I (Table 1). These values are in agreement with the studies found in the literature that show that the citrus pectin presents a higher proportion of HG (53.3–61.4%) and lower proportion of RG-I (14.0–43.9%) (KRAVTCHEENKO; VORAGEN; PILNIK, 1992; LIN; LOPEZ-SANCHEZ; GIDLEY, 2016; TORKOVA et al., 2018). These proportions vary according to the extraction conditions. The commercial extraction of pectins typically relies on acid hydrolysis with strong mineral acids (HCl, HNO₃, or H₂SO₄, pH 2.0 at 3.0), at different temperatures (50 at 100 °C), where branched regions are reduced in these process (CIRIMINNA et al., 2015; DRANCA; OROIAN, 2018). In addition, these samples presented a smaller region of RG-I which is important since the increase in RG-1 in the samples can give a negative effect on the activity of pectinases, since they preferably act on linear chains of polygalacturonic acid (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

As WOP-DI and CP present the high proportion of HG (67.6% and 77%, respectively) showed by the monosaccharide composition and the homogeneous profile of both obtained by HPSEC-RI, both samples were selected to continue the chemical and rheological analysis.

3.2 DEGREE OF METHYL-ESTERIFICATION – DM

The degree of methyl-esterification of WOP-DI and CP was determined by $^1\text{H-NMR}$ as described by Grasdalen, Bakøy and Larsen (1988), where integration of peaks from H-1 of $\rightarrow 4$)- α -D-GalAp-(1 \rightarrow units (5.10 ppm), H-1 and H-5 of $\rightarrow 4$)- α -D-6MeGalAp-(1 \rightarrow units (4.96 and 5.05 ppm, respectively) corresponding to region A, and H-5 of $\rightarrow 4$)- α -D-GalAp-(1 \rightarrow units (4.84 ppm) corresponding to region B (Fig. 3).

WOP-DI had a DM of 74%, corresponding to a high-methoxyl pectin (HM), whereas CP had a DM of 48%, corresponding to a low-methoxyl pectin (LM). This result for CP is not in agreement with those found by Müller-Maatsch et al. (2014), who reported a degree of methyl esterification of 64%, also using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. However according to the the manufacturer's specifications, CP is commercialized as LM pectin.

A high degree of methyl esterification (HM) can cause inhibition of pectinases, since it increases the viscosity of the reaction medium hindering the diffusion of the enzyme (MINJARES-CARRANCO et al., 1997; STOCK, 2013). In addition, methylesterification can also inhibit endopolygalacturonase action. Thus, WOP-DI and CP were investigated regarding their rheological behavior when subjected to enzymatic hydrolysis by pectinases and this process was monitored through the analysis of the complex viscosity in rotational rheometer.

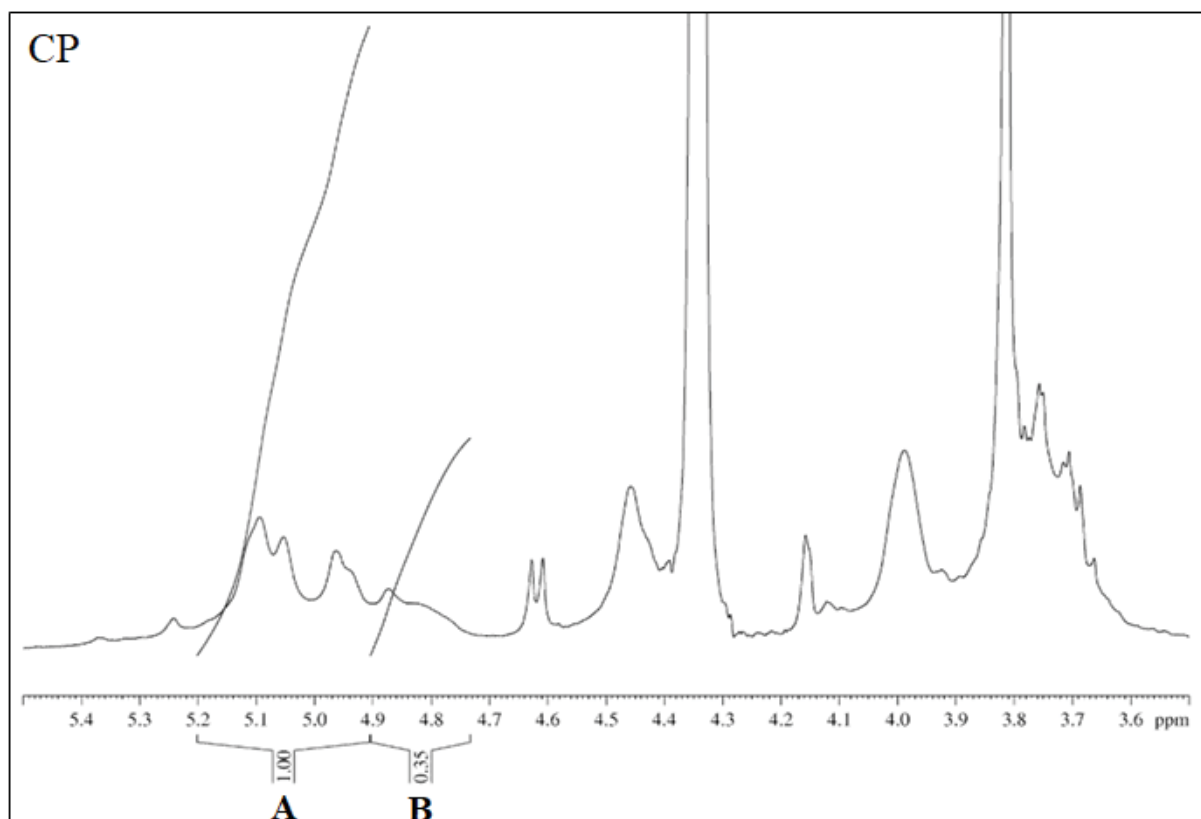
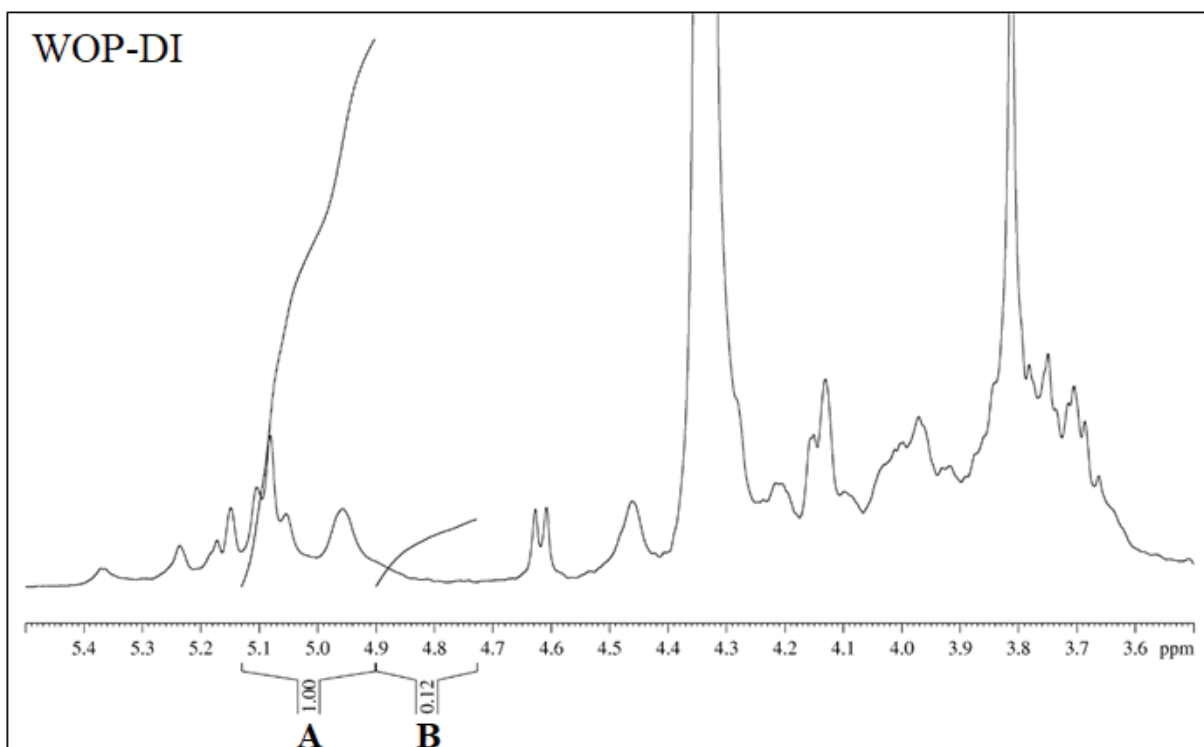


Figure 3 $^1\text{H-NMR}$ spectra of the fractions pectin from wet orange bagasse (WOP-DI) and Sigma citric pectin (CP); obtained at 70 °C in D_2O (chemical shifts are expressed in δ , ppm)

3.3 RHEOLOGICAL CHARACTERIZATION

The flow behavior of WOP-DI and CP can be defined based on the results of the flow curve (Fig. 4A), and viscosity curve (Fig. 4B). The samples were investigated at 30 °C, in acetate buffer pH 4.5 0.2 mol L⁻¹, since the objective of the rheological analyses was to simulate the reaction medium with the ideal conditions for the action of pectinases.

It was possible to observe differences in the yield minimum stress required to start flowing WOP-DI and CP (Fig. 4A), with 0.006 and 0.001 Pa at 3%, 0.008 Pa and 0.05 Pa at 5%, 0.08 and 0.048 at 7%, and 0.130 Pa and 0.156 Pa at 10%, respectively. Also, a Bingham fluid, an important non-Newtonian fluid with linear shear stress/shear rate relationship, requires a yield limit stress before it begins to flow, that is, the plot of shear stress against shear rate does not pass through the origin (GHASSEMI; SHAHIDIAN, 2017). However, the values are clearly small to be representative to enable this definition. The yield limit stress could also indicate the presence of a reticulated or interactive structure that should be degraded initially, allowing the flow to occur at an appropriate shear rate. In this case, the curve also does not pass through the origin of the shear stress/shear rate plot (SUN; GUNASEKARAN, 2009). Thus, we can say that they present a characteristic of pseudoplastic fluid, due to the value of yield limit stress is very close to zero and the viscosity drop when the shear stress increases.

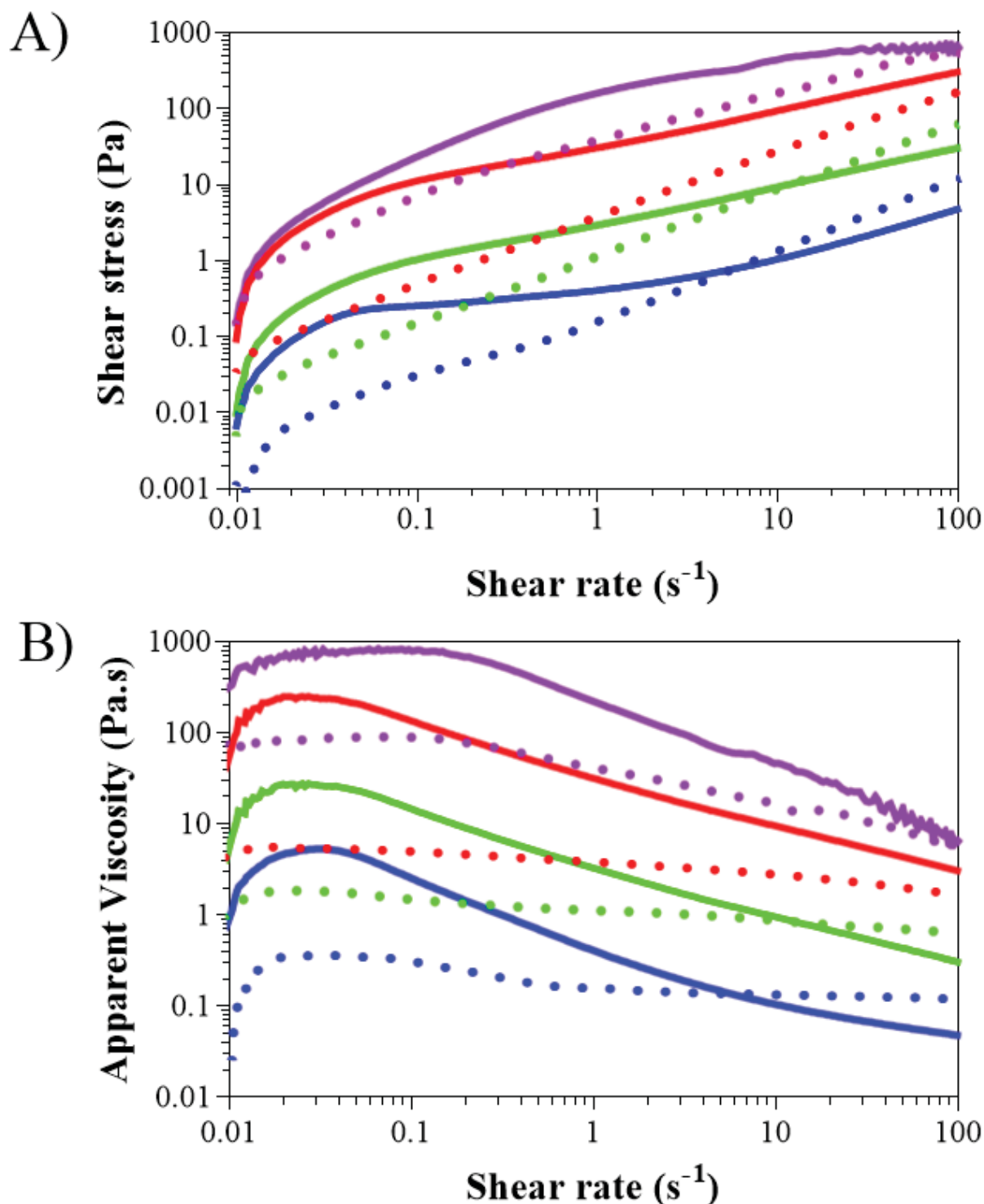


Figure 4 Influence of shear rate (0.01 - 1000 s^{-1}) **A**) on the flow curve and **B**) on the viscosity curve of pectin from wet orange bagasse (WOP-DI, continuous line) and Sigma citric pectin (CP, dotted line) at 30°C in different concentrations of 3% (blue), 5% (green), 7% (red) and 10% (purple) in acetate buffer pH 4.5 0.2 mol L⁻¹

The shear thinning behavior was observed for both samples at all concentrations analyzed as the apparent viscosity decreased with the shear rate increase (Fig. 4B). In shear rate at 0.03 s^{-1} (Newtonian plateau region) that WOP-DI sample produced higher viscous dispersion than CP at all-concentration analyzed. The

apparent viscosity values were 5.32 and 0.36 Pa.s for 3%, 27.0 and 1.85 Pa.s for 5%, 250.8 and 5.71 Pa.s for 7%, 698.75 and 86.51 Pa.s for 10%, respectively.

