

SÍLVIO CLÁUDIO DA COSTA



**CACTO Cereus peruvianus:
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS,
REOLÓGICAS E APLICAÇÕES DOS
POLISSACARÍDIOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA
1997

SÍLVIO CLÁUDIO DA COSTA

**CACTO Cereus peruvianus:
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS,
REOLÓGICAS E APLICAÇÕES DOS
POLISSACARÍDIOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA
1997

SILVIO CLAUDIO DA COSTA

Cacto Cereus Peruvianus: Características estruturais,
reológicas e aplicações dos Polissacarídios

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor
no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná,
pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana (UFPR)

Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter (UFPR)

Prof. Dr. Flávio Teixeira da Silva (FAENQUIL)

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCarlos)

Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes (UEM)

Curitiba , 18 de dezembro de 1997

Orientadores : Prof. Dr. José Domingos Fontana

Prof. Dr. Mauro Alvarez

À Cecília, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Domingos Fontana, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela orientação e revisão dos originais, pela dedicação e amizade no decorrer do curso.

Ao Professor Doutor Mauro Alvarez, do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, pela transmissão de seus conhecimentos e por sua grande amizade.

À Professora Doutora Maria Benigna Martinelli de Oliveira, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, e ao Professor Doutor Fábio Pedrosa, ex-coordenador, pelas atenções recebidas.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade e convívio enriquecedor.

Aos Professores e Funcionários do Nepron (Núcleo de Produtos Naturais) da Universidade Estadual de Maringá, pelas contribuições técnicas e pela amizade renovadora.

À Universidade Estadual de Maringá, pelas condições fornecidas para o desenvolvimento deste trabalho e, por todo apoio recebido.

À Sanepar, que permitiu o uso de suas instalações para a realização dos testes de potabilização de água.

Ao Professor Doutor Mauro Luciano Baesso, do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, pela realização das análises de Ressonância Paramagnética Eletrônica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante a realização deste curso.

Aos meus familiares e aos meus amigos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras.....	xv
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxiii
INTRODUÇÃO.....	1
1. Cactáceas.....	1
2. Mucilagens de Cactáceas	4
2.1 Aspectos Estruturais.....	4
2.2 Usos de mucilagens e outros produtos de cactáceas.....	7
3. Pectinas	12
3.1 Aspectos gerais.....	12
3.2 Histórico.....	16
3.3 Tipos de géis e graduação.....	26
3.4 Geleificação de pectinas de alto teor de grupos metoxilas.....	28
3.5 Geleificação de pectinas de baixo teor de grupos metoxilas.....	33
3.5.1 Conformação da molécula de pectina.....	34
3.5.2 Mecanismos e estruturas das zonas de junções.....	35
3.5.3 Parâmetros intrínsecos de geleificação.....	37
3.5.3.1 O efeito da massa molar.....	37
3.5.3.2 O efeito da distribuição de carga.....	37
3.5.3.3 O efeito da ramnose.....	37
3.5.3.4 Efeito do grupo acetila.....	38
3.5.3.5 Efeito de grupos amida.....	39
3.5.4 Parâmetros extrínsecos.....	39
3.5.4.1 Efeito da concentração de pectina e cálcio.....	40
3.5.4.2 Efeito do pH.....	41
3.5.4.3 Efeito da força iônica.....	41
3.5.4.4 Efeito da temperatura.....	42
3.6 Conteúdo de sólidos solúveis.....	42

4.	Reologia.....	43
4.1	Alguns fundamentos de reologia.....	43
4.2	Caracterização de fluxo.....	44
4.3	Reologia e dimensões moleculares.....	46
5	Coagulação-floculação com polieletrólitos.....	49
5.1	Uso de polieletrólitos como agente coagulante.....	51
5.1.1	Modo de aplicação.....	52
5.1.2	Características de polieletrólito no uso como agente de floculação.....	53
5.3	Coagulantes primários.....	58
	OBJETIVOS.....	63
	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
1.	Fonte do cacto.....	64
2.	Purificação e extração de polieletrólitos	64
2.1	Extração por maceração.....	65
2.2	Extração por prensagem manual.....	65
2.3	Extração por prensagem mecânica.....	65
3.0	Purificação dos polissacarídeos obtidos por maceração, prensagem Mecânica e prensagem manual.....	66
3.1	Obtenção do polissacarídeo na forma ácida.....	66
4.	Filtração em coluna cromatográfica.....	66
5.	Composição monomérica.....	67
5.1	Hidrólise com H ₂ SO ₄ (ácido sulfúrico).....	67
5.2	Hidrólise com TFA (ácido trifluoroacético).....	67
5.3	Hidrólise com H ₂ SO ₄ concentrado (Hidrólise de Saeman).	67
5.4	Hidrólise enzimática.....	68
5.5	Análise dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (clae).....	68
5.6	Cromatografia em camada delgada.....	68

5.7	Análise por cromatografia gasosa acoplada com espectrômetria de massas (CG-EM).....	69
5.7.1	Derivatização I (alditóis acetatos).....	69
5.7.2	Derivatização II (alditóis sililados).....	69
5.8	Determinação do conteúdo de ácidos urônicos.....	70
5.8.1	Métodos colorimétricos.....	70
5.8.1.1	Método do carbazol.....	70
5.9	Carboxiredução de polissacarídeos ácidos.....	71
6	Análise de metilação.....	71
6.1	Metilação de Hakomori.....	71
6.1.1	Preparação do reativo (metilsulfinil-Na).....	71
6.1.2	Método de metilação (Hakomori).....	71
6.2	Metilação de Haworth.....	72
6.3	Hidrólise do polissacarídeo metilado.....	72
7	Métodos de extração de substâncias pécticas.....	72
7.1	Extração com solução EDTA/oxalato de amônio.....	72
7.2	Extração com HCl diluído a quente.....	73
7.3	Extração com HCl concentrado a temperatura ambiente.....	74
8	Eletroforese em papel.....	74
9	Grau de metoxilação.....	75
10	Análises espectroscópicas.....	76
11	Extração e análise de cera cuticular	76
12	Análise de ácidos hidroxí-cinâmicos (ferúlicos).....	77
13	Separação por membranas.....	77
14	Polarimetria.....	78
15	Reologia.....	78
16	Cromatografia de exclusão estérica.....	78
17	Análise de cátions.....	79
17.1	Absorção atômica.....	79
17.2	Ressonância paramagnética eletrônica	79
18	Experimentos de remoção de turbidez.....	79
18.1	Remoção de turbidez de água para uso doméstico	79

18.2	Clarificação do chá de estévia (<i>Stevia rebaudiana</i>).....	80
19.	Determinação da composição de aminoácidos.....	80
20.	Poder geleificante de substâncias pécticas de baixo teor de metoxila.....	80
21.	Secagem em “spray dryer”.....	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		83
1.	Cultivo.....	83
1.1	Espaçamento e densidade.....	83
1.2	Determinação do crescimento anual médio de cladódios do <i>Cereus peruvianus</i>	84
1.3	Determinação da massa verde por metro de cladódio do <i>Cereus peruvianus</i>	85
1.4	Estimativa do rendimento da fitobiomassa do <i>Cereus peruvianus</i>	85
1.5	Determinação da umidade através da liofilização.....	86
1.6	Dissecção e determinação gravimétrica das partes anatômicas de cladódios de plantas com 3 ano de idade.....	88
1.7	Determinação da umidade em estufa.....	89
1.8	Dissecção e determinação gravimétrica das partes anatômicas de um segmento com 5 anos de idade.....	90
2.0	Extração dos glicopolímeros a partir dos parênquimas.....	91
2.1	Extração por maceração.....	91
2.1.1	Efeito da diluição.....	91
2.1.2	Efeito do tempo sobre o rendimento de extração.....	92
2.2	Extração da mucilagem por prensagem manual.....	93
2.3	Extração da mucilagem por prensagem mecânica automatizada.....	95
2.4	Avaliações preliminares das mucilagens extraídas de <i>Cereus peruvianus</i> pelos diferentes métodos.....	96
2.4.1	Determinação da viscosidade absoluta.....	96
2.4.2	Determinação da capacidade de atuarem como auxiliares de floculação nos processos de potabilização.....	97
2.5	Avaliação da homogeneidade da amostra.....	98

2.5.1	Determinação da composição monomérica das frações obtidas em DEAE-celulose (Cl ⁻)	99
2.6	Determinação da composição monomérica através de cromatografia líquida de alta eficiência (clae).....	104
2.7	Análise de fragmentação.....	108
2.8	Eletroforese em papel.....	109
2.9	Caracterização espectroscópica da ramnoarabinogalactana ácida.....	111
2.10	Avaliação da massa molar através de GPC	112
2.11	Análise de ácidos fenol-carboxílicos.....	114
2.12	Avaliação das pontes de hidrogênio intercadeias sobre a massa molar da mucilagem.....	116
2.13	Purificação da amostra com a finalidade de remoção de agregados.....	117
2.14	Determinação das constantes de Staundinger/Mark/Houwing	118
2.15	Determinação do número de viscosidade, raio da partícula e densidade do polímero.....	119
2.16	Ultrafiltração do Polissacarídeo extraído por prensagem mecânica automatizada.....	121
2.17	Determinação da viscosidade absoluta do polissacarídeo integral e das frações obtidas por ultrafiltração.....	123
2.18	Avaliação do polissacarídeo integral e do polissacarídeo concentrado em 100kD como auxiliar de floculação nos processos de potabilização de água.....	124
2.19	Desidratação em “spray dryer” do extrato aquoso do parênquima de <i>Cereus peruvianus</i> obtido por prensagem mecânica.....	127
2.20	Tratamento do chá de estévia com polieletrólito.....	130
2.21	Influência de alguns fatores sobre a viscosidade absoluta do polieletrólito.....	134
2.21.1	Preparo da solução de polieletrólito.....	135
2.21.2	Influência da temperatura na viscosidade de uma solução de polieletrólito.....	136
2.21.3	Influência do tempo sobre a viscosidade.....	139
2.22	Avaliação do efeito sinérgico com proteínas recuperadas de resíduos curtidos da indústria de beneficiamento de couro.....	141

3.0	Cutícula do cacto colunar <i>Cereus peruvianus</i> como fonte de pectina e cera.....	145
3.1	Desengorduramento/extração de ceras.....	145
3.2	Determinação do teor de proteínas totais.....	145
3.3	Extração de substâncias pécticas com mistura EDTA/Oxalato de amônio.....	146
3.4	Extração com ácido diluído.....	146
3.5	Extração de substâncias pécticas pelo método ácido/base(A/B).....	147
3.6	Determinação do teor de cinzas na cutícula antes e depois do tratamento ácido.....	147
3.7	Determinação do teor de cátions na cutícula antes e depois do tratamento ácido (processo de descationização).....	148
3.8	Recuperação do sulfato de cálcio a partir do filtrado ácido.....	149
3.9	Análise em Espectrofotometria de Absorção Atômica do sal isolado do filtrado ácido.....	150
3.10	Análise de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	151
3.11	Comparação das substâncias pécticas obtidas pelo método A/B e pelo método EDTA/Oxalato de amônio.....	152
3.12	Aplicação do método A/B para extração de pectinas de outras fontes.....	153
3.13	Caracterização de substância péctica através de Cromatografia Gasosa acoplado com Espectrômetro de Massa.....	155
3.14	Hidrolise enzimática e análise dos produtos de hidrólise.....	156
3.15	Ressonância Magnética Nuclear do ¹³ C para a substância péctica isolada pelo método A/B (ácido/base)	158
3.16	Análise de metilação.....	158
3.17	Otimização do método de extração.....	160
3.17.1	Efeito da granulometria sobre o rendimento de extração.....	161
3.17.2	Efeito da concentração do ácido.....	161
3.17.3	A cinética de remoção do cálcio com ácido clorídrico 6M.....	162
3.18	Determinação da massa molar através de cromatografia de exclusão estérica.....	163
3.19	Fracionamento da substância péctica através de ultrafiltração.....	167

3.20	Determinação da condições ótimas de geleificação para pectinas obtidas a partir de <i>Cereus peruvianus</i>	170
3.20.1	Influência do pH sobre géis com diferentes conteúdos de sólidos totais.....	170
3.20.2	Influência do teor de cálcio sobre géis preparados com 30% de sólidos totais.....	171
3.21	Pectina obtida pelo método ácido/base e ultrafiltrada.....	172
3.21.1	Influência do pH sobre géis com diferentes conteúdos de sólidos totais.....	172
3.21.2	Determinação do teor de cálcio para a formação de gel padrão 100 com pectina ácido/base ultrafiltrada.....	174
3.22	Forma dos estômatos.....	176
3.23	Análise da fração lipídica em Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massa.....	177
	CONCLUSÕES.....	183
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características Estruturais de Moléculas de Pectinas.....	16
Tabela 2 - Diferentes tipos de pectinas de alto teor de grupos metoxilas (ATM).....	26
Tabela 3 - Polieletrólitos típicos utilizados em processos de clarificação.....	55
Tabela 4 -Reações de coagulação em meio alcalino.....	59
Tabela 5 - Determinação do crescimento de cladódios de <i>Cereus peruvianus</i> pelo período de 1 ano.....	84
Tabela 6 - Rendimento de massa verde por metro de cladódio do <i>Cereus peruvianus</i>	85
Tabela 7 - Determinação da percentagem de massa seca do cladódio por liofilização.....	86
Tabela 8 - Determinação da massa seca das partes anatômicas de um cladódio com 3 anos de idade :.....	89
Tabela 9 - Determinação da massa seca em estufa de segmentos de cladódios.....	89
Tabela 10 - Percentual de massa seca de cada fração em relação à massa seca total do cladódio com 5 anos de idade.....	90
Tabela 11 - Teor de umidade de cada fração de <i>Cereus peruvianus</i>	91
Tabela 12 - Rendimento de extração em relação a massa úmida de parênquima aletas processada por maceração em diferentes relações massa/volume pelo período de 10 horas.....	92
Tabela 13 - Cinética de extração por maceração na diluição de 1:6 (massa/volume). Foi macerado 200g de parênquimas aletas.....	93
Tabela 14 - Rendimento da extração do polissacarídeo por prensagem manual realizadas com lotes de 1Kg de parênquima aletas úmido.....	94
Tabela 15 - Rendimento do processo de extração utilizando prensagem mecânica automatizada.....	96

Tabela 16 - Determinação dos valores de viscosidade absoluta para os polissacarídeos extraídos por diferentes métodos na concentração de 1,5% (massa/massa).....	97
Tabela 17 - Remoção de turbidez da água bruta captada do rio Pirapó como 180 UNF de turbidez utilizando mucilagens extraídas de <i>Cereus peruvianus</i> por diferentes métodos, na concentração de 1 ppm.....	97
Tabela 18 - Fracionamento do polissacarídeo extraído por prensagem mecânica em DEAE-celulose (Cl ⁻).....	98
Tabela 19 - Percentagem de monossacarídeos da mucilagem de parênquima de <i>Cereus peruvianus</i> determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência.....	106
Tabela 20 - Áreas correspondentes às frações com diferentes massas molares.....	113
Tabela 21 - Determinação da massa molar média ponderal Mw e da massa molar em número Mn em solução aquosa e em DMSO.....	117
Tabela 22 - Determinação da massa molar ponderal média Mw e do número de massa molar Mn para uma amostra purificada.....	118
Tabela 23 - Determinação das constantes de Mark/Houwink.....	119
Tabela 24 - Calibração universal e SEC - DRI/LALLS para o polissacarídeo reprecipitado em etanol e dissolvido em solução aquosa de NaCl 1M.....	121
Tabela 25 - Massas recuperadas nas membranas de 100 kD e 1kD (retentatos).....	123
Tabela 26 - Avaliação da viscosidade absoluta do polissacarídeo integral e do polissacarídeo concentrado em membrana de 100 kD.....	124
Tabela 27 - Viscosidade absoluta do polieletrólito desidratado em “spray dryer”, na concentração de 1,5 %.....	127
Tabela 28 - Análise da viscosidade absoluta de soluções de polieletrólitos preparadas de várias formas.....	136
Tabela 29 - Efeito da temperatura sobre a viscosidade de uma solução de polieletrólito de parênquima de <i>Cereus peruvianus</i> 1,5% (p/p): valores após aquecimento até cada temperatura de medida.....	137

Tabela 30 - Medidas da viscosidade de uma amostra de polieletrólito de parênquima de <i>Cereus peruvianus</i> a 1,5% (p/p): pré-aquecimento até 80°C e medidas após reversão a cada temperatura desejada.....	138
Tabela 31 - Viscosidade da amostra 1 (sem conservante) em diferentes velocidades de cisalhamento durante o período de 1 mês.....	139
Tabela 32 - Viscosidade da amostra 2 (conservante: benzoato de sodio), em diferentes velocidades de cisalhamento, durante o período de 1 mês.....	140
Tabela 33 - Viscosidade da amostra 3 (conservante: metil parabeno) durante o período de 1 mês.....	140
Tabela 34 - Perfil de aminoácidos da proteína recuperada de aparas curtidas.....	142
Tabela 35 - Avaliação da viscosidade absoluta de solução proteica colagênica, solução de polieletrólito e solução resultante da combinação de ambos os solutos.....	144
Tabela 36 - Rendimento da extração de ceras da cutícula do <i>Cereus peruvianus</i>	145
Tabela 37 - Determinação do teor de proteínas totais na cutícula de <i>Cereus peruvianus</i>	146
Tabela 38 - Teor de cinzas da cutícula de <i>Cereus peruvianus</i> antes do tratamento com HCl 6 M.....	148
Tabela 39 - Teor de cinzas da cutícula do <i>Cereus peruvianus</i> após tratamento com HCl 6M.....	148
Tabela 40 - Determinação da composição de cátions na cutícula do <i>Cereus peruvianus</i> antes e após tratamento ácido e na substância péctica.....	149
Tabela 41 - Determinação gravimétrica do sulfato de cálcio obtido a partir da cutícula do <i>Cereus peruvianus</i>	150
Tabela 42 - Determinação de alguns cátions por espectrofotometria de absorção atômica do precipitado isolado do filtrado ácido.....	150
Tabela 43 - Propriedades físicas e químicas de pectinas obtidas pelo método A/B e pelo método E/ O	153
Tabela 44 - Rendimento e propriedades físicas e químicas de substâncias pécticas extraídas de outras fontes pelo método A/B (ácido/base).....	154

Tabela 45 - Rendimento de pectatos extraídos pelo método A/B em função da granulometria.....	161
Tabela 46 - Rendimento da substância pécica em função da concentração utilizado na fase de decationização.....	161
Tabela 47 - Análise do teor de cálcio no resíduo após o processo de decationização com HCl em diferentes concentrações.....	162
Tabela 48 - Cinética de extração do cálcio da cutícula do <i>Cereus peruvianus</i>	163
Tabela 49 - Estimativa da massa molar por cromatografia de exclusão molecular com duplo monitoramento.....	167

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cladódios de uma planta de <i>Cereus peruvianus</i> com aproximadamente 8 metros de altura.....	3
Figura 2 - Unidade estrutural básica da goma <i>cholla</i> (mucilagem da <i>Opuntia fulgida</i>).....	5
Figura 3 - Estrutura parcial proposta para a mucilagem da <i>Opuntia ficus-indica</i>	6
Figura 4 - Representação esquemática da cadeia principal de uma pectina mostrando a região não-ramificada (homogalacturonana) e região ramificada (ramnogalacturonana).....	15
Figura 5 - Esquema da β -eliminação.....	22
Figura 6 - Diagrama de RAUCH (1965): formação de geléia em função da combinação de seus componentes básicos.....	29
Figura 7- Interação açúcar-pectina-água por meio de pontes de hidrogênio.....	30
Figura 8 - Estrutura das zonas de junções em géis de pectinas de alto teor de metoxila baseado em estudos de difração de Raios-X.....	32
Figura 9 - Representação esquemática da rede de sustentação de um gel. As áreas interconectadas representam zonas de junções.....	33
Figura 10 - Representação esquemática do cálcio ligante às sequências de ácido poligalacturônico.....	36
Figura 11 - Representação esquemática mostrando como inserções de ramnose (Ra) provocam dobras na cadeia do ácido poligalacturônico.....	38
Figura 12 - Diagrama de fase de uma solução de pectina com GM 28%.....	40
Figura 13 - Planos paralelos, com área A, separados por um líquido sob cisalhamento, nos quais é aplicada uma força tangencial F.....	43
Figura 14 - Relação entre tensão de cisalhamento (τ) e velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para fluidos exibindo diferentes comportamentos de fluxo.....	44

