

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LÚCIA CRISTINA VRIESMANN

**PECTINAS DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (*Theobroma cacao* L.):
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

CURITIBA

2012

LÚCIA CRISTINA VRIESMANN

**PECTINAS DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (*Theobroma cacao* L.):
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Vriesmann, Lúcia Cristina

Pectinas da casca dos frutos do cacau (*Theobroma cacao* L.):
otimização da extração e caracterização. / Lúcia Cristina Vriesmann. –
Curitiba, 2012.

170 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Pectina 2. Cacau I. Título II. Petkowicz, Carmen Lucia de Oliveira
III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192482
583.19

TERMO DE APROVAÇÃO

LÚCIA CRISTINA VRIESMANN

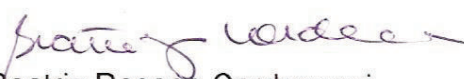
PECTINAS DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (*Theobroma cacao* L.):
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



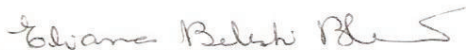
Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz (Orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - USP



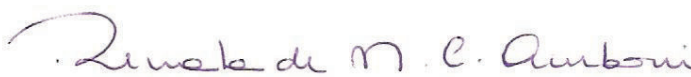
Dra. Eliana Beleski Borba Carneiro

Departamento de Química - UEPG



Dra. Joana Lea Meira Silveira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFSC

Curitiba, 30 de agosto de 2012.

**Ao João Luiz, meu porto seguro,
À Melissa, pedacinho de mim,
Aos meus familiares.**

Com imenso amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por sempre me acompanhar e proteger, e por guiar meus passos, permitindo que eu chegasse até aqui.

À UFPR e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, pela oportunidade, e aos professores, por compartilharem seu conhecimento.

À minha orientadora, prof^a. Carmen, por acreditar em mim desde que cheguei à Curitiba, pela dedicação, exemplo e disponibilidade, pela confiança no meu trabalho, pelo incentivo ao estudo das pectinas da casca do cacau, pelas correções cuidadosas dos meus artigos, pelo auxílio na tomada de certas decisões e pela preocupação e compreensão nos momentos em que precisei! (E que não foram poucos durante o Doutorado!) Agradeço também pelo empenho e rapidez na correção da tese, para posterior envio à banca interna.

À CEPLAC, especialmente Miguel Moreno-Ruiz e Adonias de Castro Virgens Filho, pela gentil obtenção e envio das cascas dos frutos do cacau, sem as quais este trabalho não teria sido realizado.

Às professoras Joana e Lucimara, componentes da minha banca interna, pela rápida correção da tese, permitindo que a mesma estivesse pronta para ser defendida em junho/2012. Obrigada pela amizade, incentivo, palavras de conforto, elogios, sugestões e acompanhamento de meu trabalho de Doutorado, e também pelo interesse e preocupação com os acontecimentos de minha vida pessoal. À prof^a. Lucimara também agradeço pela oportunidade de aprendizagem e dicas durante o estágio em docência.

À prof^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela colaboração na análise das cascas do cacau.

Ao prof. Dr. Reinaldo F. Teófilo, da Universidade Federal de Viçosa, pela colaboração no planejamento experimental.

À prof^a. Ruth Meri Lucinda da Silva, da Universidade do Vale do Itajaí, pela colaboração nos experimentos relacionados à obtenção e análises das micropartículas de pectina e fármaco, e à prof^a. Tânia Bresolin, por ter me direcionado a ela.

À prof^a. Célia Regina Cavichiolo Franco, pelo acesso ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR e colaboração nas análises de MEV, bem como aos funcionários do CME da UFPR, que auxiliaram na parte prática da microscopia.

Aos professores Guilherme, Miguel e Andersson, e ao doutorando Arquimedes, por realizarem experimentos de RMN deste trabalho.

Às professoras Maria Rita Sierakowski e Izabel Cristina Riegel, por cederem o reômetro para a realização de parte das análises reológicas deste trabalho, e à Patrícia, Neoli e Clayton, pelo auxílio com o uso do equipamento.

Ao LAMIR e seus funcionários, pela moagem da fração OP deste trabalho.

Ao Departamento de Química da UFPR, pela utilização do FT-IR, do RMN e da balança analítica. Em especial à prof^a. Dr^a. Jaísa Fernandes Soares, e aos professores Dr. Andersson Barison e Dr. Fernando Wypych, e aos alunos de seus laboratórios.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

Em especial ao CNPq, pela bolsa de Doutorado concedida através do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica e pela taxa de bancada, que contribuiu para melhorar a qualidade deste trabalho e permitiu a compra de bens materiais que continuarão auxiliando outros pesquisadores.

A cada membro da banca examinadora, pela disponibilidade e sugestões.

A todos os funcionários do setor de Ciências Biológicas e do Departamento de Bioquímica, que diariamente tornam possível a realização de nossos trabalhos.

Aos professores Eliana e Paulo, orientadores de iniciação científica, por serem os primeiros a acreditar em meu potencial como pesquisadora. Agradeço pelos primeiros ensinamentos, pelo exemplo, dedicação e atenção. Obrigada pela grande amizade construída e por fazer parte da minha vida até hoje!

À professora Fany, pela confiança, preocupação e acolhimento.

À Heide, pela grande amizade, pelas dicas e conversas, pelas palavras e atitudes de conforto e incentivo quando apareciam as dificuldades e problemas.

Ao Rogério, pela amizade, conversas bem-humoradas, convívio e ajuda nos trabalhos no lab ou naqueles envolvendo informática e estatística.

Aos amigos Andréa, Marília e João, pelas conversas, companhia e ajuda no laboratório durante meu Doutorado.

À Regiane, que conquistou meu carinho no pouco tempo que convivemos no lab. Agradeço pela disponibilidade e ajuda no finalzinho do Doutorado!

À Eliz, pelas conversas, amizade e momentos compartilhados, e também pela prontidão em realizar pequenos favores e análises de HPSEC-MALLS. À Rosane, pela amizade e disponibilidade de injetar minhas amostras no GLC e no GLC-MS.

A todos do lab, pelo apoio, cooperação e amizade: Augusto, Karen, Larissa, Maíra, Marina, Monique, Nana, Nicole, Rhayla, Roberto e Suelen, e àqueles que passaram pelo lab 259 da Bioquímica durante a realização deste trabalho.

Aos amigos, colegas e professores dos laboratórios vizinhos, pelo auxílio e empréstimo de materiais.

Em especial, e com muito carinho, à minha família:

Meu esposo, João Luiz, por ser tão especial em minha vida, companheiro de todos os momentos, pelo seu apoio, incentivo, paciência e compreensão nos momentos dedicados ao Doutorado, pelos conselhos, pelas ajudas, pelo carinho e pelo seu imenso amor, demonstrado em todas as situações ou até mesmo nos pequenos detalhes. Amo você imensamente!

Melissa, presente de Deus em nossas vidas! Razão de muita felicidade e grandes mudanças!

Meus pais, Bernadete e Lolke, pelo seu amor, preocupação e pela educação que me deram. Foi por tudo o que me proporcionaram que consegui chegar até aqui, sem dúvida! Amo vocês!

Minha irmã, Leila, por ser a pessoa em quem me espelhava desde a infância! Pelo menos é o que ouço falar! Obrigada pelo apoio, pelas experiências compartilhadas, paciência e amor fraterno!

Meu irmão Lourenço, pelo exemplo de superação e otimismo depois de tudo que passou, por estar aqui entre nós neste momento e fazer com que eu percebesse que a vida é o bem mais precioso que temos, não importa o que aconteça, e que tudo o que passamos é para nos tornar melhores e mais fortes. Obrigada pelo apoio e amor fraterno!

Meus avós, Martha e Bernardo (*in memoriam*), e tios Ana, Lidvina e Pedro, por seu carinho, apoio, preocupação e incentivo, sempre.

Minha nova família: Elisabete, Luiz, Izolda e Lulu, pela preocupação, interesse e apoio.

A todos que torceram por mim ou que contribuíram para a realização deste trabalho, e que de alguma forma eu não tenha citado.

Muito obrigada!!!

Tudo o que a vida nos oferece é para nos deixar mais fortes, mesmo que às vezes a gente custe um pouco a entender. (Autor desconhecido)

RESUMO

A casca dos frutos do cacau (*Theobroma cacao* L., Família Sterculiaceae) é o mais abundante resíduo da indústria cacaueira (~75% do fruto fresco). Estudos prévios mostraram a presença de teores consideráveis de pectinas nas cascas do cacau, de modo que estas poderiam constituir potencial fonte das mesmas. Neste trabalho, utilizou-se planejamento experimental para a extração de pectinas a partir de cascas secas e moídas de frutos do cacau empregando soluções de ácido nítrico e ácido cítrico. Variou-se o pH da solução ácida, a temperatura e o tempo de extração visando maiores rendimentos e pectinas com alto teor de ácidos urônicos. Através de metodologia de análise de superfície de resposta, foram selecionadas condições otimizadas para extração em maior escala. Para elevado teor de ácidos urônicos, as condições de extração selecionadas foram: solução de ácido nítrico em pH 1,5 a 100°C por 30 min, originando a fração OP. Para elevado rendimento, as condições de extração foram: pH 3,5 a 100°C durante 30 min com ácido nítrico, gerando a fração NA-HYP; e pH 3 a 95°C por 95 min com ácido cítrico, originando a fração CA-HYP. As pectinas obtidas foram posteriormente caracterizadas, bem como pectinas extraídas por 90 minutos com água a 50°C e fervente (frações 50W e BW, respectivamente). Todas as pectinas analisadas foram compostas por homogalacturonanas altamente acetiladas e ramnogalacturonanas contendo cadeias laterais constituídas majoritariamente por galactose. A fração OP apresentou pectinas com alto grau de esterificação (HM: DE>50%) e as demais frações foram constituídas por pectinas com baixo grau de esterificação (LM: DE<50%). A fração OP foi empregada para preparar micropartículas contendo ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), fármaco destinado à liberação no cólon intestinal. As micropartículas foram obtidas por *spray dryer* em proporções 1:1; 2:1; 3:1 e 4:1 de OP:5-ASA e apresentaram tamanho inferior a 5µm. Ensaio de liberação *in vitro* mostraram uma tendência de melhor retenção do fármaco quando o teor de pectinas foi aumentado. A capacidade de formação de gel foi testada para todas as frações. Para a fração OP foram inicialmente preparados géis com concentração fixa de amostra (1,32% de ácido galacturônico, GalA, m/m) e de sacarose (60%, m/m) variando-se o pH (2,5-3,3). Após realização das análises reológicas, selecionou-se o pH 2,7 para os experimentos com variação de concentração de OP (0,33 a 1,98% GalA, m/m), mantendo-se fixa a concentração de sacarose em 60% (m/m). Os experimentos oscilatórios dinâmicos a 25°C mostraram a presença de géis em todas as concentrações analisadas e os experimentos rotacionais evidenciaram um comportamento pseudoplástico. Os géis de OP foram influenciados positivamente pelo aumento da concentração de polímero, tanto em termos de viscosidade quanto em relação à força dos géis. Para as pectinas LM, apesar de não haver formação de gel na presença de íons cálcio, houve formação de géis a 0,99% GalA (m/m) na presença de 60% de sacarose e em pH <3,0, havendo uma tendência de formação de géis mais fortes com a redução do pH de 3,0 para 2,5. Os resultados obtidos mostraram que apesar do alto teor de acetyl, as pectinas extraídas de diferentes formas a partir da casca dos frutos do cacau foram capazes de formar gel em condições de baixo pH e alta concentração de sacarose, sugerindo um possível uso como aditivo espessante e gelificante em produtos ácidos. Desta forma, o uso da casca dos frutos do cacau como fonte de pectinas poderia contribuir para um melhor aproveitamento deste abundante resíduo da indústria cacaueira.

Palavras-chave: *Theobroma cacao*. Casca dos frutos do cacau. Planejamento experimental. Metodologia de análise de superfície de resposta. Pectinas. Reologia. Micropartículas. 5-ASA.

ABSTRACT

Cacao pod husk (*Theobroma cacao* L., Sterculiaceae Family) is the main byproduct of cocoa industry (~75% fresh fruit). Previous studies showed the presence of considerable contents of pectins in the pod husks. So, they could be potential source of pectins. In this work, experimental design was employed to extract pectins from dried milled cacao pod husks using nitric or citric acid solutions. Aqueous acid solution pH, temperature and time of extraction were varied aiming higher yields and pectins with high uronic acid content. Through response surface methodology, optimized conditions for extraction on a larger scale were selected. For high uronic acid content, selected extraction conditions were: nitric acid solution at pH 1.5 and 100°C during 30 min, originating OP fraction. For high yield, extraction conditions were: pH 3.5 at 100°C for 30 min with nitric acid, leading to NA-HYP fraction, and pH 3.0 at 95°C during 95 min with citric acid, originating CA-HYP fraction. The obtained fractions were then characterized, as well as those extracted with water during 90 min at 50°C and boiling bath (50W and BW fractions, respectively). All analyzed pectins were composed by highly acetylated homogalacturonans and rhamnogalacturonan with side chains consisting mainly by galactose. OP fraction presented high methoxyl (HM) pectins (DE>50%) and the other fractions were constituted by low methoxyl (LM) pectins (DE<50%). OP fraction was used to prepare microparticles containing 5-aminosalicylic acid (5-ASA), a drug intended to colon targeted delivery. The microparticles of OP:5-ASA in proportions of 1:1; 2:1; 3:1 and 4:1 were obtained by *spray drying* and presented < 5µm. In vitro drug release assays showed tendencies of better drug retention with increases in pectin content. The ability to gel formation was tested for all fractions. For OP fraction, gels were initially prepared at 1.32 galacturonic acid percent, GalA% (w/w) and 60% sucrose (w/w) varying the pH (2.5-3.3). After rheological analyses, pH 2.7 was selected for experiments with variations in OP concentration (0.33 to 1.98 GalA%, w/w) at fixed sucrose content (60%, w/w). Dynamic oscillatory experiments at 25°C showed the presence of gels in all analyzed concentrations and rotational experiments indicated a non-Newtonian shear-thinning behavior. OP gels were positively influenced by increases in pectin concentration, both in terms of viscosity and gel strength. For LM pectins, although gel formation was not observed with calcium ions, gels were formed at 0.99 GalA% (w/w) at pH <3.0 in the presence of 60% sucrose, with tendency to formation of stronger gels when pH decreases from 3.0 to 2.5. The obtained results showed that despite the high content of acetyl, the pectins extracted by different ways from cacao pod husks were able to gel at low pH and high sucrose content, suggesting a possible use as thickening and gelling additive in acid products. In this way, the use of cacao pod husks as pectin source could contribute to a better exploitation of this main residue from cocoa industry.

Keywords: *Theobroma cacao*. Cacao pod husks. Experimental design. Response surface methodology. Pectins. Rheology. Microparticles. 5-ASA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DE PECTINAS DE PAREDE CELULAR VEGETAL.....	24
FIGURA 2	- CADEIA DE HOMOGALACTURONANA.....	28
FIGURA 3	- MECANISMOS DE LIGAÇÃO CRUZADA DE MOLÉCULAS DE PECTINAS: (A) HM EM MEIO ÁCIDO (B) LM NA PRESENÇA DE CÁLCIO	33
FIGURA 4	- ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO.....	39
FIGURA 5	- CACAUEIRO (<i>Theobroma cacao</i> L.) COM FRUTOS EM PRODUÇÃO.....	41
FIGURA 6	- FRUTO ABERTO DO CACAU (CORTE LONGITUDINAL), REVELANDO AS SEMENTES E A CASCA ESPESSA	42
FIGURA 7	- PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF).....	51
FIGURA 8	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PECTINAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) USANDO ÁCIDO NÍTRICO COMO AGENTE EXTRATOR. (A) SUPERFÍCIE TRIDIMENSIONAL (B) SUPERFÍCIE BIDIMENSIONAL.....	82
FIGURA 9	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DE PECTINAS EXTRAÍDAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) USANDO ÁCIDO NÍTRICO COMO AGENTE EXTRATOR. (A) SUPERFÍCIE TRIDIMENSIONAL (B) SUPERFÍCIE BIDIMENSIONAL.....	83
FIGURA 10	- GRÁFICOS PARA VALIDAÇÃO DO MODELO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO DE PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF). (A) VALORES OBSERVADOS × VALORES ESTIMADOS (B) VALORES OBSERVADOS × RESÍDUOS.....	89
FIGURA 11	- SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) USANDO ÁCIDO CÍTRICO COMO AGENTE EXTRATOR. (A) SUPERFÍCIE TRIDIMENSIONAL (B) SUPERFÍCIE BIDIMENSIONAL.....	90

FIGURA 12	- PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI (25°C) DA FRAÇÃO OP OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS.....	96
FIGURA 13	- ESPECTRO DE ^{13}C RMN (70°C, 100 MHz) DA FRAÇÃO OP OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS. SOLVENTE: D_2O . DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm.....	97
FIGURA 14	- MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PECTINA OTIMIZADA (OP) E ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO (5-ASA) OBTIDAS POR SPRAY DRYER. (A) CONTROLE CONTENDO APENAS A PECTINA; (B) AMOSTRA 1 (50% PECTINA E 50% 5-ASA); (C) AMOSTRA 2 (66,7% PECTINA E 33,3% 5-ASA); (D) AMOSTRA 3 (75% PECTINA E 25% 5-ASA); (E) AMOSTRA 4 (80% PECTINA E 20% 5-ASA). AUMENTO: 4000X.....	100
FIGURA 15	- PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> (37°C) DO ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO (5-ASA) A PARTIR DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO PECTINA OTIMIZADA (OP) E 5-ASA EM MEIOS MIMETIZANDO O pH DO SISTEMA GASTROINTESTINAL	102
FIGURA 16	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DA SOLUÇÃO AQUOSA A 5% (M/M) DA PECTINA OTIMIZADA (OP) OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS	105
FIGURA 17	- VARREDURA DE FREQUÊNCIA (25°C, γ : 0,07) DA SOLUÇÃO AQUOSA A 5% (M/M) DA PECTINA OTIMIZADA (OP) OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS.....	106

FIGURA 18	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DE AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) A 1,32% GalA (M/M) COM 60% SACAROSE (M/M) EM DIFERENTES pHs APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL.....	107
FIGURA 19	- DEPENDÊNCIA DA VISCOSIDADE APARENTE A 0,003 s ⁻¹ (25°C) EM RELAÇÃO AO pH DE AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) A 1,32% GalA (M/M) NA PRESENÇA DE 60% DE SACAROSE (M/M) APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL	108
FIGURA 20	- VARREDURAS DE FREQUÊNCIA (25°C; γ : 0,0035-0,04) PARA AS AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) A 1,32% GalA (M/M) COM 60% DE SACAROSE (M/M) EM DIFERENTES pHs APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL. (A) MÓDULO ELÁSTICO (G') (B) MÓDULO VISCOSO (G'')	109
FIGURA 21	- DEPENDÊNCIA DE G' E G'' A 0,1 Hz (25°C) EM RELAÇÃO AO pH DAS AMOSTRAS DE PECTINA OTIMIZADA (OP) PREPARADA A 1,32% GalA (M/M) COM 60% DE SACAROSE (M/M) APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL	110
FIGURA 22	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DE AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) EM CONCENTRAÇÕES DE 0,33 A 1,98% GalA (M/M) NA PRESENÇA DE 60% DE SACAROSE EM pH 2,7 (M/M) APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL	112
FIGURA 23	- VARREDURAS DE FREQUÊNCIA (25°C; γ : 0,001-0,05) DE AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) EM CONCENTRAÇÕES DE 0,33 A 1,98% GalA (M/M) NA PRESENÇA DE 60% DE SACAROSE (M/M) EM pH 2,7 APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL: (A) MÓDULO ELÁSTICO (G'); (B) MÓDULO VISCOSO (G'')	113
FIGURA 24	- MÓDULO ELÁSTICO (G') A 0,1 Hz (25°C) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PECTINA (% GalA) DOS GÉIS DE OP EM pH 2,7 CONTENDO 60% DE SACAROSE (M/M)	116
FIGURA 25	- RENDIMENTO EXPERIMENTAL DAS FRAÇÕES PÉCTICAS OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) EM RELAÇÃO À CPHF DESIDRATADA.....	120

FIGURA 26	- PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC (25°C) DAS FRAÇÕES 50W, BW, CA-HYP, NA-HYP E OP OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF): (A) MALLS (90°); (B) RI.....	126
FIGURA 27	- ESPECTROS DE ¹³ C RMN (70°C, 100 MHz) DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF): (A) 50W; (B) BW; (C) CA-HYP; (D) NA-HYP; (E) OP. SOLVENTE: D ₂ O. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm.....	128
FIGURA 28	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DAS SOLUÇÕES AQUOSAS A 5% (M/M) DAS FRAÇÕES DE PECTINAS OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)	130
FIGURA 29	- VARREDURAS DE FREQUÊNCIA (25°C, γ : 0,03-0,1) DAS SOLUÇÕES AQUOSAS A 5% (M/M) DAS FRAÇÕES DE PECTINAS OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)	131
FIGURA 30	- INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DAS AMOSTRAS DAS FRAÇÕES 50W, BW, CA-HYP E NA-HYP A 0,99% GaIA COM 60% SACAROSE (M/M) EM DIFERENTES pHs APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL: (A) pH 2,5; (B) pH 2,7; (C) pH 3,0.....	135
FIGURA 31	- VARREDURAS DE FREQUÊNCIA (25°C; γ : 0,002-0,03) DAS AMOSTRAS DAS FRAÇÕES 50W, BW, CA-HYP E NA-HYP A 0,99% GaIA (M/M) COM 60% DE SACAROSE (M/M) EM DIFERENTES pHs APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL. (A) pH 2,5; (B) pH 2,7; (C) pH 3,0	137

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3^{3-1} PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) EMPREGANDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO NÍTRICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH, TEMPERATURA E TEMPO.....	52
TABELA 2	- PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3^{3-1} PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) EMPREGANDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH, TEMPERATURA E TEMPO.....	53
TABELA 3	- COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MINERAL DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) (<i>Theobroma cacao</i> L.)	67
TABELA 4	- COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) (<i>Theobroma cacao</i> L.)	69
TABELA 5	- PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3^{3-1} PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E VALORES EXPERIMENTAIS PARA AS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS.....	74
TABELA 6	- EFEITOS ESTIMADOS PARA O PLANEJAMENTO 3^{3-1} SOBRE O RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)	75
TABELA 7	- PONTOS EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (CCD) PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E VALORES EXPERIMENTAIS PARA AS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS	77

TABELA 8	-	COEFICIENTES DE REGRESSÃO ESTIMADOS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (CCD) SOBRE O RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E PARÂMETROS ESTATÍSTICOS PARA AS RESPOSTAS 78
TABELA 9	-	ANOVA PARA VALIDAÇÃO DOS MODELOS ESTATÍSTICOS DAS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) 81
TABELA 10	-	PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3^{3-1} PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E VALORES EXPERIMENTAIS PARA AS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS 84
TABELA 11	-	EFEITOS ESTIMADOS PARA O PLANEJAMENTO 3^{3-1} SOBRE O RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) 85
TABELA 12	-	PONTOS EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (CCD) PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E VALORES EXPERIMENTAIS PARA AS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS 87
TABELA 13	-	COEFICIENTES DE REGRESSÃO ESTIMADOS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (CCD) SOBRE O RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E PARÂMETROS ESTATÍSTICOS PARA AS RESPOSTAS 88
TABELA 14	-	COMPOSIÇÃO DA PECTINA OTIMIZADA (OP) OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS 93

TABELA 15	-	FORMULAÇÃO, RENDIMENTO, TEOR DE FÁRMACO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS CONTENDO A PECTINA OTIMIZADA (OP) E ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO (5-ASA)	99
TABELA 16	-	RENDIMENTO, TEOR DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E FENÓLICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)	122
TABELA 17	-	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, GRAU DE ACETILAÇÃO E GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)	124

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

50W	- Pectina obtida por extração aquosa em banho-maria a 50°C por 90 minutos
5-ASA	- Ácido 5-aminossalicílico
ANOVA	- Análise de variância
BW	- Pectina obtida por extração aquosa em banho-maria fervente por 90 minutos
CA-HYP	- Pectina de elevado rendimento obtida por extração com ácido cítrico em pH 3,0 a 95°C por 95 min
CCD	- Planejamento Composto Central
Coef	- Coeficiente
CPHF	- Farinha da casca de frutos do cacau
DA	- Grau de acetilação
DE	- Grau de esterificação
df	- Grau de liberdade
EPM	- Erro padrão médio
FAC	- Capacidade de retenção de óleo
FT-IR	- Infravermelho com transformada de Fourier
G'	- Módulo de cisalhamento elástico ou módulo de armazenamento
G''	- Módulo de cisalhamento viscoso ou módulo de perda
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa
GLC-MS	- Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa
HG	- Homogalacturonana
HM	- Pectinas com grau de esterificação superior a 50%
HPMC	- Hidroxipropilmetilcelulose
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta performance
LM	- Pectinas com grau de esterificação inferior a 50%
MALLS	- Detector de espalhamento de luz laser em multiângulos
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MLR	- Regressão linear múltipla

<i>m/z</i>	- Relação massa-carga
NA-HYP	- Pectina de elevado rendimento obtida por extração com ácido nítrico em pH 3,5 a 100°C por 30 min
NI	- Normolitro
OP	- Pectina otimizada, obtida por extração com ácido nítrico em pH 1,5, a 100°C por 30 min
RG	- Ramnogalacturonana
RG-I	- Ramnogalacturonanas do tipo I
RG-II	- Ramnogalacturonanas do tipo II
RI	- Detector de índice de refração diferencial
RMN	- Ressonância magnética nuclear
R-OP	- Fração OP carboxi-reduzida
RSM	- Metodologia de superfície de resposta
SC	- Capacidade de inchamento
SG	- Galacturonana substituída
TFA	- Ácido trifluoracético
UV	- Detector ultravioleta
WRC	- Capacidade de retenção de água
γ	- Deformação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVO GERAL	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 PECTINAS	23
2.1.1 Fontes de pectinas para uso comercial	28
2.1.2. Extração de pectinas	29
2.1.3 Propriedades e aplicações das pectinas	30
2.1.4 Gelificação de pectinas	32
2.1.5 Pectinas em sistemas de liberação colônica de fármacos	37
2.2 COLITE ULCERATIVA E ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO	38
2.3 CACAU	41
2.3.1 Cacau e Polissacarídeos	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 OBTENÇÃO DA CASCA DOS FRUTOS DE CACAU (<i>Theobroma cacao</i>)	47
3.2 ENSAIOS PRELIMINARES DE PROCESSAMENTO DAS CASCAS	47
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)	48
3.3.1. Propriedades físico-químicas	50
3.4 OBTENÇÃO DE PECTINAS	50
3.4.1 Planejamento experimental para extração ácida de pectinas	52
3.5 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS	54
3.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	55
3.6.1 Hidrólises ácidas totais	55
3.6.2 Redução, acetilação e extração dos produtos acetilados	55
3.7 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DAS PECTINAS	56
3.8 DETERMINAÇÃO DE HOMogeneidade	57
3.9 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	58
3.10 CARBOXI-REDUÇÃO DA FRAÇÃO OP (PECTINA OTIMIZADA)	58
3.11 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES REOLÓGICAS	59

3.12 ANÁLISES REOLÓGICAS	60
3.13 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE PECTINA E FÁRMACO	61
3.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	62
3.15 TESTES DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO DAS MICROPARTÍCULAS	62
3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 ENSAIOS PRELIMINARES	64
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF).....	66
4.2.1. Caracterização química e mineral	66
4.2.2 Propriedades físico-químicas	71
4.3 EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU	73
4.3.1 Planejamento experimental	73
4.3.1.1 Extrações com ácido nítrico	73
4.3.1.2 Extrações com ácido cítrico.....	84
4.3.2 Extrações aquosas	91
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE PECTINAS OBTIDAS DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU	91
4.4.1 Fração OP (Pectina otimizada)	91
4.4.1.1 Rendimento e composição	91
4.4.1.2 Obtenção e caracterização de micropartículas contendo fármaco	98
4.4.1.3 Análises reológicas.....	104
4.4.2 Demais frações pécticas obtidas da casca dos frutos do cacau	119
4.4.2.1 Rendimento e composição	120
4.4.2.2 Análises reológicas.....	129
5 CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	140
APÊNDICE	170

1 INTRODUÇÃO

O aumento da procura por produtos alimentícios com teores reduzidos de açúcar ou de baixa caloria leva a indústria a desenvolver produtos saudáveis sem comprometimento das suas propriedades texturais e sensoriais. As pectinas, com suas propriedades espessante, gelificante e estabilizante, são candidatas ao desenvolvimento deste tipo de produtos. Na área farmacêutica, a busca por novos tipos de sistemas de liberação de fármacos tem apontado que as pectinas são moléculas promissoras para estas aplicações, ampliando ainda mais a demanda por este biopolímero. Assim, há constante interesse em caracterizar novas fontes de pectinas para distintos propósitos, já que as pectinas comerciais atualmente utilizadas são provenientes de cascas de frutas cítricas ou do bagaço da maçã, subprodutos da fabricação de sucos.

Neste contexto, a casca dos frutos do cacau (*Theobroma cacao* L.), o mais abundante subproduto da indústria cacaueira, surge como possível fonte deste polímero.

Cada tonelada de sementes secas de cacau representa 10 toneladas de cascas úmidas (FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993; KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998). Sabendo-se que a produção mundial na safra 2009/2010 (outubro/setembro) foi de 3.613.000 toneladas de sementes secas de cacau (ICCO, 2011), foram geradas neste período 36.130.000 toneladas de cascas frescas. Para a safra 2011/2012, a estimativa é de que a produção mundial aumente para 3.961.000 toneladas de sementes de cacau (ICCO, 2012a). O crescimento da produção e da demanda de sementes de cacau resulta em um aumento dos resíduos da indústria cacaueira, principalmente de cascas dos frutos do cacau, representando um sério problema de descarte.

Normalmente os frutos do cacau são abertos nas áreas de plantação, e as cascas frescas são descartadas sob as árvores, podendo retornar nutrientes ao solo, mas também propagar doenças pela plantação, como é o caso da vassoura-de-bruxa, causada por fungos do gênero *Phytophthora* (BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008; ICCO, 2012b).

Vários autores investigaram as possíveis potencialidades de utilização da casca dos frutos do cacau. A maioria das aplicações propostas foi limitada à sua

utilização na alimentação de animais domésticos e na adubação orgânica, ou ainda para a produção de energia na forma de metano (AREGHEORE, 2002; BATEMAN; FRESNILLO; 1967; CHEPOTE, 2003; DONKOH *et al.*, 1991; FAGBENRO, 1988; FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993; HAINES; ECHEVERRIA, 1955; MOYIN-JESU, 2007; OLADOKUN, 1986; RIDZWAN *et al.*, 1993; SMITH; ADEGBOLA, 1982, 1985; SOBAMIWA; LONGE, 1994), mas poucos estudos foram direcionados à obtenção e caracterização de pectinas (ADOMAKO, 1972; BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008; BLAKEMORE; DEWAR; HODGE, 1966; DITTMAR, 1958).

Até o momento, as cascas do fruto do cacau são consideradas produtos residuais indesejáveis da indústria cacaueteira, com potenciais a serem ainda explorados. Conhecendo-se melhor a composição, as características e as propriedades das pectinas das cascas dos frutos do cacau, poderia se propor a utilização deste subproduto da indústria cacaueteira como alternativa para obtenção de pectinas comerciais, diversificando seu uso, agregando maior valor ao fruto do cacau e apresentando uma solução parcial ao problema ambiental gerado pelas cascas descartadas.

Portanto, neste trabalho utilizou-se planejamento experimental para a obtenção de pectinas da casca dos frutos do cacau e selecionou-se algumas condições para extração em maior escala. As pectinas obtidas foram submetidas a análises estruturais e físico-químicas visando possíveis aplicações.

1.1 OBJETIVO GERAL

Definir condições de extração para a obtenção de pectinas com alto rendimento e teor de ácidos urônicos a partir da casca dos frutos de cacau (*Theobroma cacao* L.) e caracterizar os polissacarídeos selecionados em relação a aspectos estruturais e reológicos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a composição da casca dos frutos do cacau e algumas propriedades funcionais;
- ✓ Extrair pectinas hidrossolúveis da casca dos frutos do cacau e caracterizá-las quimicamente e reologicamente;
- ✓ Utilizar planejamento experimental para obter pectinas da casca dos frutos do cacau utilizando ácido nítrico e ácido cítrico, em diferentes condições de pH, temperatura e tempo visando as respostas rendimento e teor de ácidos urônicos;
- ✓ Extrair pectinas em maior escala nas condições otimizadas de extração visando maior teor de ácidos urônicos;
- ✓ Extrair pectinas em maior escala nas condições otimizadas de extração visando maior rendimento;
- ✓ Caracterizar quimicamente as pectinas selecionadas;
- ✓ Analisar o comportamento reológico da solução e dos géis das pectinas selecionadas;
- ✓ Empregar a pectina selecionada para a obtenção de micropartículas contendo ácido 5-aminossalicílico e analisar as micropartículas obtidas quanto ao rendimento, teor de fármaco, eficiência de encapsulação e morfologia;
- ✓ Efetuar testes de liberação do fármaco *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PECTINAS

As pectinas são polissacarídeos presentes na parede celular vegetal, juntamente com celulose e hemiceluloses, além de proteínas e substâncias aromáticas. São encontradas principalmente na parede celular primária e na lamela média das células vegetais (CARPITA; MCCANN, 2000; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001).

Na lamela média, região que conecta células vizinhas, as pectinas são importantes para a adesão entre células adjacentes. Na parede celular primária, presente em células de vegetais em crescimento, células de tecidos suculentos (tais como frutos) e células meristemáticas, as pectinas contribuem para a retenção de água e formação de géis, influenciando as propriedades mecânicas da parede celular (CARPITA; MCCANN, 2000; JARVIS, 1988; MELFORD; DEY, 1986; VAN BUREN, 1991).

Nas zonas de junção celular, as pectinas podem formar géis através de ligações cruzadas com íons cálcio, permitindo um fino controle da porosidade da parede, regulando a difusão de nutrientes, íons e enzimas através da parede celular, modulando, desta forma, o pH e o balanço iônico. Por limitar a porosidade da parede, as pectinas podem afetar o crescimento celular, regulando o acesso de enzimas aos seus substratos. Adicionalmente, oligossacarídeos pécticos servem como moléculas de sinalização que alertam as células de plantas para a presença de organismos simbióticos, patógenos e insetos, podendo ativar respostas de defesa e modificar o crescimento e desenvolvimento do tecido vegetal (CARPITA; MCCANN, 2000; MCCANN *et al.*, 1995; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001).

Há evidências de que os polissacarídeos pécticos da parede celular sofrem modificações estruturais durante o crescimento e desenvolvimento das células vegetais (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001). Sabe-se que a textura de frutos e verduras durante o crescimento, amadurecimento e armazenamento é fortemente influenciada pela quantidade e natureza das pectinas presentes. Alterações importantes das propriedades de frutas e produtos vegetais durante a estocagem e

processamento estão relacionadas a alterações dos componentes pécicos (VORAGEN *et al.*, 1995).

Quimicamente, as pectinas englobam uma família de polissacarídeos ricos em ácido galacturônico extremamente diversificados em sua estrutura fina. São, portanto, polidispersas, com significativa heterogeneidade em relação à estrutura química e à massa molecular (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; PÉREZ; MAZEAU; DU PENHOAT, 2000; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Estruturalmente, os polissacarídeos pécicos são classificados como homogalacturonanas (HGs), ramnogalacturonanas (RGs) e galacturonanas substituídas (SGs) (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001), como ilustrado na Figura 1. Dentro desta classificação, os três principais blocos que compõem as pectinas incluem as homogalacturonanas, ramnogalacturonanas I (RG-I) e ramnogalacturonanas II (RG-II) (FRAEYE *et al.*, 2010).

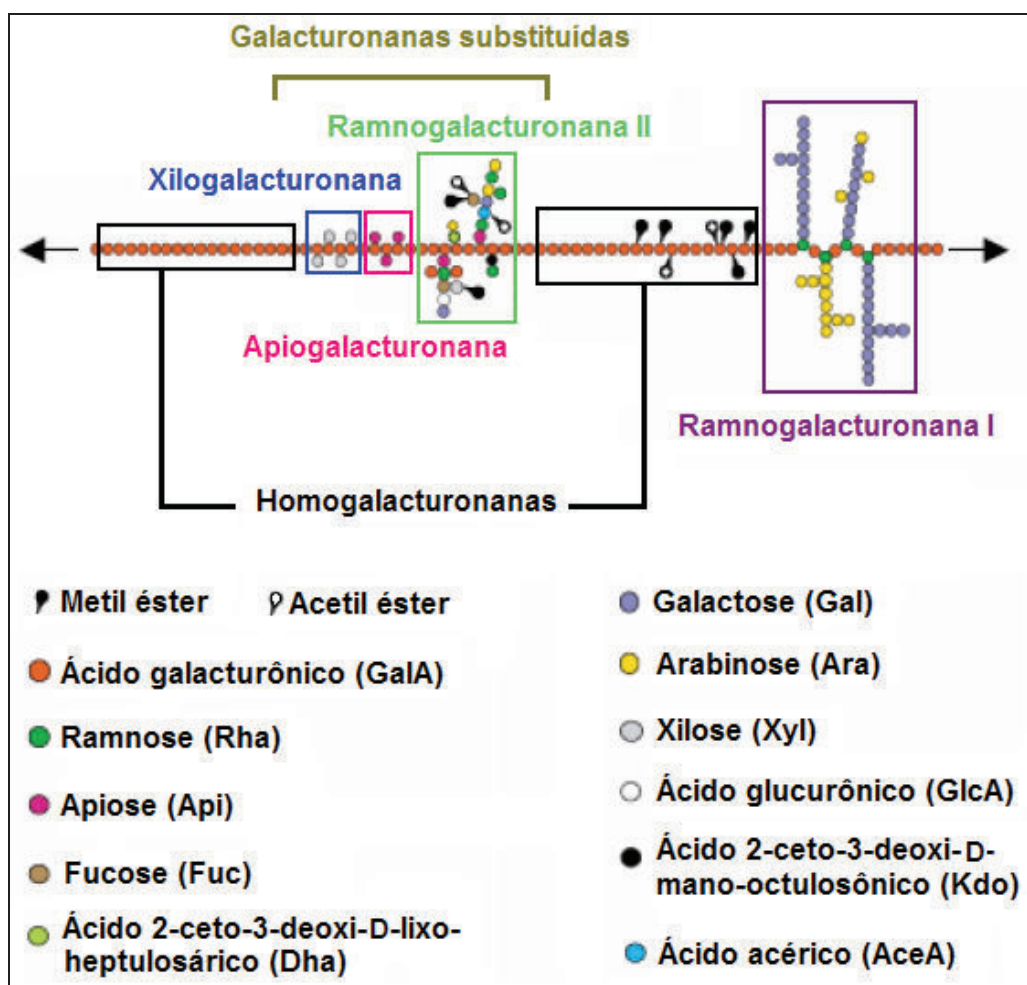


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DE PECTINAS DE PAREDE CELULAR VEGETAL
 FONTE: ADAPTADO DE WILLATS, KNOX e MIKKELSEN (2006).

Homogalacturonanas constituem a região lisa ou *smooth region* das cadeias de pectinas. São homopolímeros lineares de unidades piranosídicas de ácido D-galacturônico (GalpA) unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1→4) nas quais muitos dos grupos ácidos estão metil-esterificados. Dependendo do tipo de vegetal, as unidades de GalpA podem estar parcialmente O-acetiladas em C-3 ou C-2 (MOHNEN, 2008; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001).

Ramnogalacturonanas constituem a região ramificada ou *hairy region* das pectinas e podem ser de dois tipos: ramnogalacturonanas I (RG-I) e ramnogalacturonanas II (RG-II). RG-I consiste de uma cadeia principal de unidades piranosídicas alternantes de D-GalA ligadas α -(1→4) e L-ramnose (Rha) ligadas α -(1→2). Embora as unidades de GalA possam apresentar grupos acetil nas posições O-2 e O-3, não há evidências de que suas carboxilas sejam metil-esterificadas. Concomitantemente, as unidades de Rha da cadeia principal podem ser substituídas (20-80%) em C-4 com cadeias laterais, tais como arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (DE VRIES, 1988; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; SCHOLS; VORAGEN, 2003; VORAGEN *et al.*, 1995).

As arabinanas são polissacarídeos que apresentam uma cadeia principal de unidades furanosídicas de L-arabinose (Ara) unidas por ligações glicosídicas α -(1→5), com ramificações ligadas a várias unidades da cadeia principal na posição O-2 e/ou O-3. Estão presentes, por exemplo, em pectinas da maçã e das sementes de mostarda (PÉREZ, MAZEAU; DU PENHOAT, 2000; VORAGEN *et al.*, 1995).

As arabinogalactanas ocorrem em duas formas estruturalmente diferentes. As arabinogalactanas do tipo I têm uma cadeia linear de unidades piranosídicas de D-galactose (Gal) ligadas β -(1→4) com 20-40% de unidades furanosídicas de L-Ara ligadas α -(1→5) presentes em cadeias laterais curtas conectadas na posição O-3 das unidades de Gal. Estão presentes, por exemplo, em pectinas de cítricos, tomate e maçã madura (PÉREZ, MAZEAU; DU PENHOAT, 2000; VORAGEN *et al.*, 1995). Já as arabinogalactanas do tipo II são mais complexas e altamente ramificadas, com cadeias de unidades piranosídicas de β -D-Gal unidas por ligações (1→3) e (1→6). As ligações (1→3) predominam nas cadeias internas, enquanto que as ligações (1→6) ocorrem principalmente nas cadeias externas, que carregam ramificações adicionais de unidades furanosídicas de α -L-Ara em ligações (1→3) e/ou (1→5),

que são geralmente terminadas por unidades L-Araf e em algum grau por unidades L-Arap (VORAGEN *et al.*, 1995).

Outros monossacarídeos que podem estar presentes nas cadeias laterais de RG-I são: D-xilose (Xyl), D-glucose (Glc), D-manose (Man), L-fucose (Fuc), ácido D-glucurônico (GlcA) e ácido 4-O-metil-D-glucurônico (2-O-Me GlcA) (DE VRIES, 1988; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; SCHOLS; VORAGEN, 2003; VORAGEN *et al.*, 1995). Ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico e *p*-cumárico, também podem estar presentes na forma de éster em algumas cadeias laterais (MORRISON, 2001; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001).

Já a ramnogalacturonana-II é o mais complexo polissacarídeo péctico (PELLERIN *et al.*, 1996) e não é estruturalmente relacionada à RG-I, sendo considerada uma galacturonana substituída (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001). Na RG-II a cadeia principal de galacturonana é formada por pelo menos 7 unidades de GalpA ligadas α -(1→4). Quatro cadeias laterais complexas consistindo de 12 monossacarídeos diferentes e 20 ligações distintas estão conectadas na cadeia principal de GalpA: dois octassacarídeos estruturalmente diferentes são ligados em C-2 e dois dissacarídeos estruturalmente distintos são ligados em C-3, embora não se saiba exatamente a localização das cadeias laterais em relação às unidades de GalpA (MELTON *et al.*, 1986; MOHNEN, 2008; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; PELLERIN *et al.*, 1996; PÉREZ, MAZEAU, DU PENHOAT, 2000; RODRIGUEZ-CARVAJAL *et al.*, 2003; VIDAL *et al.*, 2000). Entre os monossacarídeos das cadeias laterais de RG-II incluem-se açúcares raros, tais como ácido acérico (ou 3-C-carboxi-5-deoxi- β -L-xilose; AcefA) (SPELLMAN *et al.*, 1983), apiose (Apif) (DARVILL; MCNEILL; ALBERSHEIM, 1978), 2-O-metil-fucose (2-O-Me-Fucp) (BARRETT; NORTHCOT, 1965; DARVILL; MCNEILL; ALBERSHEIM, 1978), 2-O-metil-xilose (2-O-Me-Xylp) (BARRETT; NORTHCOT, 1965; DARVILL; MCNEILL; ALBERSHEIM, 1978), ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico (Kdo) (STEVENSON; DARVILL; ALBERSHEIM, 1988) e ácido 2-ceto-3-deoxi-D-lixo-heptulosárico (Dha) (YORK *et al.*, 1985). As unidades de apiose da cadeia lateral de duas cadeias de RG-II são esterificadas com ácido bórico, formando dímeros de RG-II nas paredes celulares primárias (ISHII *et al.*, 1999; KOBAYASHI; MATOH; AZUMA, 1996). Apesar da complexidade, a estrutura de RG-II parece ser conservada nas paredes celulares das dicotiledôneas (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Outras galacturonanas substituídas descritas são as xilogalacturonanas e as apiogalacturonanas. Nas xilogalacturonanas, identificadas em grãos de soja, ervilha, melancia, cenoura, casca de limão e maçã, unidades piranosídicas de β -D-Xyl estão presentes como cadeias laterais de uma única unidade ligada à posição C-3 das unidades de GalpA da cadeia principal (ALBERSHEIM *et al.*, 1996; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; VORAGEN *et al.*, 1995; WILLATS *et al.*, 2001). Em alguns casos, uma unidade adicional de β -D-Xyl pode estar presente em ligação (1 $\rightarrow$ 2) na unidade de Xyl ligada à GalA da cadeia principal (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Já nas apiogalacturonanas, presentes nas paredes celulares de algumas monocotiledôneas aquáticas (*Lemna* e *Zostera*), unidades furanosídicas de β -D-Api estão presentes como cadeias laterais de uma única unidade ou do dissacarídeo [β -D-Apif-(1 $\rightarrow$ 3')- β -D-Apif-(1 $\rightarrow$)] ligadas em C-2 de GalpA da cadeia principal (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001).

Todas as moléculas de pectina contêm segmentos lineares de GalA (Figura 2) cujos grupos carboxílicos podem estar esterificados com metanol ou ainda as unidades de GalA podem apresentar grupos O-acetil (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; ROLIN, 1993). A proporção de grupos carboxílicos metil-esterificados em relação ao total de grupos carboxílicos nas pectinas é expressa como grau de esterificação (DE), e a proporção de grupos O-acetil em relação ao total de unidades de GalA é denominada grau de acetilação (DA). Dependendo do grau de esterificação (DE), as pectinas são classificadas em dois grupos: pectinas com alto teor de esterificação (HM), com um DE superior a 50%, e pectinas com baixo teor de esterificação (LM), com um DE inferior a 50% (VORAGEN *et al.*, 1995).

Geralmente as pectinas nativas apresentam alto grau de esterificação (HM) e baixo grau de acetilação (VORAGEN *et al.*, 1995). Pectinas LM podem ser obtidas através da desesterificação de pectinas HM por tratamento com ácidos, álcalis ou enzimas. Se a desesterificação for efetuada em condições alcalinas na presença de amônia, os grupos metil esterificados são transformados em grupos amida (FRAEYE *et al.*, 2010; MAY, 1990).