Comparing the apparent viscosity showed at shear rate at 0.03 s^{-1} between the samples at the same concentrations, the value obtained for the WOP-DI sample is around 13 times higher than that found in the CP sample, at concentrations of 3 and 5%, while at the 7% concentration this value is even higher, reaching 42 times. However, in the 10% concentration, the difference drops to 8 times higher.

The accentuated increase in apparent viscosity of the WOP-DI sample compared to CP samples in the same concentrations, can be related probably to its higher arabinose content in the pectin chain (Table 1, 18.1% and 2.1% for WOP-DI and CP, respectively). The higher content of RG-I (Table 1, 29.8 % for WOP-DI in comparison to CP, 21.1%) can also contribute for the higher apparent viscosity of the pectin dispersion, given that the RG-I lateral chains can allow the polysaccharide chains of the pectin to interact more, leading to hydrophobic interactions and hydrogen bonds between the HG region of the side chains (SOUSA et al., 2015). Thus, the increase RG-I chain promote the formation of gelling networks, making it more viscous (GUO et al., 2017). In addition, the higher amount of arabinose in WOP-DI compared to CP may also have influenced the increase in viscosity. The presence of side chains tends to increase the rigidity of the polymer chain, being responsible for the higher hydrodynamic volume and viscosity (SILVA et al., 1998). Thus, the high viscosity of WOP-DI may be associated with a higher degree of esterification and methylesterification.

The Ostwald-de-Waele and Herschel-Bulkley models can be obtained by the non-linear relationship between stress and shear rate (Fig. 4A). However, the Herschel-Bulkley model considers the yield limit stress (τ_0), while the Ostwald-de-Waele model does not. Depending on the similarity between the models, except for a linear coefficient in the mathematical equation, both presented adjustments with values of the correlation coefficient (r) higher than 0.98 (Table 2).

When applied to the Herschel-Bulkey model, the samples WOP-DI and CP showed negative values for τ_0 . In general, WOP-DI and CP did not show shear stress at low torques, but rather shear stress with a smaller slope relative to the shear rate. Thus, it can happen that the extrapolation of the shear rate to the value of zero, in a

log plot, generates negative values, as can be observed in the values obtained from τ_0 using the Herschel-Bulkley model.

The WOP-DI and CP samples showed an increase in value of coefficient of consistence (K), in accordance with the increase in concentrations, in both models evaluated (Table 2). The highest value reported was with the WOP-DI sample at 10%, where $K= 447.75$, while the lowest value was with the CP sample at 3%, where $K= 0.23$. The WOP-DI sample was more consistent, because its K values were higher than the values found for CP for the same concentrations. The value of K is related with the increase of the viscosity of dispersion.

Table 2

Rheological data of pectin from wet orange bagasse (WOP-DI) and Sigma citric pectin (CP) samples measured by the Ostwald-de-Waele and Herschel-Bulkley models

Samples	Concentration (m/v)	Herschel-Bulkley ($\tau=\tau_0 +K\dot{\gamma}^n$)				Ostwald-de-Waele ($\tau=K\dot{\gamma}^n$)		
		τ_0	K	n	r	K	n	r
WOP-DI	3%	0.47	0.41	0.73	0.998	0.48	0.71	0.999
	5%	-0.70	4.63	0.67	0.999	4.27	0.69	0.999
	7%	-3.86	36.30	0.46	0.998	34.46	0.47	0.999
	10%	-241.78	447.75	0.20	0.983	194.65	0.31	0.971
CP	3%	-0.17	0.24	0.86	0.999	0.23	0.86	0.998
	5%	-0.50	1.23	0.86	0.990	1.22	0.86	0.999
	7%	-6.66	11.12	0.60	0.997	9.53	0.62	0.997
	10%	-9.33	53.92	0.52	0.998	46.93	0.56	0.997

τ_0 = yield limit stress; τ = shear stress; $\dot{\gamma}$ = shear rate; K = coefficient of consistence; n =flow behavior index; r^2 = coefficient of determination

In both models, the CP sample in 3% presented the highest value of flow behavior index, $n=0.86$, while the WOP-DI sample in 10% presented the lowest ($n= 0.20$ and 0.31). The parameter “n” (flow behavior index) of the Ostwald-de-Waele and Herschel-Bulkley models, it was found that the values below the unit value ($n = 1$), characterize the samples as non-Newtonian fluids with pseudoplastic characteristics. The more distant the value of “n” is from the unit value, the more distant the fluid is from the Newtonian behavior (GURJÃO et al., 2017).

The dynamic viscoelastic properties of WOP-DI and CP (3%, 5%, 7% and 10%) were evaluated by elastic (G') and viscous (G'') module as a function of frequency (0.02–100 Hz) (Fig. 5).

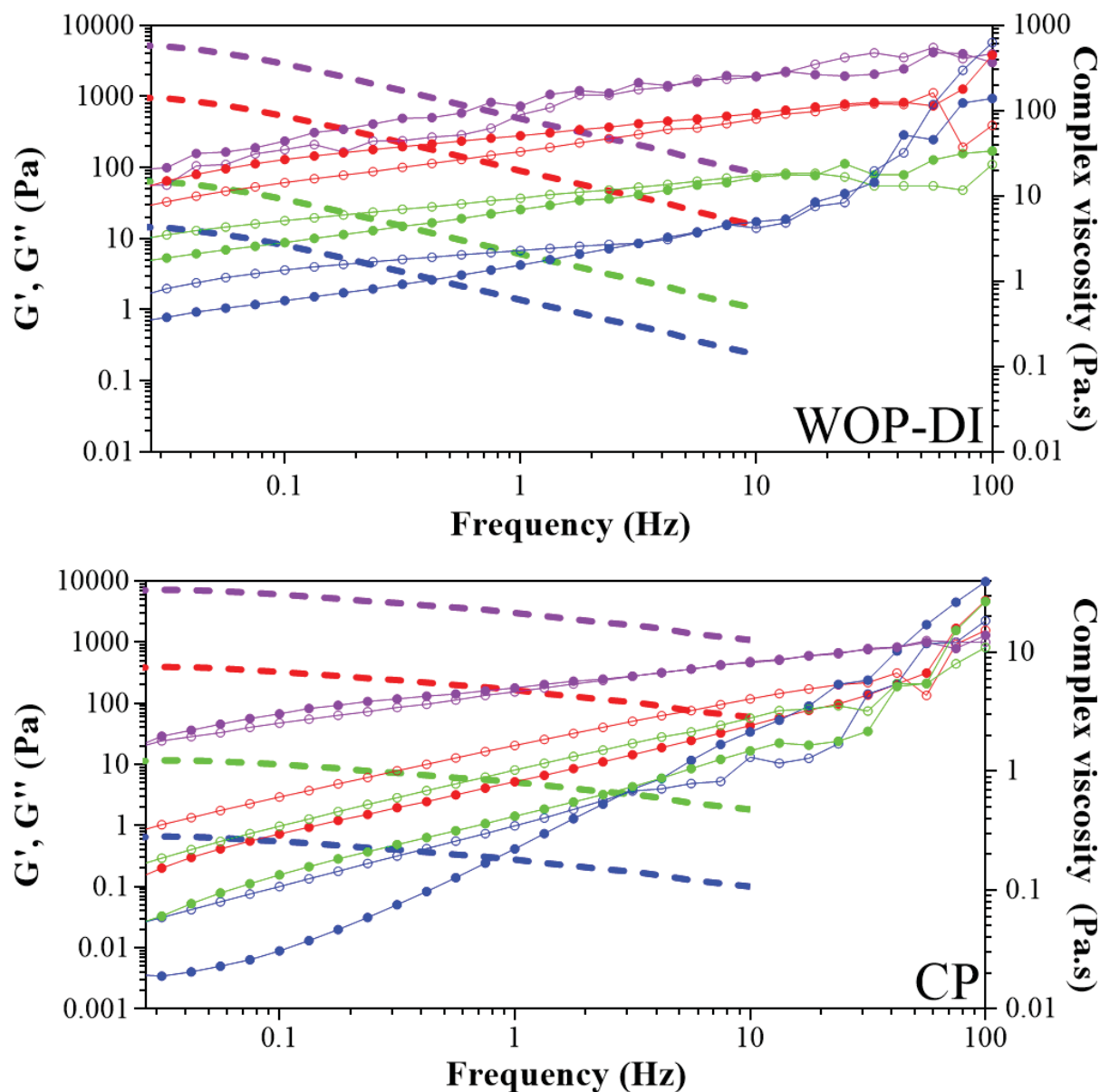


Figure 5 Frequency sweep properties of samples in concentrations of 3% (blue), 5% (green), 7% (red) and 10% (purple) (w/v) to pectin from wet orange bagasse (WOP-DI) and Sigma citric pectin (CP). Frequency sweep (0.02–100 Hz) at 30 °C, showing the frequency dependence of the elastic modulus (G' , full symbols), viscous modulus (G'' , open symbols) and complex viscosity (η^* , dashed line).

The G' and G'' modules of the WOP-DI and CP samples, in all concentrations analyzed, increased as the frequency increased, while the complex viscosity (η^*) dropped (Fig. 5). The increase in module values was directly impacted by the concentration of dispersion used, showing a gradual increase of G' and G'' as the dispersion concentration increased (Table 3).

Table 3

Elastic (G') and Viscous (G'') modules for the 0.02 Hz and 10 Hz frequencies of the pectin from wet orange bagasse (WOP-DI) and Sigma citric pectin (CP) samples in different concentrations

Samples	Concentration (w/v)	0.02 Hz		10.0 Hz		Crossover of the modules G' and G''
		G' (Pa)	G'' (Pa)	G' (Pa)	G'' (Pa)	
WOP-DI	3%	1.5	0.7	14.9	17.2	2 Hz
	5%	4.7	9.5	70.1	78.5	10 Hz
	7%	48.9	27.1	574.8	488.4	30 Hz
	10%	56.8	93.1	1 884.0	1 924.0	- - -
CP	3%	0.05	0.3	26.3	14.3	3 Hz
	5%	0.03	0.2	17.0	56.7	30 Hz
	7%	0.1	0.7	56.0	117.0	40 Hz
	10%	18.3	17.9	460.4	476.0	- - -

In all cases, it is possible to observe the crossing between modules G' and G'' , but at different frequencies. In both samples, at 5% and 7%, the frequency required for the crossover between the modules was equal to or above 10 Hz, while for the 3% concentration 2 Hz was required for WOP-DI and 3 Hz for CP. In the 10% concentration, it was considered that the modules of both remained overlapped during the test, with small variations. The crossing between the modules is a characteristic of concentrated dispersions (SCHRAMM, 2006; STEPHEN; PHILLIPS; WILLIAMS, 2016).

The Cox–Merz rule is an empirical observation that states that the apparent viscosity and the complex viscosity are closely super-imposable for numerically equivalent values of shear and frequency (COX, 1952), allowing the prediction of the steady shear viscosity from dynamic data and vice versa. This rule only holds, however, for isotropic polymeric solutions and polymer melts, not for liquid crystals or flocculated systems. Both pectin dispersions WOP-DI and CP, only the samples at 3% concentration obey the Cox-Merz rule (Fig. 6). For higher concentrations (5%, 7% and 10%), this does not occur because the values of complex viscosity (η^*) are higher or smaller than the values of apparent viscosity (η^a). The departure of the Cox-Merz rule is observed in two situations: where $\eta^* > \eta^a$, occurs with HM pectin dispersions in the presence of some other molecules that associate to form delicate weak gelled networks or where $\eta^* < \eta^a$, could be attributed to pectin aggregation in solution (SILVA; RAO, 2006). In addition, this confirms that the pectin dispersions studied in this work interact and behave as concentrated dispersions.