Figura 15 - Curva de fluxo típica para um fluido pseudoplástico.....	45
Figura 16 - Ridgelímetro para a medição % de “Sag”.....	81
Figura 17 - Foto da secção de cladódio de <i>Cereus peruvianus</i>	87
Figura 18 - Representação esquemática de uma secção do <i>Cereus peruvianus</i>	88
Figura 19 - Parênquima das aletas separadas do cladódio com o auxílio de uma faca e livres da cutícula.....	94
Figura 20 - Líquido viscoso isolado por prensagem mecânica do parênquima do <i>Cereus peruvianus</i>	95
Figura 21 – Cromatograma da mistura de padrões de carboidratos na forma de sililpoliois:arabinitol, ramnitol, 6-carboxi-galactitol e galactitol.....	100
Figura 22 – Cromatograma da fração I eluída com água da coluna de DEAE-celulose. Hidrolisada com TFA 1M durante 7 horas e 30 minutos a 100 °C e derivatizada na forma de sililpoliois.....	101
Figura 23 – Cromatograma da fração II eluída com LiCl 1M da coluna de DEAE-celulose. Hidrolisada com TFA 1M durante 7 horas e 30 minutos a 100 ° C e derivatizada na forma de sililpoliois.....	102
Figura 24 – Cromatograma da fração III eluída com HCl 1M de uma coluna de DEAE-celulose e hidrolisada com TFA 1M durante 7 horas e 30 minutos a 100 °C e derivatizada na forma de sililpoliois.....	103
Figura 25 – Cromatograma da fração IV eluída com NaOH 0,5 M de uma coluna de DEAE-celulose e hidrolisada com TFA 1M durante 7 horas e 30 minutos a 100 ° C e derivatizada na forma de sililpoliois.....	104
Figura 26 - Perfil cromatográfico de monossacarídeos padrão na concentração de 1 mg/ml analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna LiChrospher (100NH ₂ , 5µm) tendo como sistema de solventes acetonitrilo:água (85:15) e detector de índice de refração.....	105

Figura 27 - Amostra de extrato bruto extraído por prensagem mecânica automatizada, hidrolisada com TFA 1M por 8 horas à 100 C° e analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (clae) em coluna LiChrospher (100 NH ₂ , 5μ), tendo como sistema de solvente acetonitrilo:água (85:15) e detector de índice de refração.....	106
Figura 28 - Cromatografia em camada delgada dos hidrolisados ácido e enzimáticos da goma do <i>Cereus peruvianus</i>	109
Figura 29 - Eletroforetograma dos hidrolisados ácido e enzimático da goma de <i>Cereus peruvianus</i> .	110
Figura 30 - Espectro ¹³ CNMR da glicana acídica do <i>Cereus peruvianus</i> (O maior pico do lado direito é do DMSO-D ⁶).....	112
Figura 31 – Distribuição da massa molar do polissacarídeo extraído do <i>Cereus peruvianus</i> através de cromatografia de permeação em gel	113
Figura 32 – Cromatograma de uma mistura de padrões de ácidos ferúlicos (sili derivatizados) determinados através de cromatografia gasosa em coluna capilar do tipo SE-30 de 25 m.....	115
Figura 33 - Análise da presença de ácidos fenol carboxílicos (sili derivatizados), na mucilagem do cacto <i>Cereus peruvianus</i> , isolada a partir do parênquima aletas realizada por CG em coluna capilar SE-30 de 25 m	116
Figura 34 - Distribuição do número de viscosidade.....	120
Figura 35 - Determinação da distribuição do raio equivalente à esfera.....	120
Figura 36- Distribuição da densidade do polímero.....	121
Figura 37 – Foto da membrana em espiral de acetato de celulose com 100 kD de corte utilizada para fracionar a solução de polieletrólito na concentração inicial de 0,1 % de sólidos totais.....	122
Figura 38 - Turbidez residual da água ribeirinha em função da concentração de poli A (polissacarídeo integral) e poli A 100 kD (fração do poli A retido na membrana de 100 kD).....	125
Figura 39 - A foto acima mostra um teste de jarras realizado com o polissacarídeo retido em membrana de 100 kD.....	126

Figura 40 – Teste de jarras com o polissacarídeo obtido mediante concentração do extrato em osmose reversa e seco em “spray dryer”	128
Figura 41 - Mucilagem do parênquima concentrada em osmose reversa após desidratação em “Spray dryer”	129
Figura 42 - Foto de amostras de chá de estévia : a) controle sem tratamento (primeiro da esquerda) , b) sulfato de alumínio 3% e c) sulfato de alumínio 0,5% + 50 ppm de polieletrólito.....	131
Figura 43 – Cromatograma do esteviosídeo obtido pelo tratamento do chá de estévia com sulfato de alumínio 0,5% + 50 ppm de polieletrólito.	132
Figura 44 - Análise do esteviosídeo obtido a partir do chá tratado com sulfato de alumínio 3%. As condições de análises foram as mesmas descritas na figura 43.....	133
Figura 45 - Foto dos produtos obtidos a partir do chá de estévia tratado com sulfato de alumínio 3% (A) e a partir do chá tratado com sulfato de alumínio 0,5% + 50 ppm de polissacarídeo (polieletrólito).....	134
Figura 46 - A foto acima mostra as aparas curtidas (resíduos sólidos de curtumes) e do lado esquerdo a proteína colagênica recuperada através de técnicas de ultrafiltração e osmose reversa	143
Figura 47 - Análise de ressonância paramagnética eletrônica na cutícula antes (CND) e depois do tratamento ácido (CNDTA).....	152
Figura 48 - Mistura de padrões contendo xilose, glucose, ramnose, manose, galactose e arabinose na forma de alditóis acetatos	155
Figura 49 - Poligalacturonato da cutícula do <i>Cereus peruvianus</i> , carboxireduzido, hidrolisado, reduzido e paracetilado. A análise foi obtida utilizando-se uma coluna capilar do tipo IF-547. b) espectro de massas do pico com tempo de retenção igual a 22,55 min.....	156
Figura 50 - Eletroforetograma dos digeridos enzimáticos de pectatos da cutícula do <i>Cereus peruvianus</i>	157
Figura 51 - Espectro do ¹³ C-NMR do ácido péctico extraído da cutícula do <i>Cereus peruvianus</i> em D ₂ O.....	159

Figura 52 - a) Cromatograma do hidrolisado do metilado do ácido poligalactourônico b) espectros dos picos correspondentes à 2,3,4,6 tetra-o-metilgalactose e 2,3,6 - tri-o-metil galactose.....	160
Figura 53 - Separação de pectatos com distribuição de massa molar com detector de índice de refração diferencial.....	164
Figura 54 - Distribuição de massa molar absoluta com duplo monitoramento (Espalhamento de luz laser de baixo angulo e índice de refração - DRI -LALLS). A=CP-A/B, Pectato do <i>Cereus peruvianus</i> obtido por extração ácido/base , B = CP-E/O, pectato do <i>Cereus peruvianus</i> extraído com EDTA/Oxalato de amônio 0,25%; e D, pectato de albedo de laranja extraída pelo método ácido/base.....	65
Figura 55 - Determinação da viscosidade intrínseca do ácido poligalacturônico em presença de NaCl 0,1 M.....	168
Figura 56 - Determinação da viscosidade intrínseca (em presença de NaCl 0,1N) do permeado do ácido poligalacturônico obtida via membrana de acetato de celulose de 100 KD	169
Figura 57 - Derterminação da viscosidade intrínseca (em presença de NaCl 0,1N) do concentrado do ácido poligalacturônico obtida via membrana de acetato de celulose de 100 KD	170
Figura 58 - Influência do pH sobre a força de géis preparados em quatro concentrações diferentes de sacarose (20, 25, 30 e 35%) e íons cálcio no nível de 30 mg/g de pectina.	171
Figura 59 - A influência do teor de cálcio sobre géis preparados com 30% de sacarose em níveis cálcio (20, 25, 30,e 35 mg /g de pectina). Os números sobre as curvas se referem ao conteúdo de cálcio.....	172
Figura 60 - Influência do pH sobre géis preparados em quatro níveis de concetração de sacarose (20, 25 e 30, 35%) e íons cálcio no nível de 30 mg/g de pectina.	174
Figura 61 - Efeito da concentração de cálcio sobre géis preparados com pectina obtida pelo tratamento ácido/base e ultrafiltrada contendo 25% de sacarose. Os números sobre as curvas referem-se ao conteúdo de cálcio	175

Figura 62 - Foto de escamas cerosas desprendidas da cutícula do <i>Cereus peruvianus</i> durante o processo de secagem. A foto mostra a forma dos estômatos	176
Figura 63 - Cromatograma da cera integral da cutícula metanolizada do <i>Cereus peruvianus</i> obtida em espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi do tipo Carbowax-M20, de 0,4 mm de diâmetro e 50 m de comprimento. A coluna capilar foi mantida em condições isotérmicas a 240 °C.....	178
Figura 63.1 Espectro de massas do pico I do cromatograma mostrado na figura 63. As condições de análise são as mesmas descritas na figura 63...	178
Figura 63.2 Mostra o resultado da pesquisa de análise de similaridade do espectro do pico I com padrões de espectros da biblioteca de espectros de massa NBS/NIH/EPA.....	179
Figura 63.3 Espectro de massas do pico II do cromatograma mostrado na figura 63.....	179
Figura 63.4 . Mostra o resultado da pesquisa de análise de similaridade do espectro do pico II com padrões de espectros da biblioteca de espectros de massa NBS/NIH/EPA.....	180
Figura 63.5 Espectro de massas do pico III do cromatograma mostrado na figura 63.....	180
Figura 63.6 Mostra a resultado da pesquisa de similaridade do espectro do pico III com padrões de espectros da biblioteca de espectros de massa NBS/NIH/EPA.....	181
Figura 64 - Cromatograma da cera cuticular integral do <i>Cereus peruvianus</i> previamente saponificada na forma de metil esterés. As condições de análise são as mesmas descritas na legenda da figura 63.....	182
Figura 65 - Cromatograma da cera cuticular do <i>Cereus peruvianus</i> purificada em coluna de sílica. As condições de análise são as mesmas descritas na legenda da figura 63.....	182

RESUMO

O cultivo do cacto colunar *Cereus peruvianus* foi realizado em uma fazenda da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil. A produção de fitobiomassa foi estimada em torno de 300 toneladas/hectare ano. Polissacarídeos dos parênquimas foram extraídos mais eficientemente através de processos que incluem etapas de prensagem mecânica automatizada, atingido um rendimento de 2,22% de massa seca em relação a massa total do parênquima.

O fracionamento do extrato bruto, após precipitação com etanol, foi realizada por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. Todas as frações ácidas apresentaram a mesma composição monomérica como avaliados por hidrólise ácida ou enzimática. Arabinose e galactose foram prontamente recuperados, enquanto ramnose e ácido galacturônico foram os últimos monômeros detectados em ambos produtos hidrolíticos. O componente uronila foi seletivamente confirmado por eletroforese em papel. Análise espectroscópica, Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C , do polímero nativo mostra claramente a contribuição de (C-1) de unidades de β -D-galactopiranosil e α -L-arabinofuranosil bem como de (-CH₃) de L-ramnopiranosil e (-C=O) de α -D-galactopiranosilurônico. Também foi deduzido do espectro a condição O-acetilada da goma nativa uma vez que os sinais respectivos ao campo baixo (-C=O) e alto (-CH₃) foram facilmente distinguíveis.

A polidispersão e distribuição da goma acídica, foi avaliada por Cromatografia de Exclusão Estérica (SEC).

A goma acídica crua foi usada eficientemente na clarificação de extratos de *Stévia rebaudiana* levando a obtenção de formas pura do esteviosídeo. A goma na concentração de 50 ppm permitiu uma economia significativa de coagulante primário (sulfato de alumínio) no processo de clarificação do chá de folhas de *Stévia rebaudiana* Bertoni.

Estudando as propriedades reológicas do heteropolissacarídeo ácido, verificou-se que a adição de hidrolisados protéicos recuperados de resíduos de curtumes, resultou em efeito sinérgico, como medido pelo aumento da viscosidade absoluta.

A cutícula cerosa pecto-celulósica dos cladódios de *Cereus peruvianus* também foi submetida a análise bioquímica e avaliação de possíveis aplicações. Seu conteúdo lipídico foi de 10,3% em relação à massa seca. A cutícula deslipidificada foi submetida a extração de substâncias pécticas com uma solução sequestrante de cátions divalentes (EDTA/Oxalato de amônio). O rendimento de pectato foi surpreendentemente alto (39,2% em relação à massa seca). Rendimento de 52% foi obtido em condições otimizadas, empregando-se um método rápido de extração em duas etapas, baseado no tratamento com ácido mineral concentrado seguido de álcali. A substância péctica foi caracterizada como um homogalacturonato por análise de metilação e Ressonância Magnética do ^{13}C . A substância foi carboxireduzida, obtendo-se uma D-galactana. Cromatografia de exclusão estérica indicou um valor de massa molar ponderal média (Mw) de 140.000 kD. A homogalacturonana teve a sua capacidade de geleificação ensaiada, segundo metodologia preconizada para pectina de baixo metoxil.

ABSTRACT

The cultivation of *Cereus peruvianus* columnar cactus was carried out in the farm of State University of Maringá, Paraná, Brazil. The production of fresh biomass was estimated in about 300 tons/ha/year. Soft parenchymatous polysaccharides were more efficiently extracted by automated mechanical press, reaching 2.22% dry weight basis of the total parenchyma.

The fractionation of crude polysaccharide extract, following the precipitation with ethanol, was performed by an ionic exchange chromatography on a DEAE-cellulose column. All the acidic fractions showed the same monomeric composition as evaluated by acid or enzymatic hydrolyses. Arabinose and galactose were promptly released, while rhamnose and galacturonic acid were the last monomers detected in both hydrolytic products. The uronyl component was selectively confirmed by high voltage paper electrophoresis. Spectroscopic analysis and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of the native gum, clearly confirmed the contribution not only of β -D-galactopyranosyl and α -L-arabinofuranosyl units (C-1) but also of L-rhamnopyranosyl (-CH₃) and α -D-galactopiranosiluronic (-C=O) units. The O-acetylation condition of the native gum was also deduced from the spectrum once the respective signals at down (-C=O) and up-field (-CH₃) were easily distinguishable.

The polydispersion and molecular mass distribution of acidic gum, was evaluated by steric exclusion chromatography (SEC).

The raw acidic gum was efficiently used to clarify *Stévia rebaudiana* extracts to obtain stevioside sweetener. Gum concentration of 50ppm allowed significant savings of primary coagulant, namely aluminum sulfate, in the process of purification of the *Stévia rebaudiana* Bertoni leaf tea.

Studying the rheological properties of the acidic heteropolysaccharide, it was verified that the addition of protein hydrolyzates released from tannery shavings resulted in a synergistic effect, as measured by the increase in absolute viscosity.

The waxy pecto-cellulosic cuticle of *Cereus peruvianus* cladodes was also submitted to biochemical analysis and evaluation for other potential applications. Its lipid content was of 10.3% (dry weight basis). The lipid-free cuticle was submitted to the extraction of pectic substances through a demineralizing action of a double chelator extractant (EDTA + ammonium oxalate). The pectate yield was surprisingly high (39.2% dry weight basis). An yield of 52% was achieved in optimized conditions, using a fast two-step extraction, based upon the treatment with concentrated mineral acid, followed by alkali. The pectic substance was characterized as an homo-polygalacturonate by methylation analysis, and by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Its near-to-completion carboxy-reduction lead to a neutral α -D-galactan. Steric exclusion chromatography of the acid/alkali extracted polypectate indicated a molar mass (Mw) of about 140 kdaltons. The homogalacturonate had its capacity of jellyfication tested according to a preconized methodology employed for pectin of low metoxil.

INTRODUÇÃO

1. CACTÁCEAS

A família Cactácea foi descrita pela primeira vez por Jussieu em 1789, sob o nome de *Cacti* (*apud* HUNT, 1967). O termo Cactácea, empregado atualmente, foi publicado por Lindrey em 1830 (*apud* GIBSON, 1986).

Oviedo em 1526 (*apud* GIBSON, 1986) fez pela primeira vez a descrição de plantas do solo mexicano pertencentes a esta família. Estas plantas foram levadas para a Europa, cultivadas em casas de vegetação e já citadas em obras do século XVI. Segundo BRITTON & ROSE (1923), os dois primeiros gêneros descritos foram *Hariota* ANDERSON (1763) e *Cassyta* J.MILLER (1771).

SCHURMANN (1899) revisou o assunto, reconhecendo 21 gêneros e dividindo a família em três subfamílias, divisão que persiste até hoje, a saber, Cereoideae (hoje, Cactoideae), Opuntioideae e Pereskiodeae.

Após a revisão de BRITTON & ROSE (1923) que reconheceu 124 gêneros e 1235 espécies, seguiram-se os trabalhos de BACKEBERG (1935) e BACKEGERG (1959), os quais listaram 220 gêneros e cerca de 3000 espécies.

Com a introdução de formas modernas de classificação filogenética, houve uma redução no número de gêneros, sendo que HUNT (1967) reconheceu 84 gêneros e cerca de 2000 espécies. Valores próximos a estes foram ratificados no Encontro Internacional para o Estudo de Plantas Suculentas, realizado em 1986, onde cerca de 90 gêneros e 2000 espécies foram reconhecidas pelos participantes do encontro (HUNT & TAYLOR, 1986).

As cactáceas são plantas fanerógamas dicotiledôneas, nativas das Américas e se distribuem amplamente desde o Canadá até a Patagônia, extremo sul da Argentina. De modo geral, podem se desenvolver em ambientes que variam desde desertos e locais pedregosos até o interior de matas tropicais, sendo fator comum a todos estes diferentes ambientes, a irregularidade do suprimento hídrico (GUDSHORORN, 1975).

Para que as cactáceas possam sobreviver em tais meios, elas possuem mecanismos eficientes que as tornam capazes de se adaptar em lugares pobres de nutrientes e água, mesmo sob a ação direta de raios solares e temperaturas elevadas. Estes mecanismos processam-se através de uma série de modificações morfofisiológicas que lhes conferem a capacidade de consumir e perder o mínimo de água que armazenam, apresentando características de plantas xerófitas. Possuem, portanto, sistemas radiculares superficiais e extensos, elevada relação volume/superfície e dispositivos que favorecem a retenção hídrica, já que a maior parte do tecido interno do caule consiste de células altamente especializadas em armazenar água (tecido parenquimático). Além desta função, encontram-se ainda substâncias mucilaginosas no seu interior, capazes de absorver água do meio circundante. Outra característica é a transpiração reduzida através de algumas modificações, principalmente nas partes aéreas do caule, tais como: cutículas espessas, revestimento ceroso e células epidérmicas apresentando paredes espessas, frequentemente lignificadas (METCALFE & CHALK, 1972).

Cereus peruvianus (figura 1), é uma espécie de cacto colunar pertencente ao gênero *Cereus*, subfamília Cactoideae e família Cactacea se distribuindo pelo sudeste da América do Sul. É uma planta arborescente de até oito metros de altura, de ramos (cladódios) carnosos, compridos com estrangulamentos de 0,50 a 0,70 m, sulcadas e com arestas e espinhos agrupados. Quando nova, apresenta uma tonalidade levemente azulada que desaparece na planta adulta (BRITTON & ROSE, 1923).



Figura 01- Cladódios de uma planta de *Cereus peruvianus* com aproximadamente 8 m de altura.

2. MUCILAGENS DE CACTÁCEAS

2.1. Aspectos Estruturais

A mucilagem da *Opuntia fulgida* ou goma *cholla* foi a primeira das mucilagens de cactáceas a ser investigada quimicamente. Os trabalhos iniciais (YOSHIMURA, K 1895; YOSHIMURA, K. 1896) identificaram apenas a galactose na estrutura da goma. Em 1902 foi relatada a presença de galactose e arabinose na estrutura do polissacarídeo . A natureza acídica da mesma foi descrita quando SANDS & KLAAS (1929) apresentaram a seguinte composição monomérica para a mucilagem da *Opuntia fulgida*: arabinose, galactose, ramnose e ácido galacturônico. BROW *et alii* (1949) identificaram na estrutura da mesma a xilose, além dos constituintes descritos anteriormente.

Parikh & Jones com base em trabalhos minuciosos e detalhados a respeito de características estruturais do polissacarídeo, propuseram que o mesmo seria constituído de uma cadeia principal formada por unidades de D-galactose unidas através de ligações do tipo $\beta(1\rightarrow6)$ e apresentando cadeias laterais ligadas ao carbono 3 constituídas dos seguintes monômeros: galactose, arabinose, ramnose , ácido galacturônico e xilose (figura 2). Parte da arabinose estaria como extremidade não-redutora na forma furanosídica (PARIKH & JONES, 1966a; PARIKH & JONES, 1966b) .

