

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE FRANCIELLE FRACASSO

MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE PECTINA CÍTRICA: IMPLICAÇÕES ESTRUTURAIS,
FÍSICAS E REOLÓGICAS

CURITIBA
2015

ALINE FRANCIELLE FRACASSO

**MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE PECTINA CÍTRICA: IMPLICAÇÕES ESTRUTURAIS,
FÍSICAS E REOLÓGICAS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Alimentos no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk.

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

CURITIBA
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

F797m Fracasso, Aline Francielle
Modificação química de pectina cítrica: implicações estruturais, físicas e reológicas / Aline Francielle Fracasso. – Curitiba, 2015.
85 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2015.

Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk.
Coorientadora: Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz.
<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.060>

1. Modificação química. 2. Propriedades estruturais. 3. Viscosidade. I. Universidade Federal do Paraná. II. Haminiuk, Charles Windson Isidoro. III. Petkowicz, Carmen Lúcia de Oliveira. IV. Título.

CDD: 541.39

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

ALINE FRANCIELLE FRACASSO

**MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE PECTINA CÍTRICA E
IMPLICAÇÕES ESTRUTURAIS, FÍSICAS E REOLÓGICAS**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK
Campus Curitiba, UTFPR


Prof. Dr. BOGDAN DEMCZUK JÚNIOR
Campus Campo Mourão, UTFPR


Prof.^a Dr.^a. LÚCIA CRISTINA VRIESMANN
Setor de Ciências Biológicas, UFPR


Prof.^a Dr.^a. MARIA LUCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof.^a Dr.^a. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 08 de outubro de 2015.

Dedico esse trabalho aos meus amados pais, Paulo Ricardo Fracasso e Ilda Pessini Fracasso, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando, por todo amor e carinho que sempre me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, sem explicação cabível.

Meus pais amados, Paulo Ricardo Fracasso e Ilda Pessini Fracasso, se há algo que faz diferença na formação da personalidade e na vida de uma pessoa é o amor que ela recebe. Vocês me educaram com amor, dedicaram-se à minha educação como ser humano, deram-me amor. Vocês fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e eu só tenho motivos para agradecer, mesmo nos momentos em que vocês precisaram ser duros, vocês fizeram isso com amor e com respeito. Vocês nunca usaram de autoridade comigo para me ensinar nada pela dor, vocês sempre usaram as vias do amor. E isso fez de mim uma pessoa compreensiva e com sensibilidade para com o outro. Mais do que a educação formal que vocês me ofereceram e que sempre se esforçaram para ser a melhor, a formação humana foi o que de mais importante vocês fizeram por mim. Eu só posso retribuir tentando ser a melhor filha que pais como vocês merecem ter. Sou e serei eternamente grata por tudo que vocês dedicaram a mim. Eu tenho muito orgulho de ser filha de vocês e muita admiração pelos pais que tenho. Obrigado por tudo. Amo muito vocês!

Ao meu orientador professor Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk pelo incentivo, apoio, paciência, ensinamentos e por ter acreditado em mim.

A professora Dr^a Carmem Lúcia de Oliveira Petkowicz por toda ajuda prestada, por ter me recebido em seu laboratório e ter permitido a realização da parte experimental desse projeto, pela confiança, incentivo, amizade, aprendizado que foram muitos, pelos conselhos valiosos e conversas sempre agradáveis, produtivas e pela valiosa contribuição neste projeto.

Aos membros da banca de pré-defesa e defesa: Prof^a Dr^a Rosemary Ribani, prof. Dr. Bogdan, Prof^a Dr^a Maria Lúcia Masson, a Prof^a Dr^a Lúcia Vriesmann pelas contribuições e sugestões valiosas que deram a este trabalho.

Agradeço as técnicas Rosane e Elisângela do Departamento da Bioquímica.

Todo meu amor e carinho as minhas amigas do laboratório 259 da Bioquímica Marília Locatelli e Cristiane Colodel, isso inclui a Samantha Kienteka, Luana M. Martins de Melo e Ana Mery nossa parceria sempre maravilhosa, conversas intermináveis, nossas festinhas, cafés da manhã, almoços, jantares, obrigada pela amizade e apoio de sempre. Por vocês e com vocês os meus dias foram ainda mais especiais e alegres, e o carinho demonstrado das mais variadas formas, aqueceram o meu coração e colocaram vários sorrisos em meu rosto. Quem tem amigas como vocês, tem a certeza da alegria, do amor, do conforto da amizade sincera. De coração, eu agradeço a todas vocês!

As meus amigos queridos do programa PPGEAL, alguns já saíram e outros permanecem: Giovanna Doná, Lizandra Savi, Priscila Muller, Eduarda Molardi, Érika Vasques, Camila Perussello, Caroline Goltz, Daniela Sampaio, Cintia Misugi, Gerson Teixeira, Thiago Takashina, Heron Faggion sempre muito atenciosos, carinhosos e prontos para ouvir e dar conselhos valiosos, pela amizade e por sempre estarem por perto. E a todos os amigos do programa que estiveram presentes no período de disciplinas, de execução do projeto, seminários, congressos e comemorações no laboratório. O tempo de mestrado e doutorado não teria sido tão proveitoso se vocês não estivessem comigo.

Minhas amadas amigas (os) Cátia Frizon, Danielle Carpiné, Marlene Bampi, Clarice Marchese, João Dagostin e Rodrigo Secchi: Somos a versão mais profunda das pessoas que se querem bem, que se estimam verdadeiramente, que se respeitam. Nossa amizade está baseada na cumplicidade dos momentos que sempre dividimos. A amizade é um sentimento concreto, absoluto e sem igual. Somente aqueles que entendem o valor de uma sincera amizade são capazes de saber o que se passa no coração do seu próximo. Com ela, aprendemos a amar e a perdoar, dar sem receber, semear a esperança sem dar-se conta do que se faz... E sabe por que tudo isso acontece? Porque onde há fé e esperança, sonho sem sair da realidade, há amor, compaixão e o mais importante: pureza de espírito! Não tenho palavras para descrever nossa amizade, vocês são diamantes preciosos que apareceram em minha vida e vou guardar para sempre em meu coração, muito obrigada! Agradeço o carinho sincero e a amizade verdadeira, através da eternidade estaremos unidos pelo carinho e benção de Deus.

Ao LAMIR, por ter realizado análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando Evelin Farias Silva, minha prima Elisiane Roper Piscini e ao querido professor José Manoel que não está mais presente entre nós, mas sempre em minha memória e no meu coração, meu muito obrigada.

Ao departamento da química por permitir que realizasse as análises de FT-IR.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) por possibilitar que eu realizasse esta pesquisa e o doutorado.

Ao secretário Paulo Krainski pela assistência com as questões burocráticas, pelas várias conversas e amizade.

A empresa CPKelco de Limeira SP por ter concedido as amostras de pectinas cítricas.

Enfim, agradeço a todos aqueles, que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta conquista.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar as modificações físicas, estruturais e reológicas causadas pelo processo de modificação química da pectina cítrica. Assim sendo, três pectinas cítricas comerciais com diferentes graus de esterificação foram modificadas quimicamente por um processo sequencial alcalino e hidrolítico para produzir pectina cítrica modificada (MCP) com propriedades especiais. A massa molar (M_w), o grau de esterificação (DE), a composição de monossacarídeos, RMN ^{13}C , homogeneidade, morfologia e o comportamento reológico das pectinas cítricas nativas e modificadas foram investigadas. A modificação química reduziu o teor de ácido urônico (até 28,3%) e a massa molar (até 29,98%), contudo, mostrou pouca influência no grau de esterificação das pectinas nativas. As pectinas cítricas modificadas apresentaram maiores quantidades de monossacarídeos neutros, principalmente galactose, arabinose e ramnose, típicos da região ramnogalacturonana (RG-I). Os testes reológicos indicaram que as pectinas nativas e modificadas apresentaram comportamento pseudoplástico, no entanto, as amostras de MCP foram menos viscosas, em comparação com as nativas. As amostras modificadas apresentaram melhor dissolução em água e géis menos fracos, com boa estabilidade durante cisalhamento oscilatório em 25 °C. Este estudo tem como objetivo compreender melhor as implicações que as modificações químicas podem impor à estrutura das pectinas cítricas.

Palavras-chave: modificação química, propriedades estruturais, viscosidade.

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the physical, structural and rheological modifications caused by the chemical modification process of citrus pectin. Therefore, three commercial citrus pectins with different degree of esterification were chemically modified by sequential alkali and acidic hydrolytic process to produce modified citrus pectins (MCP) with special properties. The molar mass (M_w), degree of esterification (DE), monosaccharide composition, ^{13}C NMR spectra, homogeneity, morphology (SEM) and rheological behavior of both native and modified citrus pectins (MCP) were investigated. The chemical modification reduced the acid uronic content (up to 28.3%) and molar mass (up to 29.98%), however, showed little influence on the degree of esterification of native pectins. Modified citrus pectins presented higher amounts of neutral monosaccharides, mainly galactose, arabinose and rhamnose, typical of the Ramnogalacturonana-I (RG-I) region. Rheological tests indicated that the native and modified citrus pectins presented pseudoplastic behavior, however, the MCP samples were less viscous, compared to the native ones. Modified samples presented better dissolution in water and less strong gels, with good stability during oscillatory shearing at 25 °C. This study aims to better understand the implications that chemical modifications may impose on the structure of citrus pectins.

Keywords: chemical modification; structural properties; viscosity.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO TÍPICA DE DUAS PECTINAS COMERCIAIS (COMPOSIÇÃO REPRESENTADA EM % DE MASSA SECA)	22
TABELA 2 – TEOR DE PECTINAS DE ALGUNS FRUTOS	23
TABELA 3 – EQUAÇÕES DOS MODELOS REOLÓGICOS.....	33
TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS PECTINAS CÍTRICAS NATIVAS E MODIFICADAS.....	41
TABELA 5 – GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DAS PECTINAS NATIVAS E MODIFICADAS (MCP).....	45
TABELA 6 – MASSA MOLAR DAS AMOSTRAS DE PECTINAS NATIVAS E MODIFICADAS.....	58
TABELA 7 – AJUSTES DOS DADOS REOLÓGICOS DAS AMOSTRAS DE PECTINAS NATIVAS E MODIFICADA PELO MODELO LEI DA POTÊNCIA	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CADEIA DE PECTINA.....	18
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS PECTINAS	20
FIGURA 3 – MECANISMOS MAIS COMUNS DE DEGRADAÇÃO DAS PECTINAS	27
FIGURA 4 – CLASSIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE FLUIDOS.....	32
FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DAS ANÁLISES	34
FIGURA 6 – ESPECTROS FT-IR DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (A) S2N - NATIVA E (B) S2MCP – MODIFICADA.....	47
FIGURA 7 – ESPECTROS FT-IR DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (C) S1N - NATIVA E (D) S1MCP – MODIFICADA .	47
FIGURA 8 – ESPECTROS FT-IR DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (E) SN - NATIVA E (F) SMCP – MODIFICADA	48
FIGURA 9 – ESPECTROS FT-IR DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (A) S2, S1 E S NATIVA E (B) S2, S1 E SMCP - MODIFICADAS	49
FIGURA 10 – ESPECTROS DE ¹³ C RMN (70°C, 100 MHz) PARA AS PECTINAS CÍTRICAS: (A) S1 NATIVA, (B) S1 MODIFICADA, (C) S NATIVA, (D) S MODIFICADA, (E) S2 NATIVA, (F) S2 MODIFICADA. SOLVENTE D ₂ O.....	52

FIGURA 11 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DAS PECTINAS CÍTRICAS: (a) S1 NATIVA, (b) S1 MODIFICADA, (c) S NATIVA, (d) S MODIFICADA, (e) S2 NATIVA, (f) S2 MODIFICADA..... 57

FIGURA 12 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (A) S1 NATIVA; (B) S1 MODIFICADA; (C) S NATIVA; (D) S MODIFICADA; (E) S2 NATIVA; (F) S2 MODIFICADA.....61

FIGURA 13 – CURVAS DE FLUXO DAS SOLUÇÕES AQUOSAS NA CONCENTRAÇÃO DE $5 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ DAS AMOSTRAS DE PECTINAS NATIVAS: S1N, S2N E SN E DAS AMOSTRAS DE PECTINAS MODIFICADAS: S1MCP, S2MCP E SMCP, AJUSTADAS PELO MODELO LEI DA POTÊNCIA.....65

FIGURA 14 – MÓDULOS DE ARMAZENAMENTO G' E MÓDULOS DE PERDA G'' EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA AS PECTINAS NATIVAS (N) E MODIFICADAS (MCP): (A) S1N – AMOSTRA NATIVA 1, S1MCP – AMOSTRA 1, PECTINA CÍTRICA MODIFICADA (B) S2N – AMOSTRA 2 NATIVA, S2MCP - AMOSTRA 2 PECTINA CÍTRICA MODIFICADA E (C) SN – NATIVA PADRÃO, SMCP – PECTINA CÍTRICA MODIFICADA PADRÃO.....68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ	-	Deslocamento Químico
η_{ap}	-	Viscosidade aparente
$\dot{\gamma}$	-	Taxa de cisalhamento
τ	-	Tensão de cisalhamento
Ara	-	Arabinose
DE	-	Grau de esterificação
D ₂ O	-	Óxido de deutério
FT-IR	-	Infravermelho com transformada de Fourier
Fuc	-	Fucose
G'	-	Módulo de Cisalhamento elástico ou módulo de armazenamento
G''	-	Módulo de Cisalhamento viscoso ou módulo de perda
Gal	-	Galactose
GalA	-	Ácido galacturônico
Glc	-	Glucose
GLC	-	Cromatografia Líquida-gasosa
HG	-	Homogalacturonana
HPSEC	-	Cromatografia de exclusão estérica de alta performance
HM	-	Pectinas com grau de esterificação superior a 50%
LM	-	Pectinas com grau de esterificação inferior a 50%
KBr	-	Brometo de potássio
Man	-	Manose
MALLS	-	Detector de espalhamento de luz laser multiângulos
MCP	-	Pectina Cítrica Modificada
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
M _w	-	Massa molecular ponderal
NaBH ₄	-	Boroidreto de sódio
Rha	-	Ramnose
RG	-	Ramnogalaturonana

- RG - I - Ramnogalacturonana do tipo I
- RG-II - Ramnogalacturonana do tipo II
- RI - Detector de índice de refração diferencial
- RMN - Ressonância magnética nuclear
- SN - Amostra de pectina cítrica Nativa da Sigma
- S1N - Amostra de pectina cítrica Nativa com grau de esterificação de 69,0
- S2N - Amostra de pectina cítrica Nativa com grau de esterificação de 58,4
- SMCP - Amostra de pectina cítrica Modificada da Sigma
- S1MCP - Amostra de pectina cítrica Modificada com grau de esterificação de 69,0
- S2MCP - Amostra de pectina cítrica Modificada com grau de esterificação de 58,4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo Geral	17
1.1.2 Objetivos Específicos	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 PECTINAS	18
2.1.1 Fontes de pectinas	21
2.1.2 Aplicações e propriedades funcionais das pectinas	23
2.1.3 Gelificação das pectinas.....	24
2.1.4 Modificação química das pectinas.....	25
2.2 REOLOGIA.....	29
2.2.1 Modelos reológicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 MATÉRIA PRIMA	35
3.1.1 Purificação das pectinas cítricas comerciais nativas	35
3.2 ANÁLISES QUÍMICAS	35
3.2.1 Modificação da pectina cítrica	35
3.2.2 Dosagem de ácidos urônicos	36
3.2.3 Determinação da Composição Monossacarídica	36
3.2.4 Determinação da Homogeneidade e massa molar (Mw).....	37
3.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de C ¹³ (¹³ C-RMN)	37
3.2.6 Determinação do Grau de Esterificação das Pectinas – FT-IR	37
3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA	38
3.3.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
3.4 REOLOGIA	38
3.4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES REOLÓGICAS.....	38
3.4.2 Análises reológicas	39
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS PECTINAS NATIVAS E MODIFICADAS	41
4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	45
4.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN C ¹³)	50
4.4 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E DE MASSA MOLAR POR HPSEC-MALLS E MODIFICAÇÃO QUÍMICA	55
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS PECTINAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV	60
4.6 ANÁLISES REOLÓGICAS (REGIME NÃO-OSCILATÓRIO E OSCILATÓRIO).....	64
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

As pectinas apresentam uma cadeia estruturalmente complexa, constituída principalmente pelo ácido galacturônico e por outros açúcares neutros nas cadeias laterais. Desempenham várias funções estruturais e funcionais e são muito empregadas como agentes estabilizantes e como agentes gelificantes em uma grande variedade de alimentos e bebidas.

O maior constituinte da pectina é a homogalacturonana (HG), um polímero de unidades de ácido α -D-galacturônico parcialmente metil-esterificados em C-6, unidos por ligação do tipo (1 \rightarrow 4). A pectina contém também outros elementos estruturais, tais como a ramnogalacturonana I (RG-I) e a ramnogalacturonana II (RG-II), xilogalacturonana, arabinana e arabinogalactana (MOHNEN, 2008; ZHANG *et al.*, 2015). As pectinas comerciais são classificadas de acordo com o grau de metoxilação: pectinas com alto grau de metoxilação (HM), as quais possuem $\geq 50\%$ de grupos carboxílicos metil-esterificados, e formam gel na presença de açúcar e em pH menor ou igual a 3,5, e pectinas com baixo grau de metoxilação (LM), as quais possuem $< 50\%$ de grupos carboxílicos metil-esterificados, e formam gel na presença de íons cálcio e em pH menor que 6 (KAZMIERI, WICKER e CORREDIG, 2003; RASCÓN-CHU *et al.*, 2009). Sendo assim, o padrão de metil-esterificação tem implicações comerciais importantes devido ao seu impacto sobre as propriedades físico-químicas das pectinas (DUVETTER *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2014).

A pectina cítrica modificada (MCP) é um polissacarídeo solúvel em água obtido a partir da casca e de frutas cítricas e modificado por meio de tratamento a pH e temperaturas elevadas, onde ocorre a quebra da sua cadeia em fragmentos menores, que de acordo com a literatura seriam absorvidos pelo organismo (CHOURASIA e JAIN, 2004; GLINSKY e RAZ, 2009; MAXWELL *et al.*, 2012; NANGIA-MAKKER *et al.*, 2002). A MCP é um suplemento dietético disponível comercialmente e produzido pela hidrólise das pectinas, produzindo uma mistura de ácido galacturônico e oligossacarídeos ricos em arabinose e galactose (COURTS, 2013). Além disso, possui elevada afinidade de ligação

com as glectinas da superfície das células cancerígenas, inibindo a agregação de células do câncer e as metástases (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2002). Muitos autores relatam a importância da pectina modificada (MAXWELL *et al.*, 2012; NANGIA-MAKKER *et al.*, 2002; WAI, ALKARKHI e EASA, 2010; YAN e KATZ, 2010), porém há poucos estudos que discutam as suas características e propriedades.

Na literatura, são relatados poucos estudos que se aproximam das propriedades estruturais, físicas e reológicas das pectinas cítricas por modificações químicas usando técnicas analíticas avançadas. O conhecimento sobre as propriedades das MCPs amplia sua aplicabilidade, especialmente nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar a modificação química por tratamento alcalino de pectinas cítricas comerciais e avaliar suas propriedades e características físicas, químicas e reológicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar a modificação química por tratamento alcalino de pectinas cítricas de origem comercial e avaliar suas propriedades e características químicas, físicas e reológicas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Modificar quimicamente as pectinas cítricas nativas de origem comercial;
- Caracterizar as pectinas nativas e modificadas através da determinação da massa molecular média (M_w);
- Caracterizar as pectinas nativas e modificadas quanto à composição monossacarídica;
- Analisar as pectinas nativas e modificadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR);
- Analisar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras de pectinas nativas e modificadas;
- Caracterizar o comportamento reológico das pectinas nativas e modificadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PECTINAS

A pectina é um dos principais componentes da parede celular e a mais complexa macromolécula na natureza, refere-se a uma família de oligossacarídeos e polissacarídeos, com características comuns, mas extremamente diversos em sua estrutura fina. Sabe-se que a estrutura fina das pectinas pode ser altamente heterogênea entre diferentes tipos de plantas, entre tecidos e até mesmo dentro de uma única parede celular. O esqueleto péctico é primariamente um homopolímero de ácido galacturônico unidos por ligações α (1 \rightarrow 4), com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados, como mostra a Figura 1 (KRAVTCHENKO, VORAGEN e PILNIK, 1992; PÉREZ, RODRÍGUES-CARVAJAL e DOCO, 2003; RIDLEY, O'NEILL e MOHNEN, 2001; TSOGA, RICHARDSON e MORRIS, 2004; VORAGEN *et al.*, 1995; VORAGEN *et al.*, 2009; WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006).

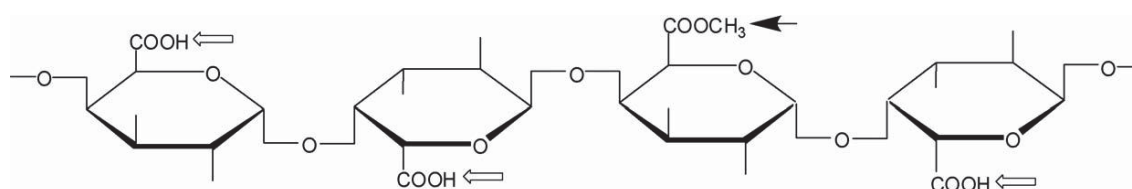


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CADEIA DE PECTINA.