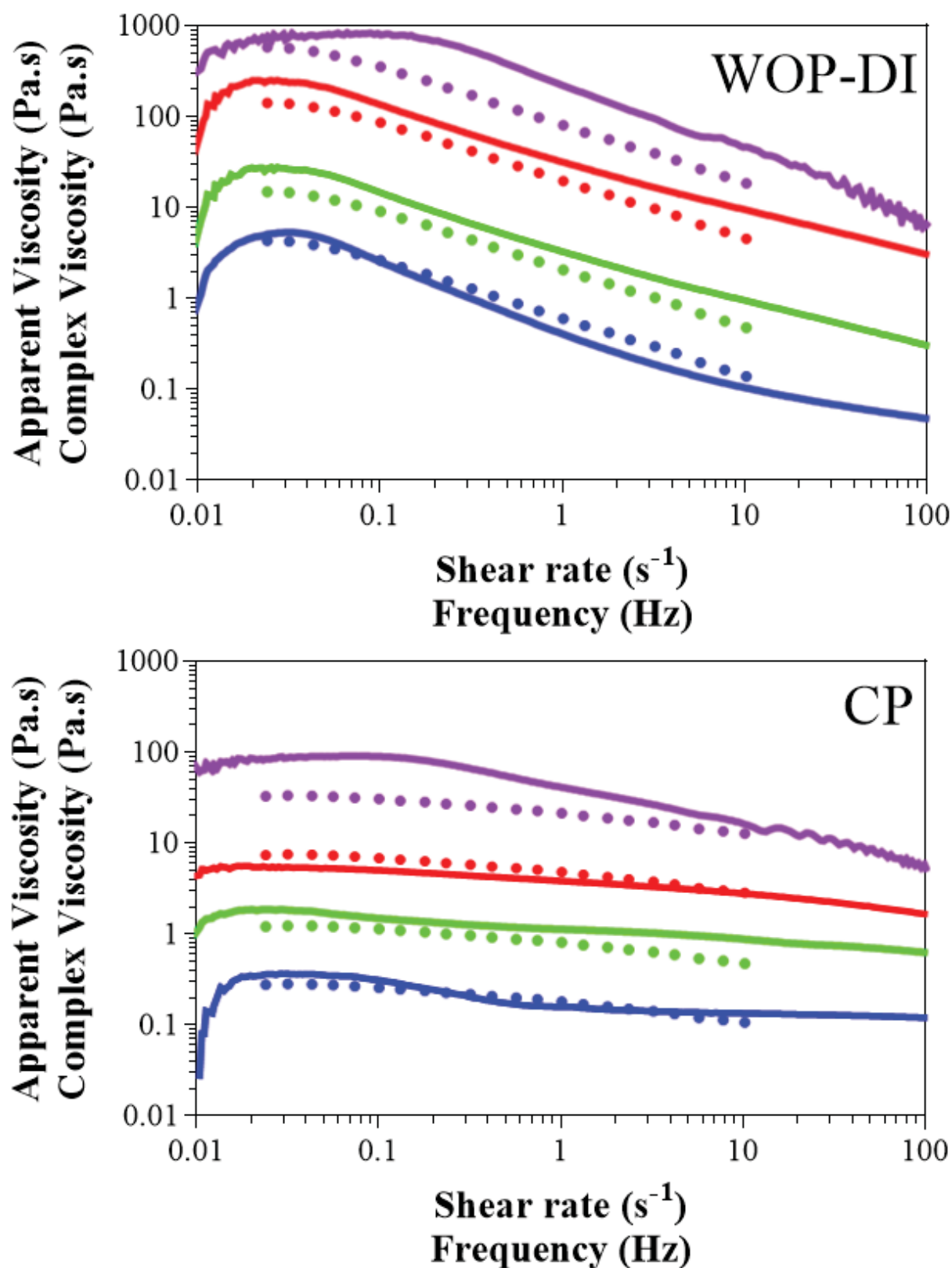


Figure 6 Cox-Merz Rule graph for pectin from wet orange bagasse (WOP-DI) and Sigma citric pectin (CP) samples in concentrations of 3% (blue), 5% (green), 7% (red) and 10% (purple) (w/v). This graph corresponds to an apparent viscosity (η^a , continuous line) plotted against the shear rate, $\dot{\gamma}$, and the magnitude of the complex viscosity (η^* , dotted line) plotted against the angular frequency, Hz.

3.4 RHEOLOGICAL ANALYSIS DURING ENZYMATIC HYDROLYSIS

The objective of these experiments was to evaluate the complex viscosity (η^*) at different times of the reaction medium during enzymatic hydrolysis, using WOP-DI and CP, in concentrations of 3%, 5%, 7% and 10% (Table 4) and different concentrations of the pectinase extract PUC. Controls without pectinases were done to determine if the initial complex viscosity was constant throughout the experiment.

The WOP-DI sample showed higher initial complex viscosity than the CP in all concentrations of 3%, 5%, 7% and 10%. For 3% concentration, both WOP-DI and CP samples, in 1:100 and 1:1000 enzyme dilutions, showed stability in complex viscosity from η^*_{400} (Table 4, Entries 01 and 05). However, at 5% concentration, the behavior of the WOP-DI and CP samples starts to get different, being impossible to visualize the stability of the complex viscosity in the displays at 1:100 dilution (Table 4, Entry 03 and 06). At concentrations of 7% and 10% of WOP-DI and CP samples, it was not possible to visualize the complex viscosity stabilization in any of the enzyme dilutions. The high concentration of pectin in the dispersion may have contributed to this result since there is much more substrate to be hydrolyzed by the enzyme.

Comparing the complex viscosity drop of the WOP-DI and CP samples, using the dilutions 1:100 and 1:1000 (Fig. 7), even having a higher initial complex viscosity and a more branched structure, the WOP-DI sample presented higher values of complex viscosity drop in relation to CP in 3%, 5% and 7% concentrations. This shows that the PUC enzymatic extract was efficient in hydrolyzing crude pectin, which is probably due to the fact that the extract, besides containing polygalacturonases, may also contain other enzymes responsible for hydrolyzing the branches responsible for influencing the viscosity of the dispersion, such as esterases, galactases and arabinases.

Table 4
Complex viscosity data obtained for pectin from wet orange bagasse and Sigma citric pectin during the enzymatic hydrolysis

Entry	Samples	Concentration (w/v)	Enzyme dilution (v/v)	η^*_0 (Pa.s)	η^*_{50} (Pa.s)	η^*_{100} (Pa.s)	η^*_{200} (Pa.s)	η^*_{300} (Pa.s)	η^*_{400} (Pa.s)	η^*_{500} (Pa.s)	η^*_{600} (Pa.s)
01		3%	1:100	0.58	0.18	0.14	0.10	0.092	0.087	0.086	0.086
			1:1 000		0.39	0.35	0.31	0.27	0.25	0.24	0.23
02	WOP-DI	5%	1:100	2.28	0.97	0.49	0.20	0.13	0.11	0.10	0.09
			1:1 000		1.98	1.76	1.45	1.15	0.97	0.83	0.71
03	WOP-DI	7%	1:100	19.20	8.73	4.25	2.07	1.33	1.00	0.800	0.700
			1:1 000		16.70	15.02	13.04	11.83	11.09	10.75	10.44
04	WOP-DI	10%	1:100	83.70	66.22	49.09	31.56	24.39	21.42	19.00	17.00
			1:1 000		73.02	68.59	63.22	58.37	55.21	53.27	51.77
05	WOP-DI	3%	1:100	0.16	0.07	0.06	0.052	0.051	0.051	0.05	0.049
			1:1 000		0.13	0.11	0.098	0.086	0.081	0.075	0.071
06	CP	5%	1:100	0.94	0.52	0.35	0.217	0.158	0.127	0.102	0.078
			1:1 000		0.79	0.73	0.646	0.594	0.565	0.544	0.524
07	CP	7%	1:100	4.56	2.39	1.51	0.820	0.549	0.414	0.350	0.300
			1:1 000		3.80	3.44	3.183	2.898	2.657	2.438	2.226
08	CP	10%	1:100	21.10	12.27	8.50	5.00	3.80	2.80	2.40	2.10
			1:1 000		16.78	17.50	16.00	14.1	12.98	11.80	10.60

WOP-DI = pectin from wet orange bagasse; CP = Sigma citric pectin

η^*_0 = Complex viscosity in 0 s; η^*_{50} = Complex viscosity in 50 s; η^*_{100} = Complex viscosity in 100 s; η^*_{200} = Complex viscosity in 200 s;

η^*_{300} = Complex viscosity in 300 s; η^*_{400} = Complex viscosity in 400 s; η^*_{500} = Complex viscosity in 500 s; η^*_{600} = Complex viscosity in 600 s

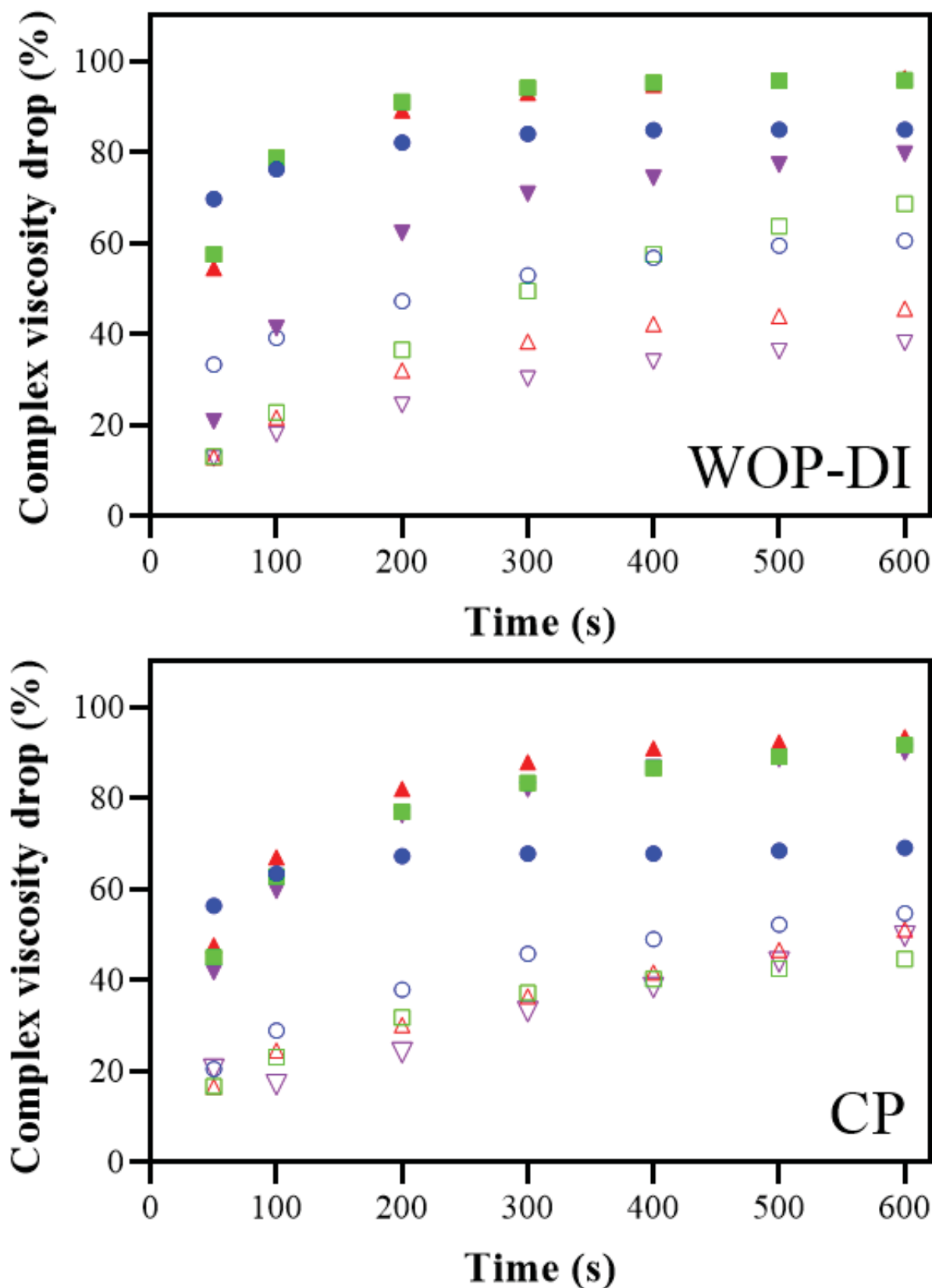


Figure 7: Drop in the complex viscosity of samples pectin from wet orange bagasse (WOP-DI) and Sigma citrus pectin (CP), in concentrations of 3% (blue), 5% (green), 7% (red) and 10% (purple), the dilutions of enzymes 1:100 (full symbols) and 1:1000 (open symbols), by the enzymatic reaction time.

In concentrations of 5% and 7% of the WOP-DI and CP, the drop of complex viscosity is similar using different enzyme dilutions (Fig. 7). The results obtained using WOP-DI at 10% showed a lower drop in complex viscosity drop compared to the results obtained with 3%, 5% and 7% concentration (Fig. 7). This difference becomes more pronounced when the tests with 1:100 and 1:1000 PUC dilutions are compared. The increase in concentration also resulted in an increase of the initial values of complex viscosity. In addition, the fact that the WOP-DI sample has more ramifications in the pectin chain in relation to the CP sample, presenting the RG-I structure, could also contribute to the formation of a gel network and, consequently, also increase the viscosity in the pectin dispersion. Thus, in high viscosities, enzymes may present a greater difficulty of hydrolyzing the pectin structure at the beginning of the reaction due to a decrease in mass transfer. However, as the enzyme acts on the dispersion, the complex viscosity drop increases.