As mucilagens de *Opuntia nopalea-coccinellifera*, *Opuntia monocantha*, (MINDT *et alii*, 1975) , *Opuntia aurantiaca* e *Opuntia brasiliensis* (MOYNA & DIFABIO, 1978) e *Opuntia ficus-indica* (McGARVIE & PAROLIS,1981) apresentaram composição monomérica similares à composição determinada para *Opuntia fulgida*: arabinose, galactose, ramnose, xilose e ácido galacturônico (BROW *et alii*, 1949).

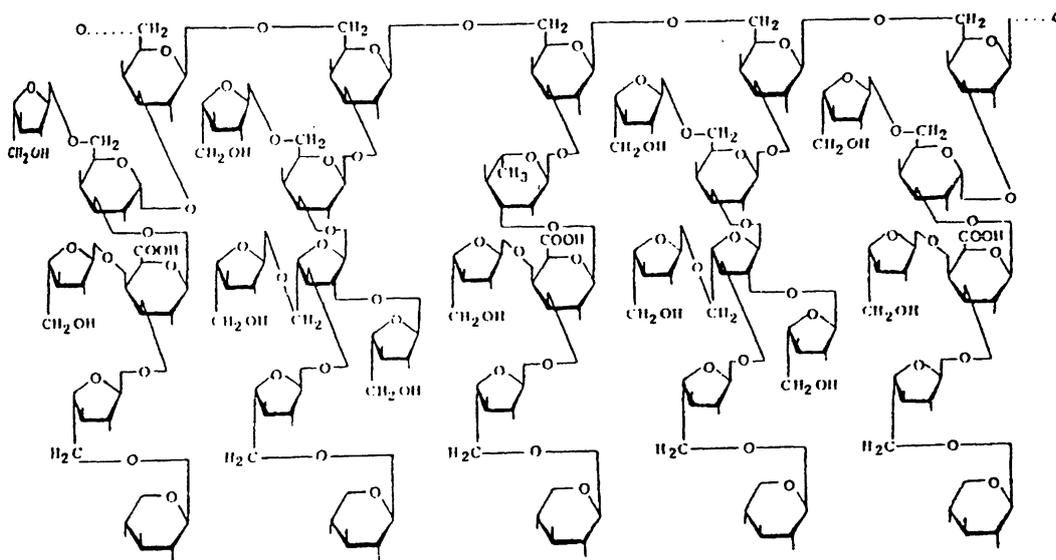


Figura 2 - Unidade estrutural básica da goma *cholla* (mucilagem da *Opuntia fulgida*).

McGARVIE (1981) após minuciosas análises por metilação do polissacarídeo obtido do parênquima da *Opuntia ficus-indica*, e com base em seus trabalhos anteriores (McGARVIE & PAROLIS, 1979a; McGARVIE & PAROLIS, 1979b) realizados com o polissacarídeo integral e parcialmente degradado, ratificou as análises de composição monomérica obtidas por outros pesquisadores e propôs uma estrutura (figura 3) para a goma da *Opuntia ficus-indica* que difere em alguns aspectos da estrutura da mucilagem da *Opuntia fulgida* (figura 2), proposta por PARIKH & JONES (1966)b. Nesta estrutura a cadeia principal é composta de unidades de ácido galacturônico alternados com unidades de ramnose. Todas as unidades de ramnose da cadeia principal estão substituídas no carbono 4 por cadeias curtas constituídas por unidades de

galactose unidas através de ligações $\beta(1\rightarrow6)$, sendo que estas cadeias laterais podem apresentar ramificações unidas aos carbonos 3 e 4. As unidades de arabinofuranose e xilopiranosose estão presentes como extremidades não-redutoras. Portanto, o ácido galacturônico e a ramnose formariam um núcleo com maior resistência à hidrólise que as cadeias laterais, constituídas de arabinose, galactose e xilose.

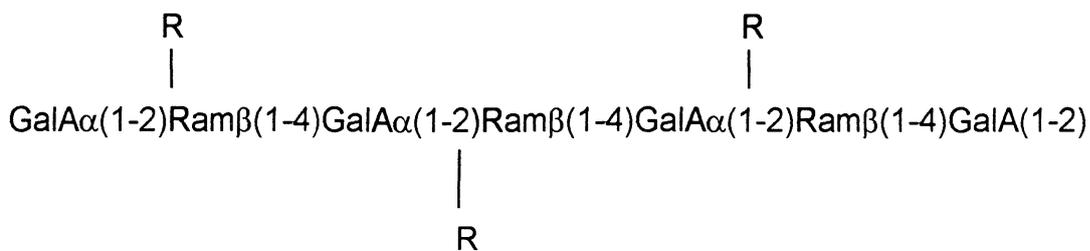


Figura 3 - Estrutura parcial proposta para a mucilagem da *Opuntia ficus-indica*. R, cadeias laterais constituídas de unidades de D-galactose unidas através de ligações do tipo $\beta(1-6)$.

TABAK & PUESCHEL (1969) isolaram um polissacarídeo com 15% de rendimento em relação à massa sêca do cacto *Cereus triangularis*, composto de galactose, arabinose, ramnose e ácido galacturônico, não sendo observada a presença de xilose, como em espécies do gênero *Opuntia*. Este polissacarídeo também apresentou um núcleo bastante resistente à hidrólise contendo todo o ácido galacturônico detectado.

MINDT *et alii* (1975) realizaram análises estruturais em mucilagens de quatro espécies de cactáceas (*Opuntia monacantha*, *Opuntia nopalea-coccinellifera*, *Cereus peruvianus*, *Wigginsia erinacea*). O teor de ácido galacturônico variou entre 20 e 51% nas espécies analisadas. A mucilagem do *Cereus peruvianus* apresentou teor de ácido galacturônico de 40% e os seguintes açúcares neutros: ramnose, galactose e arabinose, não sendo observada a presença de xilose. A análise de metilação mostrou que parte da arabinose

(2,3,5 - tri-O-metil-arabinose) ocupa extremidades terminais não-redutoras na forma furanosídica . O autor concluiu ainda, que as mucilagens do *Cereus peruvianus* e da *Wiggincea erinácea* são similares em termos de composição monomérica e estruturais.

Segundo MOYNA & TUBÍO (1977) a maioria das mucilagens de plantas suculentas tem em comum a presença de L-arabinose, D-galactose, L-ramnose , ácido D-galacturônico, cuja cadeia principal ("backbone") é constituída pelo ácido urônico e pelo deoxi-açúcar.

2.2. Usos de mucilagens e outros produtos de cactáceas

CRUSE (1949) , em uma revisão a respeito da flora do deserto do sudoeste dos Estados Unidos, relaciona uma série de patentes e publicações que preconizam a viabilidade da utilização da flora do deserto, em especial as cactáceas, como fonte de alimento forrageiro para animais, açúcares fermentescíveis, celulose, amidos, resinas, gomas, alcalóides, fitoterápicos, óleos e outros produtos extrativos.

FERNANDEZ (1954) relata os resultados de suas pesquisas com as "folhas " e frutos da *Opuntia ficus-indica*, sugerindo que as "palmas" poderiam ser utilizadas como alimento para o gado e discute ainda a viabilidade econômica da obtenção de óleo a partir de suas sementes, bem como a possibilidade de extração e fermentação de açúcares das mesmas.

MEDEIROS (1958) analisando as cactáceas: *Cereus jamacaru*, *Opuntia nopalea-coccinellifera* e *Opuntia ficus-indica*, em relação ao conteúdo de proteínas, lipídios, cinzas, carboidratos e sais minerais, concluiu que a planta seca pode ser utilizada como aditivo alimentar para o gado devido ao alto conteúdo de sais de cálcio e fósforo.

CAMPELLO e CORRÊA (1960) descreveram os resultados de uma pesquisa a respeito do cultivo e utilização de variedades de cactáceas forrageiras sem espinhos. Procuraram também estabelecer a classificação

botânica das espécies existentes nas regiões áridas de Pernambuco e a forma adequada de manejo do gado com fitobiomassa provenientes de cactáceas. Os autores concluíram que "é indiscutível a necessidade de fomentar, o mais intensamente possível, a cultura das palmatórias na zona seca de Pernambuco, a fim de que o sertanejo e seu gado não pereçam".

CORRÊA (1963) publica uma revisão onde discute o valor nutritivo de algumas espécies de palmas e os resultados de estudos realizados pelo Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco com o objetivo de resolver problemas da cultura de palma gigante (*Opuntia ficus-indica*), palma redonda e miúda (*Opuntia nopalea-coccinellifera*), as quais são utilizadas no nordeste brasileiro como forrageira para o gado.

MELLA (1958) publicou resultados de avaliações bromatológicas realizadas com frutos de *Opuntia ficus-indica* e de *Pyrus communis* provenientes do Chile. Os resultados levaram à conclusão que o fruto da *ficus-indica* possui alto valor nutritivo em função do seu conteúdo de sais minerais e vitaminas.

Em 1968, VIDAL & VARELA realizaram um "screening" de aminoácidos da *Opuntia ficus-indica*, o qual indicou um conteúdo aceitável de aminoácidos, embora lisina, um dos aminoácidos essenciais, seja limitante. Dietas com 25% de proteína de *Opuntia ficus-indica* e 75% de proteína de farinha de peixe são totalmente aceitáveis do ponto de vista nutricional.

BICALHO & PENTEADO (1981) relataram resultados de avaliações bromatológicas realizadas com "folhas" e frutos da *Opuntia ficus-indica*. O valor nutricional do fruto anunciado por outros pesquisadores foi comprovado nas análises realizadas por Bicalho e colaboradores que também determinaram alta percentagem de cálcio, fósforo e vitaminas no fruto. BICALHO & PENTEADO (1982) determinaram o período ideal para colheita dos frutos consumidos "in natura" ou processado.

VILLAREAL *et alii* (1964) relataram os resultados obtidos com sucos extraídos de frutos de seis espécies de cactos (*Opuntia megacantha*; *Opuntia spp.*; *Opuntia streptacantha*; *Opuntia robusta*; *Opuntia amyclaea*; e *Opuntia ficus-indica*). As pesquisas tiveram como objetivos determinar condições ideais de processamento e avaliar a qualidade dos sucos enlatados. Os melhores resultados foram obtidos com o suco extraído dos frutos da *Opuntia streptacantha*.

OSPINA (1971) relatou a determinação da levulose em frutos de *Opuntia ospinae* e ESPINOSA (1973) identificou os seguintes açúcares solúveis no suco obtido de *Opuntia ficus-indica*: frutose, glucose e galactose, além de descrever as condições de preservação do suco.

LERCKER *et alii* (1976) identificaram os seguintes açúcares solúveis no fruto da *Opuntia ficus-indica*: glucose, frutose e em menor quantidade sacarose. O óleo obtido a partir das sementes apresentou alto conteúdo de ácido linolêico (65%), não sendo detectada qualquer substância que possa impedir seu uso na alimentação humana. Os autores sugeriram o uso da *Opuntia* como uma fonte alimentar do tipo convencional. O fruto de uma cactácea (*Cereus (Carnegiea) gigantea Eng.*) foi utilizado pelos índios como alimento em grande escala. O xarope obtido da polpa era fermentado para fabricação de vinho e vinagre e as sementes serviam como fonte de proteínas.

PIMIENTA-BARRIOS & NOBEL (1993) descreveram a distribuição geográfica no território mexicano do cacto colunar *Stenocereus*, que produz frutos denominados de Pitayas e comparou características químicas e morfológicas de frutos de espécies nativas com frutos de espécies selecionadas e cultivadas em grandes plantações.

VILLAREAL *et alli* (1963) relataram resultados de pesquisas realizadas com seis espécies de cactos. Com base nos resultados, foi discutida a possível utilização de cactáceas como fonte de pectinas e celulose.

COSTA *et alli* (1992) relataram o desenvolvimento de um método de extração de pectinas da cutícula do *Cereus peruvianus*, pelo qual se obteve um rendimento de 40% em relação à massa seca da cutícula.

Com relação a princípios ativos não glicídicos, Head e colaboradores em 1960 (*apud* CRUSE, 1973) isolaram o composto 7-stigmasten-3 β -ol do cacto *Tophocereus schottii*, o qual mostrou ser essencial ao ciclo de vida de *Drosophila phacea*.

Hartwell em 1960 (*apud* CRUSE, 1973) relatou a cura de um adenocarcinoma abdominal, histologicamente diagnosticado, pelo emprego de duas cactáceas uma espécie de *Opuntia* proveniente do México e outra da África do Sul (*Opuntia máxima*).

No período de 1978 a 1983 foram publicados uma série de artigos que avaliam a eficiência de extrato de *Opuntia streptacantha*, largamente utilizado no México como agente hipoglicemiante. Segundo os autores, os resultados obtidos comprovam a eficiência destes extratos e validam, portanto, a utilização dos mesmos (IBÁÑEZ- CAMACHO *et alii*, 1983).

Brambilla em 1957 (*apud* CRUSE, 1973) obteve dos frutos e das folhas da *Opuntia ficus-indica* mucilagem com propriedade emoliente e hidratante com a qual foi preparada uma emulsão cosmética contendo 2,5% com 2% de sólidos totais.

ALDERETE (1955) descreveu o uso de mucilagens obtidas de cactáceas (*Opuntia quimilo*, *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia kiska-loro*, *Cereus validus* e *Cereus coryne*) em processos de clarificação de água, além das propriedades adsorventes das mesmas em soluções aquosas para alguns compostos químicos.

RODRIGUEZ (1984) obteve mucilagens do *Cereus peruvianus* através de diversos métodos e avaliou o potencial da mesma em processos de clarificação de água. Constatou que a mucilagem, na faixa de 0,2 ppm a 1 ppm, funciona como um auxiliar de floculação, conduzindo a uma economia do coagulante primário, sulfato de alumínio.

NOZAKI *et alii* (1993) empregaram a mucilagem do *Cereus peruvianus*, obtida de acordo com os métodos descritos por RODRIGUEZ (1984) e avaliaram o potencial da mesma na remoção do cromo III de águas residuais de curtumes.

NERD *et alii* (1993) descrevem uma tentativa de adaptação de cinco espécies de cactáceas colunares, entre elas o *Cereus peruvianus*, no Deserto de Negv de Israel. Segundo os autores, *Cereus peruvianus* tem excelentes chances de ser domesticado, tendo apresentado excelente taxa de crescimento e de rendimento de biomassa anual (2 kg de massa seca por metro quadrado) e ainda colheita precoce de frutos comestíveis de boa qualidade em relação às demais espécies estudadas.

3. PECTINAS

3.1 Aspectos gerais

Os três principais polissacarídeos que entram na composição da parede celular de plantas são : celulose, hemilcelulose e substâncias pécticas.

As substâncias pécticas se localizam principalmente na lamela mediana e parede celular primária, desempenhando importante papel na manutenção da integridade e aderência dos tecidos da planta. Desta forma, a natureza e a quantidade de substâncias pécticas presentes exercem grande influência sobre a textura das plantas e vegetais (VAN BUREN, 1979) .

Nos frutos verdes a maior parte das substâncias pécticas se encontra sob a forma de protopectina, substância cimentante entre as células, a qual pode ser hidrolizada enzimaticamente até pectina solúvel durante o processo de maturação que, por sua vez, pode ser decomposta formando álcool metílico e ácido péctico, durante o amadurecimento excessivo ou apodrecimento da fruta. Embora a base bioquímica do amadurecimento e envelhecimento, associado ao amolecimento não tenha uma explicação clara, a dissolução da lamela, separação e perdas de íons Ca^{+2} , foram sugeridas como fatores que contribuem para o amolecimento das frutas.

Muitos vegetais, pré-aquecidos a temperaturas moderadas (60-70°C), por 20 a 30 minutos, e logo postos em água fervendo durante 15-30 minutos, apresentam maior rigidez que aqueles mantidos na última condição diretamente, ou seja, sem pré-aquecimento. A maior rigidez deve-se provavelmente à ação da pectinesterase sobre as paredes celulares, especialmente sobre as substâncias pécticas que são desmetiladas com uma posterior formação de pontes de íons Ca^{+2} , ocorrendo portanto, aumento no conteúdo de pectinas do tipo quelantes solúveis (BARTOLOME & HOFF, 1972) . Segundo SAJJAANANTAKUL *et alii* (1989) o efeito texturizante provocado pelo pré-aquecimento seria resultado não apenas do aumento do cálcio ligante, mas também da redução do processo de β -eliminação, o

qual provoca despolimerização das substâncias pécticas segundo um mecanismo alternativo à simples quebra hidrolítica, ou seja formação de um hexuronato insaturado entre C-4 e C-5 (ação enzimática das pectinas liases).

Pectinas foram pioneiramente caracterizadas como agentes geleificantes em frutas (BRACONNOT, 1825). Desde então, estudos bioquímicos têm levado a um entendimento detalhado da estrutura química de várias fontes (ASPINALL, 1969) e, condições ótimas para a preparação de importantes pectinas comerciais foram descritas (TOWLE & CHRISTENSEN, 1973).

As substâncias pécticas são, basicamente, polissacarídeos constituídos por resíduos do ácido D-galacturônico unidos através de ligações do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$, podendo apresentar em sua estrutura, curtas sequências de ramnose unidas através de ligações do tipo $\alpha(1\rightarrow2)$ e ainda pequenas ramificações de xilose, ramnose e arabinose. Nas pectinas, parte das unidades de ácido D-galacturônico se encontram esterificadas por grupo metila, sendo que o grau de esterificação é um parâmetro que divide as pectinas em dois grandes grupos: pectinas com baixo teor de metoxila (abaixo de 50%) e pectinas com alto teor de metoxilas (acima de 50%). Esta classificação é muito importante, pois pectinas pertencentes a grupos diferentes, exibem comportamentos distintos de geleificação, sendo que, as pectinas de alto teor de metoxilas (ATM) são hábeis em formar géis na presença de ácidos orgânicos (cítrico, málico, etc.) e sacarose enquanto que as pectinas de baixo teor de metoxila (BTM) podem formar géis mesmo na ausência de tais complementos, exige, entretanto, uma pequena quantidade de íons divalentes (cálcio e/ou magnésio), daí a grande importância deste tipo de pectinas, uma vez que podem ser utilizadas, mais facilmente na fabricação de produtos dietéticos ou com baixo teor de calorias (GRUESS, 1973). As principais fontes de pectinas são as frutas cítricas (lima, limão e laranja) e bagaço de maçã (McCREADY & McCOMB, 1952).

Numa designação mais genérica, as substâncias pécticas foram definidas como derivados coloidais de carboidratos, porque o ácido

galacturônico em vegetais é derivado da galactose via oxidação do grupo alcoólico do carbono 6. Há grande proporção de unidades de ácido anidro galacturônico, formando uma cadeia polimérica básica linear.

Na década de 40, em decorrência das controvérsias existentes a respeito da nomenclatura das substâncias pécticas, um comitê instituído pela Sociedade Americana de Química adotou a “Nomenclatura Revisada de Substâncias Pécticas” que até hoje é aceita como padrão. De acordo com esta nomenclatura substâncias pécticas formam um grupo constituído pelas seguintes substâncias: protopectina, ácidos pectínicos, pectinatos, pectinas, ácidos pécticos e pectatos (CHRISTENSEN, 1986). As definições são dadas a seguir. Protopectina é a substância péctica matriz, insolúvel em água e presente nos tecidos de plantas que originam as demais substâncias pécticas. Ácidos pectínicos são ácidos poligalacturônicos com grau variável de metilação, os quais dependendo do teor de metoxilação, podem formar géis com sacarose em meio ácido, ou em presença de cátions divalentes. Pectinatos são sais de ácidos pectínicos. Pectinas são os ácidos pectínicos solúveis em água com teor de metoxil e grau de neutralização variável, podendo também geleificar com açúcar e ácido sob condições apropriadas. Ácidos pécticos são representados pelos ácidos poligalacturônicos totalmente desesterificados (livres de metoxila). Pectatos são os sais de ácidos pécticos.

Os grupos carboxila da cadeia poligalacturônica podem então ser encontrados parcialmente esterificados com grupos metila ou, completamente neutralizados por uma ou mais bases. O grau de esterificação varia com a procedência da pectina e método de extração (FISHMAN *et alii*, 1978; PILNIK & VORAGEN, 1970). A “Nomenclatura Revisada de Substâncias Pécticas” está sendo criticada por não prever a presença de açúcares neutros ou ramificações laterais. Moléculas de pectinas podem ser divididas em duas regiões basicamente lineares distintas (figura 4), região “smooth” (homogalacturonana) e região “hairy” (ramnogalacturonana) em função das cadeias laterais de açúcares neutros ligadas covalentemente (DE VRIES *et alii*, 1982; DE VRIES *et alii* 1983).