FONTE: ADAPTADO DE CHEN *et al.*, 2006.

Nota: A seta fechada indica o grupo carboxílico esterificado e a seta aberta indica Grupos carboxílicos não-esterificados.

Embora a pectina ocorra na maioria das paredes celulares da planta, é mais abundante em frutos cítricos (lima, limão e laranja) e a estrutura química da pectina varia dependendo da espécie da fruta e também depende das diferentes fases durante o desenvolvimento do fruto (CHEN *et al.*, 2006). De acordo com Bemiller (1986) as pectinas provindas dos tecidos das plantas apresentam grau de esterificação por volta de 60-90%.

O ácido galacturônico (GalA) é o componente principal das três principais frações das pectinas, a Homogalacturonana (HG), a mais abundante nas pectinas, polímero linear ligados α -(1→4) de unidades de ácido galacturônico e podem ser metil-esterificados em C-6 e O-acetilado em O-2 ou O-3 (WICKER *et al.*, 2014, YAPO, 2011). Segundo Voragen *et al.* (2009) é necessário ressaltar que não é só a quantidade de metil-esterificação que é importante, mas também a distribuição desses ésteres ao longo do polímero.

A Xilogalacturonana é um polímero de homogalacturonana substituído nas cadeias laterais por uma unidade de β -D-Xylp (1 → 3). Algumas unidades de GalA estão metil-esterificado e os metil-ésteres estão distribuídos entre as unidades de GalA substituídos e não substituídos (SCHOLS *et al.*, 1995). A apiogalacturonana (API) é uma cadeia de HG substituída em O-2 ou O-3 com D-apiofuranose (MOHNEN, 2008).

O segundo componente mais abundante é a Ramnogalacturonana I (RG-I) que apresenta uma cadeia principal de unidades de ácido D-galacturônico ligados α -(1→4) e unidades de ramnose ligadas α -(1→2), às quais estão conectadas cadeias laterais formadas por açúcares neutros (galactose, arabinose, glucose, entre outros açúcares) (SCHMELTER *et al.*, 2002). Tem também as regiões xilogalacturonanas e arabinogalactanas I e II (WICKER *et al.*, 2014, YAPO, 2011). Segundo Kravtchenko, Voragen e Pilnik (1992), as unidades GalA da RG-I são provavelmente não-esterificados, pois a ramnogalacturonana não é degradada em condições de β -eliminação.

A arabinogalactana I (ARA-I) é composta de uma cadeia principal de β -1,4-D-Galp com unidades de α -L-Araf ligados em O-3 de unidades de galactose. E a arabinogalactana II (ARA-II) é composta de uma cadeia principal de β -1,3-D-Galp, contendo pequenas cadeias laterais de α -L-Araf-(1 → 6)-[β -D-Galp-(1 → 6)]_n, onde n=1, 2 e 3. Nas cadeias laterais as unidades de galactose podem ser substituídas com unidades de α -L-Araf-(1 → 3), e está associada principalmente com as proteínas e podem ser chamadas também de proteínas arabinogalactanas (VORAGEN *et al.*, 2009).

A Ramnogalacturonana (RG-II) tem uma cadeia principal de HG com cadeias laterais complexas ligadas as unidade de GalA (GULLÓN *et al.*, 2013),

também se caracteriza por ter presentes açúcares raros como fucose, xilose, apiose e ácido acérico, e açúcares comuns como arabinose, glucose e GalA (WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006). A representação da estrutura das pectinas estão esquematizadas na Figura 2.

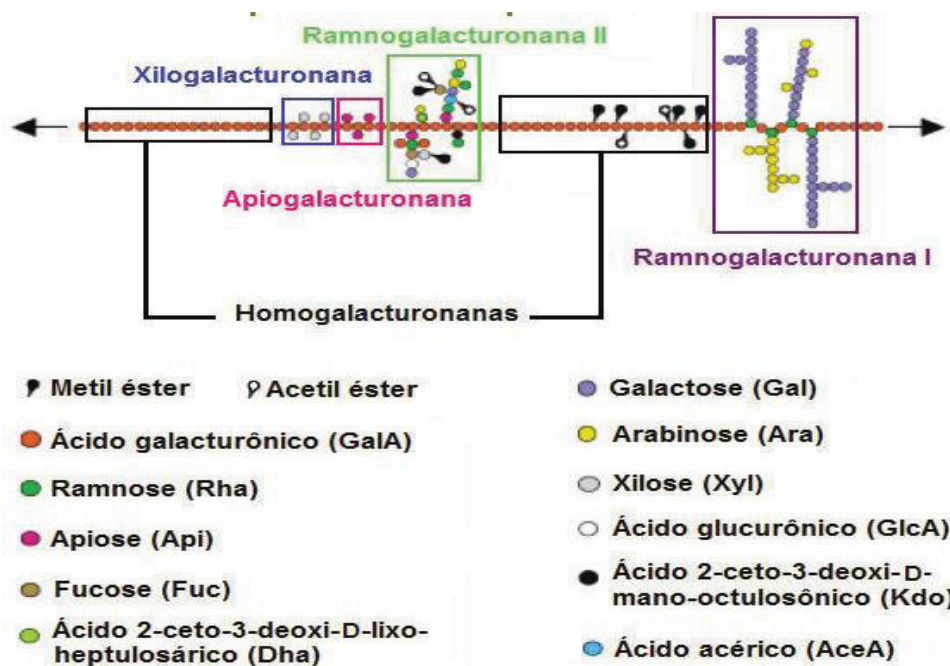


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DAS PECTINAS.
FONTE: VRIESMANN (2012), ADAPTADO DE WILLATS, KNOX e MIKKELSEN (2006)

Um dos fatores mais importantes que definem as propriedades funcionais da pectina é o grau de esterificação (DE). Com base no grau de esterificação a pectina pode ser subdividida em dois grupos: pectinas de baixo grau de esterificação (LM) com DE < 50% e pectinas com alto grau de esterificação (HM) com DE > 50%. LM pode formar gel sob condições ácidas na presença de concentrações altas de açúcares (EVAGELIOU, RICHARDSON e MORRIS, 2000). Por outro lado, HM forma géis por interação com cátions divalentes, principalmente Ca^{2+} , entre grupos carboxílicos livres (CARDOSO, COIMBRA e SILVA, 2003). As pectinas com alto grau de esterificação possuem poder gelificante considerável e são muito utilizadas na gelificação de geleias.

A presença de cadeias laterais, principalmente de unidades de arabinose e galactose, afeta significativamente as propriedades funcionais das pectinas, tais como solubilidade, gelificação, gelatinização, estabilidade de congelamento e descongelamento, formação de filme e propriedades de interação e reológicas (HWANG e KOKINI, 1991).

Segundo Venzon *et al.* (2015), a estrutura química da pectina varia de acordo com a fonte, fatores ambientais, condições de extração e técnicas de modificação, que afetam o rendimento da pectina e suas características moleculares, tais como o grau de esterificação, o conteúdo de ácido galacturônico, massa molar e comportamento reológico. Devido a essa complexidade e variabilidade em sua estrutura, faz de sua caracterização uma tarefa difícil e de extrema importância.

2.1.1 Fontes de pectinas

As pectinas cítricas foram reconhecidas em 1934, como cadeias lineares de ácido galacturônico e desde então, evidenciou-se que a pectina é uma molécula altamente complexa e o recente desafio é acomodar toda informação disponível em um único modelo estrutural (VORAGEN *et al.*, 2009).

A produção industrial de pectina cítrica teve início no Brasil no ano de 1954, na cidade de Limeira, São Paulo, idealizada por um químico industrial italiano, na empresa Citropectina. Essa mesma indústria alterou o nome para Braspectina, em 1985, passou a Citrus Colloids S/A, em 1993 e, quando adquirida pelo grupo Hércules, em 1998, foi denominada CPKelco (RIBEIRO, 2002), sendo a única fábrica de pectina no país e maior produtora mundial de pectina cítrica (ACIL, 2012).

Na Tabela 1 encontra-se a composição típica de duas pectinas comerciais obtidas a partir de resíduos de frutas cítricas e de maçã, as duas grandes fontes de matéria-prima da indústria de produção de pectinas. Sendo constituídas majoritariamente por ácido galacturônico, na sua composição existe ainda uma quantidade significativa de açúcares neutros e uma percentagem residual de proteínas e de compostos fenólicos (THIBault e RALET, 2001). Estima-se também que algumas unidades de ácido D-

galacturônico (GalA) se encontrem acetiladas, em um grau de 1,5% para as pectinas de limão e de 5% para a pectina de maçã. Encontra-se ainda uma pequena percentagem de compostos inorgânicos (principalmente íon sódio e potássio). A pectina extraída da maçã contém mais açúcares neutros e mais compostos fenólicos, mas menos proteínas que a pectina de limão (KRAVTCHENKO, VORAGEN e PILNIK, 1992).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO TÍPICA DE DUAS PECTINAS COMERCIAIS (REPRESENTADA EM % DE MASSA SECA).

Componente (%)	Citricos (Limão)	Maçã
Ácido galacturônico anidro	76,4	60,8
Grupos Metoxilo (% DE)	4,4 (71,5)	3,6 (74,3)
Grupos acetilo (%)	0,26 (1,4)	0,72 (5,0)
Açúcares neutros	8,5	27
Proteínas	3	1,6
Compostos Fenólicos	0,18	0,59
Cinzas	2,38	1,89

FONTE: KRAVTCHENKO, VORAGEN e PILNIK (1992).

A pectina ocorre em citrinos como pectato de cálcio das paredes celulares ou como protopectina. São mais abundantes no albedo das frutas cítricas, mas também estão bem distribuídas em outras partes do fruto (TING e ROUSEFF, 1986). A pectina é uma fibra gelatinosa presente, em um grande número de vegetais e em todas as frutas, mas é na laranja principalmente que encontra-se em grande quantidade. Portanto, quando se consome a laranja, ingere-se pectina, que pode ser extraída industrialmente da parte branca da laranja (albedo), sendo apresentada como um pó branco (ROUSE, 1953).

O teor em substâncias pécticas varia de acordo com a origem botânica do produto vegetal, sendo três subprodutos de indústrias agrícolas e alimentares ricos em substâncias pécticas (teor superior a 15% em base seca): bagaço de maçã, albedo cítrico e polpa de beterraba como é mostrado na Tabela 2. Estas pectinas de várias matérias-primas podem ser diferentes na estrutura molecular, como, por exemplo, massa molecular, grau de esterificação, conteúdo de acetil, teor de açúcares neutros, distribuição dos grupos carboxi-metoxilados e, portanto apresentam diferentes propriedades funcionais (THIBAUT e RALET, 2001).

A qualidade uniforme e consistência estável das pectinas comercializadas variam de acordo com a variedade dos frutos, seu grau de maturação e as condições de cultivo (TROMP *et al.*, 2003).

TABELA 2 – TEOR DE PECTINAS DE ALGUNS FRUTOS

Fruto	Substâncias pécticas % em MF	% MS
Maçã	0,5 - 1,6	4 – 7
Bagaço de maçã	1,5 - 2,5	15 – 20
Albedo cítrico	2,5 - 4,0	30 – 35
Casca de laranja	3,5 - 5,5	-
Casca de maracujá	2,1 - 3,0	-
Maracujá	0,5	-
Polpa de beterraba	-	15 – 20
Carambola	0,7	-
Cenoura	0,2 - 0,5	10
Goiaba	0,8 - 1,0	-
Polpa de limão	2,5 - 4,0	-
Abacaxi	0,04 - 0,1	-
Tomate	0,2 - 0,6	3
Morangos	0,6 - 0,7	-
Tamarindo	1,71	-

FONTE: THAKUR, SINGH e HANDA, 1997

MF – material-fresca; MS – material-seca.

As pectinas cítricas foram reconhecidas em 1934, como cadeias lineares de ácido galacturônico e desde então, evidenciou-se que a pectina é uma molécula altamente complexa e o recente desafio é acomodar toda informação disponível em um único modelo estrutural (VORAGEN *et al.*, 2009).

A produção industrial de pectina cítrica teve início no Brasil no ano de 1954, na cidade de Limeira, São Paulo, idealizada por um químico industrial italiano, na empresa Citropectina. Essa mesma indústria alterou o nome para Braspectina, em 1985, passou a Citrus Colloids S/A, em 1993 e, quando adquirida pelo grupo Hércules, em 1998, foi denominada CPKelco (RIBEIRO, 2002), sendo a única fábrica de pectina no país e maior produtora mundial de pectina cítrica (ACIL, 2012).

2.1.2 Aplicações e propriedades funcionais das pectinas

A pectina é um polissacarídeo comercialmente importante na indústria de processamento de alimentos, é primeiramente utilizada como aditivo alimentar como agente de gelificação, sendo utilizada para dar textura e estabilizar compotas, geleias, marmeladas, leite e produtos de confeitaria (KYOMUGASHO *et al.*, 2015). Entre outras propriedades está a estabilização de produtos de panificação e o aumento do volume e na prevenção de flotação (VORAGEN *et al.*, 2009).

A funcionalidade da pectina também é importante em outras indústrias, incluindo a indústria farmacêutica, cosméticos e de tratamento de resíduos (SILA *et al.*, 2009). Além disso, a pectina tem boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, não é tóxica, e apresenta alto valor nutricional (por exemplo, ligação mineral, efeito prebiótico, regulador do colesterol e ação anti-câncer), isso faz com que a pectina seja um polissacarídeo atraente (SRIVASTAVA e MALVIYA, 2011), exibindo propriedades funcionais específicas dependendo de cada aplicação (FRAEYE *et al.*, 2010).

As pectinas atuam como fibras dietéticas, fazendo com que diminua o nível de colesterol e afetando a absorção da glucose. É um substituto de gordura e açúcar em alimentos dietéticos (VORAGEN *et al.*, 1995; WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006).

A pectina é utilizada em vários produtos, isto inclui filmes biodegradáveis e comestíveis, adesivos, substitutos de papel, espumas e plastificantes, agentes de superfície para produtos médicos, materiais para implantes biomédicos e sistemas de liberação de fármacos (MOHNEN, 2008; *apud* CANTERI *et al.*, 2012).

2.1.3 Gelificação das pectinas

A gelificação é devida à formação de zonas de junções intermoleculares entre regiões não esterificadas das homogalacturananas de diferentes cadeias. A habilidade de formação de gel sofre influência de vários fatores: do grau de esterificação, acetilação, pH, temperatura, força iônica e da quantidade de

cálcio adicionada (AXELOS e THIBAUT, 1991; WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006).

Para a indústria de alimentos a capacidade de formar géis é motivo de utilização por elas, como por exemplo em espessantes de geleias. Os géis aquosos devem apresentar necessariamente zonas de junção entre as moléculas do polímero, segmentos de junções entre polímeros relativamente móveis e água entremeada na rede polimérica (BEMILLER, 1986).

As zonas de junção estão relacionadas com a união entre duas cadeias poliméricas e podem envolver uma única ligação covalente ou uma combinação entre diversas ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre as cadeias. Essa etapa é muito crítica no processo de gelificação, porque prevê a formação de uma rede hidratada ou de um precipitado. Os géis de pectina são geralmente homogêneos, formadores de uma malha rica em água (AXELOS e THIBAUT, 1991).

Pectinas HM geralmente formam géis em meio ácido (pH abaixo de 3,6) na presença de alta concentração de açúcares. Esses açúcares são responsáveis pela estabilização das zonas de junção, através da promoção de interações hidrofóbicas entre os grupos metoxi. Em pectinas LM, a formação de géis se dá pela presença de íons cálcio, que atuam como uma ponte entre os grupos carboxílicos das cadeias poliméricas (WALKINSHAW e ARNOTT, 1981).

Segundo Takur *et al.* (1997) os grupos metoxi auxiliam no processo de gelificação, prevenindo a formação de zonas de junção nos segmentos inter-junções, tornando a malha de gel mais flexível. Devido a facilidade das pectinas em formar géis, alguns estudos relatam esse potencial na formação de partículas micro e nanométricas. De acordo com Einhorn-Stoll, Kastner e Drusch (2014) as pectinas podem ser caracterizadas por diferentes parâmetros moleculares, os parâmetros mais importantes são o grau de esterificação e a massa molecular.

2.1.4 Modificação química das pectinas

Devido à disponibilidade de inúmeros grupos funcionais, a modificação química dos polissacarídeos tem sido bastante estudada como forma de obter derivados destes com novas características e propriedades.

A pectina cítrica modificada (MCP) é uma forma de pectina que tenha sido alterada de modo que ela pode ser facilmente absorvida pelo trato digestivo. Também conhecida como pectina fracionada, MCP é rica em unidades de galactose, permitindo uma afinidade com receptores de certas células cancerígenas. A pectina na sua forma natural não pode ser absorvida pelo corpo e é considerado um tipo de fibra dietética solúvel, enquanto que a pectina modificada pode ser absorvida pela corrente sanguínea (YAN e KATZ, 2010). A massa molar da pectina varia entre 50.000-150.000 Da, dependendo do tamanho da cadeia (SRIAMORNSAK, 2003). De acordo com Courts (2013) a pectina cítrica modificada é produzida pela hidrólise das pectinas de plantas e a produção é uma mistura de ácido galacturônico, galactose e oligossacarídeos ricos em arabinose. Ralet e Thibault (2002) relataram que a modificação química é frequentemente acompanhada por uma clivagem da cadeia principal das unidades de ácido galacturônico (GalA) que resulta em pectinas com massa molecular menor e diferentes propriedades funcionais.

Segundo Morris *et al.* (2013), a modificação química e enzimática da pectina cítrica destina-se principalmente em diminuir a sua massa molar, através da clivagem da homogalacturonana. A pectina passa por um tratamento alcalino primeiramente e após por um tratamento ácido para diminuir sua massa molar a aproximadamente 10 kDa, com isso tem-se um aumento efetivo da solubilidade e melhor absorção e circulação no sangue da pectina modificada, e esses tratamentos melhoram a acessibilidade de ligação da Gal-3. A GAL-3 é uma proteína de ligação a hidratos de carbono, intimamente relacionada com o crescimento do câncer e metástases, exibem função biológica pleiotrópica, que desempenham um papel fundamental em muitos processos fisiológicos e patológicos (KRZESLAK e LIPINSKA, 2004).

Glinsky e Raz (2009) concluíram que é possível que uma combinação de pH e temperaturas elevadas no tratamento utilizado na preparação da MCP seja ideal para gerar pectinas com capacidade de ligação da galectina, promover a apoptose e ajudar a evitar a propagação do câncer. Nangia-Makker

et al. (2002) relataram que a MCP é rica em galactose e tem elevada afinidade de ligação com as galectinas da superfície das células cancerígenas, inibindo a agregação de células do câncer e as metástases. Pienta *et al.* (1995) estudaram se a pectina cítrica modificada tem o poder de determinar se um polissacarídeo rico em unidades de galactose pode inibir a metástase espontânea de células de adenocarcinoma da próstata do rato e concluíram que a ingestão oral de pectina cítrica modificada atua como um potente inibidor da metástase do câncer da próstata em ratos. Gunning, Bongaerts e Morris (2009) concluíram que uma cadeia lateral de açúcar neutro contendo terminais de galactose na extremidade não redutora da cadeia da pectina pode ligar-se a GAL-3, e que a pectina modificada tem efeito sobre a ação anti-câncer, demonstrando que os fragmentos bioativos da pectina podem ligar-se especificamente a GAL-3.

Estudos pré-clínicos indicaram que a MCP ajudou a reduzir a propagação do câncer de próstata, cólon, de mama, no fígado e de pele (HAYASHI, GILLEN e LOTT, 2000; PLAT e RAZ, 1992; YAN e KATZ, 2010). Yan e Katz (2010) verificaram que houve a indução de apoptose de células cancerígenas de próstata, tanto em humanos como em ratos com pectina cítrica modificada. E Ramachandan *et al.* (2011) estudaram a MCP em células leucêmicas e observaram a indução da apoptose celular.

A pectina sofre alterações físico-químicas em sua estrutura de acordo com as condições do meio. Quando solubilizadas, as cadeias de pectina podem degradar-se por meio de duas reações opostas, porém esquematizados em três tipos de reações como mostrado na Figura 3.