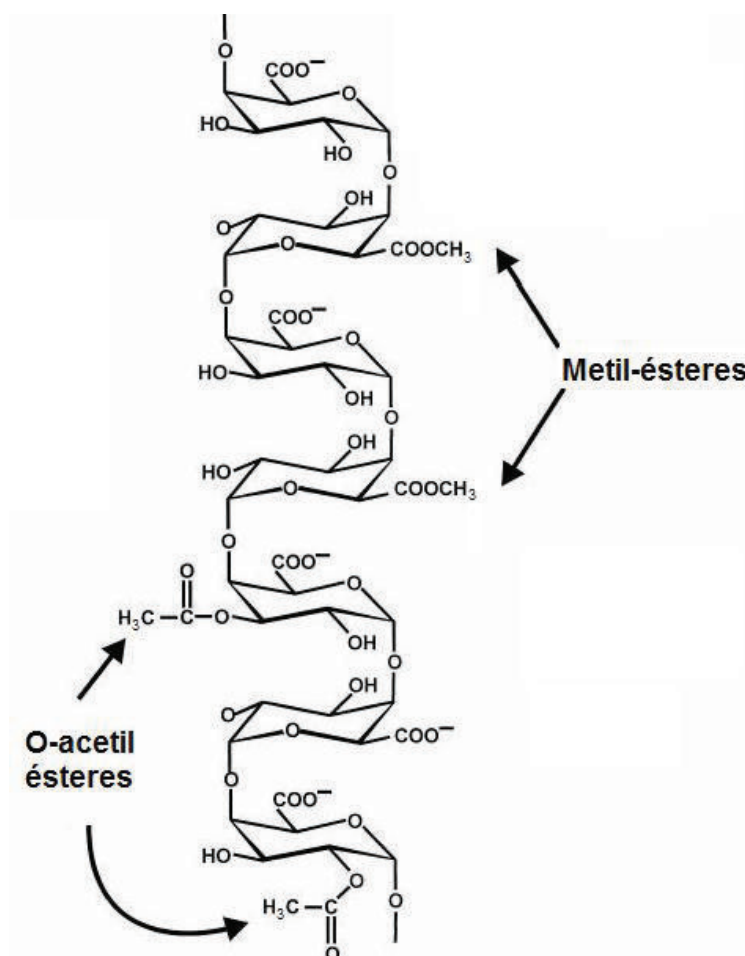


FIGURA 2 - CADEIA DE HOMOGALACTURONANA
 FONTE: ADAPTADO DE RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001.

Tanto a fonte vegetal empregada quanto as condições de extração influenciam nas características das pectinas (ROLIN; NIELSEN; GLAHN, 1998), podendo estas apresentar diferente composição, DE, DA e características físico-químicas, parâmetros importantes para sua aplicabilidade.

2.1.1 Fontes de pectinas para uso comercial

As pectinas comerciais são geralmente obtidas das cascas e bagaço de frutas cítricas ou do bagaço da maçã, subprodutos obtidos após a extração de sucos pelas indústrias (ROLIN, 1993; THIBAULT; RALET, 2001; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). O bagaço de maçã contém de 10 a 15% de pectinas e as cascas de cítricos contêm de 20 a 30% de pectinas (THIBAULT; RALET, 2001).

Outras fontes de pectinas que vêm sendo estudadas incluem a polpa de beterraba (LEVIGNE; RALET; THIBAUT, 2002; OOSTERVELD *et al.*, 2000; TURQUOIS *et al.*, 1999; YAPO *et al.*, 2007b), as cascas de soja (IGLESIAS; LOZANO, 2004; KALAPATHY; PROCTOR, 2001), os talos de amoreira (LIU *et al.*, 2010), os resíduos de sementes de girassol (IGLESIAS; LOZANO, 2004) e de frutas como banana (HAPPI EMAGA *et al.*, 2008a, QIU *et al.*, 2010); mangostão (GAN; LATIFF, 2011); cacau (ARLORIO *et al.*, 2001; BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008; MOLLEA; CHIAMPO; CONTI, 2008), cajá (KIOUBALA *et al.*, 2008b), maracujá (CANTERI, 2010; CANTERI *et al.*, 2011; KLIEMANN *et al.*, 2009; KULKARNI; VIJAYANAND, 2010; PINHEIRO, 2007; YAPO, 2009a; YAPO; KOFFI, 2006) e manga (KIOUBALA *et al.*, 2008a). Entretanto, nenhuma destas ainda foi capaz de substituir as pectinas comerciais atualmente empregadas (DANIELLS, 2008), e desta forma, há constante interesse em caracterizar novas fontes de pectinas, que podem apresentar características diferenciadas, dependendo do procedimento empregado para sua extração e purificação (ROLIN; NIELSEN; GLAHN, 1998).

2.1.2. Extração de pectinas

Pectinas podem ser removidas da parede celular vegetal por extrações com água quente, soluções tampão, soluções de agentes quelantes, soluções de ácidos diluídos a quente, soluções de álcali a frio ou com o uso de enzimas (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; VORAGEN *et al.*, 1995), podendo-se obter moléculas com características distintas e desejáveis variando-se o procedimento de extração.

Geralmente, as pectinas comerciais são extraídas do material vegetal com ácidos minerais diluídos a quente, em faixas de pH entre 1 e 3, tempo de 30 minutos a 24 horas e temperaturas entre 50 e 100°C, e são recuperadas dos extratos através de precipitação com álcool (MAY, 1990; ROLIN, 1993; VORAGEN *et al.*, 1995). Embora ácidos orgânicos, como o ácido acético, cítrico, láctico, málico e tartárico, possam ser utilizados para a extração de pectinas, há uma preferência de uso dos ácidos minerais, tais como ácido nítrico, clorídrico e sulfúrico, que apresentam custo mais baixo (KERTESZ, 1951).

Muitos tipos de ligações glicosídicas podem ser hidrolisadas em extrações ácidas permitindo a obtenção de pectinas fortemente ancoradas na parede celular (VORAGEN *et al.*, 1995). Segundo Adomako (1972), o uso de ácidos diluídos a quente maximiza o rendimento de pectinas metil-esterificadas ao mesmo tempo que preserva sua integridade para estudo de suas propriedades físicas e químicas.

Vários autores têm avaliado os efeitos das condições de extração sobre as pectinas, especialmente pH, temperatura e tempo, bem como o uso de ácidos extratores distintos (CANTERI *et al.*, 2011; CANTERI-SCHEMIN *et al.*, 2005; GAN; LATIFF, 2011; GARNA *et al.*, 2007; HAPPI EMAGA *et al.*, 2008a; KALAPATHY; PROCTOR, 2001; KLIEMANN *et al.*, 2009; KOUBALA *et al.*, 2008a; LEVIGNE; RALET; THIBAUT, 2002; MASMOUDI *et al.*, 2008; PAGÁN; IBARZ, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2008; QIU *et al.*, 2010; SCABIO *et al.*, 2007; VIRK; SOGI, 2004; WAI; ALKARKHI; EASA, 2010; WANG *et al.*, 2007; YAPO *et al.*, 2007b; YAPO, 2009a). Dependendo do material de partida e das condições empregadas, diferentes respostas são obtidas, principalmente em relação ao rendimento ou às características químicas e físico-químicas das pectinas, que estão diretamente envolvidas nas suas aplicações.

2.1.3 Propriedades e aplicações das pectinas

Derivada do grego “pektos”, o significado da palavra pectina está diretamente relacionado à habilidade que as pectinas têm de formar gel sob certas circunstâncias, além de aumentar a viscosidade de líquidos, propriedades estas que constituem a base de seu uso comercial. Assim, a pectina é considerada um importante aditivo nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, exibindo propriedades funcionais específicas dependendo de cada aplicação (FRAEYE *et al.*, 2010; O’NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; PÉREZ, MAZEAU; DU PENHOAT, 2000; VORAGEN *et al.*, 1995).

Além de fazer parte da dieta humana durante o consumo de frutas e verduras, as pectinas são também ingeridas como ingredientes ou aditivos em produtos alimentícios (THIBAUT; RALET, 2001). Na indústria de alimentos, a pectina é um dos hidrocolóides mais usualmente empregados (MIRHOSSEINI *et al.*, 2008).

Devido às suas propriedades estabilizantes e espessantes, as pectinas são utilizadas como aditivos em geleias, maionese, cremes para saladas, molhos, sucos concentrados, bebidas e sorvetes (VORAGEN *et al.*, 1995). Pela estabilidade em baixos valores de pH, as pectinas apresentam aplicações em alimentos ácidos, estabilizando, por exemplo, iogurtes e bebidas lácteas e suas combinações com sucos de frutas (FRAEYE *et al.*, 2010; MAY, 1990; ROLIN, 1993).

Por não serem digeridas durante a passagem pelo sistema gastrointestinal superior do homem, as pectinas atuam como fibras alimentares. Elas afetam a absorção de Glc, reduzindo a resposta do organismo à curva glicêmica, e contribuem na diminuição do nível de colesterol sanguíneo (FRAEYE *et al.*, 2010; MAXWELL *et al.*, 2012; MOHNEN, 2008; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; THIBAUT; RALET, 2001; VORAGEN *et al.*, 1995; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Além disso, são descritas apresentando atividade antioxidante (DALONSO; PETKOWICZ, 2012; GAN; LATIFF, 2011; KOŠŤÁLOVÁ *et al.*, 2013; MATEOS-APARICIO *et al.*, 2010).

Na área de saúde, as pectinas podem ser empregadas em modificadores de superfície para fins médicos, materiais para implantação biomédica e em diferentes produtos farmacêuticos, pois também apresentam atividades imunoestimuladoras e anti-câncer, além da capacidade de se ligar a metais tóxicos (INNGJERDINGEN *et al.*, 2007; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; THEUWISSEN; MENSINK, 2008; VISSER; VORAGEN, 1996).

Na área farmacêutica, as pectinas, em associação com caolim e compostos de bismuto, são tradicionalmente empregadas em antidiarréicos. Também são empregadas para manter a viscosidade de xaropes (MAY, 1990), como excipiente em comprimidos (LIU *et al.*, 2003; SRIAMORNSAK; PUTTIPIPATKHACHORN; PRAKONGPAN, 1997), em formulações anti-refluxo (WATERHOUSE; WASHINGTON; WASHINGTON, 2000), e para formação de filmes (HAGESAETHER; HIORTH; SANDE, 2008; OFORI-KWAKYE; FELL, 2001; SOUTO-MAIOR *et al.*, 2008; SRIAMORNSAK; KENNEDY, 2006).

Adicionalmente, géis de pectina podem ser usados como carreadores para liberação modificada de fármacos, além das pectinas estarem sendo investigadas como matriz ou revestimento de comprimidos para liberação controlada de fármacos (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001). A gama de aplicações das pectinas

nesta área é atribuída principalmente à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade oral (WONG; NURJAYA, 2008).

2.1.4 Gelificação de pectinas

Um gel de pectina é formado quando porções das moléculas de homogalacturonanas estão interligadas para formar uma rede tridimensional na qual a água e os solutos estão aprisionados. Vários fatores determinam a ocorrência da gelificação das pectinas e influenciam as características do gel, incluindo temperatura, concentração de pectina, pH, concentração de solutos (açúcares) e concentração de íons, como o Ca^{+2} (ROLIN, 1993; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Os limites estabelecidos por estes fatores e os modos nos quais eles influenciam a gelificação são dependentes das propriedades moleculares das pectinas, tais como massa molecular média, grau de esterificação e de amidação (proporção de grupos amida), presença de acetil-éster em C-2 e C-3 nas unidades de GalA da cadeia de galacturonana, presença e distribuição de Rha (que causa torções na cadeia de pectina) e distribuição (aleatória ou em blocos) dos grupos ésteres e carga ao longo da molécula (AXELOS; THIBAUT, 1991; ROLIN, 1993). Desta maneira, pectinas de fontes distintas apresentam variações nestes fatores, e como consequência suas capacidades gelificantes são distintas (SATO *et al.*, 2004).

Os mecanismos de gelificação são diferentes para pectinas de alto teor de esterificação (HM) e de baixo teor de esterificação (LM) (OAKENFULL, 1991; ROLIN, 1993; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

A gelificação de soluções aquosas de pectinas HM é frequentemente observada em pH ácido (inferior a 3,5), na presença de grandes quantidades de açúcares ou co-solutos semelhantes (tipicamente 60-65% de sacarose); sendo este o procedimento usado na produção convencional de geleias (BULONE *et al.*, 2002; CHRISTENSEN, 1986; MAY, 1990; OAKENFULL; SCOTT, 1984; REES, 1969).

A alta concentração de co-solutos cria condições de baixa atividade da água, onde as interações cadeia-cadeia predominam em relação às interações cadeia-solvente, enquanto que o pH ácido reduz a dissociação dos grupos carboxílicos,

resultando em menos cargas negativas e diminuindo assim as repulsões eletrostáticas entre as cadeias (ROLIN, 1993; THIBAUT; RALET, 2001; VORAGEN *et al.*, 1995). Com a redução das repulsões e da disponibilidade de água para solvatação das pectinas HM, as cadeias se aproximam e formam zonas de junção, que são estabilizadas por interações hidrofóbicas entre os grupos metil e por pontes de hidrogênio entre grupos carboxílicos não-dissociados e álcoois secundários, como demonstrado na Figura 3(A) (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997; VORAGEN *et al.*, 1995; WALKINSHAW; ARNOTT, 1981).

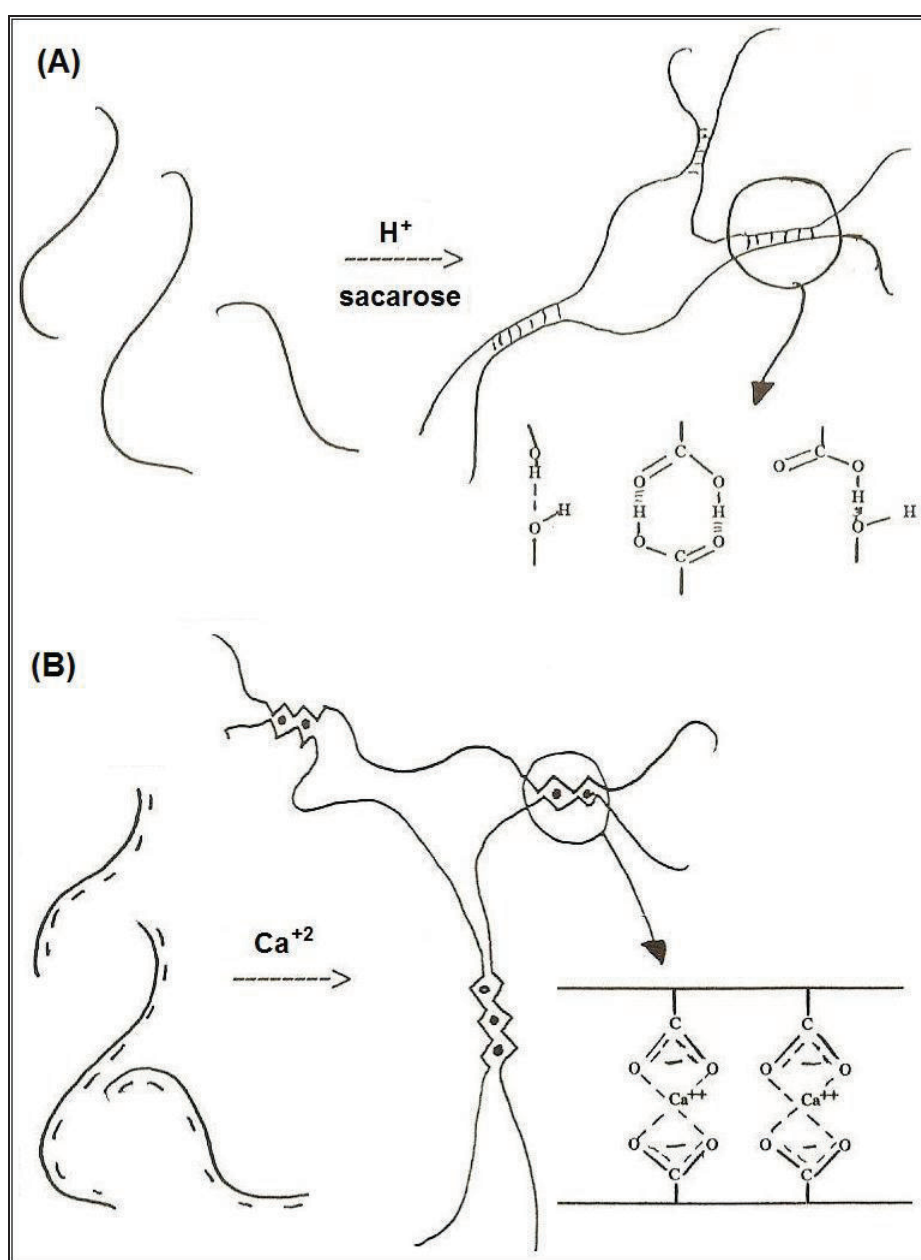


FIGURA 3 - MECANISMOS DE LIGAÇÃO CRUZADA DE MOLÉCULAS DE PECTINAS: (A) HM EM MEIO ÁCIDO (B) LM NA PRESENÇA DE CÁLCIO
 FONTE: ADAPTADO DE RINAUDO (1996).

Sob condições semelhantes, pectinas HM com maior massa molecular formam géis mais fortes. Elevadas proporções de grupos acetil e de regiões de ramificações (RG-I) atrapalham a gelificação das pectinas. O grau de esterificação, dentro do grupo das pectinas HM, determina seu nível de gelificação, desde pectinas ultra-rápidas até lentas, podendo o tempo de formação de gel variar de 1-3 minutos a mais de uma hora, e o pH necessário para alcançar a gelificação decrescer de valores de 3,4 a 2,6 (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; THIBAUT; RALET, 2001; VORAGEN *et al.*, 1995).

Géis de pectinas HM são de considerável importância na indústria de alimentos, uma vez que produtos contendo frutos processados, como compotas e geleias, são ácidos e contêm uma alta concentração de sacarose (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001), e, desta maneira, suas características e propriedades físico-químicas são constantemente analisadas.

Entre os estudos que englobam as propriedades de géis de pectinas HM produzidos em pH ácido com alto teor de co-solutos, destacam-se aqueles variando o pH (EL-NAWAWI; HEIKEL, 1997; EVAGELIOU; RICHARDSON; MORRIS, 2000; SHARMA; LIPTAY; LE MAGUER, 1998), a concentração de sacarose (EL-NAWAWI; HEIKEL, 1997; EVAGELIOU; RICHARDSON; MORRIS, 2000; SHARMA; LIPTAY; LE MAGUER, 1998; VRIESMANN, 2008; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010), a concentração de pectina (SHARMA; LIPTAY; LE MAGUER, 1998; VRIESMANN, 2008; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010) e o tipo de co-soluto empregado (EVAGELIOU; RICHARDSON; MORRIS, 2000; TSOGA; RICHARDSON; MORRIS, 2004).

Em geral, tem sido observado que a formação de géis de pectinas HM ocorre dentro de certos limites de pH, pois valores de pH muito baixos são críticos e não há gelificação em $\text{pH} > 3,5$ (ROLIN; DE VRIES, 1990). Para uma pectina comercial a 0,5% (DE 70,3%) na presença de 65% de sacarose e diferentes pHs (3,0 a 4,7), foi observada a formação de géis mais fortes com a diminuição do pH (EVAGELIOU; RICHARDSON; MORRIS, 2000).

Ao estudar a gelificação de pectinas HM de cítricos a 0,4% variando a concentração de sacarose (55, 65 e 75%) e o pH (2,2 a 3,4), El-Nawawi e Heikel (1997) obtiveram géis mais fortes com 75% de sacarose em pH 3,2 e 65% de sacarose em pH 3,0.

Para pectinas HM da polpa de tomates, Sharma, Liptay e Le Maguer (1998) observaram a formação de géis com 60% de sacarose em $\text{pH} < 3,0$, sendo que a força dos géis aumentou com decréscimos no pH e com o aumento da concentração de pectina de 1 para 2%.

Para géis de pectinas HM da polpa do cupuaçu preparados em pH 3,0 com diferentes concentrações de pectina (1-3%) e teores variados de sacarose (55-65%), observou-se que aumentos de concentração de pectina e de sacarose influenciaram positivamente os géis (VRIESMANN, 2008; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010).

Ao analisar géis de pectinas comerciais (DE 70%) a 1% preparados com diferentes co-solutos (xilitol, sorbitol, glucose, frutose ou sacarose) em várias concentrações (50-65%) e pH 3,0 foi observada a formação de géis mais fortes utilizando a sacarose (TSOGA; RICHARDSON; MORRIS, 2004).

No caso de pectinas LM, não há necessidade de sacarose para a gelificação. Esta ocorre na presença de cátions divalentes, como por exemplo, íons cálcio, que agem como uma ponte entre pares de grupos carboxílicos dissociados de diferentes cadeias de pectinas numa faixa de pH entre 2,5 e 6,0, formando zonas de junção entre as regiões de homogalacturonana por meio de ligações iônicas, como demonstrado na Figura 3(B), que levam à gelificação (MALOVÍKOVÁ; RINAUDO; MILAS, 1994; MORRIS, 1986; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001; REES, 1969; THIBAUT; RALET, 2001; THIBAUT; RINAUDO, 1986).

Este tipo de formação de zonas de junção pode ser descrito pelo modelo “caixa de ovos” (*egg box*), onde as cadeias de pectato são hélices duplas e nas zonas de junção, com seu arranjo antiparalelo, estas cadeias formam espaços ou fendas de ligação, as quais aprisionam íons cálcio, que ligam as cadeias entre si. A gelificação aparentemente envolve dois estágios, sendo o primeiro a formação de dímeros (caixa de ovos) e o segundo a condensação dos dímeros em agregados (muitas caixas de ovos são posicionadas juntas) (ROLIN, 1993). Além das interações eletrostáticas, as zonas de junção entre duas cadeias pécticas vizinhas são também estabilizadas por interações de Van der Waals e pontes de hidrogênio entre os grupos polares das moléculas de pectinas (FRAEYE *et al.*, 2010). Como metade dos grupos carboxílicos é orientada para fora da “caixa de ovos”, a presença de um número limitado de unidades metil-esterificadas não impossibilita a formação de uma zona de junção (FRAEYE *et al.*, 2010; POWELL *et al.*, 1982).

Pela natureza eletrostática das ligações, os géis de pectinas LM são muito sensíveis a parâmetros estruturais que podem modificar o ambiente dos grupos carboxílicos, como a natureza, distribuição e quantidade de substituintes ao longo da cadeia de homogalacturonana. Desta forma, a presença de grupos acetil reduz drasticamente a afinidade das pectinas para com o cálcio. A presença de grupos amidas em C-6 (amidação) melhora a capacidade das pectinas LM de formar géis, especialmente em baixos valores de pH, pela contribuição adicional de pontes de hidrogênio entre os grupos amida. Adicionalmente, menos cálcio é necessário para a gelificação de pectinas amidadas, que também são menos susceptíveis a precipitação por alto teor de cálcio (FRAEYE *et al.*, 2010; LOOTENS *et al.*, 2003; THIBAULT; RALET, 2001; VORAGEN *et al.*, 1995).

Além disso, a capacidade de formação de gel de pectina LM aumenta com o decréscimo do DE (pois há aumento do número de sequências de GalA desesterificadas). Pectinas LM com grupos carboxílicos livres distribuídos em blocos são muito sensíveis a baixos níveis de cálcio e formam géis mais fortes que pectinas LM com distribuição aleatória dos grupos carboxílicos livres (FRAEYE *et al.*, 2010; THIBAULT; RALET, 2001; VORAGEN *et al.*, 1995).

Adicionalmente, a força dos géis de pectinas LM diminui quando a massa molecular é menor: se houver alguma despolimerização da cadeia, a adição de uma quantidade maior de cálcio pode compensar a perda da força do gel, mas se as cadeias de pectina forem muito curtas, a gelificação se torna impossível. Cadeias laterais (ramificações) em elevada proporção causam impedimento estérico, que pode dificultar as interações entre as cadeias adjacentes de pectinas e prejudicar a formação de géis (FRAEYE *et al.*, 2010).

O processo de gelificação de pectinas LM também depende de fatores externos, como temperatura, pH, força iônica e quantidade de cálcio adicionada. Em baixas concentrações de cálcio, duas cadeias de homogalacturonanas estão fortemente ligadas pelos íons cálcio. Ligação cooperativa do cálcio ocorre em regiões que contêm mais de 10 unidades de GalA livres adjacentes com posterior estabilização das zonas de junção. Em excesso de cálcio, as zonas de junção podem consistir de múltiplas cadeias de HG interligadas, podendo levar à precipitação (FRAEYE *et al.*, 2010; O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001).

Se a sacarose estiver presente, seu efeito combinado com o pH permite gelificação a menores níveis de cálcio por promover interações cadeia-cadeia

(VORAGEN *et al.*, 1995). Aumentos na concentração de sacarose favorecem a formação de géis de pectinas LM (CARDOSO; COIMBRA; LOPES DA SILVA, 2003; FU; RAO, 2001; IGLESIAS; LOZANO, 2004), bem como aumentos na quantidade de pectina utilizada (CARDOSO; COIMBRA; LOPES DA SILVA, 2003; FU; RAO, 2001).

Concentrações usuais de pectinas HM em géis variam de 2 a 4%, e de pectinas LM de 0,1 a 4% (BUREY *et al.*, 2008) e na maioria dos casos, um gel de pectina é preparado sob aquecimento e então solidificado por resfriamento. Quando resfriado abaixo da temperatura de gelificação, sistemas contendo pectinas LM geleificarão quase que instantaneamente, enquanto que sistemas com pectinas HM geleificarão após certo tempo. Uma vez formado, o gel de pectina HM não pode ser desfeito, mas um gel de pectina LM pode, na maioria dos casos, ser desfeito e reconstituído repetidamente, ou seja, é termorreversível (ROLIN, 1993).

Pelas características de sua gelificação, pectinas LM podem ser usadas em produtos com baixo teor de açúcar, tais como geleias de baixo teor calórico, produtos de confeitaria, e outras aplicações que envolvam restrição no conteúdo de açúcar. A ampla faixa de pH onde ocorre a gelificação das pectinas LM permite seu emprego em alimentos que necessitam formar gel em condições menos ácidas, como por exemplo, para preservar aromas (THIBAUT; RALET, 2001). A reversibilidade térmica de géis de pectinas LM permite seu uso em geleias e géis de brilho e em recheios e coberturas de produtos de padarias e confeitarias que passam por procedimentos de esterilização ou pasteurização, ou ainda aquecimento em micro-ondas (IGLESIAS; LOZANO, 2004).

Uma vez que as características dos géis de pectina podem determinar diferentes tipos de aplicações, a análise de suas propriedades físico-químicas torna-se um passo imprescindível para a sua adequada utilização.

2.1.5 Pectinas em sistemas de liberação colônica de fármacos

As pectinas vêm sendo sugeridas para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos cólon-específicos, na sua forma nativa ou modificada, isoladamente ou em combinação com outros polímeros naturais ou sintéticos (BIGUCCI *et al.*, 2008; LEE; KIM; LEE, 2009; LIU *et al.*, 2003; MAESTRELLI *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*,

2007; SRIAMORNSAK; PUTTIPIATKHACHORN; PRAKONGPAN, 1997; SRIAMORNSAK; NUNTHANID, 1998; UGURLU *et al.*, 2007; WEI *et al.*, 2006; WU, *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2009).

A grande vantagem destes tipos de sistemas de liberação é a administração de: i) proteínas e peptídeos por via oral; ii) menores doses de fármacos insolúveis ou que apresentam pouca absorção no sistema gastrointestinal superior, iii) fármacos com elevada incidência de efeitos colaterais; ou iv) fármacos para ação local. Estes chegam ao cólon de forma intacta devido à proteção polimérica e ali são absorvidos (SINHA; KUMRIA, 2001; YANG; CHU; FIX, 2002).

As pectinas podem ser aplicadas nestes sistemas por se manter intactas no ambiente fisiológico do estômago e intestino delgado, resistindo a proteases e amilases e permanecendo como macromoléculas agregadas em ambientes ácidos (LIU *et al.*, 2003; SINHA; KUMRIA, 2001). Em pH neutro, estas se dissociam e se expandem, sendo biodegradadas especificamente pela microbiota do cólon intestinal, permitindo a liberação do fármaco (LIU *et al.*, 2003).

Entre os fármacos que poderiam ser empregados neste tipo de sistema de liberação contendo pectinas está o ácido 5-aminossalicílico, destinado à ação local no cólon em casos de doenças inflamatórias intestinais, como na colite ulcerativa. Além disso, já são descritos efeitos benéficos de pectinas neste tipo de doença, especialmente quanto à diminuição da resposta inflamatória na mucosa intestinal (YE; LIM, 2010).

2.2 COLITE ULCERATIVA E ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal que se manifesta em resposta a desordens imunológicas associadas com a resposta imune celular e humoral (OWCZAREK *et al.*, 2009). Embora sua patogênese ainda não esteja totalmente esclarecida, parece envolver desequilíbrios entre as citocinas anti- e pró-inflamatórias (ARDIZZONE; BIANCHI PORRO, 2005), levando a um distúrbio inflamatório crônico no intestino grosso, onde se observa inflamação e ulceração da mucosa intestinal, que se estende desde o orifício anal e pode acometer todo o cólon ou parte dele, exibir manifestações extra-intestinais (articulares,

dermatológicas, oculares e osteomusculares), e gerar sérias complicações, como o câncer colorretal e o megacólon tóxico. É caracterizada por diarreia crônica, sanguinolenta ou não, com ou sem muco, e frequentemente acompanhada por dor abdominal, sintomas que podem persistir por dias ou até meses. É característica da doença a presença de períodos de recidivas e exacerbações, o que pode até mesmo levar à anemia, emagrecimento e desidratação, dependendo do caso (CORMAN, 2005; GOUVEIA; JACQUES, 2010; SELLIN; PASRICHA, 2010).

Entre os fármacos tradicionalmente empregados para o tratamento da colite ulcerativa está, como primeira opção, o ácido 5-amino-2-hidroxi benzóico ou ácido 5-aminossalicílico, também denominado 5-ASA, mesalazina e mesalamina (GOUVEIA; JACQUES, 2010; KLOTZ, 2005; SELLIN; PASRICHA, 2010), cuja estrutura química está representada na Figura 4.

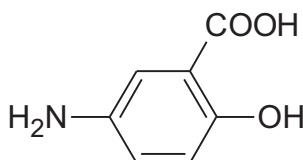


FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO
FONTE: O AUTOR.

O 5-ASA tem massa molecular de $153,14 \text{ g.mol}^{-1}$ e se apresenta como pó ou cristais de coloração variando de branca a acinzentada e rosada. Se decompõe a 280°C e se dissolve em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos e ácido clorídrico, sendo muito pouco solúvel em água e praticamente insolúvel em álcool. Está incluído na categoria terapêutica dos anti-inflamatórios gastrointestinais (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2008; THE MERCK INDEX, 2001).

Apesar de seu mecanismo de ação ainda não estar totalmente elucidado, trata-se de um agente anti-inflamatório eficaz nas manifestações branda a moderada da doença bem como na manutenção da remissão, prevenindo as recidivas (GOUVEIA; JACQUES, 2010; KLOTZ, 2005; SELLIN; PASRICHA, 2010; SONU *et al.*, 2010).

Por apresentar ação anti-inflamatória local na mucosa intestinal, o 5-ASA deve chegar ao cólon em concentração adequada para se ter eficácia terapêutica a nível tecidual. Embora o fármaco possa ser administrado por via retal, através de supositórios, enemas ou preparações de espumas, há uma preferência dos

pacientes pelo uso de medicamentos via oral. Desta forma, ao ser administrado por via oral, o 5-ASA deve ser pouco absorvido no organismo para atingir o cólon na dose adequada, e promover sua ação (CAMPIERI *et al.*, 1991; HANAUER, 2004; SELLIN; PASRICHA, 2010; SONU *et al.*, 2010; SOUSA *et al.*, 2008).

Uma maneira de viabilizar a administração oral do 5-ASA consiste no desenvolvimento de formulações que permitam sua liberação a nível colônico, como aquelas pH-dependentes ou de liberação controlada do fármaco. Estes sistemas podem reduzir, concomitantemente, a incidência de efeitos colaterais relacionados à absorção sistêmica do fármaco (QURESHI; COHEN, 2005; SONU *et al.*, 2010).

Entre as formulações comerciais de 5-ASA com revestimento pH-dependente estão o Asacol[®] e o Salofalk[®]. Ambos empregam copolímeros derivados do ácido metacrílico e metilmetacrílico (polímeros sintéticos Eudragit[®]). Os polímeros utilizados nestas preparações se dissolvem em pH>7 e pH>6, respectivamente, de modo a prevenir a liberação do fármaco no estômago e intestino delgado e permiti-la no íleo e cólon, desde que a formulação permaneça nestes locais pelo tempo necessário para tal (FREIRE *et al.*, 2006).

Exemplo de formulação comercial de 5-ASA de liberação controlada é o Pentasa[®], que consiste em comprimidos contendo microgrânulos do fármaco revestidos por etilcelulose, polímero derivado da celulose. Ao ser ingerido, o comprimido se desagrega e libera os microgrânulos revestidos. O polímero de revestimento intumescce e leva à formação de um gel em torno de cada microgrânulo de 5-ASA, que será liberado por erosão e difusão através da camada de gel. Quanto mais espessa a camada de etilcelulose, maior será o tempo de latência para a liberação do fármaco, permitindo, desta maneira, controlar o local de liberação de acordo com o tempo de chegada até o cólon (FREIRE *et al.*, 2006).

Sistemas tempo e pH dependentes vêm mostrando benefícios no tratamento das doenças inflamatórias do intestino, mas são pouco específicos se comparados com sistemas que se baseiam em particularidades do cólon (FREIRE *et al.*, 2006).

Desta forma, existe interesse da indústria farmacêutica quanto ao desenvolvimento de novos sistemas de liberação cólon-específicos, como aqueles que podem explorar a microbiota local, com o emprego de polímeros naturais, seguros e biodegradáveis, a exemplo das pectinas das cascas de frutos do cacau, objeto de estudo do presente trabalho.

2.3 CACAU

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.), mostrado na Figura 5, pertence à família Sterculiaceae e é a espécie mais conhecida do gênero *Theobroma* (ICCO, 2012c), sendo popularmente denominado cacau, cacaueiro e cacau-verdadeiro (LORENZI, 2002).



FIGURA 5 - CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.) COM FRUTOS EM PRODUÇÃO
FONTE: OTTOIMAGEM (2012)

Sua madeira tem pouca aplicação, mas seus frutos, mostrados nas Figuras 5 e 6, são comestíveis. Seu principal valor comercial está nas sementes, destinadas principalmente para a fabricação do chocolate consumido em todo o mundo, mas também utilizadas nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (ALMEIDA; VALLE, 2007; KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998; LORENZI, 2002).



FIGURA 6 - FRUTO ABERTO DO CACAU (CORTE LONGITUDINAL), REVELANDO AS SEMENTES E A CASCA ESPESSA

FONTE: MASTER GARDENER LANDSCAPING OF FORT LAUDERDALE (2012).

Na produção comercial de sementes, após colheita dos frutos maduros de cacau, estes são abertos e as sementes envoltas pela polpa são retiradas, passando por um processo de fermentação. Assim, a polpa fornece substratos para vários microorganismos, permitindo a ocorrência de reações químicas nas sementes, que são essenciais para o desenvolvimento do sabor e da cor do chocolate, que se completa durante a torrefação das sementes. Após a fermentação, antes de serem embaladas para distribuição, as sementes de cacau passam por um processo de secagem artificial ou ao sol para redução da umidade de 60% para 7,5% (ICCO, 2012b).

Desta forma, apenas 10% do fruto do cacau é comercializado, na forma de sementes secas (amêndoas de cacau). Entretanto, subprodutos e derivados do cacau também podem ser empregados em cosméticos, bebidas e alimentos (ALMEIDA; VALLE, 2007; KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998).

A polpa, necessária à fermentação das sementes, muitas vezes está presente em excesso, e pode ser utilizada *in natura* ou processada, na produção de geleias de cacau, bebidas finas, álcool, vinagre, polpa, iogurtes, sorvetes ou sucos. Já as cascas dos frutos, originadas após a remoção das sementes, normalmente são consideradas resíduos indesejáveis da indústria do cacau e acabam sendo

abandonadas na própria plantação de cacau (ALMEIDA; VALLE, 2007; BABATOPE, 2005; DONKOH *et al.*, 1991; FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993; ICCO, 2012b; KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998; LORENZI, 2002).

Constituindo aproximadamente 75-76% do fruto do cacau inteiro, a casca é o principal resíduo da indústria cacaueira (DONKOH *et al.*, 1991; WHISTLER; MASAK JR; PLUNKETT, 1956). Para cada tonelada de sementes secas são geradas 10 toneladas de casca úmida do fruto, o que representa um sério problema ambiental. Elas se tornam uma fonte significativa de inóculo de doenças, como a vassoura-de-bruxa, quando usadas como adubo dentro da plantação, além de causarem o aparecimento de odores fétidos no local (BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008; FIGUEIRA; JANICK; BEMILLER, 1993; KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998).

Análises físico-químicas das cascas de frutos do cacau mostraram a presença de Ca, P, K, Mg, Na, Zn, Fe, Mn e Cu, com relativa abundância de K, além de significativo teor de fibras (AREGHEORE, 2002; CHEPOTE, 2003; DONKOH *et al.*, 1991; IMANAH; OKIEMEN, 2003; KALVATCHEV; GARZARO; CEDEZO, 1998). Assim, entre os produtos que empregam cascas dos frutos do cacau estão rações para animais, em especial carneiros, porcos e aves domésticas. A partir do potássio obtido das cascas incineradas, são produzidos fertilizantes ricos em potássio e usados em culturas de cacau, vegetais e alimentos, sais de potássio e sabões (CRIG, 2009).

O cacau é produzido nos países localizados entre 10°N e 10°S da linha do Equador, onde o clima é apropriado ao crescimento das árvores. Os maiores produtores mundiais são a Costa do Marfim, a Gana e a Indonésia, com 35%, 24% e 10% da produção mundial, respectivamente, na safra de outubro 2010 a setembro 2011 (CEPLAC, 2012; ICCO, 2012c).

Atualmente o Brasil ocupa a sexta posição em produção mundial do cacau (quase 5% do total produzido no mundo na safra 2010/2011), sendo este cultivado principalmente em plantações comerciais na região Amazônica e na Bahia, mas também no Espírito Santo (CEPLAC, 2012; IBGE, 2012). Segundo dados do IBGE (2012), a produção brasileira total na safra 2011 passou de 245.000 toneladas de sementes secas. A Bahia foi o principal estado produtor de cacau (>156.000 ton), seguida do Pará (> 63.000 ton), Rondônia (> 15.000 ton) e Espírito Santo (>8.000 ton).

2.3.1 Cacau e Polissacarídeos

O cacau é comercialmente explorado pelas suas sementes. Assim, muitos dos atuais estudos estão relacionados a elas, inclusive quando se trata de carboidratos.

Redgwell e Hansen (2000) investigaram polissacarídeos de parede celular de cotilédones de sementes de cacau antes e depois da fermentação. Os autores observaram uma composição monossacarídica idêntica para os grãos fermentados ou não, sugerindo que a fermentação não causou mudanças significantes nos polissacarídeos não-celulósicos da parede celular. Entre os polissacarídeos encontrados, destacaram-se as pectinas (60%), seguidas de celulose (28%), e hemiceluloses, principalmente xiloglucana fucosilada (8%) e galactoglucomanana (3%).

Posteriormente, Redgwell, Trovato e Curti (2003), ao analisar mudanças ocorridas nos polissacarídeos pela torrefação das sementes do cacau, mostraram que houve degradação de 10% de Ara, mas em geral, as pectinas e hemiceluloses permaneceram intactas após a torrefação.

Já entre os estudos com as cascas das sementes de cacau, incluem-se aqueles que mostram que elas apresentam quantidades significativas de fibras dietéticas totais, em especial fibras insolúveis (BONVEHÍ; BENERÍA, 1998; LECUMBERRI *et al.*, 2007; MARTÍN-CABREJAS *et al.*, 1994).

Bonvehí e Benería (1998) e Lecumberri *et al.* (2007) encontraram a celulose como principal tipo de fibra insolúvel e os polissacarídeos com alto teor de ácidos urônicos como principal tipo de fibra solúvel nas cascas das sementes do cacau. Já Martín-Cabrejas *et al.* (1994) encontraram pectinas e celulose presentes em quantidades semelhantes nas fibras dietéticas totais. A Glc predominou na fibra insolúvel, enquanto que os polissacarídeos ácidos estavam igualmente distribuídos nas fibras solúveis e insolúveis. As principais substâncias pécticas na fibra insolúvel foram pectinas LM enquanto que na fibra solúvel foram pectinas HM.

Arlorio *et al.* (2001) sugeriram as cascas das sementes do cacau como potencial fonte de pectinas HM (rendimento $1,29 \pm 0,08\%$, peso seco; DE $60,53 \pm 6,09\%$), embora não tenham sido mostrados detalhes de caracterização química e reológica para as pectinas obtidas.

Mais recentemente, Redgwell *et al.* (2003) verificaram que a parede celular de cascas não deslipidificadas das sementes torradas do cacau apresentava 45% de polissacarídeos, com predomínio de pectinas (40-45%), seguidos de celulose (34%), além de uma mistura de polímeros hemicelulósicos, representados por galactoglucomananos (7-10%), xiloglucanas fucosiladas (5-7%) e glucuronoarabinoxilanas (4%). Nas frações pécticas, foram encontradas homogalacturonanas e ramnogalacturonanas com cadeias laterais contendo galactose e arabinose.

Visando otimizar o processo de extração de pectinas das cascas de sementes de cacau, Mollea, Chiampo e Conti (2008) fizeram um estudo preliminar de extração e caracterização das mesmas. Como agente extrator, os autores utilizaram solução aquosa com e sem acidificação por HCl (pHs 7,0; 4,0; 2,5; 1,5 e 1). O maior rendimento (~8%) foi obtido após 1h de extração em pH 2,5 a partir de cascas moídas, resultando em pectinas LM. Entretanto, os autores apontam a necessidade de mais investigações para otimizar os parâmetros de extração.

Outros materiais de estudo obtidos do cacau foram as gomas do caule e da casca dos frutos. Figueira, Janick e BeMiller (1994) mostraram que ambas as gomas apresentaram altos teores de ácidos urônicos. Apesar da semelhança entre sua composição monossacarídica e a da goma karaya, as gomas do cacau apresentaram uma maior quantidade de Rha, GalA e GlcA.

Em relação aos polissacarídeos das cascas do fruto do cacau, o primeiro estudo foi efetuado por Whistler, Masak Jr e Plunkett (1956), que analisaram polissacarídeos solúveis em água quente das cascas e também das sementes do cacau, com rendimento de 2% e 0,3%, respectivamente. Ambos os polissacarídeos apresentaram os mesmos monossacarídeos, mas em diferentes proporções. Na casca a proporção Rha:Gal:Ara:Man encontrada foi 3,8:3,8:1,3:1, enquanto que na semente a proporção foi de 3:2:2,5:1.

Posteriormente Dittmar (1958) citou que cascas de cacau de diversas variedades sul-americanas, secas ao sol, continham 5,3 a 7,1% de pectinas. Por extração aquosa a quente, foi isolada uma fração com 11% de rendimento, contendo pectinas contaminadas por glucanas e mananas.

Blakemore, Dewar e Hodge (1966) citados por Figueira, Janick e BeMiller (1993) verificaram que a maior parte dos polissacarídeos solúveis em água quente presentes na casca do fruto do cacau eram pectinas.

Adomako (1972), através de extração ácida branda usando ácido acético e clorídrico também obteve frações pécticas a partir das cascas de frutos do cacau. Houve predomínio de GalA (60%) e as frações apresentaram rendimentos entre 8 e 11% em relação à casca seca de frutos maduros e 25-29% em relação à casca seca de frutos imaturos.

Já Fontes (1972), citado por Barazarte, Sangronis e Unai (2008), extraiu pectinas do endocarpo do cacau com um rendimento de 8% em base seca.

Rosário (2006), na tentativa de isolar xiloglucana estrutural de cascas do fruto do cacau a partir de extrações com KOH, fez extrações sequenciais prévias com água e Na_2CO_3 , encontrando nessas frações elevada proporção de material péctico, totalizando 12,5% de rendimento em relação às cascas secas e deslipidificadas.

Recentemente, Barazarte, Sangronis e Unai (2008) extraíram pectinas a partir de cascas dos frutos de cacau em diferentes condições de pH (3, 4 e 5) e temperatura (60, 75 e 90°C) através de planejamento experimental fatorial 3^2 e avaliaram suas principais características químicas. Foram obtidas pectinas com rendimento entre 2,6 e 4,7%, teor de GalA entre 49,8 e 64,6% e DE entre 37,9 e 52,2%. A pectina obtida em pH 4 e temperatura de 90°C (3,9% de rendimento em relação às cascas secas) apresentou 62,3% GalA e por esta razão, foi considerada pelos autores como a de melhor qualidade, sendo capaz de formar gel na presença de sacarose e ácido (DE 48,3%).

Conforme descrito, estudos prévios relacionados aos polissacarídeos das cascas do fruto do cacau demonstram a presença de pectinas. Entretanto, há escassez de estudos mais detalhados relacionados à sua caracterização química e reológica, e à otimização da extração das pectinas a partir das cascas dos frutos do cacau, sendo estes aspectos objeto do presente estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA CASCA DOS FRUTOS DE CACAU (*Theobroma cacao*)

Durante a safra (setembro 2008-fevereiro 2009), após a “quebra” dos frutos para retirada da polpa e das sementes para processamento pela indústria cacaueira, as cascas frescas dos frutos de cacau foram enviadas para Curitiba pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), em Itabuna (BA). O material foi utilizado para ensaios preliminares.

Também foram enviadas cascas dos frutos de cacau previamente desidratadas na CEPLAC/CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau, Itabuna, BA) em estufa a 70°C com circulação de ar. As mesmas foram moídas em moinho WILEY MILL 934 utilizando peneiras de 2 e 1 mm, sucessivamente. O material final, que passou por peneira de 1mm (<18 mesh), foi denominado CPHF (*cacao pod husks flour* - farinha da casca dos frutos do cacau) e empregado para a extração de pectinas.

3.2 ENSAIOS PRELIMINARES DE PROCESSAMENTO DAS CASCAS

As cascas frescas trituradas em liquidificador foram submetidas a diferentes processamentos, envolvendo ou não inativação enzimática, para verificar que condição seria mais adequada para a obtenção das pectinas.