It is important to emphasize the difference of the complex viscosity drop when using the enzyme dilution 1:100 and 1:000. On average, the complex viscosity drops in 600 s using the 1:1000 dilution can be reached in 50-100 s using the 1:100 dilution. The amount of enzyme present in the dispersion may have interfered to the increase, as the initial viscosity directly interferes with the speed of the reaction. It was observed that in both samples and concentrations, the with 1:1000 dilutions took about 10 times longer to reach the same complex viscosity drop compared to the 1:100 dilutions, justified by the reduced amount in 10 times.

After the complex viscosity experiments, samples of the reaction medium were analyzed by HPSEC-MALLS-RI and HPLC to evaluate the elution profile after the enzymatic hydrolysis. The chromatograms show the comparison between the elution profiles before and after enzymatic hydrolysis of the samples (Fig. 8).

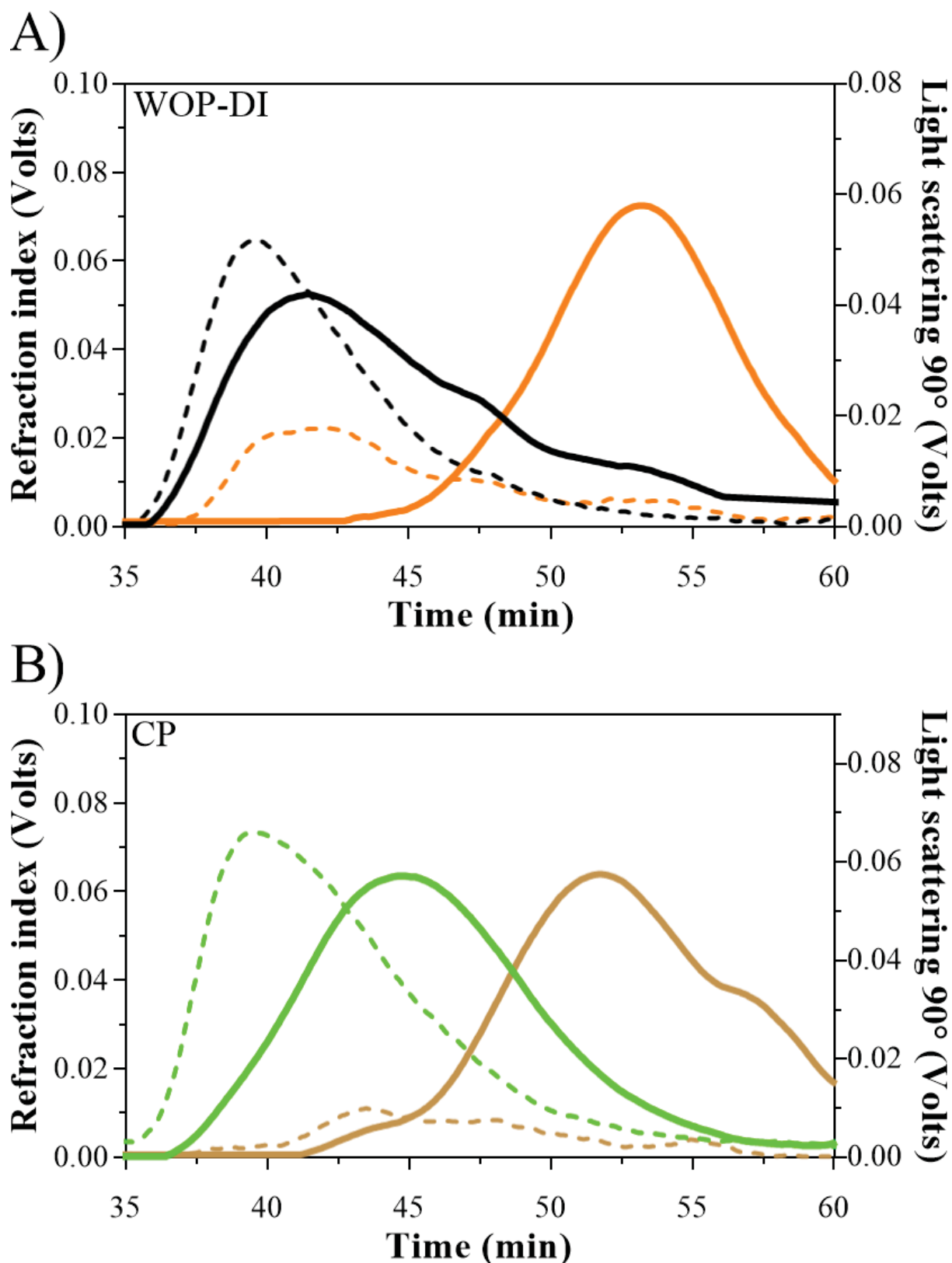


Figure 8 HPSEC-MALLS-RI elution profile. Comparison between Refraction Index (R.I., continuous line) and Light Scattering (L.S., dotted line). **A)** pectin from wet orange bagasse (WOP-DI, black) and hydrolyzed pectin from wet orange bagasse (WOP-DI+E, orange); **B)** Sigma citric pectin (CP, green) and hydrolyzed Sigma citric pectin (CP+E, brown).

For the WOP-DI (Fig. 8A), the concentration of high molar mass compounds dropped significantly after the hydrolysis process. Before the hydrolysis, the concentration of low molar mass compounds was very small; as the high molar mass compounds began to be hydrolyzed, the concentration of low molar mass compounds started to increase considerably, reaching a peak after 53 min. The same behavior can be observed for the CP sample (Fig. 8B).

In addition, the differences between the concentration and molar mass presented in HPSEC-MALLS-R results can be explained through the high-performance liquid chromatography (HPLC) results. The samples CP and WOP-DI showed distinct D-GalA values released at the end of hydrolysis. The CP sample, in 5% and 10% concentrations, presented about 22.3 and 22.8 mg mL⁻¹ of D-GalA, respectively. The WOP-DI sample presented 16.4 and 19.4 mg mL⁻¹, respectively. The lower concentration of free D-GalA in WOP-DI in relation to CP was already expected, since in the monosaccharide characterization the lowest amount of D-GalA in the pectin composition was identified. This shows that, the drop in complex viscosity of the dispersions is associated with the release of D-GalA from pectin hydrolysis.

4 CONCLUSION

This paper studies the pectin extracted from wet orange bagasse, evaluating aspects such as yield, composition, concentration, and rheology. It also presented enzymatic assays coupled with rheology, with the purpose of associating the complex viscosity drop with the pectinase hydrolytic activity.

High molar mass, low degree of D-GalA and high degrees of arabinose and galactose were the main characteristics found in the pectin of wet orange bagasse. However, the proportion of D-GalA increases considerably after the dialysis process, removing small free carbohydrates and pigments. The WOP-DI sample was comparable to the CP in rheology tests.

After dialysis, the pectin from the orange wet bagasse showed a pseudoplastic behavior, due to the drop in viscosity as the shear rate increased, and some traces of Bingham fluid, due to the need for an initial shear stress in order for it to start flowing. In addition, based on the frequency sweep behavior, the samples showed concentrated dispersion behavior.

In the rheology combined enzymatic assays, it was possible to observe the drop in complex viscosity, for both WOP-DI and CP samples. Tests with the highest pectin concentrations showed a lower drop in initial complex viscosity, compared to subsequent lower concentrations. However, a drop in viscosity was still perceptible. In high pectin concentrations, the initial viscosity may impact the mass transfer of enzymes with the substrate. Enzymatic hydrolysis is confirmed due to variation in the concentration of high molar mass compounds before and after enzymatic hydrolysis, generating high concentrations of low molar mass compounds, including D-GalA.

In all tested concentrations (3%, 5%, 7% and 10%) it was possible to visualize the reduction of complex viscosity, using a rotational rheometer during enzymatic hydrolysis. The rheological analyses made it possible to use those of high pectin concentrations, without the need for dilutions, and online follow-up of the analysis. Thus, rheological analyses were useful to follow the action of pectinases in the pectin dispersions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the following Brazilian agencies for financial support: The National Council for Scientific and Technological Development - CNPq, the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES and Ministry of Science and Technology/CNPq, and the Federal University of Parana - Brazil. Nadia Krieger, Joana Léa Meira Silveira and David Mitchell are research members of the CNPq Foundation (n° 303287/2019-5, 309225/2018-3 and 306743/2018-3, respectively); Gustavo Alexandre Fuchs is the beneficiary of a master scholarship from Program of Academic Excellence - PROEX, n° 88882.344100/2019-01 and Shayla Barbieri is the beneficiary of a post-doctoral scholarship from Coordination of Superior Level Staff Improvement – CAPES, n° 88887.335103/2019-00. The authors would like to thank the *NMR Center of UFPR* for recording the NMR spectra, the *SuperSuco – Indústria de Sucos* for the wet orange bagasse, the *LNF Latino Americana* for the enzymatic extract Pectinex Ultra Clear.

REFERENCES

- BARBIERI, S. F.; AMARAL, S. C.; RUTHES, A. C.; PETKOWICZ, C. L. O.; KERKHOVEN, N. C.; DA SILVA, E. R. A.; SILVEIRA, J. L. M. Pectins from the pulp of gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): Structural characterization and rheological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, n. March, p. 250–258, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.03.045.
- BARROS, S.; BERK, C. Brazil - Citrus Semi-annual. **Global Agricultural Information Network**, p. 11, 2018.
- BATTISON, L. **Nova técnica quer converter casca de laranja em biocombustível**. 2011. Disponível em: https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2011/09/110916_laranja_microondas_rw. Acesso em: 17 maio. 2019.
- BEUX, S. **Avaliação das Propriedades de Coagulação de Leite Bovino In Natura por Parâmetros Latodinamográficos e Reológicos**. 2017. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná, 2017.
- BLAKE, J.D.; RICHARDS, G. N. Problems of Lactonisation in the analysis of uronic acids. **Carbohydrate Research**, v. 28, p. 275–281, 1968.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, p. 484–489, 1973.
- CAFFALL, K.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–1900, 2009. DOI: 10.1016/j.carres.2009.05.021.
- CARPITA, N. C.; MCCANN, M. The cell wall. *In*: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (org.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2000. p. 52–108.
- CHAN, S. Y.; CHOO, W. S.; YOUNG, D. J.; LOH, X. J. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 118–139, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.12.033.
- CIRIMINNA, R.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; HERNÁNDEZ, A. I. R.; PAGLIARO, M. Perspective: Pectin: A New Perspective from the Biorefinery Standpoint. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 9, n. 4, p. 368–377, 2015. DOI: 10.1002/bbb.
- CIRIMINNA, R.; FIDALGO, A.; DELISI, R.; ILHARCO, L. M.; PAGLIARO, M. Pectin production and global market. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 27, n. 5, p. 17–20, 2016.
- COX, H. L. The elasticity and strength of paper and other fibrous materials. **British Journal of Applied Physics**, v. 3, p. 72–79, 1952.

DRANCA, F.; OROIAN, M. Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. **Food Research International**, v. 113, p. 327–350, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.06.065.

FAZIO, S. A.; UHLINGER, D. J.; PARKER, J. H.; WHITE, D. C. Estimations of uronic acids as quantitative measures of extracellular and cell wall polysaccharide polymers from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1151–1159, 1982. DOI: 10.1128/aem.43.5.1151-1159.1982.

FUNDECITRUS. **REESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA 2019-20 DO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO-SUDESTE MINEIRO - CENÁRIO EM FEVEREIRO-2020.**

GHASSEMI, M.; SHAHIDIAN, A. Fluid mechanics. *In*: **Nano and Bio Heat Transfer and Fluid Flow**. v. 1p. 57–87. DOI: 10.1016/B978-0-12-803779-9.00004-2.

GRASDALEN, H.; EINAR BAKØY, O.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, n. C, p. 183–191, 1988. DOI: 10.1016/0008-6215(88)80016-8.

GUO, M.; HU, X.; WANG, C.; AI, L. Polysaccharides: Structure and Solubility. **Solubility of Polysaccharides**, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.71570.

GURJÃO, F. F.; CARNEIRO, G. G.; PESSOA, T.; SILVA, D. R. S.; MIRANDA, D. S. A. Rheological properties of hog plum yogurt marketed in Campina Grande, Paraíba state. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 11, n. 3, p. 0–1, 2017.

GUSAKOV, A. V.; MARKOV, A. V.; GRISHUTIN, S. G.; SEMENOVA, M. V.; KONDRATYEVA, E. G.; SINITSYN, A. P. Viscometric method for assaying of total endodepolymerase activity of pectinases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, n. 6, p. 676–682, 2002. DOI: 10.1023/A:1016102522747.

JAKÓB, A.; BRYJAK, J.; POLAKOVIČ, M. Selection of a method for determination of activity of pectinolytic enzymes in berry fruit materials. **Chemical Papers**, v. 63, n. 6, p. 677–682, 2009. DOI: 10.2478/s11696-009-0065-z.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.03.026.

KAYA, M.; SOUSA, A. G.; CRÉPEAU, M. J.; SØRENSEN, Su. O.; RALET, M. C. **Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: Influence of acid type and pH of extraction** *Annals of Botany*, 2014. DOI: 10.1093/aob/mcu150.

KRAVTCHENKO, T. P.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, n. 1, p. 17–25, 1992. DOI: 10.1016/0144-8617(92)90183-Q.