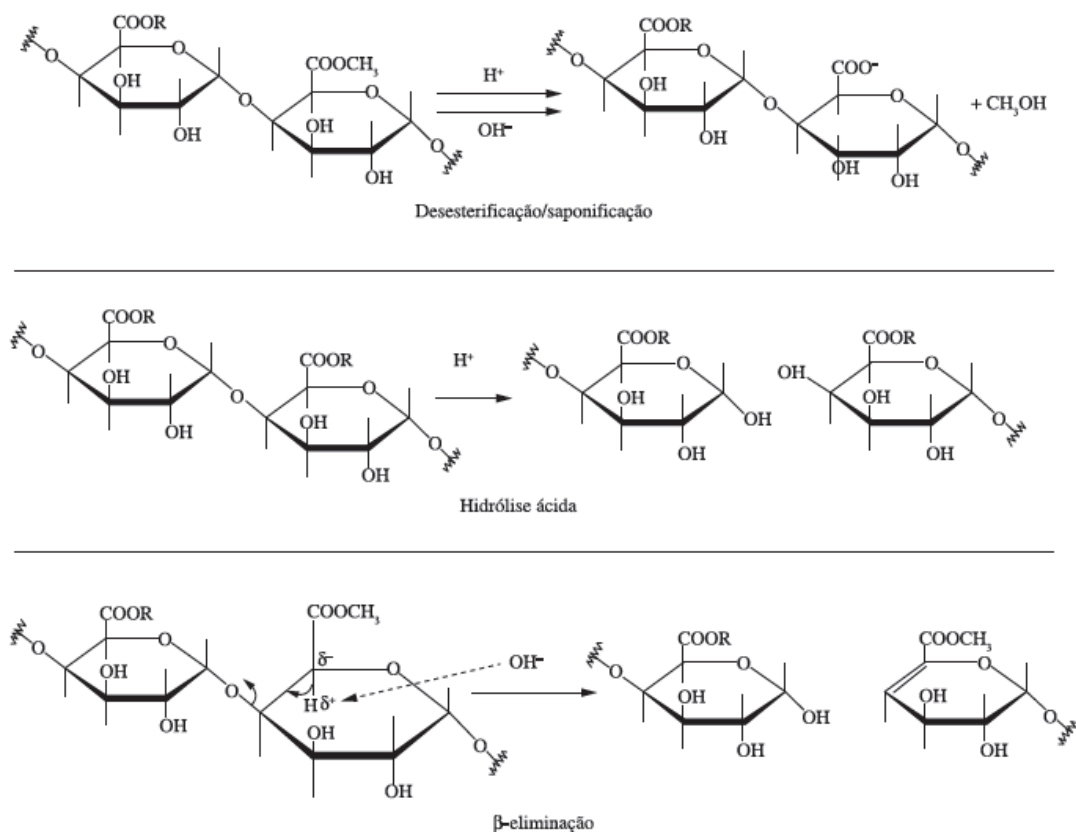


FIGURA 3 - MECANISMOS MAIS COMUNS DE DEGRADAÇÃO DAS PECTINAS

FONTE: CANTERI *et al.*, 2012.

Em meio ácido entre pH 1 a 3 e em temperaturas inferiores a 10 °C, predominam as desesterificações. Já a despolimerização leva à diminuição do tamanho da cadeia polimérica e isso ocorre por hidrólise ácida ou enzimática das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ ou por reações de β -eliminação. A despolimerização por tratamento térmico foi descrito por alguns autores para soluções de pectinas (KRAVTCHENKO, VORAGEN e PILNIK, 1992; MORRIS, FOSTER e HARDING, 2002; ROLIN, 2002; VORAGEN *et al.*, 1995) e atribuída a β -eliminação. Renard e Thibault (1996) e Kravtchenko, Voragen e Pilnik (1992), observaram que o tratamento alcalino da pectina cítrica conduziu a reações de β -eliminação que resultou na despolimerização da cadeia principal a homogalacturonana e na desesterificação da pectina e que qualquer aumento na temperatura aumentará a taxa de β -eliminação, e que o aumento do pH aumenta a velocidade de desesterificação. E Thibault *et al.* (1993) observaram que o tratamento ácido clivou os açúcares neutros, o que é considerado na ordem Ara-Gal-Rha. Açúcares livres ou oligômeros de baixa massa molar podem ser perdidos na precipitação com álcool e na secagem (WANG *et al.*,

2010). Em temperaturas maiores, a pectina tende a se contrair, adquirindo uma nova conformação (MASUELLI, 2011). Krall e McFeeters (1998) verificaram que com $\text{pH} > 3,8$ já ocorre a reação de β -eliminação. De acordo Fraeye *et al.* 2007, da reação resulta a remoção do hidrogênio em C-5 e a ruptura da ligação glicosídica com a formação entre C-4 e C-5, de dupla ligação conjugada com aquela da função carboxílica.

A β -eliminação promove o aumento na taxa de açúcares redutores, proporcional ao aumento na taxa de uronidatos insaturados (KRALL e MCFEETERS, 1998; DIAZ, ANTHON e BARRET, 2007).

A degradação da pectina acarreta em diminuição da viscosidade natural e diminuição da massa molar. A viscosidade está intimamente relacionada com as características intrínsecas ao polímero, como volume, massa molar, cargas de superfície e deformabilidade, e às características do meio, como pH , temperatura e força iônica. Quando em solução, a pectina pode estar disposta em diversas conformações, como vara, vara segmentada, anéis, áreas circulares ou blocos de moléculas. Essas conformações estão relacionadas com a viscosidade (BROWNLEE, 2011; *apud* MARTINEZ, 2013).

Mais estudos devem ser feitos para se tirar conclusões definitivas, porém as primeiras evidências mostram que a pectina cítrica modificada ajuda a combater o câncer, o que torna uma arma potencialmente poderosa no combate a essa doença.

2.2 REOLOGIA

A reologia é o estudo do fluxo e da deformação de materiais, abrangendo as propriedades de escoamento dos líquidos, em termos de viscosidade e também em relação a várias propriedades viscoelásticas. O conhecimento dessas propriedades é muito utilizada na indústria de alimentos e é importante para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios (BARNES, HUTTON e WALTERS, 1989). Também tem grande importância no controle de qualidade, em projetos de tubulações e equipamentos, no desenvolvimento de novos produtos, e para um melhor entendimento do comportamento estrutural dos produtos (STEFFE, 1996; SCHRAMM, 2006).

A reologia foi criada por Eugene Cook Bingham em 1928, e define-se como a ciência da deformação e de fluxo dos materiais, isto é, trata-se do estudo da forma na qual os materiais respondem a um estresse ou tensão aplicada (STEFFE, 1996; SCHRAMM, 2006). Essa deformação ocorre de três maneiras: sólidos, líquidos ou gases (STEFFE, 1996).

A primeira lei básica da viscosimetria foi expressa por Isaac Newton (1687), onde a viscosidade (η) está relacionada à tensão de cisalhamento (τ) e à taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$ de acordo com a Equação 1:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (1)$$

A tensão de cisalhamento refere-se à força aplicada tangencialmente sobre uma área e sua unidade é pascal ($\text{Pa} = \text{N/m}^2$).

O comportamento reológico em solução de pectina é altamente dependente das condições ambientais, tais como pH, concentração, temperatura, sais e açúcares (EVAGELIOU, RICHARDSON e MORRIS, 2000). As moléculas da pectina em solução são afastadas umas das outras e sua conformação é afetada principalmente pelo soluto e interações da pectina. A viscosidade da solução é sensível a variação das condições ambientais (FRAEYE *et al.*, 2010). Segundo Braccini, Carvajal e Perez (2005) com o aumento da concentração, as moléculas da pectina podem agregar-se para construir uma estrutura de rede tridimensional, levando a formação de uma solução espessa ou gel. As zonas de junção consistem em cadeias ligadas entre si ao longo de interações que não estão ligadas, tais como ligação com hidrogênio pode trazer uma boa resistência as mudanças ambientais.

Um dos parâmetros que caracterizam o comportamento de fluxo dos alimentos é a viscosidade, que é uma medida da resistência de um fluido em movimento, quando uma tensão de cisalhamento é aplicada. O comportamento de escoamento destes alimentos quando tem-se tensões aplicadas classificam-se como newtonianos ou não-newtonianos. O comportamento de fluxo de um material durante o processamento pode variar significativamente, porque a consistência e composição do material pode ser alterado devido ao

aquecimento, mistura, arrefecimento, composição, homogeneização, cristalização, etc (BHATTACHARYA, 1997).

Os fluidos Newtonianos são independentes da taxa de cisalhamento e do histórico anterior ao cisalhamento, dependendo da composição e temperatura (VIDAL, 2000). E os fluidos não-newtonianos não apresentam esse comportamento ideal, podendo ser dependentes ou independentes do tempo (SCHRAMM, 2006) (Figura 4). Segundo Holdsworth (1971) os fluidos independentes do tempo são divididos em: dilatantes, pseudoplásticos e o plástico de Bingham. Os dilatantes o comportamento é caracterizado pelo aumento da viscosidade aparente com a taxa de cisalhamento onde provoca a ruptura da estrutura e a quantidade de líquido não é mais suficiente para a lubrificação, isso faz com que o atrito aumente.

Em pseudoplásticos, esse comportamento é classificado na grande maioria dos fluidos estudados. Para esses fluidos a viscosidade aparente depende da taxa de cisalhamento, mas não da duração do cisalhamento (Holdsworth, 1971). Segundo Rao (1987) é caracterizado pela diminuição da viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento, onde a tangente em cada ponto da curva de escoamento (viscosidade aparente) diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. De acordo com Holdsworth (1971) este aumento na taxa de cisalhamento modifica a estrutura das moléculas de cadeias longas, alinhando-se paralelamente as linhas de corrente diminuindo a resistência ao escoamento. O fluido apresenta um comportamento próximo ao Newtoniano com altas taxas de cisalhamento, essa classe é representada em soluções de pectina.

E por último o plástico de Bingham tem comportamento de um sólido sob condições estáticas, onde certa quantidade de força deve ser aplicada antes que o fluxo seja induzido (tensão inicial) (MCCLEMENTS, 2007).

Para fluidos não Newtonianos o termo viscosidade é substituído por η_{ap} que é a viscosidade aparente, e é função do gradiente de velocidade (VIDAL, 2000), Equação 2:

$$\eta_{ap} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (2)$$

Onde:

η_{ap} = Viscosidade aparente (Pa s)

τ = tensão de cisalhamento (Pa)

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento (s^{-1})

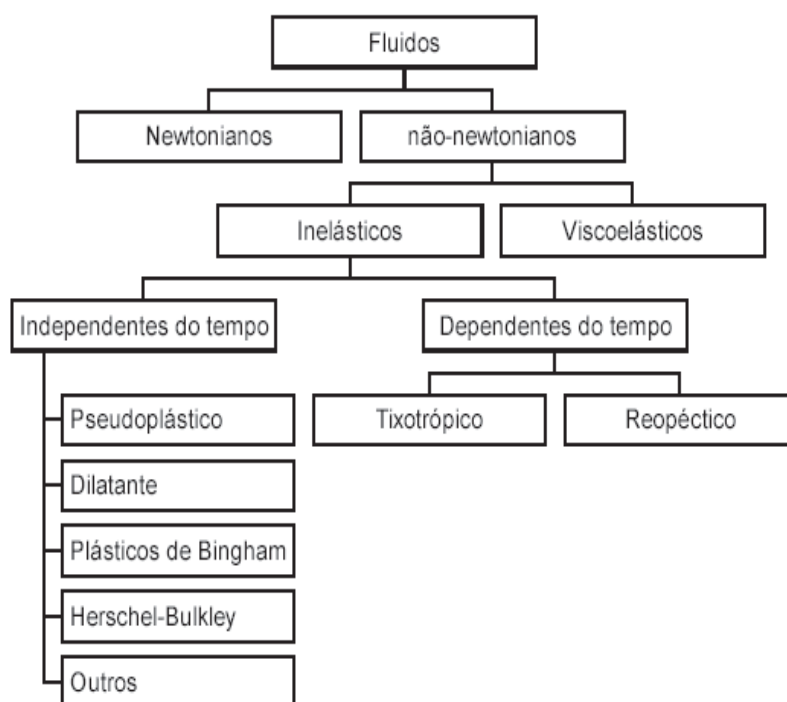


FIGURA 4 - CLASSIFICAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE FLUÍDOS.
FONTE: STEFFE, 1996

O comportamento reológico dos fluidos viscoelásticos é analisado através de ensaios dinâmicos, onde o material é submetido à variação de tensão ou deformação com o tempo. A composição química e a estrutura física do material podem influenciar nos resultados (STEFFE, 1996).

2.2.1 Modelos Reológicos

Os modelos reológicos são usados para uma melhor descrição do comportamento reológico dos fluidos, permitindo relacionar as propriedades reológicas com grandezas, como concentração, temperatura e índice de

maturação. O conhecimento dessas grandezas é indispensável no controle em linhas de produção, no projeto e dimensionamento dos processos (BRANCO, TELIS e GASPARETTO, 1995).

O modelo da lei da potência (Ostwald-De-Waele) tem se mostrado adequado para os cálculos de engenharia e devido à sua simplicidade, tem sido amplamente utilizado nesta área (RAO E ANANTHESWARAM, 1982).

Um dos modelos mais utilizados para descrever o comportamento não-Newtoniano são: Ostwald-De-Waele (Lei da Potência), Bingham, Herschel-Bulkley, Casson e Mizrahi & Berk. A Tabela 3 mostra as equações para alguns modelos reológicos normalmente utilizados (STEFFE, 1996).

TABELA 3 – EQUAÇÕES DOS MODELOS REOLÓGICOS.

Modelos	Equação	Parâmetros
Ostwald-de-Waele (Lei da Potência)	$\tau = \kappa \cdot \gamma^n$	κ_{lp}, n
Bingham	$\tau = \tau_0 + \kappa \cdot \gamma$	μ_b, τ_0
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_0 + \kappa \cdot \gamma^n$	κ_{hb}, n, τ_0
Casson	$\tau^{1/2} = \tau_0 + \kappa \cdot \gamma^{1/2}$	κ_{oc}, κ_c
Mizrahi-Berki	$\tau^{1/2} = \kappa_{om} + \kappa_{mb} (\gamma)^n$	$\kappa_{om}, \kappa_{mb}, n$

Onde: τ é a tensão de cisalhamento (Pa), τ_0 é a tensão inicial (Pa), γ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}), κ_p , κ_{hb} , κ_c , μ_b e κ_{mb} são índices de consistência, κ_{oc} e κ_{om} são constantes e n são índices de comportamento dos modelos.

O comportamento reológico da maioria dos fluidos em alimentos pode ser descrito por uma equação do tipo Ostwald-de-Waele (Lei da potência), isso devido ao seu comportamento pseudoplástico (STEFFE, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 5, é apresentado um fluxograma com o resumo das etapas presentes na metodologia deste trabalho, que são descritas detalhadamente nas seções seguintes.

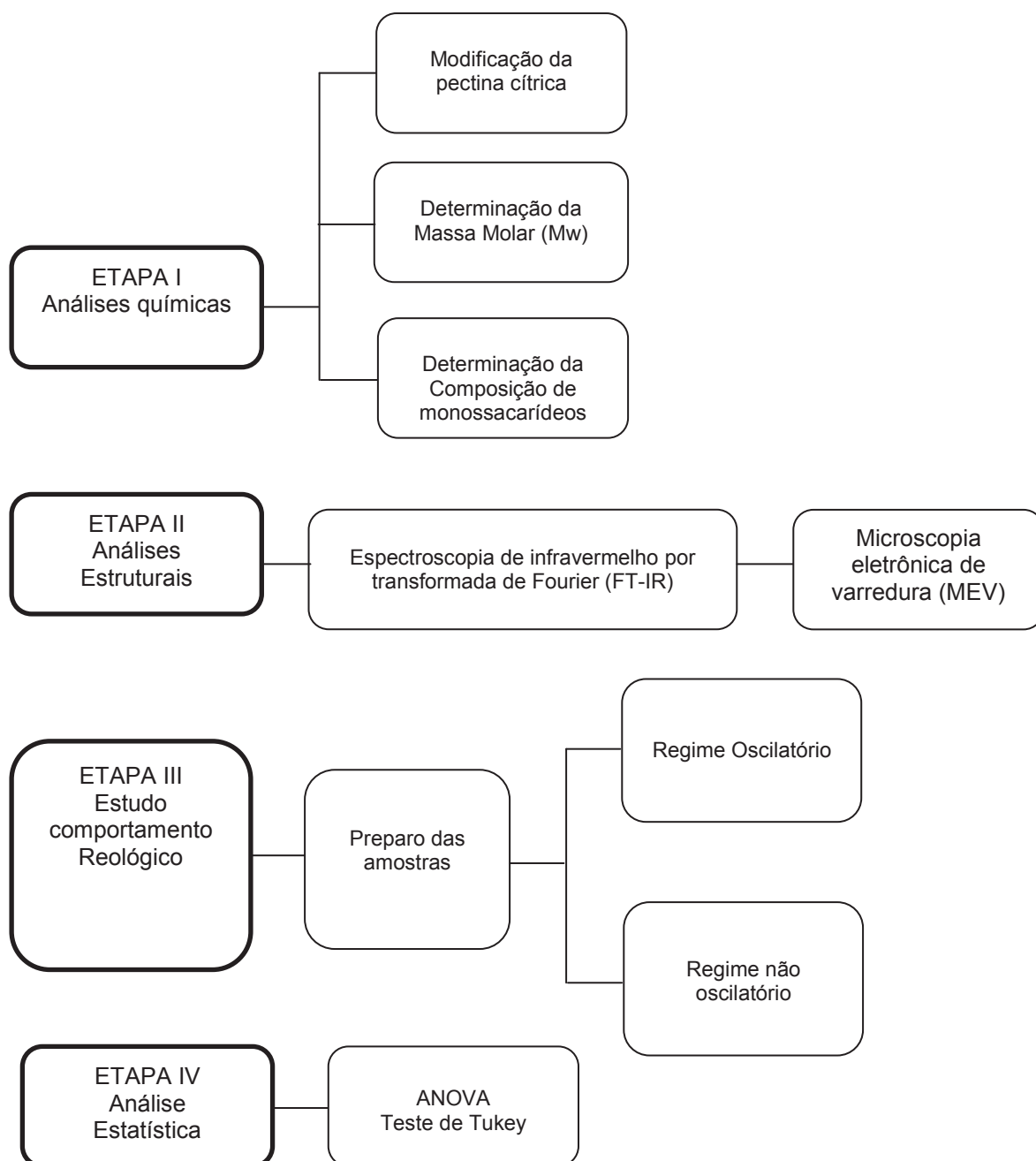


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DAS ANÁLISES.

3.1 MATÉRIA PRIMA

A matéria-prima utilizada neste estudo foram três pectinas cítricas comerciais com diferentes graus de esterificação (DE), as quais foram quimicamente modificadas. São elas as amostras nomeadas S1 e S2, fornecidas pela empresa CP Kelco-Brasil (Limeira - SP), cujos DE são de 69,0 e 58,4, respectivamente, e a Sigma, proveniente da Sigma Aldrich (Brasil), que não possui especificação de DE, foi denominada S.

3.1.1 Purificação das pectinas cítricas comerciais nativas

As amostras de pectinas cítricas comerciais foram solubilizadas em água deionizada, precipitadas com dois volumes de etanol e mantidas sob refrigeração por 16 horas. O material precipitado foi centrifugado, lavado com etanol e seco em estufa a vácuo EDGCON 5P a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 24 horas, originando as amostras de pectinas nativas.

3.2 ANÁLISES QUÍMICAS

3.2.1 Modificação da pectina cítrica

Inicialmente, as amostras de pectinas cítricas comerciais foram solubilizadas a 1,5% em água destilada, e o seu pH foi elevado para 10,0 com NaOH (3 N), seguindo através de uma incubação de 1 hora a 50-60°C em banho-maria. Em seguida, as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente, enquanto que o seu pH ajustado para 3,0 com HCl (3 N) e armazenadas durante a noite em um refrigerador. As amostras foram precipitadas no dia seguinte com etanol 95% e foram incubadas a 20°C durante 2 horas, filtradas, lavadas com acetona e em seguida secas em estufa a vácuo a 25°C durante 8 horas. A pectina foi designada como pectina cítrica modificada ou MCP (WAI, ALKARKHI e EASA, 2010).

3.2.2 Dosagem de ácidos urônicos

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada por meio do método colorimétrico descrito por Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), adotando como padrão o ácido galacturônico, em triplicata, e utilizando um espectrofotômetro SP-22 Biospectro para leitura das absorvâncias.

3.2.3 Determinação da Composição Monossacarídica

As amostras de pectinas nativas e modificadas foram hidrolisadas com ácido trifluoracético 2 mol.L^{-1} por 5 horas em banho-maria fervente (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989). Os monossacarídeos resultantes foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4) (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Em seguida adicionou-se a resina trocadora de cátions na forma ácida para decompor o excesso de agente redutor e remover os cátions sódio. Após filtração, o material foi evaporado até *secura*, em evaporador rotatório, seguido de adição de metanol para a remoção do boro, na forma de borato de trimetila, e os alditóis secos resultantes foram acetilados com piridina (agente catalisador) e anidrido acético 1:1 v/v (agente acetilante) em tubo de hidrólise hermeticamente fechado, por 16 horas a 25°C (WOLFROM e THOMPSON, 1963a). Os produtos acetilados foram extraídos com clorofórmio e lavados com solução de sulfato de cobre (CuSO_4) a 5% (m/v) (WOLFROM e THOMPSON, 1963b). Após secagem da fase clorofórmica contendo os acetatos de alditóis, as amostras foram ressolubilizadas em acetona para serem analisadas por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

As análises por cromatografia líquido-gasosa (GLC) foram efetuadas em cromatógrafo THERMO Trace GC Ultra, com detector de ionização de chama, utilizando hélio como gás de arraste $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm), modelo DB-225 (SLONEKER, 1972).