Os processos sem inativação enzimática foram: secagem em estufa a 45°C e secagem em liofilizador. Os materiais secos foram submetidos a uma extração aquosa por 1h a 25°C, e após centrifugação, o sobrenadante foi separado, precipitado com dois volumes de etanol e mantido sob refrigeração por 16h. O material precipitado foi centrifugado, lavado com etanol e seco em estufa a vácuo EDGCON 5P a 25 ± 1°C.

Os processos de inativação enzimática foram com etanol (KOCH; NEVINS,

1989; ROSE *et al.*, 1998; SÁENZ *et al.*, 2000) e com solução de metanol: água (4:1, v/v) (LEITNER, 1991), em ebulição sob refluxo por 20 minutos, seguidas de banho de gelo. Após centrifugação, os resíduos foram fracionados em duas partes: uma delas foi lavada com etanol (para desidratar as moléculas) e a outra com acetona (para desidratar as moléculas e ao mesmo tempo tentar extrair possíveis pigmentos) e ambos os resíduos foram secos em estufa a vácuo ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Os materiais secos foram submetidos ao processo de extração descrito anteriormente.

Para inativação enzimática também se empregou água fervente adicionada sobre as cascas trituradas frescas, seguida de tempos de permanência em micro-ondas sob alta potência de 2, 5 e 10 minutos, baseando-se no procedimento empregado por Kratchanova *et al.* (1994), Kratchanova, Pavlovaa e Panchev (2004) e Fishman *et al.* (2000) com modificações. Cada material foi resfriado até 25°C com água gelada e foi centrifugado. O sobrenadante foi descartado e os resíduos foram fracionados em três partes: uma delas foi submetida a uma extração aquosa por 1h a 25°C , outra parte foi lavada com etanol e outra com acetona e ambos os resíduos foram secos em estufa a vácuo e também submetidos à extração aquosa já descrita. Uma nova alíquota de cascas de cacau foi submetida ao procedimento de inativação enzimática em micro-ondas (2, 5 e 10 min), porém após resfriamento, foi submetida diretamente à extração aquosa, sem centrifugação prévia.

Também foi realizada uma extração aquosa por 1h a 25°C diretamente do material fresco.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

A farinha da casca dos frutos do cacau (CPHF) foi caracterizada quanto à umidade, teor de cinzas, proteínas, lipídios, fibras alimentares totais, solúveis e insolúveis, e minerais, de acordo com as metodologias descritas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). A umidade foi determinada em estufa a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ e a fração cinzas em forno mufla a $550 \pm 1^\circ\text{C}$. A dosagem de nitrogênio total pelo método Kjeldahl foi utilizada para determinar o teor protéico (valor de

nitrogênio x 6,25). A determinação lipídica foi realizada a partir do método de Soxhlet. Fibras alimentares totais, solúveis e insolúveis foram determinadas pelo método enzimático-gravimétrico. As concentrações de cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), magnésio (Mn), selênio (Se) e zinco (Zn) e foram determinadas a partir da digestão ácida das cinzas seguida pela análise em espectrofotometria de absorção atômica (Perkin-Elmer Analyst 300). Potássio (K) e sódio (Na) foram determinados por fotometria de chama (B262 Micronal) com escala de leitura de 0 a 150 mg L⁻¹. Curvas de calibração com padrões de grau analítico foram utilizadas para quantificação dos minerais ($R^2 = 0,99$).

O teor de fenólicos foi determinado espectrofotometricamente como compostos fenólicos solúveis após extrações (quadruplicata) a partir de CPHF, como descrito por Lecumberri *et al.* (2007). 1g de CPHF foi submetido a extrações sequenciais com 40 mL de metanol:água (50:50, v/v) acidificado com 16 mmol.L⁻¹ de HCl, e com 40 mL de acetona:água (70:30, v/v) por 1h a 25°C sob agitação. Após 15 minutos de centrifugação a 3000 x g, os sobrenadantes de cada etapa de extração foram agrupados e o volume completado para 100 mL para realização da dosagem colorimétrica, conforme item 3.5.

O teor de lignina foi determinado como a quantidade de material insolúvel em ácido sulfúrico após hidrólise ácida de duas etapas (ADAMS, 1965).

Os compostos de baixa massa molecular foram extraídos de CPHF com etanol a 80% (1:30, m/v) a 60°C por 5h. Após centrifugação, o sobrenadante foi separado e o resíduo da extração foi submetido ao mesmo processo de extração por mais duas vezes. Os três sobrenadantes foram agrupados e concentrados até um volume final conhecido. O teor de carboidratos totais e de açúcares redutores foram determinados conforme item 3.5

Todas as análises foram efetuadas em triplicata (n=3), exceto a determinação de fibras e a extração dos compostos de baixa massa molecular (n=2). Os resultados foram expressos em g/100g (base seca), exceto para o teor de minerais, expressos em mg/100 g ou mg/1000 g.

3.3.1. Propriedades físico-químicas

As capacidades de inchamento (SC), de retenção de água (WRC) e de retenção de óleo (FAC) foram avaliadas baseando-se nos métodos empregados por Gómez-Ordóñez, Jiménez-Escrig e Rupérez (2010) e Chantaro, Devahastin e Chiewchan (2008), com modificações.

Para a capacidade de inchamento (SC), 100 mg de CPHF foram hidratados por 18h a 25°C em 10 mL de água destilada contendo 0,02% de azida de sódio utilizando-se um cilindro graduado (0,1 mL) com 12 mm diâmetro. O volume ocupado pela amostra foi medido e a capacidade de inchamento foi expressa em mL/g CPHF seco.

Para a capacidade de retenção de água (WRC), 1 g de CPHF foi hidratado por 18h a 25°C em 30 mL de água destilada contendo 0,02% de azida de sódio. Após centrifugação a 3000 x g por 20 minutos, o sobrenadante foi removido, o resíduo foi pesado e a capacidade de retenção de água foi calculada em g água retida/g CPHF seco.

Para a capacidade de retenção de óleo (FAC), realizou-se o mesmo procedimento efetuado para a capacidade de retenção de água, mas usando óleo de soja comercial em vez de água destilada contendo azida. A capacidade de retenção de óleo foi calculada em g de óleo de soja retido/ g CPHF seco.

3.4 OBTENÇÃO DE PECTINAS

As extrações foram realizadas em balão de duas bocas em banho-maria Fisatom 775 sob refluxo com auxílio de agitador mecânico FISATOM 713 a 250 rpm. Utilizou-se a proporção 1:25 CPHF:solução extratora (m/v). Após cada extração, as dispersões foram centrifugadas a 15400 × g por 30 minutos (centrífuga HITACHI HIMAC CR 21E), separando o sobrenadante, que foi filtrado em tecido sintético e os polissacarídeos foram precipitados utilizando dois volumes de etanol, permanecendo em repouso por 16h a 4°C. O material precipitado foi lavado três

vezes com etanol e seco em estufa a vácuo EDGCON 5P a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, originando as frações de pectinas, cujo rendimento foi calculado gravimetricamente em relação à CPHF (% do peso bruto de CPHF).

Para obtenção das pectinas, foram efetuadas extrações ácidas e aquosas, conforme esquematizado na Figura 7. As extrações ácidas foram feitas com ácido cítrico ou nítrico de acordo com planejamento experimental descrito no item 3.4.1. As extrações aquosas foram realizadas em banho-maria com temperatura de 50°C e fervente (90 minutos).

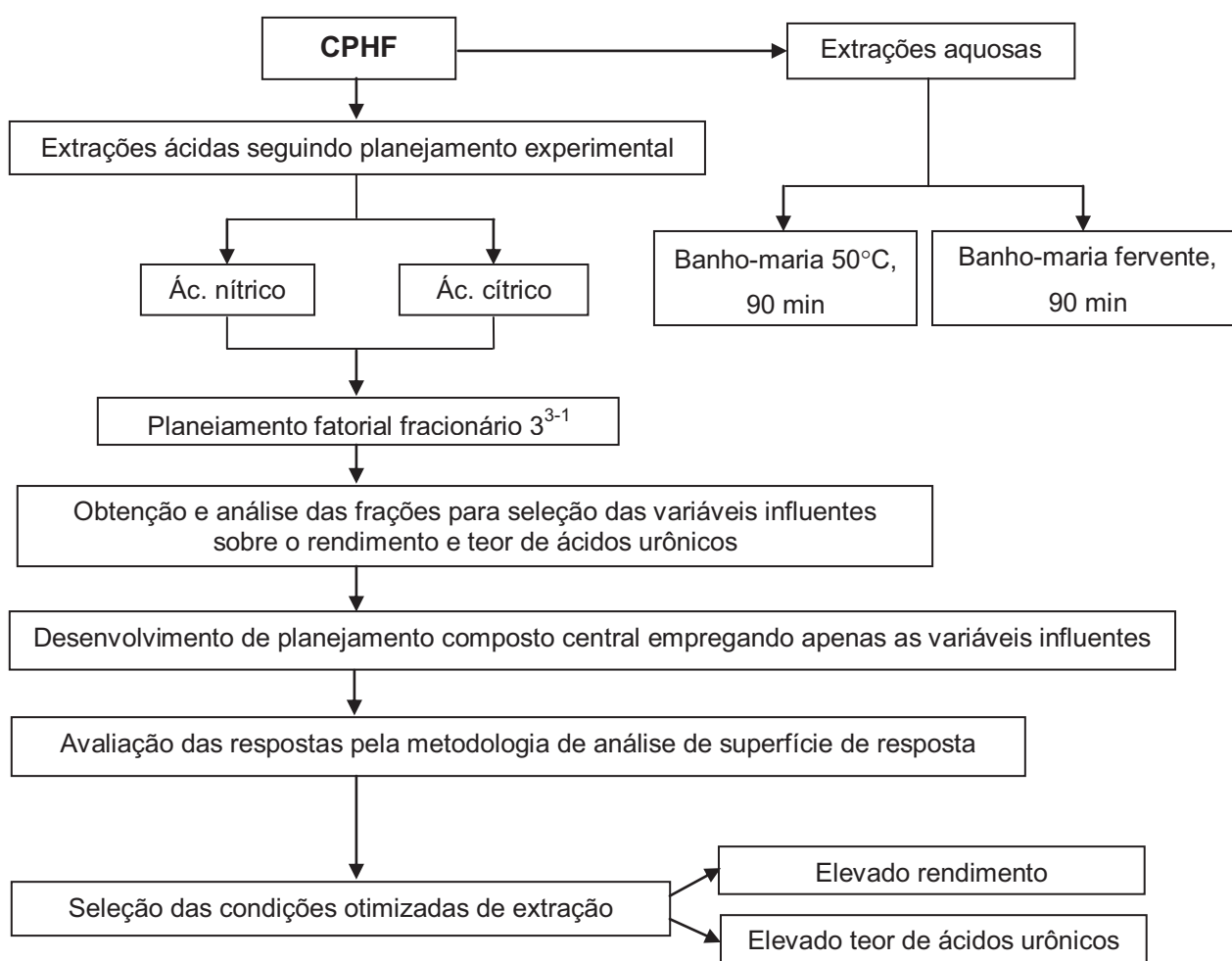


FIGURA 7 - PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

As determinações de pH foram realizadas em equipamento QUIMIS digital, modelo Q400A.

Para a remoção de solventes foi utilizado evaporador rotatório HEIDOLPH VV 2000 a vácuo, com banho FISATOM em temperatura inferior a 50°C .

3.4.1 Planejamento experimental para extração ácida de pectinas

Para as extrações ácidas, primeiramente foram elaborados planejamentos fatoriais fracionários 3^{3-1} de extração empregando ácido nítrico e ácido cítrico para triagem inicial de variáveis influentes sobre as respostas rendimento e teor de ácidos urônicos das pectinas extraídas (Tabelas 1 e 2). As variáveis estudadas foram o pH da solução ácida extratora (pH), a temperatura de extração (T) e o tempo de extração (t), cujos valores foram selecionados de acordo com a literatura (ROLIN, 1993; VORAGEN *et al.*, 1995).

TABELA 1 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3^{3-1} PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) EMPREGANDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO NÍTRICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH, TEMPERATURA E TEMPO

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	tempo (min)
7	3	50	60
2	1	75	90
13c	2	75	60
9	3	100	90
5c	2	75	60
3	1	100	60
4	2	50	90
11c	2	75	60
10c	2	75	60
1	1	50	30
12c	2	75	60
8	3	75	30
6	2	100	30

c: ponto central

Foram empregados 3 níveis para cada uma das variáveis estudadas. Para o pH, valores de 1, 2 e 3 foram utilizados; para a temperatura de extração, utilizou-se 50, 75 e 100°C; e a duração das extrações foi de 30, 60 e 90 minutos. Cinco repetições foram efetuadas no ponto central (c – $pH=2$, $T=75^{\circ}C$ e $t=60$ min) para estimar erros puros e os experimentos foram realizados aleatoriamente para detectar erros sistemáticos.

TABELA 2 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3^{3-1} PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) EMPREGANDO SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE pH, TEMPERATURA E TEMPO

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	tempo (min)
7	3	50	60
8	3	75	30
13c	2	75	60
6	2	100	30
12c	2	75	60
10c	2	75	60
2	1	75	90
9	3	100	90
1	1	50	30
11c	2	75	60
3	1	100	60
5c	2	75	60
4	2	50	90

c: ponto central

A partir dos resultados do planejamento fatorial fracionário, as variáveis que influenciaram as respostas rendimento e teor de ácidos urônicos foram

selecionadas e empregadas para construir um planejamento composto central (CCD) para cada ácido extrator.

Os coeficientes de regressão linear, quadrática e de interação entre as variáveis foram determinados usando regressão linear múltipla (MLR). A significância de cada coeficiente de regressão e de efeito foi avaliada estatisticamente por computação do valor-*t* e erros associados. Os coeficientes de regressão foram utilizados para gerar as superfícies de resposta para o rendimento e teor de ácidos urônicos (Metodologia de superfície de resposta - RSM), sendo os modelos estatísticos validados usando a análise de variância (ANOVA) e os gráficos dos valores observados *versus* estimados e dos resíduos *versus* valores observados (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

A partir das superfícies de resposta obtidas, condições otimizadas de extração visando elevado rendimento e elevado teor de ácidos urônicos foram selecionadas para obtenção das pectinas em maior escala.

3.5 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

As análises colorimétricas foram efetuadas em triplicata e utilizou-se um espectrofotômetro SP-22 Biospectro® para leitura das absorbâncias.

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada de acordo com Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), tendo como solução padrão GalA nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e leitura em 525 nm.

O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando como padrão solução de Glc nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e leitura efetuada em comprimento de onda de 490 nm.

O teor de açúcares redutores foi estimado pelo método de Somogyi modificado (NELSON, 1944) utilizando como padrão solução de Glc nas concentrações de 10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com leitura em comprimento de onda de 535 nm.

Os teores de proteínas foram determinados pelo método de Bradford (1976) sendo a leitura efetuada em 650 nm. O padrão empregado foi soroalbumina bovina

(BSA-SIGMA) em concentrações de 1-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

O teor de fenólicos foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) e ácido gálico como padrão em concentrações de 1-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com leituras em 760 nm.

A dosagem de acetil foi efetuada de acordo com Hestrin (1949), utilizando como padrão soluções de eritritol tetraacetato nas concentrações de 0,05-5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e leitura em 540 nm.

3.6 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

3.6.1 Hidrólises ácidas totais

As hidrólises ácidas totais das frações obtidas foram realizadas com ácido trifluoracético (TFA) 2 mol.L^{-1} em tubo hermeticamente fechado, a 100°C, durante 5 horas. Após a hidrólise, o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989). O material hidrolisado foi lavado duas vezes com água destilada, e esta evaporada.

A hidrólise ácida total de CPHF foi efetuada de acordo com Saeman *et al.* (1954), em tubo hermeticamente fechado. Utilizou-se H_2SO_4 72% (m/m) em banho de gelo por uma hora, com agitações, seguido de diluição para 8%, a 100°C, durante 15 horas. Após a hidrólise, o ácido sulfúrico foi neutralizado com BaCO_3 e o sal resultante foi removido por centrifugação seguida de filtração.

3.6.2 Redução, acetilação e extração dos produtos acetilados

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise ácida total foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4) em meio aquoso a 25°C por 16h (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Os íons hidreto (H^-) fornecidos pelo agente redutor (NaBH_4)

promovem redução dos grupamentos carbonila dos monossacarídeos, formando alditóis.

Em seguida adicionou-se resina trocadora de cátions na forma ácida para decompor o excesso de agente redutor e remover os íons Na^+ .

A solução foi filtrada em algodão e o filtrado evaporado até a secura. Lavagens sucessivas com 3 mL de metanol (3 vezes) foram feitas para remover o ácido bórico remanescente por co-destilação, na forma de borato de trimetila.

Os alditóis secos resultantes foram acetilados com piridina (agente catalisador) - anidrido acético (agente acetilante) (1:1 v/v), em tubo de hidrólise hermeticamente fechado, por 16h a 25°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a).

Este processo foi interrompido por adição de gelo moído ao sistema, e os acetatos de alditóis foram extraídos com 1 mL de clorofórmio. A piridina residual foi complexada com solução aquosa de sulfato de cobre (CuSO_4) a 5% (m/v), sendo assim separada da fase clorofórmica e eliminada por sucessivas e intercaladas lavagens com água destilada e CuSO_4 .

A fase clorofórmica contendo os acetatos de alditóis foi coletada, e após secura, a amostra foi ressolubilizada em acetona para ser analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

As análises por GLC foram efetuadas em cromatógrafo gasoso Thermo Eletronic Corporation, modelo Trace GC Ultra, com detector de ionização de chama (FID) e equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno) modelo DB-225. As injeções foram realizadas em temperatura inicial de 40°C (mantida por 1 minuto), seguida de aquecimento a 40°C.min⁻¹ até 215°C (mantida até o final da análise) e hélio foi utilizado como gás de arraste em fluxo de 1,0 mL.min⁻¹.

3.7 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DAS PECTINAS

O grau de esterificação das pectinas foi determinado através de espectroscopia de infravermelho (FT-IR - Infravermelho com Transformada de Fourier), em espectrofotômetro BOMEM MB-100 (Hartman & Braun, Canadá), conforme descrito por Vriesmann (2008) e Vriesmann e Petkowicz (2009).

Os espectros foram coletados no modo de absorbância na frequência de 4000-400 cm^{-1} , numa resolução de 4 cm^{-1} , 32 scans, empregando amostras sólidas pulverizadas. Utilizou-se brometo de potássio (KBr) de grau espectroscópico e preparou-se cada pastilha usando uma proporção de 90:10 (m/m) de KBr:amostra. Como branco empregou-se uma pastilha de KBr, para correção da absorção do CO_2 e mistura de ar antes das análises (KALAPATHY; PROCTOR, 2001; MONSOOR, 2005).

Para cada pectina, duas amostras independentes foram preparadas, seus espectros de FT-IR foram obtidos e as áreas dos picos correspondentes aos grupos carboxílicos esterificados (1749 cm^{-1}) e não-esterificados (1630 cm^{-1}) foram quantificadas utilizando o *software* do equipamento.

Calculou-se a razão da área da banda dos grupos carboxílicos metil-esterificados (1749 cm^{-1} - COO-R) em relação à área total dos grupos carboxílicos [soma das áreas de 1749 cm^{-1} (COO-R) e 1630 cm^{-1} (COO⁻)] das duplicatas e obteve-se uma média para cada pectina. Esta foi aplicada na equação da reta da curva de calibração para determinação do grau de esterificação previamente construída com padrões de pectinas com DE conhecido (VRIESMANN, 2008; VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009).

Previamente às análises por FT-IR, o KBr foi desidratado a 120°C durante 24 horas, e as amostras de pectinas com grau de esterificação desconhecido foram dessecadas em pistola a vácuo contendo P_2O_5 . Para a pesagem das pectinas e do KBr utilizou-se uma balança OHAUS Analytical Plus, com precisão de 0,00001g.

3.8 DETERMINAÇÃO DE HOMOGENEIDADE

As amostras de pectina foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol.L^{-1} contendo azida de sódio (NaN_3) 200 ppm, em concentração de 1-2 g.mL^{-1} , e filtradas em membrana de acetato de celulose (Millipore) com porosidade de 0,22 μm .

As amostras previamente filtradas foram injetadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) Waters, equipado com detector de

índice de refração diferencial (RI) Waters modelo 2410, com detector ultravioleta (UV) Pharmacia LKB Uvicord VW 2251 a 280 nm e com detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) Wyatt Technology modelo Dawn DSP, com 18 canais acoplados em série. Utilizou-se quatro colunas de gel permeação Ultrahidrogel 2000, 500, 250 e 120 em série (Waters), com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, respectivamente. As análises foram efetuadas a 25°C utilizando como fase móvel solução de NaNO₂ 0,1 mol.L⁻¹ contendo 200 ppm de NaN₃, a um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, monitorado através de bomba peristáltica Waters 515.

3.9 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As frações de pectinas foram solubilizadas em D₂O e as análises efetuadas em tubos de 5 ou 10 mm de diâmetro. As determinações de RMN foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE DRX-400 acoplado a um transformador Fourier, com ressonância de ¹H e ¹³C, de 400 e 100 MHz respectivamente, utilizando a temperatura de 70°C. Os deslocamentos (δ) foram expressos em ppm, utilizando a ressonância dos grupos CH₃ da acetona como padrão interno (¹³C, δ 30,2).

3.10 CARBOXI-REDUÇÃO DA FRAÇÃO OP (PECTINA OTIMIZADA)

Os grupos carboxílicos das unidades de ácidos urônicos da fração OP (pectina otimizada) foram reduzidos às suas correspondentes unidades glicosídicas de 6,6-dideutério por uma variação (ANDERSON; STONE, 1985) do método de Taylor e Conrad (1972).

A amostra OP foi solubilizada em tampão ácido 2-(*N*-morfolina)-etanossulfônico (MES) 0,2 mol.L⁻¹, pH 4,75. Adicionou-se, gradualmente e sob agitação, quantidade adequada de 1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida

meta-*p*-toluenossulfonato (CMC) de acordo com o teor de ácidos urônicos da amostra. A mistura permaneceu por duas horas sob agitação para então adicionar-se tampão TRIS (ácido *N*-tris[hidroximetil]metil-2-aminioetanossulfônico) 2 mol.L⁻¹, pH 7,0 até estabilização da mistura em pH 7,0. Posteriormente, acrescentou-se NaBD₄ aos poucos, sob agitação, até concentração final de 2 mol.L⁻¹. A mistura permaneceu sob agitação por 16h e a redução foi interrompida pela adição de ácido acético, em banho de gelo, até pH 5,0. O material foi submetido à diálise em membranas com limite de exclusão de 8000 Da (Spectrapor®) durante 48 h, e então foi congelado e liofilizado. Por fim, o material seco foi lavado três vezes com metanol e seco, e o teor de ácidos urônicos foi determinado. O processo da carboxi-redução foi repetido mais duas vezes e as quantidades dos reagentes foram adicionadas proporcionalmente aos teores de ácidos urônicos ainda presentes. A fração carboxi-reduzida assim obtida foi denominada R-OP, e sua composição monossacarídica foi determinada conforme o item 3.6, com a diferença de que a análise foi realizada por cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-MS), de modo a identificar as unidades de ácidos urônicos da fração pelo tempo de retenção e perfil de fragmentação.

As análises por GLC-MS foram realizadas em Cromatógrafo Gasoso Varian 3800 ligado a um espectrômetro de massa Varian 2000 R-12, utilizando hélio como gás de arraste (fluxo de 1.0 mL.min⁻¹) e coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), mantida a 50°C durante a injeção, e então programada para aumentar 40°C.min⁻¹ até atingir 220°C (temperatura constante até o final da análise).

3.11 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES REOLÓGICAS

As soluções de pectina (amostras OP, NA-HYP, CA-HYP, BW e 50W) foram preparadas a 5% (m/m) em água deionizada (MIN *et al.*, 2011). Adicionalmente, amostras foram preparadas em condições necessárias para a obtenção de géis de pectina (alto teor de sacarose e pH ácido). Como a formação de gel de pectinas ocorre entre as regiões de homogalacturonanas das pectinas, a concentração das amostras de pectinas preparadas para formação de gel foi normalizada em % GaIA das mesmas.

Para a amostra OP, as condições empregadas foram:

- ✓ variando o pH (2,5-3,3) em concentrações fixas de 1,32% GalA (m/m) e 60% (m/m) de sacarose;
- ✓ variando a concentração da amostra (0,33-1,98% GalA, m/m) com concentração fixa de sacarose (60%, m/m) em pH 2,7.

Para as amostras NA-HYP, CA-HYP, BW e 50W, variou-se o pH (2,5-3,0) em concentrações fixas de 0,99% GalA (m/m) e 60% (m/m) de sacarose.

Cada amostra foi solubilizada em solução de ácido cítrico no pH adequado por 16h à 25°C. A seguir, foi aquecida em banho-maria sob agitação e acrescentou-se a sacarose a 60°C, continuando sob agitação e aquecimento até o banho-maria atingir a ebulição, permanecendo nesta condição por 15 minutos. Posteriormente, foi mantida em repouso até atingir 25°C e foi armazenada sob refrigeração por 16h, para então ser empregada nas análises reológicas.

3.12 ANÁLISES REOLÓGICAS

Parte das medidas reológicas foi realizada em reômetro Haake RheoStress1 acoplado a um banho termocirculante Haake (DC30) com dispositivo de termostatização Universal Thermo Controller (UTC). As demais análises reológicas foram efetuadas em reômetro Haake Mars, acoplado a um banho termoestatizado Haake K15 e a um termocirculador de água DC5. A temperatura das análises foi mantida por controlador térmico TC 81 (Peltier) e Thermo Haake UTM. Foram utilizados os sensores cone-placa (C60 2Ti) e placa-placa (PP 35 Ti L).

Previamente às análises reológicas, foi determinada a inércia para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos. Durante as análises, a temperatura ambiente manteve-se em $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

As soluções poliméricas e géis foram preparados nas condições descritas no item 3.11 e as análises foram realizadas a 25°C. Inicialmente realizou-se uma varredura de tensão na frequência de 1 Hz para verificação da faixa viscoelástica

linear e seleção da tensão ou deformação que seriam empregadas nas análises de varredura de frequência, de modo a preservar a estrutura do gel em análise.

As varreduras de frequência foram conduzidas na tensão ou deformação pré-selecionada, aumentando a frequência oscilatória com o tempo, na faixa de 0,01-10 Hz. As curvas de viscosidade foram realizadas a 25°C na faixa de 0,001-300 s⁻¹ durante 360s.

3.13 OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE PECTINA E FÁRMACO

Micropartículas de pectinas contendo ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) foram preparadas com razões polímero:fármaco 4:1; 3:1; 2:1 e 1:1 (m/m). A amostra OP foi previamente dissolvida em água destilada e adicionou-se a solução do fármaco recém-preparado em HCl 0,1 mol.L⁻¹ em quantidade adequada para cada proporção de polímero:fármaco. A mistura foi submetida ao processo de *spray dryer* usando um Mini Spray Dryer BUCHI B-290 com temperatura de entrada de 170°C e temperatura de saída de 97°C, fluxo de ar de 473 NL.h⁻¹ e pressão de filtro de -40 mBar. A taxa de aspiração foi de 90% a um fluxo de 4 mL.min⁻¹.

As micropartículas formadas foram coletadas e pesadas para cálculo do rendimento. Após dissolução total de quantidades precisamente pesadas das micropartículas em HCl 0,1 mol.L⁻¹, o teor de fármaco foi determinado por meio de leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC em comprimento de onda de 302 nm, empregando-se uma curva padrão previamente construída com soluções padrão do fármaco em HCl 0,1 mol.L⁻¹, em concentrações de 5-100 µg.mL⁻¹ (linearidade de 1-100 µg.mL⁻¹). O comprimento de onda utilizado foi obtido após varredura da solução padrão de 5-ASA em HCl 0,1 mol.L⁻¹ (CHUONG; CHRISTENSEN; AYRES, 2008).

3.14 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A análise morfológica-estrutural das micropartículas foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. As amostras foram coladas por fita condutora de cobre sobre suportes próprios para análise por microscopia eletrônica e levadas para recobrimento com ouro no metalizador - SDC 030 - Balzers Union FL 9496. Para a observação das amostras foi usado um microscópio Hitachi SEM S-2500. As imagens foram capturadas em magnificações de 70x, 200x, 4000x e 13000x.

3.15 TESTES DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACO DAS MICROPARTÍCULAS

Os testes de liberação de fármaco das micropartículas foram realizados *in vitro* a 37°C com auxílio de um aparelho Dissolutor Nova Ética Mod 299 com agitação a 50 rpm. As micropartículas foram colocadas em membranas de diálise (limite de exclusão 12000 Da) e imersas subsequentemente em soluções de HCl 0,1 mol.L⁻¹ (2h) e tampão fosfato pH 6,0 (1h) e pH 7,2 (1,5h), seguindo o protocolo da Farmacopéia Americana (2008) para dissolução de comprimidos de liberação prolongada de 5-ASA. Os testes foram efetuados em triplicata e alíquotas das soluções foram coletadas a intervalos de tempo apropriados (HCl 0,1 mol.L⁻¹: 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min; tampão fosfato pH 6,0: 5, 15, 30, 45 e 60 min; tampão fosfato pH 7,2: 5, 10, 20, 30, 45, 60 e 90 min). A quantidade de fármaco liberado foi determinada espectrofotometricamente, empregando-se curvas padrão (HCl 0,1 mol.L⁻¹, leitura a 302 nm; tampão fosfato pH 6,0, leitura a 330 nm e tampão fosfato pH 7,2, leitura a 331 nm, valores obtidos após varredura das soluções-padrão de 5-ASA nesses meios) (CHUONG; CHRISTENSEN; AYRES, 2008).

3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação de dados de composição das amostras foi efetuada através da análise de variância - ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando Prisma versão 5.0. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS PRELIMINARES

Uma primeira remessa de cascas dos frutos de cacau quebradas (obtidas após a retirada das sementes e polpa para processamento) e frutos inteiros de cacau chegou a Curitiba em setembro 2008. Foram recebidos 13 frutos inteiros, com peso médio de 477 ± 35 g (média $\pm$ EPM), em concordância com dados da literatura (~ 500 g) (LACHENAUD *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2004). O peso médio das sementes e polpas ficou em 122 ± 8 g. Portanto, o peso médio das cascas de cacau foi de 355 ± 30 g, ou seja, cada fruto de cacau teve aproximadamente 74% de casca fresca (m/m), valor semelhante ao encontrado na literatura (75-76%) (DONKOH *et al.*, 1991; WHISTLER, MASAK JR, PLUNKETT, 1956). A umidade da casca dos frutos foi de aproximadamente 90% (m/m).

Com a finalidade de avaliar a influência de diferentes processamentos sobre o processo de extração de pectinas, foram realizados ensaios preliminares com as cascas do cacau, incluindo secagem por meio de dois processos distintos (liofilização e secagem em estufa a 45°C), inativação enzimática das cascas frescas com etanol ou metanol:água (4:1) em ebulição sob refluxo por 20 minutos, ou ainda com água fervente em micro-ondas em alta potência durante 2, 5 e 10 minutos.

Neste trabalho, além do emprego de metanol:água, convencionalmente utilizado para inativação enzimática de materiais vegetais no laboratório de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica da UFPR (LEITNER, 1991), utilizou-se também etanol por ser um composto menos tóxico que o metanol, além de apresentar menor custo e comprovada atividade de inativação de poligalacturonases e outras hidrolases (KOCH; NEVINS, 1989; ROSE *et al.*, 1998; SÁENZ *et al.*, 2000).

Realizou-se uma extração aquosa a 25°C por 1h do material obtido em cada uma das condições citadas anteriormente e também das cascas frescas. No total, foram isoladas 19 frações polissacarídicas. Após a obtenção e secagem das mesmas, calculou-se o rendimento, que variou de 0,01 a 1,1 g/100g de cascas

frescas, sendo que a fração de maior rendimento foi obtida por extração diretamente das cascas frescas submetidas a micro-ondas por 10 minutos.

A análise de composição monossacarídica revelou a presença de pectinas em todas as frações, com teores de ácidos urônicos entre 31,0 e 58,7%. Entre os açúcares neutros que compõem as pectinas, verificou-se que a Gal foi o monossacarídeo predominante, com menores quantidades de Rha e Ara, semelhantemente à pectina hidrossolúvel obtida da polpa do cupuaçu, também do gênero *Theobroma* (VRIESMANN, 2008; VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009).

Análises de homogeneidade por HPSEC-MALLS/RI mostraram um perfil não homogêneo para todas as frações das cascas do cacau obtidas nos ensaios preliminares. Pela semelhança entre os perfis de eluição das frações obtidas da casca dos frutos do cacau submetidas ou não à inativação enzimática, possivelmente não houve hidrólise enzimática de polissacarídeos, mostrando que não há necessidade deste procedimento prévio.

Os resultados dos ensaios preliminares mostraram que quando se usou diretamente as cascas frescas, os melhores rendimentos foram obtidos por extrações diretas, especialmente após tratamento por micro-ondas ($>0,8\text{g}/100\text{g}$ de cascas frescas), e as frações apresentaram entre 42,2 e 58,7% de ácidos urônicos. Semelhantemente, um considerável aumento no rendimento e qualidade de pectinas de resíduos de cítricos e de maçã foi obtido após pré-tratamento por aquecimento em micro-ondas dos respectivos materiais de frutos frescos (FISHMAN *et al.*, 2000; 2003; KONG; LIU; CHEN, 2000; KRATCHANOVA *et al.*, 1994; KRATCHANOVA; PAVLOVAA; PANCHEV, 2004; WANG *et al.*, 2007).

Os efeitos favoráveis do aquecimento em micro-ondas sobre o rendimento e a qualidade das pectinas são assumidos primeiramente devido à parcial desintegração dos tecidos vegetais e à hidrólise da protopectina, e depois devido à rápida inativação das enzimas pectinolíticas do material de partida (KRATCHANOVA *et al.*, 1994).

As frações obtidas dos resíduos das cascas submetidas à inativação enzimática com etanol ou metanol apresentaram rendimentos em torno de 0,3-0,4g/100g (peso fresco). Os maiores teores de ácidos urônicos foram encontrados nas frações obtidas a partir dos resíduos lavados com etanol (52-57%) em relação às frações obtidas dos resíduos lavados com acetona (45-50%).

Apesar dos resultados indicarem que os melhores rendimentos foram obtidos a partir das extrações diretas, principalmente após tratamento por micro-ondas, devido a dificuldades relacionadas à obtenção do material optou-se pela secagem prévia do material. Para se armazenar uma maior quantidade de cascas dos frutos de cacau de diferentes remessas de uma forma mais homogênea seria melhor desidratá-las, moê-las e reuni-las em um único lote.

Os resultados dos ensaios preliminares mostraram que entre os dois processos empregados para secagem das cascas, o melhor tanto em termos de rendimento quanto de teor de pectinas, considerando o percentual de ácidos urônicos, foi a liofilização (0,5g/100g de cascas frescas; 51,3% de ácidos urônicos). Este, a princípio, foi o método escolhido, pois permitiria o armazenamento de material de diferentes remessas, que após moagem poderiam ser misturados e moídos para a obtenção de um único lote de cascas de cacau. Entretanto, devido a problemas operacionais, as cascas de cacau utilizadas neste trabalho foram previamente desidratadas na CEPLAC, por meio de estufa com circulação de ar, e estas foram moídas, gerando a farinha da casca dos frutos do cacau (CPHF).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

4.2.1. Caracterização química e mineral

A composição química e mineral da farinha da casca dos frutos do cacau (CPHF), bem como os teores de fibras alimentares estão mostrados na Tabela 3. Esta parte do trabalho contou com colaborações da Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, da Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MINERAL DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) (*Theobroma cacao* L.)

Componentes	Teor ^a (g/100 g)
Umidade residual ^b	8,5 ± 0,03
Cinzas ^b	6,7 ± 0,01
Proteínas ^b	8,6 ± 0,05
Lipídios ^b	1,5 ± 0,08
Carboidratos totais ^c	32,3 ± 1,04
Carboidratos de baixa massa molecular ^d	19,2 ± 0,14
Açúcares redutores ^e	10,4 ± 0,50
Fenólicos solúveis ^f (g ácido gálico/100 g CPHF)	4,6 ± 0,02
Lignina ^g	21,4 ± 0,35
Fibra alimentar insolúvel ^b	27,0 ± 0,01
Fibra alimentar solúvel ^b	9,6 ± 0,01
Fibra alimentar total ^b	36,6 ± 0,01
Minerais^b	(mg/100 g)
Ca	254,0 ± 6,53
Fe	5,8 ± 0,06
K	2768,0 ± 30,00
Mg	110,9 ± 0,01
Na	10,5 ± 0,35
Minerais^b	(mg/Kg)
Cu	6,18 ± 0,01
Mn	35,72 ± 0,02
Se	0,01 ± 0,003
Zn	39,74 ± 0,03

^aExpresso em base seca, exceto para a umidade residual. Os resultados são a média de triplicatas ± EPM, exceto para os teores de fibras alimentares, açúcares redutores e carboidratos de baixa massa molecular (n=2).

^b: determinados por metodologia descrita pela AOAC, 2005.

^c: determinado por método colorimétrico, Dubois *et al.*, 1956.

^d: determinado por método colorimétrico, Dubois *et al.*, 1956, após extração hidroetanólica.

^e: determinado por método colorimétrico, Nelson, 1944, após extração hidroetanólica.

^f: determinado por método colorimétrico usando o reagente Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ROSSI, 1965); resultados expressos como % ácido gálico.

^g: determinado gravimetricamente, após hidrólise ácida de duas etapas (ADAMS, 1965).

CPHF apresentou baixo teor de lipídios (1,5%) e elevados teores de cinzas (6,7%) e proteínas (8,6%), como descrito em estudos anteriores (AREGHEORE, 2002; DONKOH *et al.*, 1991). Estes resultados se assemelham aos de outros subprodutos das indústrias agrícola e alimentícia, como casca de cítricos (MARÍN *et al.*, 2007), polpa de beterraba, casca de ervilha e resíduos de semente de azevém

(SERENA; KNUDSEN, 2007), concentrados de fibras da extração de sucos de laranja, limão e pomelo (FIGUEROLA *et al.*, 2005), e cascas de cenoura (CHANTARO; DEVAHASTIN; CHIEWCHAN, 2008).

O teor de fibra alimentar total de CPHF foi 36,6%, em concordância com dados publicados para casca dos frutos do cacau (DONKOH *et al.*, 1991; AREGHEORE, 2002), sendo principalmente constituído de fibras insolúveis (27%). Quantidades semelhantes de fibra total e insolúvel foram encontradas em concentrados de fibras alimentares do bagaço de laranja (GRIGELMO-MIGUEL; MARTÍN-BELLOSO, 1999).

Compostos fenólicos também foram encontrados em CPHF. Normalmente estes compostos se acumulam em folhas e partes externas de vegetais, tais como epicarpos e cascas (BRAVO, 1998; LECUMBERRI *et al.*, 2007).

Lecumberri *et al.* (2007) observaram que os dados sobre teores de compostos fenólicos em produtos obtidos das sementes do cacau são muito variados apresentando valores de 0,33 a 6,5% de compostos fenólicos totais no pó de cacau e de 0,17 a 3,65% de compostos fenólicos totais em chocolates escuros, compreendendo principalmente os flavan-3-óis (epicatequina, catequina e procianidinas), e pequenas quantidades de antocianinas (principalmente glicosídeos de cianidina) e flavonóis (glicosídeos de quercetina) (ADAMSON *et al.*, 1999; HAMMERSTONE *et al.*, 1999). Entretanto, informações sobre os compostos fenólicos da casca do fruto do cacau são escassas.

Neste trabalho, encontrou-se em CPHF um teor de 4,6% de compostos fenólicos solúveis, valor superior ao de um produto obtido a partir da casca das sementes do cacau (1,32%) (LECUMBERRI *et al.*, 2007). Os compostos fenólicos do cacau vêm sendo sugeridos como auxiliares da saúde cardiovascular através da redução da agregação plaquetária (CASTELL; PÉREZ-CANO; BISSON, 2013; REIN *et al.*, 2000), da inibição da lipoperoxidação (WAN *et al.*, 2001; WISWEDEL *et al.*, 2004) e da atividade das enzimas ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase (CASTELL; PÉREZ-CANO; BISSON, 2013; SCHEWE; KÜHN; SIES, 2002), e do aumento dos níveis de óxido nítrico (KARIM; MCCORMICK; KAPPAGODA, 2000). Além disso, os compostos fenólicos do cacau mostraram atividade antimutagênica (YAMAGISHI *et al.*, 2000), e pareceram reduzir danos ao DNA, com possível papel na prevenção de câncer (OROZCO; WANG; KEEN, 2003).

CPHF também apresentou variedade em minerais (Tabela 3). Os componentes qualitativos foram os mesmos descritos em estudos prévios (AREGHEORE, 2002; DONKOH *et al.*, 1991). Observou-se um predomínio de K, seguido por Ca e Mg, com proporções intermediárias de Na, Fe, Mn e Zn e quantidades menores de Cu e Se. Notou-se a presença de variações nos teores de alguns minerais em relação aos outros estudos citados, que pode ser explicada pelas diferentes origens geográficas das amostras e técnicas distintas de determinação de minerais.

Os carboidratos somaram 32,3% de CPHF. Como mostrado na Tabela 4, a composição monossacarídica de CPHF foi Glc > ácidos urônicos > Xyl > Ara > Gal > Rha > Man > Fuc, sugerindo o predomínio de celulose. As elevadas quantidades de Xyl e Ara sugerem a presença de xilanas da parede celular secundária lignificada. O teor de lignina foi de aproximadamente 21%. De acordo com a composição monossacarídica, outras hemiceluloses, tais como xiloglucanas, mananas, galactomananas ou (galacto)glucomananas poderiam também ser encontradas em CPHF. Estes resultados estão em concordância com os dados que mostram que as fibras alimentares de CPHF consistem principalmente de fibras insolúveis. A presença de ácidos urônicos e pequenas quantidades de Rha é consistente com a ocorrência de pectinas nas fibras alimentares solúveis.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) (*Theobroma cacao* L.)

Monossacarídeos ^a	%, m/m
Rha	1,9 ± 0,12
Fuc	0,2 ± 0,01
Ara	3,7 ± 0,31
Xyl	6,4 ± 0,46
Man	1,6 ± 0,06
Gal	3,2 ± 0,17
Glc	8,6 ± 0,25
Ácidos urônicos ^b	6,7 ± 0,28
Carboidratos totais ^c	32,3 ± 1,04

^aDeterminados por GLC, após hidrólise ácida total (SAEMAN *et al.*, 1954); média de triplicatas ± EPM.

^bDeterminados por dosagem colorimétrica, Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991, após hidrólise ácida total (SAEMAN *et al.*, 1954); média de triplicatas ± EPM.

^cDeterminado por método colorimétrico, Dubois *et al.*, 1956; média de triplicatas ± EPM.

Outros materiais estudados como fontes de pectinas apresentaram composições monossacarídicas distintas entre si. Por exemplo, a polpa da beterraba teve quantidades semelhantes de GalA, Glc e Ara (20,1%, 19,2% e 18,4%, respectivamente) (TURQUOIS *et al.*, 1999). Já as cascas de mangas maduras de duas variedades (“Améliorée” e “Mango”) mostraram um predomínio de Glc (26,2% e 20,4%, respectivamente), seguido por ácidos urônicos (9,2% e 10,4%, respectivamente), Gal (7,4 e 6,6%, respectivamente) e Ara (5,4 e 5,8%, respectivamente) (KOUBALA *et al.*, 2008a).

Koubala *et al.* (2008b) obtiveram pectinas da casca de cajá e verificaram que as cascas brutas, com 45,5% de carboidratos, também mostravam um predomínio de Glc (20,8%), seguida por ácidos urônicos (10,8%) e Ara (5,5%).

O material insolúvel em álcool das cascas do maracujá amarelo, usado para a extração de pectinas, teve a Glc como o monossacarídeo majoritário (37,9%), seguida por ácidos urônicos (14,1%) e Xyl (8,4%) (YAPO; KOFFI, 2008). O resíduo insolúvel em álcool da maçã apresentou 31,2% Glc, 26,8% GalA e 8% Ara (SCHOLS *et al.*, 1995), enquanto que aquele da casca de cítricos mostrou teores de 32,9% de GalA, 25,8% de Glc e 8,4% de Ara (YAPO *et al.*, 2007a).

Adicionalmente, pequenas quantidades de outros compostos poderiam estar presentes em CPHF, incluindo os alcalóides 3-metilxantina, cafeína, teobromina e 7-metilxantina (ZHENG *et al.*, 2004), mas estes componentes não foram analisados neste trabalho.

Portanto, os resultados de composição da casca dos frutos do cacau sugerem que este subproduto da indústria cacaueira é uma fonte promissora de compostos funcionais, tais como fenólicos e fibras alimentares, incluindo pectinas, que trazem benefícios à saúde quando consumidos ou que podem ser estudados para distintas aplicações biológicas, farmacêuticas e alimentares. Além disso, após a extração destes componentes, o material lignocelulósico remanescente poderia ser testado para a produção de produtos químicos e industriais (REDDY; YANG, 2005). Como exemplo, por conversão microbiana, a casca dos frutos do cacau poderia ser estudada para a produção de carboidratos fermentáveis e posteriormente bioetanol e outros produtos biotecnológicos.

4.2.2 Propriedades físico-químicas

O uso de subprodutos agroindustriais como possíveis fontes de fibras alimentares, como é o caso da casca dos frutos do cacau, é atrativo tanto do ponto de vista funcional quanto nutricional. Como as fibras alimentares geralmente são fermentáveis pela microbiota colônica e apresentam propriedades de aceleração do trânsito gastrointestinal, de aumento do bolo fecal, de redução dos níveis sanguíneos da glucose pós-prandial e do colesterol total e LDL (ALLER *et al.*, 2004; BROWNLEE, 2011; FRIEDMAN, 1998; KACZMARCZYK; MILLER; FREUND, 2012; KENDALL; ESFAHANI; JENKINS, 2010; THEUWISSEN; MENSINK, 2008), a ingestão de fibras alimentares leva a benefícios na saúde do homem. Entre eles destacam-se redução, melhora ou prevenção de distúrbios intestinais crônicos, obesidade, diabetes tipo II, câncer e doenças cardiovasculares (BROWNLEE, 2011; EDITORIAL, 2011; LECUMBERRI *et al.*, 2007; THIBAUT; RALET, 2001).

As fibras alimentares são constituídas por polissacarídeos da parede celular vegetal, lignina e demais substâncias resistentes às enzimas digestivas humanas (DE VRIES, 2003), e apresentam propriedades físico-químicas que dependem em grande parte da composição em fibras solúveis e insolúveis (THIBAUT; RALET, 2001). Ao considerar CPHF como fonte de fibras alimentares é importante conhecer estas propriedades físico-químicas. Por isso, foram analisadas algumas de suas propriedades funcionais.