KUIVANEN, J.; MOJZITA, D.; WANG, Y.; HILDITCH, S.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P.; WIEBE, M. G. Engineering filamentous fungi for conversion of d-galacturonic acid to L-galactonic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8676–8683, 2012. DOI: 10.1128/AEM.02171-12.

KUTE, A. B.; MOHAPATRA, D.; KOTWALIWALE, N.; GIRI, S. K.; SAWANT, B. P. Characterization of Pectin Extracted from Orange Peel Powder using Microwave-Assisted and Acid Extraction Methods. **Agricultural Research**, 2019. DOI: 10.1007/s40003-019-00419-5.

LIN, D.; LOPEZ-SANCHEZ, P.; GIDLEY, M. I. J. Interactions of pectins with cellulose during its synthesis in the absence of calcium. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 57–68, 2016. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.06.004.

M'SAKNI, N. H.; MAJDOUB, H.; ROUDESLI, S.; PICTON, L.; LE CERF, D.; RIHOUEY, C.; MORVAN, C. Composition, structure and solution properties of polysaccharides extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. **European Polymer Journal**, v. 42, n. 4, p. 786–795, 2006. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2005.09.014.

MARÍN, F. R.; SOLER-RIVAS, C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 736–741, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.040.

MARTINS, L. C.; MONTEIRO, C. C.; SEMEDO, P. M.; SÁ-CORREIA, I. Valorisation of pectin-rich agro-industrial residues by yeasts: potential and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 6527–6547, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10697-7.

MATSUBARA, T.; KATAOKA, M.; KISHIDA, M. Basidiomycotic yeast *Cryptococcus diffluens* converts L-galactonic acid to the compound on the similar metabolic pathway in ascomycetes. **Fermentation**, v. 5, n. 3, p. 1–8, 2019. DOI: 10.3390/fermentation5030073.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MINJARES-CARRANCO, A.; TREJO-AGUILAR, B. A.; AGUILAR, G.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 1, p. 25–31, 1997. DOI: 10.1016/S0141-0229(96)00212-8.

MOJZITA, D.; WIEBE, M.; HILDITCH, S.; BOER, H.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Metabolic engineering of fungal strains for conversion of D-galacturonate to meso-Galactarate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 169–175, 2010. DOI: 10.1128/AEM.02273-09.

MÜLLER-MAATSCH, J.; CALIGIANI, A.; TEDESCHI, T.; ELST, K.; SFORZA, S. Simple and validated quantitative ¹H NMR method for the determination of methylation, acetylation, and feruloylation degree of pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 37, p. 9081–9087, 2014. DOI: 10.1021/jf502679s.

MUNARIN, F.; PETRINI, P.; GENTILINI, R.; PILLAI, R. S.; DIRÈ, S.; TANZI, M. C.; SGLAVO, V. M. Micro- and nano-hydroxyapatite as active reinforcement for soft biocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 199–209, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.050.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681–689, 2012. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002.

NOREEN, A.; NAZLI, Z.; AKRAM, J.; RASUL, I.; MANSHA, A.; YAQOUB, N.; IQBAL, R.; TABASUM, S.; ZUBER, M.; ZIA, K. M. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 254–272, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.029.

PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. **Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review** *3 Biotech*, 2018. DOI: 10.1007/s13205-018-1220-4.

POURBAFRANI, M.; FORGÁCS, G.; HORVÁTH, I. S.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4246–4250, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.077.

RAO, M. A. **Rheological behavior of food gels**. DOI: 10.1007/978-1-4614-9230-6_6.

RICHARD, P.; HILDITCH, S. D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 597–604, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-1870-6.

RUANO, P.; LAZO, L. D.; PICCO, S.; VILLEGAS, L.; TONELLI, F.; MERLO, M. E. A.; RIGAU, J.; DIAZ, D.; MASUELLI, M. Extraction and Characterization of Pectins From Peels of Criolla Oranges (*Citrus sinensis*): Experimental Reviews. **IntechOpen**, p. 1–44, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. ARTLIBER ed. São Paulo.

SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Pectins: structure, functionality, and uses. *In*: STEPHEN, A. M.; PHILIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (org.). **Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition**. p. 353–411.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, n. 2, p. 25–33, 1998. DOI: 10.1590/s0104-14281998000200005.

SOUSA, A. G.; NIELSEN, H. L.; ARMAGAN, I.; LARSEN, J.; SØRENSEN, S. O. The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 130–139, 2015. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.013.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2ª Edition ed. East Lansing. DOI: 10.1016/b978-1-4832-3245-4.50016-9.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition**.

STOCK, D. **Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido**. 2013. Universidade Federal do Paraná, 2013.

STOCK, D.; BIZ, A.; DE PAULA, D. H. F.; RICHARD, P.; GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Conversion of citric pectin into D-galacturonic acid with high substrate loading using a fermented solid with pectinolytic activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 214–219, 2017. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.07.003.

SUN, Adriano; GUNASEKARAN, Sundaram. Yield stress in foods: Measurements and applications. **International Journal of Food Properties**, v. 12, n. 1, p. 70–101, 2009. DOI: 10.1080/10942910802308502.

TORKOVA, A. A.; LISITSKAYA, K. V.; FILIMONOV, I. S.; GLAZUNOVA, O. A.; KACHALOVA, G. S.; GOLUBEV, V. N.; FEDOROVA, T. V. Physicochemical and functional properties of Cucurbita maxima pumpkin pectin and commercial citrus and apple pectins: A comparative evaluation. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–24, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0204261.

VENZON, S. S.; CANTERI, M. H. G.; GRANATO, D.; DEMCZUK, B.; MACIEL, G. M.; STAFUSSA, A. P.; HAMINIUK, C. W. I. Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4102–4112, 2015. DOI: 10.1007/s13197-014-1419-2.

VIDGREN, V.; HALINEN, S.; TAMMINEN, A.; OLENIUS, S.; WIEBE, M. G. Engineering marine fungi for conversion of d-galacturonic acid to mucic acid. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1186/s12934-020-01411-3.

YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373–385, 2011. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.065. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711004450>.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- A pectina do bagaço de laranja úmido foi extraída com ácido cítrico quente. Os aspectos avaliados da pectina obtida foram o rendimento, a composição, a concentração e a reologia. Também foram efetuados testes enzimáticos acoplados à reologia, com o objetivo de associar a queda de viscosidade complexa com a atividade hidrolítica da pectinase.
- Alta massa molar, baixo grau de D-GalA e altos graus de arabinose e galactose foram as principais características encontradas na pectina do bagaço de laranja úmido. Entretanto, a proporção de D-GalA aumenta consideravelmente após o processo de diálise, removendo pequenos carboidratos e pigmentos livres. A amostra de pectina extraída do bagaço de laranja foi comparável à pectina comercial da Sigma nos ensaios de reologia, pois apresentaram teor próximo de D-GalA.
- Após a diálise, a pectina do bagaço úmido de laranja mostrou um comportamento pseudoplástico, devido à queda na viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumentava. Também apresentou alguns traços do fluido Bingham e estrutura reticulada devido à necessidade de uma tensão inicial de cisalhamento para que ele começasse a fluir. Além disso, com base no comportamento de varredura de frequência, as amostras mostraram comportamento de dispersão concentrada.
- Nos ensaios enzimáticos combinados da reologia, foi possível observar a queda na viscosidade complexa, tanto para amostras extraídas do bagaço de laranja como para as de pectina comercial Sigma. Testes com as maiores concentrações de pectina mostraram uma menor queda na viscosidade inicial complexa, em comparação com as concentrações subsequentes mais baixas. Entretanto, ainda era perceptível uma queda na viscosidade. Em altas concentrações de pectina, a viscosidade inicial pode ter impacto na transferência de massa das enzimas com o substrato.

- A hidrólise enzimática foi confirmada devido à variação na concentração de compostos de alta massa molar antes e depois da ação enzimática, gerando altas concentrações de compostos de baixa massa molar, incluindo o D-GalA.
- Em todas as concentrações testadas (3%, 5%, 7% e 10% (m/v)) foi possível visualizar a redução da viscosidade complexa usando um reômetro rotacional, durante a hidrólise enzimática. Usando a diluição enzimática 1:100 foi possível observar uma queda mais acentuada em relação a 1:1000 em um curto espaço de tempo. Assim, as análises reológicas foram úteis para acompanhar a ação das pectinases nas dispersões de pectina.

REFERÊNCIAS

- ABID, M.; CHEIKHROUHOU, S.; RENARD, C. M. G. C.; BUREAU, S.; CUVELIER, G.; ATTIA, H.; AYADI, M. A. Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. **Food Chemistry**, v. 215, p. 318–325, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.181.
- AHMED, A.; SOHAIL, M. Characterization of pectinase from *Geotrichum candidum* AA15 and its potential application in orange juice clarification. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 955–961, 2020. DOI: 10.1016/j.jksus.2019.07.002.
- AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S.; NGADI, M. O. Rheological characteristics of arabic gum in combination with guar and xanthan gum using response surface methodology: Effect of temperature and concentration. **International Journal of Food Properties**, v. 8, n. 2, p. 179–192, 2005. DOI: 10.1081/JFP-200060234.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21–28, 1998. DOI: 10.1016/S0032-9592(97)00046-0.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- BAASCH, A. **Planta de pectina da Cargill em Bebedouro (SP) deve começar a operar em 2021**. 2020. Disponível em: <http://www2.safras.com.br/2020/10/16/planta-de-pectina-da-cargill-em-bebedouro-sp-deve-comecar-a-operar-em-2021/#:~:text=Porto Alegre%2C 16 outubro de,no primeiro semestre de 2021.> Acesso em: 26 nov. 2020.
- BAKER, G. L. High-Polymer Pectins and Their Deesterification. **Advances in Food Research**, v. 1, p. 395–427, 1948.
- BALDINO, N.; MILETI, O.; LUPI, F. R.; GABRIELE, D. Rheological surface properties of commercial citrus pectins at different pH and concentration. **Lwt**, v. 93, n. January, p. 124–130, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.03.037.
- BARBIERI, S. F.; AMARAL, S. C.; RUTHES, A. C.; PETKOWICZ, C. L. O.; KERKHOVEN, N. C.; DA SILVA, E. R. A.; SILVEIRA, J. L. M. Pectins from the pulp of gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): Structural characterization and rheological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 214, n. March, p. 250–258, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.03.045.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. Elsevier ed.

BARROS, S.; BERK, C. Brazil - Citrus Semi-annual. **Global Agricultural Information Network**, p. 11, 2018.

BATTISON, L. **Nova técnica quer converter casca de laranja em biocombustível**. 2011. Disponível em: https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2011/09/110916_laranja_microondas_rw. Acesso em: 17 maio. 2019.

BERGER, M. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico**, p. 130–139, 2014.

BEUX, S. **Avaliação das Propriedades de Coagulação de Leite Bovino In Natura por Parâmetros Latodinamográficos e Reológicos**. 2017. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná, 2017.

BIZ, A. **SOLUÇÕES PARA BIORREFINARIAS DE POLPA CÍTRICA**. 2015. Universidade Federal do Paraná, 2015.

BIZ, A.; FARIAS, F. C.; MOTTER, F. A.; DE PAULA, D. H.; RICHARD, P.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Pectinase activity determination: An early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works! **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109529.

BLAKE, J.D.; RICHARDS, G. N. Problems of Lactonisation in the analysis of uronic acids. **Carbohydrate Research**, v. 28, p. 275–281, 1968.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, p. 484–489, 1973.

BUCHHOLT, H. C. **PROCESS FOR EXTRACTION OF PECTIN**, Patent Number: WO/2016/202986, 2016.

BUSINESSWIRE. **Global Polybutylene Terephthalate (PBT) Market Growth, Trends and Forecast 2018-2023**. 2018. Disponível em: <https://www.businesswire.com/news/home/20180501005744/en/Global-Polybutylene-Terephthalate-PBT-Market-Growth-Trends>. Acesso em: 16 ago. 2020.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–1900, 2009. DOI: 10.1016/j.carres.2009.05.021.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectin: from Raw Material to the Final Product. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282012005000024>.

CARGILL. **Cargill confirma construção de uma nova fábrica no Brasil**. 2019. Disponível em: https://www.cargill.com.br/pt_BR/2019/nova-fabrica-pectina-hm.

CARPITA, N. C.; MCCANN, M. The cell wall. *In*: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (org.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Biologists, 2000. p. 52–108.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993. DOI: 10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x.

CHAN, S. Y.; CHOO, W. S.; YOUNG, D. J.; LOH, X. J. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 118–139, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.12.033.

CIRIMINNA, R.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; HERNÁNDEZ, A. I. R.; PAGLIARO, M. Perspective: Pectin: A New Perspective from the Biorefinery Standpoint. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 9, n. 4, p. 368–377, 2015. DOI: 10.1002/bbb.

CIRIMINNA, R.; FIDALGO, A.; DELISI, R.; ILHARCO, L. M.; PAGLIARO, M. Pectin production and global market. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 27, n. 5, p. 17–20, 2016.

COX, H. L. The elasticity and strength of paper and other fibrous materials. **British Journal of Applied Physics**, v. 3, p. 72–79, 1952. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0508-3443/3/3/302>.

CPKELCO. **APRESENTAÇÃO DA EMPRESA – HISTÓRICO PROJETO CPrepara para o FUTURO!** Limeira. Disponível em: <http://www.ciesp.com.br/limeira/files/2019/04/CP-KELCO-1.pdf>.