3.2.4 Determinação da Homogeneidade e massa molar (Mw)

As análises de homogeneidade foram efetuadas em cromatógrafo de exclusão esférica de alta performance (HPSEC) *Waters*, equipado com detector de índice de refração diferencial (RI) *Waters* modelo 2410 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 *Waters* em série, 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. As análises foram efetuadas a 25°C utilizando como eluente solução de NaNO₂ 0,1 mol.L⁻¹ contendo NaN₃ 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, pressão de 920 psi, monitorados através de bomba peristáltica *Waters* 515.

Para fins de cálculo da massa molar, as amostras comerciais e modificadas tiveram seu valor de dn/dc determinado. Para esta análise, as amostras foram solubilizadas em cinco diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg.mL⁻¹) e cada uma das soluções foi analisada pelo detector de índice de refração. Os cálculos de dn/dc e massa molar foram realizados utilizando o software ASTRA 4.70.07.

3.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de C¹³ (¹³C-RMN)

As amostras de pectinas comerciais e modificadas foram solubilizadas em óxido de deutério (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 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).

3.2.6 Determinação do Grau de Esterificação das Pectinas – FT-IR

O grau de esterificação das pectinas comerciais e modificadas foi determinada por meio de espectroscopia de infravermelho (FT-IR - *Fourier Transform-Infrared*) usando espectrofotômetro Vertex 70, marca Bruker. Os espectros foram coletados no modo de absorvância na frequência de 400-4000 cm^{-1} , numa resolução de 4 cm^{-1} , 32 scans, empregando amostras sólidas pulverizadas. Preparou-se cada pastilha usando brometo de potássio (KBr) com grau espectroscópico (Merck, Darmstadt, Alemanha) na proporção KBr:amostra de 99:1. Para cada amostra de pectina comercial e modificada, os espectros de FT-IR foram obtidos em triplicatas 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, como descrito por Vriesmann e Petkowicz (2009). As análises de FT-IR foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

3.3.1 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras de pectinas comerciais e modificadas foi obtida utilizando o equipamento JEOL 6010LA, do LAMIR - Laboratório de Análises de Minerais e Rochas do Departamento de Geologia, da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram metalizadas pulverizadas com uma liga de Ouro/Paládio sob condições de vácuo, e após, foram produzidas imagens microscópicas das amostras, auxiliando assim a elucidação de características de rede de acordo com Almrhag *et al.*, (2012). O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 x) e resolução. As magnificações utilizadas foram em 100 x.

3.4 REOLOGIA

3.4.1 Preparo das amostras para análises reológicas

As soluções de pectinas comerciais e modificadas foram solubilizadas em água deionizada por 16 h a temperatura ambiente sob agitação magnética na concentração fixa de 5% (m/m), as soluções foram mantidas em repouso por 1 h para então serem empregadas nas análises reológicas (MIN *et al*, 2011).

3.4.2 Análises reológicas

As medidas reológicas foram realizadas em Reômetro Haake Mars, acoplado a um banho termoestabilizado HAAKE K15, a um termocirculador de água DC5 e a um controlador térmico TC 81 (Peltier) utilizando os sensores cone-placa (C60 2Ti) e placa-placa (PP 20 Ti; PP 35 Ti). Previamente às análises reológicas, foi determinada a inércia para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos. Durante as análises, realizadas a 25°C, a temperatura ambiente manteve-se em (20±1) °C.

Inicialmente foram realizadas varreduras de tensão para verificação da faixa viscoelástica linear e seleção da tensão ou deformação que seriam empregadas nas análises de varredura de frequência. As varreduras de frequência foram conduzidas na tensão ou deformação pré-selecionada, aumentando a frequência oscilatória com o tempo, na faixa de 0,01-30 Hz. As curvas de viscosidade foram realizadas a 25°C na faixa de 0,001-100 s⁻¹. Os dados foram coletados e tratados pelo software RHEOWIN.

As curvas de fluxo, foram ajustadas pelo modelo da Lei da Potência de Ostwald-de-Waele, de acordo com a Equação 3:

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

onde: τ é a tensão de cisalhamento (Pa), $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s⁻¹), que variou entre 0.0004 e 300 s⁻¹; K é o coeficiente de consistência (Pa.sⁿ) e n é o índice de comportamento (adimensional) – n<1 fluido não-newtoniano pseudoplástico.

A viscosidade aparente das soluções pectina foi calculada pela Equação 4, em que η é a viscosidade aparente de um fluido não-newtoniano (Pa.s):

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (4)$$

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação dos dados foi efetuada por meio da análise de variância ANOVA e teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média e erro padrão médio. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS PECTINAS NATIVAS E MODIFICADAS

A Tabela 4 apresenta os resultados da composição monossacarídica das pectinas cítricas nativas e modificadas. Todas as amostras são constituídas pelos mesmos monossacarídeos, mas em diferentes proporções. A presença de ramnose nas pectinas modificadas é característica de pectinas RG-I, esse monossacarídeo se constitui em ponto de ramificação para cadeias laterais (VORAGEN *et al.*, 1995).

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS PECTINAS CÍTRICAS NATIVAS E MODIFICADAS.

Monossacarídeo (%)	Pectinas					
	S1-N	S1-MCP	S2-N	S2-MCP	S-N	S-MCP
Rha ^a	4,5	2,1	1,7	4,6	3,6	1,4
Xyl ^a	2,3	0,8	2,3	2,9	-	-
Man ^a	1,6	3,5	2,8	2,6	-	1,7
Gal ^a	7,0	18,0	12,0	15,1	8,5	10,0
Glc ^a	11,1	11,2	5,4	10,9	2,9	7,0
Fuc ^a	1,2	-	-	1,1	-	4,3
Ara ^a	9,0	19,1	3,3	3,7	3,6	12,0
Ácidos urônicos ^b	63,3	45,4	71,8	59,2	80,1	63,2

^aaçúcares neutros determinados por cromatografia líquido-gasosa, onde: Rha = ramnose; Fuc = fucose; Ara = arabinose; Xyl = xilose; Man = manose; Gal = galactose e Glc = glucose.

^bácidos urônicos determinados pelo método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973). Amostras: S1-N pectina nativa, S1-MCP pectina modificada, S2-N pectina nativa, S2-MCP pectina modificada, S-N pectina nativa, S-MCP pectina modificada.

As pectinas contêm ácidos urônicos como componente principal, em teores maiores para as nativas S1, S2 e SN (63,3, 71,8 e 80,1% respectivamente) do que para as modificadas S1, S2 e SMCP (45,4, 59,2 e 63,2% respectivamente). Uma diminuição do teor de ácido urônico pode ser

atribuída à reação de β -eliminação, um dos mecanismos de degradação não enzimática das pectinas, que ocorrem principalmente em condições alcalinas. Esta reação cliva e desesterifica a região da homogalacturonana (HG), gerando oligômeros de ácido poligalacturônico e regiões de rhamnogalacturonana I (RG-I) (GLINSKY e RAZ,2009). Esta reação de β -eliminação que prossegue em ácidos urônicos pode resultar na remoção de átomo de hidrogênio ativado em C-5 e na unidade glicosídica em C-4 de unidade de ácido galacturônico, levando a compostos intermediários não estáveis, como compostos não saturados (BEMILLER e KUMARI, 1972; KISS, 1974). Estes produtos de reações secundárias podem ser indicados por mudanças de absorvância a 235 nm (KRAVTCHENKO *et al.*, 1993; KRAVTCHENKO *et al.*, 1992). A metodologia aplicada neste estudo foi realizada pelo método colorimétrico a 520 nm e uma diminuição no teor de ácidos urônicos, pode sugerir que foi parcialmente degradada na reação de β -eliminação, como compostos insaturados que absorvem em outro comprimento de onda.

Em comparação as pectinas nativas, as pectinas modificadas são mais ricas em açúcares neutros, principalmente em galactose (18,0% para a S1 MCP, 10% para S MCP e 15,1% para a S2 MCP) quando comparadas com as nativas (7,0, 8,5 e 12,0%, respectivamente). Seguido pela arabinose (19,1% para S1 MCP, 3,7% S2 MCP e 12,0% S MCP) e para S1, S2 e S nativas (9,0, 3,3 e 3,6% respectivamente). Renard, Crépeau e Thibault (1995) observaram o predomínio de galactose e arabinose em substância pecticas de cítricos. A Ramnose teve uma diminuição das modificadas S1MCP e SMCP (2,1 e 1,4% respectivamente) quando comparadas as nativas S1N e SN (4,5 e 3,6% respectivamente). Ocorreu um aumento de Ramnose para a amostra S2 MCP de 4,6% comparada com a S2 nativa 1,7%. A glucose teve um aumento em todas as amostras modificadas S1, S2 e S (11,2; 10,9 e 7,0% respectivamente) comparadas com as nativas (11,1; 5,4 e 2,9% respectivamente). Morris *et al.* (2010), estudaram a caracterização da homogalacturonana e ramnogalacturonana da pectina da beterraba e para se caracterizar as propriedades físicas e químicas de regiões da ramnogalacturonana (RG-I) foi necessário degradar a região da homogalacturonana (HG). Com a modificação química teve-se um aumento na formação de monossacarídeos neutros,

principalmente de galactose, arabinose e ramnose, esses monossacarídeos estão nas cadeias laterais de regiões da RG-I. Zhang *et al.* (2013) encontraram em seu estudo regiões similares sobre cinética de degradação de pectina de maçã. Em geral, galactose e glicose foram os principais açúcares neutros em todas as amostras de pectinas, seguida de arabinose e ramnose, indicando que os açúcares neutros são predominantemente arabinogalactanas. Nas regiões ramificadas das pectinas, a estrutura xilogalacturonana também pode estar presente. O mesmo também foi observado por Schols *et al.* 1995. Na verdade, a xilose estava presente em amostras S1 e S2 (nativas e modificadas). Albersheim *et al.*, 1996 relataram que nas partes comestíveis de frutas e vegetais as pectinas só podem constituir as regiões HG e RG-1, com a sequência Rha-GalA. A afirmação parece ser verdadeira para as amostras analisadas, uma vez que existe a possibilidade de elas também conterem regiões xilogalacturonanas.

Segundo Courts (2013) a pectina cítrica modificada é rica em ácido galacturônico (GalA), com graus variáveis de polimerização e produzidas a partir da hidrólise alcalina da cadeia principal da região da homogalacturonana (HG). A região da ramnogalacturonana (RG-I) tem uma estrutura complexa e variável e compreendem uma cadeia alternada de GalA e unidades de ramnose ramificada com repetições de unidades de galactose e arabinose. As proporções, comprimentos de cadeia e ramificações da RG-I e suas cadeias laterais variam de uma fonte de pectina para outra (WILLATS, KNOX e MIKKELSEN, 2006).

Einhorn-Stool, Kunzek e Dougowski (2007) em seu estudo com pectina cítrica modificada encontraram valores de ramnose de 0,95 a 1,15%, arabinose 2,51 a 3,71%, xilose 0,25 a 0,35%, galactose 4,25 a 4,45% e glicose 0,9%, valores inferiores aos encontrados nesse estudo.

Foi constatada a presença de fucose nas pectinas S1N, S2MCP e SMCP, o que é raro em pectinas, além dos açúcares que constituem a estrutura da pectina. De acordo com Kravitchenko *et al.* (1992), os açúcares arabinose, galactose, xilose e glicose estão ligados ao carbono 4 da ramnose, mesmo que os três primeiros estejam ligados às unidades de ácidos galacturônicos e fucose.

A presença de glucose sugere que o amido pode estar presente em baixa proporção nas amostras, o que foi confirmado pelo teste do lugol. Bringard e Denis (1990) também encontraram amido em pectinas do bagaço da maçã.

Considerando que o grau de esterificação é superior a 50%, esses dados sugerem que a estrutura das pectinas nativas e modificadas podem consistir principalmente de uma homogalacturonana (HG) e ramnogalacturonana tipo I (RG-I) altamente esterificada com cadeias laterais de galactanas ou arabinogalactanas.

A amostra S2 apresentou um comportamento diferente das demais amostras em relação aos açúcares ramnose, xilose e arabinose. Neste caso, a modificação química causou um aumento na proporção de açúcares de ramnose e xilose, enquanto o teor de arabinose praticamente não mudou. Esta diferença no comportamento da composição de monossacarídeos da amostra S2 pode ser atribuída ao processo de extração de pectina. Levigne *et al.* (2002), concluíram que as condições de extração (pH, tempo e temperatura de extração) têm efeitos importantes sobre as características da pectina extraída (açúcares neutros e ácidos, graus de esterificação, propriedades físico-químicas e viscosidade intrínseca). Os autores verificaram que as amostras de pectina extraídas a pH 3,0 apresentaram quantidades mais baixas de ramnose do que em outras condições (pH 1 e 2). Além disso, o tipo de ácido como agente de extração influenciou os parâmetros físico-químicos das pectinas (JIANG *et al.*, 2012). Em nosso estudo, a pectina comercial S2-N apresentou o menor quantidade de rhamnose (1,7%) em comparação com as demais amostras nativas (4,5% e 3,6%, S1-N e S-N, respectivamente), o que pode sugerir que as condições de extração provavelmente foram diferentes. Portanto, a frequência em que o Rhamnose interrompe a sequência HG na macromolécula de pectina S2-N foi menor que as demais amostras (S1-N e S-N). Assim, o método de extração utilizado na pectina nativa S2-N pode ter causado modificações estruturais, que influenciaram diretamente a composição de monossacarídeos obtida após a modificação química. Em todos estes casos, o teor de monossacarídeos aumentou após a modificação química, enquanto o conteúdo de ácido galacturônico foi reduzido.

Esses valores sugerem que a estrutura das pectinas nativas e modificadas pode consistir principalmente de uma homogalacturonana (HG) e de ramnogalacturonana do tipo I (RG-I).

4.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

A análise de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) é um excelente método para análise estrutural e quantitativa da pectina, principalmente para a determinação do grau de esterificação, um importante fator de sua caracterização. Uma pequena diferença na estrutura e composição de uma molécula podem causar alterações significativas na intensidade dos picos de absorção do FT-IR.

A Tabela 2 mostra valores médios do grau de esterificação das pectinas nativas e modificadas. As pectinas cítricas nativas comerciais S1-N e S-N foram classificadas em pectinas de alto grau de esterificação (HM), ou seja, com $\geq 50\%$ de grupos carboxílicos metil esterificados, com valores de DE $64.1 \pm 6.2\%$ e $58.3 \pm 9.0\%$, respectivamente. Por outro lado, a pectina cítrica nativa S2-N apresentou DE $\leq 50\%$, $47.7 \pm 6.8\%$ e foi considerada pectina de baixo grau de esterificação (LM).

TABELA 5 – GRAU DE ESTERIFICAÇÃO DAS PECTINAS NATIVAS E MODIFICADAS (MCP)

Amostras	Pectina cítrica Nativa (%)	MCP (%)
S1	64.1 ± 6.2^a	53.0 ± 2.7^b
S2	47.7 ± 6.8^a	55.7 ± 5.8^a
S	58.3 ± 9.0^a	57.1 ± 3.4^a

Caracteres diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre as amostras segundo o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Podemos justificar que esse decréscimo no DE, pois em meio alcalino ocorre uma desmetoxilação rápida, assim como a degradação que se inicia

pela ruptura da ligação glicosídica em β (C_4) ao grupo carboxílico do éster (receptor de elétrons). O grupo carboxílico não é um bom receptor de elétrons quando ionizado, dificultando a saída do grupo ligado em C_4 (BOBBIO e BOBBIO, 1992). A reação de β -eliminação se processa sob pH ligeiramente ácido ou básico, não ocorrendo quando a acidez do meio é maior (KEIJBETS e PILNIK, 1974). Em nosso estudo utilizamos pH alcalino. Segundo Fertoni *et al.* (2009) à medida que os polissacarídeos precipitáveis em álcool estão sendo extraídos, estão sendo degradados ou desesterificados também, levando à obtenção de pectinas com menores graus de esterificação. Após a modificação química, observou-se uma redução estatisticamente significativa no DE ($p \leq 0.05$) apenas para a amostra S1-N, dos 17,3%, o que corrobora o espectro FT-IR, onde os grupos carboxílicos livres (COO^-) foi ligeiramente superior aos grupos carboxílicos esterificados. Este comportamento corrobora com os estudos de Wai, Alkarkhi e Easa (2010) onde relataram que os grupos carboxílicos livres aumentaram em pectina modificada de durian (*Durio Zibethinus*). No entanto, na amostra S2-N, não foi observada uma redução significativa no DE após a modificação química, porque a probabilidade dos grupos carboxílicos esterificados predominaram sobre os grupos carboxílicos livres. Assim, para a amostra S1, esses resultados indicaram diferenças no %DE das pectinas, e essa modificação alterou-se com sucesso.

Por meio da utilização do software Origin 8.0 foi possível determinar o valor das áreas dos picos correspondentes aos grupos carboxílicos livres e esterificados. Os espectros de FT-IR de pectinas nativas (Figuras 6A, 7C e 8E) e modificadas ilustrados nas Figuras 6B, 7D e 8F mostram bandas mais intensas entre $1760\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$, causada por estiramento $\text{C}=\text{O}$ que representa os grupos carboxílicos esterificados ($-\text{COOCH}_3$), e entre $1630\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, que representa os grupos carboxílicos livres ($-\text{COOH}$) (SINGTHONG, CUI e GOFF, 2004; FAJARDO *et al.*, 2012; VRIESMANN, TEÓFILO e PETKOWICZ, 2012).

Observou-se que os espectros de FT-IR das amostras modificadas S1-MCP (nativo DE: 64%) e S2-MCP (nativo DE: 47,7%), revelaram bandas mais intensas entre $1760\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$ (grupos carboxílicos esterificados) e em $1630\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ (grupos carboxílicos livres) em comparação com as nativas (S1-N e S2-N). Conforme ilustrado na Figura 7D para amostra S1 modificada, a

intensidade da absorbância ou área da banda dos grupos carboxílicos livres (íons carboxilato) aumenta com o decréscimo do DE. Wai, Alkarkhi e Easa, (2010), observaram comportamento semelhante para pectinas cítricas nativas e modificadas.

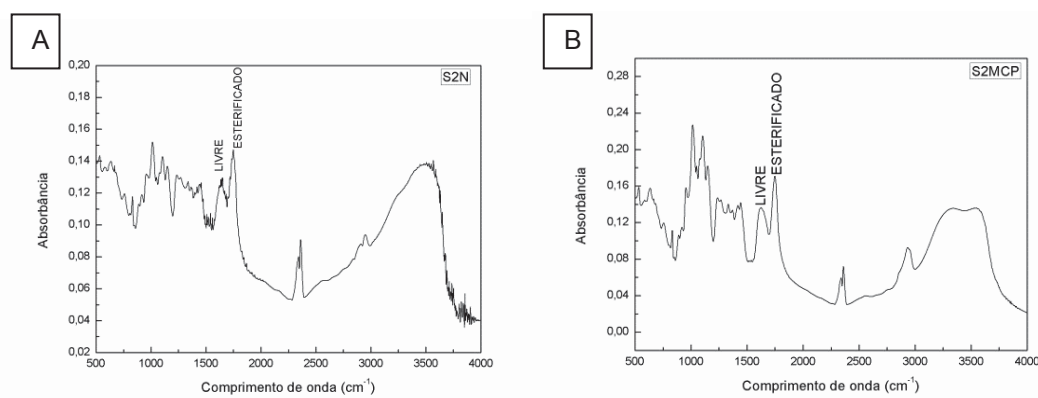


FIGURA 6 – ESPECTROS FT-IR DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (A) S2N - NATIVA E (B) S2MCP – MODIFICADA.

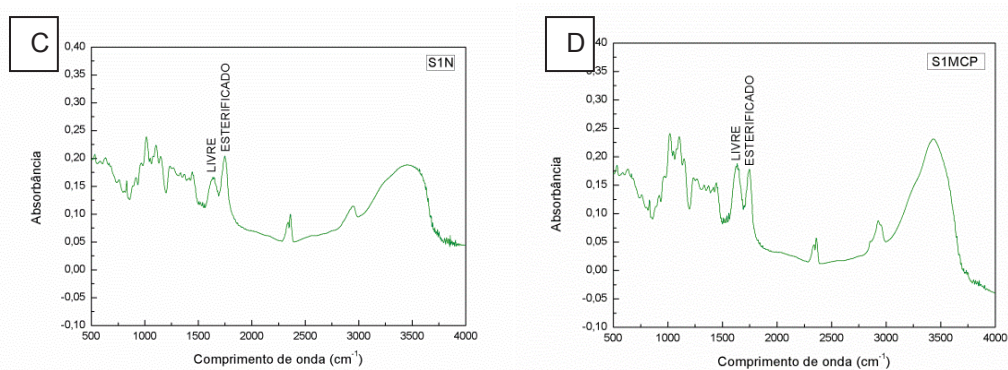


FIGURA 7 – ESPECTROS FT-IR DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (C) S1N - NATIVA E (D) S1MCP – MODIFICADA.