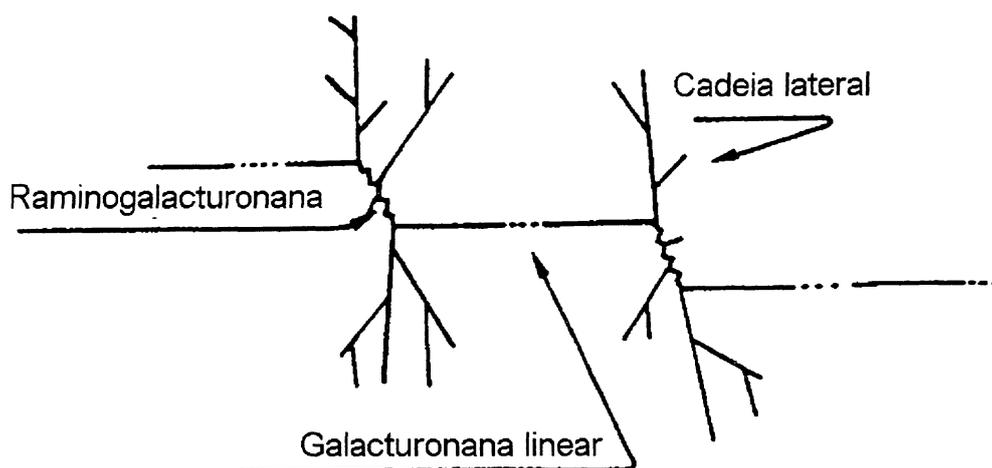


Figura 4 - Representação esquemática da cadeia principal de uma pectina mostrando a região não-ramificada (homogalacturonana) e região ramificada (ramnogalacturonana).

As características estruturais de pectinas são sumarizadas na tabela 1. As cadeias laterais são compostas principalmente de D-galactose, L-arabinose, D-xilose, e em menor frequência: D-manose, L-fucose, ácido D-glucurônico e ainda açúcares metilados como 2-O-metil-D-Xilose, 2-O-metil-L-fucose e D-apiose. As cadeias laterais ligam-se covalentemente à cadeia principal através do carbono 4 de unidades de ramnose pertencentes à cadeia principal. Deve ser salientado que substituições também ocorrem nas unidades de ácido galacturônico da cadeia principal em C-2 e C-3 (SELVENDRAN *et alii*, 1987). Algumas hidroxilas do C-2 e C-3 podem estar acetiladas, existindo valores de acetilação que variam de 0,2% no caso da pectina cítrica e de maçã podendo chegar até 35% em pectina extraída de bagaço de beterraba (ROMBOUTS & THIBault, 1986). Os açúcares metilados ocorrem exclusivamente como grupos terminais, enquanto os açúcares neutros mais comuns como D-galactose, L-arabinose são encontrados na forma de arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (ASPINALL, 1980).

Tabela 1 - Características Estruturais de Moléculas de Pectinas

Cadeia Principal	Galacturonana Ramnogalacturonana
Cadeias Laterais (Maiores)	Arabinanas Galactanas Arabinogalactanas
Cadeias Laterais (Menores)	β -D-Xil-(1-3)- L-ara-(1-3)- β -D-Gal- (1-2)- β -D-Xil-(1-3)- α -L-Fuc-(1,2)- β -D-Xil-(1-3)- D-Api-(1-3)-D-Api-(1- β -D-GlcA-(1,6)-D-Gal-(1-

3.2 Histórico

TUTIN (1921) observou a produção de metanol e ácido péctico pela ação enzimática ou de alcali sobre pectinas. MYERS & BACKER (1927) constataram a redução na viscosidade de soluções de pectina devido a adição de álcali.

PAUL & GRANDSEIGNE (1929) verificaram que pectinas submetidas à ação da pectase eram sensíveis a metais alcalinos terrosos, ou seja, estes eram capazes de promoverem a geleificação, resultando em gel firme. Estas mesmas pectinas, enzimaticamente tratadas, quando misturadas com leite levavam à formação de gel.

JOSEPH (1930) observando que a pectina tratada enzimaticamente coagulava em presença de leite, concluiu que a geleificação se dava em função do cálcio presente no leite.

Um método de preparação de agentes geleificantes utilizando pectinas de baixo teor de metoxila (variando entre 3,0 e 6,5) pela adição de cátions foi patenteado por BAKER & GOLWIN (1941).

KAUFMAN *et alii* (1942) observaram que a formação de géis utilizando pectinas de baixo teor de metoxila em presença de cálcio era influenciada pelo tamanho da cadeia, isto é, quanto maior a cadeia mais firme era o gel produzido.

McCREADY *et alii* (1944) verificaram que pectinas cítricas eram desmetoxiladas e despolimerizadas pelo tratamento alcalino, sendo que a velocidade de desmetoxilação em relação à despolimerização dependia do pH e da temperatura, ou seja, controlando-se tais parâmetros era possível ajustar um processo de desesterificação, de forma que a velocidade de desmetilação fosse mais rápida que a despolimerização. Os autores sugeriram que para valores de pH superiores a 10, a temperatura não podia ultrapassar a 5°C. A influência de sais também foi estudada pelos mesmos autores sendo constatado que a presença de alguns sais influenciavam a velocidade de desmetilação. A influência dos sais de metais divalentes como Ca^{+2} e Mg^{+2} era maior que a dos sais de Na^+ e K^+ .

LINEWAVER (1945) estudando o efeito da concentração de eletrólitos sobre a desesterificação de pectinas cítricas, verificou um aumento de 400% na velocidade de desesterificação em função da concentração eletrolítica, concluiu que a aceleração da velocidade de desesterificação se dava em função da neutralização de carga do grupo carboxila, o que segundo o autor facilitaria a aproximação do agente de hidrólise, o íon hidroxila.

SHULTS *et alii* (1945) comparando a desesterificação de pectinas através de tratamentos enzimático e alcalino, perceberam que os ácidos pectínicos enzimaticamente desesterificados eram menos dissociados do que aqueles desesterificados por tratamento alcalino. Esta diferença no comportamento de dissociação foi explicada em termos da distribuição de grupos carboxilas gerados. Segundo Shultz, agentes alcalinos provocam

desesterificação ao acaso, gerando uma distribuição irregular ou aleatória de grupos carboxílicos, enquanto que na desesterificação enzimática, obtem-se vários grupos desesterificados lado a lado, que em blocos atrairiam os íons mais firmemente que os grupos carboxílicos distribuídos aleatoriamente .

SPEISER *et alii* (1945), estudando o efeito da concentração de ácido e temperatura sobre o processo de desmetilação de pectinas cítricas, verificaram que o ácido não apenas promovia a desmetilação como também removia outros compostos, sem entretanto, causar degradação excessiva da molécula. Portanto, na desmetilação ácida obtem-se ácidos pectínicos com maior grau de "pureza". A análise de parâmetros cinéticos mostrou que a reação de desesterificação era de primeira ordem, similar à hidrólise de ésteres de baixa massa molecular, o que indicava que a hidrólise era independente do resto da molécula. Foi observado, ainda, que a velocidade de desmetilação era diretamente dependente da temperatura. Os autores verificaram ainda, que sob a ação da pectase em pH 6,0, à diferentes temperaturas, a reação de desesterificação era muito mais rápida que a remoção de outros componentes, obtendo-se uma máxima velocidade de desesterificação a 50 °C.

MERILL & WEEKS (1945) estudando o efeito do aquecimento sobre a reologia de soluções de pectina a 1%, verificaram que alterações na viscosidade relativa estavam associadas a alterações na viscosidade intrínseca. Os autores sugeriram que a redução de viscosidade se dava em função, preferencialmente, da estrutura primária que da estrutura secundária. Estudando o efeito do pH e da temperatura sobre o processo de desesterificação de pectinas em meio ácido, obtidas a partir de maçã, verificaram que a reação era de primeira ordem. Observaram, também, que a adição de ácido aumentava a velocidade de desesterificação em relação à despolimerização, ou seja, o ácido era mais eficiente na catálise da desmetilação do que na catálise da despolimerização. Observaram ainda que a adição de sais provocava um aumento do pH e na velocidade de desesterificação. Segundo os pesquisadores essas mudanças eram

provocadas pelos cátions que atuavam especificamente sobre os grupos carboxilas.

O efeito dispersante da sacarose e dextrose sobre pectinas de baixo teor de grupos metoxilas foram estudados em 1946 por WOODMANSEE *et alii* (1946). A sacarose foi mais efetiva em pH 3,35, enquanto a dextrose em pH 2,95. Os mesmo autores verificaram a influência de açúcares na forma de pó na obtenção de geleias, sendo que apresentaram melhores características de textura aquelas produzidas com uma mistura de sacarose e dextrose. Nas géleias em que foi adicionada somente dextrose, ocorreu cristalização e naquelas preparadas com sacarose, observou-se uma textura granulosa. Ainda estudando o efeito do tempo sobre géis de uvas preparadas com pectinas de baixo teor de grupos metoxila, o autor verificou que a rigidez dos géis aumenta com o tempo de armazenamento, mas perde em elasticidade.

SPEISER & EDDY (1946), utilizando pectinas de maçãs desesterificadas enzimaticamente e por tratamento ácido, prepararam géis visando determinar a influência do método de desesterificação e da massa molar. Os géis preparados com pectinas obtidas através de desesterificação enzimática eram menos firmes que os géis preparados com pectinas desmetoxiladas por tratamento ácido. Verificaram que nos géis preparados com 65% de sólidos a firmeza dependia da massa molar, enquanto que nos preparados em presença de cálcio a firmeza dependia fundamentalmente do grau de metoxilação.

OWENS & MACLAY (1948) patentearam um processo de produção de pectinas de baixo teor de grupos metoxila e alta massa molar. O método consistia em tratar o tecido vegetal com álcali na faixa de pH de 6 a 10, com temperaturas variando de 0 a 60 °C. O processo extrativo/preparativo era interrompido pela adição de ácido e, então, a mistura aquecida à ebulição em presença de um auxiliar de filtração, para a obtenção da pectina.

OWENS *et alii* (1949), estudando a geleificação de pectinas de alto e baixo teor de grupos metoxilas, sugeriram que pontes de hidrogênio

eram as responsáveis pela geleificação de pectinas de alto teor de grupos metoxilas em presença de alto teor de sólidos, enquanto que as pectinas de baixo teor de grupos metoxilas tinham a geleificação governada por pontes de íons suplementadas pelas pontes de hidrogênio.

Numa outra patente, McCREADY *et alii* (1948) descreveram a obtenção de ácidos pectínicos de baixo teor de grupos metoxilas, desesterificados com diferentes agentes. A pectina foi precipitada por acidificação e o precipitado lavado até um pH máximo de 2,2.

JOSEPH *et alii* (1949) observaram que a desesterificação produzida pelo hidróxido de amônio levava à amidação da pectina, isto é, a hidrólise do éster se processava conjuntamente com a formação de grupos amida, tanto em sistemas alcoólicos como aquosos sob altas concentrações de hidróxido de amônio. Verificaram também que a velocidade de amidação era maior nos sistemas alcoólicos em relação aos sistemas aquosos, em função da concentração da amônia ser maior que íons amônio em sistemas alcoólicos, a qual reagia com os ésteres formando o grupo amida. Os mesmos autores enfatizaram que com o controle da concentração de hidróxido de amônio, temperatura e tempo de reação, pectinas amidadas seriam obtidas com praticamente a mesma massa molar da pectina tratada, a qual poderia ser empregada comercialmente. Ainda, segundo JOSEPH e colaboradores, as pectinas amidadas requerem a mesma quantidade de cálcio para produzirem um gel com determinada firmeza, mesmo quando no processo utilizou-se elevada concentração de hidróxido de amônio. Os autores observaram também que o grupo amida não reagia com os íons cálcio no processo de geleificação, uma vez que o conteúdo de nitrogênio amídico permanecia constante antes e após a geleificação.

Estudos eletroforéticos de pectinas desesterificadas enzimaticamente (HILLS *et alii* 1949), demonstraram que a enzima hidrolizava os grupos metoxilas em posição específicas. Também observaram que os géis preparados com tais enzimas eram pouco firmes e que a firmeza aumentava com o aumento da desesterificação, sugerindo que este aumento de firmeza

era em decorrência do aumento da homogeneidade de cargas sobre a cadeia da pectina.

BRYANT (1949) obteve uma patente para produção de pectinas de baixo teor de grupos metoxilas, empregando uma quantidade 16 vezes superior a quantidade de hidróxido de amônio necessário para rompimento das ligações ésteres. Com este processo, Bryant obteve um produto contendo de 12 a 20 % de grupos carboxilas livres e sais de amônio na faixa de 15 a 35%. Sendo que este produto só necessitava de cálcio para geleificação.

OWENS *et alii* (1950) desenvolveram um método de preparação de pectinas de baixo teor de grupos metoxilas, a qual ao final do processo era separada por precipitação utilizando-se solução de NaCl 2 a 10% e pH entre 3 e 5.

MITCHELL (1950), estudando a desmetoxilação de pectinas via tratamento com hidróxido de amônio, verificou que o aumento de grupos carboxilas livres não correspondia ao aumento de grupos desmetoxilados.

GRAHAM & SHEPHERD (1953) estudando a despolimerização de pectinas cítricas com hidróxido de amônio, verificaram que a degradação poderia ser reduzida conduzindo o processo a baixas temperaturas e também que a neutralização parcial de pectinas de baixo teor de grupos metoxilas aumentava a solubilidade e a estabilidade durante o armazenamento.

KACHALSK & FEITELSON (1954) estudaram a desesterificação com hidróxido de sódio a 4°C e verificaram que a constante de velocidade decrescia com o tempo reacional, o que sugere, segundo os autores, que o campo eletrostático fortemente negativo dos grupos carboxilas, formados durante a hidrólise, causava redução na velocidade de reação.

NEUKON E DEUEL (1958), através de estudos reológicos de pectatos de sódio obtidos por desesterificação alcalina com hidróxido de sódio sob diferentes temperaturas, concluíram que sendo as pectinas polissacarídeos oxidados, as ligações glicosídicas seriam facilmente rompidas

por alcali produzindo compostos de menor massa molar. O rompimento da ligações, segundo estes autores, seriam em decorrência do fenômeno de β -eliminação (figura 5).

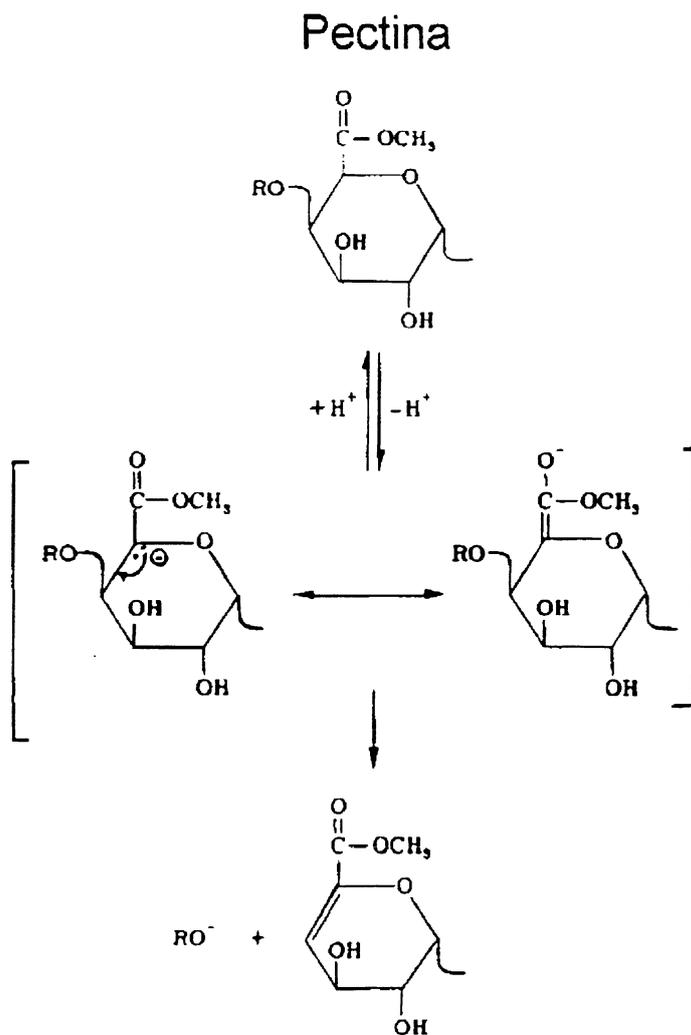


Figura 5 - Esquema da β -eliminação

ALBERSHEIN *et alii* (1960) observaram que a despolimerização de pectinas em pH 6.8 com temperatura entre 60 e 90 °C, aumentava com a temperatura e era maior no início da reação. De acordo com os autores, a redução na velocidade de degradação da molécula com o tempo de aquecimento era devido à diminuição do conteúdo de grupos metila. Ainda de acordo com Albershein, as unidades de ácido galacturônico deveriam estar na conformação C-1, de forma que os dois substituintes diretamente envolvidos na β -eliminação estariam situados em posição axial e a eliminação se daria de acordo com o esquema mostrado na figura 5; no caso de esteres de ácido algínico a degradação ocorre de forma mais lenta, uma vez que o hidrogênio do carbono 5 e o resíduo glicosídico não estarem em posição axial.

DI GIACOMO & RISPOLI (1961) verificaram que a desesterificação com hidróxido de amônio em meio alcoólico podia ser controlada mais facilmente pelo fato de ser menos rápida.

RISPOLI & DI GIACOMO (1962), também, estudaram a influência de fatores como: pH, sólidos solúveis e grupos metoxila na preparação de géis utilizando pectinas de baixo teor de grupos metoxilas. A influência do cálcio foi mais pronunciada à medida que houve redução do teor de metoxila, sendo que a necessidade de cálcio também aumentou com a redução do teor de sólidos totais

LEO & TAYLOR (1962) patentearam um método de preparação de géis, utilizando pectinas de baixo metoxila, a frio e sem a necessidade de adição de açúcar.

BOCK E LANGE (1963), estudando a desesterificação de pectinas com hidróxido de amônio em meio aquoso, no intervalo de temperatura de 10 a 30°C e valores de pH entre 9 a 10,3, observaram que para este intervalo de pH, o poder de geleificação dos produtos aumentava com o decréscimo da temperatura. Segundo estes autores o pH e a concentração de hidróxidos, empregados no processo de desmetilação não tiveram influência significativa sobre a capacidade de geleificação dos

produtos obtidos. Estes autores determinaram que os produtos desesterificados sob temperaturas entre 10 a 15 °C, apresentavam capacidade ótima de geleificação em relação aos produtos obtidos em temperaturas mais elevadas.

LOPES & LI-HSIENG (1968), estudando a influência de sólidos totais, pH e teor de cálcio, em relação à firmeza de géis preparados com pectinas de baixo teor de metoxila e contendo grupos amidas, verificaram que embora seja possível a obtenção de géis preparados com pectinas de baixo teor de metoxila em um amplo intervalo de pH, o pH era extremamente importante na qualidade e estabilidade de géis preparados em presença de cálcio e baixo conteúdo de sólidos. Os autores também verificaram que em determinado pH e conteúdo de cálcio, a quantidade de pectina necessária para a obtenção de gel com uma determinada firmeza decrescia com o aumento do teor de sólidos solúveis. Verificaram ainda que, fora dos intervalos ótimos de concentração de pectina de baixo teor de metoxila e conteúdo de cálcio, ou seja, tanto acima como abaixo do intervalo, géis fracos eram formados. Observaram ainda que o emprego de grandes quantidades de pectina promovia turvação no gel. Estes mesmos autores, verificaram que durante o armazenamento, a firmeza do gel aumentava enquanto a elasticidade decrescia. Eles sugeriram que tais mudanças estavam relacionadas com a redução do conteúdo de metoxil, levando portanto a um aumento do número efetivo de pontes de íons estabelecidas entre as cadeias.

KOHN (1969) determinando a constante de estabilidade para complexos formados entre pectinas de beterraba e íons cálcio, observou que as pectinas desesterificadas enzimaticamente apresentavam segmentos de cadeia com alta densidade de carga, possibilitando a ligação à ions cálcio, mesmo aquelas com conteúdo relativamente alto de grupos metoxila. O autor também verificou que a afinidade de íons cálcio pelas pectinas aumentava com o decréscimo do teor de metoxila. Estudando a constante de estabilidade de pectatos de cálcio e de pectinato de cálcio acetilado, Kohn verificou que o aumento do grau de acetilação provocava diminuição no grau de estabilidade,

e que tal redução na constante era decorrente de impedimento estérico acarretado pelos grupos acetílicos. Com bases nestes estudos, o autor sugeriu que a ligação entre cálcio e a pectina se dava através de forças eletrostáticas.