A capacidade de inchamento (SC) é o volume ocupado por um peso conhecido de fibras sob as condições empregadas. A capacidade de retenção de água (WRC) é a quantidade de água retida por um peso conhecido de fibras após a aplicação de uma força externa, como centrifugação ou pressão (RAGHAVENDRA *et al.*, 2006; THIBAUT; RALET, 2001). As características estruturais e a composição química das fibras definem sua afinidade com a água, que pode ficar ligada nas fibras como resultado da força de tensão superficial ou interagir com os componentes da fibra (LÓPEZ *et al.*, 1996).

CPHF apresentou uma SC de $31 \pm 0,6$ mL/g CPHF seco e uma WRC de $11,8 \pm 0,2$ g água retida/g CPHF seco. Esses valores foram superiores aos de um produto rico em fibras insolúveis obtido das cascas das sementes de cacau (6,51 mL/g e 4,76 g/g, respectivamente) (LECUMBERRI *et al.*, 2007), e de subprodutos da

produção de vinhos (SC 6,8-12,9 mL/g e WRC 3,9-10,7 g/g) (GONZÁLEZ-CENTENO *et al.*, 2010), além de fibras de aveia, trigo e bambu (SC 5,0-7,6 mL/g; WRC 3,1-4,8 g/g) (ROSELL; SANTOS; COLLAR, 2009).

Essas diferenças podem ser explicadas pela quantidade e proporções de fibras solúveis e insolúveis presentes em cada material. A celulose apresenta baixa SC (6,2 mL/g) e WRC (4 g/g) em razão de sua insolubilidade. Pectinas e hemiceluloses mostram melhores propriedades de hidratação (LECUMBERRI *et al.*, 2007; ROSELL; SANTOS; COLLAR, 2009).

As fibras alimentares podem ainda reter óleo, propriedade esta explorada em certos alimentos. A capacidade de retenção de óleo (FAC) pode ser definida como a quantidade de óleo retida por um peso conhecido de fibras sob as condições empregadas e depende das propriedades de superfície, densidade total de cargas, espessura e natureza hidrofóbica das partículas fibrosas (FEMENIA *et al.*, 1997; LÓPEZ *et al.*, 1996; THIBAUT; RALET, 2001). CPHF foi capaz de reter $2,1 \pm 0,02$ g de óleo de soja por g de CPHF seco. Para materiais insolúveis em álcool obtidos da casca de maracujá amarelo e de subprodutos da produção de vinhos foram observados valores de FAC superiores a 4g de óleo/g fibra (GONZÁLEZ-CENTENO *et al.*, 2010; YAPO; KOFFI, 2008).

Tanto as fibras solúveis quanto as fibras insolúveis podem adsorver e reter água e outras substâncias, como minerais, lipídios, ácidos biliares e glucose, com a diferença de que as fibras solúveis incham e formam soluções viscosas, o que não é observado para as fibras insolúveis. Desta forma, diferentes aplicações tecnológicas são encontradas: enquanto as fibras solúveis, tais como pectinas, alginatos e gomas, são empregadas como agentes estabilizantes de espumas e emulsões, gelificantes, espessantes, formadores de filme e substitutos de gordura, as fibras insolúveis são utilizadas como texturizadores e estabilizantes em sistemas alimentícios. Pelas suas propriedades de hidratação, as fibras também auxiliam a retardar o endurecimento de alimentos e a controlar a umidade e a formação de cristais de gelo nos mesmos, reduzindo a sinérese e auxiliando na sua estabilidade (GELROTH; RANHOTRA, 2001; LECUMBERRI *et al.*, 2007).

4.3 EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU

Considerando-se a reduzida disponibilidade de informação a respeito da obtenção de pectinas da casca dos frutos do cacau, neste trabalho utilizou-se planejamento experimental para sua extração. Foram investigados os principais efeitos de variáveis experimentais e as interações entre seus efeitos sobre o rendimento e o teor de ácidos urônicos das pectinas extraídas com dois ácidos distintos: o ácido nítrico e ácido cítrico. Adicionalmente, foram feitas extrações aquosas a quente.

4.3.1 Planejamento experimental

Neste trabalho, um planejamento fatorial fracionário 3^{3-1} foi desenvolvido para investigar a influência das variáveis: pH da solução ácida, temperatura de extração e duração da extração sobre o rendimento das extrações e teor de ácidos urônicos das pectinas obtidas com o uso do ácido nítrico e do ácido cítrico. Na sequência, desenvolveu-se um planejamento composto central com duas variáveis influentes sobre as respostas. Com os resultados, construiu-se o modelo empírico e a superfície de resposta para otimização dos resultados. Esta parte do trabalho foi efetuada em parceria com o Dr. Reinaldo Francisco Teófilo, da Universidade Federal de Viçosa, MG.

4.3.1.1 Extrações com ácido nítrico

O ácido nítrico é um ácido mineral amplamente utilizado para a extração de pectinas comerciais. Assim, soluções de ácido nítrico foram empregadas nas extrações de pectinas de CPHF seguindo planejamentos experimentais.

O planejamento fatorial fracionário 3^{3-1} para o ácido nítrico, as variáveis, os níveis codificados e decodificados e as respostas são mostrados na Tabela 5.

TABELA 5 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3^{3-1} PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E VALORES EXPERIMENTAIS PARA AS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	tempo (min)	Rendimento (% de CPHF)	Ácidos urônicos (%)
7	3 (+1)	50 (-1)	60 (0)	4,9	56,2
2	1 (-1)	75 (0)	90 (+1)	5,2	75,1
13c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,6	54,0
9	3 (+1)	100 (+1)	90 (+1)	11,2	56,9
5c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,7	55,8
3	1 (-1)	100 (+1)	60 (0)	6,4	82,5
4	2 (0)	50 (-1)	90 (+1)	5,4	50,6
11c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,9	55,4
10c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,9	56,7
1	1 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	3,3	65,0
12c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,3	52,3
8	3 (+1)	75 (0)	30 (-1)	7,1	50,9
6	2 (0)	100 (+1)	30 (-1)	9,0	59,8

Os números entre parênteses são os níveis codificados das variáveis.
c: experimentos do ponto central.

O rendimento das pectinas variou de 3,3 a 11,2% em relação à CPHF. O maior rendimento foi obtido quando as condições de extração empregaram pH 3 por 90 min a 100°C. O teor de ácidos urônicos nas pectinas obtidas ficou compreendido entre 50,6% e 82,5%. A maior quantidade de ácidos urônicos foi obtida na extração em pH 1 durante 60 min a 100°C.

A Tabela 6 mostra que os efeitos lineares e quadráticos do pH e o efeito linear da temperatura tiveram maior influência no rendimento e teor de ácidos urônicos das pectinas. Desta maneira, o rendimento das extrações aumentou significativamente com maior pH e maior temperatura ($p < 0,05$). Em contrapartida, a duração das extrações, dentro dos níveis estudados, não influenciou o rendimento das pectinas.

TABELA 6 - EFEITOS ESTIMADOS PARA O PLANEJAMENTO 3^{3-1} SOBRE O RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

	Rendimento				Ácidos urônicos			
	Efeito ^a	Erro padrão	df(6)	p	Efeito ^a	Erro padrão	df(6)	p
Média	6,63	0,16	41,57	0,00000	61,06	0,93	65,99	0,00000
pH	2,77	0,41	6,69	0,00054	-19,53	2,40	-8,14	0,00019
pH ²	0,83	0,32	2,63	0,03907	-10,13	1,84	-5,51	0,00151
Temp.	4,33	0,41	10,48	0,00004	9,13	2,40	3,81	0,00891
Temp. ²	-0,22	0,32	-0,68	0,52072	-2,33	1,84	-1,27	0,25191
tempo	0,80	0,41	1,93	0,10121	2,30	2,40	0,96	0,37489
tempo ²	-0,72	0,32	-2,26	0,06464	4,02	1,84	2,18	0,07172

df: grau de liberdade; Temp.: Temperatura.

^aValores em negrito e *italico* são significativos a $p < 0,05$ e seis graus de liberdade para o rendimento e teor de ácidos urônicos utilizando o quadrado do erro residual médio.

Kalapathy e Proctor (2001) realizaram extrações ácidas de pectinas da casca da soja e verificaram que maiores temperaturas ou tempos de extração não afetaram o rendimento. Contudo, os autores observaram que ao aumentar o pH das extrações houve aumento no rendimento, e a redução do pH levou a menores rendimentos. Eles concluíram que extrações mais ácidas geraram moléculas de pectinas menores e altamente solúveis que poderiam não ter sido precipitadas efetivamente pela adição de álcool.

Levigne, Ralet e Thibault (2002) observaram que entre as variáveis temperatura de extração, pH, duração e tipo de ácido, o pH também foi o principal parâmetro que influenciou o rendimento de pectinas de beterrabas frescas. Entretanto, diferentemente do estudo de Kalapathy e Proctor (2001), o rendimento das pectinas da beterraba aumentou com o decréscimo do pH.

Pagán e Ibarz (1999) estudaram a extração de pectinas do bagaço fresco de pêssgo e obtiveram melhores rendimentos em maiores temperaturas de extração e menores pH. Adicionalmente, tempos maiores de extração aumentaram o rendimento das pectinas, mas este efeito foi limitado, pois acima de certo tempo de extração o rendimento diminuiu. Assim os autores propuseram um modelo de duas reações consecutivas, onde na primeira reação a solução ácida solubiliza pectinas

do material sólido e na segunda reação, a pectina solúvel é hidrolisada a produtos degradados menores. A primeira reação predomina até a exaustão da fonte de pectina e a segunda reação acontece durante tempos extensos de extração e por fim, reduz o rendimento das extrações (PAGÁN; IBARZ, 1999).

Yapo *et al.* (2007b) extraíram pectinas da polpa de beterraba e observaram que os efeitos individuais do pH e do tempo de extração apresentaram as maiores influências no rendimento das pectinas. Mais especificamente, o rendimento aumentou significativamente com o decréscimo do pH de extração ou com o aumento da duração da extração. A temperatura não influenciou o rendimento das pectinas. Além disso, o rendimento das pectinas não estava relacionado com o teor de GalA, que foi mais influenciado pelo pH das extrações. Eles sugeriram que o teor de GalA das pectinas aumentava com reduções do pH. Em contrapartida, o teor de GalA foi apenas moderadamente influenciado pelo tempo de extração, temperatura, e pela interação do tempo e temperatura. Levigne, Ralet e Thibault (2002) também verificaram que o teor de GalA não estava relacionado ao rendimento de pectinas extraídas de beterrabas frescas.

Os dados obtidos para as extrações de pectinas da casca dos frutos do cacau utilizando o ácido nítrico (Tabela 6) evidenciam que, assim como para o rendimento, os efeitos individuais do pH e da temperatura de extração influenciaram o teor de ácidos urônicos das pectinas. Entretanto, o teor de ácidos urônicos aumenta com reduções no pH e com aumentos na temperatura de extração. A duração da extração não influenciou o teor de ácidos urônicos das pectinas, como foi também evidenciado para o rendimento.

Os resultados demonstraram que o efeito do pH nas extrações é diferente para as respostas rendimento e teor de ácidos urônicos: maiores pHs melhoram o rendimento, mas causam diminuição no teor de ácidos urônicos, e vice-versa. Como o tempo de extração foi uma variável que não influenciou ambas as respostas, o tempo foi fixado em 30 min para os próximos experimentos para minimizar custos.

A partir dos resultados do primeiro planejamento, foi aplicada a metodologia de análise de superfície de resposta (RSM) empregando um planejamento composto central (CCD) com duas variáveis independentes (pH e temperatura) para analisar o efeito de suas combinações na extração de pectinas de CPHF. Os dados do CCD estão mostrados na Tabela 7.

TABELA 7 - PONTOS EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (CCD) PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E VALORES EXPERIMENTAIS PARA AS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Ensaio ^a	pH	Temperatura (°C)	Rendimento (% de CPHF)	Ácidos urônicos (%)
1	2 (-1)	75 (-1)	6,8	45,7
3	2 (-1)	95 (+1)	8,8	70,8
8	2,5 (0)	99,14 (+ α)	8,5	49,5
10c	2,5 (0)	85 (0)	7,8	49,4
7	2,5 (0)	70,86 (- α)	6,8	54,8
13c	2,5 (0)	85 (0)	7,6	48,4
12c	2,5 (0)	85 (0)	7,4	48,1
6	3,207 (+ α)	85 (0)	7,1	57,3
5	1,793 (- α)	85 (0)	7,3	52,6
4	3 (+1)	95 (+1)	9,2	52,5
11c	2,5 (0)	85 (0)	7,4	57,1
2	3 (+1)	75 (-1)	6,8	52,5
9c	2,5 (0)	85 (0)	7,1	50,1

Os números entre parênteses são os níveis codificados das variáveis.

^aTempo de extração mantido fixo em 30 min.

c: experimentos do ponto central.

$\pm\alpha$: experimentos dos pontos axiais situados no centro dos eixos, com distâncias de $\pm 1,414$ a partir da origem.

Na Tabela 7 observa-se rendimentos variando de 6,8 a 9,2% em relação a CPHF. Estes rendimentos foram superiores àqueles obtidos por Barazarte, Sangronis e Unai (2008) também para pectinas de casca dos frutos do cacau (<5%). Em comparação a outras fontes não-comerciais de pectinas, os rendimentos foram semelhantes aos de resíduos de girassol (IGLESIAS; LOZANO, 2004; SAHARI; AKBARIAN; HAMED, 2003), de cascas de sementes de cacau (ARLORIO *et al.*, 2001; MOLLEA; CHIAMPO; CONTI, 2008) e da polpa de beterraba (YAPO *et al.*, 2007b), mas inferiores àqueles das cascas de manga (KIOUBALA *et al.*, 2008a), cascas de cajá (KIOUBALA *et al.*, 2008b), cascas de maracujá (YAPO; KOFFI, 2006), polpa de beterraba (LEVIGNE; RALET; THIBAUT, 2002) e cascas de soja (KALAPATHY; PROCTOR, 2001; MONSOOR, 2005).

Adicionalmente, os valores de rendimento mostrados na Tabela 7 estão em concordância com aqueles de Adomako (1972), que obteve 8-11% de rendimento (em base seca) para pectinas extraídas de cascas de frutos de cacau maduros com ácido clorídrico ou acético. Ele observou que o rendimento aumentou para 25-29% quando usou cascas de frutos imaturos do cacau. Segundo o autor, durante a maturação dos frutos do cacau, as substâncias pécicas são convertidas de sua forma insolúvel e mais complexa (protopectina) para formas solúveis mais simples pela ação de enzimas pectinolíticas.

A Tabela 8 mostra os coeficientes de regressão em função das respostas e seus parâmetros estatísticos. O rendimento foi influenciado pelo efeito linear da temperatura ($p < 0,05$), mas o pH e a interação entre o pH e a temperatura não foram significativos para o rendimento ($p > 0,05$). O coeficiente de regressão linear para a temperatura foi positivo, indicando maior rendimento de pectinas em maiores temperaturas, ou seja, maiores temperaturas aumentam o rendimento, independentemente do pH.

TABELA 8 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO ESTIMADOS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (CCD) SOBRE O RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E PARÂMETROS ESTATÍSTICOS PARA AS RESPOSTAS

	Rendimento				Ácidos urônicos			
	Coef. ^a	Erro padrão	df(7)	<i>p</i>	Coef. ^a	Erro padrão	df(4)	<i>p</i>
Média	7,46	0,19	39,02	0,00000	50,62	1,66	30,52	0,00001
<i>pH</i>	0,01	0,15	0,10	0,92549	-0,61	1,31	-0,46	0,66760
<i>pH</i> ²	-0,01	0,16	-0,07	0,94675	2,62	1,41	1,86	0,13576
<i>Temp.</i>	0,85	0,15	5,63	0,00079	2,20	1,31	1,68	0,16858
<i>Temp.</i> ²	0,21	0,16	1,32	0,22862	1,22	1,41	0,87	0,43416
<i>pH</i> × <i>Temp.</i>	0,10	0,21	0,47	0,65409	-6,28	1,85	-3,38	0,02769

df: Graus de liberdade; Coef.: coeficiente; *Temp.*: Temperatura.

^aValores em negrito e itálico são significativos a $p < 0,05$ com sete graus de liberdade para o rendimento das pectinas usando o quadrado do erro residual médio, e quatro graus de liberdade para o teor de ácidos urônicos usando o erro puro.

Barazarte, Sangronis e Unai (2008) empregaram um planejamento fatorial 3² para extrair pectinas da casca dos frutos do cacau com soluções de EDTA em

diferentes pHs (3, 4 e 5) e temperaturas (60°C, 75°C e 90°C), mantendo fixo o tempo de extração (60 min), somando 9 extrações,. Os rendimentos variaram entre 2,6% e 4,7%. A resposta dependeu principalmente dos efeitos individuais da temperatura e do pH. Os maiores rendimentos foram obtidos em 5. Quando o pH foi mantido constante, houve um aumento nos rendimentos das pectinas com o aumento da temperatura de extração. De acordo com os autores, os altos rendimentos de pectinas obtidas a 90°C podem ser atribuídos a uma maior hidrólise da protopectina gerada pelo aumento da temperatura. Os autores comentam ainda que, o elevado rendimento em pH 5 poderia ser devido a uma menor degradação das pectinas, pois baixos pHs podem causar certa despolimerização das pectinas (BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008).

Em relação ao teor de ácidos urônicos das pectinas extraídas de CPHF com ácido nítrico seguindo o planejamento composto central (CCD), foram encontrados valores entre 45,7% e 70,8% (Tabela 7), que estão de acordo com os valores obtidos para pectinas das cascas dos frutos do cacau extraídas com soluções de EDTA em pH 3 a 5 e temperatura de 60 a 90°C (BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008; 49,8% a 64.1%) e através de extração exaustiva com ácido acético em pH 2,8 (ADOMAKO, 1972; 62%).

Em relação a outras fontes não convencionais de pectinas, estes teores de ácidos urônicos foram semelhantes aos obtidos para pectinas da polpa de beterraba (YAPO *et al.*, 2007b), da casca de soja (KALAPATHY; PROCTOR, 2001; MONSOOR, 2005), da casca de cajá (KOUBALA *et al.*, 2008b), da casca de banana (HAPPI EMAGA *et al.*, 2008a,b) e da casca de manga (KOUBALA *et al.*, 2008b); e superiores àqueles das pectinas de cascas das sementes do cacau (ARLORIO *et al.*, 2001) e de polpa de beterraba (LEVIGNE; RALET; THIBAUT, 2002), mas um pouco inferiores aos de pectinas da casca do maracujá (YAPO; KOFFI, 2006) e de resíduos de girassol (IGLESIAS; LOZANO, 2004; SAHARI; AKBARIAN; HAMED, 2003).

Além dos dados para o rendimento, a Tabela 8 também apresenta os coeficientes de regressão estimados para o planejamento composto central (CCD) sobre o teor de ácidos urônicos das pectinas extraídas com ácido nítrico a partir da farinha da casca dos frutos do cacau (CPHF) baseado nos dados da Tabela 7, bem como os parâmetros da análise estatística sobre esta resposta. O rendimento das pectinas da casca dos frutos do cacau não se relacionou com o teor de ácidos

urônicos. Os efeitos individuais das variáveis pH e temperatura, nos níveis estudados, não influenciaram o teor de ácidos urônicos das pectinas ($p>0,05$), mas a interação entre as duas variáveis foi significativa ($p<0,05$) e negativa para extrair pectinas ricas em ácidos urônicos empregando ácido nítrico. Essa interação sugere uma melhor resposta ao se aumentar o pH dentro dos níveis negativos de temperatura (menores temperaturas) ou o inverso, ao se reduzir o pH dentro dos níveis positivos de temperatura (maiores temperaturas).

Barazarte, Sangronis e Unai (2008), em seu planejamento fatorial 3^2 , obtiveram pectinas da casca dos frutos do cacau com teores de ácidos urônicos entre 49,8% e 64,1%. A resposta dependeu principalmente dos efeitos individuais da temperatura. Maiores teores de ácidos urônicos foram obtidos em maiores temperaturas. Em temperatura constante, o pH mais baixo levou a um maior teor de ácidos urônicos. O efeito do pH apareceu somente a 75°C. Assim, os autores sugerem uma interação do pH com a temperatura em pH 4. Além disso, Barazarte, Sangronis e Unai (2008) não verificaram uma mudança significativa do teor de ácidos urônicos em resposta ao pH.

As equações 1 e 2 revelam os modelos estatísticos para o rendimento e teor de ácidos urônicos, respectivamente.

$$\text{Rendimento (\%)} = 7,46 + 0,01pH - 0,01pH^2 + 0,85Temp + 0,21Temp^2 + 0,10pH \times Temp$$

(Equação 1)

$$\text{Ácidos urônicos (\%)} = 50,62 - 0,61pH + 2,62pH^2 + 2,20Temp + 1,22Temp^2 - 6,28pH \times Temp$$

(Equação 2)

Os modelos foram validados usando a análise de variância (ANOVA) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006), cujos resultados para ambos os modelos são apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 - ANOVA PARA VALIDAÇÃO DOS MODELOS ESTATÍSTICOS DAS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO NÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

Variação	Rendimento					Ácidos urônicos				
	SS ^{a,f}	df ^b	MS ^c	F ^d	p ^e	SS ^a	df ^b	MS ^c	F ^d	p ^e
Regressão	6,157	5	1,2315	6,74	0,013	252,46	5	50,49	1,50	0,301
Resíduos	1,279	7	0,1828			235,66	7	33,67		
Falta de ajuste	1,007	3	0,3357	4,94	0,079	180,61	3	60,20	4,38	0,094
Erro puro	0,272	4	0,0680			55,03	4	13,76		
SS Total	7,437	12				488,12	12			

^aSS: Somas de quadrados; ^bdf: grau de liberdade; ^cMS: quadrados das médias; ^dF: distribuição F; ^ep: valor p. ^fOs valores em negrito e itálico são significativos a $p < 0,05$.

A Tabela 9 mostra que a regressão foi significativa para o rendimento das pectinas, mas não para o teor de ácidos urônicos. Isto indica que para o rendimento, os coeficientes são estatisticamente interpretáveis e o modelo pode ser utilizado para previsões. Entretanto, para o teor de ácidos urônicos, os coeficientes são estatisticamente interpretáveis, mas o modelo não pode ser utilizado para previsões. Isto ocorre devido ao elevado erro relacionado ao ajuste ao modelo. Nota-se que a variância da regressão é próxima à falta de ajuste, indicando uma baixa qualidade do modelo para previsões. As superfícies de resposta foram então construídas para o rendimento (Figura 8A e 8B), e também para o teor de ácidos urônicos (Figura 9A e 9B).

Através da superfície de resposta para o rendimento (Figura 8A), é possível observar que o maior valor foi de aproximadamente 10,5% dentro dos níveis estudados. De acordo com Rolin (1993), o bagaço da maçã rende de 10 a 15% de pectinas em base seca, enquanto que as cascas de cítricos geram de 20 a 30% de pectinas. Se a umidade de CPHF (8,5%) for considerada, o valor do rendimento alcança 11,5%, semelhante ao rendimento descrito para pectinas de maçã.

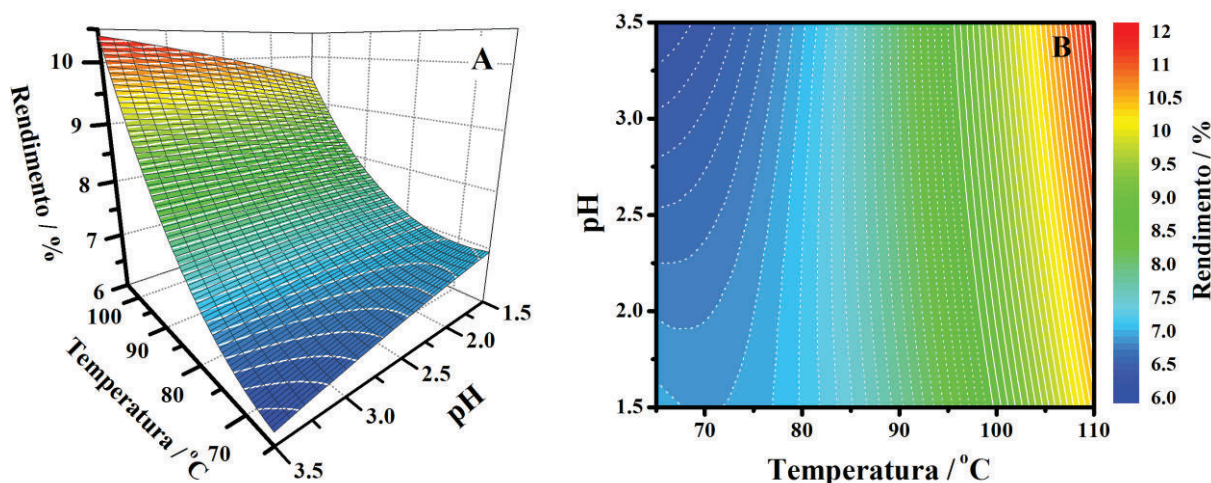


FIGURA 8 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PECTINAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) USANDO ÁCIDO NÍTRICO COMO AGENTE EXTRATOR. (A) SUPERFÍCIE TRIDIMENSIONAL (B) SUPERFÍCIE BIDIMENSIONAL

Adicionalmente, nas superfícies da Figura 8A e 8B, ao observar os eixos pH e temperatura concomitantemente, nota-se um significativo aumento do rendimento das pectinas com aumentos de temperatura independente do pH. Com base nesses dados, uma possível condição para maximizar o rendimento seria o emprego de ácido nítrico em pH 3,5 a 100°C durante 30 min de extração para alcançar aproximadamente 10,0 % de rendimento. Provavelmente estas condições favorecem uma maior hidrólise da protopectina e uma menor despolimerização da pectina recém-liberada (BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008).

Em relação aos resultados para o teor de ácidos urônicos, as superfícies de resposta (Figura 9A e 9B) mostram que valores acima de 70% podem ser alcançados dentro das condições do planejamento. Este teor satisfaz os requisitos de no mínimo 65% de ácidos urônicos para uso como pectinas comerciais (MAY, 1990). Ao observar os eixos pH e temperatura concomitantemente nas superfícies de resposta da Figura 9 (A e B) fica evidente um aumento considerável no teor de ácidos urônicos ao se reduzir o pH e aumentar a temperatura, ou quando o pH é aumentado e a temperatura reduzida. Com base nos dados, uma condição que poderia maximizar o teor de ácidos urônicos seria o uso de ácido nítrico em pH 1,5 a 100°C por 30 min de extração para alcançar ~80% de ácidos urônicos. Estas condições favorecem a degradação de cadeias laterais neutras das pectinas, levando a um maior teor de GalA presente na cadeia principal, uma vez que há

diferentes sensibilidades das ligações glicosídicas de substâncias pécicas frente à hidrólise ácida (YAPO *et al.*, 2007b).

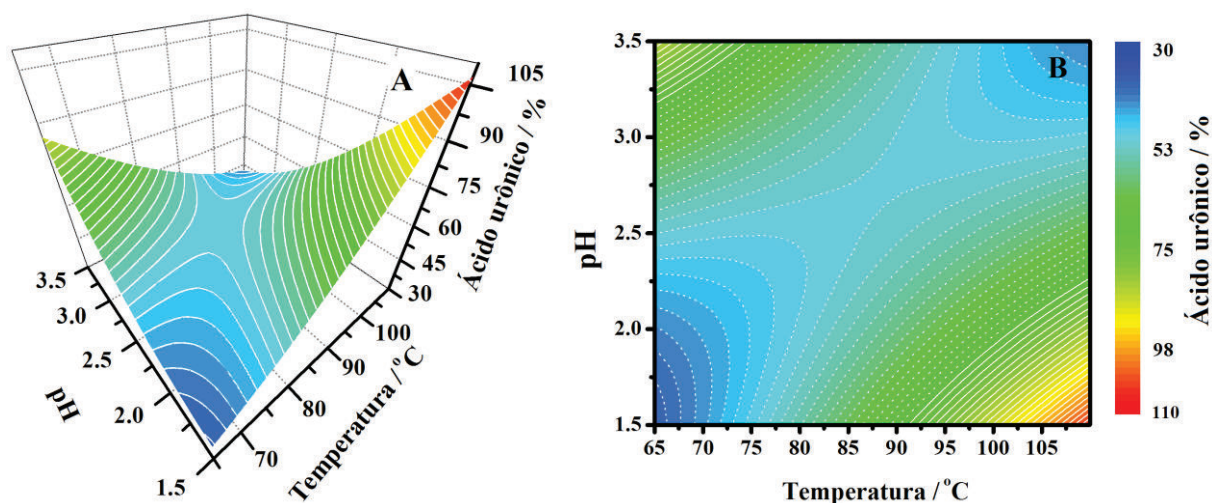


FIGURA 9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DE PECTINAS EXTRAÍDAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) USANDO ÁCIDO NÍTRICO COMO AGENTE EXTRATOR. (A) SUPERFÍCIE TRIDIMENSIONAL (B) SUPERFÍCIE BIDIMENSIONAL

Ao se considerar ambas as superfícies de resposta (Figuras 8A e 9A), as condições de extração que maximizam o teor de ácidos urônicos provavelmente reduziriam o rendimento de aproximadamente 10,0% para cerca de 9,0%. Por outro lado, as condições ótimas de extração para elevado rendimento reduziriam o teor de ácidos urônicos para menos de 50%, inferior ao valor mínimo para pectinas comerciais. Neste caso, é preferível ganhar em qualidade (alto teor de ácidos urônicos) mesmo com perdas de rendimento. Assim, foram escolhidas como condições satisfatórias de extração o uso do ácido nítrico em pH 1,5 a 100°C por 30 minutos para fornecer pectinas em um rendimento estimado de 9,0% e com 80% de ácidos urônicos, que geraram a amostra OP (*optimized pectin* ou *pectina otimizada*), principal pectina deste trabalho.

Adicionalmente, as condições para maximizar o rendimento (10,0%) com o uso do ácido nítrico (pH 3,5 a 100°C durante 30 min de extração) também foram empregadas para obter a amostra NA-HYP (*nitric acid high yield pectin* ou *pectina de alto rendimento extraída com ácido nítrico*).

4.3.1.2 Extrações com ácido cítrico

Por ser seguro, biodegradável, e gerar resíduos ambientais menos tóxicos que os ácidos minerais, o ácido cítrico, um ácido orgânico, vem sendo utilizado para a extração de pectinas (CANTERI-SCHEMIN *et al.*, 2005; KLIEMAN *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2008; YAPO, 2009a). Desta forma, neste trabalho também foram feitas extrações utilizando ácido cítrico como agente extrator.

O planejamento experimental utilizado foi o mesmo delineado para o ácido nítrico. O planejamento fatorial fracionário 3^{3-1} , as variáveis e seus níveis codificados e decodificados, e as respostas rendimento e teor de ácidos urônicos das pectinas obtidas com ácido cítrico estão expostos na Tabela 10.

TABELA 10 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 3^{3-1} PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E VALORES EXPERIMENTAIS PARA AS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	tempo (min)	Rendimento (% CPHF)	Ácidos urônicos (% fração)
7	3 (+1)	50 (-1)	60 (0)	5,6	59,8
8	3 (+1)	75 (0)	30 (-1)	5,4	56,3
13c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,6	63,8
6	2 (0)	100 (+1)	30 (-1)	9,0	62,2
12c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,8	65,2
10c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,7	63,2
2	1 (-1)	75 (0)	90 (+1)	7,8	56,9
9	3 (+1)	100 (+1)	90 (+1)	9,7	68,9
1	1 (-1)	50 (-1)	30 (-1)	3,9	57,8
11c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	7,1	64,0
3	1 (-1)	100 (+1)	60 (0)	10,6	60,5
5c	2 (0)	75 (0)	60 (0)	6,7	59,7
4	2 (0)	50 (-1)	90 (+1)	3,7	54,4

Os números entre parênteses são os níveis codificados das variáveis.
c: experimentos do ponto central.

O rendimento das frações variou de 3,7% a 10,6% em relação à CPHF. O maior rendimento foi obtido quando as condições de extração foram pH 1 durante 60 min a 100°C. O teor de ácidos urônicos nas pectinas obtidas ficou compreendido entre 54,4% e 68,9%, sendo o maior teor encontrado na fração obtida em pH 3 por 90 min a 100°C.

A Tabela 11 mostra os efeitos estimados para o planejamento fatorial. É possível verificar que o efeito linear da temperatura e o efeito quadrático do tempo foram significativos em relação ao rendimento, enquanto que somente o efeito linear da temperatura foi significativo para o teor de ácidos urônicos. O rendimento aumentou significativamente ($p < 0,05$) em maiores tempos e temperaturas de extração. O teor de ácidos urônicos aumentou significativamente com o aumento da temperatura. O pH da solução de ácido cítrico não apresentou efeito significativo em ambas as respostas. Estes resultados diferem daqueles obtidos quando o ácido nítrico foi usado nos mesmos níveis para obtenção de pectinas a partir de CPHF. Naquele caso, foi o tempo de extração que não influenciou o rendimento e o teor de ácidos urônicos. O rendimento aumentou com aumentos no pH e temperatura, e o teor de ácidos urônicos aumentou em menores pHs e maiores temperaturas.

TABELA 11 - EFEITOS ESTIMADOS PARA O PLANEJAMENTO 3^{3-1} SOBRE O RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

	Rendimento				Ácidos urônicos			
	Efeito ^a	Erro Padrão	df(6)	<i>p</i>	Efeito ^a	Erro Padrão	df(4)	<i>p</i>
Média	6,93	0,16	44,24	0,00	60,35	0,65	92,33	0,00
<i>pH</i>	-0,53	0,41	-1,31	0,24	3,27	1,70	1,93	0,13
<i>pH</i> ²	-0,72	0,31	-2,32	0,06	0,97	1,30	0,74	0,50
<i>Temp.</i>	5,37	0,41	13,21	0,00	6,53	1,70	3,85	0,02
<i>Temp.</i> ²	-0,47	0,31	-1,51	0,18	-0,74	1,30	-0,57	0,60
<i>Tempo</i>	0,97	0,41	2,38	0,05	1,30	1,70	0,77	0,48
<i>tempo</i> ²	1,03	0,31	3,30	0,02	2,81	1,30	2,16	0,09

df: grau de liberdade; *Temp.*: Temperatura.

^aValores em negrito e itálico são significativos a $p < 0,05$ com seis graus de liberdade para o rendimento usando o quadrado do erro residual médio e quatro graus de liberdade para o teor de ácidos urônicos usando o erro puro.

Marcon *et al.* (2005) extraíram pectinas do bagaço da maçã com ácido cítrico a 5% (m/v) utilizando um planejamento fatorial 2^2 com diferentes tempos e temperaturas. Os rendimentos obtidos variaram de 5,7 a 16,8%, e maiores rendimentos foram relacionados a aumentos de tempo e de temperatura de extração, como os resultados obtidos neste trabalho nas extrações com ácido cítrico. O teor de GalA encontrado pelos autores nas frações do bagaço da maçã (33,4 - 42,5%) não estava relacionado ao rendimento das extrações.

Canteri-Schemin *et al.* (2005) extraíram pectinas do bagaço da maçã com diferentes ácidos: cítrico, fosfórico, málico, tartárico, sulfúrico, clorídrico e nítrico. O ácido cítrico e o ácido nítrico levaram aos maiores rendimentos entre os ácidos orgânicos e minerais testados, respectivamente. O maior rendimento médio (13,75%) foi encontrado para pectinas extraídas com o ácido cítrico.

Yapo (2009a) investigou os efeitos do tipo de ácido extrator (ácidos cítrico, nítrico e sulfúrico) no rendimento e nas características de pectinas da casca do maracujá amarelo. Os resultados mostraram que tanto o tipo de ácido quanto sua concentração influenciaram o rendimento das pectinas extraídas, compreendido entre 3 e 14%, m/m. A quantidade de pectinas obtidas foi significativamente maior quando se utilizou solventes extratores em pH mais baixo, independente do tipo de ácido empregado. Quantidades semelhantes de pectinas foram extraídas com os ácidos nítrico e sulfúrico, mas os rendimentos das pectinas extraídas com o ácido cítrico foram menores (2,8% e 5,1%), mas estas apresentaram melhores propriedades físico-químicas (YAPO, 2009a).

A partir dos resultados do planejamento 3^{3-1} , um planejamento composto central (CCD) com as duas variáveis influentes sobre as respostas (tempo e temperatura) foi construído para que seus níveis ficassem numa região de maior interesse e possibilitar a aplicação da metodologia de superfície de resposta. Como o pH não teve influência no rendimento e teor de ácidos urônicos, foi fixado o valor de pH 3 nesses experimentos. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 - PONTOS EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (CCD) PARA EXTRAÇÃO DE PECTINAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E VALORES EXPERIMENTAIS PARA AS RESPOSTAS RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Ensaio ^a	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Rendimento (% de CPHF)	Ácidos urônicos (%)
1	75 (-1)	60 (-1)	6,6	52,2
3	75 (-1)	95 (+1)	7,2	55,1
8	85 (0)	102,245 (+ α)	9,0	60,9
10c	85 (0)	77,5 (0)	8,4	58,5
7	85 (0)	52,755 (- α)	8,0	61,7
13c	85 (0)	77,5 (0)	8,5	54,8
12c	85 (0)	77,5 (0)	8,6	55,2
6	99,14 (+ α)	77,5 (0)	8,9	55,0
5	70,86 (- α)	77,5 (0)	7,0	54,2
4	95 (+1)	95 (+1)	8,8	62,2
11c	85 (0)	77,5 (0)	8,4	58,1
2	95 (+1)	60 (-1)	8,3	55,8
9c	85 (0)	77,5 (0)	8,6	52,0

Os números entre parênteses são os níveis codificados das variáveis.

^a pH de extração mantido fixo em 3,0.

c: experimentos do ponto central.

$\pm\alpha$: experimentos dos pontos axiais situados no centro dos eixos, com distâncias de $\pm 1,414$ a partir da origem.

A Tabela 12 mostra que os rendimentos variaram entre 6,6 e 9,0 % em relação à CPHF, valores semelhantes aos obtidos neste trabalho quando ácido nítrico foi utilizado como agente extrator (6,8-9,2%, Tabela 7). Já o teor de ácidos urônicos das pectinas obtidas neste planejamento variou de 52,0 a 62,2% (Tabela 12) e apesar de não haver uma diferença expressiva entre os valores, o teor de ácidos urônicos em geral foi superior à maioria das pectinas obtidas no CCD com ácido nítrico (Tabela 7).

A Tabela 13 exibe os coeficientes de regressão para construção do modelo. O rendimento foi influenciado pelos efeitos lineares da temperatura e do tempo ($p < 0,05$) e pelo efeito quadrático da temperatura, mas não pela interação entre o tempo e a temperatura ($p > 0,05$). Os coeficientes lineares de regressão para a

temperatura e o tempo foram positivos, indicando maior rendimento das pectinas em maiores temperaturas e tempos. O rendimento das pectinas obtidas com ácido cítrico a partir da casca dos frutos do cacau não se relacionou com o teor de ácidos urônicos. Os efeitos individuais do tempo e da temperatura, dentro dos níveis estudados, não influenciaram o teor de ácidos urônicos das pectinas ($p>0,05$).

TABELA 13 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO ESTIMADOS PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL (CCD) SOBRE O RENDIMENTO E TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS DAS PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) E PARÂMETROS ESTATÍSTICOS PARA AS RESPOSTAS

	Rendimento				Ácidos urônicos			
	Coef. ^a	Erro padrão	df(7)	<i>p</i>	Coef. ^a	Erro padrão	df(4)	<i>p</i>
Média	8,50	0,13	64,97	0,000	55,72	1,19	46,80	0,000
<i>Temp.</i>	0,75	0,10	7,24	0,000	1,48	0,94	1,57	0,191
<i>Temp.</i> ²	-0,40	0,11	-3,61	0,009	-0,97	1,01	-0,96	0,392
<i>tempo</i>	0,31	0,10	3,04	0,019	1,02	0,94	1,08	0,338
<i>tempo</i> ²	-0,13	0,11	-1,13	0,296	2,38	1,01	2,36	0,077
<i>Temp.×tempo</i>	-0,02	0,15	-0,17	0,869	0,87	1,33	0,65	0,546

df: Graus de liberdade; Coef.: coeficiente; *Temp.*: Temperatura.

^aValores em negrito e itálico são significativos a $p<0,05$ com sete graus de liberdade para o rendimento das pectinas usando o quadrado do erro residual médio, e quatro graus de liberdade para o teor de ácidos urônicos usando o erro puro.

A partir da Tabela 13 verifica-se que a temperatura (fatores linear e quadrático) e o tempo (fator linear) foram significativos para o rendimento. Os coeficientes lineares e positivos indicam que aumentos nas variáveis resultam em maiores rendimentos. O coeficiente quadrático negativo da temperatura indica que um decréscimo na temperatura produz uma queda quadrática no rendimento.

Para o teor de ácidos urônicos, observa-se na Tabela 13 que nenhuma das variáveis foi significativa dentro dos níveis estudados. A partir dos resultados mostrados na Tabela 12 verifica-se pouca variação no teor de ácidos urônicos (52,0 a 62,2%) com uma média de 56,6%, evidenciando a diferença não significativa entre os valores. A partir dos resultados das Tabelas 10 e 12, níveis que produziram resultados satisfatórios para o teor de ácidos urônicos seriam temperatura de aproximadamente 95°C e tempo de cerca de 95 min.

Como não houve variável influente sobre o teor de ácidos urônicos das pectinas extraídas usando ácido cítrico, foi construído apenas o modelo para o rendimento, usando os coeficientes codificados, como mostrado na Equação 3.

$$\text{Rendimento (\%)} = 8,5 + 0,75\text{Temp} - 0,40\text{Temp}^2 + 0,31\text{tempo} - 0,13\text{tempo}^2 - 0,02\text{Temp} \times \text{tempo}$$

(Equação 3)

O modelo foi validado utilizando os gráficos dos valores observados *versus* valores estimados e o gráfico dos valores observados *versus* os resíduos deixados pelas replicatas realizadas no ponto central (TEÓFILO; FERREIRA, 2006), que são apresentados na Figura 10.

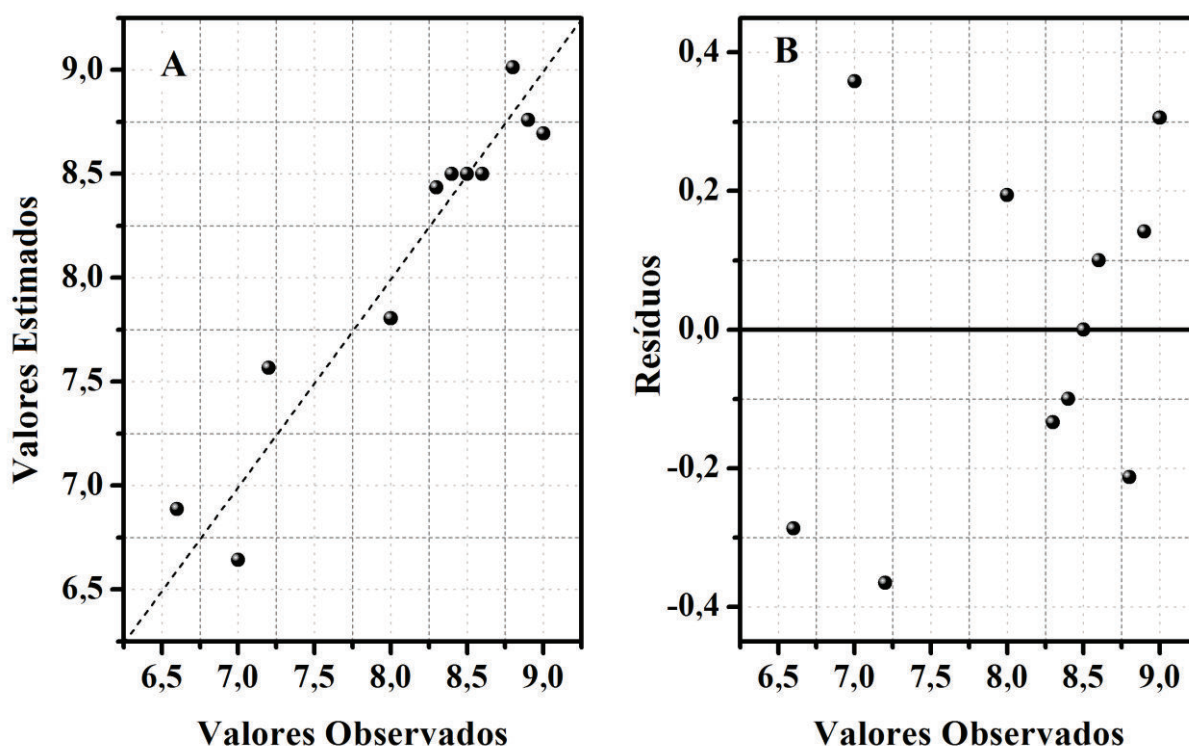


FIGURA 10 - GRÁFICOS PARA VALIDAÇÃO DO MODELO PARA A RESPOSTA RENDIMENTO DE PECTINAS EXTRAÍDAS COM ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF). (A) VALORES OBSERVADOS × VALORES ESTIMADOS (B) VALORES OBSERVADOS × RESÍDUOS

Na Figura 10A, verifica-se que os valores de rendimento observados são bastante próximos aos valores previstos e podem ser representados por uma reta ajustada. Consequentemente, a distribuição dos resíduos é aleatória, como

mostrado na Figura 10B, onde se observa a presença de resíduos positivos e negativos em várias posições do gráfico. Portanto, estes gráficos mostram que os valores estimados pelo modelo apresentam um baixo erro e o modelo pode ser usado para previsões, ou seja, o modelo está ajustado.

As superfícies do modelo para a resposta rendimento de pectinas extraídas com ácido cítrico a partir de CPHF foram construídas baseadas nos coeficientes decodificados e estão mostradas na Figura 11A e 11B. Através da superfície de resposta tridimensional para o rendimento (Figura 11A), é possível observar que o maior valor foi de 9,0% dentro dos níveis estudados. Adicionalmente, ao observar os eixos tempo e temperatura concomitantemente nas superfícies da Figura 11A e 11B, fica evidenciado o aumento do rendimento com aumentos concomitantes na temperatura e no tempo até aproximadamente 95°C e 95 minutos.