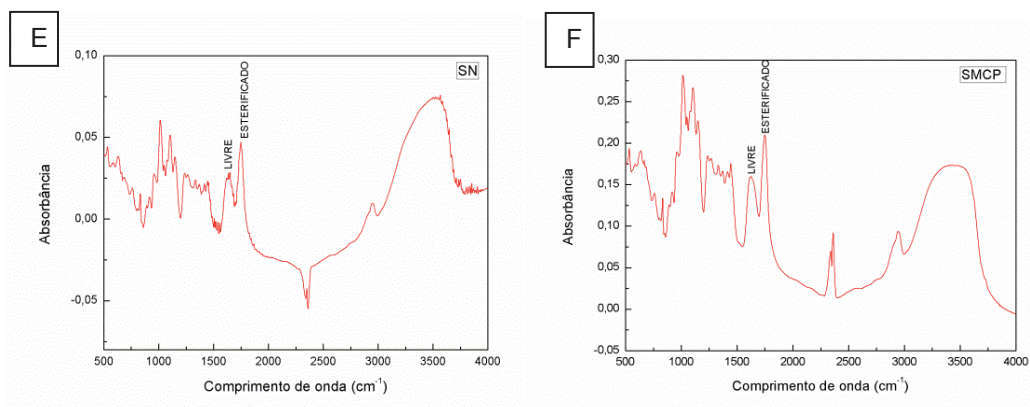
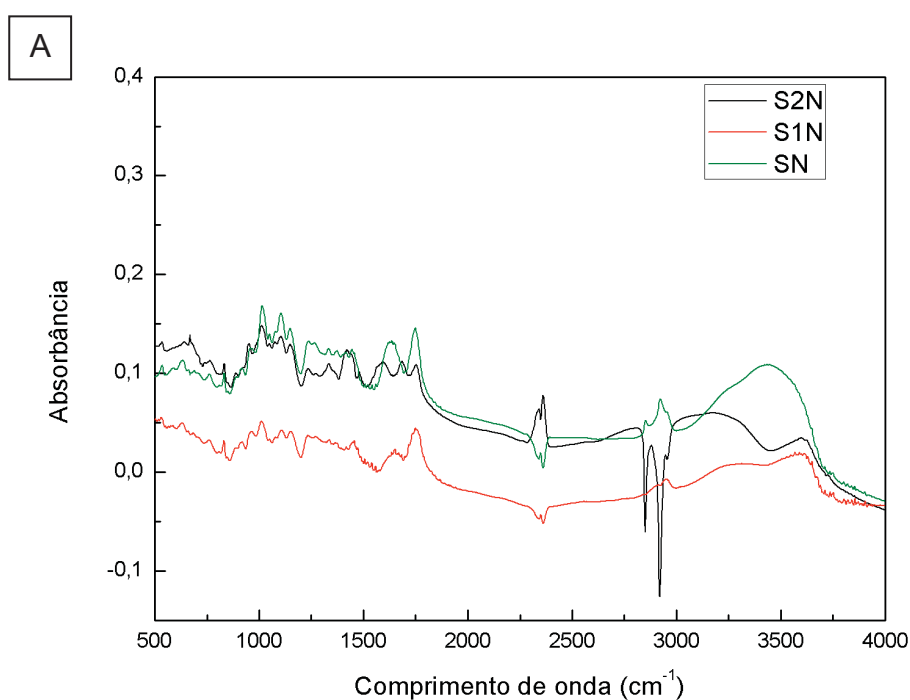


FIGURA 8 – ESPECTROS FT-IR DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (E) SN - NATIVA E (F) SMCP – MODIFICADA.

Segundo Liang *et al.* (2012), a razão entre a área do pico do grupo carboxílico esterificado sobre a soma dos picos dos grupos carboxílicos esterificados e não esterificados está correlacionado com o grau de esterificação das pectinas. Os espectros das pectinas nativas mostraram maior absorbância a 1753 cm^{-1} do que em 1630 cm^{-1} , que é característico da pectina de alto grau de esterificação. As pectinas modificadas também apresentaram este comportamento. Estas observações estabeleceram a base para a análise quantitativa do grau de esterificação de pectinas por FT-IR (VRIESMANN e PETKOWICZ, 2009; WAI, ALKARKHI e EASA, 2010).

Todos os espectros de FT-IR das pectinas nativas comparadas com as pectinas cítricas modificadas ilustrados na Figura 9 (A e B), apresentaram intensa absorção no intervalo de onda de 800 e 1200 cm^{-1} , considerando como a região dos carboidratos, permitindo identificar os principais grupos químicos nos polissacarídeos porque a posição e intensidade da banda é característica de cada polissacarídeo (LIANG *et al.*, 2011).



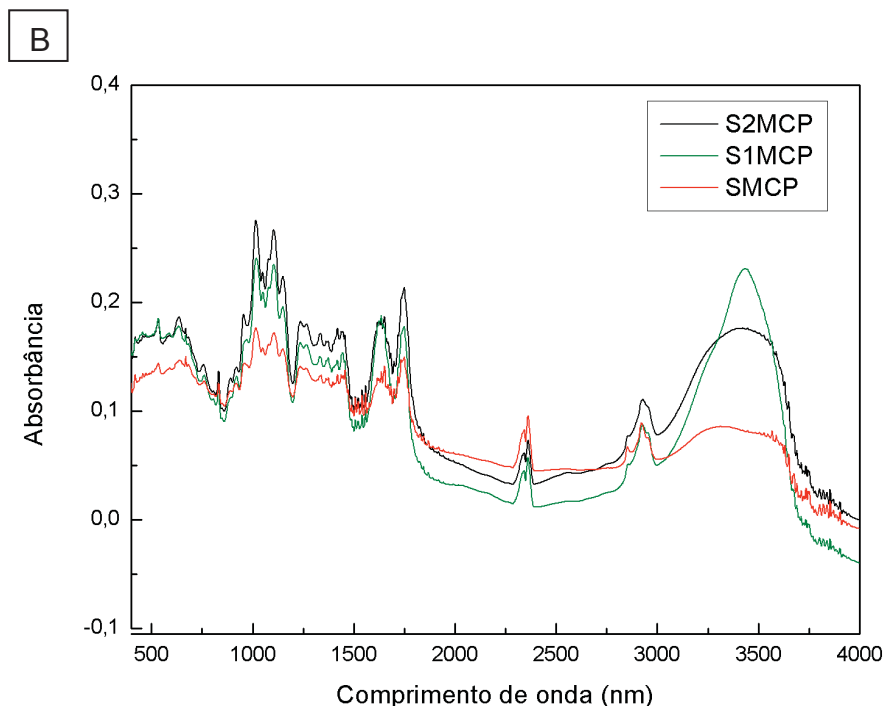


FIGURA 9 – ESPECTROS FT-IR DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (A) S2, S1 E S NATIVA E (B) S2, S1 E SMCP - MODIFICADAS.

NOTA: S2 (DE 58,4); S1 (DE 69,0) E S (DE >50 – SIGMA).

De acordo com Gnanasambandam e Proctor (2000), uma pequena diferença na estrutura e na composição de uma molécula pode resultar em mudanças significativas na intensidade dos picos de absorção no FT-IR. Desta maneira, é esperado que amostras de mesma fonte/origem possuam menores variações espectrais, como é o caso aqui apresentado.

Todas as amostras de pectinas mostraram a presença de grupos éter, que correspondem às ligações glicosídicas (C-O-C) em bandas com absorção entre 1000 e 1200 cm^{-1} , que corresponde as ligações éter R-O-R e cíclicas C-C do anel da estrutura das pectinas (LIU *et al.*, 2010), observando as áreas sobre este pico temos um aumento para a área das pectinas modificadas. As bandas que aparecem em 2922 cm^{-1} correspondem ao estiramento das ligações C-H de grupos alquila. Todas as amostras de pectinas nativas e modificadas apresentaram bandas de absorção que correspondem aos grupos carboxílicos de ácidos urônicos esterificados (1706 , 1710 , 1697 , 1693 , 1710 , 1716 , 1693 e 1689). Observou-se sinais nas regiões de 3000 a 3600 cm^{-1} correspondendo aos grupos O-H, no caso das pectinas, podem ser atribuídas a ligação de

hidrogênio intra e intermolecular do esqueleto do ácido galacturônico. As vibrações do grupo O-H podem indicar várias características de um composto, incluindo grupos hidroxila livres que esticam as ligações que ocorrem em amostras em fase de vapor e bandas O-H ligadas ao ácido carboxílico. Assim, um aumento na banda dos grupos O-H está relacionado ao aumento dos grupos hidroxila em amostras de pectina após modificação química, comportamento claramente observado nas amostras S1 e S2. Foram observadas bandas em torno de 2800 a 3000 cm^{-1} indicando presença de $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$, metil ésteres do ácido galacturônico (LIU *et al.*, 2010).

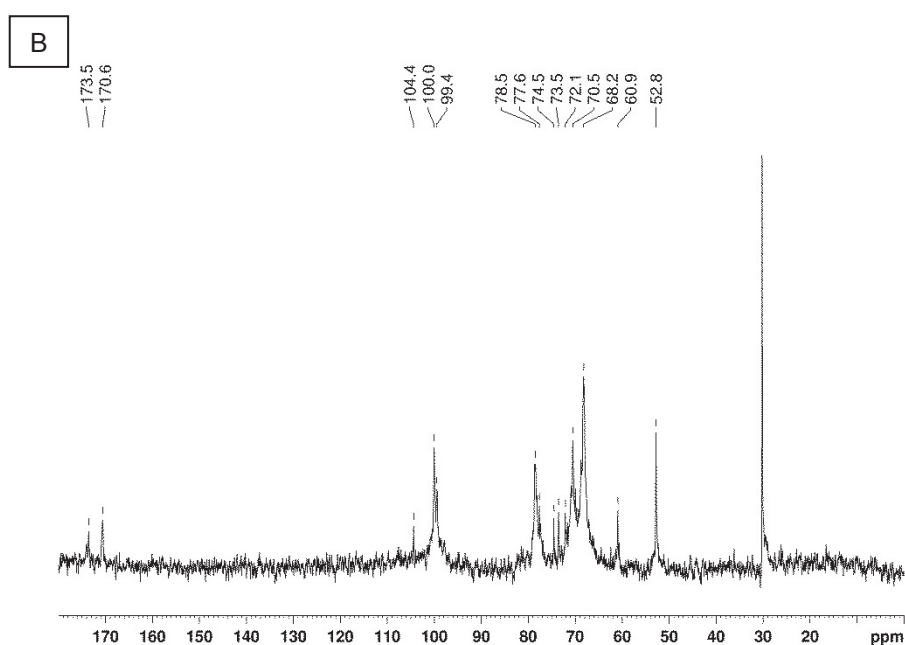
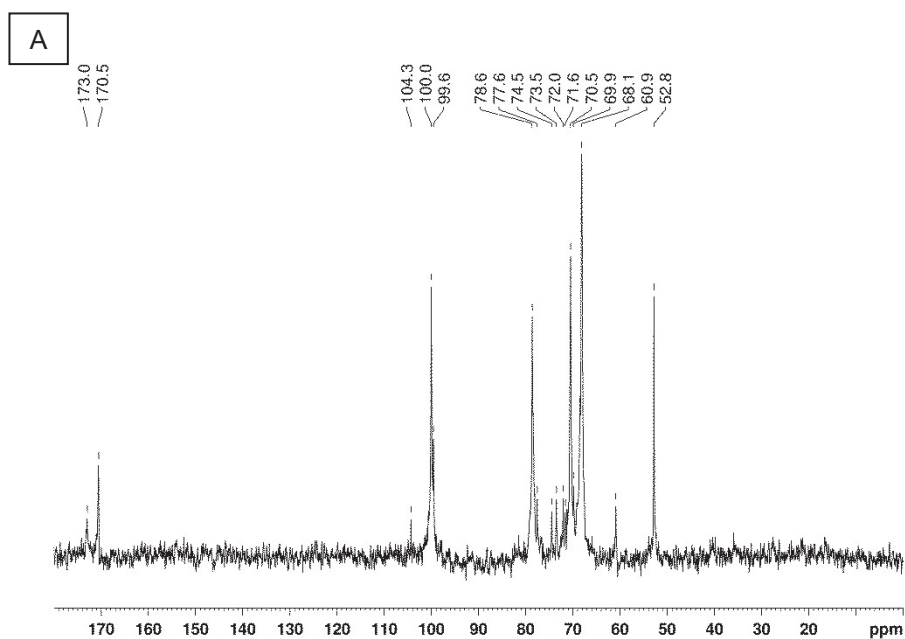
Com base nos valores de DE e nos espectros de FT-IR obtidos para as pectinas nativas e modificadas, pode-se concluir que a modificação química causou diferenças estruturais nas moléculas de pectina, observadas principalmente pela proporção de grupos carboxílicos esterificados e grupos carboxílicos livres. No entanto, a redução do grau de esterificação foi apenas observada para a pectina com maior grau de esterificação (S1).

4.3 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN C^{13})

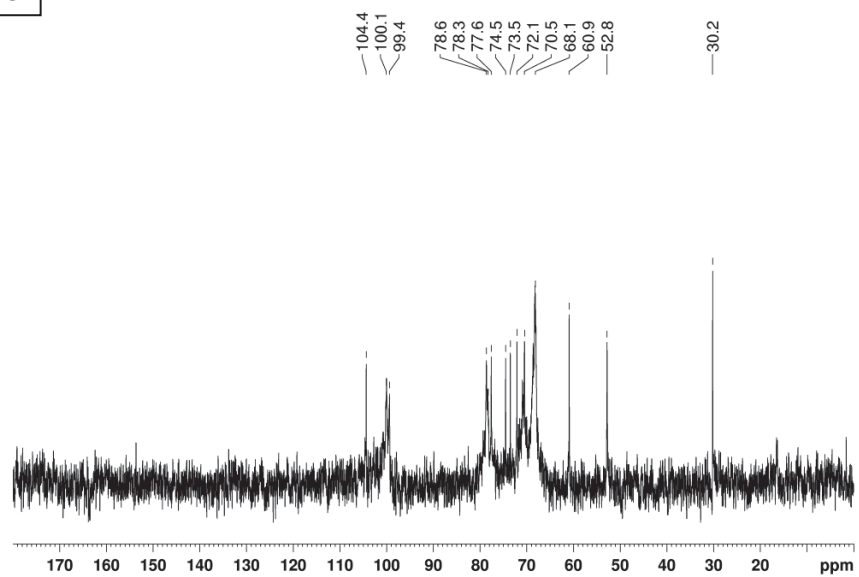
As amostras de pectina foram analisadas por espectroscopia de ^{13}C -RMN após solubilização em D_2O . Os espectros apresentaram diversos sinais comuns para a pectina cítrica modificada (MCP) e a pectina nativa com alto grau de esterificação (S1, S2 e S). Na Figura 10A para pectina S1 nativa mostrou a presença do ácido α -D-galacturônico, os picos encontrados em 100,1 e 99,6 ppm correspondem ao C-1 de unidades esterificadas e não esterificadas, respectivamente. Os picos encontrados em 170,6 e 173,5 ppm correspondem ao C-6 dos grupos carboxílicos metil-esterificados e não esterificados, respectivamente, enquanto que o pico em 52,9 ppm representa os grupos metil-éster dos grupos carboxílicos. Comparando os espectros de pectina nativa (S1) e pectina modificada (S1-MCP), é possível notar que o grupo esterificado de metil (170,6 ppm) teve seu sinal reduzido após a modificação química. Isto significa que após a modificação houve uma redução nos grupos esterificados, o que pode justificar a redução do grau de esterificação da

amostra modificada (64,1% a 53,0%, S1-N e S1-MCP, respectivamente). O espectro obtido corrobora os resultados obtidos na análise FTIR.

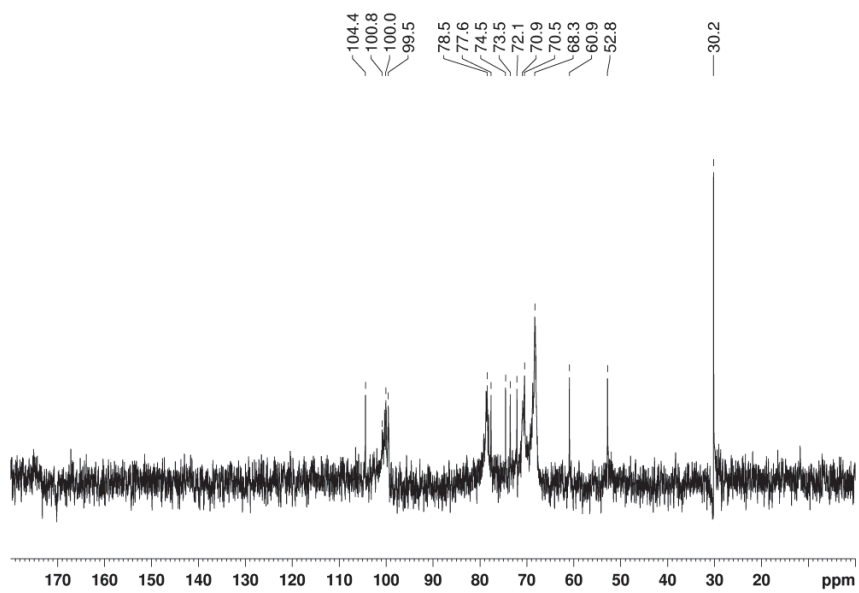
Os sinais dos carbonos das unidades de ácido galacturônico aparecem em 68,2 ppm (C-2), 70,0 ppm (C-3), 78,7 ppm (C-4), 71,7 ppm (C-5).



C



D



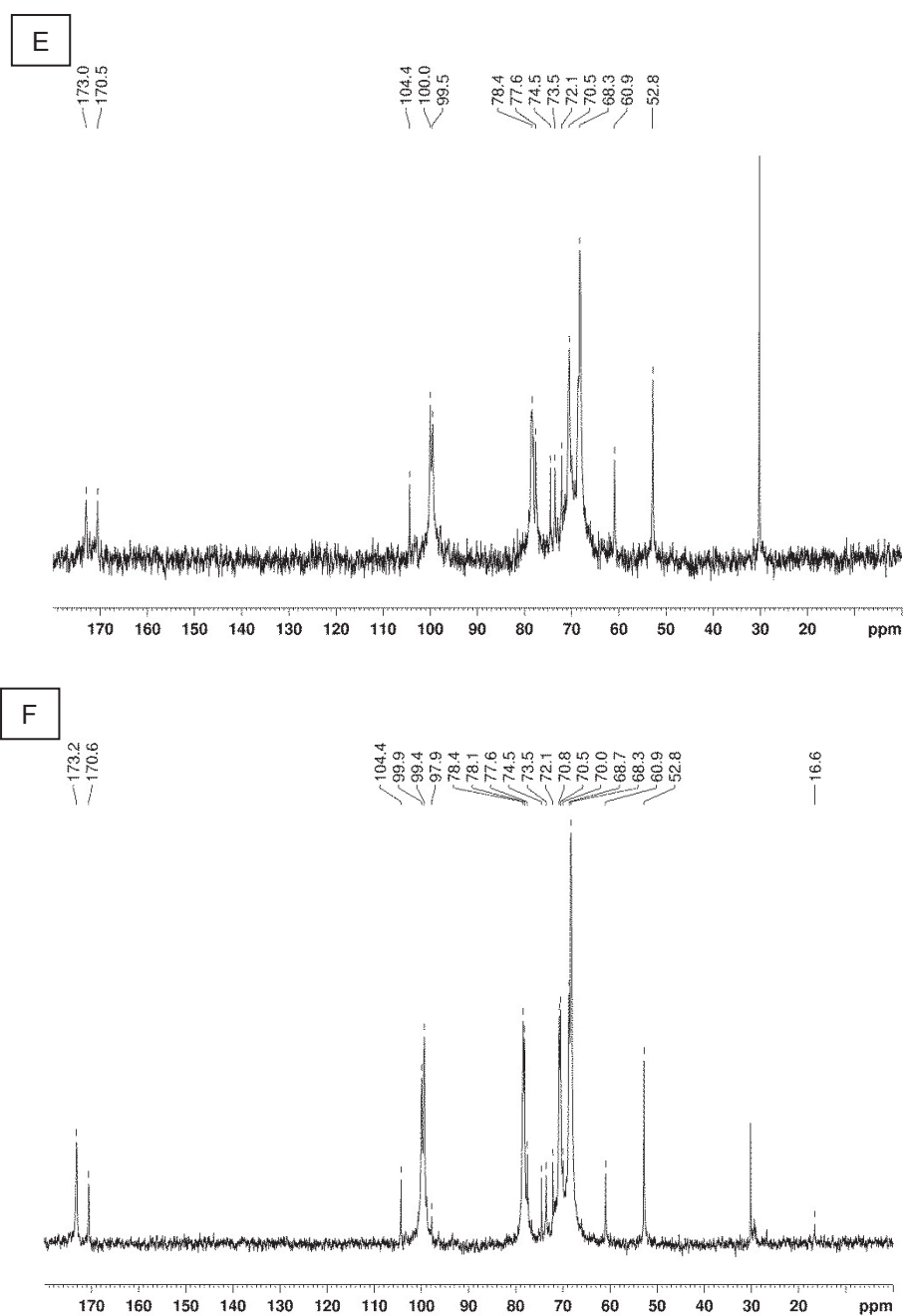


FIGURA 10 – ESPECTROS DE ^{13}C RMN (70°C , 100 MHz) PARA AS PECTINAS CÍTRICAS: (A) S1 NATIVA, (B) S1 MODIFICADA, (C) S NATIVA, (D) S MODIFICADA, (E) S2 NATIVA, (F) S2 MODIFICADA. SOLVENTE D_2O .

*Deslocamentos químicos expressos em ppm.