CSIBA, M.; CLEOPHAX, J.; PETIT, S.; GERO, S. D. An Expedient and Practical Three-Step Synthesis of Vitamin C from a Byproduct of the Sugar Industry: The L-Galactono-1,4-lactone Pathway. **Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 25, p. 7281–7282, 1993. DOI: 10.1021/jo00077a062.

DE OLIVEIRA, M. S. R.; WILLMS, A. Extração Diferenciada De Pectina De Frutas Cítricas. **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 1–6, 2016.

DEITOS, A.; KIELING, A. G.; FERNANDES, J. I.; MORAES, C. A. M.; BREHM, F. A. Avaliação do resíduo casca de laranja na obtenção de pectina e óleo essencial. **IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**, March 2015, p. 1–9, 2014.

DI MATTEO, A.; SACCO, A.; ANACLERIA, M.; PEZZOTTI, M.; DELLEDONNE, M.; FERRARINI, A.; FRUSCIANTE, L.; BARONE, A. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. **BMC plant biology**, v. 10, p. 163, 2010. DOI: 10.1186/1471-2229-10-163.

DRANCA, F.; OROIAN, M. Extraction, purification and characterization of pectin from alternative sources with potential technological applications. **Food Research International**, v. 113, p. 327–350, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.06.065.

EMBRAPA. **Citros: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 1ª Edição ed. Brasília.

ETEBU, E.; NWAUZOMA, A. B. A review on sweet orange (*Citrus sinensis*): health, diseases and management. **American Journal of Research Communication**, v. 2, n. 2, p. 33–70, 2014. Disponível em: www.usa-journals.com.

FANI, M. Reologia dos Hidrocolóides. **Aditivos & Ingredientes**, São Paulo, p. 34–40, 2017. Disponível em: https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201703/2017030751233001488809162.pdf.

FARIAS, F. C. **CARACTERIZAÇÃO DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PÉCTICOS**. 2014. Universidade Federal do Paraná, 2014.

FAZIO, S. A.; UHLINGER, D. J.; PARKER, J. H.; WHITE, D. C. Estimations of uronic acids as quantitative measures of extracellular and cell wall polysaccharide polymers from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1151–1159, 1982. DOI: 10.1128/aem.43.5.1151-1159.1982.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Pectinas: Propriedades E Aplicações. **Food Ingredients Brasil**, v. 29, p. 46–53, 2014.

FRACASSO, A. F.; PERUSSELLO, C. Augusto; CARPINÉ, D.; PETKOWICZ, C. L. O.; HAMINIUK, Charles Windson Isidoro. Chemical modification of citrus pectin: Structural, physical and rheological implications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.109, p.784–792, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.060.

FUNDECITRUS. **REESTIMATIVA DA SAFRA DE LARANJA 2019-20 DO CINTURÃO CITRÍCOLA DE SÃO PAULO E TRIÂNGULO-SUDESTE MINEIRO - CENÁRIO EM FEVEREIRO-2020**.

GHASSEMI, M.; SHAHIDIAN, A. Fluid mechanics. *In*: **Nano and Bio Heat Transfer and Fluid Flow**. v.1, p. 57–87. DOI: 10.1016/B978-0-12-803779-9.00004-2.

GRAND VIEW RESEARCH. **Polyethylene Terephthalate Market Size, Share & Trends Analysis Report, By Application (Packaging, Films & Sheets)**. 2019. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/polyethylene-terephthalate-market>. Acesso em: 16 ago. 2020.

GRASDALEN, Hans; EINAR BAKØY, Ole; LARSEN, Bjørn. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by 1H-NMR. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v.184, n.C, p.183–191, 1988. DOI: 10.1016/0008-6215(88)80016-8.

GUO, M. Q.; HU, X.; WANG, C.; AI, L. Polysaccharides: Structure and Solubility. **Solubility of Polysaccharides**, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.71570.

GURJÃO, F. F.; CARNEIRO, G. G.; PESSOA, T.; SILVA, D. R. S.; MIRANDA, D. S. A. Rheological properties of hog plum yogurt marketed in Campina Grande, Paraíba state. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 11, n. 3, p. 0–1, 2017.

GUSAKOV, A. V.; MARKOV, A. V.; GRISHUTIN, S. G.; SEMENOVA, M. V.; KONDRATYEVA, E. G.; SINITSYN, A. P. Viscometric method for assaying of total endodepolymerase activity of pectinases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, n. 6, p. 676–682, 2002. DOI: 10.1023/A:1016102522747.

HERBSTREITH & FOX. **Pectin in Preventive Nutrition and Therapy**. 2009. Disponível em: <https://docplayer.net/14778491-From-research-development-pectins-in-preventive-nutrition-and-therapy.html>.

IMARC. **Pectin Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2020-2025**. Disponível em: <https://www.imarcgroup.com/pectin-technical-material-market-report>.

JACOB, N.; NILADEVI, K. N.; ANISHA, G. S.; PREMA, P. Hydrolysis of pectin: An enzymatic approach and its application in banana fiber processing. **Microbiological Research**, v. 163, n. 5, p. 538–544, 2008. DOI: 10.1016/j.micres.2006.07.016.

JAKÓB, A.; BRYJAK, J.; POLAKOVIČ, M. Selection of a method for determination of activity of pectinolytic enzymes in berry fruit materials. **Chemical Papers**, v. 63, n. 6, p. 677–682, 2009. DOI: 10.2478/s11696-009-0065-z.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931–2944, 2005. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.03.026.

JENSEN, S. V.; SORENSEN, S. O.; ROLIN, C. **PROCESS FOR EXTRACTION OF PECTIN**, Patent Number: WO/2012/167963, 2012.

JEONG, D.; YE, S.; PARK, H.; KIM, S. R. Simultaneous fermentation of galacturonic acid and five-carbon sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 295, n. September 2019, p. 122259, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122259.

KAYA, M.; SOUSA, A. G.; CRÉPEAU, M. J.; SØRENSEN, S. O.; RALET, Marie Christine. Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: Influence of acid type and pH of extraction. **Annals of Botany**, 2014. DOI: 10.1093/aob/mcu150.

KERTESZ, Z. I. The pectic substances. **Interscience**, v. 12, n. 1, p. 34, 1951.

KOTHANDARAMAN, G. P.; RAVICHANDRAN, V.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M.; JAYAKRISHNAN, A. Anti-fungal and anti-leishmanial activities of pectin-amphotericin B conjugates. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.02.010.

KRAVTCHENKO, T. P.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, n. 1, p. 17–25, 1992. DOI: 10.1016/0144-8617(92)90183-Q.

KROG-MIKKELSEN, I.; HELS, O.; TETENS, I.; HOLST, J. J.; ANDERSEN, J. R.; BUKHAVE, K. The effects of L-arabinose on intestinal sucrase activity: Dose-response studies in vitro and in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 2, p. 472–478, 2011. DOI: 10.3945/ajcn.111.014225.

KUIVANEN, J.; MOJZITA, D.; WANG, Y.; HILDITCH, S.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P.; WIEBE, M. G. Engineering filamentous fungi for conversion of D-galacturonic acid to L-galactonic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 24, p. 8676–8683, 2012. DOI: 10.1128/AEM.02171-12.

KUTE, A. B.; MOHAPATRA, De.; KOTWALIWALE, N.; GIRI, S. K.; SAWANT, B. P. Characterization of Pectin Extracted from Orange Peel Powder using Microwave-Assisted and Acid Extraction Methods. **Agricultural Research**, 2019. DOI: 10.1007/s40003-019-00419-5.

LADANIYA, M. S. Fruit morphology, anatomy and physiology. *In*: **Citrus Fruit**. p. 103–124.

LARA-ESPINOZA, C.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; BALANDRÁN-QUINTANA, R.; LÓPEZ-FRANCO, Y.; RASCÓN-CHU, A. Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018. DOI: 10.3390/molecules23040942.

LECLERE, L.; CUTSEM, P. V.; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4 OCT, n. October, p. 1–8, 2013. DOI: 10.3389/fphar.2013.00128.

LEWKOWSKI, J. Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethyl-furfural and its derivatives. **Arkivoc**, p.17–54, 2001. DOI: 10.3998/ark.5550190.0002.102.

LI, X.; WU, D.; LU, T.; YI, G.; SU, H.; ZHANG, Y. Highly efficient chemical process to convert mucic acid into adipic acid and DFT studies of the mechanism of the rhenium-catalyzed deoxydehydration. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 16, p. 4200–4204, 2014. DOI: 10.1002/anie.201310991.

LIN, D.; LOPEZ-SANCHEZ, P.; GIDLEY, M.I J. Interactions of pectins with cellulose during its synthesis in the absence of calcium. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 57–68, 2016. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.06.004.

M'SAKNI, N. H.; MAJDOUB, H.; ROUDESLE, S.; PICTON, L.; LE CERF, D.; RIHOUEY, C.; MORVAN, Cl. Composition, structure and solution properties of polysaccharides extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. **European Polymer Journal**, v. 42, n. 4, p. 786–795, 2006. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2005.09.014.

MARÍN, F. R.; SOLER-RIVAS, C.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 736–741, 2007. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.04.040.

MARKETS AND MARKETS. **Pectin Market by Type (HM Pectin, LM Pectin), Raw Material (Citrus fruits, Apples, Sugar beet), Function, Application (Food & beverages, Pharmaceutical & Personal Care Products, Industrial Applications), and Region - Global Forecast to 2025**. 2018. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pectin-market-139129149.html>.

MARTINS, L. C.; MONTEIRO, C. C.; SEMEDO, P. M.; SÁ-CORREIA, I. Valorisation of pectin-rich agro-industrial residues by yeasts: potential and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 6527–6547, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10697-7.

MATSUBARA, T.; KATAOKA, M.; KISHIDA, M. Basidiomycotic yeast *Cryptococcus diffluens* converts L-galactonic acid to the compound on the similar metabolic pathway in ascomycetes. **Fermentation**, v. 5, n. 3, p. 1–8, 2019. DOI: 10.3390/fermentation5030073.

MICARD, V.; GRABBER, J. H.; RALPH, J.; RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J. F. Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 7, p. 1365–1368, 1997.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MINJARES-CARRANCO, A.; TREJO-AGUILAR, B. A.; AGUILAR, G.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 1, p. 25–31, 1997. DOI: 10.1016/S0141-0229(96)00212-8.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008. DOI: 10.1016/j.pbi.2008.03.006.

MOJZITA, D.; WIEBE, M.; HILDITCH, S.; BOER, H.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Metabolic engineering of fungal strains for conversion of D-galacturonate to meso-Galactarate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 169–175, 2010. DOI: 10.1128/AEM.02273-09.

MORRIS, G. A.; FOSTER, T. J.; HARDING, S. E. The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 3, p. 227–235, 2000. DOI: 10.1016/S0268-005X(00)00007-2.

MÜLLER-MAATSCH, J.; CALIGIANI, A.; TEDESCHI, T.; ELST, K.; SFORZA, S. Simple and validated quantitative ¹H NMR method for the determination of methylation, acetylation, and feruloylation degree of pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 37, p. 9081–9087, 2014. DOI: 10.1021/jf502679s.

MUNARIN, F.; PETRINI, P.; GENTILINI, R.; PILLAI, R. S.; DIRÈ, S.; TANZI, M. C.; SGLAVO, V. M. Micro- and nano-hydroxyapatite as active reinforcement for soft biocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 199–209, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.050.

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681–689, 2012. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002.

MUTLU, M.; SAR, K.; DEMIR, N.; ERCAN, M. T.; ACAR, J. Use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. **Journal of Food Engineering**, v. 41, n. 3, p. 147–150, 1999. DOI: 10.1016/S0260-8774(99)00088-6.

NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; MALFA, S. La; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 1155–1166, 2000. DOI: 10.1007/s001220051419.

NISHIYAMA, R.; INOUE, A.; OJIMA, T. Identification of 2-keto-3-deoxy-D-gluconate kinase and 2-keto-3-deoxy-D-phosphogluconate aldolase in an alginate-assimilating bacterium, *Flavobacterium sp.* strain UMI-01. **Marine Drugs**, v. 15, n. 2, p. 1–17, 2017. DOI: 10.3390/md15020037.

NOREEN, A.; NAZLI, Z.; AKRAM, J.; RASUL, I.; MANSHA, A.; YAQOOB, N.; IQBAL, R.; TABASUM, S.; ZUBER, M.; ZIA, K. M. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 254–272, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.029.

NUSSINOVITCH, A. **Hydrocolloid Applications**. 1ª Edição ed. Israel: Chapman & Hall, 1997. DOI: 10.1007/978-1-4615-6385-3.

ONGARATTO, R. S.; VIOTTO, L. A. Efeito do tratamento enzimático sobre a viscosidade e os teores de fibra e pectina em suco de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 3, p. 231–238, 2015. DOI: 10.1590/1981-6723.5514.

OWENS, H. S.; LOTZKAR, H.; SCHULTZ, T. H.; MACLA, W. D. Shape and Size of Pectinic Acid Molecules Deduced from Viscometric Measurements. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 68, p. 1628–1632, 1946. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review **Biotech**, 2018. DOI: 10.1007/s13205-018-1220-4.

POURBAFRANI, M.; FORGÁCS, G.; HORVÁTH, I. S.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4246–4250, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.077.

PRABASARI, I.; PETTOLINO, F.; LIAO, M. L.; BACIC, A. Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 484–494, 2011. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.12.012.