SMIT & BRYANT (1969) metilaram pectinas com diazometano sob temperatura de 30 °C, e constataram redução na viscosidade. Esta redução foi relacionada a diminuição da massa molar provocada pela despolimerização durante o processo .

SEWER-LEWANDOWSKA *et alii* (1972), estudando a rigidez de pectinas de baixo teor de grupos metoxilas próximo a pH 3, observaram que a sensibilidade ao cálcio aumentava com o decrescimo do teor de grupos metoxila.

BLACK & SMIT (1972) estudando a desesterificação através de diferentes métodos, observaram que entre 5 e 7°C e pH 8, o processo de desmetilação com hidróxido de sódio era extremamente rápido a ponto de não permitir a obtenção de pectinas com determinados graus de metoxilação. A desesterificação conduzida com ácido clorídrico 1,4 N mostrou-se muito lenta em relação à reação processada em meio alcalino, mas com a vantagem de produzir menor despolimerização. Os mesmos autores, comparando géis produzidos com pectinas obtidas por diferentes agentes de desesterificação (ácido, hidróxido de amônio ou hidróxido de cálcio), observaram que os mesmos apresentavam valores de firmeza semelhantes, quando as massas molares e o teor de metoxila eram aproximadamente iguais. Observaram também, que géis feitos com pectinas de mesmo teor de metoxila e com a mesma percentagem de grupos carboxila livres, de pectinas obtidas por hidróxido de amônio ou hidróxido de sódio, apresentavam comportamento diferente. Os autores sugeriram que a maior firmeza dos géis de pectinas desesterificados via hidróxido de amônio era devido a formação de pontes de hidrogênio suplementares pelos grupos amida.

KAWABATA & SAWAYAMA (1975), estudando geleificação de pectinas de baixo teor de metoxila em presença de íons cálcio e magnésio,

observou que seria necessário o emprego de quantidades de magnésio três vezes superiores a quantidade de cálcio necessária para produzir um gel de mesma firmeza.

3.3 Tipos de géis e graduação

As pectinas de alto teor de metoxila, pertencentes ao grupo ATM, são aquelas que apresentam mais de 50% dos resíduos de ácido galacturônico esterificados (WALKINSHAW & ARNOTT, 1981), tendo as suas propriedades de geleificação influenciadas pelo grau de esterificação. De acordo com o grau de esterificação as pectinas podem ser subclassificadas em: pectinas de deposição rápida, de deposição semi-rápida e pectinas de deposição lenta. DOESBURG E GREVERS (1960) definiram o tempo de deposição como sendo aquele entre o momento em que todos os ingredientes necessários à formação da geléia estão presentes na solução aquecida em correta proporção, e o momento que ocorre a formação da geléia. A tabela 2 mostra, de forma sumariada, a relação entre grau de esterificação, o tempo e a temperatura de deposição para os diferentes tipos de pectinas de alto metoxila disponíveis comercialmente.

Tabela 2. Diferentes tipos de pectinas de Alto Teor de grupos metoxilas

<i>TIPO DE PECTINA</i>	<i>GRAU DE METOXILAÇÃO (%)</i>	<i>TEMPERATUA DE GELEIFICAÇÃO (C)</i>
Deposição Rápida	70-76	75-85
Deposição semi-rápida	66-70	55-75
Deposição lenta	60-66	45-60

As pectinas de deposição rápida apresentam grau de metoxilação entre 70 e 76%, são indicadas quando se utiliza embalagens pequenas e/ou na preparação de geléias contendo pedaços de frutas. A rápida deposição ou geleificação deste tipo de pectinas em temperaturas elevadas (75-85°C) previne a flotação de pedaços de frutas. Pectinas hábeis em promover a formação do gel entre 55-75°C são denominadas de pectinas de deposição semi-rápida e são utilizadas com as mesmas finalidades das pectinas de

deposição rápida, apresentam grau de metoxilação entre (66-70%). As pectinas com grau de metoxilação entre 60 e 66% geleificam em temperaturas entre 45 e 60 °C e são denominadas de pectinas de deposição lenta. Estas pectinas são indicadas quando se utiliza recipientes grandes. O tempo relativamente grande requerido para sua geleificação permite encher grandes recipientes. Portanto, para pectinas de alto teor de grupos metoxilas (tipo ATM), o tempo e temperatura de deposição são diretamente proporcionais ao grau de metoxilação da pectina.

A velocidade de deposição é um parâmetro que pode ser regulado também pelo controle do pH do meio de geleificação. Sais-tampão, tais como acetato de sódio, tartarato ácido de sódio, fosfato bissódico, carbonato de cálcio e citrato bissódico são frequentemente utilizados na preparação de pectinas comerciais tendo como finalidade controlar a velocidade de deposição do gel.

Pectinas de baixo teor de grupos metoxilas (BTM), tem a característica de fomagel em uma extensa faixa de pH, são menos sensíveis às variações de pH em relação às pectinas pertencentes ao grupo ATM, além disso geleificam sob baixas concentrações de cossoluto, sacarose por exemplo, ou mesmo na ausência deste. Entretanto, requerem a presença de íons divalentes como Ca^{+2} e Mg^{+2} . As pectinas comerciais, pertencentes ao grupo BTM, devem conter especificações relativas a quantidade de cossoluto (sacarose) e cálcio por grama de pectina necessária para a formação do gel. Altas concentrações de íons divalentes podem provocar a precipitação da pectina sem formação do gel. De modo diferente das pectinas de alto teor de grupos metoxilas (ATM), as pectinas do tipo BTM produzem geis cuja velocidade de deposição é reduzida com o aumento do grau de metoxilação. As pectinas do tipo BTM são utilizadas na fabricação de geléias com restrição calórica e outros produtos dietéticos como pudins, sopas gelatinosas, suco de frutas, purês e molhos.

A quantidade de sacarose (em gramas) necessária para geleificar um grama de pectina é uma medida do poder de geleificação e é expresso em graus, resultando em um gel com características texturais padronizadas sob condições predeterminadas. Há vários métodos que podem ser empregados para determinar o grau ou poder de geleificação de uma pectina. O mais utilizado é o USA-SAG. Quando 150 g de sacarose forma uma geléia perfeita com 1 g de pectina a partir de uma mistura com 65% de sólidos e pH ajustado para 3, esta pectina apresenta grau 150 SAG.

Pectinas obtidas a partir de polpa de maçãs e pele de cítricos, comercializadas sob a forma de pós, normalmente são padronizadas com glicose para grau 100 ou 150 SAG. Embora as pectinas também sejam disponíveis comercialmente na forma líquida, a preferência recai sob as pectinas na forma de pós uma vez que são mais estáveis e mais apropriadas para a preparação de geléias.

3.4 Geleificação de pectinas de alto teor de grupos metoxilas

As condições necessárias para promover a geleificação de ácidos pectínicos de alto teor de metoxila foram amplamente estudadas e existe um consenso a respeito dos requerimentos básicos, quais sejam: concentração de açúcar relativamente elevada; faixa de pH apropriada, massa molar e grau de metoxilação também elevados. Já em 1965 RAUCH apresentava, de forma esquemática (figura 6), a relação existente entre as principais condições necessárias à formação de gel com pectinas do tipo ATM, apontando valores limites que continuam sendo observados.

Em relação ao mecanismo de geleificação não existe o mesmo nível de consenso. A teoria mais simples e antiga, de acordo com GAVA (1986) , propõe que os açúcares têm um efeito desidratante, ou seja, os

mesmos removeriam a camada de água protetora das moléculas de pectina, possibilitando assim a sua aproximação, e conseqüentemente, o estabelecimento de pontes de hidrogênio entre as moléculas de pectina. Outros acreditam que a adição de açúcar conduz à formação de pontes de hidrogênio, mas estas seriam estabelecidas entre as moléculas de pectina e as moléculas de açúcar como mostra a figura 7. Para outros, o mecanismo de formação do gel não pode envolver somente o estabelecimento de pontes de hidrogênio entre moléculas de pectinas, açúcares e água, devido ao fato de serem demasiadamente fracas (FIZMAN, 1989).

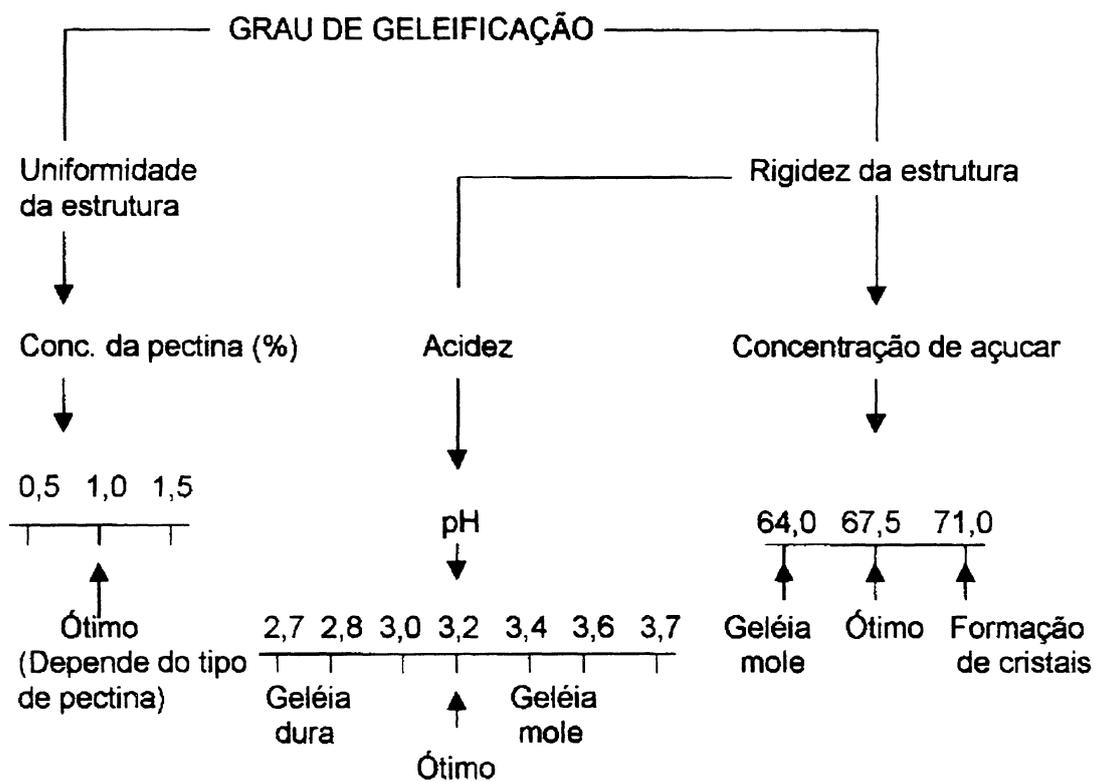


Figura 6 - Diagrama de RAUCH (1965): formação de geléia em função da combinação de seus componentes básicos.

De acordo com DESROSIER (1964), a pectina em solução se comporta como uma partícula coloidal carregada negativamente. A adição do açúcar provocaria a desestabilização destas partículas, as quais precipitariam na forma de uma rede e teriam a capacidade de reter líquido em sua estrutura

supramolecular. A continuidade da rede e a densidade das fibras que a constituem seriam tanto maiores quanto maior fosse a concentração de pectina. A firmeza da malha seria influenciada pela concentração de açúcar e pela acidez. Quanto maior a concentração de açúcar maior seria o efeito desidratante. Acidez elevada resultaria em géis firmes, embora pudesse provocar a ruptura da molécula de pectina por hidrólise e conseqüentemente o colapso do gé. Sob baixo valores de acidez as fibras tornar-se-iam fracas, não suportando o líquido, com conseqüente ruptura do gé.

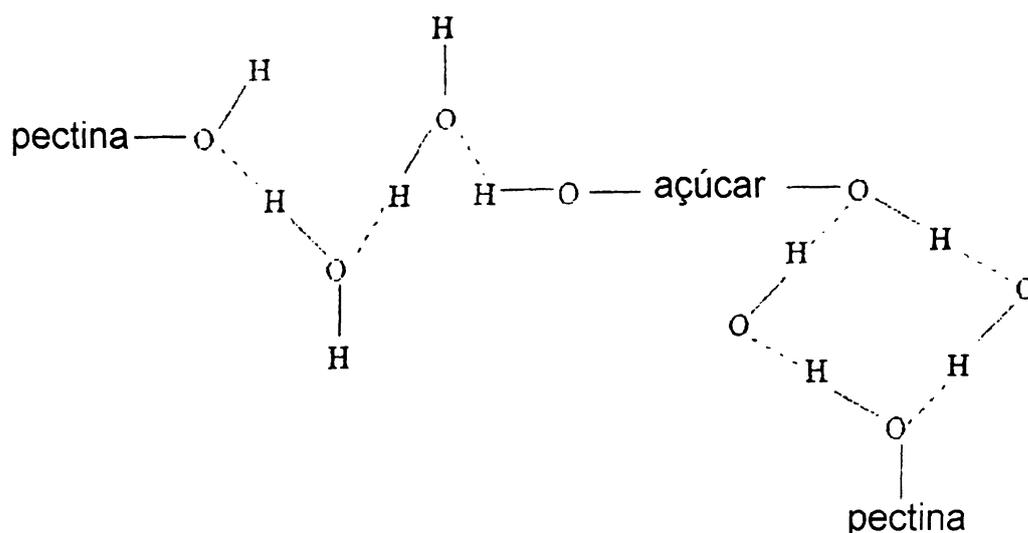
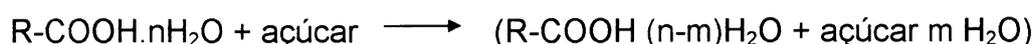


Figura 7- Interação açúcar-pectina-água por meio de pontes de hidrogênio

Segundo BOBBIO & BOBBIO (1984) as moléculas de pectinas estariam suspensas em meio aquoso na forma de micelas carregadas negativamente e altamente hidratadas. Para que ocorra a formação do gel haveria a necessidade de promover a aproximação entre as micelas. Esta aproximação seria possível pela desidratação parcial e pela redução da repulsão eletrostática. O açúcar exerceria o efeito desidratante e a acidez elevada (valores de pH entre 2,8 e 3,3) provocaria a redução da repulsão eletrostática.

Considerando-se $R-COO^-nH_2O$ como representação da molécula de pectina hidratada, a geleificação se daria segundo o seguinte esquema:



WALKINSHAW e ARNOTT (1981) realizando medidas em estruturas no estado sólido, propuseram que as interações hidrofóbicas poderiam desempenhar importante papel no mecanismo de geleificação de pectinas com alto teor grupos metoxilas. As interações hidrofóbicas seriam estabelecidas entre os grupos metoxilas (figura 08). Este trabalho se constitui num marco, pois fornece as primeiras evidências experimentais da existência de um outro tipo de interação além das pontes de hidrogênio.

OAKENFULL e SCOTT (1984) estudaram a interação hidrofóbica na formação de géis de pectinas de alta teor de grupos metoxilas e concluíram que a rede de moléculas de polissacarídeos nesses géis é estabilizada por uma combinação de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A contribuição da interação hidrofóbica à energia livre de formação de zonas de junção é metade daquela da ligação de hidrogênio, mas é uma exigência essencial, desde que a ligação de hidrogênio sozinha é insuficiente para vencer a barreira entrópica para a formação do gel. As zonas de junção consistem de dois segmentos adjacentes de cadeias de polissacarídeos, variando o comprimento desses segmentos de 18 até perto de 250 unidades de ácido galacturônico, aumentando com o grau de metoxilação. A exigência de alta concentração de sacarose (ou outro cossoluto similar) na preparação de géis de pectinas é explicada pela estabilização de

interações hidrofóbicas por certos açúcares (sacarose por exemplo). O papel significativo da interação hidrofóbica pode, também, explicar como as propriedades reológicas desses géis dependem da temperatura, e são afetados pela substituição de outros açúcares ou cossolutos similares à sacarose. Portanto, os autores não só confirmam a existência e a importância das interações hidrofóbicas na formação de pectinas com alto teor de metoxila como, também, demonstram que o açúcar ou outros poliois desempenham a função de estabilizar a interação hidrofóbica.

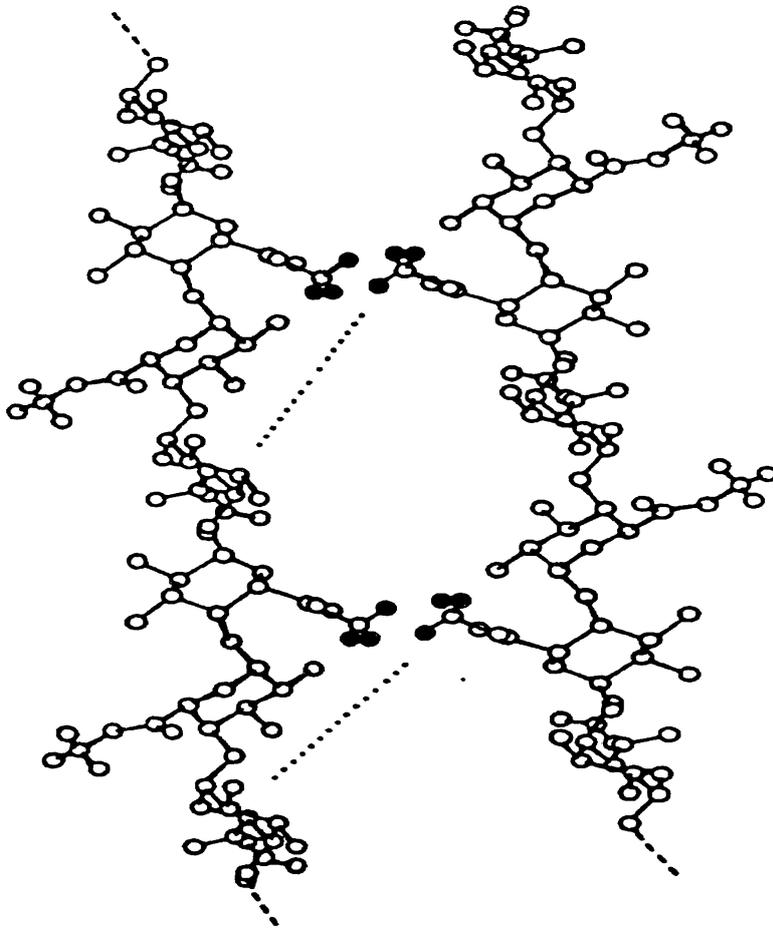


Figura 8 - Estrutura das zonas de junções em géis de pectinas de alto teor de metoxila baseado em estudos de difração de Raios-X. Os átomos de hidrogênio dos grupos metílicos hidrofóbicos são representados por círculos fechados e as pontes de hidrogênio são representadas por linhas tracejadas.

De acordo com GROSSO (1992) a capacidade de geleificação de pectinas de alto teor de metoxila depende da capacidade de hidratação do açúcar empregado e, também, de sua capacidade de interagir com a pectina. Géis obtidos com sorbitol apresentaram resultados texturais (dureza) superiores aos obtidos com sacarose ou com glucose.

Parece existir um certo consenso de que a pectina, em condições adequadas à geleificação, sofre uma desidratação parcial e precipita-se ou fica num estado intermediário, entre a solução e a precipitação, na forma de uma rede capaz de suportar líquidos mantidas por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (MAY, 1990), como mostra a figura 9.