Na Figura 10B para pectina S1 modificada observa-se os mesmos assinalamentos, porém uma diminuição nos picos 100,0 e 99,4 ppm correspondentes ao C-1 de unidades esterificadas e não esterificadas, respectivamente, o que significa que houve uma diminuição no conteúdo de

ácido urônico após a modificação química, e nos picos 170,6 e 173,5 ppm do C-6 dos grupos carboxílicos metil-esterificados e não esterificados, respectivamente. Os espectros da pectina S nativa (Figura 10C) mostram assinalamentos em 100,08 e 99,36 ppm para as nativas (C-1 unidades GalA esterificados e não esterificados, respectivamente) e para S modificada (Figura 10D) em 100,04 e 99,53 ppm (C-1 unidades GalA esterificados e não esterificados, respectivamente). Na Figura 10E para pectina S2 nativa o pico em C-1 aparece em 99,6 ppm e para a S2 modificada (Figura 10F) em 99,4 e 99,9 ppm. Houve diminuições em todos os assinalamentos do C-1 para as pectinas modificadas e o sinal de 104,4 ppm foi atribuído ao C-1 de unidades de galactose e apareceu em todas as amostras nativas e modificadas. A redução do pico em relação ao sinal 52,9 ppm para as pectinas modificadas indicam a redução do DE na análise por FT-IR. O sinal de CH₃ das unidades de ramnose foi encontrado em 16,7 ppm somente para pectina S2 modificada, corroborando com os dados da composição de monossacarídeos onde esta amostra teve um aumento do conteúdo de ramnose.

Os sinais de C-2, C-3, C-4 e C-5 obtidos para as pectinas nativas e modificadas (Figura 10C, D, E e F) apresentaram-se semelhantes aos observados para a pectina S1 nativa e para pectina S1 modificada. Os assinalamentos foram feitos de acordo com a literatura (HA *et al.*, 2005; WESTERENG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2013), esses resultados indicam a presença de regiões de homogalacturonana, ramnogalacturonana I (RG-I) com arabinose e galactose nas amostras de pectinas nativas e principalmente nas modificadas, esses resultados são consistentes com os encontrados na composição monossacarídica. Segundo Ha *et al.* (2005) a correlação entre a capacidade para o aumento rápido e o alto conteúdo de monossacarídeos neutros galactose, arabinose e ramnose, são características de uma ramnogalacturonana I (RG-I).

FT-IR e o RMN são métodos eficazes para determinar estruturas de polissacarídeos, incluindo as pectinas (VORAGEN *et al.*, 1995). O grau de esterificação (DE) e a porcentagem do número total de grupos carboxila esterificado tem um efeito significativo na resistência do gel e nos mecanismos de gelificação das pectinas (WALTER, 1991).

4.4 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E DE MASSA MOLAR POR HPSEC-MALLS E MODIFICAÇÃO QUÍMICA

A Figura 11 ilustra os perfis de eluição das amostras de pectinas cítricas nativas e modificadas obtidos por HPSEC (detector de índice de refração - RI - e espalhamento de luz a 90° - MALLS). Enquanto o detector de RI fornece um sinal proporcional à concentração, o de MALLS evidencia a massa molecular do composto. Todas as amostras de pectinas nativas e modificadas mostram um perfil de eluição homogêneo: observa-se a presença de um pico eluindo em torno de 38 minutos, detectado pelo espalhamento de luz, que coincide com um pico no índice de refração, indicando que se trata de um componente de elevada massa molar. Yapo *et al.* (2007) e Thibault *et al.* (1993) encontraram perfis homogêneos semelhantes com pectina cítricas.

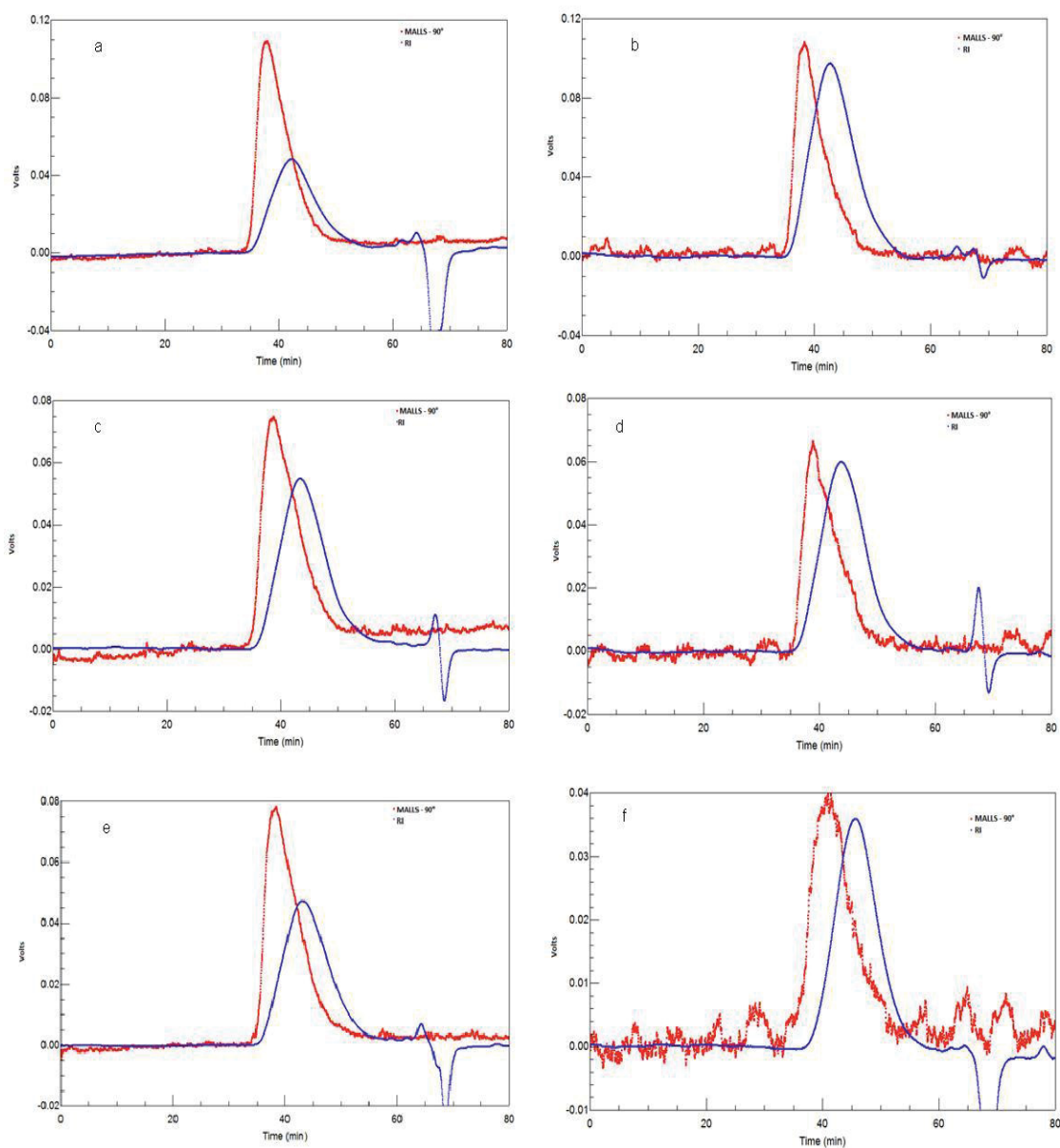


FIGURA 11 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DAS PECTINAS CÍTRICAS: (a) S1 NATIVA, (b) S1 MODIFICADA, (c) S NATIVA, (d) S MODIFICADA, (e) S2 NATIVA, (f) S2 MODIFICADA.

Observa-se nas Figuras 11B, 11D e 11F (referentes às pectinas S1 MCP, S MCP e S2 MCP, respectivamente) um pico evidente no detector de índice de refração, que aparece em torno de 45 minutos. Este coincide com uma mínima intensidade no espalhamento de luz, indicando componentes de menor massa molar, detectados somente pelo índice de refração. Segundo Kim, Teng e Wicker (2005), a pectina apresenta regiões lineares e cadeias laterais ramificadas, variações inter e intramolecular, além de diferentes

padrões de distribuição dos grupos metil-éster ao longo da cadeia poligalacturônica.

A caracterização da pectina quanto à sua massa molar é importante visto que esta característica influencia diretamente em sua propriedade gelificante e a força do gel formado por este polissacarídeo: quanto maior a massa molecular, maior será a rigidez do gel (PAGAN e IBARZ, 1999). De acordo com Diaz, Anthon e Barret (2007) a massa molar é uma característica importante da pectina que reflete nas suas propriedades funcionais, sendo estas propriedades responsáveis pela aplicação a ser dada à pectina.

A massa molar e dn/dc das pectinas nativas e modificadas foram determinados por HPSEC/MALLS – RI e estão apresentados na Tabela 6. A modificação química das pectinas resultou em uma diminuição da sua massa molar de 10,50%, 29,98% e 25,29%, para S1, S2 e S, respectivamente. Os açúcares neutros não foram reduzidos com a modificação química, porém o teor de ácido galacturônico foi em vez disso. Assim, a diminuição da massa molar sugere que a cadeia linear do ácido galacturônico foi alterada (como também observado na Tabela 4. A massa molar encontrada para as amostras de pectina foi além disso similar aos valores encontrados por Mesbahi, Jamalian e Farahnaky (2005) para pectina de alto grau de esterificação extraída da beterraba ($1,53 \times 10^5$ g/mol) e pectina cítrica comercial de alto grau de esterificação ($1,16 \times 10^5$ g/mol), ambas analisadas por HPSEC/MALLS.

Segundo Izydorczyk; Cui e Wang (2005), a massa molar média de pectinas de várias fontes de frutos é da ordem de 10^4 e 10^5 Da. Os valores encontrados neste estudo são consistentes com esses valores.

TABELA 6 – MASSA MOLAR e dn/dc DAS AMOSTRAS DE PECTINAS NATIVAS E MODIFICADAS, DETERMINADOS POR HPSEC/MALLS - RI

Pectinas	M_w (g mol ⁻¹) e ED – nativa	M_w (g mol ⁻¹) e ED – modificada	dn/dc – nativa	dn/dc - modificada
S1	$1,846 \times 10^5$ (0,6%)	$1,652 \times 10^5$ (0,6%)	0,130	0,155
S2	$1,871 \times 10^5$ (0,5%)	$1,310 \times 10^5$ (0,5%)	0,150	0,124
S	$1,546 \times 10^5$ (0,7%)	$1,155 \times 10^5$ (0,7%)	0,113	0,124

*ED: Erro de determinação; ** dn/dc : índice de refração diferencial. S1 – amostra 1, S2 – amostra 2, S – Padrão.

Pode-se justificar a diminuição anômala da massa molar relativa à pectina S2 em vista das particularidades da análise de HPSEC-MALLS, que é bastante delicada, pelos resultados do FT-IR ela praticamente manteve-se constante e/ou igual. De acordo com Voragen *et al.* (1995), em muitos casos são obtidas discrepâncias entre os resultados mesmo quando os experimentos são conduzidos com especial cuidado, o que pode ser atribuído à polidispersão, ao fenômeno de agregação (que depende do DE e da concentração e interfere na coleta dos dados por espalhamento de luz) e às dificuldades experimentais, especialmente para amostras com elevada massa molar. De modo geral, contudo, a massa molar das amostras modificadas diminuíram em relação às pectinas nativas, conforme esperado.

A modificação das pectinas cítricas, que ocorre de forma química, destina-se principalmente a diminuir a sua massa molar com o objetivo de promover benefícios importantes à saúde humana quando consumidos em formulações alimentícias e farmacêuticas. Estes benefícios incluem a redução do crescimento de tumores e a inibição da formação de metástases. Embora alguns estudos tenham demonstrado o potencial das pectinas cítricas modificadas como agentes terapêuticos de doenças cancerígenas, ainda se encontra por elucidar os mecanismos pelos quais as pectinas induzem a apoptose de células cancerígenas e inibem a propagação de metástases, bem como ainda não é claro, devido à sua complexidade estrutural, quais tipos de estruturas moleculares em particular são responsáveis por esta atividade. A pectina é modificada pelo ajuste de pH e pelo tratamento térmico, o que acarreta a quebra da sua cadeia em fragmentos menores que teoricamente podem ser absorvidos pelo organismo. Estudos sugerem que os fragmentos de pectina com pequena massa molar, ricos em galactose, se ligam à proteína vinculada à galectina-3 (GAL3) (MAXWELL *et al.*, 2012; MORRIS *et al.*, 2013).

Para fins de modificação química, primeiramente a pectina passa por um tratamento alcalino e em seguida por um tratamento ácido para diminuir sua massa molar de aproximadamente 10 kDa (MORRIS *et al.*, 2013). A degradação que ocorre como resultado da modificação química da pectina está relacionada com as suas propriedades, tais como grau de esterificação e

massa molecular (FRAYE *et al.*, 2010; KRALL e MCFEETERS, 1998; MUNARIN *et al.*, 2013).

Tem sido relatado que a função medicinal da pectina é intimamente relacionada com as suas características estruturais. Por exemplo, a pectina com um baixo teor de esterificação e menor massa molar (<10 kDa) mostrou-se mais eficiente para a prevenção de metástases do câncer, enquanto que a pectina com um conteúdo de alta metoxilação e massa molar é um agente de redução do bom colesterol (LIU *et al.*, 2010). Glinsky e Raz (2009) concluíram que é possível que uma combinação de pH e temperaturas elevadas no tratamento utilizado na preparação da MCP seja ideal para gerar pectinas com capacidade de inibir a ligação da galectina, promover a apoptose e ajudar a evitar a propagação do câncer.

Segundo Williams *et al.* (2007), as pectinas são polidispersas e heterogêneas quanto à massa molar e estrutura química e possuem características físico-químicas distintas dependendo de sua fonte, forma de extração e outras condições ambientais.

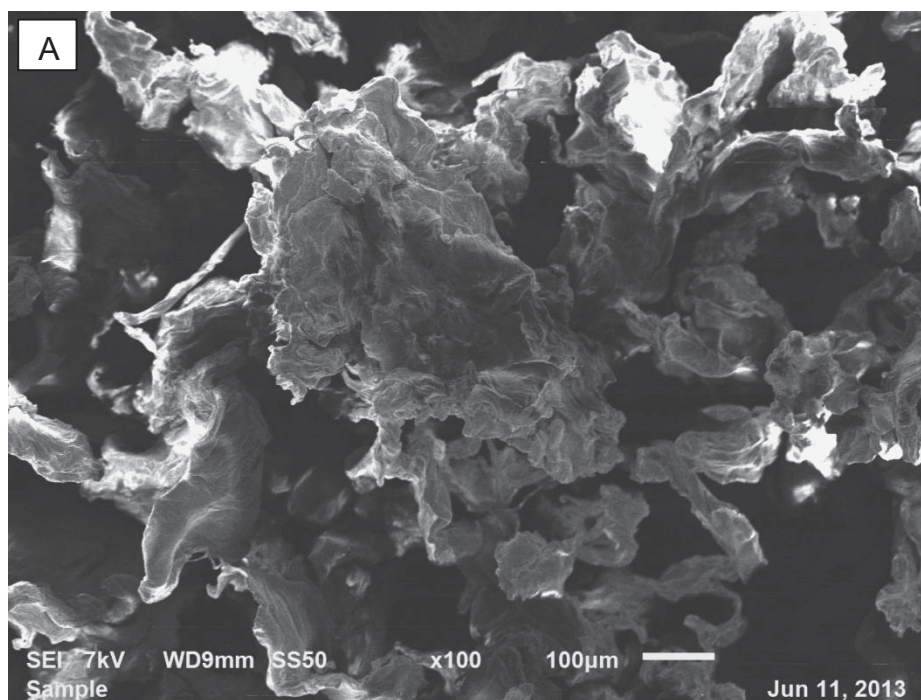
Nesse estudo, pode-se verificar que a massa molar obtida após a modificação química foi maior que o valor referenciado para a sua função medicinal (115,5 a 165,2 kDa, S-MCP e S1-MCP, respectivamente). Assim, provavelmente as pectinas do presente estudo não foram modificadas o suficiente para serem absorvidas pelo organismo humano.

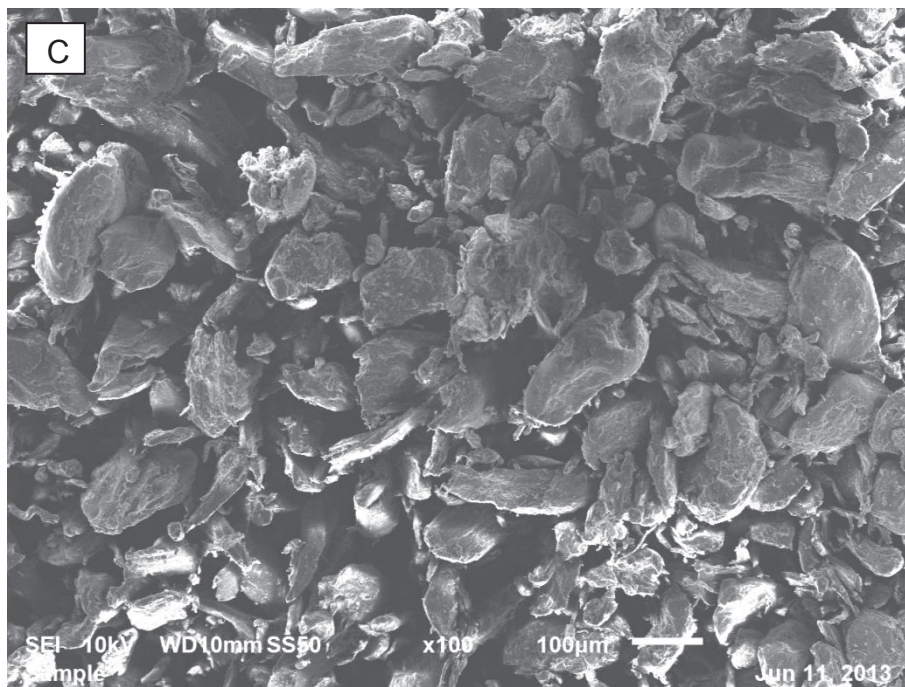
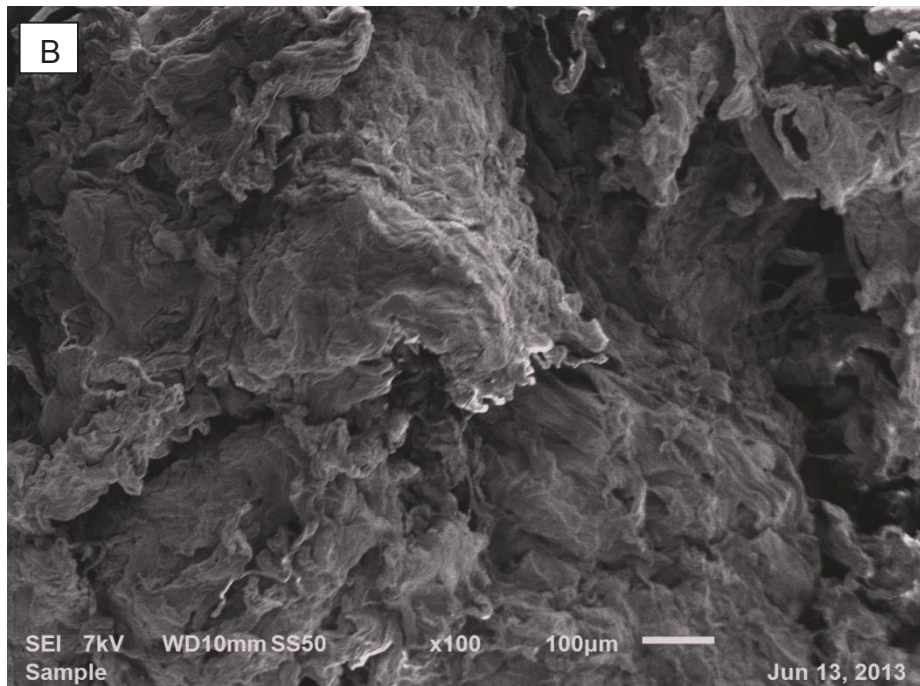
Embora não tenha ocorrido uma diminuição significativa no DE da S2-MCP e S-MCP (Tabela 5), é possível verificar que houve uma diminuição na massa molar de todas as amostras de pectina após a modificação, indicando que modificações estruturais ocorreram nas amostras. Uma vez que os açúcares neutros aumentaram com a modificação química, independente das amostra nativa, a redução da massa molar pode ser atribuída a degradação parcial das cadeias de ácidos galacturônicos.