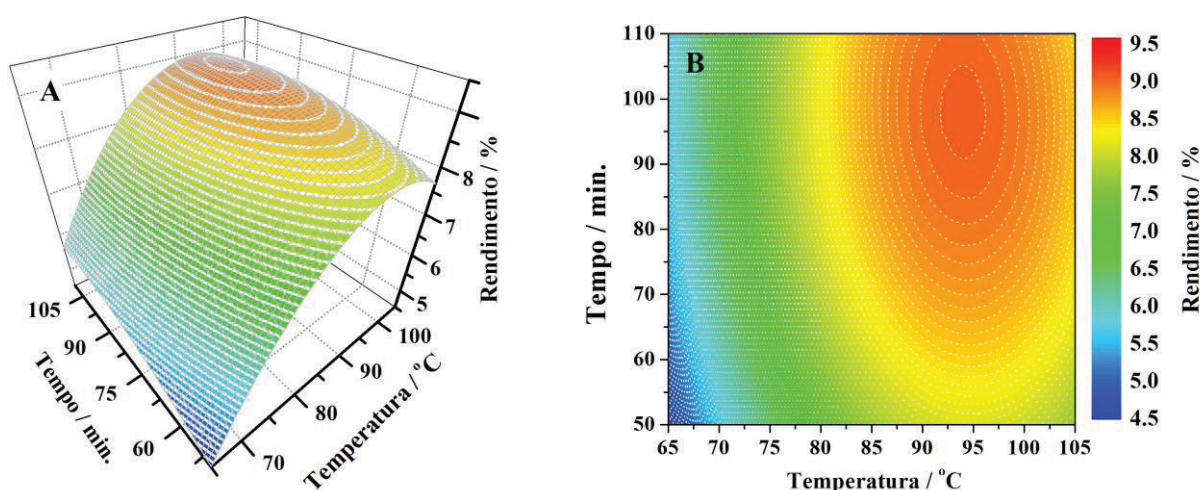


FIGURA 11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DE PECTINAS DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) USANDO ÁCIDO CÍTRICO COMO AGENTE EXTRATOR. (A) SUPERFÍCIE TRIDIMENSIONAL (B) SUPERFÍCIE BIDIMENSIONAL

Com base nos dados apresentados, para maximizar o rendimento das pectinas extraídas com ácido cítrico a partir da casca dos frutos do cacau, as condições de extração seriam o uso da solução aquosa do ácido em pH 3,0 a 95°C por 95 min para alcançar um rendimento de cerca de 9,0%. Se a umidade de CPHF (8,5%) for considerada, o rendimento estimado alcança 9,8%. Estas condições de alto rendimento foram utilizadas para obter a fração CA-HYP (*citric acid high yield pectin* ou pectina de alto rendimento obtida com ácido cítrico).

4.3.2 Extrações aquosas

Blakemore, Dewar e Hodge (1966) verificaram que a maior parte de polissacarídeos solúveis em água quente presentes na casca do fruto do cacau era constituída por material péctico. Comparado aos ácidos, a utilização de água como agente extrator teria a vantagem de não gerar efluentes corrosivos, além da redução de custo. Assim, foram feitas extrações aquosas a quente de CPHF visando a obtenção de pectinas. A fração obtida a 50°C foi denominada 50W (50°C water ou fração de pectina hidrossolúvel a 50°C) e a fração obtida em banho-maria fervente (~97°C) foi chamada BW (boiling water ou fração de pectina hidrossolúvel sob fervura).

As análises relativas à caracterização química e reológica das frações de pectinas obtidas a partir da casca dos frutos do cacau serão apresentadas adiante.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE PECTINAS OBTIDAS DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU

4.4.1 Fração OP (Pectina otimizada)

4.4.1.1 Rendimento e composição

As extrações nas condições satisfatórias para elevado teor de ácidos urônicos (solução aquosa de ácido nítrico em pH 1,5/100°C/30 min) originaram a principal fração deste trabalho, denominada OP (optimized pectin ou pectina otimizada), em um rendimento experimental de $9,0 \pm 0,08\%$ de CPHF (m/m), em concordância com o valor previsto (9,0%). Se a umidade de CPHF (8,5%) for considerada, o rendimento é de 9,8% (m/m CPHF seco).

Assim, o rendimento da fração OP obtida das cascas dos frutos do cacau foi

levemente superior ao de pectinas obtidas de cascas do maracujá amarelo em condições otimizadas de extração, após precipitação com álcool (7,5%; YAPO, 2009b), mas foi inferior a pectinas extraídas com solução de ácido clorídrico a partir de cascas do cajá (>11%; KOUBALA *et al.*, 2008b) e de cascas de manga de duas variedades distintas (> 10%; KOUBALA *et al.*, 2008a).

Conforme mostrado na Tabela 14, OP apresentou 5,8% de umidade e consistiu de 69,9% de carboidratos, 3,6% de proteínas e 3,9% de compostos fenólicos. O teor de proteínas é semelhante ao de pectinas obtidas da casca do maracujá amarelo sob condições otimizadas de extração (YAPO, 2009b) e pectinas cítricas (KURITA; FUJIWARA; YAMAZAKI, 2008), mas a umidade e o teor de carboidratos são inferiores àqueles de pectinas cítricas (~9% e ~80%, respectivamente; KURITA; FUJIWARA; YAMAZAKI, 2008).

Com base nos resultados dos planejamentos experimentais para extração de pectinas a partir de CPHF com ácido nítrico, o rendimento das pectinas foi melhor em temperaturas maiores, e o teor de ácidos urônicos apresentou uma tendência a elevação em menores pHs e altas temperaturas. Assim, condições que poderiam melhorar ambas as respostas, rendimento e teor de ácidos urônicos, foram empregadas para obter a fração OP, visando obter uma pectina de maior qualidade em melhor rendimento. Entretanto, o valor experimental para os ácidos urônicos (Tabela 14) foi menor do que o valor previsto (~66,0% × ~80,0%, respectivamente), e poderia ser justificado pela baixa qualidade do modelo para previsões, conforme comentado anteriormente.

TABELA 14 - COMPOSIÇÃO DA PECTINA OTIMIZADA (OP) OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS

Composição (%, m/m, base seca)	OP ^h
Umidade	5,8 ± 0,11
Carboidratos totais ^a	69,9 ± 0,69
Proteínas ^b	3,6 ± 1,04
Fenólicos ^c	3,9 ± 0,35
Monossacarídeos ^d	
Rha	10,0 ± 0,74
Ara	2,7 ± 0,80
Xyl	0,7 ± 0,26
Man	1,0 ± 0,22
Gal	16,8 ± 0,58
Glc	2,8 ± 0,20
Ácidos urônicos ^e	66,0 ± 1,27
DE ^f	56,6 ± 0,81
DA ^g	17,1 ± 0,29

a: determinado por método colorimétrico, Dubois *et al.* (1956).

b: determinado por método colorimétrico, Bradford (1976).

c: determinado por método colorimétrico usando o reagente Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965); resultados expressos como % ácido gálico.

d: determinado por GLC, média de triplicatas ± EPM.

e: determinados por método colorimétrico, Filisetti-Cozzi; Carpita (1991), média de triplicatas ± EPM.

f: Grau de esterificação, determinado por quantificação através de FT-IR, como descrito por Vriesmann (2008) e Vriesmann e Petkowicz (2009), média de duplicatas ± EPM.

g: Grau de acetilação, determinado por método colorimétrico, Hestrin (1949).

h: expresso em base seca, exceto para a umidade.

Como evidenciado na Tabela 14, a composição química de OP indicou que a fração apresenta principalmente ácidos urônicos (66,0%). O valor encontrado foi levemente superior ao descrito para a pectina obtida em condições otimizadas a partir da casca do maracujá amarelo (62,4%; YAPO, 2009b). A identidade das unidades de ácidos urônicos de OP foi confirmada após hidrólise e derivatização da fração carboxi-reduzida (R-OP, *reduced OP*) e análise por GLC-MS, onde se evidenciou um pico principal correspondente ao da galactose (79,2%), indicando que a fração OP é composta majoritariamente por GalA, conforme esperado para pectinas.

Entre os monossacarídeos neutros de OP, houve predomínio de Gal (16,8%). Outros monossacarídeos típicos de pectinas foram a Rha (10,0%) e a Ara (2,7%). Esses três monossacarídeos compõem a região de ramnogalacturonanas, que inclui também unidades de GalA. A composição monossacarídica de OP mostrou-se semelhante às pectinas extraídas com ácido a partir da casca da manga (KOUBALA *et al.*, 2008a), apesar destas apresentarem um teor maior de ácidos urônicos.

Além dos monossacarídeos típicos de pectinas, OP também apresentou quantidades menores de Man, Xyl e Glc, que são monossacarídeos que podem estar presentes em cadeias laterais de RG-I (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001). Testes de lugol descartaram a presença de amido. A Man foi encontrada em diferentes proporções em frações de pectinas isoladas de várias fontes (HABIBI *et al.*, 2004; HILZ *et al.*, 2006; IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; KOUBALA *et al.*, 2008a; MIYAMOTO; CHANG, 1992; O'DONOGHUE; SOMERFIELD, 2008; OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2002; PINHEIRO, 2007; ROS; SCHOLS; VORAGEN, 1998; VRIESMANN, 2008; VRIESMANN, PETKOWICZ, 2009; YAPO *et al.*, 2007b). A Xyl também é descrita em galacturonanas substituídas (xilogalacturonanas) (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001) e poderia estar presente em OP.

As pectinas nativas geralmente possuem elevado grau de esterificação e baixo grau de acetilação (VORAGEN *et al.*, 1995). A fração OP apresentou DE 56,6% e DA de 17,1%, evidenciando a presença de pectinas HM altamente acetiladas. Seu DE se compara ao de pectinas extraídas com ácido de cascas da manga (KOUBALA *et al.*, 2008a) e de pectinas obtidas sob condições otimizadas a partir da casca de frutos do maracujá amarelo e precipitadas com álcool (YAPO, 2009b). Já o DA é muito superior ao de pectinas de outros subprodutos, como de cascas de banana (DA<6,0%) (HAPPY EMAGA *et al.*, 2008a,b); de cascas de manga (DA 3,0-8,0%) (KOUBALA *et al.*, 2008a); de cascas de cajá (DA 4,0-6,0%), (KOUBALA *et al.*, 2008b) e de cascas do maracujá amarelo (DA<2,0%; YAPO; KOFFI, 2006), apesar de ser inferior ao de pectinas da beterraba (DA>25,0%; BUCHHOLT *et al.*, 2004).

A distribuição da acetilação entre os segmentos de homogalacturonana e ramnogalacturonana ainda não está bem estabelecida. HGs altamente acetiladas são comuns em pectinas de beterraba e batata (WILLATS *et al.*, 2001). Em pectinas do linho, alho-porró, maçã e cebola, os grupos acetil estão presentes nas regiões de

RG-I (BONNIN *et al.*, 2008). Nas pectinas de quiabo, além dos grupos acetil estarem ligados nas unidades de GalA das regiões de HG e RG-I, eles estão presentes nas unidades de Rha e/ou Gal nas cadeias laterais de RG-I (SENGKHAMPARN *et al.*, 2009).

Embora os grupos acetil possam estar ligados nas unidades de GalA (CAFFALL; MOHNEN, 2009), Rha (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001) ou Gal (SENGKHAMPARN *et al.*, 2009), o grau de acetilação (DA) é calculado apenas em relação às unidades de GalA. Em certos casos, até 90% das unidades de GalA podem estar acetiladas e é sabido que elevados DAs impedem a hidrólise enzimática de homogalacturonanas e alteram a solubilidade de pectinas e suas propriedades de formação de géis (WILLATS *et al.*, 2001).

Entretanto, elevados teores de acetil em conjunto com outras características das pectinas podem conferir propriedades diferenciadas a elas. Por exemplo, as pectinas da beterraba são citadas com propriedades surfactantes e emulsificantes (YAPO *et al.*, 2007b) e sendo capazes de formar géis termicamente estáveis por meio de ligações covalentes através de unidades de ácido ferúlico, permitindo sua aplicação em materiais que podem reter e absorver água em enormes quantidades (MAY, 1990). Além disso, tratamentos químicos em meio ácido contendo metanol são capazes de remover os grupos acetil e aumentar simultaneamente o DE (MAY, 1990).

Pelos resultados de composição, sugere-se que a fração OP consiste de homogalacturonanas altamente esterificadas e acetiladas e ramnogalacturonanas tipo I (RG-I) com galactanas ou arabinogalactanas como cadeias laterais neutras.

A fração OP foi submetida à análise por HPSEC-MALLS/RI, e seu perfil de eluição está mostrado na Figura 12. Enquanto o detector de RI fornece um sinal proporcional à concentração, o detector de MALLS evidencia a massa molecular do composto. A fração OP exibiu um perfil heterogêneo por HPSEC-MALLS/RI, indicando a presença de uma mistura de pectinas com massas moleculares distintas. Nota-se a presença de um polímero eluindo em ~38 min, detectado com alta intensidade pelo espalhamento de luz e também detectado pelo RI. Um pico mais intenso foi detectado apenas pelo RI após 42 min. Esses dados indicam a presença de dois polímeros, um de elevada massa molecular e um polímero predominante com menor massa molecular.

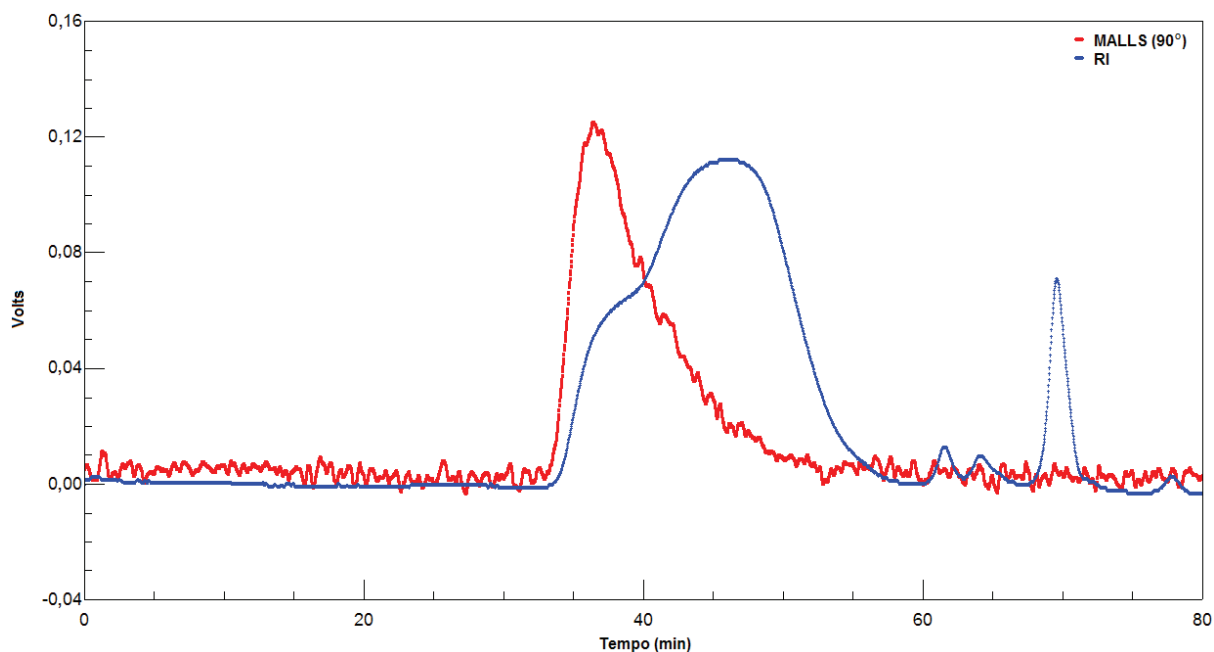


FIGURA 12 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI (25°C) DA FRAÇÃO OP OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS

Perfis de eluição polimodais são comuns para pectinas de diferentes fontes, como de casca de banana (HAPPI EMAGA *et al.*, 2008b), polpa de beterraba (YAPO *et al.*, 2007b), casca de maracujá amarelo (YAPO, 2009a), polpa de manga (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002) e polpa de cupuaçu (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009).

O uso do detector de UV a 280 nm pode fornecer informações sobre a presença de anéis aromáticos, como aqueles presentes em compostos fenólicos e proteínas. Na fração OP, o uso desse detector evidenciou dois pequenos picos eluindo depois de 55 minutos (dado não mostrado) que coincidiram com uma detecção mínima apenas pelo detector RI, sugerindo a presença de compostos fenólicos ou proteínas, confirmando os dados da Tabela 14. Estes compostos provavelmente apresentam menor massa molecular, uma vez que eluíram depois dos outros polímeros.

A estrutura química das pectinas da fração OP foi estudada por ^{13}C -RMN (Figura 13). A presença de homogalacturonanas está demonstrada pelos sinais de ressonância do ácido α -galacturônico (α -GalpA). Em 100,1 ppm e 99,4 ppm aparecem os sinais de C-1 das unidades esterificadas e livres, respectivamente. Os

sinais correspondentes de C-6 são observados em 170,6 ppm (carbonos carbonílicos metil-esterificados) e 173,4 ppm (carbonos carboxílicos). O sinal do carbono de grupos metil das unidades esterificadas de GalpA apareceu em 52,8 ppm. Os sinais de C-2, C-3, C-4 e C-5 de GalpA foram identificados, respectivamente, em 69,4; 70,6; 78,4 e 72,0. Todos os sinais de assinalamento de GalpA são similares aos de outras pectinas (DALONSO; PETKOWICZ, 2012; DUAN *et al.*, 2004; TAMAKI *et al.*, 2008; VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009; WESTERENG *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010).

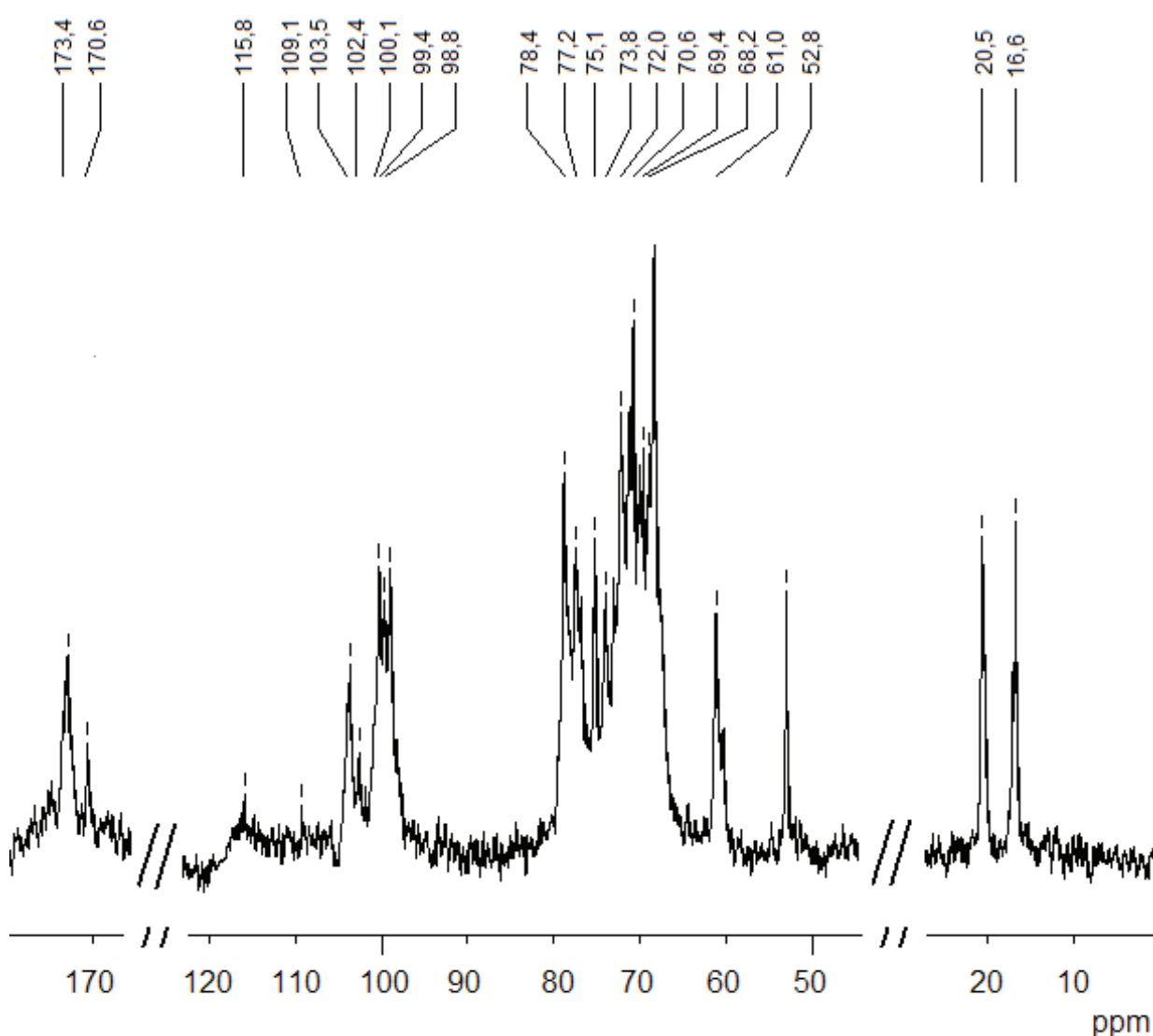


FIGURA 13 - ESPECTRO DE ^{13}C RMN (70°C, 100 MHz) DA FRAÇÃO OP OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICO. SOLVENTE: D_2O . DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm

A presença dos grupos acetil, que podem estar presentes em O-2 e/ou O-3 de GalpA, foi evidenciada pelos sinais de seu carbono metílico em 20,5 ppm. Adicionalmente, o sinal em 173,4 ppm também pode ser devido aos carbonos carboxílicos de grupos acetil (WAWER; WOLNIAK; PARADOWSKA, 2006). Na região de carbonos aromáticos, um sinal principal apareceu em 115,8 ppm. Provavelmente esse sinal reflete a presença de pequena quantidade de compostos fenólicos na fração OP, pois ressonâncias entre 114,4 a 118,6 ppm são características de CH fenólicos (WAWER; WOLNIAK; PARADOWSKA, 2006).

Alguns sinais de ressonância também mostraram a presença de ramnogalacturonanas em OP. Sinais de C-1 e C-6 de unidades de α -L-Rhap apareceram em 98,8 ppm e 16,6 ppm, respectivamente. Na região anomérica do espectro de RMN de OP, nota-se também sinais de α -L-Araf em 109,1 ppm, e de β -1,4-D-Gal em 103,5 e 102,4 ppm (substituídas e não-substituídas, respectivamente). Todos os assinalamentos se basearam em valores da literatura (DUAN *et al.*, 2004; IACOMINI *et al.*, 2005; PETERSEN *et al.*, 2008; VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009; WESTERENG *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010).

Portanto, os dados obtidos apontam para a presença de pectinas altamente acetiladas constituídas de homogalacturonanas HM e ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) contendo cadeias laterais constituídas majoritariamente por galactanas.

4.4.1.2 Obtenção e caracterização de micropartículas contendo fármaco

Como as pectinas vêm sendo estudadas em sistemas de liberação de fármacos, a fração OP foi empregada para preparar micropartículas contendo ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), fármaco destinado à liberação no cólon intestinal com ação anti-inflamatória local para tratamento da colite ulcerativa branda a moderada. Esta parte do trabalho foi efetuada no Laboratório de Pesquisa em Tecnologia Farmacêutica da Universidade do Vale do Itajaí (Itajaí, SC) em parceria com a Profa. Dra. Ruth Meri Lucinda da Silva; e no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, em parceria com a Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco.

As micropartículas foram obtidas por *spray dryer* contendo razões de 4:1; 3:1; 2:1 e 1:1 (m/m) de OP:5-ASA. Após coleta das micropartículas, estas foram

pesadas para cálculo do rendimento (Tabela 15) e armazenadas em frascos de vidro âmbar. Após dissolução das micropartículas de cada amostra em HCl 0,1 mol.L⁻¹, determinou-se espectrofotometricamente o teor de fármaco, a partir do qual se calculou a eficiência de encapsulação do fármaco, que é a razão entre o teor de fármaco encontrado e o teor de fármaco teórico (Tabela 15).

TABELA 15 - FORMULAÇÃO, RENDIMENTO, TEOR DE FÁRMACO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS CONTENDO A PECTINA OTIMIZADA (OP) E ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO (5-ASA)

	Formulação		Rendimento	Teor de fármaco ^{ab}	Eficiência de encapsulação ^b
	OP	5-ASA			
Amostra			%		
1	50,0	50,0	68,0	43,0 ± 0,6	86,0 ± 1,0
2	66,7	33,3	62,5	29,8 ± 0,1	89,5 ± 0,1
3	75,0	25,0	60,8	23,2 ± 0,1	93,0 ± 0,7
4	80,0	20,0	61,7	19,6 ± 0,2	98,1 ± 0,2

^a: Determinado espectrofotometricamente a 302 nm.

^b: Valor ± EPM.

A amostra 1, preparada com quantidades equivalentes de fármaco e pectina, apresentou o maior rendimento (68%). Em geral, houve uma tendência à melhora no rendimento das micropartículas preparadas com menores proporções de pectina. O inverso foi observado para a eficiência de encapsulação, que foi melhor com o aumento da proporção de pectina utilizada variando de 86% para a amostra 1 até 98,1% para a amostra 4, o que evidencia uma menor perda de fármaco durante o processo de produção das micropartículas com maior teor de polímero.

Orhan *et al.* (2006) produziram micropartículas de pectina:ciprofloxacino nas mesmas proporções deste trabalho destinadas a tratamento da osteomielite. O rendimento ficou compreendido entre 45 e 49% e a eficiência de encapsulação foi maior quando se usou maiores proporções de pectina.

Melhores eficiências de encapsulação com maiores razões polímero:fármaco também foram encontradas para micropartículas reticuladas de quitosana contendo aciclovir preparadas por *spray dryer*, sendo o maior valor encontrado de 90,6% em uma razão polímero:fármaco de cerca de 13,3:1 (STULZER *et al.*, 2009).

As análises morfológico-estruturais das micropartículas de cada amostra bem

como de um controle contendo apenas a pectina submetida ao mesmo processo de *spray dryer*, foram efetuadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme mostrado na Figura 14.

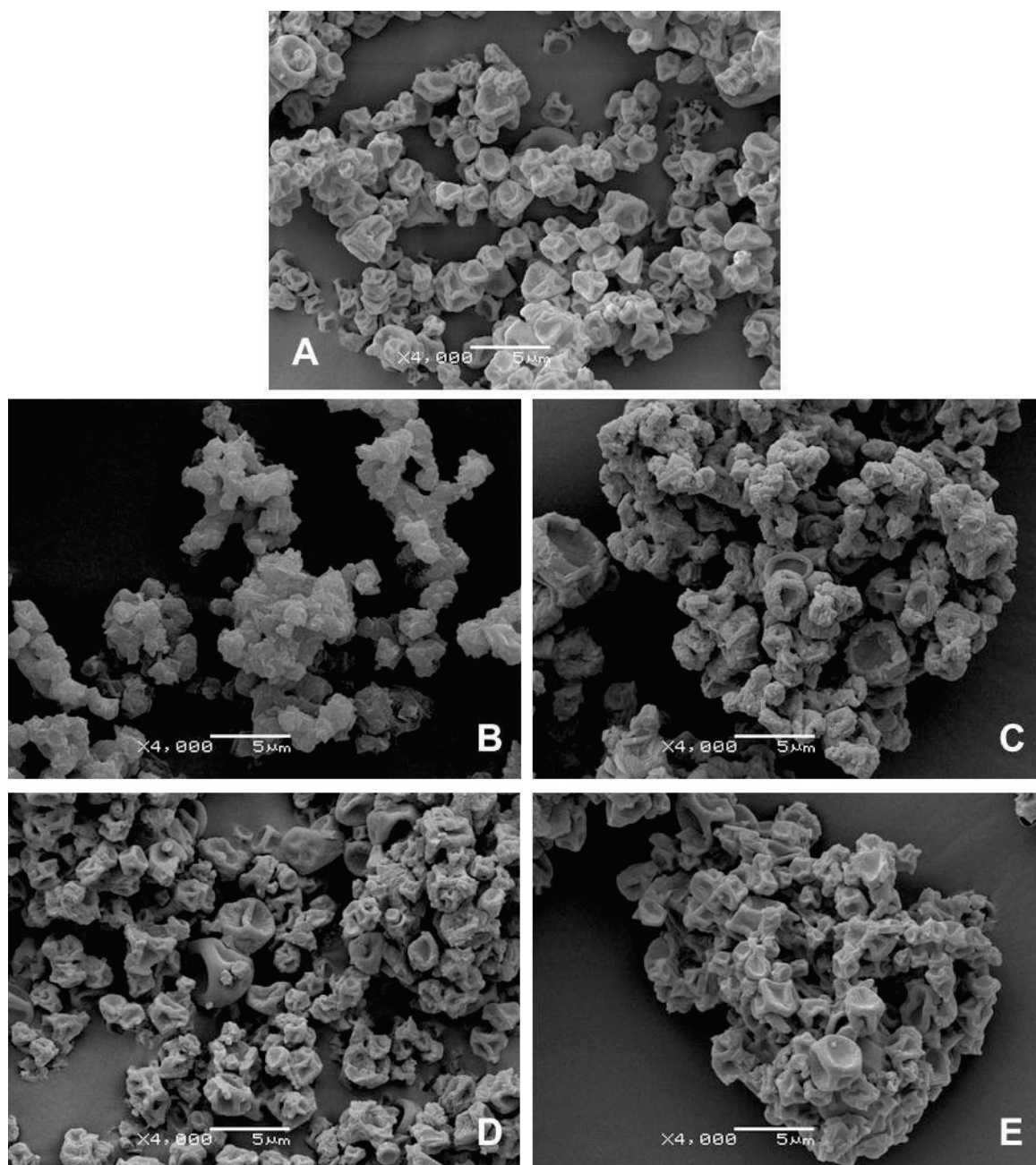


FIGURA 14 - MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROPARTÍCULAS DE PECTINA OTIMIZADA (OP) E ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO (5-ASA) OBTIDAS POR SPRAY DRYER. (A) CONTROLE CONTENDO APENAS A PECTINA; (B) AMOSTRA 1 (50% PECTINA E 50% 5-ASA); (C) AMOSTRA 2 (66,7% PECTINA E 33,3% 5-ASA); (D) AMOSTRA 3 (75% PECTINA E 25% 5-ASA); (E) AMOSTRA 4 (80% PECTINA E 20% 5-ASA). AUMENTO: 4000X

Pode-se observar que as micropartículas apresentaram-se agregadas e com um tamanho individual inferior a 5 μm , apesar de exibir certa heterogeneidade no tamanho das partículas. Foram realizados tratamentos com álcool e acetona, além do uso de ultrassom para tentar separar melhor as micropartículas, mas não se obteve sucesso.

Micropartículas reticuladas de quitosana contendo aciclovir obtidas por *spray dryer* mostraram mais heterogeneidade e maior tamanho (19-35 μm ; STULZER *et al.*, 2009) do que as micropartículas com OP e 5-ASA obtidas no presente trabalho. As micropartículas reticuladas de quitosana também estavam agregadas, o que foi justificado pelas características de adesão do polissacarídeo.

Em contrapartida, micropartículas de pectina e ciprofloxacino preparadas por *spray dryer* nas proporções 1:1; 2:1; 3:1 e 4:1 polímero:fármaco mostraram semelhança de tamanho (em torno de 4 μm ; ORHAN *et al.*, 2006) com as micropartículas obtidas com OP e 5-ASA. Além disso, Orhan *et al.* (2006) observaram que as micropartículas apresentaram formato esférico, exibindo estreita distribuição de tamanho.

Na Figura 14 observa-se a presença de uma superfície irregular nas micropartículas, mais pronunciada na amostra 1 (Figura 14B), onde parece haver cristais alongados, dando a impressão que houve dificuldade de encapsulação do fármaco nas micropartículas. Com o aumento da proporção de pectina as micropartículas contendo 5-ASA pareceram mais homogêneas morfológicamente (Figura 14C, 14D, 14E), se assemelhando mais às micropartículas do controle (Figura 14A).

Foram efetuados testes de liberação de fármaco das micropartículas *in vitro* a 37°C (FARMACOPÉIA AMERICANA, 2008). Utilizou-se sequencialmente soluções de HCl 0,1 mol.L⁻¹ (2h), tampão fosfato pH 6,0 (1h) e tampão fosfato pH 7,2 (1,5h) com coleta de alíquotas em intervalos de tempo apropriados para mensurar a liberação do fármaco empregando-se curvas padrão previamente construídas em cada um dos meios de liberação utilizados. Os resultados de liberação do 5-ASA das amostras 1 a 4 estão mostrados na Figura 15.

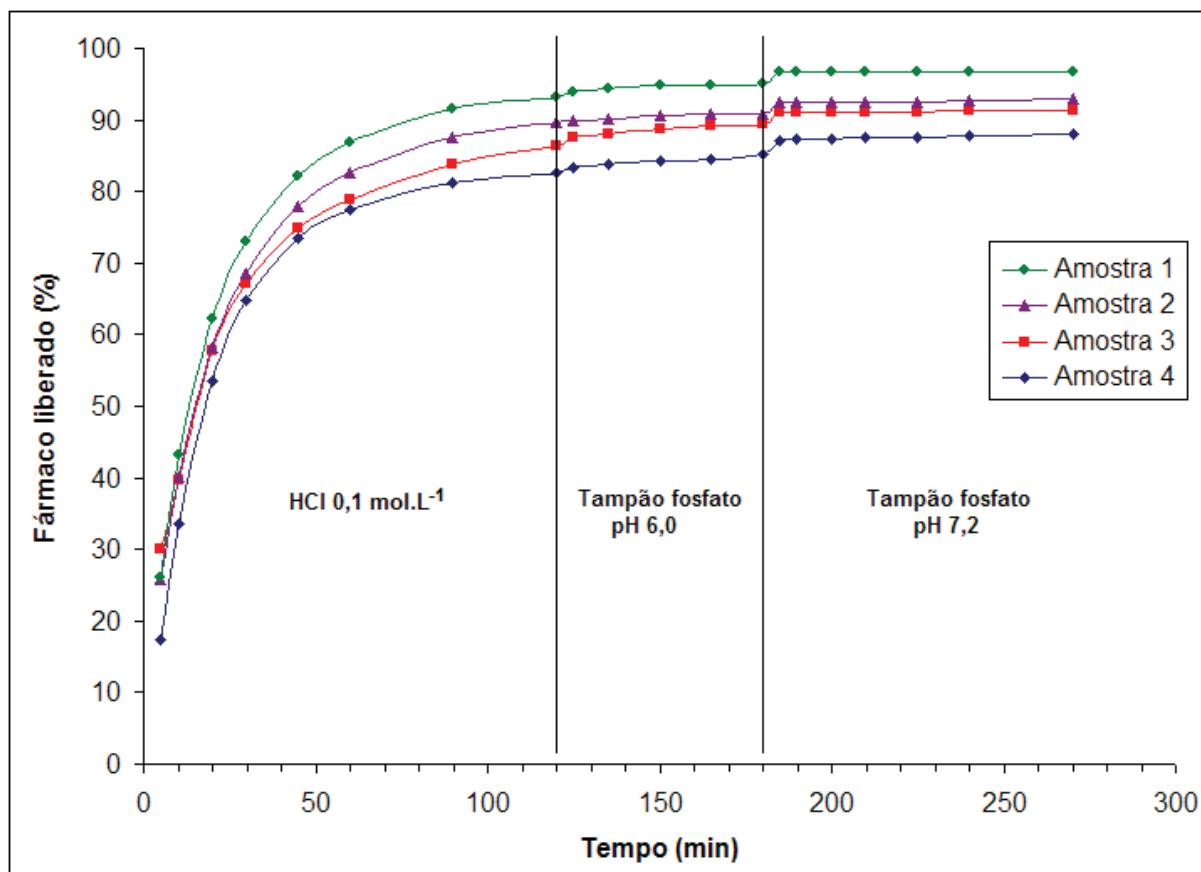


FIGURA 15 - PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* (37°C) DO ÁCIDO 5-AMINOSSALICÍLICO (5-ASA) A PARTIR DE MICROPARTÍCULAS CONTENDO PECTINA OTIMIZADA (OP) E 5-ASA EM MEIOS MIMETIZANDO O pH DO SISTEMA GASTROINTESTINAL

NOTA: Amostra 1 (50% pectina e 50% 5-ASA); Amostra 2 (66,7% pectina e 33,3% 5-ASA); Amostra 3 (75% pectina e 25% 5-ASA); Amostra 4 (80% pectina e 20% 5-ASA).

Após 2 horas em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, mais de 80% de 5-ASA foi liberado das formulações. A amostra 4, contendo maior proporção de pectina (80% OP e 20% 5-ASA), apresentou a maior capacidade de proteção do fármaco (Figura 15). Esta amostra também pareceu ter incorporado melhor o fármaco, pois as micropartículas obtidas mostraram-se mais homogêneas (Figura 14E).

Ficou evidente que houve uma tendência de maior retenção do fármaco quando o teor de OP foi aumentado. Porém, o uso destas pectinas isoladamente e nestas proporções não foi suficiente para conferir uma proteção satisfatória no pH gástrico, apontando a necessidade de uma maior investigação neste aspecto. Entre as sugestões, novos testes poderiam ser realizados aumentando a concentração de OP. Outra opção seria testar a solubilização prévia de OP e de 5-ASA em solventes diferentes daqueles empregados neste trabalho ou apenas variando o pH dos solventes.

Poderiam também ser efetuados testes de complexação com outras substâncias que podem auxiliar na reticulação para aprisionamento do fármaco, como o cálcio. O pectinato de cálcio, por ser menos hidrossolúvel, vem sendo empregado para fins de liberação colônica de fármacos (ADKIN *et al.*, 1997; RUBINSTEIN *et al.*, 1993; WEI *et al.*, 2006).

Além disso, para formação de uma matriz mais resistente ao pH gástrico, poderiam ser empregados outros polímeros naturais, como a quitosana e alginato, ou sintéticos, como hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) ou derivados metacrílicos (Eudragit®).

Sistemas contendo pectinas e HPMC vêm sendo usados para formação de comprimidos com potencial para liberação colônica de fármacos (GUIMARÃES *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2007; TURKOGLU; UGURLU, 2002; UGURLU *et al.*, 2007). Turkoglu e Ugurlu (2002) revestiram comprimidos de 5-ASA com pectina HM cítrica e também associações desta pectina e HPMC. O emprego de pectina pura para o revestimento foi insuficiente para proteger o núcleo contendo o fármaco, mas a incorporação de 20% de HPMC foi suficiente para proteger o fármaco pelo tempo necessário. Segundo os autores, o uso de HPMC contribui positivamente para candidatar a pectina para desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, pois aumenta a proteção do núcleo contendo o fármaco durante a passagem pelo sistema gastrointestinal.

Bigucci *et al.* (2008) prepararam complexos entre pectinas HM cítricas e quitosana, e por compressão direta destas com vancomicina obtiveram comprimidos. Os complexos quitosana/pectina foram sugeridos como potencialmente capazes de promover a liberação colônica de vancomicina devido à sua habilidade de inchamento pH-dependente, às suas características mucoadesivas e sua degradação enzima-dependente. Pectinas e quitosana em associação também foram usadas com gama-orizanol, ciprofloxacino e antipsicóticos para fins distintos de liberação (LEE; KIM; LEE, 2009; LUPPI *et al.*, 2010; ORHAN *et al.*, 2006).

Micropartículas de pectina cítrica, alginato e quitosana em combinação contendo BSA como modelo de fármaco sustentaram efetivamente a liberação de BSA em pH 1,2 e pH 5,0. Em pHs mais próximos da neutralidade, a liberação aumentou consideravelmente, especialmente na presença de pectinases, sugerindo que este tipo de micropartículas tem potencial para liberação sítio-específica através da via oral (YU *et al.*, 2009).

Maestrelli *et al.* (2008) desenvolveram microesferas de pectinato de cálcio contendo teofilina com revestimento de Eudragit® S 100, que permitiu a manutenção da integridade das microesferas até a chegada ao cólon. Nos testes de liberação simulando a variação de pH do sistema gastrointestinal, os autores observaram que o uso de maiores quantidades de cálcio na reticulação com as pectinas (amidadas e não amidadas) reduziram a liberação de fármaco, mas o tipo de pectina não teve influência na liberação de fármaco. Usando 2,5% (m/v) de CaCl_2 para formação das microesferas de pectinato houve prevenção da liberação da teofilina em condições do ambiente gástrico e 100% de liberação foi alcançada no cólon em menos de 24 h.

Como as pectinas de OP não apresentaram um perfil de liberação de fármaco satisfatório para o propósito desejado são necessárias investigações mais detalhadas para seu uso em sistemas de liberação colônica de fármacos.

4.4.1.3 Análises reológicas

Análises reológicas permitem a caracterização de pectinas em soluções e géis, permitindo o fornecimento de dados importantes do ponto de vista tecnológico e de aplicabilidade (ENDRESS; DÖSCHL-VOLLE; DENGLE, 1996). Desta maneira, após a caracterização química, a fração OP foi submetida a análises reológicas.

Inicialmente, soluções aquosas de OP a 5% (m/m) foram avaliadas. Esta concentração foi empregada por ser a menor concentração empregada por MIN *et al.* (2011) em análises reológicas de frações pectínicas oriundas do bagaço da maçã. A curva de viscosidade e a varredura de frequência são mostradas na Figuras 16 e 17, respectivamente.

Na Figura 16, pode-se verificar que a fração apresentou baixa viscosidade inicial ($< 1\text{Pa.s}$), semelhantemente à solução de pectinas extraídas quimicamente do bagaço da maçã na mesma concentração (MIN *et al.*, 2011). Nota-se um comportamento pseudoplástico, com redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, como descrito para outras soluções de pectinas (EVAGELIOU; PTITCHKINA; MORRIS, 2005; HWANG; KOKINI, 1992; IAGHER;

REICHER; GANTER, 2002; MIN *et al.*, 2011; SENGKHAMPARN *et al.*, 2010; SINGTHONG *et al.*, 2005).

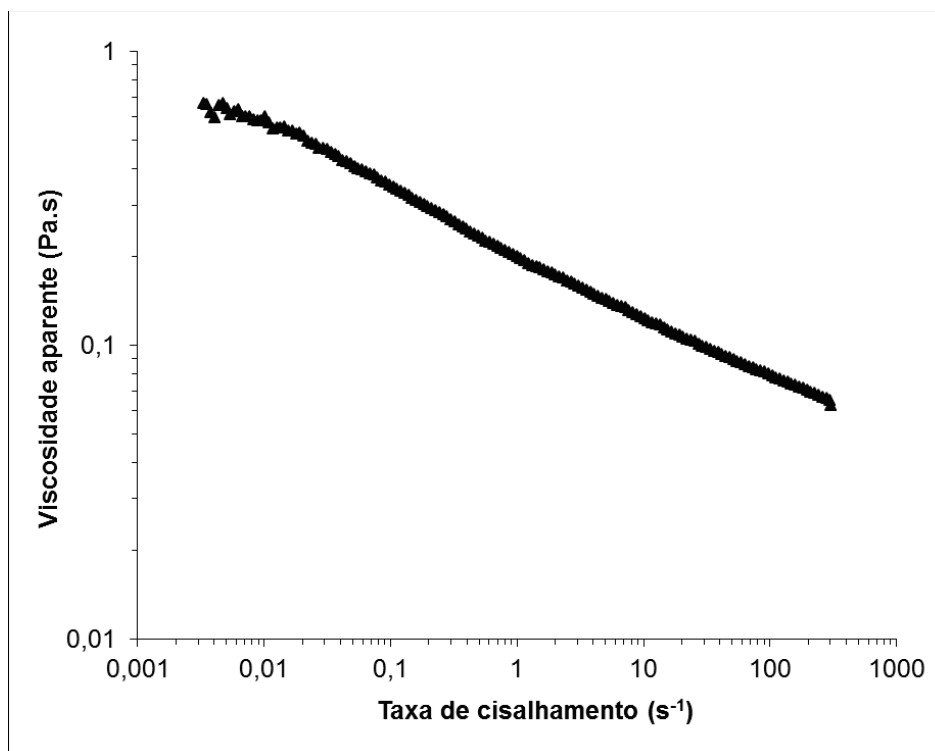


FIGURA 16 - INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DA SOLUÇÃO AQUOSA A 5% (M/M) DA PECTINA OTIMIZADA (OP) OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS

As propriedades viscoelásticas da solução de OP a 5% foram avaliadas por meio de varreduras de frequência (Figura 17), onde G' refere-se ao comportamento elástico (de sólidos) e G'' ao comportamento viscoso (de líquidos) durante o experimento oscilatório. Para OP a 5%, G'' foi superior a G' na faixa de frequência analisada, mostrando predomínio do caráter líquido, e o valor de ambos os módulos aumentou proporcionalmente com aumentos da frequência. Como citado por Min *et al.* (2011), por meio de uma varredura de frequência, as propriedades reológicas de um determinado material podem ser observadas em tempos longos (baixas frequências) e tempos curtos (alta frequência) (WROLSTAD *et al.*, 2005). Aparentemente, a solução de OP mostrou-se sensível a altas frequências de oscilação, sofrendo perturbações em frequências maiores que 2,8 Hz.

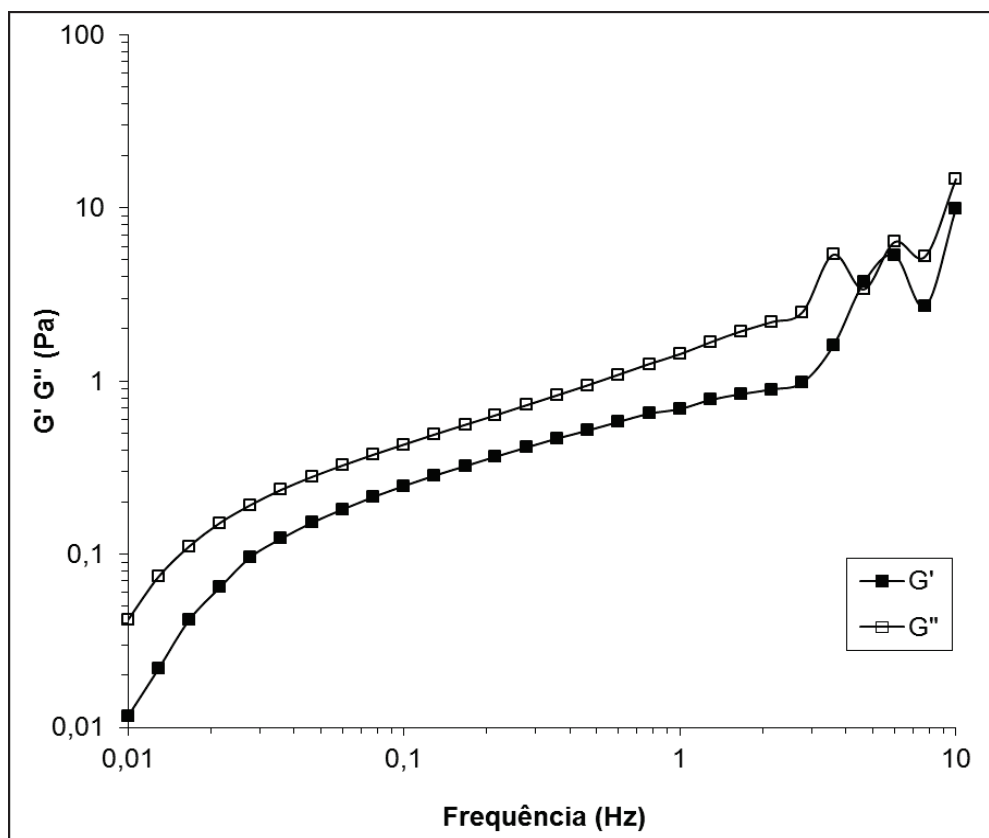


FIGURA 17 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA (25°C, γ : 0,07) DA SOLUÇÃO AQUOSA A 5% (M/M) DA PECTINA OTIMIZADA (OP) OBTIDA A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) POR EXTRAÇÃO COM ÁCIDO NÍTRICO EM CONDIÇÕES SELECIONADAS POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DE PECTINAS COM ELEVADO TEOR DE ÁCIDOS URÔNICOS

Depois de obtidos os dados reológicos para a solução polimérica de OP, estudou-se sua capacidade de formação de gel.