PROTZKO, R. J.; LATIMER, L. N.; MARTINHO, Z.; DE REUS, E.; SEIBERT, T.; BENZ, J. P.; DUEBER, J. E. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for co-utilization of D-galacturonic acid and D-glucose from citrus peel waste. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-07589-w.

QUIMIBRÁS. **Matéria-prima para Indústrias Farmacêuticas, Alimentícias e Cosméticas**. 2020. Disponível em: http://www.quimibras.com.br/homepage/produtos/dyne_todos.html.

RAO, M. A. **Rheological behavior of food gels**. DOI: 10.1007/978-1-4614-9230-6_6.

RICHARD, P.; HILDITCH, S. D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 597–604, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-1870-6.

RODRIGUEZ-NOGALES, Jo. M.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Pectin hydrolysis in a free enzyme membrane reactor: An approach to the wine and juice clarification. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 112–119, 2008. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.057.

ROLAND, J. F.; CAYLE, T.; DINWOODIE, R. C.; MEHNERT, D. W. **Fermentation production of ascorbic acid from L-galactonic substrate**, Patent Number: 4,595,659, 1986.

ROMÁN, Y.; BARDDAL, H. P. O.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L.; CIPRIANI, T. R. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 731–739, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.06.110.

ROSENBOHM, C.; LUNDT, I.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; YOUNG, N. W. G. Chemically methylated and reduced pectins: Preparation, characterization by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 7, p. 637–649, 2003. DOI: 10.1016/S0008-6215(02)00440-8.

RUANO, P.; LISMET, L. D; PICCO, S.; VILLEGAS, L.; TONELLI, F.; MERLO, M. E. A.; RIGAU, J.; DIAZ, D.; MASUELLI, M. Extraction and Characterization of Pectins From Peels of Criolla Oranges (*Citrus sinensis*): Experimental Reviews. **IntechOpen**, p. 1–44, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/57353>. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>.

SABERIAN, H.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; AHMADI GAVLIGHI, H.; BARZEGAR, M. Optimization of pectin extraction from orange juice waste assisted by ohmic heating. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 117, n. September 2016, p. 154–161, 2017. DOI: 10.1016/j.cep.2017.03.025.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. J. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213–294, 1993.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. ARTLIBER ed. São Paulo.

SECEX. **Exportações totais de suco de laranja em toneladas de FCOJ**. Disponível em: http://www.citrusbr.com/download/Relatorio_MARCO_2020_ano-safra.pdf.

SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Pectins: structure, functionality, and uses. *In*: STEPHEN, A. M.; PHILIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (org.). **Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition**. p. 353–411.

SILVA, S. S.; CARVALHO, R. R.; FONSECA, J. L. C.; GARCIA, R. B. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, n. 2, p. 25–33, 1998. DOI: 10.1590/s0104-14281998000200005.

SOLÍS, S.; LOEZA, J.; SEGURA, G.; TELLO, J.; REYES, N.; LAPPE, P.; GUITÉRREZ, L.; RÍOS, F.; HUITRÓN, C. Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase-overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niveus* CH-Y-1043. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 3, p. 123–128, 2009. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2008.11.003.

SOUSA, A. G.; NIELSEN, H. L.; ARMAGAN, I.; LARSEN, J.; SØRENSEN, S. O. The impact of rhamnogalacturonan-I side chain monosaccharides on the rheological properties of citrus pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 130–139, 2015. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.013.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2ª Edition ed. East Lansing. DOI: 10.1016/b978-1-4832-3245-4.50016-9.

STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition**.

STOCK, D. **Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido**. 2013. Universidade Federal do Paraná, 2013.

STOCK, D.; BIZ, A.; DE PAULA, D. H. F.; RICHARD, P.; GONÇALVES, A. G.; NOSEDA, M. D.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Conversion of citric pectin into D-galacturonic acid with high substrate loading using a fermented solid with pectinolytic activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 214–219, 2017. DOI: 10.1016/j.bcab.2017.07.003.

SUN, A.; GUNASEKARAN, S. Yield stress in foods: Measurements and applications. **International Journal of Food Properties**, v. 12, n. 1, p. 70–101, 2009. DOI: 10.1080/10942910802308502

TAGAWA, K.; KAJI, A. Polygalacturonase from *Corticium rolfsii*. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 361–365, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61041-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61041-X).

THEUWISSEN, E.; MENSINK, R. P. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. **Physiology and Behavior**, v. 94, n. 2, p. 285–292, 2008. DOI: 10.1016/j.physbeh.2008.01.001.

THIBAUT, P. J. F.; SAULNIER, L.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. Difficultés expérimentales de l'étude des macromolécules pectiques. **Bulletin de la Societe Botanique de France. Actualites Botaniques**, v. 138, n. 3–4, p. 319–337, 1991. DOI: 10.1080/01811789.1991.10827077.

TIWARI, A. K.; SAHA, S. N.; YADAV, V. P. Extraction and Characterization of Pectin from Orange Peels. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 13, n. 1, p. 39–47, 2017.

TORKOVA, A. A.; LISITSKAYA, K. V.; FILIMONOV, I. S.; GLAZUNOVA, O. A.; KACHALOVA, G. S.; GOLUBEV, V. N.; FEDOROVA, T. V. Physicochemical and functional properties of Cucurbita maxima pumpkin pectin and commercial citrus and apple pectins: A comparative evaluation. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–24, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0204261.

UMSZA-GUEZ, M. A.; RINALDI, R.; LAGO-VANZELA, E. S.; MARTIN, N.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; THOMÉO, J. C. Effect of pectinolytic enzymes on the physical properties of caja-manga (*Spondias cytherea* Sonn.) pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 517–526, 2011. DOI: 10.1590/s0101-20612011000200037.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; AEBI, M.; PACKER, N. H.; SEEBERGER, P. H.; ESKO, J. D.; STANLEY, P.; HART, G.; DARVILL, A.; KINOSHITA, T.; PRESTEGARD, J. J.; SCHNAAR, R. L.; FREEZE, H. H.; MARTH, J. D.; BERTOZZI, C. R.; ETZLER, M. E.; FRANK, M.; VLIAGENTHART, J. F. G.; LÜTTEKE, T.; PEREZ, S.; BOLTON, E.; RUDD, P.; PAULSON, J.; KANEHISA, M.; TOUKACH, P.; AOKI-KINOSHITA, K. F.; DELL, A.; NARIMATSU, H.; YORK, W.; TANIGUCHI, N.; KORNFELD, S. Symbol nomenclature for graphical representations of glycans. **Glycobiology**, v. 25, n. 12, p. 1323–1324, 2015. DOI: 10.1093/glycob/cwv091.

VENZON, S. S.; CANTERI, M. H. G.; GRANATO, D.; DEMCZUK, Bo.; MACIEL, G. M.; STAFUSSA, A. P.; HAMINIUK, C. W. I. Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4102–4112, 2015. DOI: 10.1007/s13197-014-1419-2.

VIDGREN, Vi; HALINEN, S.; TAMMINEN, A.; OLENIUS, S.; WIEBE, M. G. Engineering marine fungi for conversion of D-galacturonic acid to mucic acid. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1186/s12934-020-01411-3.

VITYAZEVA, F. V.; FEDYUNEVA, M. I.; GOLOVCHENKO, V. V.; PATOVA, O. A.; IPATOVA, E. U.; DURNEV, E. A.; MARTINSON, E. A.; LITVINETS, S. G. Pectin-silica gels as matrices for controlled drug release in gastrointestinal tract. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 9–20, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.09.048.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263–275, 2009. DOI: 10.1007/s11224-009-9442-z.

VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; PETKOWICZ, C. L. O. Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. **LWT - Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 108–116, 2012. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.04.018.

VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; PETKOWICZ, C. L. O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1230–1236, 2011. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.01.009.

WERPY, T.; PETERSEN, G. **Top Value-Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. Office of Scientific and Technical Information, 2004. DOI: 10.2172/15008859. Disponível em: <https://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>.

WIDMER, W.; ZHOU, W.; GROHMANN, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5242–5249, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.038.

WILLIAM, S. A. **Production of Mucic Acid**, Patent Number: 1,718,837, 1929.

YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373–385, 2011. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.05.065. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711004450>.

YEOH, S.; SHI, J.; LANGRISH, T. A. G. Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. **Desalination**, v. 218, n. 1–3, p. 229–237, 2008. DOI: 10.1016/j.desal.2007.02.018.

YULIARTI, O.; HOON, A. L. S.; CHONG, S. Y. Influence of pH, pectin and Ca concentration on gelation properties of low-methoxyl pectin extracted from *Cyclea barbata* Miers. **Food Structure**, v. 11, p. 16–23, 2017. DOI: 10.1016/j.foostr.2016.10.005.

ZANELLA, K. **EXTRAÇÃO DA PECTINA DA CASCA DA LARANJA- PERA (*Citrus sinensis* L. Osbeck) COM SOLUÇÃO DILUÍDA DE ÁCIDO CÍTRICO**. 2013. Universidade Estadual de Campinas, 2013.

ZEMA, D. A.; CALABRÒ, P. S.; FOLINO, A.; TAMBURINO, V.; ZAPPIA, G.; ZIMBONE, S. M. Valorisation of citrus processing waste: A review. **Waste Management**, v. 80, p. 252–273, 2018. DOI: 10.1016/j.wasman.2018.09.024.

APÊNDICE

PATENTE

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

RESUMO

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

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

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

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

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

{004}. A hidrólise da pectina para produzir D-GalA pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos. Na hidrólise química, são utilizados ácidos, como os clorídrico e sulfúrico, em altas temperaturas (80 a 100 °C) e baixos valores de pH (1,0 a 3,0) [8]. Contudo, nestas condições, D-GalA pode ser degradado em lactonas e furfuranos, perdendo o seu valor econômico [9] [10].

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

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

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

{008}. Para evitar estes problemas, o ácido cítrico tem sido utilizado para substituir os ácidos oxálico e nítrico na extração de pectina. O ácido cítrico pode ser considerado um solvente ecológico, sendo um dos ácidos orgânicos encontrados em

limões e laranjas e classificado como ácido fraco, de alta solubilidade em água e biodegradável [16] [17].

{009}. Além de reduzir o impacto ambiental, a utilização do ácido cítrico no processo de extração da pectina é mais adequada para a indústria alimentícia, uma vez que a despolimerização e degradação da pectina são menores visto que os ácidos orgânicos possuem capacidade de hidrólise inferior em relação aos ácidos minerais por serem ácidos fracos [14]–[16] [18] [19].

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

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

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

{013}. A viscosidade cinemática, que é viscosidade medida através do escoamento decorrente da força da gravidade, determinada através da utilização de viscosímetros capilares também pode ser uma ferramenta para determinar a atividade de pectinases, através da redução da viscosidade relativa. Contudo, esse método é recomendado apenas para baixas concentrações de pectina, variando de 0,1% até 2,0% (m/v). Este método precisa de concentrações reduzidas pois, devido à alta viscosidade das dispersões de pectina em altas concentrações, pode causar o entupimento do capilar. Porém, a baixa concentração de pectina pode levar a erros na determinação da atividade, visto que não irá representar o efeito real da atividade

em altas concentrações. Para estas análises, há necessidade da utilização de variados volumes de dispersão de pectina e tempos de reação, que podem variar, respectivamente, de 1 mL até 18 mL, com duração de 5 min até 15 min [26][27].

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

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

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

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

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

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

Onde:

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

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

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

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

{020}. O trabalho de 1999, intitulado como "*Use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity*" [26] descreve a elaboração de uma metodologia viscosimétrica para quantificar a atividade enzimática e determinar os parâmetros cinéticos de um extrato enzimático comercial (Pectinex Ultra SP-L) em dispersão de pectina. Contudo, neste trabalho é utilizado um viscosímetro para determinar a viscosidade aparente. Deste modo, este trabalho também não apresenta similaridade com este pedido de patente, visto que na presente solicitação a viscosidade é determinada através da utilização de um reômetro rotacional, no qual o resultado principal é a viscosidade complexa.

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

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

{023}. O trabalho de 2009, intitulado como “*Selection of a method for determination of activity of pectinolytic enzymes in berry fruit materials*” [24] descreve diferentes métodos para determinar atividade enzimática de produtos de frutas silvestres em diferentes concentrações, entres eles o método colorimétrico e o de redução da viscosidade. Contudo, para a determinação da atividade enzimática, foi utilizado um viscosímetro para determinar a redução da viscosidade aparente. Este documento não apresenta coincidência, visto no presente pedido de patente utiliza-se um reômetro rotacional para determinar a viscosidade complexa de dispersões de pectina cítrica para a determinação de atividade de pectinases.

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

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

DESCRIÇÃO DA ABORDAGEM DO PROBLEMA TÉCNICO

{026}. Com base na ação das pectinases sobre a pectina, surgiu a ideia proposta no presente pedido de patente de invenção: “DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE

COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL”. A inovação está no desenvolvimento de um método eficiente que possibilite a determinação da atividade enzimática das pectinases em dispersões de pectina em concentração de até 5,0% (m/v), utilizando um baixo volume de amostra (3 mL), em tempo real e de maneira rápida (< 2 minutos).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

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

{028}. Com relação à etapa **1)**, extração da pectina, a extração com ácido cítrico foi realizada para extrair pectina do bagaço de laranja úmido. O bagaço de laranja úmido (200 g) foi submetido a tratamento com 99% de etanol (1:9) sob refluxo durante 30 min a 80 °C, fornecendo o extrato etílico e os resíduos insolúveis em álcool (AIR). Os extratos ácidos foram extraídos do AIR com 5,0% (m/v) de ácido cítrico (1:12), pH 2,0 durante 2 h a 80 °C. Os extratos ácidos foram obtidos por centrifugação (5.000 rpm; 20 min a 10 °C), dialisados em água ultra pura durante 72 h (6-8 kDa), e depois tratados com 99% de etanol (3:1, v/v) para precipitar a pectina. O precipitado foi liofilizado durante 24 h a - 45 °C e 0,1 mbar.