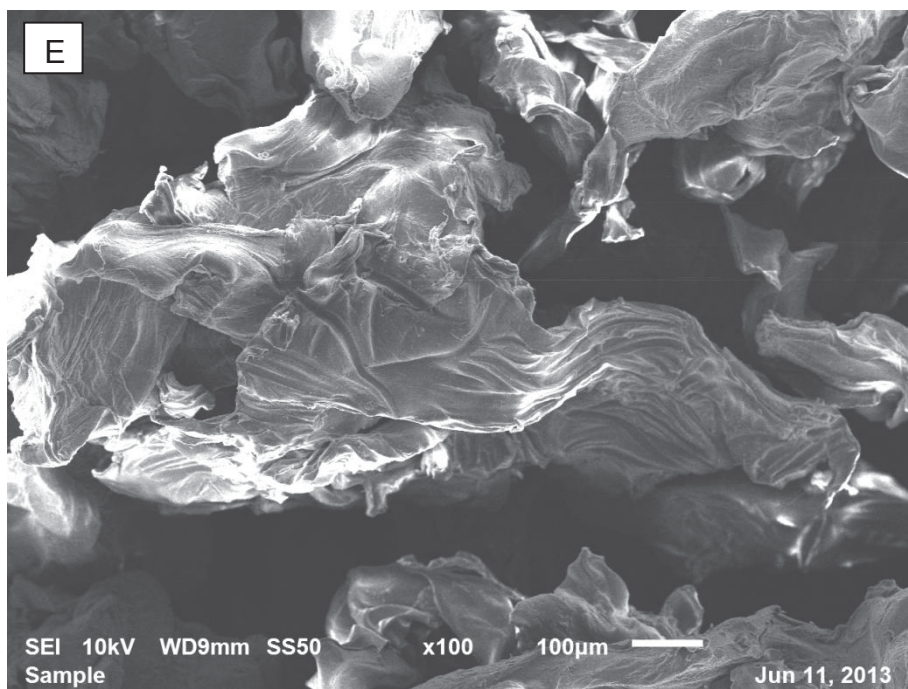
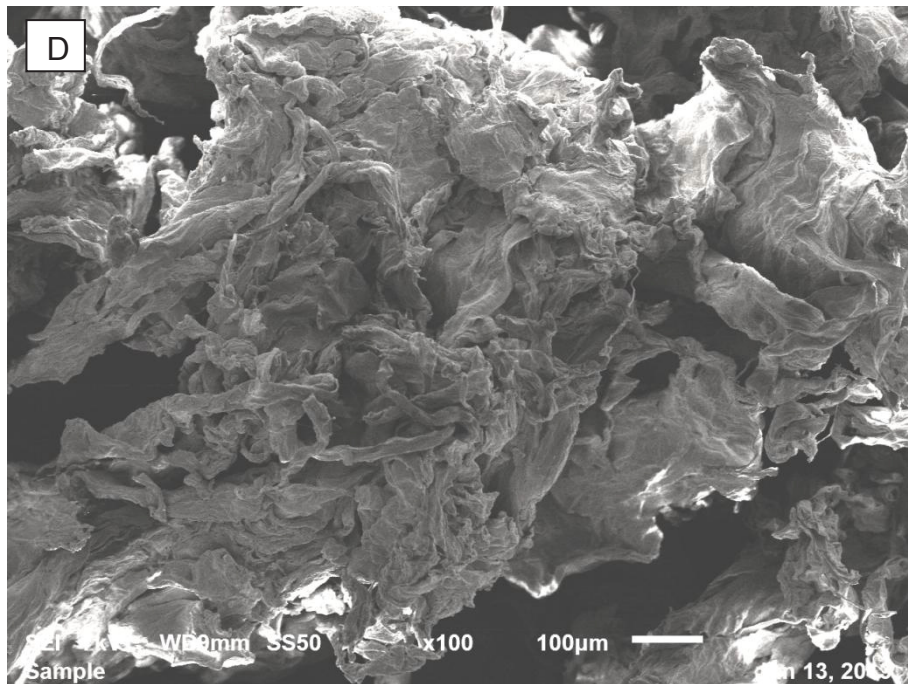
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DAS PECTINAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

Para caracterizar a superfície das amostras de pectinas nativas e modificadas foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o objetivo de visualizar sua estrutura e morfologia de modo a compreender qual o nível de modificação sofrido pelas pectinas.

Pode-se observar na Figura 12 que as amostras nativas e modificadas apresentam-se com partículas multiformes e de diversos tamanhos, com aparência de fibras.







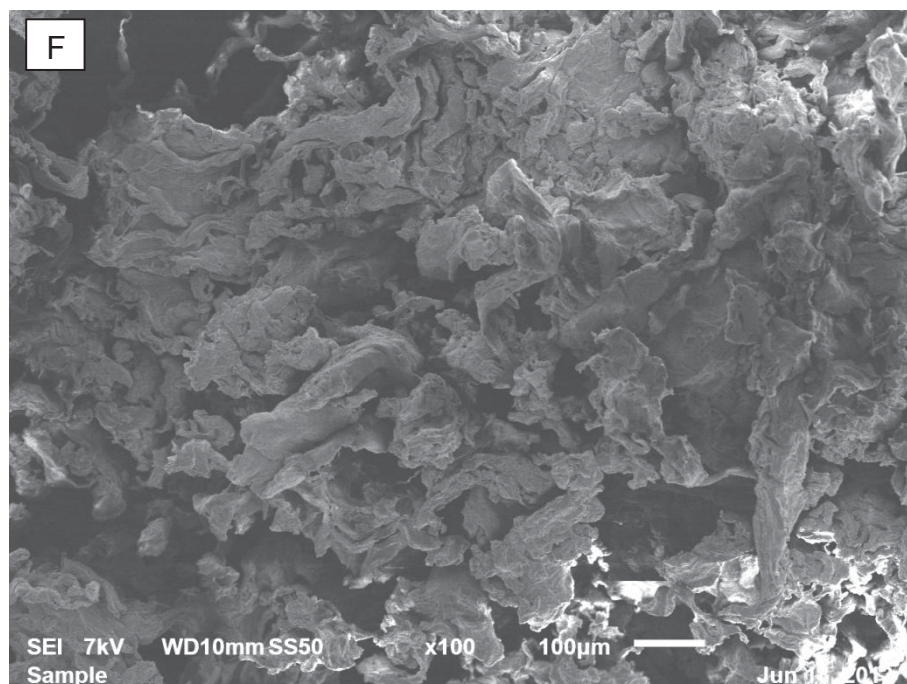


FIGURA 12 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS AMOSTRAS DE PECTINA CÍTRICA: (A) S1 NATIVA; (B) S1 MODIFICADA; (C) S NATIVA; (D) S MODIFICADA; (E) S2 NATIVA; (F) S2 MODIFICADA.

*Aumento em (A) e (B) de 100 X, (C) e (D) de 100 X e em (E) e (F) de 100 X

A observação precisa das partículas nas amostras de pectinas modificadas mostra uma estrutura de característica fibrosa, ou pelo menos rugosa, com tamanhos médios observáveis de 5 a 100 μm (Figuras 12B, 12D e 12F). Einhorn-Stoll *et al*, (2015) encontraram estrutura similar para pectina cítrica modificada. Comparando as amostras nativas com as modificadas nota-se que variaram de tamanho, as amostras de pectinas nativas (Figuras 12A, 12C e 12E) podem conter partes filamentosas e tem uma superfície um pouco porosa. Considerando que o tamanho da partícula da pectina pode ser influenciada pelo processo de moagem das partículas e a morfologia da superfície tem uma maior dependência de interações intermoleculares e intramoleculares das moléculas de pectina, isso mostra que as amostras de pectinas modificadas foram afetadas pelas condições do processo de modificação por tratamento alcalino.

Einhorn-Stoll, Hatakeyama e Hatakeyama (2012), observaram que partículas pequenas irregulares, amorfas e porosas com um elevado número de grupos polares podem acelerar a absorção de água e reagir com a água.

Porém partículas amorfas maiores mostram taxa mais lenta de absorção de água e assim, o processo de degradação pode ser retardado nestas partículas, mesmo que a pectina contenha um elevado número de grupos polares.

4.6 ANÁLISES REOLÓGICAS (REGIME NÃO-OSCILATÓRIO E OSCILATÓRIO)

As medidas reológicas possibilitam a caracterização de pectinas em soluções, o que permite fornecer dados importantes no desenvolvimento dos processos tecnológicos, no controle de qualidade das matérias-primas e produtos padronizados e na determinação de dados na pesquisa e desenvolvimento de um material específico (ENDRESS, DÔSCHL-VOLLE e DENGLER, 1996). De acordo com Fissore, Rojas e Gerschenson (2012), as propriedades da solução desses polissacarídeos é de grande interesse para um grande número de aplicações, como por exemplo, agentes gelificantes e espessantes de suspensão.

Desta maneira, o modelo da Lei da Potência se ajustou apropriadamente as curvas de fluxo (Figura 13) das soluções aquosas na concentração de $5 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ das amostras de pectinas nativas e modificadas com alto coeficiente de determinação (R^2). Pode-se observar que a modificação influenciou significativamente o comportamento reológico das pectinas. Após serem modificadas, as pectinas apresentaram uma diminuição no seu coeficiente de consistência (K) e um aumento no seu índice de comportamento (n), indicando mudança da estrutura molecular e um menor comportamento não-newtoniano do tipo pseudoplástico. As pectinas modificadas (MCP) tiveram um decaimento rápido da tensão de cisalhamento com o aumento da taxa de cisalhamento em comparação com as pectinas nativas. Uma diferença na viscosidade foi observado entre as amostras de pectina nativas e as modificadas, onde os valores foram bem inferiores para as pectinas modificadas. Venzon *et al.* (2015) observaram o mesmo comportamento para pectinas cítricas comerciais modificadas por tratamento alcalino. E concluíram que valores inferiores na viscosidade pode ser um fator positivo porque isso significa um menor gasto

em energia durante o processamento, ao qual não requer o aumento da viscosidade.

Min *et al.* (2011) em seu estudo com pectinas do bagaço da maçã, observaram também na mesma concentração do presente estudo comportamento pseudoplástico.

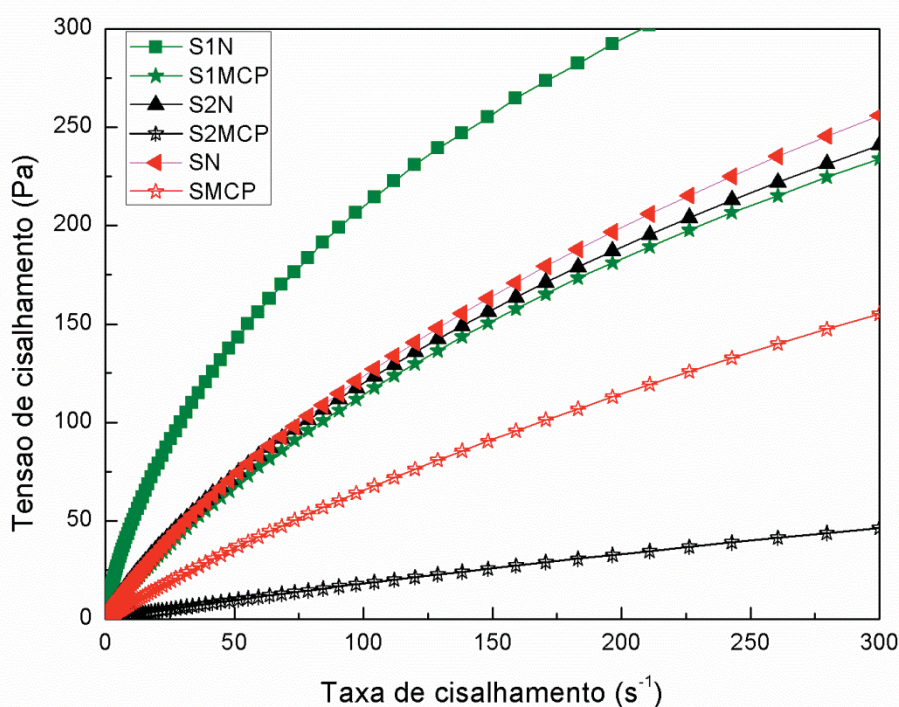


FIGURA 13 – CURVAS DE FLUXO DAS SOLUÇÕES AQUOSAS NA CONCENTRAÇÃO DE 5 g.100g⁻¹ DAS AMOSTRAS DE PECTINAS NATIVAS: S1N, S2N E SN E DAS AMOSTRAS DE PECTINAS MODIFICADAS: S1MCP, S2MCP E SMCP, AJUSTADAS PELO MODELO LEI DA POTÊNCIA.

Quanto menor for n , mais as características do fluido se afastam das newtonianas. Para todas as pectinas, o índice de comportamento aumentou após a modificação química, o que indica uma aproximação do comportamento newtoniano para as soluções pécticas. Para fins de operações unitárias, esta característica é interessante dado que facilita o dimensionamento de pasteurizadores, bombas e tubulações. A viscosidade aparente (η) das amostras nativas revelou-se maior do que das modificadas, sugerindo que a modificação química das pectinas alterou suas propriedades reológicas, o que

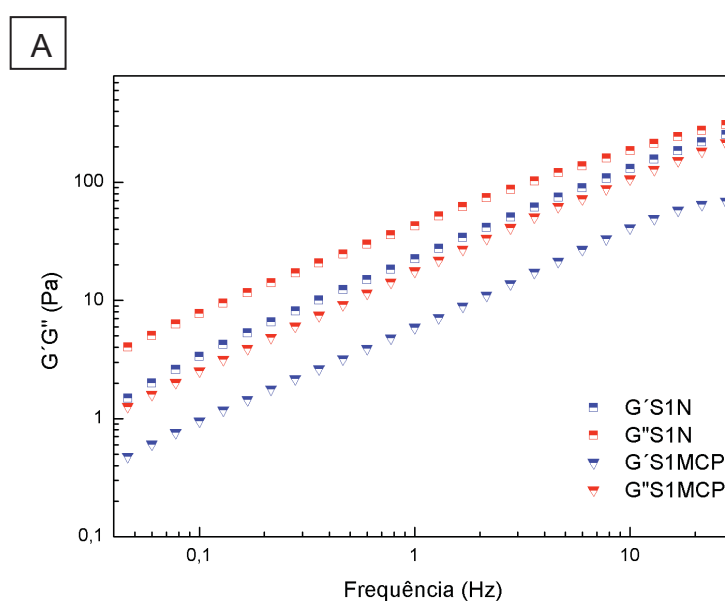
é confirmado pelas mudanças nos valores de DE e M_w . Os valores de viscosidade aparente máxima e mínima apresentados na Tabela 7 correspondem às tensões de cisalhamento máximo e mínimo utilizadas nos testes reológicos. Visto que a perda de carga está relacionada com a viscosidade, a diminuição desta propriedade reduz custos de produção ligados ao transporte de fluidos durante o processamento. A viscosidade da pectina pode ser afetada por vários fatores, incluindo a M_w , a agregação, a conformação das moléculas, o grau de esterificação (DE), o pH, a temperatura e a fonte da pectina (ZHOU *et al.*, 2014; KIM e WICKER, 2009). Tais alterações na viscosidade e M_w podem indicar uma mudança no padrão de ligações de hidrogênio que mantém juntos os agregados da pectina (FISHMAN *et al.*, 2000). Os coeficientes de consistência (K) conforme mostrados na Tabela 7, por sua vez, diminuíram cerca de quatro vezes para todas as pectinas à temperatura de 25°C, de acordo com a análise de variância (ANOVA). Em suma, as pectinas modificadas sofreram uma diminuição significativa na viscosidade aparente e no coeficiente de consistência, associada à redução da massa molecular. Em seu estudo com pectina cítrica, Masuelli (2011) encontrou comportamento similar.

TABELA 7 — AJUSTES DOS DADOS REOLÓGICOS DAS AMOSTRAS DE PECTINAS NATIVAS E MODIFICADA PELO MODELO LEI DA POTÊNCIA.

Amostras de pectinas	K (Pa.s ⁿ)	N	R ²	η_{\max} (Pa.s)	η_{\min} (Pa.s)
S1-N	14,033±1,488	0,574±0,021	0,998	397,02±67,96	1,240±0,201
S1-MCP	3,893±0,009	0,729±0,009	0,999	32,558±1,91	0,830±0,061
S2-N	4,625±0,010	0,699±0,003	0,998	48,748±1,18	0,831±0,012
S2-MCP	0,316±0,006	0,881±0,004	0,999	0,801±0,03	0,160±0,002
S-N	4,005±0,004	0,735±0,004	0,995	31,855±1,05	0,844±0,023
S-MCP	1,399±0,051	0,830±0,005	0,988	5,310±0,40	0,530±0,008

n=3, R² – coeficiente de determinação; K – coeficiente de consistência; n – índice de comportamento de fluxo; η - viscosidade aparente. S1-N – amostra Nativa 1 (DE 69,0), S1-MCP – amostra 1, pectina cítrica modificada, S2-N – amostra 2 Nativa (DE 58,4), S2-MCP - amostra 2 pectina cítrica modificada, S-N – Nativa padrão, S-MCP – pectina cítrica modificada padrão.

Polissacarídeos são materiais viscoelásticos, apresentam características de sólidos e líquidos, e os módulos G' e G'' referem-se ao caráter elástico e viscoso, respectivamente, sendo possível quantificar a predominância do caráter sólido ou líquido de uma amostra através de medições dinâmicas. A determinação dos módulos G' e G'' em relação à frequência deve ocorrer na região viscoelástica linear, sob condições em que a deformação utilizada retém a estrutura original da amostra, sem perturbação significativa do sistema (IAGHER, REICHER e GANTER, 2002). Na Figura 14 são mostrados os módulos dinâmicos (G' e G'') das pectinas nativas e modificadas em função da frequência, durante o experimento oscilatório. O módulo viscoso G'' das soluções de pectinas modificadas foram superiores do que o módulo de elasticidade G' , em toda a faixa de frequência estudada, indicando um comportamento viscoso. Segundo Sharma, Mulvaney e Rizvi (2000), os ensaios oscilatórios são úteis para caracterizar a conformação macromolecular e as interações intermoleculares em solução. Informações de varreduras de frequências podem ser usadas para caracterizar uma dispersão desde que estes testes se restrinjam ao intervalo de viscoelasticidade linear. As pectinas nativas apresentaram valores de G' superiores aos obtidos para as pectinas modificadas, bem como uma maior diferença entre G' e G'' .



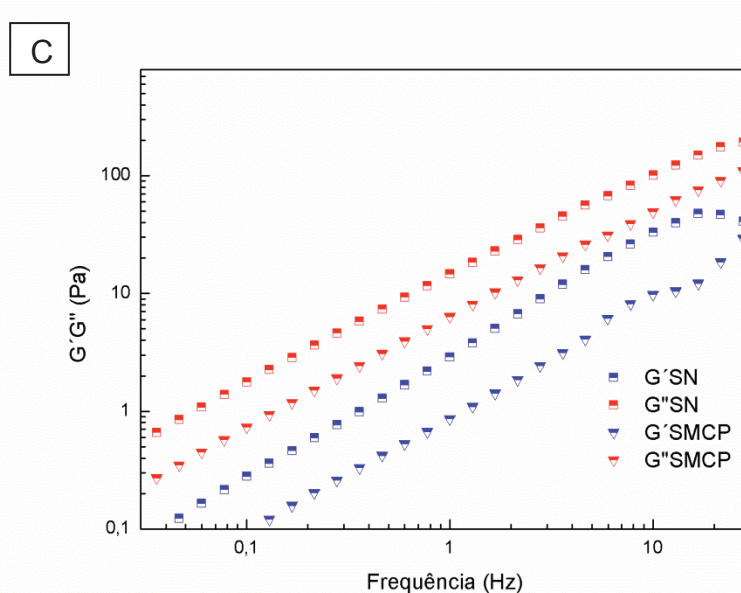
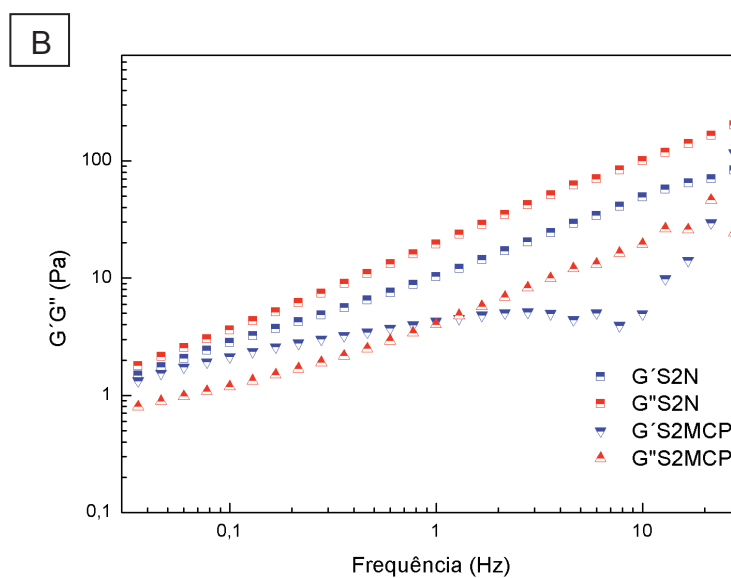


FIGURA 14 – MÓDULOS DE ARMAZENAMENTO G' E MÓDULOS DE PERDA G'' EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA PARA AS PECTINAS NATIVAS (N) E MODIFICADAS (MCP) ($\tau = 0,1$ a $0,3$ Pa): (A) S1N – AMOSTRA NATIVA 1, S1MCP – AMOSTRA 1, PECTINA CÍTRICA MODIFICADA (B) S2N – AMOSTRA 2 NATIVA, S2MCP - AMOSTRA 2 PECTINA CÍTRICA MODIFICADA E (C) SN – NATIVA PADRÃO, SMCP – PECTINA CÍTRICA MODIFICADA PADRÃO.