Observou-se que estudos envolvendo as propriedades gelificantes de pectinas HM com alto teor de acetil, como é o caso de OP (DA 17,1%), são escassos. Elevados teores de acetil são reconhecidos por alterar a solubilidade das pectinas e suas propriedades de gelificação (VORAGEN *et al.*, 1995; WILLATS *et al.*, 2001). Pilnik e Voragen (1992), citados por Iglesias e Lozano (2004), apontam um valor de 4% de acetil como sendo considerado o limite crítico para a formação de gel de pectinas.

Como OP continha pectinas HM (DE 56,6%) e não se sabia a influência que o seu alto teor de acetil (DA 17,1%) poderia ocasionar em sua gelificação, foram preparados géis nas condições necessárias para gelificação de pectinas HM, ou seja, pH ácido (2,5-3,3) e alta concentração de sacarose (60%), já que esta é o

principal co-soluto empregado em geleias e já se mostrou melhor do que outros co-solutos para formação de géis de pectinas HM comerciais (TSOGA; RICHARDSON; MORRIS, 2004).

Rolin e de Vries (1990) citaram que pHs muito baixos são críticos para a formação de gel de pectinas HM e que a gelificação não ocorre em pH superior a 3,5. Sharma, Liptay e Le Maguer (1998), ao estudar a gelificação de pectinas HM da polpa do tomate com diferentes concentrações de sacarose (50-70%) em pH variando de 2 a 5, observaram que houve formação de géis com 60% de sacarose em $\text{pH} < 3$. Assim como Evageliou, Richardson e Morris (2000), eles verificaram que a força dos géis aumentou com reduções no pH.

Portanto, soluções poliméricas de OP foram inicialmente preparadas a 1,32% GalA (m/m) com 60% de sacarose (m/m) em uma faixa de pH entre 2,5 e 3,3 para seleção de um pH adequado para os próximos experimentos.

A Figura 18 mostra as curvas de viscosidade obtidas. Verifica-se a redução da viscosidade com a elevação da taxa de cisalhamento, caracterizando um comportamento pseudoplástico para todas as amostras.

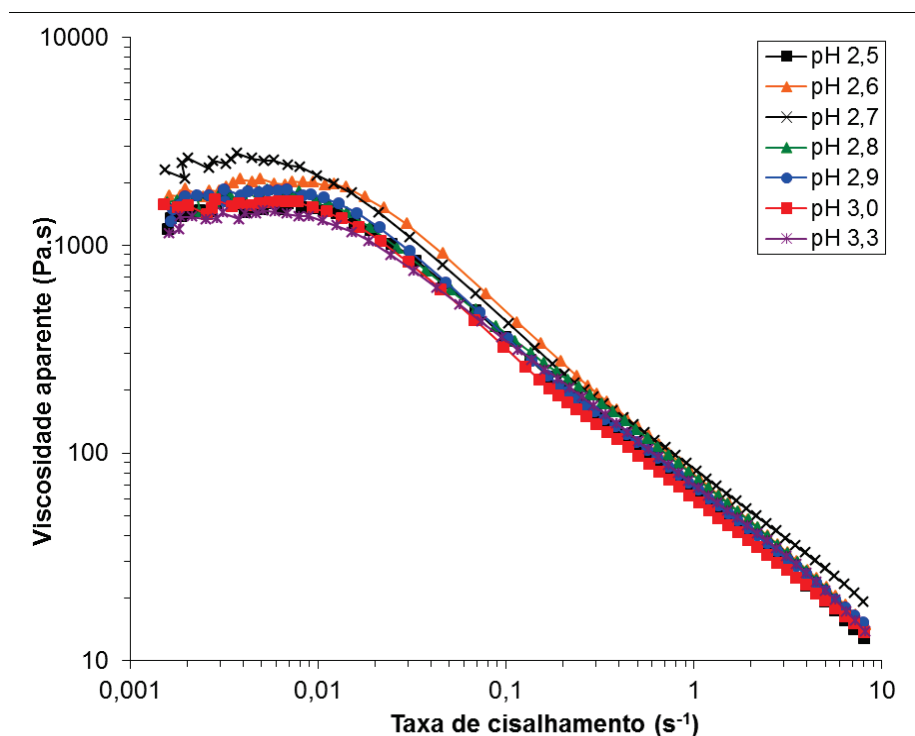


FIGURA 18 - INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DE AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) A 1,32% GalA (M/M) COM 60% SACAROSE (M/M) EM DIFERENTES pHs APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL

A amostra preparada em pH 2,7 apresentou valores de viscosidade acima das demais (Figura 18). Ao se observar a dependência da viscosidade em relação ao pH (Figura 19), é possível confirmar que o pH 2,7 foi o melhor em termos de viscosidade.

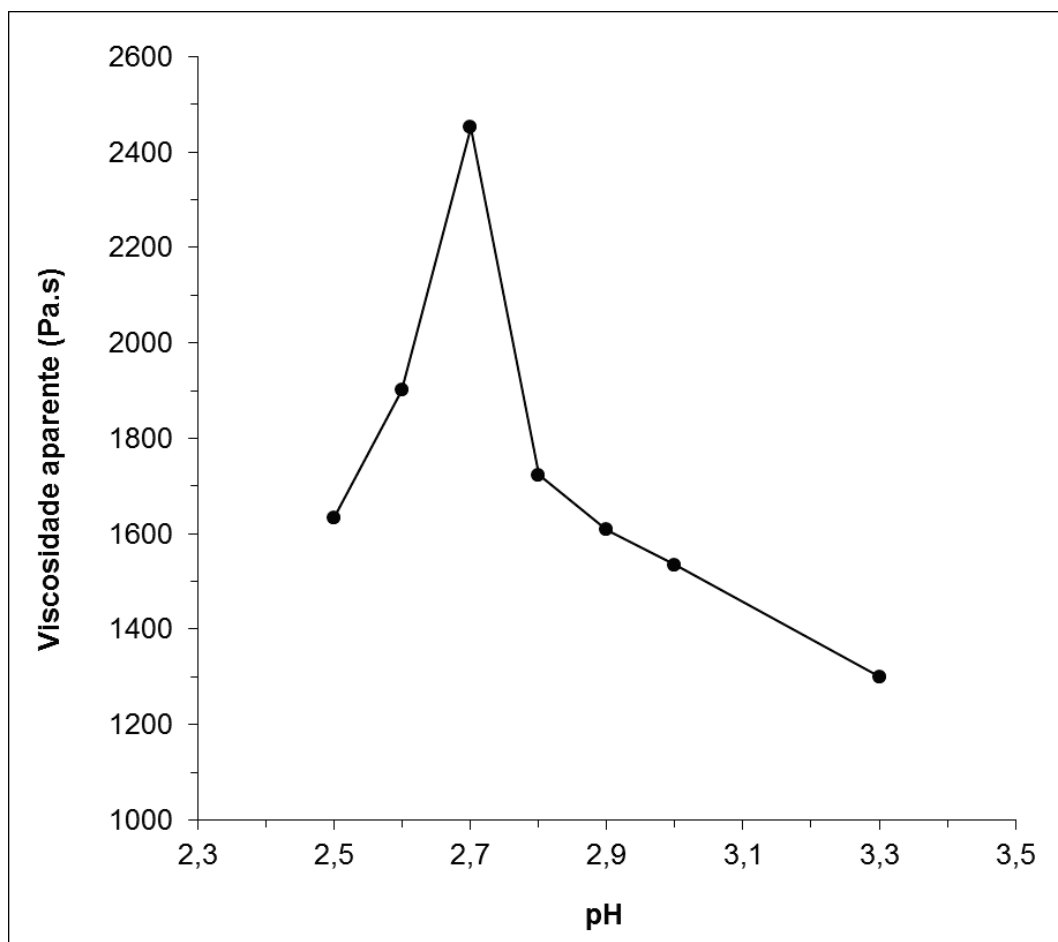


FIGURA 19 - DEPENDÊNCIA DA VISCOSIDADE APARENTE A $0,003 \text{ s}^{-1}$ (25°C) EM RELAÇÃO AO pH DE AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) A 1,32% GalA (M/M) NA PRESENÇA DE 60% DE SACAROSE (M/M) APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL

Além do comportamento de fluxo, foi estudado o comportamento viscoelástico de OP. A Figura 20A mostra o módulo elástico (G') das amostras de OP preparadas nos diferentes pHs, enquanto a Figura 20B exhibe os respectivos módulos viscosos (G''). Apesar de OP ter elevada proporção de grupos acetil, todas as amostras apresentaram $G' > G''$ ao longo da faixa de frequência analisada e G' foi menos dependente da frequência do que G'' , caracterizando a existência de géis. Em baixas frequências, o valor de G' é pelo menos 3 vezes maior que os valores correspondentes de G'' .

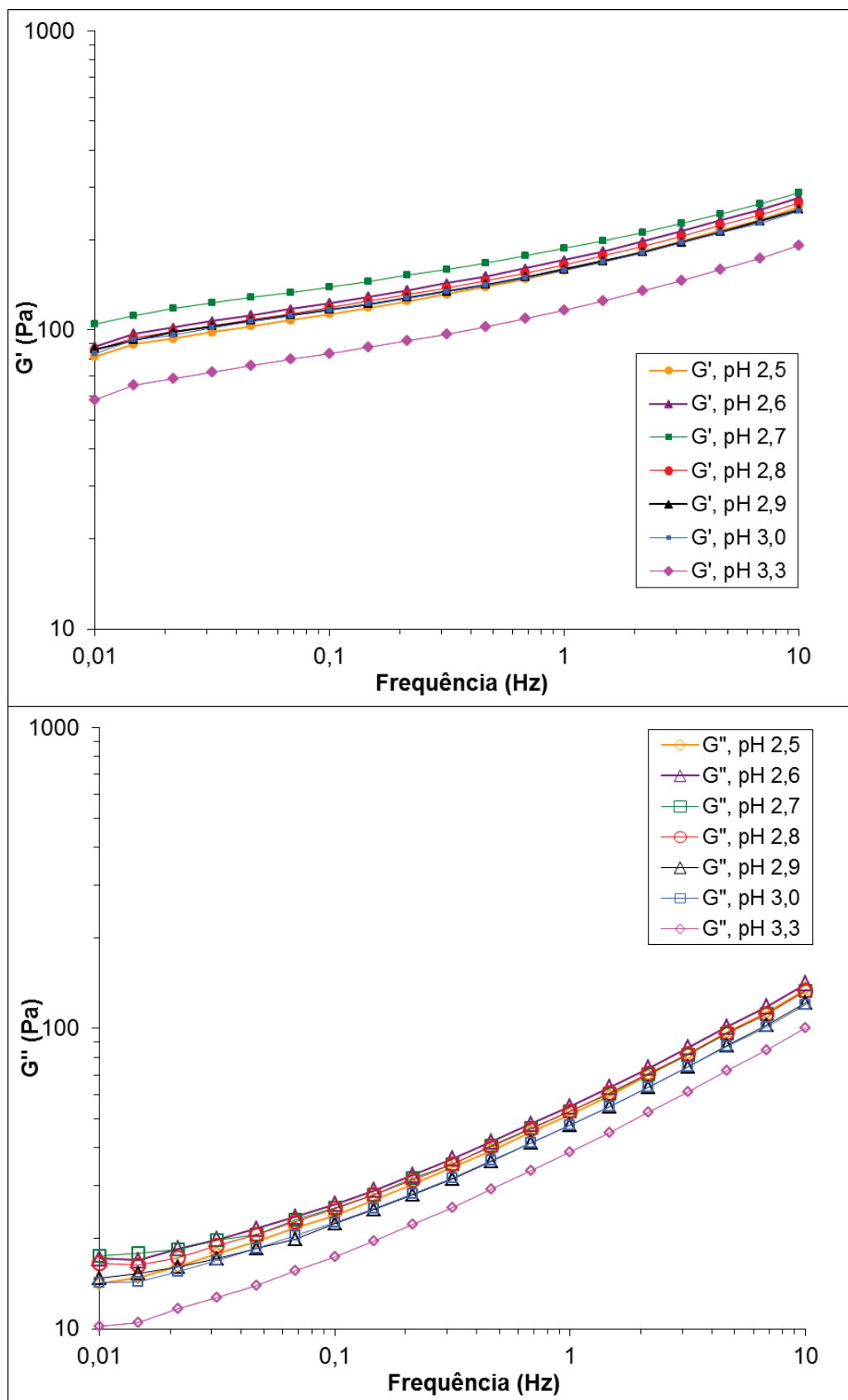


FIGURA 20 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA (25°C; γ : 0,0035-0,04) PARA AS AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) A 1,32% GalA (M/M) COM 60% DE SACAROSE (M/M) EM DIFERENTES pHs APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL. (A) MÓDULO ELÁSTICO (G') (B) MÓDULO VISCOSO (G'')

Quando se compara o comportamento viscoelástico dos géis preparados em diferentes pHs, assim como nas curvas de viscosidade, a amostra com pH 2,7 novamente se destaca entre as demais, pois o gel formado apresentou o maior valor de G' e também a maior diferença entre os módulos G' e G'' . Já a amostra preparada em pH 3,3 mostrou características opostas e as demais amostras apresentaram comportamento semelhante entre si. Estes resultados são melhor demonstrados na Figura 21, que apresenta os valores de G' e G'' na frequência fixa de 0,1 Hz em função do pH. É notável o predomínio de G' sobre G'' em todos os pHs estudados, como evidenciado para comportamento de gel. Um valor superior de G' é observado na amostra de pH 2,7 em relação às outras amostras, e sua magnitude decresce quando o pH é maior ou menor que este valor, dentro dos níveis estudados. Para o valor de G'' ocorre uma leve diferença com as mudanças no pH. A amostra com pH 3,3 mostrou a menor propriedade gelificante.

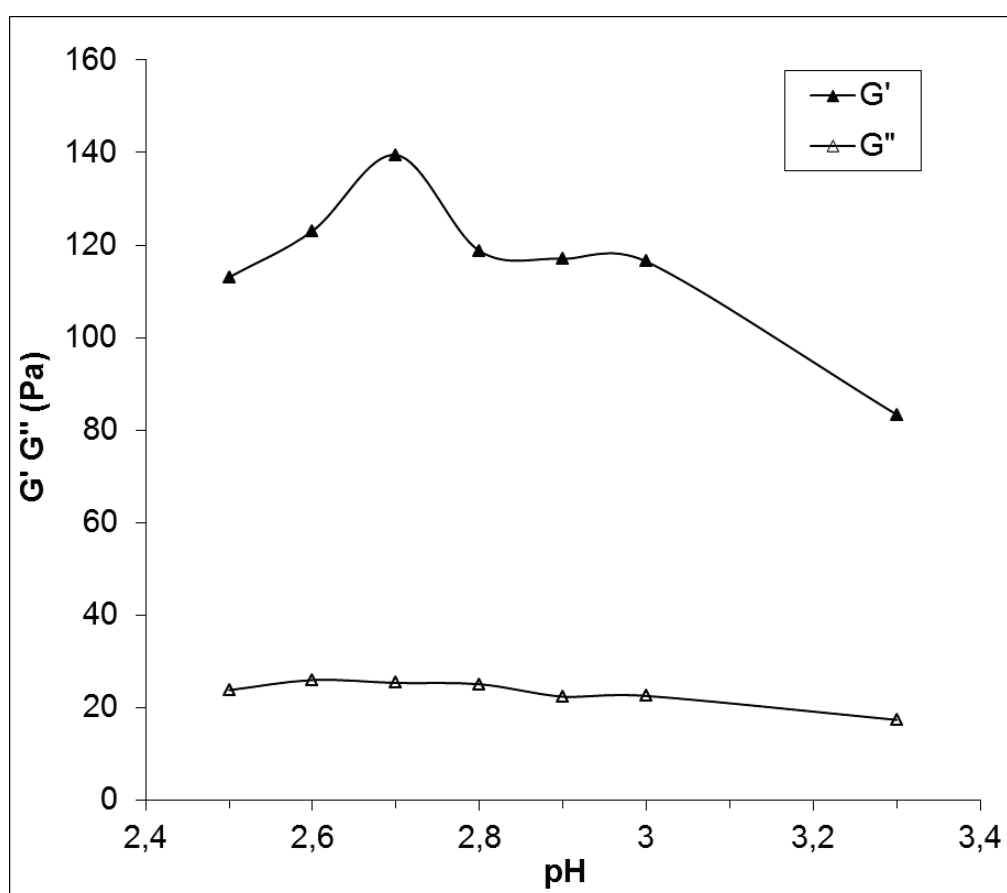


FIGURA 21 - DEPENDÊNCIA DE G' E G'' A 0,1 Hz (25°C) EM RELAÇÃO AO pH DAS AMOSTRAS DE PECTINA OTIMIZADA (OP) PREPARADA A 1,32% GalA (M/M) COM 60% DE SACAROSE (M/M) APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL

Evageliou, Richardson e Morris (2000) observaram que para uma amostra de pectinas HM (DE 70,3%) cuja formação de gel foi estudada em pH entre 3 e 4,7 na presença de 65% de sacarose, ambos os módulos G' e G'' diminuíram bruscamente quando o pH foi superior a 3,4, que é aproximadamente o pK_a das unidades de galacturonato do polímero.

Smit e Bryant (1986) observaram que pectinas de casca de limão com DE entre 65,9 e 73,7% apresentaram pouca diferença na gelificação em pH ~ 3 , com perda da habilidade de gelificação em maiores pHs. Pectinas com menor DE formaram géis mais fortes quando o pH foi diminuído (EL-NAWAWI; HEIKEL, 1997; SMIT; BRYANT, 1968). Para pectinas com DE 43,7%, a melhor capacidade de gelificação foi em pH 2,2 (SMIT; BRYANT, 1968), com DE 51%, o grau de gelificação foi maior em pH 2,5-2,3 e com DE 61%, os pHs 2,7 e 2,3 mostraram maior grau de gelificação, com muito pouca diferença em relação ao pH 2,5 (EL-NAWAWI; HEIKEL, 1997). Como as pectinas de OP apresentam DE 56,6%, os resultados obtidos estão de acordo com as observações citadas, pois o gel com comportamento mais elástico foi obtido em pH 2,7, seguido pelo pH 2,6 (Figura 21).

Após análises estatísticas usando ANOVA e teste-t ($p < 0,05$), o pH 2,7 foi selecionado para o preparo de géis das pectinas de OP com variação na concentração (0,33 a 1,98% GalA) e com teor fixo de 60% de sacarose, objetivando-se avaliar a influência causada por modificações no teor de pectinas empregado sobre a habilidade de formação de gel.

O efeito da concentração de pectina (0,33 a 1,98% GalA) sobre o comportamento de fluxo das amostras a 25°C pode ser observado na Figura 22, que mostra as curvas de viscosidade obtidas. Nota-se a presença de um perfil semelhante para as amostras. As viscosidades aparentes aumentaram com a concentração das amostras e houve redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, caracterizando um comportamento pseudoplástico dentro das condições empregadas.

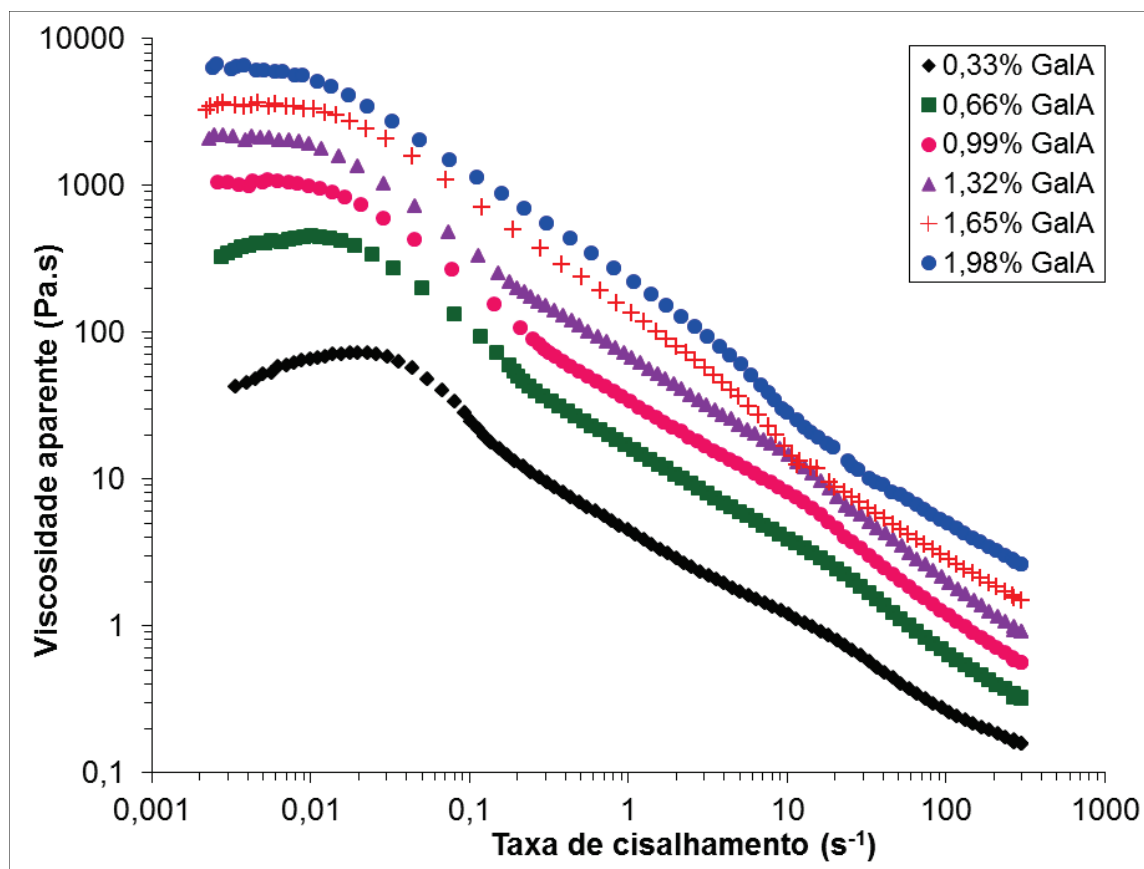


FIGURA 22 - INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DE AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) EM CONCENTRAÇÕES DE 0,33 A 1,98% GalA (M/M) NA PRESENÇA DE 60% DE SACAROSE EM pH 2,7 (M/M) APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL

Como evidenciado na Figura 22, houve diferença considerável entre os valores de viscosidade aparente das amostras, com as maiores diferenças observadas nas menores concentrações. Em uma taxa de cisalhamento de $0,03 \text{ s}^{-1}$, a amostra com maior concentração de OP (1,98% GalA) apresentou viscosidade aparente de 6127 Pa.s, enquanto que a amostra com a menor concentração de OP (0,33% GalA) mostrou um valor de 45 Pa.s, ou seja, uma diferença de seis vezes na concentração gerou uma diferença de aproximadamente 136 vezes na viscosidade aparente nesta taxa de cisalhamento.

O comportamento viscoelástico das amostras foi avaliado e está representado na Figura 23, que mostra a variação dos módulos elástico (G' , Figura 23A) e viscoso (G'' , Figura 23B) com a frequência a 25°C para as amostras de OP preparadas em pH 2,7, com 60% (m/m) de sacarose nas concentrações de 0,33 a 1,98% GalA.

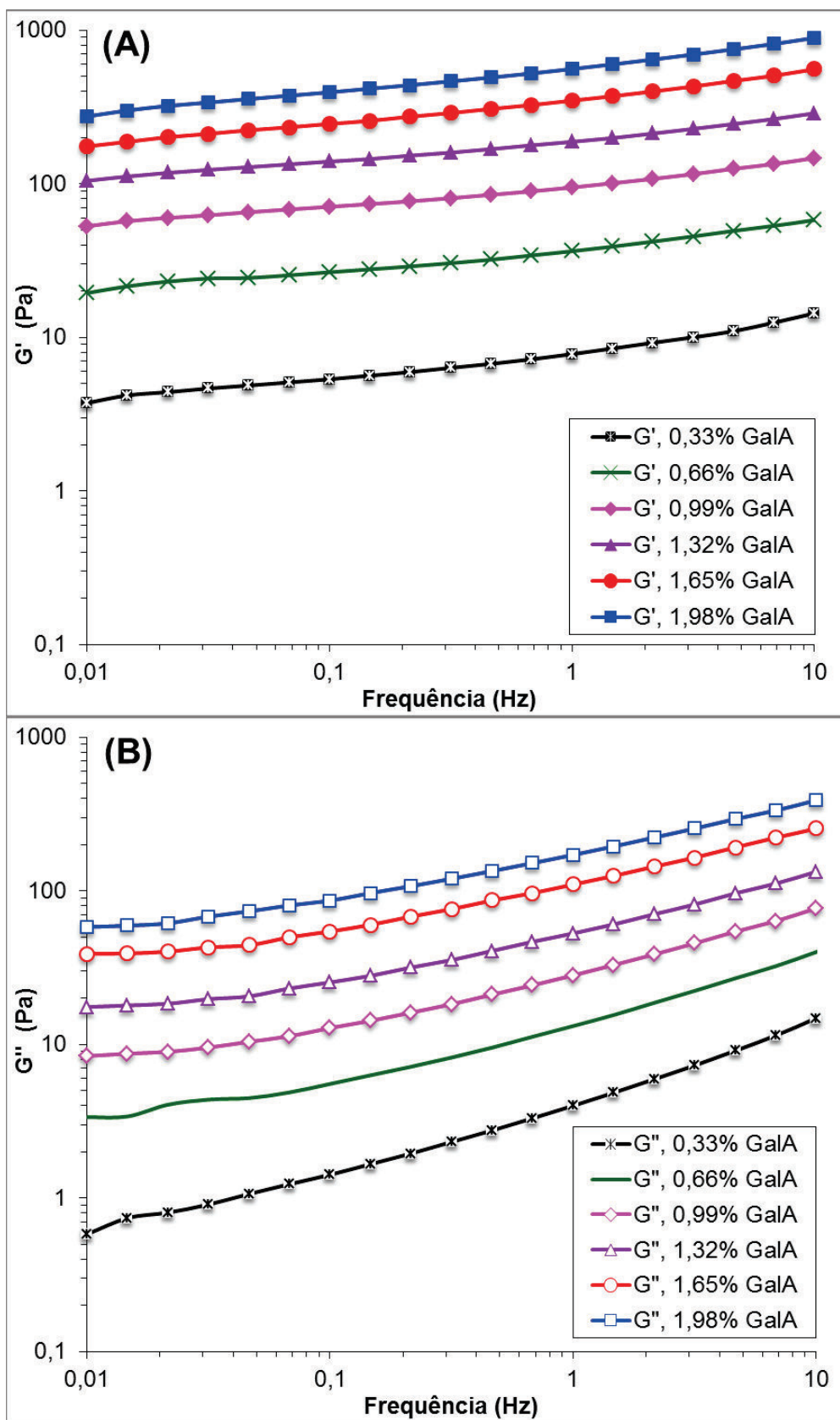


FIGURA 23 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA (25°C; γ : 0,001-0,05) DE AMOSTRAS DA PECTINA OTIMIZADA (OP) EM CONCENTRAÇÕES DE 0,33 A 1,98% GalA (M/M) NA PRESENÇA DE 60% DE SACAROSE (M/M) EM pH 2,7 APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL: (A) MÓDULO ELÁSTICO (G'); (B) MÓDULO VISCOSO (G'')

Embora as pectinas de OP tenham apresentado grau de acetilação de 17,1%, as varreduras de frequência mostraram a presença de géis em todas as concentrações analisadas (Figura 23A,B), com G' excedendo G'' ao longo da escala de frequência empregada e mostrando menos dependência da frequência do que G'' , evidenciando o predomínio da resposta sólida, como presente em uma rede elástica (ENDRESS; DÖSCHL-VOLLE; DENGLER, 1996; MORRIS, 2008). Ao expressar a dependência de G' com a frequência pela lei da potência $G' \propto f^p$, os valores obtidos para p variaram de 0,1448 a 0,1917 ($R^2 > 0,98$, dados não mostrados). De acordo com Brito *et al.* (2005), amostras que se comportam como soluções viscosas apresentam p próximo a 1, enquanto que amostras com comportamento elástico mostram p próximo a zero. Quando aplicado a OP, confirma-se que as amostras de OP nas diferentes concentrações tiveram um predomínio do caráter elástico, como presente em géis.

Pippen, McCready e Owens (1950) prepararam pectinas parcialmente acetiladas a partir de pectinas comerciais cítricas. Eles observaram que a presença de acetil inibiu a formação de gel com sacarose e ácido (65% sólidos) em amostras contendo cerca de 5% de acetil, enquanto que amostras com 3,5 a 4% de acetil formaram géis fracos após repouso de 1 a 4 semanas. Eles também verificaram que a porcentagem de acetil que impede a gelificação foi pouco influenciada pelo DE das pectinas e a remoção dos grupos acetil restaurou a habilidade gelificante quando restou 2,4% ou menos de acetil. Os mesmos autores estudaram a influência da remoção de grupos acetil de pectinas de beterraba e observaram que uma pectina capaz de formar gel foi produzida quando o teor de acetil foi inferior a 1%. Entretanto, os autores não detalham as condições empregadas para preparo dos géis, nem mesmo citam a realização de testes variando as condições extrínsecas como acidez ou teor de sacarose ou pectina para tentar a gelificação.

No presente trabalho, a fração OP, com DA 17,1% (ou 10,8% m/m da fração seca), apresentou capacidade gelificante até mesmo na menor concentração avaliada (0,33% GalA, m/m), diferentemente dos resultados de Pippen, McCready e Owens (1950). De acordo com Kravtchenko, Voragen e Pilnik (1992), que citam BeMiller (1986), DA menor que 12,5% não impede a gelificação de pectinas, mas provavelmente a acetilação influencia nas suas propriedades de gel. Um DA superior a este valor também permitiu a formação de géis para as pectinas da fração OP,

sugerindo que outros fatores moleculares podem estar auxiliando sua gelificação ou que o alto teor de acetil apenas modifica as características dos géis.

Além disso, é notável na Figura 23 que quanto maior a concentração de pectina, maior é a magnitude de G' (Figura 23A), mostrando a presença de géis mais fortes em maiores concentrações, como citado para outras pectinas (LÖFGREN; WALKENSTRÖM; HERMANSSON, 2002; PTITCHKINA *et al.*, 1994; SHARMA; LIPTAY; LE MAGUER, 1998; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010). Quando a concentração de pectina OP foi dobrada, G' aumentou aproximadamente 5 vezes e G'' aumentou cerca de 4 vezes. Um aumento de 6 vezes na concentração de OP (de 0,33 a 1,98 GalA%) resultou em um valor de G' cerca de 70 vezes superior, sugerindo a existência de mais zonas de junção reticuladas entre cadeias pécticas distintas em maiores concentrações.

Löfgren, Walkenström e Hermansson (2002) citaram que géis de pectinas HM são muito influenciados por mudanças na concentração. Para as pectinas HM de cítricos (DE 70%) estudadas por estes autores, ao se duplicar a concentração de 0,75% para 1,5%, os valores de G' aumentaram 3 vezes e os de G'' 4 vezes, com a presença de uma rede de gel mais densa em maior concentração de pectinas, mas com uma constituição preservada da estrutura da malha do gel.

A Figura 24 exibe a variação de G' em função das diferentes concentrações de OP a 0,1 Hz. A magnitude de G' aumentou com aumentos na concentração de GalA, evidenciando a presença de zonas de junção mais elásticas e G' dependeu da concentração de GalA seguindo a lei da potência $G' \propto C^{2,4}$, sendo a inclinação da reta obtida por esta relação o valor do expoente (2,4).

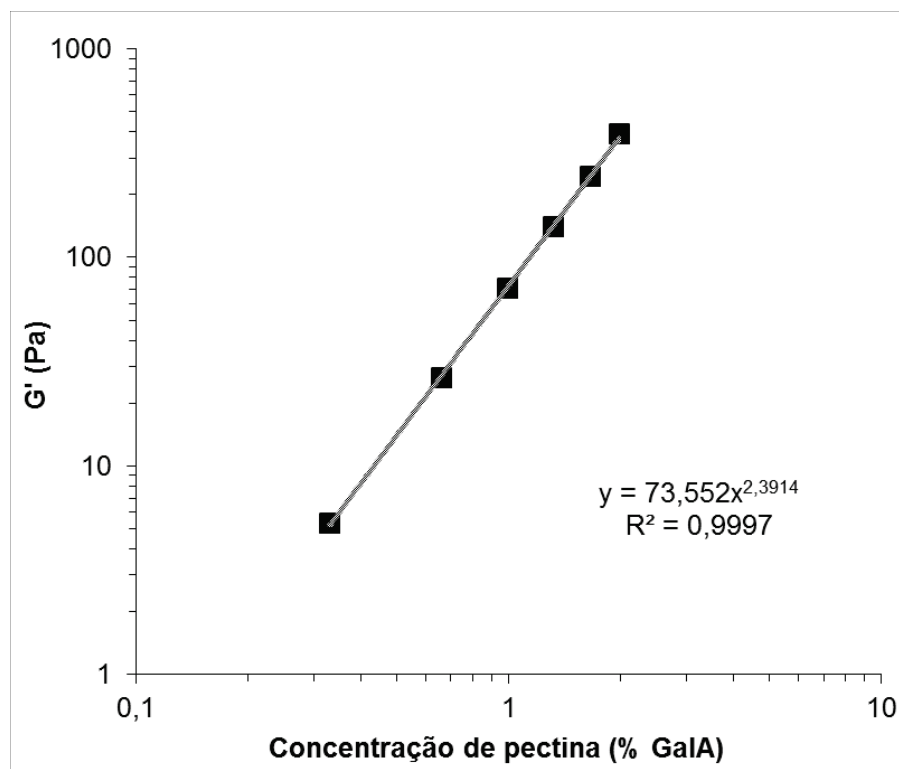


FIGURA 24 - MÓDULO ELÁSTICO (G') A 0,1 Hz (25°C) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PECTINA (% GalA) DOS GÉIS DE OP EM pH 2,7 CONTENDO 60% DE SACAROSE (M/M)

Morris (2008) declara que a constituição das junções intermoleculares em uma rede depende significativamente da estrutura do polímero, e esse tipo de gráfico (Figura 24) tem um padrão comum à maioria dos polissacarídeos que formam gel, com uma inclinação de 2 em elevadas concentrações, indicando uma dependência da $(\text{concentração})^2$ para a força do gel. De acordo com o autor, o valor da inclinação aumenta quando a concentração do polímero decresce em direção à concentração crítica mínima de gelificação (c^*), que é a menor concentração capaz de formar gel.

Comparando os resultados de comportamento viscoelástico obtidos para as pectinas HM altamente acetiladas de OP com amostras de pectinas HM oriundas de diferentes fontes preparadas sob pH ácido e alta concentração de sacarose (LÖFGREN; WALKENSTRÖM; HERMANSSON, 2002; PTITCHKINA *et al.*, 1994; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010), foi possível notar a presença de géis mais fracos para OP.

O alto teor de acetil é conhecido por levar a efeitos negativos na gelificação de pectinas (MATTHEW *et al.*, 1990; MCCREADY, 1966; OOSTERVELD *et al.*, 2000; PILNIK; VORAGEN, 1992; PIPPEN; MCCREADY; OWENS, 1950; VORAGEN *et al.*, 1995; WILLATS *et al.*, 2001) e pode estar influenciando as características dos

géis de OP. Entretanto, não apenas o grau de acetilação, mas também outros aspectos relacionados com as moléculas das pectinas podem estar envolvidas nesta diferença, como massa molecular, presença de cadeias laterais, grau de esterificação (DE) e distribuição de cargas pela cadeia principal (AXELOS; THIBAUT, 1991; ROLIN, 1993).

A força de géis de pectinas depende positivamente da massa molecular: se esta for muito baixa, as pectinas não formam gel em qualquer condição, mas com o aumento da massa molecular há gelificação e aumento da força do gel (O'DONOGHUE; SOMERFIELD, 2008; PAGÁN; IBARZ, 1999). A baixa massa molecular é considerada um dos fatores envolvidos na fraca propriedade gelificante de pectinas de beterraba (MICHEL *et al.*, 1985; PHATAK; CHANG; BROWN, 1988; PILNIK; VORAGEN, 1992; THIBAUT, 1986). Entretanto, esse não é o caso dos géis das pectinas de OP, pois a análise por HPSEC mostrou a presença de polímeros de massa molecular elevada.

É descrito que a presença e distribuição de unidades de α -1,2 ramnopiranosose (que pode ter cadeias laterais em O-4) intercalando a cadeia galacturônica principal pode causar torções, limitando o tamanho das zonas de junção nos géis de pectina e algumas vezes interrompendo as zonas de junção (REES; WIGHT, 1971; WALKINSHAW; ARNOTT, 1981). Este fator pode estar perturbando a formação de géis de OP nas condições testadas para gelificação de pectinas HM (10,0% Rha, Tabela 14).

A presença, tamanho e distribuição de cadeias laterais nas pectinas podem interferir em sua gelificação, já que a formação de zonas de junção ocorre nas regiões lisas (*smooth region*) das moléculas (HWANG; PYUN; KOKINI, 1993; KEENAN *et al.*, 1985; MATTHEW *et al.*, 1990; SCHMELTER *et al.*, 2002; THIBAUT; GUILLON; ROMBOUTS, 1991, THIBAUT; RALET, 2001). Schmelter *et al.* (2002) observaram que pectinas com cadeias laterais curtas mostraram melhores propriedades de gelificação que aquelas com cadeias laterais mais compridas. Entretanto, as dimensões das cadeias laterais devem ser suficientes para fornecer mais entrelaçamentos na rede polimérica do que aqueles dos polímeros lineares com massa molecular semelhante, visto que a cadeia principal de polímeros ramificados é mais curta do que a de polímeros lineares de mesma massa (SCHMELTER *et al.*, 2002). Foi relatado que as cadeias laterais de açúcares neutros poderiam estar diretamente envolvidas no mecanismo de formação de gel

de pectinas de um tipo de abóbora (PTITCHKINA *et al.*, 1994), enquanto que para pectinas de abóbora extraídas com ácido cítrico, o comprimento longo da cadeia principal pode ter contornado a interferência das cadeias laterais em sua gelificação em soluções ácidas com elevado teor de sacarose (O'DONOGHUE; SOMERFIELD, 2008).

As cadeias laterais neutras de OP poderiam estar afetando a gelificação se forem muito longas ou muito curtas. No primeiro caso, ocorre um impedimento espacial da interação entre moléculas diferentes e no segundo, a pectina é mais compacta que o respectivo polímero linear. Contudo, a presença de Rha e regiões de ramificação com açúcares neutros podem também estar prevenindo fenômenos indesejáveis nos géis. Thibault e Ralet (2008) comentaram que estes constituintes são supostamente elementos estruturais que agem como “finalizadores” de zonas de junção, e podem evitar turbidez, precipitação ou sinérese em géis ácidos com 55-65% de sacarose.

Além disso, o DE e a distribuição das unidades de GalA metil-esterificadas na cadeia péctica (aleatória ou em blocos) afetam suas propriedades de agregação e formação de redes intermoleculares (POWELL *et al.*, 1982; STRÖM *et al.*, 2007; THIBAUT; RINAUDO, 1986; WILLATS *et al.*, 2001). Esses fatores podem ser responsáveis pelas características dos géis de OP em meio ácido na presença de sacarose.

Por comparações da capacidade de gelificação de pectinas com diferentes DEs, tem-se sugerido que os grupos metil, além de reduzir a densidade de cargas ao longo da cadeia polimérica, também contribuem na associação intermolecular (MORRIS *et al.*, 1980). Assim, a viscosidade aumenta com o DE e uma redução na força do gel ocorre em menores DEs, onde uma maior repulsão eletrostática está presente e há menos grupos éster que contribuem para a estabilidade das junções intermoleculares (MORRIS *et al.*, 1980; WALKINSHAW; ARNOTT, 1981).

Neidhart, Hannak e Gierschner (2003) verificaram que distribuições distintas dos grupos éster entre as moléculas de pectina afetam fortemente suas propriedades de formação de gel, com diferenças evidentes em moléculas contendo teores similares de ácidos urônicos e grupos metil (O'DONOGHUE; SOMERFIELD, 2008).

Adicionalmente, o grau de polimerização (DP) das pectinas é outro fator importante para a força dos géis. Se as cadeias forem longas, um número maior de

zonas de junção pode ser formado, o que aumenta o grau de ligação e, portanto, a força total do gel. Contrariamente, a despolimerização das cadeias de pectinas tem um efeito negativo na força dos géis e pode dificultar a gelificação (FRAEYE *et al.*, 2010).

Além dos fatores intrínsecos discutidos acima, fatores extrínsecos como alto teor de cinzas e elevada força iônica das soluções de pectinas podem afetar negativamente suas propriedades gelificantes (YAPO, 2009b).

Até então, pectinas naturalmente ricas em acetil e açúcares neutros e/ou apresentando massa molecular baixa, como aquelas extraídas da chicória, da abobrinha e de subprodutos da beterraba (YAPO, 2009b) foram descritas apresentar propriedades gelificantes deficientes. Para as pectinas de OP obtidas da casca dos frutos do cacau, a formação de gel em baixo pH (2,5-3,3) e alto teor de sacarose (60%) não foi impedida, apesar de seu alto grau de acetilação.

4.4.2 Demais frações pécticas obtidas da casca dos frutos do cacau

Quatro frações adicionais de pectinas foram obtidas e analisadas neste trabalho. Como descrito previamente, as extrações nas condições satisfatórias para elevado rendimento com ácido cítrico (solução aquosa de ácido cítrico em pH 3/95°C/95 min) originaram a fração CA-HYP (*citric acid high yield pectin* ou pectina de alto rendimento usando ácido cítrico). As extrações nas condições satisfatórias para elevado rendimento com ácido nítrico (solução aquosa de ácido nítrico em pH 3,5/100°C/30 min) originaram a fração NA-HYP (*nitric acid high yield pectin* ou pectina de alto rendimento usando ácido nítrico). As extrações aquosas a quente originaram as frações 50W (*50°C water* ou fração de pectina hidrossolúvel a 50°C) e BW (*boiling water* ou fração de pectina hidrossolúvel sob fervura).

Estas frações foram caracterizadas quimicamente e reologicamente, e os resultados estão apresentados a seguir.

4.4.2.1 Rendimento e composição

Os rendimentos experimentais (% CPHF desidratado) das frações 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP estão mostrados na Figura 25, em comparação com a pectina otimizada (OP) já descrita.

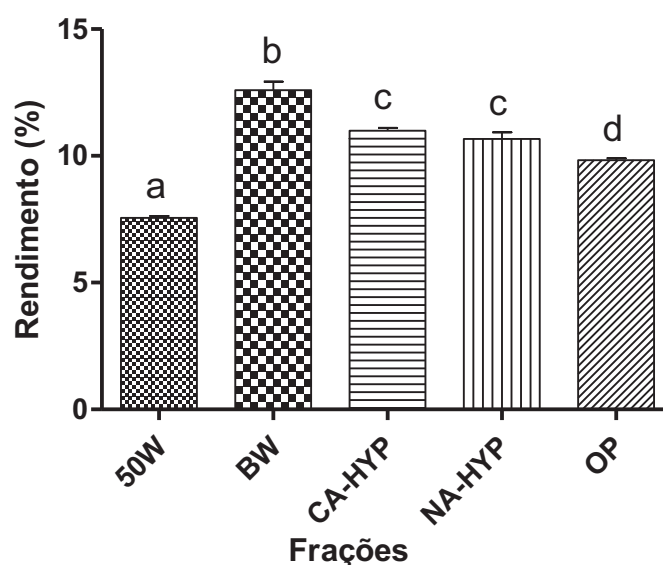


FIGURA 25 - RENDIMENTO EXPERIMENTAL DAS FRAÇÕES PÉCTICAS OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF) EM RELAÇÃO À CPHF DESIDRATADA

NOTA: 50W: fração de pectina hidrossolúvel a 50°C; BW: fração de pectina hidrossolúvel sob fervura; CA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido cítrico; NA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido nítrico; OP: pectina otimizada.

Foi realizado o teste estatístico One-way ANOVA seguido de Bonferroni e os dados estão representados pelas médias das extrações $\pm$ EPM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores ($p < 0,0001$).

Pectinas obtidas das cascas dos frutos do cacau por outros pesquisadores tiveram rendimentos variando entre 2 e 11% (ADOMAKO, 1972; BARAZARTE; SANGRONIS; UNAI, 2008; WHISTLER; MASAK JR; PLUNKETT, 1956) usando diferentes agentes extratores. Na Figura 25, observam-se rendimentos entre 7,5 e 12,6%. A amostra que apresentou maior rendimento gravimétrico em relação à CPHF foi a fração BW e o oposto foi observado para a fração 50W. As frações CA-HYP e NA-HYP, obtidas com ácido orgânico e mineral, respectivamente, não

apresentaram diferença estatisticamente significativa no valor do rendimento.

As pectinas extraídas com água a partir da beterraba mostraram baixo rendimento (0,5%) e as extrações ácidas efetuadas renderam amostras com rendimento entre 2 e 35% (LEVIGNE; RALET; THIBAUT, 2002). Whistler, Masak Jr e Plunkett (1956) extraíram polissacarídeos hidrossolúveis da casca de frutos maduros de cacau em um rendimento de 2% do fruto total desidratado.