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

De acordo com a dosagem colorimétrica, a quantidade de D-GalA presente na pectina extraída do bagaço de laranja úmido e da pectina do padrão analítico foram de 69% e 79% (m/m), respectivamente.

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

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

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

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

{034}. Em relação à etapa **4)**, solubilização da enzima, para realização dos experimentos foi utilizado o extrato comercial de pectinase citado em {030}, diluído em

tampão 0,2 mol L⁻¹ pH 4,5 de acetato de sódio. A enzima foi diluída na razão de 1:1000 para os testes em concentração de 5,0% (m/v) de pectina.

{035}. Em relação à etapa **5**), determinação dos parâmetros da análise reológica, foram selecionados os parâmetros para as análises em sistema oscilatório dinâmico (tensão e frequência oscilatórias fixadas em 0,1 Pa e 1,0 Hz, respectivamente) para monitorar a variação da viscosidade complexa durante a hidrólise enzimática das amostras de pectina. Esta análise reológica foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Beux [32] e Esteves *et al.* [30], com modificações. Os experimentos foram realizados como descrito abaixo {036}, com concentração de pectina de 5,0% (m/v) das amostras de pectina extraída do bagaço úmido de laranja e padrão analítico de pectina cítrica (Sigma-Aldrich).

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

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

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

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

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

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

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

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

{002}. Ainda na etapa 8), as análises dos hidrolisados no HPLC após 100 segundos de reação (tempo na qual a viscosidade complexa já estava estabilizada) mostraram um teor de 0,33 mg mg⁻¹ (mg de D-GalA/mg de pectina) para a amostra de pectina extraída do bagaço úmido de laranja na concentração de 5,0% (m/v). Já em relação ao padrão analítico, os teores de D-GalA foram de 0,45 mg mg⁻¹ na

concentração de 5,0% (m/v). Ressalta-se a inexistência de D-GalA livre nas dispersões de pectina antes da hidrólise enzimática.

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

{004}. Em relação na etapa **9**), atividade enzimática a partir da geração de D-GalA, usualmente considera-se que uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de substrato por minuto sob condições padrão de temperatura, pH e demais variáveis. Contudo, muitas enzimas utilizadas na indústria são impuras, dificultando a quantificação de proteína ativa responsável pela transformação do substrato. Deste modo, a concentração destas enzimas comerciais é determinada em unidades por mL de extrato enzimático. Assim, nota-se que as unidades de atividade enzimática são definidas de diversas maneiras para enzimas diferentes e podem ter diferentes definições para a mesma enzima em condições reacionais e contextos diferentes (MUTLU et al., 1999).

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

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

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

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

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

Onde:

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

P_{GalA} = Ácido galacturônico gerado (μmol)

t = Tempo de reação (min)

V_E = Volume de extrato enzimático utilizado (mL)

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

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

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

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

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

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

Onde:

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

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

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

V_E = Volume de extrato enzimático utilizado (mL)

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

{011}. Diante dos resultados obtidos descritos nos parágrafos anteriores, pode-se considerar que o método para medir a atividade de pectinases em dispersões de pectina através de análise em reômetro rotacional, descrito nesta patente, é vantajoso no que diz respeito às condições operacionais, citadas em {010, 012-015 e 017}, e à eficiência em se monitorar a atividade da enzima pela queda de viscosidade complexa {038-040}, que se correlaciona bem com a produção de D-GalA {042}. Além disso, permitiu rapidamente o cálculo para atividade enzimática {046 e 049} com base na redução da viscosidade complexa inicial {038}, utilizando um volume de 3 mL de dispersão de pectina em uma concentração de 5,0% (m/v) em menos de 2 minutos de reação.

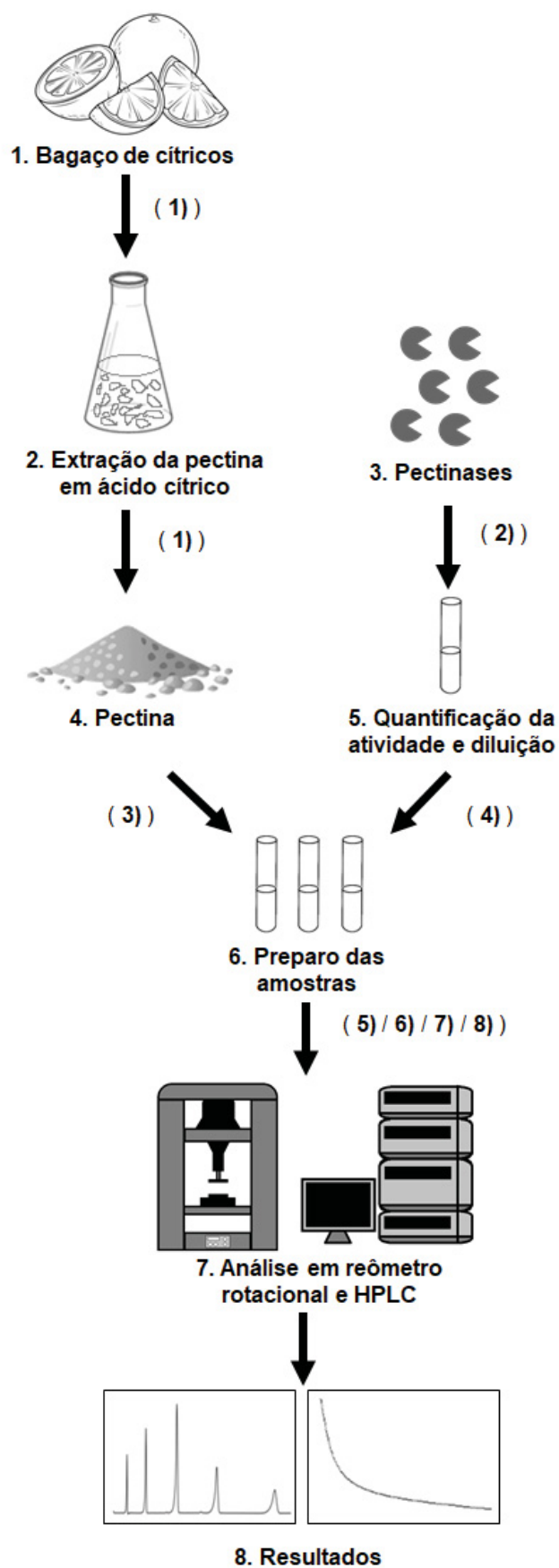


Figura 1

REIVINDICAÇÕES

1. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL, caracterizada pela utilização de parâmetros reológicos obtidos em sistema oscilatório dinâmico de reômetro rotacional, a partir da análise da queda da viscosidade complexa de dispersões de pectina, preferencialmente de origem cítrica, mas que pode ser utilizada para outras fontes de pectina.

2. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela redução significativa da viscosidade complexa nas amostras de pectina cítrica, mas não limitada a esta fonte de pectina, em tempo reacional reduzido (menos de dois minutos) e com baixo volume de amostra (3 mL).

3. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela utilização de dispersões de pectina cítrica de 5% (m/v), mas não limitada a esta concentração, podendo ser utilizada com pectina de outras fontes.

4. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada pela rapidez da análise e pela correlação com a produção de ácido D-galacturônico durante a hidrólise de dispersões de pectina cítrica, podendo ser utilizada com pectina de outras fontes.

5. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL, de acordo com as reivindicações 1 e 4, com a redução da viscosidade complexa que pode ser utilizada para acompanhamento da produção de ácido D-galacturônico por hidrólise enzimática de amostras de pectina cítrica, mas não limitada a esta fonte de pectina.

6. METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ATRAVÉS DA REDUÇÃO DA VISCOSIDADE COMPLEXA EM REÔMETRO ROTACIONAL, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser uma metodologia que possibilita simultaneamente a determinação da atividade pectinolítica e acompanhamento da produção de ácido D-galacturônico em tempo real, pela análise da queda da viscosidade complexa de dispersões de pectina cítrica, podendo ser utilizada com pectina de outras fontes.

REFERÊNCIAS

- [1] A. G. J. Voragen, G. J. Coenen, R. P. Verhoef, and H. A. Schols, "Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls," *Struct. Chem.*, vol. 20, no. 2, pp. 263–275, 2009.
- [2] S. Y. Chan, W. S. Choo, D. J. Young, and X. J. Loh, "Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology," *Carbohydr. Polym.*, vol. 161, pp. 118–139, 2017.
- [3] F. Naqash, F. A. Masoodi, S. A. Rather, S. M. Wani, and A. Gani, "Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 168, pp. 227–239, 2017.
- [4] A. Noreen *et al.*, "Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 101, pp. 254–272, 2017.
- [5] B. M. Yapo, "Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model," *Carbohydr. Polym.*, vol. 86, no. 2, pp. 373–385, 2011.
- [6] J. Kuivanen *et al.*, "Conversion of orange peel to L-galactonic acid in a consolidated process using engineered strains of aspergillus niger," *AMB Express*, vol. 4, no. 1, pp. 1–8, 2014.
- [7] P. Richard and S. Hilditch, "D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 82, no. 4, pp. 597–604, 2009.
- [8] P. Ruano *et al.*, "Extraction and Characterization of Pectins From Peels of Criolla Oranges (*Citrus sinensis*): Experimental Reviews," *IntechOpen*, pp. 1–44, 2019.
- [9] S. A. Fazio, D. J. Uhlinger, J. H. Parker, and D. C. White, "Estimations of uronic acids as quantitative measures of extracellular and cell wall polysaccharide polymers from environmental samples," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 43, no. 5, pp. 1151–1159, 1982.
- [10] G. N. Blake, J.D.; Richards, "Problems of Lactonisation in the analysis of uronic acids," *Carbohydr. Res.*, vol. 28, pp. 275–281, 1968.
- [11] D. Stock *et al.*, "Conversion of citric pectin into D-galacturonic acid with high substrate loading using a fermented solid with pectinolytic activity," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 11, pp. 214–219, 2017.
- [12] A. Minjares-Carranco, B. A. Trejo-Aguilar, G. Aguilar, and G. Viniestra-González, "Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 21, no. 1, pp. 25–31, 1997.
- [13] M. S. R. De Oliveira and A. Willms, "Extração Diferenciada De Pectina De Frutas Cítricas," *XXV Congr. Bras. Ciência e Tecnol. Aliment.*, pp. 1–6, 2016.
- [14] S. V. Jensen, S. O. Sorensen, and C. Rolin, "PROCESS FOR EXTRACTION OF PECTIN," Patent Number: WO/2012/167963, 2012.
- [15] H. C. Buchholt, "PROCESS FOR EXTRACTION OF PECTIN," Patent Number: WO/2016/202986, 2016.
- [16] F. H. Verhoff, "Citric acid," *Miles Lab.*, pp. 1–6, 2005.
- [17] E. R. Pinheiro *et al.*, "Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, pp. 5561–5566, 2008.

- [18] A. M. Stephen, G. O. Phillips, and P. A. Williams, *Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition*. 2016.
- [19] P. Henrique *et al.*, "Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 88, pp. 373–379, 2016.
- [20] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.
- [21] G. Schramm, *Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos*, ARTLIBER. São Paulo, 2006.
- [22] R. Brummer, *Rheology essentials of cosmetic and food emulsions*. Berlin, 2006.
- [23] M. K. Patidar, S. Nighojkar, A. Kumar, and A. Nighojkar, "Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review," *3 Biotech*, vol. 8, no. 199, pp. 1–24, 2018.
- [24] A. Jakób, J. Bryjak, and M. Polakovič, "Selection of a method for determination of activity of pectinolytic enzymes in berry fruit materials," *Chem. Pap.*, vol. 63, no. 6, pp. 677–682, 2009.
- [25] A. V. Gusakov, A. V. Markov, S. G. Grishutin, M. V. Semenova, E. G. Kondratyeva, and A. P. Sinitsyn, "Viscometric method for assaying of total endodepolymerase activity of pectinases," *Biochem.*, vol. 67, no. 6, pp. 676–682, 2002.
- [26] M. Mutlu, K. Sar, N. Demir, M. T. Ercan, and J. Acar, "Use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity," *J. Food Eng.*, vol. 41, no. 3, pp. 147–150, 1999.
- [27] M. Mahmoodi, G. D. Najafpour, and M. Mohammadi, "Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, no. 12, pp. 4123–4128, 2017.
- [28] J. F. Steffe, *Rheological methods in food process engineering*, 2^a Edition. East Lansing, 1992.
- [29] R. G. Larson, *The structure and rheology of complex fluids*. New York, 1999.
- [30] C. L. C. Esteves, J. A. Lucey, and E. M. V. Pires, "Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin," *Int. Dairy J.*, vol. 12, pp. 427–434, 2002.
- [31] N. Blumenkrantz and G. Asboe-Hansen, "New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids," *Anal. Biochem.*, vol. 54, pp. 484–489, 1973.
- [32] S. Beux, "Avaliação das Propriedades de Coagulação de Leite Bovino In Natura por Parâmetros Latodinamográficos e Reológicos," *Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Paraná*, 2017.