As soluções de pectina nativa mostraram-se mais viscosas comparadas com as amostras modificadas, o que é associado com a quantidade de ácido galacturônico encontradas durante as análises químicas. O ácido galacturônico

está diretamente relacionado à formação de rede da pectina, além disso, a diferença pode ser atribuída aos valores do grau de esterificação (DE) e à massa molecular das pectinas. Muitos fatores afetam as características reológicas das pectinas, assim como a força do gel formado. O comprimento de cadeia e a natureza química das zonas de conexão pelas moléculas de pectina exercem forte influência sobre essas características. Sob condições iguais, a força do gel aumenta com o aumento da massa molecular e qualquer tratamento que despolimerize as cadeias de pectinas refletirá em géis mais fracos (HAMINIUK *et al.*, 2006), o que pode justificar a diminuição da consistência das soluções das pectinas modificadas.

CONCLUSÃO

Nosso estudo indicou que a modificação proposta na pectina cítrica influenciou sua estrutura (composição de monossacarídeos, massa molar, propriedades reológicas) em certa medida.

As pectinas modificadas por tratamento alcalino apresentaram menores teores de ácido urônico e maior proporção de açúcares neutros que as nativas. As pectinas nativas após modificação química apresentaram maiores quantidades de monossacarídeos neutros, principalmente galactose, arabinose e rhamanose, típico da região de Ramnogalacturonana-I (RG-I).

Os resultados de ^{13}C -RMN foram consistentes com os encontrados na composição monossacarídica e com a análise de FT-IR.

A massa molar foi influenciada pela modificação proposta e, como esperado, foi reduzida após o tratamento. No entanto, essa redução não foi suficiente para afirmar que estas pectinas poderiam ser melhoradas o suficiente para serem absorvidas pelo organismo humano.

O comportamento reológico das amostras de pectina foi significativamente influenciado pelo processo de modificação, apresentando menor viscosidade, sugerindo que ocorreram alterações nas estruturas moleculares das amostras de pectinas nativas. As soluções de pectinas cítricas modificadas apresentaram boa estabilidade à temperatura ambiente, melhor dissolução na água e comportamento pseudoplástico.

Este estudo contribui para melhor compreender o comportamento das pectinas submetidas ao tratamento alcalino e como essa modificação química pode influenciar nas propriedades estruturais de um polissacarídeo tão complexo.

REFERÊNCIAS

ACIL – Associação Comercial e Industrial de Limeira. Visão empresarial 2007. CPKelco Brasil S/A. Disponível em: <http://www.acil.org.br/site/diadaempresa/2007/encarte01/jornal10.htm>. Acesso em: 19/11/2012.

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

ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G.; O'NEILL, M.A.; SCHOLS, H.A. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants, in: J. Visser, A.G.J. Voragen (Eds.). **Pectins and Pectinases**, Elsevier, Amsterdam, p. 47–55, 1996.

ALMRHAG, O.; GEORGE, P.; BANNIKOVA, A.; KATOPO, L. Analysis on the effectiveness of co-solute on the network integrity of high methoxy pectin. **Food Chemistry**, v. 135, p.1455-1462, 2012.

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

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.199, 1989.

BEMILLER, J. N. AN INTRODUCTION TO PECTINS - STRUCTURE AND PROPERTIES. In: FISHMAN, M. L. e JEN, J. J. (Ed.). **Chemistry and Function of Pectins**. Washington, DC, USA: American Chemical Society, v. 310, cap. 1, p.2-12, 1986.

BEMILLER, J.N.; KUMARI, G. V. β -elimination in uronic acids: evidence for an ElcB Mechanism. **Carbohydrate Research**, v. 25, p. 419–428, 1972.

BHATTACHARYA, S. N. **Rheology: fundamentals and measurements**. Australia: Royal Melbourne Institute of Technology. 1997.

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, p. 27-41, 1989.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, p. 484-489, 1973.

BOBBIO, P.A; BOBBIO F.O. Química do Processamento de Alimentos. 2ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 151p, 1992.

BRINGARD, G.; DENIS, A. Insight into the structure of pectin by high performance chromatographic methods. **Carbohydrate Polymers**, v.12, p.61-77, 1990.

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

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACK, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da material-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

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

CHEN, C. H.; SHEU, M. T.; CHEN, T. F.; WANG, Y. C.; HOU, W. C.; LIU, D. Z.; CHUNG, T. C.; LIANG, Y. C. Suppression of endotoxin-induced

proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1001-1009, 2006.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Polysaccharides for colon targeted drug delivery. **Drug Delivery**, v. 11, p. 129-148, 2004.

COURTS, F. L. Profiling of modified citrus pectin oligosaccharide transport across Caco-2 cell monolayers. **Pharma Nutrition**, v. 1, p.22-31, 2013.

DIAZ, J. V.; ANTHON, G. E.; BARRET, D. M. Nonenzymatic Degradation of Citrus Pectin and Pectate during Prolonged Heating: Effects of pH, Temperature, and Degree of Methyl Esterification. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 5131–5136, 2007.

DUVETTER, T., SILA, D. N., VAN BUGGENHOUT, S., JOLIE, R.; VAN LOEY, A., HENDRICKX, M. Pectins in processed fruit and vegetables: part I stability and catalytic activity of pectinases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p.75-85, 2009.

EINHORN-STOOL, U., HATAKEYAMA, H., HATAKEYAMA, T. Influence of pectin modification on water binding properties. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 494-502, 2012.

EINHORN-STOLL, U.; KASTNER, H.; DRUSCH, S. Thermally induced degradation of citrus pectins during storage - Alterations in molecular structure, colour and thermal analysis. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 565-575, 2014.

EINHORN-STOOL, U., KASTNER, H.; HECHT, T.; ZIMATHIES, A.; DRUSCH, S. Modification and physico-chemical properties of citrus pectin e Influence of enzymatic and acidic demethoxylation. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 338-345, 2015.

EINHORN-STOOL, U.; KUNZEK, H.; DOUGOWSKI, G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1101-1112, 2007.

ENDRESS, H. U. **Nonfood Uses of pectin**, in: Walter R.; Taylor, S. (ed.), Academic Press, New York, 1991.

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

FAJARDO, A. R.; LOPES, L. C.; PEREIRA, A. G. B.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Polyelectrolyte complexes based on pectin–NH₂ and chondroitin sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1950– 1955, 2012.

FISSORE, E. N.; ROJAS, A. M.; GERSCHENSON, L. N. Rheological performance of pectin enriched products isolated from red beet (*Beta vulgaris L. var. conditiva*) through alkaline and enzymatic treatments. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 249-260, 2012.

FRAEYE, I.; DE ROECK, A.; DUVETTER, T.; VERLENT, I.; HENDRICKX, M.; VAN LOEY, A. Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. **Food Chemistry**, v. 105, p. 555-563, 2007.

FRAEYE, I.; DUVETTER, T.; DOUNGLA, E.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. 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.

GLINSKY, V. V.; RAZ, A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1788-1791, 2009.

GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 68, p.327-332, 2000.

GULLÓN, B.; GÓMEZ, B.; MARTÍNEZ-SABAJANES, M.; YÁNEZ, R.; PARAJÓ, J. C.; ALONSO, J. L. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, p. 153-161, 2013.

GUNNING, A. P.; BONGAERTS, R. J. M.; MORRIS, V. J. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. **Faseb Journal**, v. 23, p. 415-424, 2009.

MARIE-ANN, HA.; VIETOR, R. J; JARDINE, G. D.; APPERLEY, D. C.; JARVIS, M. C. Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1817-1824, 2005.

HAMINIUK, C. W. I., SIERAKOWSKI, M. R., MACIEL, G. M. M., VIDAL, J. R. M. B., BRANCO, I.G., MASSON, M. L. Rheological properties of butia pulp. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, p.1-12, 2006.

HAYASHI, A.; GILLEN, A. C.; LOTT, JR. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin on implanted colon-25 tumor growth in Balb-c mice. **Alternative medicine review**, v. 5, p. 546-52, 2000.

HOLDSWORTH, S. D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behaviour of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v.2, n.4, p.393-418, 1971.

HWANG, J. E KOKINI, J. L. Structure and rheological function of side branches of carbohydrate polymers. **Journal of Texture Studies**, v. 22, p. 123-67, 1991.

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

IZYDORCZYK, M.; CUI, S. W.; WANG, Q. Polysaccharide gums: structures, functional properties and applications. In: CUI, S. W. (ed) **Food Carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications**. Boca Raton. FL: CRC press, Taylor and Francis Group, 2005.

JIANG, Y.; DU, Y.; ZHU, X.; XIONG, H.; WOO, M.W.; HU, J. Physicochemical and comparative properties of pectins extracted from *Akebia trifoliata* var. *australis* peel. **Carbohydrate. Polymers**, v. 87, p. 1663–1669, 2012.

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.

LIANG, R. H.; CHEN, J.; LIU, W.; LIU, C. M.; YU, W.; YUAN, M.; ZHOU, X. Q. Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*Ficus pumila* Linn.) seeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 76-83, 2012.

LIU, L.; CAO, J.; HUANG, J., CAI, Y.; YAO, J. Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. **Bioresource Technology**, v. 101, p.3268–3273. 2010.

KAZMIERI, M.; WICKER, L.; CORREDIG, M. Interactions of betalactoglobulin and high-methoxyl pectins in acidified systems. **Journal of Food Science**, v. 68, p.1673-1679, 2003.

KEIJBETS, M. J.; PILNIK, W. β -Elimination of pectin in the presence of anions and cations. **Carbohydrate research**, v. 33, p. 359-362, 1974.

KIM, Y. K.; WICKER, L. Valencia PME isozymes create charge modified pectins with distinct calcium sensitivity and rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 957-963, 2009.

KIM, Y.; TENG, Q.; WICKER, L. Action pattern of Valencia orange PME deesterification of high methoxyl pectin and characterization of modified pectins. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2620-2629, 2005.

KIM, Y.; WILLIAMS, M. A. K.; TZEN, J. T. C.; LUZIO, G. A.; GALANT, A. L.; CAMERON, R. G. Characterization of charged functional domains introduced into a modified pectic homogalacturonan by an acidic plant pectin methylesterase (*Ficus awkeotsang* Makino) and modeling of enzyme mode of action. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p.319-329, 2014.

KISS, J. β -Eliminative Degradation of Carbohydrates Containing Uronic Acid Residues Original, in: Stuart Tipson, D. Horton (Eds.), **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, New York, p. 229–303, 1974.

KRALL, S. M.; MCFEETERS, R. F. Pectin hydrolysis: effect of temperature, degree of methylation, pH and calcium on hydrolysis rates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, p. 1311-1315, 1998.

KRAVTCHENKO, T. P.; VORAGEN, A. G. J.; E PILNIK, W. Analytical Comparison of 3 Industrial Pectin Preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 17-25, 1992.

KRAVTCHENKO, T. P.; ARNOULD, I.; VORAGEM.; A. G. J.; PILNIK, W. Improvement of the selective depolymerization of pectic substances by chemical β -elimination in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, p. 237–242, 1992.

KRAVTCHENKO, T. P.; PENCI, M.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Enzymic and chemical degradation of some industrial pectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 20, p.195–205, 1993.

KRZESLAK, A.; LIPINSKA, A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cell Mol Biol Lett**, v. 9, p. 305-328, 2004.

KYOMUGASHO, C.; CHRISTIAENS, S.; SHPIGELMAN, A.; LOEY, A. M. V.; HENDRICKX, M. E. FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit-and vegetable-based matrices. **Food Chemistry**, v. 176, p. 82-90, 2015.

MARTINEZ, R. M. Preparação e caracterização de partículas coloidais de pectina cítrica e de peptonas vegetais para aplicação em cosméticos. 85f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Setor Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2013.

MASUELLI, M. A. Viscometric study of pectin. Effect of temperature on the hydrodynamic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p.286–291, 2011.

MAXWELL, E. G.; BELSHAW, N. J.; WALDRON, K. W.; MORRIS, V. J. Pectin e Anemerging new bioactive food polysaccharide. **Trends in Food Science &Technology**, v. 24, p.64-73, 2012.

MESBAHI, G.; JAMALIAN, J.; FARAHNAKY, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in foods systems. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p.731-738, 2005.

MIN, B.; LIM, S.; KO, S.; LEE, K. G.; LEE, S. H.; LEE, SUYONG. Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and

their structural/rheological characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3855-3860, 2011.

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

MORRIS, G. A.; MARIE-CHRISTINE, R.; BONNIN, E.; JEAN-FRANÇOIS, T.; HARDING, S.E. Physical characterization of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 1161–1167, 2010.

MORRIS, V. J.; BELSHAW, N. J.; WALDROM, K. W.; MAXWELLI, E. G. The bioactivity of modified pectin fragments. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre** , v.1, p.21 – 37, 2013.

MORRIS, G. A.; FOSTER, T. J.; e HARDING, S. E. A hydrodynamic study of the depolymerisation of a high methoxy pectin at elevated temperatures. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, p. 361–367, 2002.

MUNARIN, F., BOZZINI, S., VISAIL, L., TANZI, M. C., PETRINI, P. Sterilization treatments on polysaccharides: Effects and side effects on pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p.74-84, 2013.

NANGIA-MAKKER, P.; HOGAN, V.; HONJO, Y.; BACCARINI, S.; TAIT, L.; BRESALIER, R.; RAZ, A. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, p. 1854-1862, 2002.

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

PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; DOCO, P. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. **Biochimie**, v. 85, p. 109–121, 2003.

PIENTA, K. J.; NAIK, H.; AKHTAR, A.; YAMAZAKI, K. Y.; REPLOGLE, T.S.; LEHR, J.; DONAT, T. L.; TAIT, L.; HOGAN, V.; RAZ, A. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, v.87, p.348-53, 1995.

PLAT, D.; RAZ, A. Modulation of the Lung Colonization of B16-F1 Melanoma Cells by Citrus Pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 84, p. 438-42, 1992.

RALET, M. C.; THIBAUT, J. F. Interchain heterogeneity of enzymatically deesterified lime pectins. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 917-925, 2002.

RAMACHANDAN, C.; WILK, B. J.; HOTCHKISS, A.; CHAU, H.; ELIAZ, I.; MELNICK, S. J. Activation of human T-helper/ inducer cell T-cytotoxic cell, B-cell and natural killer (NK) – cell and induction of natural killer cell activity against k562 chronic myeloid leukemia cells with modified citrus pectin. **Journal BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-9, 2011.

RAO, M.A. and ANANTHESWARAN, R.C. Rheology of fluids in food processing. **Food Technology**. v. 36, n.2, 116, 1982.

RAO, M. A. Predicting the flow properties of food suspensions of plant origin: mathematical models help clarify the relationship between composition and rheological behavior. **Food Technology**, p. 85-88, 1987.

RASCÓN-CHU, A., MARTINEZ-LÓPEZ, A. L., CARVAJAL-MILLÁN, E., LEÓN-RENOVA, N. E. P., MÁRQUEZ-ESCALANTE, J. A., ROMO-CHACÓN, A.

Pectin from low quality 'Golden Delicious' apples: Composition and gelling capability. **Food Chemistry**, v. 116, p.101–103, 2009.

RENARD, C. M. G. C.; CRÉPEAU, M. J.; THIBAUT, J. F. Structure of repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. **Carbohydrate Research**, v.275, p.155-165, 1995.

RENARD, C.; THIBAUT, J. F. Degradation of pectins in alkaline conditions: kinetics of demethylation. **Carbohydrate Research**, v. 286, p. 139-150, 1996.

RIBEIRO, B. M. **Visão geral da empresa CPKelco**. Reunião Técnica, Limeira, 2002.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v.57, p.929-67, 2001.

ROLIN, C. Commercial pectin preparations. In SEYMOUR, G. B.; e KNOX, J. P. (Eds.), *Pectins and their manipulation*. Oxford: Blackwell Publishing, p. 222-241, 2002.

ROUSE, A. H. Distribution of pectinesterase and total pectin in component parts of citrus fruits. **Food Technology**, v.7, p.360-62, 1953.

SCHMELTER, T.; WIENTJES R., VREEKER R., KLAFFKE W., Enzymatic modifications of pectins and the impact on their rheological properties, **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 99 - 108, 2002.

SCHOLS, H. A.; BAKX, E. J.; SCHIPPER, D.; VORAGEN, A. G. J. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. **Carbohydrate Research**, v. 279, p.265-279, 1995.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**: fundamentos teóricos e práticos. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora Ltda., 2006. 233p.

SEIXAS, F. L.; FUKUDA, D. L.; TURBIANI, F. R. B.; GARCIA, P. S.; PETKOWICZ, C. L. O.; JAGADEVAN, S.; GIMENES, M. L. Extraction of Pectin from Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) By Microwave-Induced Heating. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 186–192, 2014.

SHARMA, S. K.; MULVANEY, S. J.; RIZVI, S. S. H. **Food processing engineering: theory and laboratory experiments**. United States of America: Wiley- Interscience. 2000. 348p

SINGTHONG, J.; CUI.; S. W., E GOFF, H. D. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krue Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p.391-400, 2004.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 20-24, 1972.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. Michigan: Freeman Press, 2. ed. 1996. 418 p.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. **Silpakorn University International Journal**, v. 3, p. 206-228, 2003.

SRIVASTAVA, P.; MALVIYA, R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry e na overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, v. 2, p. 10-18, 2011.

YAN, J.; KATZ, A. PectaSol-C modified citrus pectin induces apoptosis and inhibition of proliferation in human and mouse androgen-dependent and – independent prostate cancer cells. **Integrative Cancer Therapies**, v.9, p.197-203, 2010.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. V. Chemistry and uses of pectin – A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, p. 47-73, 1997.

THIBAUT, J. F.; RENARD, C. M. G. C.; AXELOS, M. A. V.; ROGER, P.; CRÉPEAU, M. J. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v. 238, p. 271–286, 1993.

THIBAUT, J. F. Some physicochemical properties of sugar-beet pectins modified by oxidative cross-linking. **Carbohydrate Research**, v. 155, p.183-192, 1986.

THIBAUT, J. F.; RALET, M. C. Pectin, their origin, structure and function. In: McCLEARY, B. V.; PROSKY, L. (Eds.). **Advanced Dietary Fiber Technology**. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, p. 369-378, 2001.

TING, S.V.; ROUSEFF, R.L. Citrus fruit their products. New York: Marcel Dekker, 1986. 293 p.

TROMP, R. H.; KRUIT, C. G; EIJK, M. V; ROLIN, C. On the mechanism of stabilization of acidified milk drinks by pectin. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.565-572, 2003.

TSOGA, A.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Role of cosolutes in gelation of high-methoxy pectin. Part 1. Comparison of sugar and polyols. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 907-919, 2004.

VENZON, S. S.; CANTERI, M. H. G.; GRANATO, D.; JUNIOR, B. D.; MACIEL, G. M.; STAFUSSA, A. P.; HAMINIUK, C. W. I. Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4102-4112, 2015.

VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W.; THIBAUT, J. F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. Pectins. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel Dekker, p. 287-340, 1995.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263–275, 2009.

VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): structural characterization of a pectic fraction, **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p.72-79, 2009.

VRIESMAN, L. C. Pectinas da casca dos frutos do cacau (*Theobroma cacao* L.): Otimização da extração e caracterização. 170f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

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. **Food Science and Technology**, v. 49, p.108-116, 2012.

WAI, W. W.; ALKARKHI, A. F. M.; EASA, A. M. Comparing biosorbent ability of modified citrus and durian rind pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 584-589, 2010.

WALTER, R. H. The chemistry and technology of pectin. New York: Academic Press, 1991.

WANG, X., CHEN, Q., LU, X. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p.129-137, 2014.

WESTERENG, B.; YOUSIF, O.; MICHAELSEN, T. E.; KNUTSEN, S. H.; SAMUELSEN, A. B. Pectin isolated from white cabbage – structure and complement-fixing activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, p.746 – 755, 2006.

WICKER, L.; KIM, Y.; KIM, M. J.; THIRKIELD, B.; LIN, Z.; JUNG, J. Pectin as a bioactive polysaccharide – Extracting tailored function from less. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 251-259, 2014.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; E 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, M. A. K.; MARSHALL, A. T.; ANJUKANDI, P.; HAVERKAMP, R. G. Investigation of the effects of fine structure on the nanomechanical properties of pectin. **Physical Review**, E-76, 2007.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Methods Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, v. 2 , p. 65-68, 1963a.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L. (Ed.). **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York: Academic Press, v. 2, p. 211- 215, 1963b.

YAN, J.; KATZ, J. PectaSol-C Modified Citrus Pectin Induces Apoptosis and Inhibition of Proliferation in Human and Mouse Androgen-Dependent and-Independent Prostate Cancer Cells. **Integrative Cancer Therapies**, v. 9, p. 197-203, 2010.

YAPO, B. M. Pectic substance: from simple pectic polysaccharides to complex pectins – a new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 373-385, 2011.

YAPO, B. M.; LEROUGE, P.; THIBAUT, J. F.; RALET, M. C. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 426–435, 2007.

ZHANG, L.; YE, X.; DING, T.; SUN, X.; XU, Y.; LIU, D. Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 222–231, 2013.

ZHANG, L.; ZHANG, X.; LIU, D.; DING, T.; YE, X. Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin. **LWT – Food Science and Technology**, v. 61, p. 630-637, 2015.

ZHOU, L.; WANG, Y.; LIU, F.; BI, X.; LIAO, X. Effect of high pressure carbon dioxide on the properties of water soluble pectin in peach juice. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 173-181, 2014.