Attri e Maini (1996) extraíram pectinas das cascas de uma variedade indígena de limão com diferentes ácidos orgânicos (ácido tartárico e cítrico) e minerais (ácido clorídrico e nítrico) e observaram que os ácidos minerais levaram a maiores rendimentos, alcançando 15,3% com HCl. Em contraste, Kliemann *et al.* (2009) extraíram pectinas da casca do maracujá com ácido cítrico, clorídrico e nítrico, e verificaram que o ácido cítrico foi o melhor para a extração de pectinas desta fonte. Dependendo das condições de extração empregadas, o ácido cítrico levou a um rendimento de duas a quatro vezes superior ao dos ácidos minerais, com rendimentos alcançando >60% com o ácido cítrico, enquanto que com os ácidos clorídrico e nítrico este não passou de 30% (KLIEMANN *et al.*, 2009). Virk e Sogi (2004) extraíram pectinas da casca da maçã com HCl e ácido cítrico e o ácido cítrico também foi mais efetivo que o HCl em termos de rendimento (3,1 x 2,2%, respectivamente, em relação às cascas frescas de maçã). Neste trabalho, não foi observada diferença significativa entre o rendimento gravimétrico das pectinas extraídas com ácido cítrico e nítrico, possivelmente devido às condições de extração serem semelhantes, especialmente em relação à temperatura e ao pH ou ainda devido às características do material de partida.

Os valores numéricos do rendimento estão mostrados na Tabela 16, juntamente com teor de carboidratos, proteínas e fenólicos.

Em geral, todas as frações foram diferentes de OP, exceto BW quanto ao teor de proteínas.

As frações obtidas nas condições otimizadas de rendimento apresentaram boa correlação com os valores previstos. Para a fração CA-HYP, o valor esperado era de 9,8% em relação à CPHF desidratada e o valor obtido foi de 11,0%; e para a fração NA-HYP, o valor estimado era de 10,9% em relação à CPHF e o rendimento obtido foi de 10,7%. Desta forma, os rendimentos obtidos alcançam as quantidades de pectinas extraídas do bagaço da maçã (10-15%; ROLIN, 1993).

TABELA 16 - RENDIMENTO, TEOR DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E FENÓLICOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

FRAÇÃO	Rendimento [#]	Carboidratos totais [*]	Proteínas ^{**}	Fenólicos ^{***}
	%			
50W	7,5±0,08 ^a	55,8±0,56 ^a	9,6±0,17 ^a	9,8±0,06 ^a
BW	12,6±0,32 ^b	51,9±0,35 ^b	5,5±0,11 ^{bd}	8,3±0,11 ^b
CA-HYP	11,0±0,10 ^c	64,0±0,35 ^c	13,8±0,81 ^c	9,4±0,06 ^{ac}
NA-HYP	10,7±0,26 ^c	60,8±0,58 ^d	14,7±0,69 ^c	9,9±0,01 ^{ac}
OP	9,8±0,08 ^d	69,9±0,69 ^e	3,6±1,04 ^{bd}	3,9±0,35 ^d

[#]: em relação à CPHF desidratado.

^{*}: determinado por método colorimétrico, Dubois *et al*, 1956.

^{**}: determinado por método colorimétrico, Bradford, 1976.

^{***}: determinado por método colorimétrico, Singleton; Rossi, 1965; resultado expresso como % ácido gálico em relação à amostra.

Foi realizado o teste estatístico One-way ANOVA seguido de Bonferroni e os valores estão representados pelas médias ± EPM. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

Os teores de carboidratos variaram de 52 a 64%, sendo diferentes entre si e também da fração OP (69,9%). As frações obtidas com ácido como agente extrator foram mais ricas em carboidratos e apresentaram teores semelhantes de proteínas e fenólicos. As frações hidrossolúveis foram diferentes entre si quanto ao teor de carboidratos e proteínas e também em relação às frações ácidas, apresentando menor quantidade destes componentes, mas foram semelhantes às pectinas hidrossolúveis obtidas a partir da polpa do cupuaçu (55-61%, VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009), que pertence ao mesmo gênero do cacau (*Theobroma*, Família Sterculiaceae).

Compostos fenólicos foram co-extraídos com os carboidratos em todas as frações. Na parede celular vegetal, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico podem estar ligados às pectinas de dicotiledôneas através de ligações éster (FAULDS; WILLIAMSON, 1999). Polímeros pécticos com ácido ferúlico foram encontrados na beterraba (GUILLON; THIBAUT, 1989; ROMBOUTS; THIBAUT, 1986), no espinafre (FRY, 1982) e na quinoa (RENARD; WENDE; BOOTH, 1999), sendo este ligado nas cadeias laterais neutras dos segmentos de RG-I. A presença de compostos fenólicos nas frações obtidas de CPHF poderiam aumentar seus benefícios se utilizadas na dieta, uma vez que são compostos bioativos.

A composição monossacarídica das frações é mostrada na Tabela 17,

juntamente com o grau de esterificação e o grau de acetilação. A composição qualitativa é semelhante entre as frações: há um predomínio de ácidos urônicos com quantidades consideráveis de Rha e Gal, encontradas em maiores proporções que os outros monossacarídeos, além da presença de Ara, evidenciando a presença de pectinas. Composições monossacarídicas similares foram encontradas em pectinas da polpa da beterraba (MORRIS; RALET, 2012), cascas da variedade *Améliorée* de manga (KOUBALA *et al.*, 2008a) e quiabo (SENGKHAMPARN *et al.*, 2009).

As frações aquosas (50W e BW) apresentaram menor teor de ácidos urônicos do que as frações obtidas com ácidos (~45% e ~60-65%, respectivamente). Além disso, 50W apresentou Rha em proporção superior em relação às outras frações, sugerindo a presença de mais segmentos de ramnagalacturonanas. As frações obtidas por extração ácida não diferiram entre si quanto à composição monossacarídica, exceto para um teor um pouco menor de Rha para CA-HYP.

Os monossacarídeos Glc, Xyl e Man também foram encontrados em pequena quantidade em todas as frações. A presença de amido foi descartada pelo teste de lugol negativo.

Os resultados para os graus de esterificação e de acetilação indicados na Tabela 17, mostram que, diferentemente da maioria das pectinas nativas, as frações 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP contêm pectinas de baixo grau de esterificação (LM: DE<50%) e alto teor de acetilação (DA: 16-29%), assim como as pectinas obtidas da polpa de beterraba (YAPO *et al.*, 2007b) e do quiabo (SENGKHAMPARN *et al.*, 2009).

A fração 50W diferiu quantitativamente de todas as outras em relação ao DE e DA, apresentando o menor DE (37,3%) e o maior DA (29%). As frações BW, CA-HYP e NA-HYP apresentaram DEs semelhantes (~41%) e o valor de DA foi similar entre BW e NA-HYP e entre CA-HYP e NA-HYP. Mais uma vez se evidenciou que as pectinas obtidas com dois ácidos de natureza distinta visando maior rendimento foram bastante semelhantes quimicamente entre si, mas diferiram em relação à pectina otimizada (OP) especialmente em relação ao DE, pois esta última teve DE>50%, caracterizando pectinas HM.

TABELA 17 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA*, GRAU DE ACETILAÇÃO E GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

FRAÇÃO	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác. Urônicos [#]	DE ^{**}	DA ^{***}
	%							%	
50W	21,4±3,90 ^a	4,6±0,40 ^a	1,8±0,05 ^a	0,8±0,15 ^a	21,7±3,40 ^a	4,5±0,80 ^c	45,1±2,42 ^a	37,3±0,66 ^a	29,0±0,58 ^a
BW	14,4±0,80 ^d	5,0±0,40 ^a	1,9±0,01 ^a	3,0±0,15 ^a	25,4±1,10 ^a	5,6±0,25 ^a	44,6±1,62 ^a	42,6±0,17 ^b	19,2±0,40 ^b
CA-HYP	8,2±1,33 ^b	1,9±0,58 ^a	1,4±1,08 ^a	2,6±1,01 ^a	16,7±1,10 ^a	4,1±0,34 ^c	65,1 ± 0,46 ^b	40,3±0,40 ^b	15,9±0,17 ^c
NA-HYP	11,6±0,89 ^d	1,7±0,13 ^a	0,5±0,03 ^a	1,8±0,01 ^a	20,3±0,25 ^a	4,9±0,73 ^c	59,2±0,35 ^b	41,0±0,46 ^b	17,6±0,35 ^{bc}
OP	10,0±0,74 ^c	2,7±0,80 ^a	0,7±0,26 ^a	1,0±0,22 ^a	16,8±0,58 ^a	2,8± 0,20 ^b	66,0±1,27 ^{bc}	56,6±0,81 ^c	17,1±0,29 ^{cd}

*: determinada por GLC, em triplicata, mol%.

#: determinados por dosagem colorimétrica, Filisetti-Cozzi; Carpita, 1991.

**: determinado por FT-IR, Vriesmann; Petkowicz, 2009.

***: determinado por dosagem colorimétrica, Hestrin, 1949.

Foi realizado o teste estatístico One-way ANOVA seguido de Bonferroni e os valores estão representados pelas médias ± EPM. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores (p<0,05).

De acordo com Yapó (2011), as homogalacturonanas HM normalmente são encontradas ao longo da parede celular vegetal e as homogalacturonanas LM estão situadas nos cantos das células, em torno de espaços de ar e na lamela média, onde formam géis com íons cálcio, associando paredes celulares adjacentes e auxiliando na adesão celular, além de realizar outras funções mecânicas e de permeabilidade na parede celular (YAPO, 2011).

Além disso, as cascas empregadas para extração de pectinas pertenciam a frutos maduros de cacau, e atividades de metilesterases são descritas durante diferentes estágios de maturação, originando pectinas parcialmente desesterificadas (ALI; CHIN; LAZAN, 2004; ARANCIBIA; MOTSENBOCKER, 2006; ASSIS; LIMA; OLIVEIRA, 2001; BARNAVON *et al.*, 2001; DEYTIEUX-BELLEAU *et al.*, 2008; DRAYE; VAN CUTSEM, 2008; EL-ZOGHBY, 1994; PAULL; GROSS; QIU, 1999).

Parece que as extrações aquosas e com ácido cítrico ou nítrico em condições mais brandas (frações compostas de pectinas LM), foram capazes de remover as pectinas que são liberadas mais facilmente, como aquelas presentes na lamela média ou menos ancoradas à parede celular vegetal dos frutos do cacau. Assim, os dados de composição das frações 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP indicaram a presença de pectinas LM, com elevado DA, contendo segmentos de ramnogalacturonanas com cadeias laterais de galactanas, ou arabinogalactanas em menor proporção.

Estas amostras de pectina foram avaliadas quanto ao seu perfil de eluição por HPSEC MALLS/RI (Figura 26A e 26B). Assim como OP, as demais frações de pectina obtidas a partir de CPHF mostraram um perfil de eluição multimodal quando analisadas pelo RI (Figura 26B), com a diferença de que houve predomínio de moléculas com maior tempo de eluição (menor massa molecular) para a fração OP.

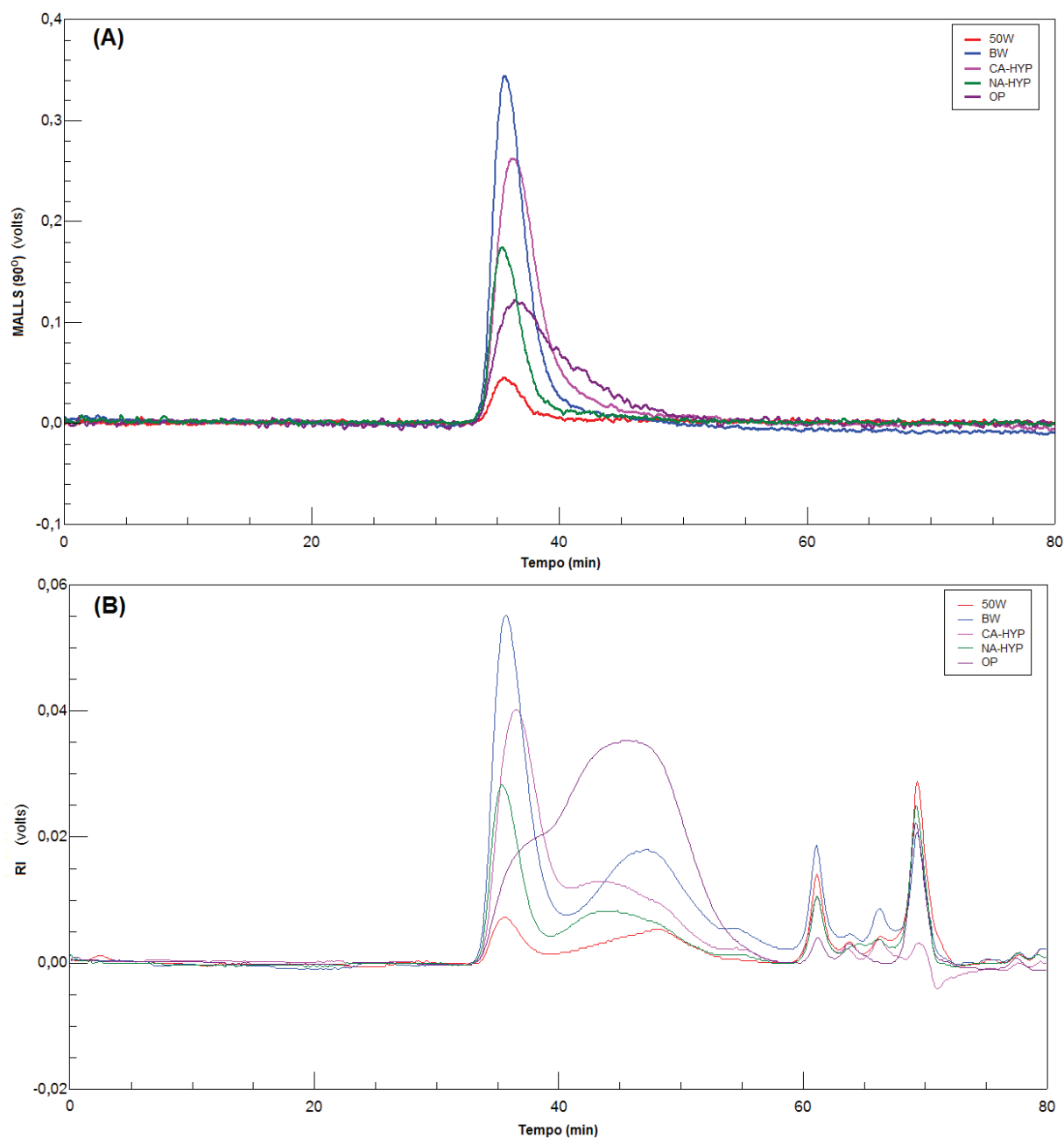


FIGURA 26 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC (25°C) DAS FRAÇÕES 50W, BW, CA-HYP, NA-HYP E OP OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF): (A) MALLS (90°); (B) RI

NOTA: 50W: fração de pectina hidrossolúvel a 50°C; BW: fração de pectina hidrossolúvel sob fervura; CA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido cítrico; NA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido nítrico; OP: pectina otimizada.

Os perfis de eluição de 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP apresentam similaridades, provavelmente devido à presença de moléculas um tanto semelhantes quimicamente, como discutido anteriormente, englobando polissacarídeos ácidos e neutros, proteínas e compostos fenólicos. Na Figura 26 evidencia-se um pico principal eluindo em aproximadamente 37-38 min para todas as amostras e que foi

detectado em alta intensidade pelo espalhamento de luz (MALLS), indicando a presença de um componente de alta massa molecular, provavelmente os polissacarídeos ácidos das frações. Outros picos foram detectados com menos intensidade pelo detector RI após 40 minutos de eluição, mostrando que famílias de polímeros de menor massa molecular estão presentes em menor proporção.

Após 50 minutos de eluição, houve detecção de sinais por UV a 280 nm (dados não mostrados), provavelmente oriunda dos anéis aromáticos de compostos fenólicos e certos aminoácidos das proteínas presentes nas frações, sugerindo que estes compostos parecem ser os de menor massa molecular das frações, com maiores tempos de eluição.

As estruturas químicas das pectinas das frações 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP foram investigadas por ^{13}C RMN e seus espectros estão mostrados na Figura 27, juntamente com a fração OP. Os espectros mostraram-se complexos e os sinais detectados foram semelhantes àqueles obtidos para a fração OP, já discutida anteriormente, mas com sinais mais evidentes de carbonos aromáticos (δ 114-160 ppm; WAWER; WOLNIAK; PARADOWSKA, 2006), provavelmente devido ao maior teor de compostos fenólicos nestas frações. Na pectina da beterraba, o ácido ferúlico foi encontrado nas regiões de ramnogalacturonanas, esterificado na posição O-2 de unidades de Ara ligadas (1 $\rightarrow$ 5) e na posição O-6 de unidades de Gal ligadas (1 $\rightarrow$ 4) (OOSTERVELD *et al.*, 2001).

Os sinais correspondentes ao C-1 das unidades de α -D-GalA livres e metil-esterificadas das homogalacturonanas apareceram em torno de 99,2 e 100,0 ppm, e seus respectivos sinais de C-6 apareceram em aproximadamente 173,5 e 170,6 ppm. O sinal do carbono dos grupos metil apareceu próximo a 53 ppm e aquele proveniente dos grupos acetil em torno de 20,6 ppm. Os sinais em aproximadamente 68,2; 70,5; 78,6 e 72,2 ppm foram assinalados a C-2, C-3, C-4 e C-5 das unidades de α -D-GalA, respectivamente.

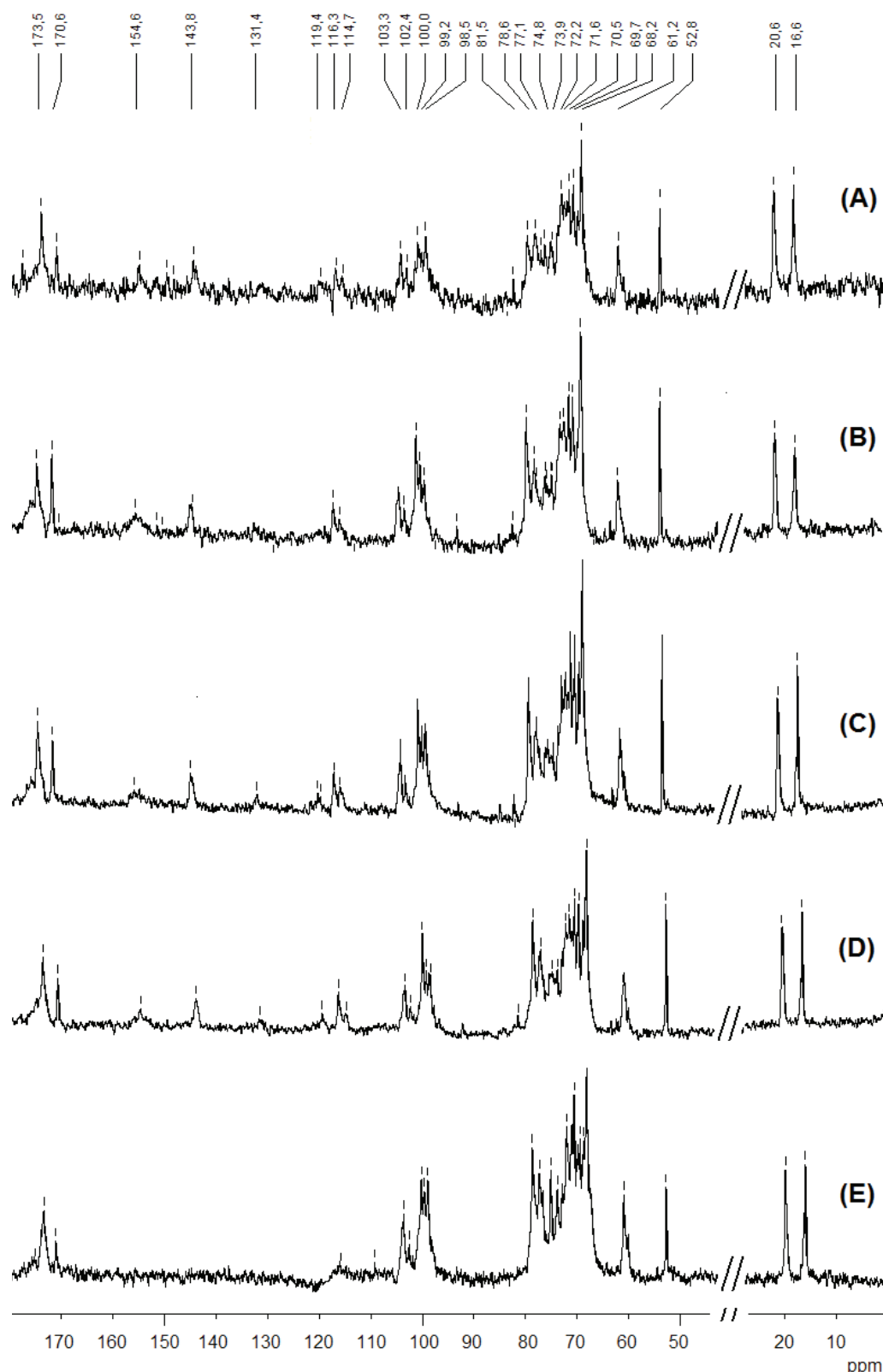


FIGURA 27 - ESPECTROS DE ^{13}C RMN (70°C, 100 MHz) DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF): (A) 50W; (B) BW; (C) CA-HYP; (D) NA-HYP; (E) OP. SOLVENTE: D_2O . DESLOCAMENTOS QUÍMICOS EXPRESSOS EM ppm

NOTA: 50W: fração de pectina hidrossolúvel a 50°C; BW: fração de pectina hidrossolúvel sob fervura; CA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido cítrico; NA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido nítrico; OP: pectina otimizada.

Sinais de ramnogalacturonanas também foram identificados nas frações. Os sinais de C-1 e de CH₃-6 das unidades de α -L-Rhap apareceram, respectivamente, em aproximadamente 98,5 ppm e 16,6 ppm. Os sinais em 103,3 e 102,4 ppm foram atribuídos às unidades de β -1,4-D-Gal substituídas e não substituídas, respectivamente. Todos os assinalamentos foram efetuados baseando-se na literatura (DALONSO; PETKOWICZ, 2012; DUAN *et al.*, 2004; PETERSEN *et al.*, 2008; TAMAKI *et al.*, 2008; VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009; WESTERENG *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010).

Os dados de RMN e composição se complementam indicando que as pectinas das frações 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP apresentam pectinas altamente acetiladas, compostas por homogalacturonanas LM e RG-I contendo cadeias laterais principalmente de galactanas.

4.4.2.2 Análises reológicas

Na sequência, analisou-se as propriedades reológicas de soluções aquosas a 5% das frações 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP. A fração 50W mostrou-se a mais insolúvel entre todas. As curvas de viscosidade estão mostradas na Figura 28, juntamente com a fração OP. Se observa um comportamento pseudoplástico para todas as amostras, com diminuição da viscosidade com elevações na taxa de cisalhamento. A fração CA-HYP apresentou uma queda mais gradual da viscosidade com a taxa de cisalhamento, mostrando maior resistência ao aumento da frequência rotacional.

A viscosidade em baixas taxas de cisalhamento foi maior para a fração 50W, obtida com a menor temperatura de extração (50°C). Na sequência, destacou-se a fração NA-HYP, seguida por BW e CA-HYP, que mostraram viscosidades semelhantes em taxas de cisalhamento $<0,1 \text{ s}^{-1}$. Todas as frações de pectinas LM mostraram valores de viscosidade aparente maiores que aqueles da fração OP e também de pectinas obtidas do bagaço de maçã (MIN *et al.*, 2011), ambas constituídas por pectinas HM, que apresentam menores proporções de carga negativa, e conseqüentemente menor repulsão eletrostática.

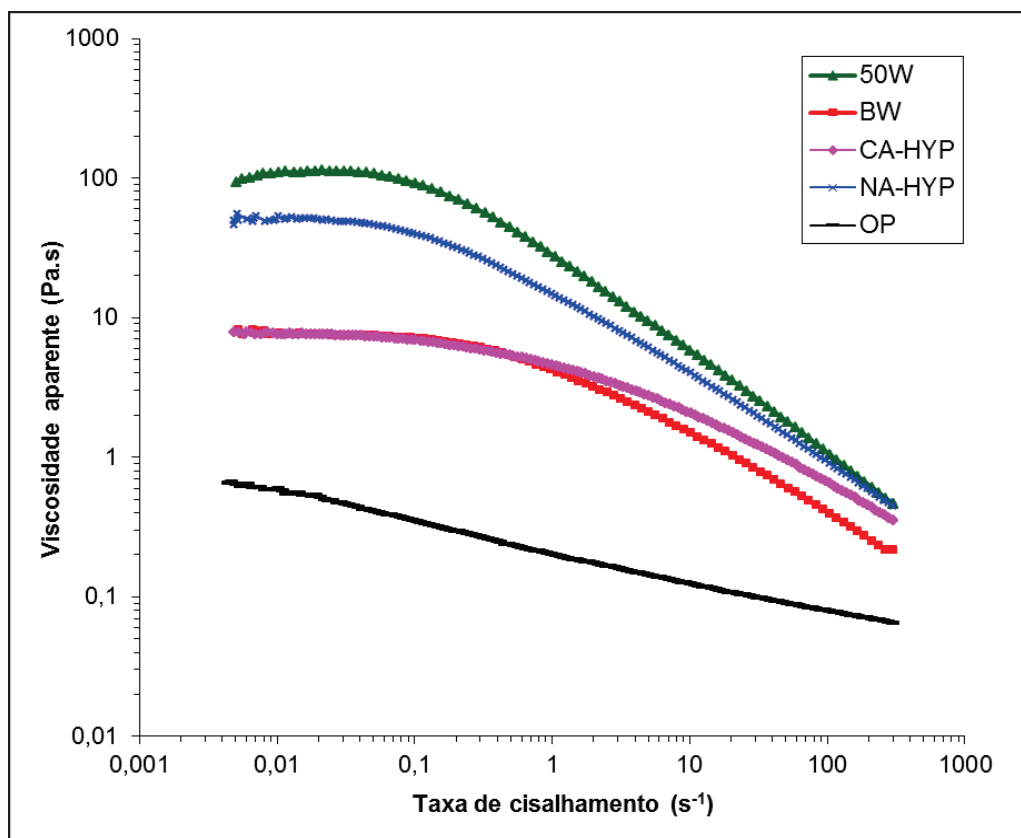


FIGURA 28 - INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DAS SOLUÇÕES AQUOSAS A 5% (M/M) DAS FRAÇÕES DE PECTINAS OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

NOTA: 50W: fração de pectina hidrossolúvel a 50°C; BW: fração de pectina hidrossolúvel sob fervura; CA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido cítrico; NA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido nítrico; OP: pectina otimizada.

Mesmo com similaridades entre as frações em certos aspectos, poderia-se sugerir que as diferenças de comportamento de fluxo observadas referem-se às propriedades moleculares das frações, tais como composição e estrutura química, rigidez das moléculas, DE e distribuição de carga, massa molecular e DA (HWANG; KOKINI, 1992; KIM *et al.*, 2008, MIN *et al.*, 2011; OOSTERVELD *et al.*, 2000; PIPPEN; MCCREADY; OWENS, 1950; SENGKHAMPARN *et al.*, 2010; WILLIAMS; PHILLIPS, 2000). A contribuição de um dos fatores isoladamente ou de sua associação com outros pode ter sido relevante para as características observadas.

Poderia-se destacar a fração 50W quanto aos aspectos relacionados especialmente ao DA, que foi significativamente maior que os demais. De acordo Sengkhamparn *et al.* (2010) a acetilação contribuiu de maneira importante para aumentar a viscosidade de soluções de pectinas LM e HM do quiabo através da formação de interações hidrofóbicas.

Na Figura 29 estão mostradas as varreduras de frequência para as mesmas amostras a fim de caracterizar suas propriedades viscoelásticas. Tanto o módulo elástico (G') quanto o módulo viscoso (G'') aumentaram com o aumento da frequência de oscilação, com maior dependência de G' em relação à frequência, conforme observado por Min *et al.* (2011) para pectinas extraídas do bagaço da maçã. Entretanto, os valores de G' e G'' para as pectinas da casca dos frutos do cacau (Figura 29) foram superiores (especialmente em baixas frequências) e menos frequência-dependentes que aquelas do bagaço da maçã (MIN *et al.*, 2011).

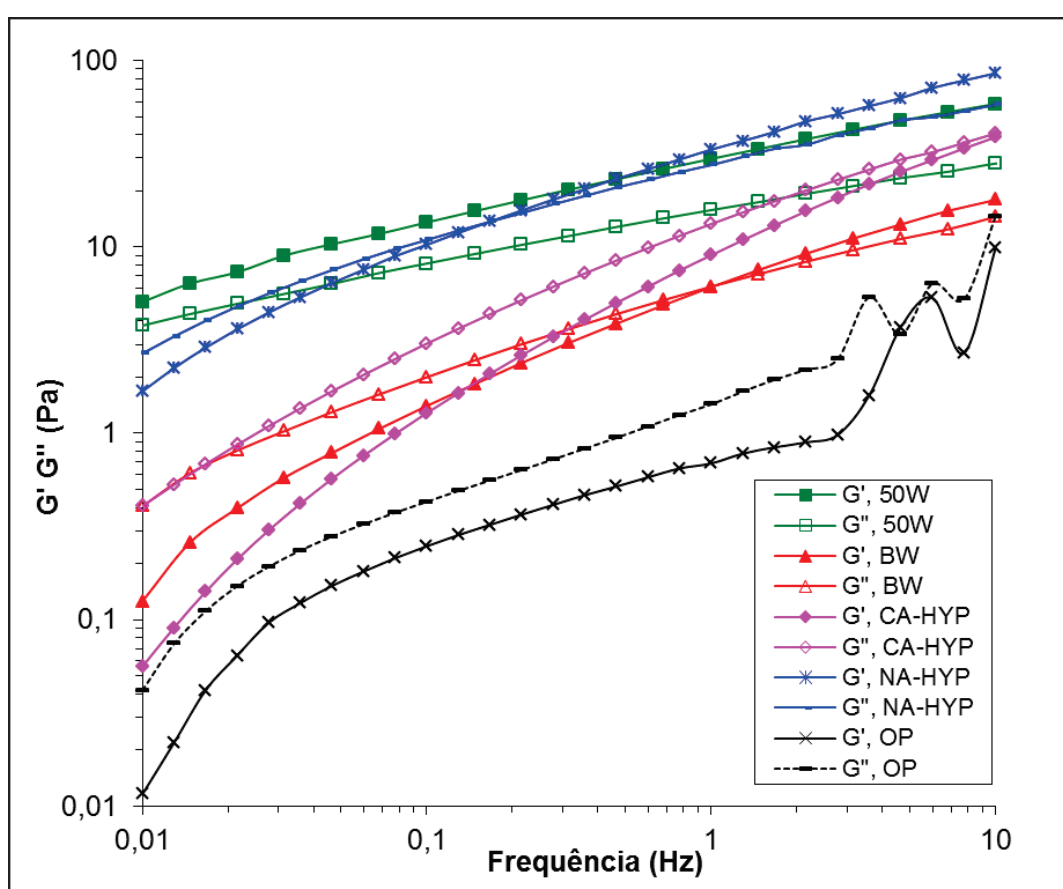


FIGURA 29 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA (25°C, γ : 0,03-0,1) DAS SOLUÇÕES AQUOSAS A 5% (M/M) DAS FRAÇÕES DE PECTINAS OBTIDAS A PARTIR DA FARINHA DA CASCA DOS FRUTOS DO CACAU (CPHF)

NOTA: 50W: fração de pectina hidrossolúvel a 50°C; BW: fração de pectina hidrossolúvel sob fervura; CA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido cítrico; NA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido nítrico; OP: pectina otimizada.

Além disso, as varreduras de frequência das amostras das frações BW, CA-HYP e NA-HYP mostraram um perfil característico de soluções viscosas, onde G'' é superior a G' em baixas frequências (comportamento de líquidos) e quando a frequência aumenta, os módulos se cruzam ($G'=G''$) e ocorre uma inversão dos módulos ($G'>G''$). Nesse caso, a fluidez do polímero diminui com o aumento da frequência e a solução assume um caráter mais elástico (GIDLEY; ROBINSON, 1990). Resultados semelhantes foram encontrados para outras pectinas (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; SINGTHONG *et al.*, 2005).

Min *et al.* (2011) observaram que pectinas com menor DE apresentavam maiores propriedades elásticas com o aumento da frequência. Na Figura 29 nota-se que a fração 50W (com menor DE) apresentou maiores propriedades elásticas, com comportamento de gel fraco, sendo G' um pouco maior que G'' na faixa de frequências estudadas. Os resultados obtidos nas varreduras de frequência para todas as amostras são consistentes com os dados de viscosidade das amostras.

Como as frações 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP foram constituídas por pectinas LM, suas capacidades de formar gel foram inicialmente testadas na presença de íons cálcio, segundo o modelo *egg box*, onde as cadeias de pectato se arranjam de modo antiparalelo formando fendas que aprisionam íons cálcio, ligando as cadeias entre si. Além das interações eletrostáticas entre COO^- e Ca^{+2} , as zonas de junção entre duas cadeias pécticas vizinhas são também estabilizadas por interações de van der Waals e pontes de hidrogênio entre os grupos polares das moléculas de pectina (FRAEYE *et al.*, 2010).

No presente trabalho, as pectinas LM obtidas da casca dos frutos do cacau (frações 50W, BW, CA-HYP e NA-HYP) foram solubilizadas em concentrações de 1,0 a 1,6% GalA (em água deionizada e NaCl 0,1 mol.L⁻¹), em diferentes pHs e usando teores de cálcio distintos. Após procedimentos convencionais para formação de géis de pectinas LM, não houve formação de gel na presença de cálcio, e verificou-se a formação de precipitados nas amostras. Vários testes foram efetuados, mas todos sem sucesso.

Um fator que poderia estar interferindo na formação de gel com íons cálcio é o elevado teor de grupos acetil, que causam impedimento espacial das interações entre as cadeias poliméricas e reduzem a força de ligação das pectinas com Ca^{+2} (FRAEYE *et al.*, 2010; WILLIAMSON *et al.*, 1990). Da mesma forma, a presença de cadeias laterais (RG-I), como evidenciado pela composição monossacarídica e ¹³C

RMN, poderia estar atrapalhando a formação de associações intermoleculares entre diferentes cadeias de pectina e, conseqüentemente, a gelificação através de íons cálcio (FRAEYE *et al.*, 2010).

Para pectinas da beterraba, foi descrito que o elevado teor de acetil (PIPPEN; MCCREADY; OWENS, 1950) e a elevada proporção de cadeias laterais (MATTHEW *et al.*, 1990) estão implicados na falta de capacidade de gelificação na presença de Ca^{+2} , e a redução dos níveis destes componentes estruturais melhorou a sua capacidade de formar gel (FAULDS; WILLIAMSON, 1990; MATTHEW *et al.*, 1990; PIPPEN; MCCREADY; OWENS, 1950).

Além disso, não somente a quantidade de unidades de GalA desesterificadas (~60%) mas também a distribuição das unidades esterificadas e livres ao longo das cadeias pécticas também poderiam estar impedindo a gelificação induzida por cálcio. A formação de zonas de junção com cálcio através do modelo *egg box* somente é possível quando as pectinas apresentam sequências com um número mínimo de unidades de GalA desesterificadas (FRAEYE *et al.*, 2010). De acordo com a literatura, uma distribuição destas unidades em blocos leva à gelificação em maiores DEs e menores concentrações de cálcio ou de pectina, em comparação com pectinas com distribuição aleatória das unidades de GalA livres e esterificadas (FRAEYE *et al.*, 2009).

Pectinas LM também podem formar gel na ausência de Ca^{+2} se o pH for inferior a 3,5. Nestas condições, os grupos carboxílicos desesterificados estão protonados, diminuindo a repulsão eletrostática entre as cadeias e permitindo interações entre elas através de pontes de hidrogênio. Se a sacarose estiver presente, a atividade de água é reduzida e interações pectina-pectina predominam sobre as interações pectina-água (FRAEYE *et al.*, 2010; VORAGEN *et al.*, 1995), favorecendo a formação de gel.

Portanto, foram realizados testes reduzindo o pH de soluções aquosas das frações de pectinas LM deste trabalho através da adição de ácido cítrico (pH<3) e adicionando sacarose. Após aquecimento e resfriamento, as amostras tornaram-se viscosas. Assim, a influência da variação do pH (2,5 a 3,0) no comportamento reológico das frações a 0,99% GalA contendo 60% de sacarose foi analisada. A concentração de 0,99% GalA foi selecionada devido a uma maior facilidade durante o preparo dos géis, diferentemente da fração OP, cuja concentração utilizada para variação de pH foi 1,32% GalA.

As curvas de viscosidade das amostras (Figura 30) evidenciaram um comportamento pseudoplástico, com a viscosidade aparente diminuindo com o aumento da taxa de cisalhamento. Ao se comparar as amostras obtidas em diferentes pHs para uma mesma fração, verificou-se que aquelas preparadas no pH mais baixo (2,5) mostraram as maiores viscosidades. Para a fração 50W, as amostras apresentaram-se um tanto turvas e com material insolúvel, características que pioraram com o decréscimo do pH, o que pode justificar a pequena diferença entre as curvas de viscosidade em pH 2,7 e 2,5.

Ao se comparar diferentes frações nos mesmos pHs (Figura 30), se observa que a fração 50W apresentou as maiores viscosidades, seguida por NA-HYP. BW e CA-HYP apresentaram viscosidade semelhante em pH 3,0, mas com a diminuição do pH, CA-HYP mostrou viscosidade superior a BW. Para a fração 50W, possivelmente pela insolubilidade, os resultados podem representar características reológicas diferentes das reais.

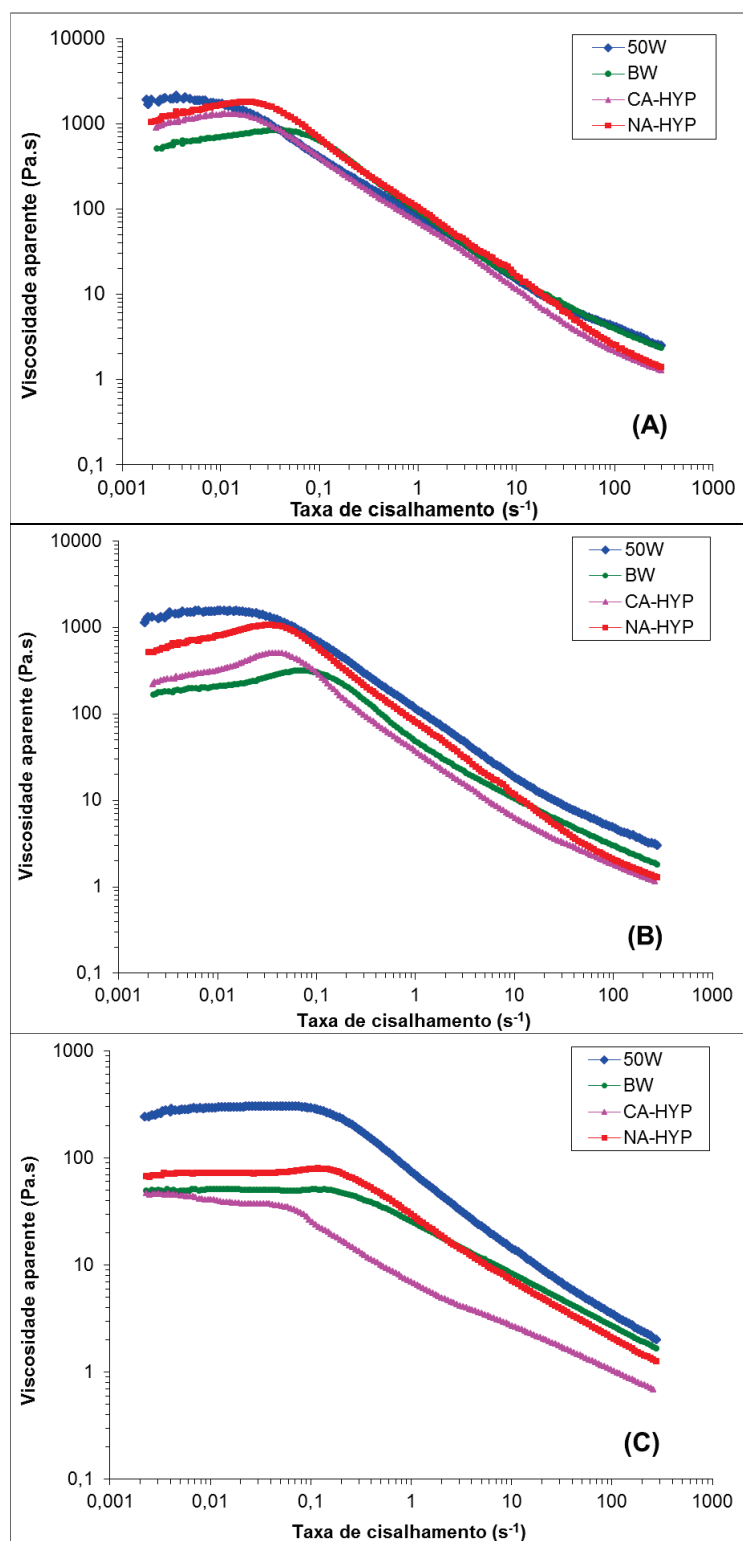


FIGURA 30 - INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO SOBRE A VISCOSIDADE APARENTE (25°C) DAS AMOSTRAS DAS FRAÇÕES 50W, BW, CA-HYP E NA-HYP A 0,99% GalA COM 60% SACAROSE (M/M) EM DIFERENTES pHs APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL: (A) pH 2,5; (B) pH 2,7; (C) pH 3,0

NOTA: Frações obtidas a partir da farinha da casca dos frutos do cacau (CPHF): 50W: fração de pectina hidrossolúvel a 50°C; BW: fração de pectina hidrossolúvel sob fervura; CA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido cítrico; NA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido nítrico.

A Figura 31 mostra a variação dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') das mesmas amostras (50W, BW, CA-HYP E NA-HYP a 0,99% GalA; pH 2,5-3,0; 60% de sacarose) com a frequência (0,01-10 Hz) a 25°C. Apesar das frações apresentarem pectinas LM com alto teor de acetilação, houve formação de gel ($G' > G''$) sob a maioria das condições.

Ao comparar a viscoelasticidade das amostras obtidas em diferentes pHs para uma mesma fração (Figura 31), fica evidente que géis mais elásticos foram formados com a redução do pH, com os melhores géis formados em pH 2,5, contendo os maiores valores de G' , menor dependência em relação à frequência e maior diferença entre G' e G'' .

As frações 50W e CA-HYP mostraram a presença de géis ($G' > G''$) em todos os pHs analisados. Para CA-HYP em pH 3,0 observou-se a presença de um gel mais fraco, pois houve um *cross-over* entre G' e G'' em aproximadamente 2,8 Hz. Para as frações NA-HYP e BW observou a presença de géis em pH 2,7 e 2,5, mas não em pH 3,0. Neste pH, em frequências bem baixas, as amostras mostraram $G'' > G'$ (caráter viscoso). Para a amostra NA-HYP, em aproximadamente 0,012 Hz os módulos se cruzaram e acima da frequência de 0,017 Hz, a amostra NA-HYP mostrou um predomínio de G' sobre G'' (caráter mais elástico), como acontece com soluções concentradas de polímeros. Já para a amostra BW em pH 3,0, G' e G'' apresentaram valores muito próximos entre si, mostrando sobreposição ($G'' = G'$) em grande parte da análise oscilatória.

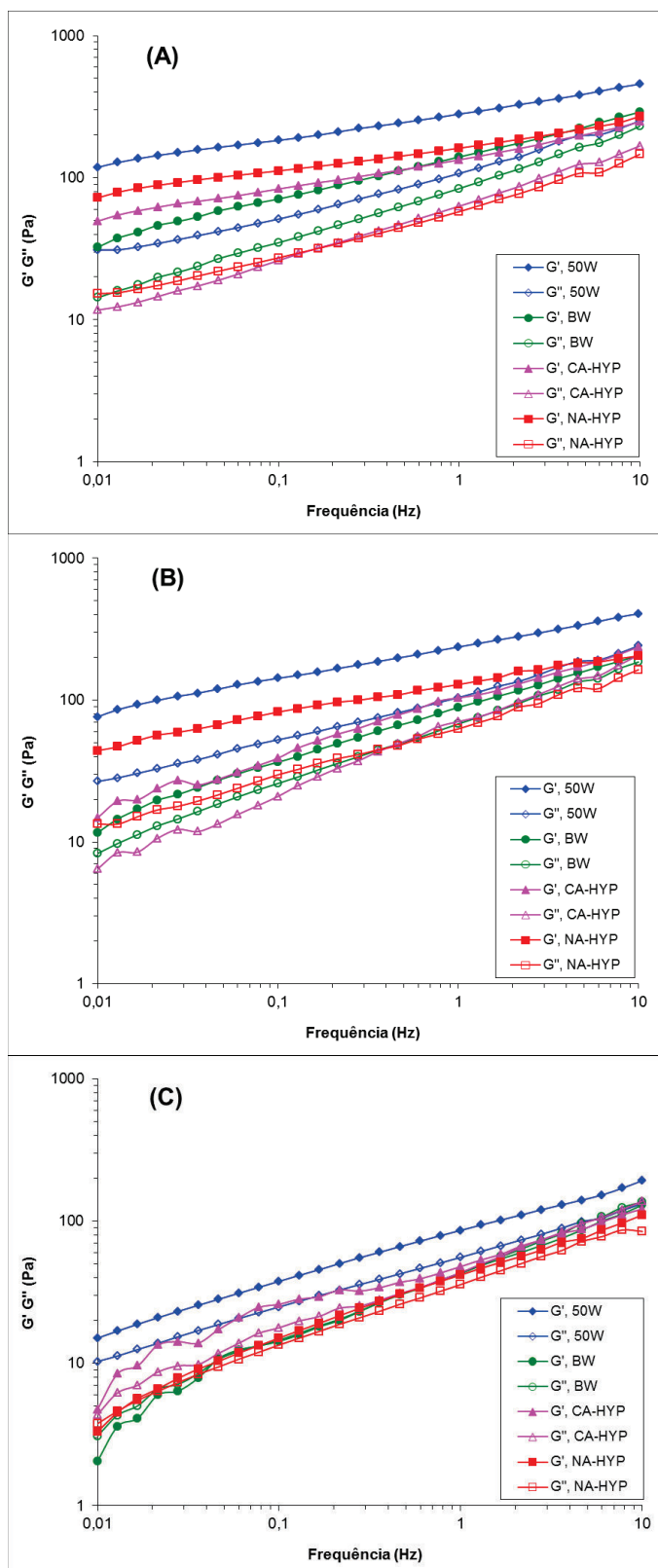


FIGURA 31 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA (25°C; γ : 0,002-0,03) DAS AMOSTRAS DAS FRAÇÕES 50W, BW, CA-HYP E NA-HYP A 0,99% GalA (M/M) COM 60% DE SACAROSE (M/M) EM DIFERENTES pHs APÓS PROCEDIMENTO DE PREPARO DE GEL. (A) pH 2,5; (B) pH 2,7; (C) pH 3,0

NOTA: Frações obtidas a partir da farinha da casca dos frutos do cacau (CPHF): 50W: fração de pectina hidrossolúvel a 50°C; BW: fração de pectina hidrossolúvel sob fervura; CA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido cítrico; NA-HYP: pectina de alto rendimento usando ácido nítrico.