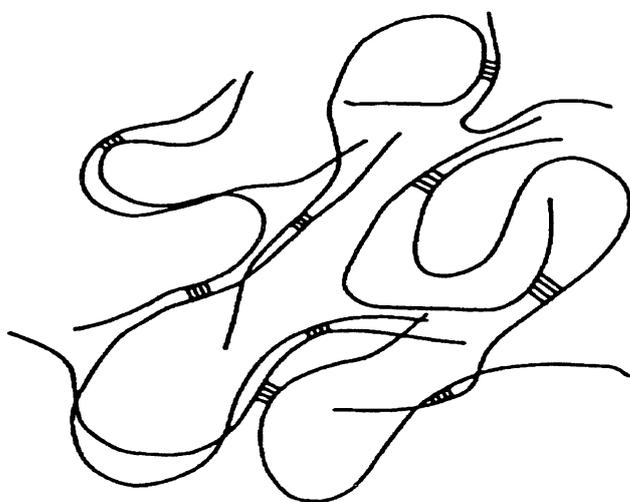


Figura 9 - Representação esquemática da rede de sustentação de um gel. As áreas interconectadas representam zonas de junções

3.5 Geleificação de pectinas de baixo teor de metoxila

Industrialmente a obtenção de pectinas com baixo teor de metoxilas tem sido realizada pela desesterificação controlada de pectinas de alto teor de metoxila extraídas de pele de citrus e bagaço de maçãs. JOSEPH *et alii* (1949) classificaram os métodos de desesterificação em quatro grupos de acordo com o agente empregado: grupo 1 (agentes ácidos), grupo 2 (agentes alcalinos), grupo 3 (agentes enzimáticos) e grupo 4 (amônia em

sistemas alcoólicos ou amônia concentrada em sistemas aquosos). Os métodos industriais mais empregados atualmente pertencem aos grupos 1 e 4. Pela desesterificação ácida obtém-se pectinas de baixo teor de metoxila com distribuição randômica de grupos carboxila metil esterificados ao longo da cadeia de pectina, enquanto pelo emprego de métodos do grupo 4 obtém-se pectinas de baixo teor de metoxila amidadas, ou seja, parte dos grupos carboxilas são amidados durante o processo (RACAPÉ *et alii*, 1989). Os métodos que empregam agentes enzimáticos na obtenção de pectinas de baixo teor de metoxila tem sido utilizados apenas em escala laboratorial.

A possibilidade de obtenção de pectinas de baixo teor de metoxila em escala comercial, como um subproduto da indústria de extração de óleos de semente de girassol, tem sido intensamente estudada desde que COLIN & LIMOYNE (1940) relataram a obtenção de substâncias pécticas de girassol. Pectinas de girassol são consideradas pectinas de baixo teor de metoxila de ocorrência natural, sendo empregado na extração das mesmas agentes sequestrantes tais como EDTA, oxalato ou hexametáfosfato (LIN *et alii*, 1975).

3.5.1 Conformação da molécula de pectina

Estudos de difração de raios-X demonstraram que a conformação geral dos polissacarídeos pécticos é determinada pelas dimensões dos ângulos ϕ e ψ das ligações glicosídicas. Esses ângulos fazem com que a cadeia polissacarídica assuma uma conformação helicoidal. Em solução, devido a interação entre solvente e o polissacarídeo, ocorre uma redistribuição dos valores dos ângulos ϕ e ψ levando o polissacarídeo assumir conformação semi-rígida. DURAND *et alii* (1990) relataram os resultados de estudos empregando técnicas de espalhamento de luz laser de baixo ângulo e neutrons com pectinas de diferentes grau de metoxilação, onde demonstraram valores de comprimento de persistência para as substâncias pécticas estudadas em torno de 20 monômeros. Com base nestes resultados, concluíram que moléculas de pectinas são muito mais flexíveis que moléculas de xantana para a qual um comprimento de 250 monômeros foi relatado (LIU &

NORISUYE, 1988) e, são mais rígidas que moléculas de amilose, que apresentam comprimento de persistência entre 3 e 8 monômeros (RING *et alii*, 1985).

3.5.2 Mecanismos e estruturas das zonas de junções

O modelo “caixa de ovos”, proposto por REES (1982), é considerado a base do mecanismo de geleificação de pectinas de baixo teor de metoxila. Segundo tal mecanismo, a associação entre cadeias se dá através do ordenamento paralelo de sequências específicas, estabelecendo-se zonas de junções entre cadeias de polissacarídeos, interligadas através de ligações iônicas e eletrostáticas dos grupos carboxila (figura 10). Os átomos de oxigênio dos grupos hidroxila, átomos de oxigênio do anel, e os átomos de oxigênio ligantes das unidades monossacarídicas participam do processo através de seus pares de elétrons livres (KOHN,1987). A estabilidade das junções dependem das interações eletrostáticas, exigindo um mínimo de sete grupos carboxila livres consecutivos no interior de cada segmento de cadeia participante da zona de junção (POWELL *et alii*, 1982). A extensão das zonas de junções são limitadas pela presença de grupos carboxilas metil esterificados.

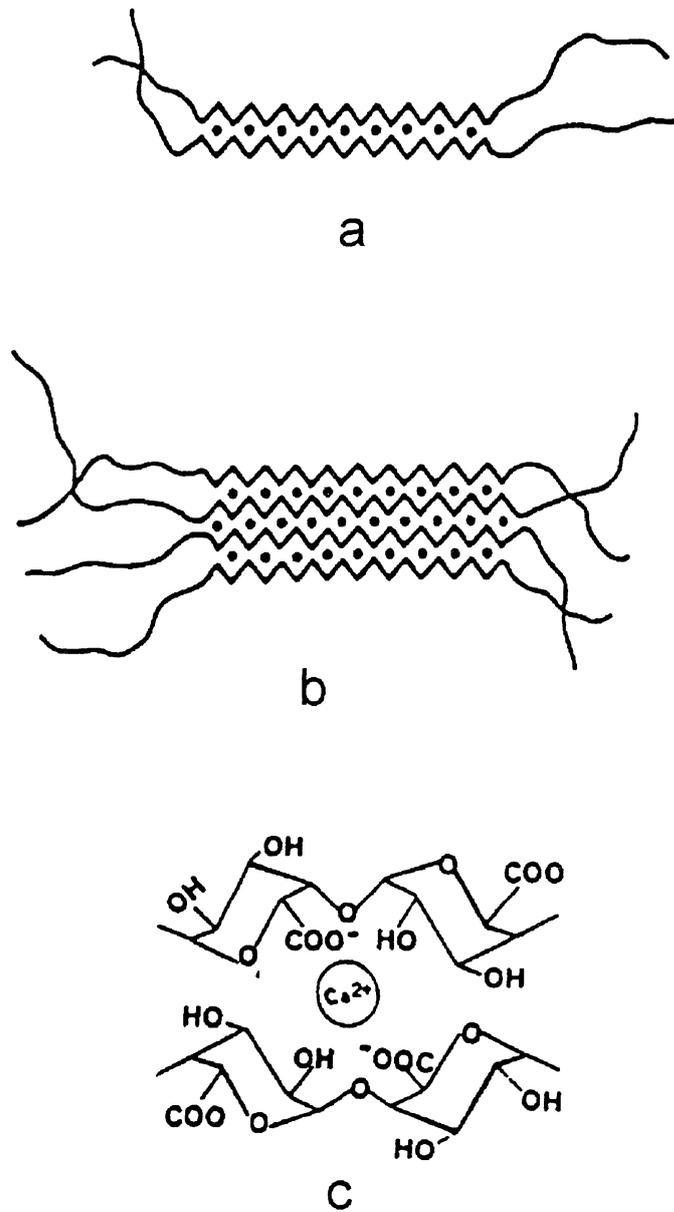


Figura 10 - Representação esquemática do cálcio ligante às sequências de ácido poligalacturônico: (a) dímero “caixa de ovos”, (b) agregação de dímeros e (c) uma cavidade da “caixa de ovos”

3.5.3 Parâmetros intrínsecos de geleificação

3.5.3.1 O efeito da massa molar

Um dos parâmetros moleculares extremamente importante na geleificação de pectinas de baixo teor de grupos metoxilas é a massa molar. Quanto maior a massa molar de uma pectina, maior o número de junções e, conseqüentemente, maior será a rigidez do gel obtido (VAN DEVENTER - SCHRINGER & PLINK 1987). Portanto, é muito importante o controle dos processos de extração no sentido de que seja evitada, tanto quanto possível, a despolimerização da cadeia polissacarídica.

3.5.3.2 O efeito da distribuição de carga

Ligações cooperativas do cálcio não são suficientemente fortes para promover a geleificação de pectinas de baixo metoxila quando mais de 40 % dos grupos carboxila estão estatisticamente esterificados. Segundo THIBAUD & RINAUDO (1985), as pectinas enzimaticamente desesterificadas são caracterizadas por um baixo coeficiente de atividade, mostrando a existência nessas moléculas de segmentos com um arranjo em blocos contendo 15 unidades de grupos carboxila. Isto corresponde a um mínimo de sete resíduos não esterificados ocorrendo ao longo de cada face do polímero.

3.5.3.3 O efeito da ramnose

A presença de ramnose na estrutura primária da molécula de pectina (figura 11) provoca dobras na cadeia, que impedem a orientação apropriada das mesmas para a formação das zonas de junções. A ramnose em pectinas cítricas e de maçãs, normalmente, estão associadas com aqueles segmentos da cadeia definidos como regiões ramificadas, ou seja, são regiões onde cadeias curtas de açúcares neutros se ligam à cadeia principal. Portanto, a molécula de pectina pode ser visualizada como sendo constituída

de dois tipos de regiões: uma linear e outra ramificada. A linear é compatível com a formação de zonas de junções, pois os monômeros estão em uma disposição que satisfazem as exigências geométricas restritivas das zonas de junções, enquanto a região ramificada, contendo ramnose e cadeias laterais não podem formar zonas de junções. Logo, o conteúdo de ramnose afeta as propriedades geleificantes das pectinas, e também, as propriedades do gel formado. O efeito do conteúdo de ramnose tem sido pouco estudado. A obtenção de pectinas de mesma massa molar e grau de esterificação, mas com diferentes conteúdos de ramnose poderia ser importante para um melhor entendimento do efeito da ramnose. A presença deste deoxi-açúcar introduz dobras na cadeia da molécula de pectina .

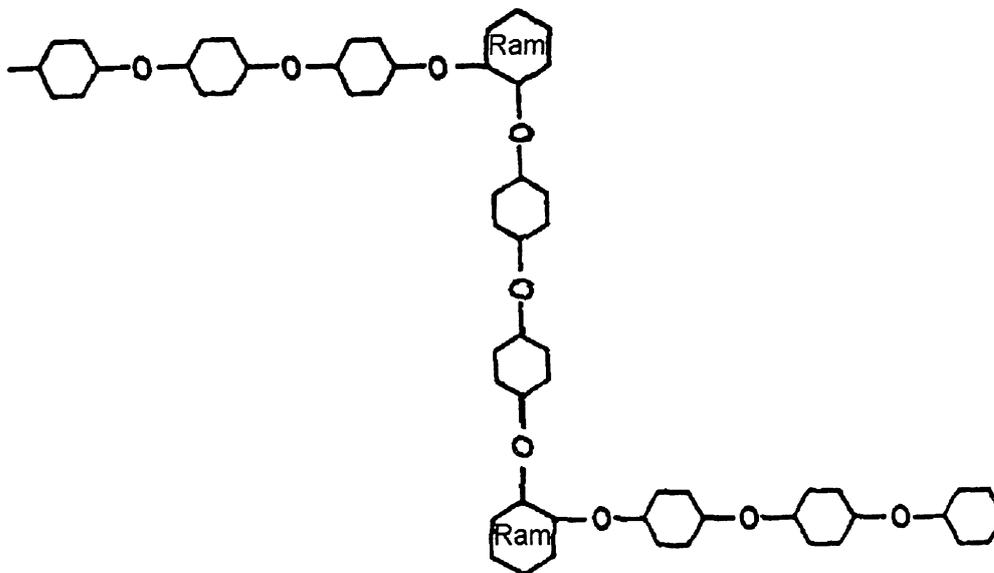


Figura 11 - Representação esquemática mostrando como inserções de ramnose (Ram) provocam dobras na cadeia do ácido poligalacturônico.

3.5.3.4 Efeito do grupo acetila

Os resíduos de ácido galacturônico acetilados apresentam dimensões que são incompatíveis com as severas restrições geométricas das associações intercadeias dentro das zonas de junções (KOHN & FURDA, 1968). Assim, os resíduos acetilados reduzem as propriedades geleificantes de

pectinas, como no caso de pectinas de beterraba, que apresentam alto teor de acetila e pobres características geleificantes. A geleificação do alginato também é reduzida pela acetilação.

3.5.3.5 Efeito de grupos amida

A amidação afeta positivamente as propriedades geleificantes de pectinas de baixo teor de grupos metoxilas, ou seja, aumenta a habilidade geleificante. Pectinas de baixo teor de grupos metoxilas amidadas apresentam a vantagem de requererem menos cálcio para geleificarem e são menos propensas à precipitação em função de altas concentrações de cálcio. Em outras palavras, são menos sensíveis à presença de cálcio. Segundo KIM *et alii* (1978) o aumento de grupos amida nas pectinas de baixo metoxila, obtidas a partir de girassol, resultou em géis mais elásticos e fortes, que aqueles obtidos com pectinas de baixo nível de amidação. RACAPÉ *et alii* (1989) sugeriram que a geleificação de pectinas amidadas não pode ser completamente explicada pelo modelo “caixa de ovos”, e que grupos amidados levam a outros tipos de associações.

3.5.4 Parâmetros extrínsecos

As características estruturais moleculares da pectina de baixo teor de grupos metoxilas, como na de alto teor de grupos metoxilas, são considerados fatores intrínsecos e governam as propriedades geleificantes; mas existem outros fatores, ditos extrínsecos, que se referem às condições nas quais é conduzido o processo de geleificação tais como: pH, temperatura, concentração de sólidos totais, força iônica, concentração de pectina e concentração de cálcio.

3.5.4.1 Efeito da concentração de pectina e cálcio

A figura 12 mostra um diagrama de fases para a pectina de baixo teor de grupos metoxilas (grau de metoxilação 28%) em pH 7. Este diagrama mostra, basicamente, a presença de três domínios: no primeiro não ocorre a geleificação e abrange aquelas regiões onde a concentração de pectina é menor que C_0 e R ($R = 2 \text{ Ca}^{2+}/\text{COO}^-$) menor que R_1 ; no segundo domínio para valores de R maiores que R_1 e dispersões de pectina acima de C_0 , no qual a mistura pode existir na forma de sol, gel ou em um estado de equilíbrio sol-gel; e um terceiro domínio para dispersões de pectina acima de C_0 e valores de R maiores que R_2 no qual o gel está sujeito à sineresis. O diagrama de fases é muito útil, pois fornece para uma dada pectina, as concentrações dos ingredientes necessários à geleificação.

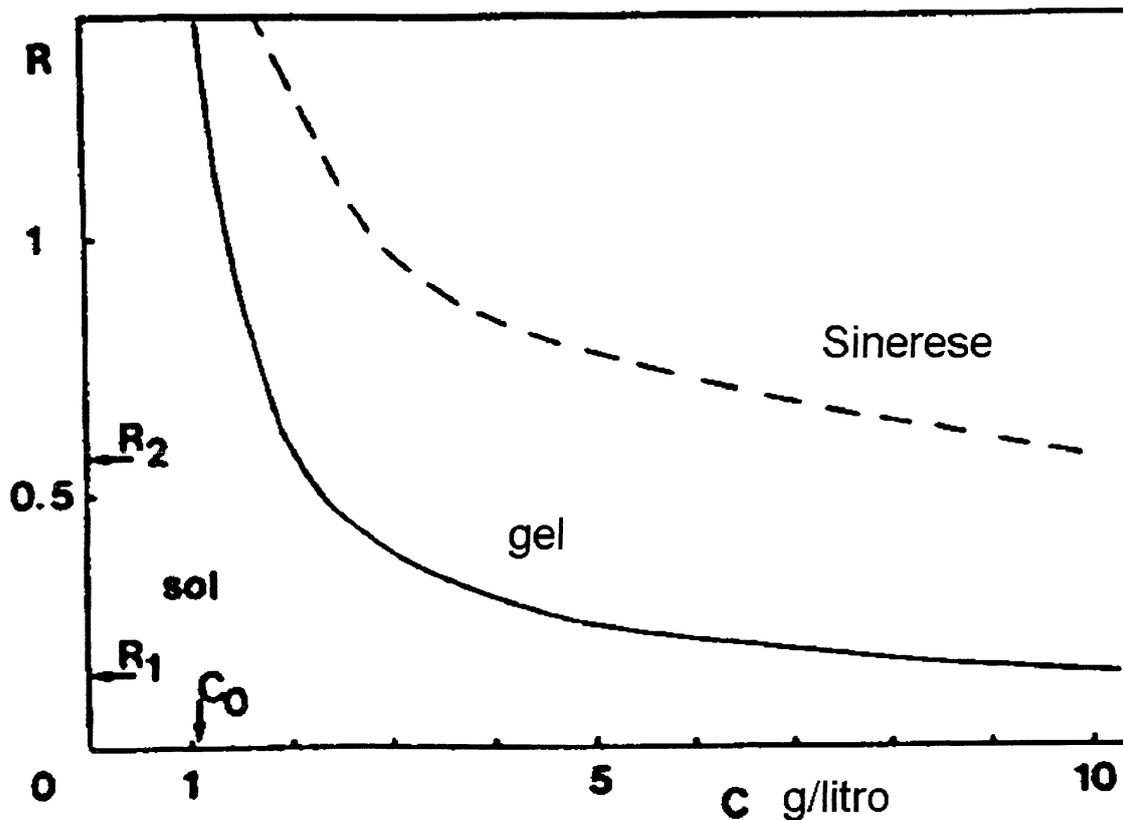


Figura 12 - Diagrama de fase de uma solução de pectina com GM 28% (sem adição de açúcar) em NaCl 0,05M, em pH 7. $R = 2 (\text{Ca}^{2+} / \text{COO}^-)$; C, concentração de pectina (g/litro).

3.5.4.2 Efeito do pH

A formação de gel com pectina de baixo teor de metoxila sem a adição de um co-soluto, como por exemplo a sacarose, é pouco sensível a mudanças de pH, porém para valores de pH abaixo de 3,5 a quantidade de cálcio necessária à geleificação é superior à quantidade requerida para pH 7, uma vez que ocorre um decréscimo no número de grupos carboxilas dissociados em função da acidez elevada. Para valores muito baixos de pH, as cargas nas zonas de junções são neutralizadas pelos íons hidrogênios, podendo levar à agregação e precipitação de pectinas.

3.5.4.3 Efeito da força iônica.

AXELOS (1990) demonstrou que, para um dado conjunto de parâmetros para uma pectina de baixo teor de metoxila em presença de NaCl, formam-se géis mais rígidos que na ausência de NaCl. Este efeito poderia ser explicado em termos de comportamento eletrolítico. Concentrações crescentes de eletrólito provocaria uma blindagem progressiva das cargas eletrostáticas localizadas ao longo da cadeia polissacarídica, de forma que ocorreria a aproximação entre cadeias e por outro lado também, é claro, uma redução do número de funções iônicas ligantes. É possível que, em função da aproximação de cadeias e de uma velocidade menor de geleificação, possa iniciar-se um número maior de pequenas zonas de junções, às quais confeririam maior estabilidade e força mecânica ao gel formado. Com o aumento da força iônica, parece ocorrer também uma redução na quantidade de cálcio necessária à geleificação.

3.5.4.4 Efeito da temperatura

O fato de géis preparados com pectinas de baixo teor de metoxila serem termoreversíveis, possibilita que os mesmos sejam preparados pela dispersão da pectina em soluções de cálcio aquosas aquecidas a 70 °C e então esfriadas lentamente. A temperatura de transição sol-gel pode ser aumentada pelo aumento do conteúdo de pectina e cálcio e redução do grau de metilação, e reduzida pelo aumento da força iônica.

3.6. Conteúdo de sólidos solúveis

A pectina de baixo teor de metoxila tem a capacidade de geleificar na ausência de açúcar. De modo geral a adição de sólidos solúveis tem o efeito de aumentar a temperatura de deposição e a força do gel enquanto reduz a sinerese (CHRISTENSEN,1986). Em pH apropriado a adição de sacarose leva a uma redução na quantidade de cálcio necessária à geleificação.

4. REOLOGIA

4.1 Alguns fundamentos de reologia

Reologia é a ciência que estuda a deformação do fluxo da matéria (do grego “rheos” = fluxo e “logos” = ciência). Segundo BARNES *et alii* (1989), a viscosidade é sinônimo de fricção interna e é uma medida da resistência do fluxo. Conforme a figura 13, a força tangencial por unidade de área necessária para produzir movimento entre moléculas é dada por F/A . Sendo simbolizada por τ e conhecida como tensão de cisalhamento (*shear stress*).

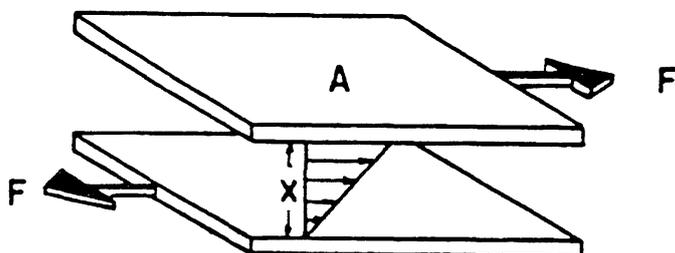


Figura 13 - Planos paralelos, com área A , separados por um líquido sob cisalhamento, nos quais é aplicada uma força tangencial F .