Löfgren, Walkenström e Hermansson (2002) obtiveram géis fracos com pectinas comerciais LM (DE 33,5%) em baixo pH e alta concentração de sacarose. A 0,75% de pectina e pH 3,0 com 60 % sacarose, na ausência de íons cálcio, os géis apresentaram $G' = 30$ Pa e $G'' = 20$ Pa a 1Hz. Nesta frequência, as amostras de pectinas LM deste trabalho a 0,99% em pH 3,0 e contendo 60% de sacarose mostraram valores superiores a estes para ambos os módulos.

Comparando-se as diferentes frações preparadas nos mesmos pHs (Figura 31), se observa que a fração 50W novamente se destacou entre as demais, seguida por NA-HYP, CA-HYP e BW em todos os pHs.

Géis de pectinas (0,7 % pectina, 65% sacarose e pH 2,3) extraídas com ácido cítrico a partir da casca do maracujá amarelo mostraram maior poder gelificante através do método SAG convencional (mede a deformação dos géis retirados de um molde pela gravidade) do que géis preparados com pectinas extraídas com ácido nítrico ou ácido sulfúrico da mesma fonte (YAPO, 2009a), diferente dos resultados obtidos para as pectinas da casca do fruto do cacau extraídas com ácido cítrico e ácido nítrico (CA-HYP e NA-HYP) através de análises reológicas. O autor explica essa melhor capacidade gelificante pelo maior DE e massa molecular das pectinas extraídas com ácido cítrico, que segundo ele, solubiliza pectinas da parede celular vegetal com menos degradação, resultando em cadeias poliméricas maiores.

As amostras de pectinas deste trabalho apresentaram algumas semelhanças e diferenças reológicas entre si, sugerindo-se que a presença de famílias de pectinas diferentes estruturalmente nas frações poderiam ter levado às propriedades físico-químicas características de cada fração.

Os resultados das análises reológicas mostraram que apesar do alto teor de acetil, as pectinas extraídas de diferentes formas a partir da casca dos frutos do cacau foram capazes de formar gel em condições de baixo pH e alta concentração de sacarose, sugerindo possíveis aplicações em produtos ácidos.

5 CONCLUSÕES

A casca dos frutos do cacau (*Theobroma cacao* L.) apresenta pectinas que podem ser obtidas com diferentes rendimentos e características dependendo do agente extrator e das condições de temperatura, pH e tempo de extração.

As condições satisfatórias para extração com ácido cítrico visando elevado rendimento foram: pH 3,0 a 95°C durante 95 min. As condições satisfatórias para extração com ácido nítrico visando elevado teor de ácidos urônicos usando solução de ácido nítrico foram: pH 1,5 a 100°C por 30 min. As condições satisfatórias para extração com ácido nítrico visando elevado rendimento foram: pH 3,5 a 100°C durante 30 min.

As frações extraídas com água quente e nas condições satisfatórias para elevado rendimento foram constituídas por pectinas LM. A fração obtida nas condições satisfatórias visando elevado teor de ácidos urônicos apresentou pectinas HM.

As pectinas mostraram-se compostas por homogalacturonanas altamente acetiladas e ramnogalacturonanas contendo principalmente galactanas como cadeias laterais.

Apesar do elevado teor de grupos acetil nas pectinas, houve formação de géis em condições de pH ácido e elevado teor de sacarose, sugerindo um possível uso como aditivo espessante e gelificante em produtos ácidos.

O uso da casca dos frutos do cacau como fonte de pectinas é promissor, tanto pela disponibilidade de material quanto pela crescente preocupação ambiental, podendo contribuir para um melhor aproveitamento e gerenciamento deste abundante resíduo da indústria cacaueira.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in Carbohydrates Chemistry**, v. 5, p. 269-276, 1965.

ADAMSON, G. E. *et al.* HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4184-4188, 1999.

ADKIN, D. A. *et al.* The Use of Scintigraphy to Provide 'Proof of Concept' for Novel Polysaccharide Preparations Designed for Colonic Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 103-107, 1997.

ADOMAKO, D. Cocoa pod husk pectin. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1145-1148, 1972.

ALBERSHEIM, P. *et al.* An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.). **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**, v. 14. Amsterdam: Elsevier, 1996, p. 47-55.

ALI, Z. M.; CHIN, L.-H; LAZAN, H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. **Plant Science**, v. 167, p. 317-327, 2004.

ALLER, R. *et al.* Effect of soluble fiber intake in lipid and glucose levels in healthy subjects: a randomized clinical trial. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 65, p. 7-11, 2004.

ALMEIDA, A.-A. F.; VALLE, R. R. Ecophysiology of the cacao tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 425-448, 2007.

ANDERSON, M. A.; STONE, B. A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, p. 115-129, 1985.

AOAC. **Official Methods of Analysis**, 18th ed., Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

ARANCIBIA, R. A.; MOTSENBOCKER, C. E. Pectin methylesterase activity in vivo differs from activity in vitro and enhances polygalacturonase-mediated pectin degradation in tabasco pepper. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 488-496, 2006.

ARDIZZONE, S.; BIANCHI PORRO, G. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. **Drugs**, v. 65, p. 2253-2286, 2005.

AREGHEORE, E. M. Chemical Evaluation and Digestibility of Cocoa (*Theobroma cacao*) Byproducts Fed to Goats. **Tropical Animal Health and Production**, v. 34, p. 339-348, 2002.

ARLORIO, M. *et al.* Characterization of Pectins and Some Secondary Compounds from *Theobroma cacao* Hulls. **Journal of Food Science**, v. 66, p. 653-656, 2001.

ASSIS, S. A.; LIMA, D. C.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. **Food Chemistry**, v. 74, p. 133-137, 2001.

ATTRI, B. L.; MAINI, S. B. Pectin from galgal (*Citrus pseudolimon* Tan.) peel. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 89-91, 1996.

AXELOS, M. A. V.; THIBAUT, J. F. In: WALTER, R. H. (Ed.). **The Chemistry and Technology of Pectin**, Academic Press, New York, pp. 109-118, 1991.

BABATOPE, B. Rheology of cocoa-pod husk aqueous system. Part-I: steady state flow behavior. **Rheologica Acta**, v. 45, p. 72-76, 2005.

BARAZARTE, H.; SANGRONIS, E.; UNAI, E. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 58, p. 64-70, 2008.

BARNAVON, L. *et al.* Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methyl-esterification of cell wall pectins. **Phytochemistry**, v. 58, p. 693-701, 2001.

BARRETT, A. J.; NORTHCOT, D. H. Apple fruit pectic substances. **Biochemical Journal**, v. 94, p. 617-627, 1965.

BATEMAN, J. V.; FRESNILLO, O. Digestibility of *Theobroma* in cacao pods when fed to cattle, **Journal of Agricultural Science**. v. 68, p. 23-25, 1967.

BEMILLER, J. N. An introduction to pectin: structure and properties. In: FISHMAN, M. L.; JEN, J. J. (Eds.). **Chemistry & Function of Pectins**. Washington, DC: ACS Symposium Series 310, American Chemical Society, 1986. pp. 2-12.

BIERMANN, C. J. Hydrolysis and the other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989, p. 27-41.

BIGUCCI, F. *et al.* Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 35, p. 435-441, 2008.

BLAKEMORE, W. R.; DEWAR, E. T.; HODGE, R. A. Polysaccharides of the cocoa pod husk. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 17, p. 558-560, 1966.

BONNIN, E. *et al.* Pectin acetylsterases from *Aspergillus* are able to deacetylate homogalacturonan as well as rhamnogalacturonan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 411-418, 2008.

BONVEHÍ, J. S.; BENERÍA, M. A. Composition of dietary fibre in cocoa husk. **European Food Research and Technology**. v. 207, p. 105-109, 1998.

BRADFORD, D. M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 722, p. 248-254, 1976.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRITISH PHARMACOPOEIA. V. II. London: The Stationery Office, 2008. p. 1403-1405.

BRITO, A. C. F. *et al.* Dynamic rheological study of *Sterculia striata* and karaya polysaccharides in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 861-867, 2005.

BROWNLEE, I. A. The physiological roles of dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 238-250, 2011.

BUCHHOLT, H .C. *et al.* Preparation and properties of enzymatically and chemically modified sugar beet pectins. **Carbohydrate Polymers**, p. 149-161, 2004.

BULONE, D. *et al.* Role of Sucrose in Pectin Gelation: Static and Dynamic Light Scattering Experiments. **Macromolecules**, v. 35, p. 8147-8151, 2002.

BUREY, P. *et al.* Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 366, 2008.

CAFFALL K. H.; MOHNEM, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879-1900, 2009.

CAMPIERI, M. *et al.* Optimum dosage of 5-aminosalicylic acid as rectal enemas in patients with active ulcerative colitis. **Gut**, v. 32, p. 929-931, 1991.

CANTERI, M. H. G. **Caracterização comparativa entre pectinas extraídas do pericarpo de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*)**. 162f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CANTERI, M. H. G. *et al.* Rheological and macromolecular quality of pectin extracted with nitric acid from passion fruit rind. **Journal of Food Process Engineering**, DOI: 10.1111/j.1745-4530.2010.00618.x, 2011.

CANTERI-SCHEMIN, M. H. *et al.* Extraction of pectin from apple pomace. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 259-266, 2005.

CARDOSO, S. M.; COIMBRA, M. A.; LOPES da SILVA, J. A. Temperature dependence of the formation and melting of pectin-Ca²⁺ networks: a rheological study. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 801-807, 2003.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The Cell Wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland: Couries Companies, 2000, p. 52-89.

CASTELL, M.; PÉREZ-CANO, F. J.; BISSON, J-F. Clinical Benefits of Cocoa: An Overview. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. (Eds.), **Chocolate in Health and Nutrition**, v. 7. New York: Humana Press, 2013. pp. 265-275, 2013.

CEPLAC. **Sinopse do mercado de cacau em 2011**. Autor: Fernando Antonio Teixeira Mendes. Disponível em <<http://www.ceplacpa.gov.br/site/?p=2964>>. Acesso em 15 de maio de 2012.

CHANTARO, P.; DEVAHASTIN, S.; CHIEWCHAN, N. Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, p. 1987-1994, 2008.

CHEPOTE, R. E. Efeito do composto da casca do fruto de cacau no crescimento e produção do cacaueiro. **Agrotrópica**, v. 15, p. 1-8, 2003.

CHRISTENSEN, S. H. Pectins. In: GLICKSMAN, M. (Ed.), **Food Hydrocolloids**. v. III. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986. pp. 205-230.

CHUONG, M. C.; CHRISTENSEN; J.M.; AYRES, J.W. New Dissolution Method for Mesalamine Tablets and Capsules. **Dissolution Technologies**, v.15, p. 7-14, 2008.

CORMAN, M. L. **Colon and rectal surgery**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, 1743 p.

CRIG (Cocoa Research Institute of Ghana). **Cocoa By-Products**. Disponível em <http://www.crig.org/by_products_subcat_list.php?id=1>, Acesso em 28 de janeiro de 2009.

DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. O. Guarana powder polysaccharides: Characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1804-1812, 2012.

DANIELLS, S. **Pectin: Sourcing issues and ideas**. Disponível em <<http://www.foodnavigator.com/Science-Nutrition/Pectin-Sourcing-issuesand-ideas>>, 2008.

DARVILL, A. G.; McNEILL, M.; ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls: VIII. A new pectic polysaccharide. **Plant Physiology**, v. 62, p. 418-422, 1978.

DE VRIES, J. A. Repeating units in the structure of pectin. In: PHILIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Gums and stabilisers from the food industry**. Vol. 4, Oxford: IRL Press, 1988. p. 25-29.

DE VRIES, J. W. On defining dietary fibre. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 37-43, 2003.

DEYTIEUX-BELLEAU, C. *et al.* Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 638–646, 2008.

DITTMAR, H. F. K. Untersuchungen an Kakaofruehlschalen. **Gordian**. v. 58, p. 48-49, 1958.

DONKOH, A. *et al.* Chemical composition of cocoa pod husk and its effect on growth and food efficiency in broiler chicks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 35, p. 161-169, 1991.

DRAYE, M., VAN CUTSEM, P. Pectin methylesterases induce an abrupt increase of acidic pectin during strawberry fruit ripening. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1152-1160, 2008.

DUAN, J. *et al.* Structural analysis of a pectic polysaccharide from the leaves of *Diospyros kaki*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 609-615, 2004.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EDITORIAL. An introduction: Evolution and finalisation of the regulatory definition of dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 139-143, 2011.

EL-NAWAWI, S. A.; HEIKEL, Y. A. Factors affecting gelation of high-ester citrus pectin. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 381-385, 1997.

EL-ZOGHBI, M. Biochemical changes in some tropical fruits during ripening. **Food Chemistry**, v. 49, p. 33-37, 1994.

ENDRESS, H. U.; DÖSCHL-VOLLE, C.; DENGLER, K. Rheological Methods to Characterize Pectins in Solutions and Gels. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**, v. 14. Amsterdam: Elsevier, 1996. pp. 407-423.

EVAGELIOU, V.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Effect of pH, sugar type and thermal annealing on high methoxyl pectin gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 245-259, 2000.

EVAGELIOU, V.; PTITCHKINA, N.M.; MORRIS, E.R. Solution viscosity and structural modification of pumpkin biopectin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 1032-1036, 2005.

FAGBENRO, O. A. Results of preliminary studies on the utilization of cocoa-pod husks in fish production in South-west Nigeria. **Biological Wastes**, v. 25, p. 233-237, 1988.

FARMACOPÉIA AMERICANA. **The United States Pharmacopeia: USP 31: the national formulary: NF 26**. v. 3. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008, p. 2629-2633.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. Effect of enzymes derived from orange peel on citrus and sugar beet pectins. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. (Eds.). **Gums and stabilizers for the food industry**, V. 5. Oxford: IRL Press, 1990. pp. 277-280.

FAULDS, C.B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 393-395, 1999.

FEMENIA, A. *et al.* Physical and Sensory Properties of Model Foods Supplemented with Cauliflower Fiber. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 635-639, 1997.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BEMILLER, J. N. New products from *Theobroma cacao*: Seed pulp and pod gum. **News crops**. v. 2, p.1-5, 1993.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BEMILLER, J. N. Partial characterization of cacao pod and stem gums. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, p. 133-138, 1994.

FIGUEROLA, F. *et al.* Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. **Food Chemistry**, v. 91, p. 395-401, 2005.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of Uronic Acids without Interference from Neutral Sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FISHMAN, M. L. *et al.* A comparison of lime and orange pectin which were rapidly extracted from albedo. In: VORAGEN, F. *et al.* (Eds.), **Advances in Pectin and Pectinase Research**. Netherlands: Kluwer Academic, 2003. pp. 107-122.

FISHMAN, M. L. *et al.* Characterization of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating under pressure. **Carbohydrate Research**, v. 323, p. 126-138, 2000.

FONTES, P. R. Estudo da pectina do mel e da casca do fruto de cacau. **Revista Theobroma**, v. 2, p. 49-51, 1972.

FRAEYE, I. *et al.* Fine-tuning the properties of pectin–calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 219-228, 2010.

FRAEYE, I. *et al.* Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2069-2077, 2009.

FREIRE, A. C. *et al.* Liberação específica de fármacos no cólon por via oral. II - Tipos de sistemas utilizados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, v. 42, p. 337-355, 2006.

FRIEDMAN, G. Dietary Fiber in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 115, p. 794, 1998.

FRY, S. C. Phenolic components of the primary cell walls: feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. **Biochemical Journal**, v. 203, p. 493-504, 1982.

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

GAN, C-Y.; LATIFF, A. A. Extraction of antioxidant pectic-polysaccharide from mangosteen (*Garcinia mangostana*) rind: Optimization using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 600-607, 2011.

GARNA, H. *et al.* Effect of Extraction Conditions on the Yield and Purity of Apple Pomace Pectin Precipitated but Not Washed by Alcohol. **Journal of Food Science**, v. 72, p. C1-C9, 2007.

GELROTH, J.; RANHOTRA, G. S. Food uses of fiber. In: S. SUNGSOO CHO, S.; DREHER, M. L. (Eds.), **Handbook of dietary fiber**. New York: Marcel Dekker, 2001, pp. 435-451.

GIDLEY, M. J.; ROBINSON, G. Techniques for studying interactions between polysaccharides. In: DEY, P. M. (Ed.) **Methods in Plant Biochemistry**. v. 2. London: Academic Press, 1990.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. **Food Research International**, v. 43, p. 2289-2294, 2010.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R., *et al.* Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1580-1586, 2010.

GOUVEIA, M. J.; JACQUES, F. O. Retocolite Ulcerativa Idiopática e o Tratamento Com Ácido 5-Aminosalicílico. **UNINGÁ Review**, nº 04, p. 06-16, 2010.

GRIGELMO-MIGUEL, N.; MARTÍN-BELLOSO, O. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. **Food Research International**, v. 31, p. 355-361, 1999.

GUILLON, F.; THIBAUT, J-F. Methylation analysis and mild acid hydrolysis of the "hairy" fragments of sugar-beet pectins. **Carbohydrate Research**, v. 190, p. 85-96, 1989.

GUIMARÃES, G. G. *et al.* Avaliação da pectina-HPMC no processo de revestimento por compressão. I-Estudo da propriedade de intumescimento em núcleos revestidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, vol. 44, p. 133-141, 2008.

HABIBI, Y. *et al.* Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1119-1127, 2004.

HAGESAETHER, E.; HIORTH, M.; SANDE, S. A. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: An *in vitro* and *ex vivo* study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 325-33, 2009.

HAINES, C. E.; ECHEVERRIA, A. J. Cocoa pods as substitute in tropical dairy rations. **Agriculture**. v. 19, p. 99-101, 1955.

HAMMERSTONE, J. F. *et al.* Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 490-496, 1999.

HANAUER, S. B. Review article: aminosaliclates in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, p. 60-65, 2004.

HAPPI EMAGA, T. *et al.* Characterisation of pectins extracted from banana peels (Musa AAA) under different conditions using an experimental design. **Food Chemistry**, v. 108, p. 463-471, 2008a.

HAPPI EMAGA, T. *et al.* Dietary fibre components and pectin chemical features of peels during ripening in banana and plantain varieties. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4346-4354, 2008b.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p. 249-261, 1949.

HILZ, H. *et al.* The pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is present as a dimer in pectic populations of bilberries and black currants in muro and in juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 521-528, 2006.

HWANG, J.; KOKINI, J. L. Contribution of the side branches to rheological properties of pectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, p. 41-50, 1992.

HWANG, J.; PYUN, Y. R.; KOKINI, J. L. Sidechains of pectins: Some thoughts on their role in plant cell walls and foods. **Food Hydrocolloids**, v. 7, p. 39-53, 1993.

IACOMINI, M. *et al.* Isolation and partial characterization of a pectic polysaccharide from the fruit pulp of *Spondias cytherea* and its effect on peritoneal macrophage activation. **Fitoterapia**, v. 76, p. 676-683, 2005.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 9-17, 2002.

IBGE. **Estatística da Produção Agrícola - Abril de 2012**. Disponível em <http://ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_201204.pdf> Acesso em 16 de maio de 2012.

ICCO (International Cocoa Organization). **Annual Report 2009/2010**. Disponível em <<http://www.icco.org/about/anualreport.aspx>> Acesso em 15 de dezembro de 2011.

ICCO (International Cocoa Organization). **Harvesting Cocoa**. Disponível em <<http://www.icco.org/about/Harvesting.aspx>> Acesso em 22 de abril de 2012b.

ICCO (International Cocoa Organization). **Latest Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics**, 29/02/2012. Disponível em <<http://www.icco.org/about/press2.aspx?Id=hlq17405>>. Acesso em 05 de maio de 2012a.

ICCO (International Cocoa Organization). **Origins Of Cocoa And Its Spread Around The World**. Disponível em <<http://www.icco.org/about/growing.aspx>> Acesso em 22 de abril de 2012c.

IGLESIAS, M. T.; LOZANO, J. E. Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 62, p. 215-223, 2004.

IMANAH, J. E.; OKIEIMEN, F. E. Rheological and Mechanical Properties of Natural Rubber Reinforced with Agricultural Byproduct. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, p. 3718-3722, 2003.

INNGJERDINGEN, K. T. *et al.* Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. **Glycobiology**, v. 17, p. 1299-1310, 2007.

ISHII, T. *et al.* The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 13098-13104, 1999.

JARVIS, M. C. A survey of pectin content of nonlignified monocot cell walls. **Plant Physiology**, v. 88, p. 309-314, 1988.

KACZMARCZYK, M. M.; MILLER, M. J.; FREUND, G. G. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. **Metabolism**, v. 61, p. 1058-1066, 2012.

KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. **Food Chemistry**, v. 73, p. 393-396, 2001.

KALVATCHEV, Z.; GARZARO, D.; CEDEZO, F.G. *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. **Agroalimentaria**, v. 6, p. 23-25, 1998.

KARIM, M.; MCCORMICK, K.; KAPPAGODA, C. T. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2108S-2119S, 2000.

KEENAN, M. H. J *et al.* A ¹³C-n.m.r. study of sugar-beet pectin. **Carbohydrate Research**, v. 138, p. 168-170, 1985.

KENDALL, C. W. C.; ESFAHANI, A.; JENKINS, D. J. A. The link between dietary fibre and human health. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 42-48, 2010.

KERTESZ, Z. I. **The Pectic Substances**. New York: Wiley Interscience Publishers, 1951, p. 438.

KIM, Y. *et al.* Textural properties of gelling system of low-methoxy pectins produced by demethoxylating reaction of pectin methyl esterase. **Journal of Food Science**, v. 73, p. C367-C372, 2008.

KLIEMAN, E. *et al.* Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) using response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 476-483, 2009.

KLOTZ, U. Colonic targeting of aminosalicylates for the treatment of ulcerative colitis. **Digestive and Liver Disease**, v. 37, p. 381-388, 2005.

KOBAYASHI, M.; MATOH, T.; AZUMA, J. I. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross linked by borate-diol ester bonds in higher-plant cell walls. **Plant Physiology**, v. 110, p. 1017-1020, 1996.

KOCH, J. L.; NEVINS, D. J. Tomato fruit cell wall. Part I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. **Plant Physiology**, v. 91, p. 816-822, 1989.

KONG, Z.; LIU, Z. D.; CHEN, S.T. Study on the extraction of pectin from apple pomace with microwave. **Journal of Hengzhou Grain College**, v. 21, p. 11-15, 2000.

KOŠŤÁLOVÁ, Z. *et al.* Polysaccharides from the Styrian oil-pumpkin with antioxidant and complement-fixing activity. **Industrial Crops and Products**. v. 41, p. 127-133, 2013.

KOUBALA, B. B. *et al.* Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1345-1351, 2008a.

KOUBALA, B. B. *et al.* Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondia cytherea*) obtained using different extraction conditions. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1202-1207, 2008b.

KRATCHANOVA, M. *et al.* Extraction of pectin from fruit materials pretreated in an electromagnetic field of super-high frequency. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p. 141-144, 1994.

KRATCHANOVA, M.; PAVLOVAA, E.; PANCHEV, I. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 181-185, 2004.

KRAVTCHEENKO, T. P.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 17-25, 1992.

KULKARNI, S. G.; VIJAYANAND, P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1026-1031, 2010.

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

LACHENAUD, P. *et al.* Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. **Scientia Horticulturae**, v. 113, p. 313-321, 2007.

LECUMBERRI, E. *et al.* Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v. 104, p. 948-954, 2007.

LEE, J.-S.; KIM, J. S.; LEE, H. G. γ -Oryzanol-loaded calcium pectinate microparticles reinforced with chitosan: Optimization and release characteristics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 70, p. 213-217, 2009.

LEITNER, S. C. S. **Estudo de polissacarídeos da semente de *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão)** 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.

LEVIGNE, S.; RALET, M.C.; THIBAUT, J-F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 145-153, 2002.

LIU, L. *et al.* Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3268-3273, 2010.

LIU, L. *et al.* Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. **Biomaterials**, v. 24, p. 3333-3343, 2003.

LÖFGREN, C.; WALKENSTRÖM, P.; HERMANSSON, A-M. Microstructure and rheological behavior of pure and mixed pectin gels. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 1144-1153, 2002.

LOOTENS, D. Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 237-244, 2003.

LÓPEZ, G., *et al.* Relationship between physical and hydration properties of soluble and insoluble fiber of artichoke. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2773-2778, 1996.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, vol. 1, 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. p. 347.

LUPPI, B. *et al.* Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 381-387, 2010.

MAESTRELLI, F. *et al.* Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 508-518, 2008.

MALOVÍKOVÁ, A.; RINAUDO, M.; MILAS, M. Comparative interactions of magnesium and calcium counterions with polygalacturonic acid. **Biopolymers**, v. 34, p. 1059-1064, 1994.

MARCON, M. V. *et al.* Pectins from Apple Pomace. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 127-129, 2005.

MARÍN, F. R. *et al.* By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. **Food Chemistry**, v. 100, p. 736-741, 2007.

MARTÍN-CABREJAS, M. A. *et al.* Cocoa Hull: A potential source of dietary fibre. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 66, p. 307-311, 1994.

MASMOUDI, M. *et al.* Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 185-192, 2008.

MASTER GARDENER LANDSCAPING OF FORT LAUDERDALE. **Tropical Plants Library Online - Cacao**. Karl Slatner, Owner, Fort Lauderdale, Florida, USA. Disponível em <www.mgonlinestore.com/Cacao/theobroma13.jpg>, acesso em 28 de maio de 2012.

MATEOS-APARICIO, I. *et al.* Multifunctional antioxidant activity of polysaccharide fractions from the soybean byproduct okara. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 245-250, 2010.

MATTHEW, J. A. *et al.* Improvement of the gelation properties of sugarbeet pectin following treatment with an enzyme preparation derived from *Aspergillus niger* - Comparison with a chemical modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 295-306, 1990.

MAXWELL, E. G. *et al.* Pectin - An emerging new bioactive food polysaccharide. **Trends in Food Science & Technology**, v. 24, p. 64-73, 2012.

MAY, C. D. Industrial pectins: sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, p. 79-99, 1990.

MCCANN, M. C. *et al.* Old and new ways to probe plant cell-wall architecture. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 103-113, 1995.

MCCREADY, R. M. Polysaccharides of sugar beet pulp. A review of their chemistry. **Journal of American Society of Sugar Beet Technology**, v. 14, p. 260, 1966.

MELFORD, D. A.; DEY, P. M. Portharvest changes in fruit cell wall. **Advances in Food Research**, v. 30, p. 139-193, 1986.

MELTON, L. D. *et al.* Structural characterization of oligosaccharides isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Research**, v. 146, p. 279-305, 1986.

MICHEL, F. *et al.* Extraction and characterization of pectins from sugar beet. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 1499-1500, 1985.

MIN, B. *et al.* Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3855-3860, 2011.

MIRHOSSEINI, C. P. T. *et al.* Influence of pectin and CMC on physical stability, turbidity loss rate, cloudiness and flavor release of orange beverage emulsion during storage. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 83-91, 2008.

MIYAMOTO, A.; CHANG, K. C. Extraction and Physicochemical Characterization of Pectin from Sunflower Head Residues. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 1439-1443, 1992.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 266-277, 2008.

MOLLEA, C.; CHIAMPO, F.; CONTI, R. Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1353-1356, 2008.

MONSOOR, M. A. Effect of drying methods on the functional properties of soy hull pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 362-367, 2005.

MONTEIRO, L. M. *et al.* Comprimidos Matriciais Preparados com Hidroxipropilmetilcelulose e Pectina contendo Quercetina para Liberação Cólon-específica. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 179-184, 2007.

MORRIS, E. R. *et al.* Characterization of pectin gelation under conditions of low water activity, by circular dichroism, competitive inhibition and mechanical properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 2, p. 327-330, 1980.

MORRIS, E. R. Assembly and rheology of non-starch polysaccharides. In: McCLEARY, B. V.; PROSKY, L. (Eds.). **Advanced Dietary Fiber Technology**. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2008. pp. 30-41.

MORRIS, G. A.; RALET, M. C. A copolymer analysis approach to estimate the neutral sugar distribution of sugar beet pectin using size exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1139-1143, 2012.

MORRIS, V. J. Gelation of polysaccharides. In: MITCHELL, J. R., LEDWARD, D. A. (Eds.) **Functional properties of food macromolecules**. London: Elsevier; 1986. p. 121-170.

MORRISON, I. M. **Polysaccharides: Plant Noncellulosic**. Encyclopedia Of Life Sciences, John Wiley & Sons, 1-11, 2001.

MOYIN-JESU, E. I. Use of plant residues for improving soil fertility, pod nutrients, root growth and pod weight of okra (*Abelmoschus esculentum* L.). **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2057-2064, 2007.

NEIDHART, S.; HANNAK, E.; GIER SCHNER, K. Sol-gel transitions of high-esterified pectins and their molecular structure. In: VORAGEN, F.; SCHOLS, H.; VISSER R. (Eds.), **Advances in pectin and pectinase research**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. pp. 431-448.

NELSON, N. A. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination on glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

O'DONOGHUE, E. M.; SOMERFIELD, S. D. Biochemical and rheological properties of gelling pectic isolates from buttercup squash fruit. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1326-1336, 2008.

O'NEILL, M. A.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. **Pectic substances**. Encyclopedia Of Life Sciences, John Wiley & Sons, 1-11, 2001.

OAKENFULL, D. G. The chemistry of high-methoxyl pectins. In: WALTER, R. H., (Ed.). **The Chemistry and Technology of Pectin**. New York: Academic Press; 1991. pp. 88.

OAKENFULL, D.; SCOTT, A. A hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 1093-1098, 1984.

OFORI-KWAKYE, K.; FELL, J. T. Biphasic drug release: the permeability of films containing pectin, chitosan and HPMC. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 139-145, 2001.

OLADOKUN, M. A. O. Use of cocoa pod husk as fertilizer for maize production. **Nigeria Journal of Agronomy**, v. 1, p. 103-109, 1986.

OOSTERVEELD, A. *et al.* Effect of deacetylation on gelation of sugar beet pectin in the presence of calcium. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 249-256, 2000.

OOSTERVEELD, A. *et al.* Isolation of feruloylated arabinans and rhamnogalacturonans from sugar beet pulp and their gel forming ability by oxidative cross-linking. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 9-17, 2001.

OOSTERVEELD, A.; VORAGEN, A. G. J., SCHOLS, H. A. Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 407-413, 2002.

ORHAN, Z. *et al.* The preparation of ciprofloxacin hydrochloride-loaded chitosan and pectin microspheres. **The Journal of Bone and Joint Surgery (British)**, v. 88-B, p. 270-275, 2006.

OROZCO, T. J.; WANG, J. F.; KEEN, C. L. Chronic consumption of a flavonols- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine in rat testes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 104-110, 2003.

OTTOIMAGE. **Cacaueiro**. Disponível em <http://ottovay.wordpress.com/?s=cacau>. Acesso em 28 de maio de 2012.

OWCZAREK, D. *et al.* Biological therapy of inflammatory bowel disease. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 119, p. 84-88, 2009.

PAGÁN, J.; IBARZ, A. Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 39, p. 193-201, 1999.

PAULL, R. E.; GROSS, K.; QIU, Y. Changes in papaya cell walls during fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 16, p. 79-89, 1999.

PELLERIN, P. *et al.* The pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II is a major component of the polysaccharides present in fruit-derived products. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 67-78.

PÉREZ, S; MAZEAU, K.; DU PENHOAT, C. H. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 37-55, 2000.

PETERSEN, B. O. *et al.* Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy-assignment of reference compounds. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2830-2833, 2008.

PHATAK, L.; CHANG, K. C.; BROWN, G. Isolation and characterization of pectin in sugar-beet pulp. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 830-833, 1988.

PILNIK, W.; VORAGEN, A. G. J. Gelling agents (pectins) from plants for the food industry. In: MORRISON I. M. (Ed.), **Advances in plant and cell biochemistry and biotechnology**. London: Jai Press Ltd., 1992. pp. 219-270.

PINHEIRO, E. R. **Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*): otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PINHEIRO, E.R. *et al.* Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5561-5566, 2008.

PIPPEN, E. L.; MCCREADY, R. M.; OWENS, H. S. Gelation properties of partially acetylated pectins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, p. 813-816, 1950.

POWELL, D. A. *et al.* Conformation and interactions of pectins. II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. **Journal of Molecular Biology**, v. 155, p. 517-531, 1982.

PTITCHKINA, N. M. *et al.* Pumpkin pectin: Gel formation at unusually low concentration. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 265-273, 1994.

QIU, L.-p. *et al.* Investigation of combined effects of independent variables on extraction of pectin from banana peel using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 326-331, 2010.

QURESHI, A. I.; COHEN, R. D. Mesalamine delivery systems: do they really make much difference? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p.281-302, 2005.

RAGHAVENDRA, S. N. *et al.* Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: A source of dietary fiber. **Journal of Food Engineering**, v. 72, p. 281-286, 2006.

REDDY, N.; YANG, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 22-27, 2005.

REDGWELL, R. J. *et al.* Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 81. p. 103-112, 2003.

REDGWELL, R. J.; HANSEN C. E. Isolation and characterization of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. **Planta**, v. 210, p. 823-830, 2000.

REDGWELL, R. J.; TROVATO, V.; CURTI, D. Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. **Food Chemistry**, v. 80, p. 511-516, 2003.

REES, D. A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels networks. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 24, p. 267-332, 1969.

REES, D. A., WIGHT, A. W. Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for α -1,4 galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances. **Journal of the Chemical Society (B)**, p. 1366-1372, 1971.

REIN, D. *et al.* Cocoa inhibits platelet activation and function. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 30-35, 2000.

RENARD, C. M. G. C.; WENDE, G.; BOOTH, E. J. Cell wall phenolics and polysaccharides in different tissues of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 2029-2034, 1999.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

RIDZWAN, B. H. *et al.* Evaluation of cocoa-pod husks on performance of rabbits. **Animal Feed Science and Technology**, v. 40, p. 267-272, 1993.

RINAUDO, M. Physicochemical properties of pectins in solution and gel states. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, 1996, v. 14, p. 20-33.

RODRIGUEZ-CARVAJAL, M. A. *et al.* The three-dimensional structure of the megaoligosaccharide rhamnogalacturonan II monomer: A combined molecular modeling and NMR investigation. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 651-671, 2003.

ROLIN, C. Pectins. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1993. pp. 257-293.

ROLIN, C.; DE VRIES, J. Pectin. In: HARRIS, P. (Ed.). **Food Gels**. London: Elsevier Applied Food Science Series, 1990. pp. 401-432.

ROLIN, C; NIELSEN, B. U.; GLAHN, P. E. Pectin. In: DUMITRIU, S. (Ed.). **Polysaccharides, Structural Diversity and Functional Versatility**; New York: Marcel Dekker Inc, 1998. pp. 377-431.

ROMBOUTS, F. M.; THIBAUT, J.-F. Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 154, p. 177-187, 1986.

ROS, J. M; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Lemon albedo cell walls contain distinct populations of pectic hairy regions. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 159-166, 1998.

ROSÁRIO, M. M. T. **Obtenção e aplicação de xiloglucanas em testes sobre macrófagos peritoneais de camundongo**. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ROSE, J. C. K. *et al.* Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. **Plant Physiology**, v. 117, p. 345-361, 1998.

ROSELL, C. M.; SANTOS, E.; COLLAR, C. Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach. **Food Research International**, v. 42, p. 176-184, 2009.

RUBINSTEIN, A. *et al.* In vitro evaluation of calcium pectinate: A potential colon-specific drug delivery carrier. **Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 258-263, 1993.

SAEMAN, J. F. *et al.* Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi Journal**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SÁENZ, J. M. *et al.* Purification and Some Properties of Pectinesterase from Potato (*Solanum tuberosum* L.) Alpha Cultivar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 393-398, 2000.

SAHARI, M. A.; AKBARIAN, A. M.; HAMED, M. Effect of variety and acid washing method on extraction yield and quality of sunflower head pectin. **Food Chemistry**, v. 83, p. 43-47, 2003.

SATO, Y. *et al.* Effect of water activity and solvent-ordering on intermolecular interaction of high-methoxyl pectins in various sugar solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 527-534, 2004.

SCABIO, A. *et al.*, A Model for Pectin Extraction from Apple Pomace. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 259-265, 2007.

SCHEWE, T.; KÜHN, H.; SIES, H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1825-1829, 2002.

SCHMELTER, T., *et al.* Enzymatic modifications of pectins and the impact on their rheological properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 99-108, 2002.

SCHOLS, H. A. *et al.* Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. **Carbohydrate Research**, v. 275, p. 343-360, 1995.

SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. The chemical structure of pectins. In: SEYMOUR, G. B.; KNOX, J. P. (Eds.). **Pectins and Their Manipulation**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003. p. 1-29.

SELLIN, J. H.; PASRICHA, P. J. Tratamento Farmacológico da Doença Inflamatória Intestinal. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Eds.). **GOODMAN & GILMAN As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11^a. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. pp. 907-916.

SENGKHAMPARN, N. *et al.* Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and alpha-linked galactosyl groups. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1842-1851, 2009.

SENGKHAMPARN, N. *et al.* Physicochemical properties of pectins from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 35-41, 2010.

SERENA, A.; KNUDSEN, K. E. B. Chemical and physicochemical characterization of co-products from the vegetable food and agro industries. **Animal Feed Science and Technology**, v. 139, p. 109-124, 2007.

SHARMA; S. K.; LIPTAY, A.; LE MAGUER, M. Molecular characterization, physicochemical and functional properties of tomato fruit pectin. **Food Research International**, v. 30, p. 543-547, 1998.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SINGTHONG, J. *et al.* Extraction and physicochemical characterization of Krueo Ma Noy pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 793-801, 2005.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p.19-38, 2001.

SMIT, C. G. B., BRYANT, E. F. Ester content and jelly pH influences on the grade of pectins. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 262-264, 1968.

SMITH, O. B.; ADEGBOLA, A. A. Studies on the feeding value of agro-industrial byproducts and the feeding value of cocoa pods for cattle. **Tropical Animal Production**, v. 7, p. 290-295, 1982.

SMITH, O. B.; ADEGBOLA, A. A. Studies on the feeding value of agro-industrial byproducts. III. Digestibility of cocoa-pod and cocoa-pod-based diets by ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 13, p. 249-254, 1985.

SOBAMIWA, O.; LONGE, O. G. Utilization of cocoa-pod pericarp fractions in broiler chick diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 47, p. 237-244, 1994.

SONU, I. *et al.* Clinical pharmacology of 5-ASA compounds in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 39, p. 559-599, 2010.

SOUSA, T. *et al.* The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 1-25, 2008.

SOUTO-MAIOR, J. P. A. *et al.* Avaliação da pectina fosfatada aplicada na formação de filmes isolados. Material candidato a novos sistemas para liberação modificada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 203-213, 2008.

SPELLMAN, M. W. *et al.* Isolation and characterization of 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylose, a naturally occurring, branched side-chain, acidic monosaccharide. **Carbohydrate Research**, v.122, p. 115-129, 1983.

SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R. A. A novel gel formation method, microstructure and mechanical properties of calcium polysaccharide gel films. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 72-80, 2006.

SRIAMORNSAK, P.; NUNTHANID, J. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 160, p. 207-212, 1998.

SRIAMORNSAK, P.; PUTTIPIPAKHACHORN, S.; PRAKONGPAN, S. Calcium pectinate gel coated pellets as an alternative carrier to calcium pectinate beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p. 189-194, 1997.

STEVENSON, T. T.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. 3-Deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell wall. **Journal of Plant Physiology**, v. 46, p. 739-744, 1988.

STRÖM, A. *et al.* Influence of pectin fine structure on the mechanical properties of calcium-pectin and acid-pectin gels. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2668-2674, 2007.

STULZER, H. K. *et al.* Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 387-392, 2009.

TAMAKI, Y. *et al.* Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 352-361, 2008.

TAYLOR, R. L; CONRAD, H. E. Stoichiometric Depolymerization of Polyuronides and Glycosaminoglycuronans to Monosaccharides following Reduction of Their Carbodiimide-Activated Carboxyl Groups. **Biochemistry**, v. 11, p. 1383-1389, 1972.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin - a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 47-73, 1997.

THE MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 13th. Ed. Whitehouse Station: Merck, 2001.

THEUWISSEN, E.; MENSINK, R. P. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. **Physiology & Behavior**, v. 94, p. 285-292, 2008.

THIBAULT, J.-F. Some physicochemical properties of sugar-beet pectins modified by oxidative cross-linking. **Carbohydrate Research**, v. 155, p. 183-192, 1986.

THIBAULT, J.-F.; GUILLON, F.; ROMBOUTS, F. M. Gelation of sugar beet pectin by oxidative coupling. In: WALTER, R. H. (Ed.), **The chemistry and technology of pectin**. San Diego: Academic Press, 1991, pp. 119-133.

THIBAULT, J.-F.; RALET, M.-C. Pectins, their origin, structure and functions. In: McCLEARY, B. V.; PROSKY, L. (Eds.). **Advanced Dietary Fiber Technology**. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2001. pp. 369-378.

THIBAULT, J. F.; RINAUDO, M. Chain association of pectic molecules during calcium-induced gelation. **Biopolymers**, v. 25, p. 455-468, 1986.

TSOGA, A.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Role of cosolutes in gelation of high-methoxyl pectin. Part 1. Comparison of sugars and polyols. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 907-919, 2004.

TURKOGLU, M.; UGURLU, T. *In vitro* evaluation of Pectin-HPMC compression coated 5-aminosalicylic acid tablets for colonic delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 65-73, 2002.

TURQUOIS, T. *et al.* Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: Influence of extrinsic parameters on their gelling properties. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 255-262, 1999.

UGURLU, T. *et al.* Colonic delivery of compression coated nisin tablets using pectin/HPMC polymer mixture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 202-210, 2007.

VAN BUREN, J. P. Function of pectin in plant tissue structure and firmness. In: WALTER, R. H. (Ed.). **The Chemistry and Technology of Pectin**. San Diego: Academic Press Inc., 1991. p. 1-22.

VIDAL, S. *et al.* Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: Evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. **Carbohydrate Research**, v. 326, p. 277-294, 2000.

VIRK, B. S.; SOGI, D. S. Extraction and Characterization of Pectin from Apple (*Malus pumila* Cv Amri) Peel Waste. **International Journal of Food Properties**, v. 7, p. 693-703, 2004.

VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. **Pectins and pectinases, Progress in Biotechnology**. v. 14. Amsterdam: Elsevier, 1996.

VORAGEN, A. G. J. *et al.* Pectins. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 287-340.

VRIESMANN, L. C. **Extração, caracterização e aspectos reológicos de polissacarídeos da polpa dos frutos de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu)** 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): structural characterization of a pectic fraction, **Carbohydrate Polymers**, 2009, v. 77, p. 72-79.

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 312-317, 2010.

WAI, W. W.; ALKARKHI, A. F.; EASA, A. M. Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 209-214, 2010.

WALKINSHAW, M. D.; ARNOTT, S. Conformations and interactions of pectins: II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. **Journal of Molecular Biology**, v. 153, p. 1075-1085, 1981.

WAN, Y. *et al.* Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 596-602, 2001.

WANG, S. *et al.* Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 693-700, 2007.

WATERHOUSE, E. T.; WASHINGTON, C.; WASHINGTON, N. An investigation into the efficacy of the pectin based anti-reflux formulation-Aflurax. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 209, p.79-85, 2000.

WAWER, I.; WOLNIAK, M.; PARADOWSKA, K. Solid state NMR study of dietary fiber powders from aronia, bilberry, black currant and apple. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 30, p. 106-113, 2006.

WEI, X. *et al.* Sigmoidal release of indomethacin from pectin matrix tablets: Effect of in situ crosslinking by calcium cations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, p. 132-138, 2006.

WESTERENG, B. *et al.* Effects of extraction conditions on the chemical structure and biological activity of white cabbage pectin, **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 32-42, 2008.

WHISTLER, R. L.; MASAK JR, E.; PLUNKETT, R. A. Cacao polysaccharides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, p. 2851-2853, 1956.

WILLATS, W. G. T. *et al.* Pectins: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 9-27, 2001.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Introduction of food hydrocolloids. In: WILLIAMS, P. A., PHILLIPS, G. O. (Eds.), **Handbook of hydrocolloids**. USA: CRC Press, 2000, pp. 1-19.

WILLIAMSON, G. *et al.* Gelation of sugarbeet and citrus pectins using enzymes extracted from orange peels. **Carbohydrate Polymers**, v. 13, p. 387-397, 1990.

WISWEDEL, I. *et al.* Flavanol-rich cocoa drink lowers plasma F2-isoprostane concentrations in humans. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 37, 411-421, 2004.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 211, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydrate. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65, 1963b.

WONG, T. W.; NURJAYA, S. Drug release property of chitosan-pectinate beads and its changes under the influence of microwave. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 176-188, 2008.

WROLSTAD, R. *et al.* **Handbook of Food Analytical Chemistry, Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates**. Hoboken, New Jersey:Wiley-Interscience, 2005.

WU, B. *et al.* Biphasic release of indomethacin from HPMC/pectin/calcium matrix tablet: II. Influencing variables, stability and pharmacokinetics in dogs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 294-302, 2008.

YAMAGISHI, M. *et al.* Antimutagenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols on the mutagenic action of heterocyclic amines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5074-5078, 2000.

YANG, L.; CHU, J. S.; FIX, J. A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 1-15, 2002.

YAPO, B. M. Biochemical Characteristics and Gelling Capacity of Pectin from Yellow Passion Fruit Rind as Affected by Acid Extractant Nature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1572-1578, 2009a.

YAPO, B. M. Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. **Food Research International**, v. 42, p. 1197-1202, 2009b.

YAPO, B. M. *et al.* Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1356-1364, 2007b.

YAPO, B. M. *et al.* Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogeneous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 426-435, 2007a.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow Passion Fruit Rind-A Potential Source of Low-Methoxyl Pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2738-2744, 2006.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Dietary Fiber Components in Yellow Passion Fruit Rind - A Potential Fiber Source. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5880-5883, 2008.

YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 373-385, 2011.

YE, M. B.; LIM, B. O. Dietary Pectin Regulates the Levels of Inflammatory Cytokines and Immunoglobulins in Interleukin-10 Knockout Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 11281-11286, 2010.

YORK, W. S. *et al.* 3-Deoxyl-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. **Carbohydrate Research**, v. 138, p. 109-126, 1985.

YU, C.-H. *et al.* Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, p. 245-249, 2009.

YU, L. *et al.* Rhamnogalacturonan I domains from ginseng pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 811-817, 2010.

ZHENG, X-Q. *et al.* Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 363-369, 2004.

APÊNDICE

ARTIGOS PUBLICADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESTE TRABALHO ATÉ A DATA DA DEFESA:

VRIESMANN, L. C.; AMBONI, R. D. M. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1173-1181, 2011.

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, p. 1230-1236, 2011.

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, p. 108-116, 2012.