Sob fluxo laminar, existem gradientes de velocidade entre as camadas que fluem. O gradiente de velocidade, γ , neste regime, é dado pela razão entre a velocidade dv das várias camadas e a distância dx em relação à parede

$$\gamma = dv/dx \quad (1.1)$$

e é conhecido como velocidade de cisalhamento (*shear rate*). A viscosidade η é a constante de proporcionalidade entre τ e γ :

$$\tau = \eta\gamma \quad (1.2)$$

ou
$$\eta = \tau/\gamma \quad (1.2a)$$

4.2 Caracterização de fluxo

A caracterização reológica de um hidrocolóide natural em solução é realizada pela determinação de suas características de fluxo. Um reograma típico representando a tensão de cisalhamento (τ) em função da velocidade ou gradiente de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) permite classificar o comportamento do fluido: Newtoniano, dilatante ou pseudoplástico (figura 14). Em líquidos Newtonianos a razão entre τ e $\dot{\gamma}$ é constante, ou seja, η é constante, em qualquer velocidade de cisalhamento.

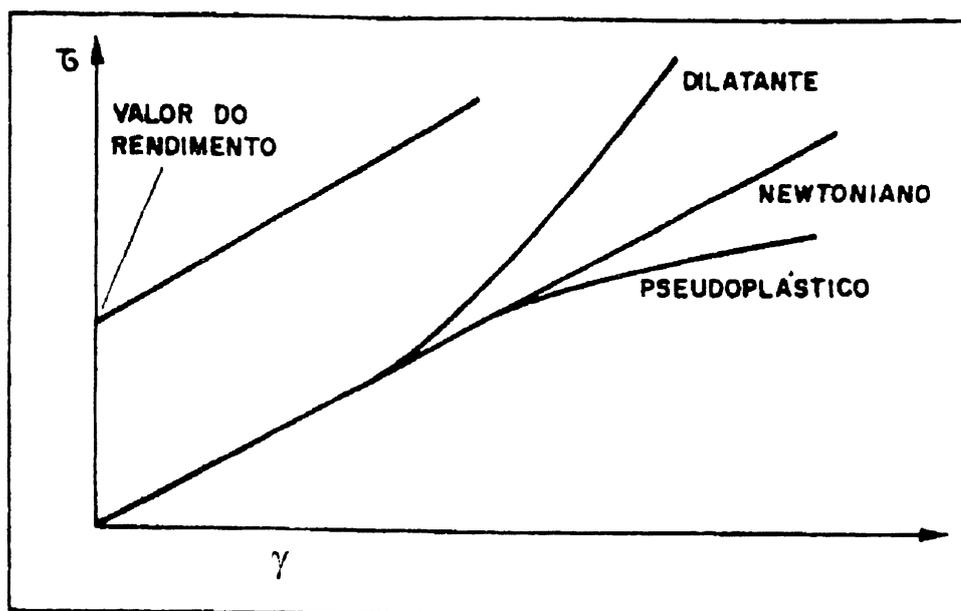


Figura 14 - Relação entre tensão de cisalhamento (τ) e velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para fluidos exibindo diferentes comportamentos de fluxo.

A maioria das macromoléculas naturais em solução exibem comportamento pseudoplástico. A figura 15 mostra uma curva de fluxo típica de um hidrocolóide com comportamento pseudoplástico. Observa-se que para valores extremos de velocidade de cisalhamento, o hidrocolóide apresenta fluxo Newtoniano, caracterizado por dois patamares que delimitam a faixa de velocidade de cisalhamento onde o mesmo exibe comportamento pseudoplástico.

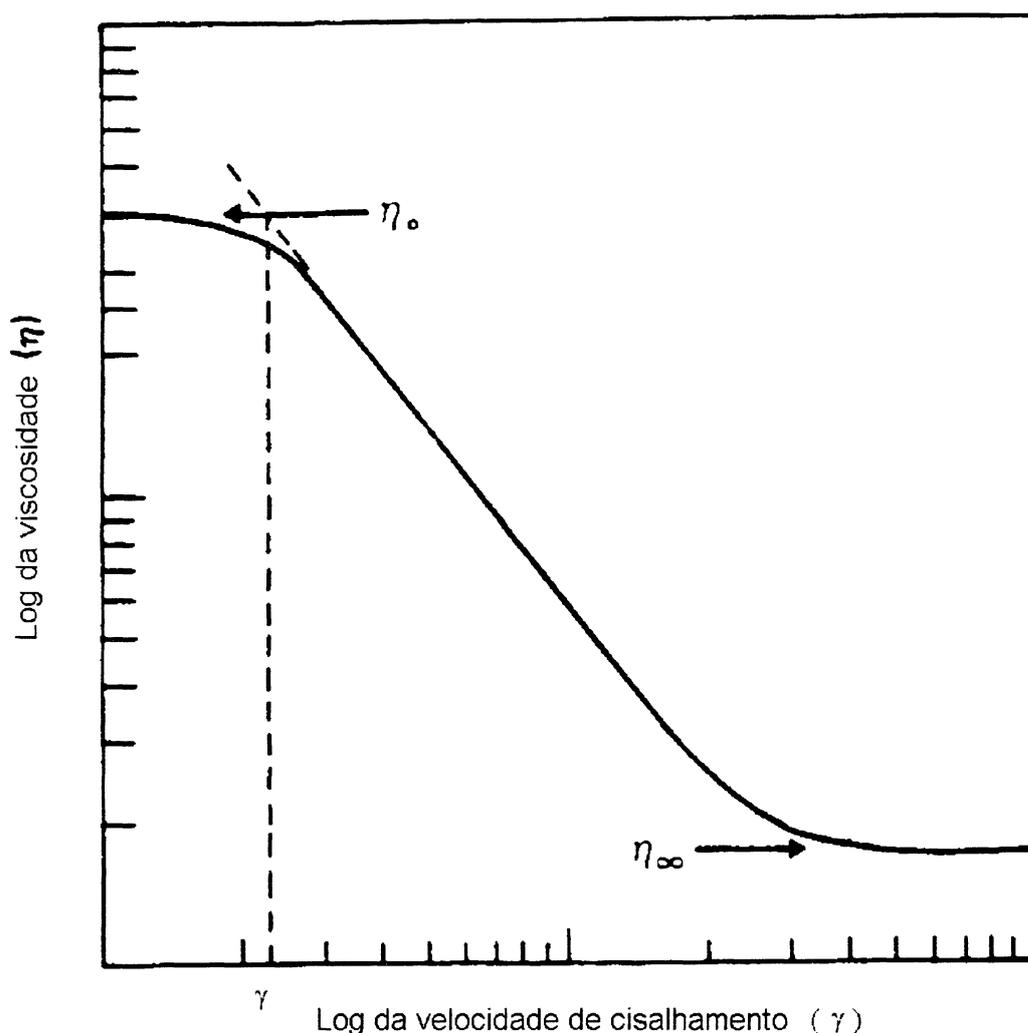


Figura 15 - Curva de fluxo típica para um fluido pseudoplástico.

A relação entre a tensão de cisalhamento, velocidade de cisalhamento e viscosidade na porção do reograma onde o hidrocolóide exibe pseudoplasticidade (*shear thinning*) pode ser descrita pelas seguintes expressões:

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (2.3)$$

$$\eta = \tau/\dot{\gamma} = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (2.4)$$

onde K é o índice de consistência e n é um número adimensional que mede o desvio do comportamento Newtoniano. Para o comportamento pseudoplástico n assume valores menores que 1. Fluidos com comportamento dilatante

exibem n maiores do que 1, e para $n=1$ a equação 3 se reduz a equação 1, ou seja, o fluido apresenta fluxo Newtoniano.

4.3 Reologia e dimensões moleculares

O estudo reológico, além de permitir a caracterização do fluxo, isto é, a relação entre velocidade de cisalhamento e tensão de cisalhamento como função de uma série de condições como concentração, pH e temperatura, que são parâmetros importantes no desenvolvimento de produtos e processos, permite através de medidas de viscosidade, em condições específicas, a obtenção de informações acerca das dimensões de macromoléculas em solução.

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é um parâmetro viscosimétrico obtido a partir de soluções diluídas e em condições de fluxo Newtoniano, que é aquela situação onde se considera que as moléculas estão isoladas uma das outras, não ocorrendo nem um tipo de interação entre as mesmas. A viscosidade intrínseca é dada pela seguinte relação:

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} [\eta_{sp}/C] \quad (3.1)$$

onde η_{sp} é a viscosidade específica e C a concentração do polímero em diluição infinita. Como se observa pela equação 3.1, a viscosidade intrínseca está relacionada com a viscosidade específica. A viscosidade específica pode ser definida como o aumento de viscosidade do solvente provocado pela dissolução do soluto, no caso o hidrocolóide, e pode ser representada pela seguinte expressão:

$$\eta_{sp} = \eta - \eta_0 / \eta_0 \quad (3.2)$$

onde η e η_0 são, respectivamente, a viscosidade do solvente puro e da solução. A viscosidade específica está diretamente relacionada com a viscosidade relativa através da seguinte expressão:

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1. \quad (3.3)$$

A razão entre viscosidade específica e a concentração na qual a mesma foi determinada, nos dá um valor conhecido como viscosidade reduzida e apresenta como unidade a relação entre as seguintes grandezas: volume/massa . Em um gráfico de viscosidade reduzida contra concentração, a viscosidade intrínseca é expressa pela viscosidade reduzida quando a concentração tende a zero ou em diluição infinita. Portanto, a viscosidade intrínseca que representa o volume hidrodinâmico da macromolécula em solução pode ser determinado através de medidas de viscosidade específica e extrapolações gráficas (ponto de encontro no eixo das abcissas).

Uma série de expressões foram desenvolvidas no sentido de linearizar a dependência da viscosidade reduzida em função da concentração, entre elas podemos citar as seguintes relações de Huggins (3.4), Kraemer (3.5), Martin (3.6) e Schulz-Blaschke (3.7).

$$\eta_{sp}/C = [\eta]_H + k_H [\eta]_H^2 C \quad (3.4)$$

$$(\ln \eta_{rel})/C = [\eta] - k_K [\eta]_K^2 C \quad (3.5)$$

$$\ln(\eta_{sp}/C) = \ln[\eta]_M + K_M [\eta]_M C \quad (3.6)$$

$$\eta_{sp}/C = [\eta]_s + K_s [\eta]_s \eta_{sp} \quad (3.7)$$

onde $[\eta]_H$, $[\eta]_K$, $[\eta]_M$ e $[\eta]_s$ são as viscosidades intrínsecas correspondentes e k_H , k_K , k_M e k_S são as constantes empíricas definidas pelas respectivas equações.

Dados experimentais demonstram que a viscosidade intrínseca, para um dado polímero em um determinado solvente, aumenta com a massa molar do polímero, se constituindo na base dos métodos viscosimétricos que avaliam a massa molar de macromoléculas. Um outro aspecto importante, é a qualidade termodinâmica do solvente, pois a viscosidade intrínseca aumenta com o poder termodinâmico do solvente. Existe uma série de relações, que permite a determinação da massa molar a partir de medidas de viscosidade intrínseca de padrões de massas molares conhecidas e considerações

empíricas a cerca da forma e geometria dos polímeros em solução. Dentre as equações propostas, podemos destacar a Mark-Kuhn-Houwink:

$$[\eta] = k_a M^a \quad (3.8)$$

onde k_a e a são parâmetros que dependem do polímero, do solvente e da temperatura e da polidispersividade das frações. Para polímeros lineares e flexíveis, a assume valores entre 0,5 e 0,8. A massa molar do polímero que se obtém através da equação de Mark-Houwink é definido pela seguinte expressão:

$$M_v = [\sum n_i M_i^{1+a} / \sum n_i M_i]^{1/a} \quad (3.9)$$

onde n_i é o número de moléculas de massa molar M_i .

5. COAGULAÇÃO - FLOCULAÇÃO COM POLIELETRÓLITOS

Um líquido que contém uma suspensão de partículas que são pequenas para decantar, quando sujeitas a força da gravidade por longos períodos de tempo, é denominado de suspensão coloidal estabilizada. O líquido pode ser água e a suspensão estabilizada constituída de pequenas partículas de argila. Neste caso o colóide é um sólido suspenso em água. Frequentemente, nos referimos a uma suspensão de argila sólida como turbidez, porque ela tende a espalhar a luz que passa através do líquido, fazendo-a parecer turva.

Águas residuais têm, frequentemente, grande número de partículas suspensas, logo apresentam turbidez. Estes colóides podem ser suspensões de sólidos, líquidos ou gases, ou combinação desses estados físicos da matéria dispersado no líquido. Exemplos de alguns materiais suspensos em águas residuais incluem metais, silicatos, fibras orgânicas, pigmentos e cinzas.

Para os colóides hidrofílicos, sua estabilidade resulta de interações químicas entre grupos hidroxila adsorvidos sobre a partícula e moléculas de água. Estes colóides são termodinamicamente estáveis, sendo que de 10^5 a 10^{18} partículas por cm^3 podem existir em uma suspensão verdadeira. Macromoléculas orgânicas tais como amidos, gomas, resinas, proteínas e polieletrólitos são exemplos de colóides hidrofílicos.

Existem colóides que não interagem quimicamente com a água e não são termodinamicamente estáveis. Entretanto, podem permanecer em suspensão devido às interações eletrostáticas entre a superfície da partícula e a água. Estes são chamados de hidrofóbicos ou suspensóides. São usualmente elementos inorgânicos. A estabilidade desses colóides pode ser influenciada pela força iônica e, também, pela própria concentração de partículas coloidais.

Em águas naturais e sistemas de água residuais é incomum encontrar um único tipo de suspensão coloidal. Normalmente, as suspensões

são constituídas por colóides com ambas características: hidrofóbicas e hidrofílicas. Argilas são silicatos de metais finamente divididos que adsorvem íons hidroxila e tornam-se, em parte, hidrofílicos. Hidróxidos de metais ou óxidos de metais podem adsorver moléculas orgânicas e tornarem-se parcialmente hidrofílicos. Não é surpreendente, portanto, que muitas das suspensões coloidais, comumente encontradas, tem a sua estabilidade dependente do pH do meio. Isto é óbvio, considerando-se que o pH influencia a força iônica e a concentração de grupos hidroxila do meio suspendente.

As suspensões mais estáveis, normalmente encontradas em águas naturais e residuais, ocorrem com partículas de diâmetro menores que $1/100 \mu\text{m}$ até cerca de $1 \mu\text{m}$.

A aplicação de coagulante tem como objetivo reduzir ou interferir com as interações superficiais, químicas ou eletrostáticas, existentes entre as partículas suspensas. A desestabilização da carga superficial da partícula é, frequentemente, necessária antes da efetiva coagulação ocorrer. Uma vez desestabilizada, há uma maior probabilidade das partículas individuais colidirem através do trabalho hidráulico. Em função das colisões, as partículas são capturadas em grupos progressivamente maiores, e a menos que sejam abalroadas por um rápido movimento ao acaso do meio, a maioria tende a responder à força da gravidade.

Certos polieltrólitos neutralizam a carga superficial eletrostática da partícula coloidal, levando-as a coagularem mais facilmente. Outros tipos adsorvem partículas coloidais, ligando-as em grupos maiores que decantam mais rapidamente. A seleção do tipo a usar depende das características das suspensões das águas naturais e residuais, dos sistemas hidráulicos e do uso final das fases sólidas e líquidas separadas.

5.1 Uso de polieletrólito como agente coagulante

Antes da aplicação de um determinado polieletrólito (exemplo goma de cactácea) a uma coagulação específica, é quase sempre necessário testá-lo antes. Há centenas de diferentes tipos de polieletrólitos disponíveis, sob vários nomes comerciais, que são utilizados para aplicações no tratamento de água para uso doméstico e água residuais.

Os diferentes tipos de polieletrólitos podem ser classificados sob relativamente poucos grupos gerais. Entretanto, dentro de cada grupo, as diferenças que existem podem mostrar efeitos peculiares sobre a coagulação e remoção de uma suspensão particular da água.

Testes laboratoriais não são importantes somente quando o polieletrólito será utilizado como coagulante primário. Mesmo quando utilizados como auxiliares de floculação juntos com coagulantes inorgânicos, tais como sais de alumínio ou sais férricos, é importante determinar como se comportarão. Se um polieletrólito não testado é adicionado a um processo de coagulação-sedimentação, sem conhecimento de sua dosagem requerida e tempo próprio de injeção, ele pode criar muitos problemas que tornam necessário lavagem de tanques, filtros e outras superfícies com os quais os sólidos ou líquidos clarificados tenham entrado em contato. Por outro lado, uma dosagem corretamente aplicada de um polieletrólito efetivo, pode aumentar significativamente a clareza de um efluente líquido, enquanto reduz o volume de lodo sem criar problemas de manutenção no equipamento.

Os polieletrólitos têm sido utilizados de maneira cada vez mais intensiva no tratamento de águas para abastecimento, tanto como auxiliares de floculação e/ou filtração, como também na forma de coagulantes primários. Seu uso, no Brasil, ainda tem sido restrito ao primeiro caso, pois, pelo menos aparentemente, as dosagens necessárias para seu emprego como coagulante primário, tornam seu uso desvantajoso, quando considerado o aspecto econômico.

Entre as principais vantagens diretas e indiretas da utilização de polieletrólitos como auxiliares de floculação em uma estação de tratamento convencional de água, podem ser citadas:

- melhoria da qualidade da água decantada e da filtrada;
- redução no consumo de coagulante primário;
- redução no volume de lodo sedimentado no decantador. Esse fato atenua os problemas de poluição dos corpos receptores pelas descargas desse material, e permite a dilatação do período entre as limpezas dessa unidade;
- aumento na remoção de germes presentes na água bruta;
- aumento da eficiência da desinfecção, como consequência da redução da concentração de sólidos suspensos na água filtrada;
- diminuição da ocorrência de deposição de lodo na rede e nos reservatórios do sistema de distribuição;
- redução dos problemas advindos da sobrecarga de decantadores e filtros. A utilização de polieletrólitos permite, geralmente, a adoção de taxas de escoamento superficial maiores que aquelas permitidas quando do uso de apenas sulfato de alumínio e cal;
- uso como solução de emergência, quando alguma unidade de decantação, floculação ou filtração tiver que ser retirada de operação, e as outras unidades tiverem que funcionar sobrecarregadas;
- redução nos gastos totais com produtos químicos.

5.1.1 Modo de aplicação

O modo de aplicação de polieletrólitos para operações de decantação pode ser totalmente diferente, dependendo de como eles funcionam como agentes decantadores de partículas. A função específica de cada polieletrólito varia de acordo com sua massa molar, cargas

predominantes e características químicas da molécula eletrólito, quando dispersa em solução. Além do entendimento da função de um polieletrólito em termos de suas características, é importante conhecer quais problemas ou efeitos colaterais essas características podem causar. Além do que, a função de um dado polieletrólito em uma sedimentação particular pode ser diferente quando utilizado sozinho, ou em combinação com coagulantes inorgânicos.

5.1.2 Características de Polieletrólitos no uso como agente de floculação

Polieletrólitos são tipicamente classificados de acordo com um número de diferentes características que possuem, mas em muitos casos, nem todas essas propriedades são incluídas nas descrições do fabricante. Normalmente, são classificados de acordo com o sinal de carga do seu grupo iônico, isto é: catiônico, aniônico ou não iônico. Outros aspectos característicos são incluídos: massa molar, estrutura molecular e fonte do material do qual são obtidos. Na seleção de polieletrólitos para aplicações particulares, é extremamente útil, se não absolutamente necessário, conhecer as cargas, uma medida relativa da massa molar, isto é, alta, média, ou baixa e alguma noção da estrutura molecular. Um outro tipo de classificação de polieletrólito usada é a designação de sua toxicidade para organismos vivos e a aceitabilidade para consumo humano. Em outras palavras, se o material pode ser usado no tratamento de água potável ou em produtos que possam entrar em contatos com alimentos tais como papel de embrulho ou frascos (SCHLAUCH, 1981).

Os fabricantes, normalmente, dão uma descrição da carga e da força relativa da carga (isto é, alto, médio e baixo), massa molar relativa, fonte e designam a sua aceitabilidade para água potável. Muitos também indicam a estrutura molecular básica e isto pode ser muito útil para o usuário que irá escolher ou avaliar uma lista de produtos disponíveis. E mais, muitos fabricantes fazem esforço para fornecer uma lista geral de aplicações para as quais seus polímeros específicos são recomendados, com uma razão típica de dosagens que são recomendadas. A tabela 3 dá um resumo da classificação de polieletrólitos com exemplos químicos típicos.

Como já mencionado as principais funções dos polieletrólitos são (1) reduzir ou neutralizar o potencial eletrostático superficial que é a mesma do coagulante primário e (2) ajudar a manter juntas pequenas partículas para formar agregados maiores. Em algumas operações de clarificação de água, a função do polieletrólito pode ser primariamente a de desestabilização, para promover coagulação do material coloidal em água natural ou águas residuais. Entretanto, em muitas operações de clarificação de águas residuais a função primária é essencialmente ligante de partículas.

Com o objetivo de obter a coagulação, pequenas partículas suspensas precisam ser colocadas em contato para que forças atrativas de natureza química (isto é, adsorção) possa ligar uma partícula a outra, embora forças mutuamente repulsivas entre partículas evitem os contatos efetivos entre partículas. As forças estabilizantes podem originar-se de cargas eletrostáticas superficiais ou interações químicas entre a superfície sólida e o meio líquido.

Tabela 3 - Polieletrólitos típicos utilizados em processos de clarificação.

Nome	Estrutura	Tipo de carga	Massa molar	Fabricante
Magnifloc 835 A	Poliacrilamida	Aniônico densidade alta de carga	15×10^6	American Cyanamid Co.
Magnifloc 820 A	Poliacrilamida	Aniônico densidade de carga intermediária	6×10^6	American Cyanamid Co.
Magnifloc 837 A	Poliacrilamida	Aniônico densidade baixa de carga	16×10^6	American Cyanamid Co.
Purifloc A -21	Ácido poliestireno sulfônico	Aniônico densidade muito alta de carga		Dow Chemical Co.
Wisprofloc	Amido de batata modificado	Aniônico		Gamlen Chemical Co.
Magnifloc 905 N	Poliacrilamida (poucos grupos carboxilas)	Não- aniônico	15×10^6	America Cianamid Co.
Purifloc N-17	Poliacrilamida	Não-aniônico	10×10^6	Midland
Betz 1260	Copolimero de Poliacrilamida	Catiônico	10×10^6	Betz Laboratories
Catifloc T	Poliamina quaternária	Catiônico	$0,5 \times 10^6$	Calgon corp.

Há indicação que as cargas superficiais eletrostáticas podem estabelecer uma atmosfera iônica difusa, de forma esférica, em torno da

partícula que a torna estabilizada. Essa camada externa difusa é produzida por uma migração de íons de carga oposta, para a superfície da partícula. As superfícies das partículas são, normalmente, negativas e os contra-íons são, normalmente, cátions. Uma vez que os contra-íons na vizinhança das partículas tenham migrado para a superfície sólida, a carga superficial inicial é parcialmente neutralizada. Entretanto, os contra-íons, agora mantidos juntos em torno da superfície da partícula, previnem os contra-íons remanecentes, no restante da solução, de difundirem-se no interior das zonas que eles deixaram vaga através de repulsões eletrostáticas mútuas. Os íons de mesmo sinal da superfície da partícula, entretanto, permanecem na zona difusa (isto é camada difusa) e são mantidas em uma posição relativamente estável pela atração da camada dos contra-íons, dando a camada difusa uma certa carga líquida negativa. A camada difusa esférica de um líquido é mantida em associação com a partícula através da atração dos ânions da camada difusa pelo aglomerado de cátions em torno da partícula. O efeito dessa camada líquida difusa é evitar colisões entre as partículas e evitar contato de superfícies sólidas em função das camadas defletirem de modo elástico uma partícula a caminho da outra. A teoria da dupla camada elétrica está de acordo com a teoria de Debye-Huckel aceita para eletrólitos simples.

Por outro lado, a manutenção de colóides de natureza hidrofílica são estabilizados por interações entre grupos hidroxil da água e os grupos hidroxil existentes sobre a partícula. Antes de serem sensíveis a íons de carga específica, esses colóides são sensíveis às propriedades hidratantes do meio tais como pH e temperatura.

Dispersões sólidas encontradas em águas naturais e águas residuais possuem propriedades combinadas de potencial de superfície eletrostática, como exibida pelos colóides hidrofóbicos, e força interativa química de colóides hidrofílicos. Este fato tem sido, provavelmente, responsável pelos diferentes e conflitantes resultados obtidos. Em águas residuais, bem como em água do mar, dispersões coloidais estáveis do tipo

hidrofóbico não são esperadas. Isto é devido ao efeito desestabilizante de altas concentrações iônicas que podem ocorrer nas águas de esgoto.

Em muitos casos onde existem colóides hidrofóbicos com dupla camada difusa, os polieletrólitos, possuindo forte caráter iônico, com carga oposta à carga da superfície eletrostática do colóide, são efetivos na coagulação. Polímeros desse tipo, quando dispersados em solução, são eles mesmos moléculas coloidais carregadas. Interações químicas atrativas entre sítios sobre o polímero e a superfície da partícula podem ser responsáveis pela habilidade desses polímeros em entrar na camada difusa. Com seus grupos de carga de mesmo sinal do contra-íon, eles então neutralizam o efeito estabilizante da carga superficial eletrostática. Nestas situações, o polieletrólito está agindo como coagulante primário. As cargas da superfície repulsiva são neutralizadas, assim partículas podem aproximar-se uma das outras para ocorrência de contatos e então, forças predominantemente atrativas, podem manter as partículas juntas. As cargas eletrostáticas superficiais estabilizantes são levadas a serem mais fracas, eliminando-se assim forças mutuamente repulsivas de longa distância. Logo, assim que as distâncias entre as partículas se tornam menores, a coagulação é favorecida sobre a estabilização. Tradicionalmente, altas concentrações de cátions tais como sais de alumínio e sais férricos têm sido utilizados para colapsarem a dupla camada elétrica por difusão, neutralizando a carga superficial do colóide. Uma vez que um polieletrólito pode ter uma atração específica por uma superfície coloidal, a concentração do polímero requerida é usualmente menor do que a do coagulante inorgânico sozinho. Normalmente, 10 a 100 vezes mais coagulantes inorgânicos são necessários para promover o mesmo efeito que polieletrólitos orgânicos.

Frequentemente, polieletrólitos são utilizados em operações de decantação como partículas ligantes. Os melhores polieletrólitos encontrados para essas aplicações são definidos como de alta massa molar e alta densidade de carga. Esses polieletrólitos podem ser ineficazes em baixas concentrações para iniciação da coagulação de colóides hidrofóbicos

altamente carregados. Entretanto, quando partículas suspensas são colóides hidrofílicos ou são grandes massas parcialmente coaguladas, tais polímeros adsorvem ou agarram a partícula em certas porções de sua molécula, enquanto outras porções da mesma molécula adsorvem uma ou mais partículas. Moléculas de polímeros continuam a adsorverem sobre essas e outras partículas, até que centenas ou milhares são mantidas juntas em grandes massas chamadas flocos, que decantam rapidamente quando a turbulência do líquido é minimizada.

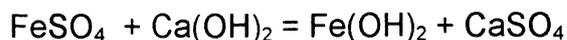
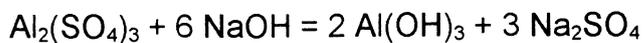
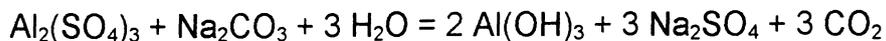
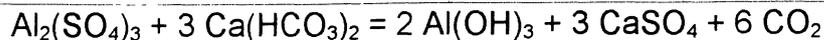
Há muitos tipos de polieletrólitos disponíveis que incorporam ambos parâmetros favoráveis: alta massa molar (entre 1 e cerca de 15 milhões) com alta densidade de carga de um sinal ou outro. Esses produtos são utilizados em tratamento de águas residuais, uma vez que muitas dessas suspensões (tais como óxidos de metais e peróxidos) comportam-se como tendo ambas características hidrofóbicas e hidrofílicas.

5.3 Coagulantes Primários

Coagulantes inorgânicos são normalmente adicionados à água e águas residuais sob a forma de sais solúveis (cátions di ou tri valentes de alumínio ou ferro). Estes cátions oligovalentes reagem com hidroxila ou outras espécies iônicas alcalinas. Muitos desses produtos de reação são só levemente solúveis em água sob condições neutras de pH. Os hidróxidos desses metais são quase insolúveis em pH neutros e precipitam rapidamente sob condições de adição de metais solúveis (isto é coagulantes) à água. Algumas dessas reações que ocorrem após a adição desses coagulantes a águas naturais e águas de esgotos são mostradas na tabela 4.

Tabela 4 - Reações de coagulação em meio alcalino

REAÇÕES DE COAGULAÇÃO



Embora a tabela 4 mostre sólidos precipitados de hidróxido de alumínio (isto é $\text{Al}(\text{OH})_3$) e hidróxido férrico (isto é $\text{Fe}(\text{OH})_3$) como produto final das reações, muitas espécies intermediárias ocorrem durante a formação de precipitados de hidróxidos de metais sólidos ou íons metálicos trivalentes dissolvidos. Essas espécies intermediárias incluem várias proporções de íons metálicos parcialmente hidratados $\text{M}(\text{OH})_2^{2+}$ e $\text{M}(\text{OH})_2^{1+}$ bem como $\text{M}(\text{OH})_4^{-1}$. Além dessas espécies, os hidratos intermediários podem polimerizar-se em cadeias ou hidratos de metal, que carregam cargas parciais ao longo da cadeia.

Os íons de metais trivalentes, com sua alta densidade de carga, atuam como coagulantes primários pela neutralização das cargas superficiais eletrostáticas do colóide. Entretanto, desde que sua existência é muito curta sob condições de pH neutro, altas concentrações de coagulantes inorgânicos seriam necessários e, a adição deveria ser realizada lentamente para que os íons inorgânicos pudessem realizar o trabalho completo de desestabilização de colóides. Entretanto, devido a existência de espécies metálicas hidratadas intermediárias de curta e longa duração em altas

concentrações, ocorre a estabilização de colóides eletrostaticamente carregados. Também, as espécies de metais hidratados poliméricos podem ligar ou estabelecer pontes entre os colóides desestabilizados sob a forma de microflocos (isto é, aglomerados iniciais de partículas sólidas que estão abaixo do tamanho visível), de forma que as espécies poliméricas continuem a crescer encapsulando os sólidos coloidais com os quais entram em contato. Este é um processo de clarificação convencional para a sedimentação de sólidos suspensos.

A extensão, bem como a velocidade de coagulação de suspensões coloidais, sejam hidrofílicas ou hidrofóbicas, depende grandemente das concentrações relativas dos íons metálicos e de seus produtos de reações intermediários. Assim, a concentração existente de íons hidroxila no sistema, durante reações de coagulação, é o fator governante da velocidade de formação de hidróxidos metálicos e seus intermediários hidratados. O pH ótimo é a chave para a efetiva coagulação com esses íons inorgânicos.

A importância do pH só não é maior quando uma abundância de hidroxianion ou íons hidroxila irão, eles mesmos, desestabilizarem a carga superficial do colóide. Um efeito semelhante é experimentado em alguns sistemas onde, meramente pela adição de ácido à suspensão de sólidos, a coagulação é iniciada sem a adição de polieletrólitos ou de íons metálicos. Quando sais inorgânicos metálicos (tais como sais de alumínio ou férrico) são adicionados à água, o sinal iônico, a densidade de carga e a concentração de espécies metálicas que se formam, são determinadas pelo pH.

Concentrações de hidróxidos metálicos que precipitam, e espécies intermediárias solúveis que se formam, após a adição de sais metálicos na água, são dependentes do pH. A solubilidade mínima de cada sal metálico está associada com um valor específico de pH, que pode variar de um sistema aquoso para outro. Entretanto, na maioria dos sistemas aquosos, a solubilidade mínima do hidróxido de alumínio é usualmente em de pH 6,0 e para hidróxidos férrico é usualmente em pH 8,0

Curvas de solubilidade são dadas por O'MELIA (1979) que mostram que a solubilidade do hidróxido de alumínio, $\text{Al}(\text{OH})_3$, e hidróxido férrico, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, aumenta significativamente abaixo ou acima do pH de sua solubilidade mínima. A solubilidade do hidróxido de alumínio aumenta extremamente rápido abaixo de pH 6,0. Por exemplo, para pH 4,0, a concentração do íon alumínio solúvel está entre 25.000 e 30.000 mg/l como Al^{+3} . Uma menor razão de aumento ocorre acima de pH 6,0 para o hidróxido de alumínio, uma vez que em pH 10 o alumínio solúvel é cerca de 30 mg/l como Al^{+3} . A solubilidade mínima do hidróxido de alumínio em pH 6,0, é cerca de $3 \cdot 10^{-3}$ mg/l. A solubilidade do hidróxido férrico é muitas ordens de magnitude menos solúvel que o hidróxido de alumínio, sobre uma vasta razão de pH. Em ambos os valores de pH, 4 e 12, a concentração de íons férricos em solução é somente cerca de $6 \cdot 10^{-3}$ mg/l de íons férrico. A solubilidade mínima do íon férrico, em pH 8, é somente cerca de $1 \cdot 10^{-6}$ mg/l de Fe^{+3} .

Para produzir um rápido crescimento das partículas de floco e completa coagulação de colóides, é muito importante ter a maioria do metal coagulante adicionado, precipitado como floco de hidróxido metálico no final do processo de coagulação. Assim, durante o processo de precipitação, as partículas coloidais tornam-se desestabilizadas por íons metálicos e pelas espécies de metais hidratados intermediários. Enquanto, as partículas hidróxidos metálicos precipitantes (flocos) fornece extensa área superficial para enriquecimento da desestabilização e adsorção de colóides.

A maioria dos processos de coagulação com sais metálicos ocorrem dessa maneira, combinando neutralização da carga física com adsorção química para remoção altamente eficiente de suspensões.

Com o sal de alumínio, altas concentrações de coagulantes têm de ser adicionado quando o pH está abaixo de 5,5 e acima de 9,0. Tornando, portanto, impraticável seu uso fora desta faixa de pH. Os sais férricos produzem precipitados de hidróxidos férricos muito insolúveis e são importantes, do ponto de vista econômico, bem como pelo fato de deixarem um baixo nível de ferro em solução, dentro da faixa de pH 4,2 a 12, quando o processo de coagulação é completo.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo o estudo e aplicações de biopolímeros obtidos a partir da fitobiomassa de *Cereus peruvianus*, cumprindo as seguintes etapas:

- Otimização do método de extração de glicobiopolímeros a partir de parênquima de cladódios do cacto.
- Isolamento e análise estrutural da fração polissacarídica do extrato bruto.
- Determinação de parâmetros físico-químicos do polissacarídeo, entre os quais distribuição de massa molar.
- Avaliar a capacidade do extrato bruto de atuar como auxiliar de floculação, tanto em processos de clarificação de água para uso doméstico, como para a clarificação do chá de *Stévia rebaudiana* (extrato aquoso inicial das folhas da planta fonte de adoçante natural).
- Otimização do método de extração de substâncias pécnicas a partir da cutícula de cladódios do *Cereus peruvianus*.
- Análise estrutural da substância pécnica.
- Determinação da distribuição de massa molar da substância pécnica através de cromatografia de exclusão estérica.
- Avaliar capacidade de geleificação das substâncias pécnicas isoladas

MATERIAL E MÉTODOS

1. Fonte do cacto

O cacto objeto deste trabalho, foi cultivado a partir de sementes e mudas na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá. A planta foi identificada como *Cereus peruvianus* (RODRIGUEZ, 1984). Os canteiros experimentais foram estabelecidos com uma planta por metro quadrado seguindo a recomendação de PESSOA (1969).



Canteiro experimental do cacto colunar *Cereus peruvianus* com um ano de idade a partir de sementes.

2. Purificação e extração de polieletrólitos (gomas das partes moles)

Os polissacarídeos foram designados de poli a (poli aletas), poli c(poli cerne) e poli T (parênquima total) dependendo do tipo de parênquima processado.

2.1 Extração por maceração

Parcelas de 200 g de parênquimas de cactáceas recém-colhidas, cortadas em pedaços pequenos (cubos com aproximadamente 1 cm^3), foram macerados em recipientes de vidro utilizando água destilada durante 10 horas à temperatura ambiente, com agitação ocasional e com as seguintes relações massa/solvente 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:10 e 1:20. Separou-se o tecido das cactáceas da solução por filtração em funil de vidro sinterizado. Alíquotas dos filtrados foram separadas, concentradas em rota-vaporizador e tratadas com etanol 3:1. Os precipitados tiveram a sua massa seca determinadas gravimetricamente, após completa remoção do solvente em estufa.

2.2. Extração por prensagem manual

Parênquimas (descorticados e isentos do cilindro central) foram separados e cortados em pequenos cubos, misturados com água na proporção de 1:1 (massa/volume) e filtrados através de um filtro de tecido na forma de coador. O coador foi prensado manualmente, e após a primeira filtração, o resíduo foi redissolvido em água na mesma proporção 1:1 e refiltrado nas mesmas condições (mais 5 vezes). Os filtrados foram reunidos e tratados com álcool na proporção de 1:3.

2.3 Extração por prensagem mecânica

Os parênquimas, separados manualmente com o auxílio de uma faca, foram processados da seguinte forma: trituração em um moinho de facas e martelos, sem a peneira de retenção, de modo que o material ficou cortado em tiras esmagadas. O material, assim triturado, foi em seguida diluído em água numa proporção 1:1, à temperatura ambiente num tanque de inox dotado com dispositivo de agitação. Após a agitação obtem-se uma mistura (sólido líquido) altamente viscosa, a qual foi submetida a prensagem mecânica em prensa helicoidal para a separação sólido líquido.

A fração líquida viscosa foi submetida a centrifugação, em centrífuga do tipo rotor tubular de fluxo contínuo para eliminação de partículas suspensas. O centrifugado, um líquido viscoso e esverdeado, foi tratado com álcool na proporção de 1:3 e o precipitado separado por filtração, lavado com acetona e sêco em estufa a 40 °C e em seguida, pulverizado e armazenado em dessecadores.

3. Purificação dos polissacarídeos obtidos por maceração, prensagem mecânica e prensagem manual.

3.1 Obtenção dos polissacarídeos na forma ácida.

Preparou-se uma solução de polieletrólito cru a 0,5% de forma a obter-se uma solução opalescente e dializou-se durante 48 horas contra água destilada. Após a diálise a solução foi tratada com Amberlite IR 120 (H⁺) para descationização. Após a filtração, adicionou-se à solução, lentamente e com agitação constante, etanol até completar a proporção de 3 partes de álcool para uma parte de solução. Decantou-se durante 24 horas, removeu-se o sobrenadante por sifonação e filtrou-se a vácuo em funil de vidro sinterizado. Secou-se o resíduo em estufa a 40 °C. Procedeu-se então a análise da homogeneidade do polissacarídeo.

4. Filtração em coluna cromatográfica

O polieletrólito foi fracionado por troca iônica em coluna de DEAE-celulose forma cloreto, utilizando os seguintes solventes: água, cloreto de lítio 1M, ácido clorídrico 1 M e hidróxido de sódio 0,5 M. As frações tiveram o teor de proteínas e ácidos urônicos determinados. Foram hidrolisadas, derivatizadas e a composição monomérica determinada em cromatografia gasosa.

5. Composição monomérica

5.1 Hidrólise com H₂SO₄ (ácido sulfúrico)

Amostras individuais de 20 mg de polissacarídeo foram misturadas com 5 ml de H₂SO₄ 2N e colocadas em tubos selados (ampolas). Incubou-se a 100°C por 1, 2, e 8 horas. Os hidrolisados foram diluídos em água destilada e o excesso de ácido sulfúrico foi neutralizado com carbonato de bário até pH 5,0. O sulfato de bário formado foi separado por centrifugação. O sobrenadante foi tratado com resina trocadora de íons Dowex 50W-X8, na forma H⁺ (200-400 mesh). Os filtrados foram concentrados até *secura* sob vácuo a 35-40°C e redissolvido em 5 ml de água. A curva de hidrólise foi determinada dosando-se o aparecimento de açúcar redutor pelo método de SOMOGYI (1945) e NELSON (1944) em relação ao conteúdo de carboidrato total (DUBOIS *et alii*, 1956).

5.2 Hidrólise com TFA (ácido trifluoroacético)

Cada amostra de 20 mg de polissacarídeo foi suspensa em 6 ml de TFA 2 M e aquecido em ampola selada, a 120 °C pelo período de 12 horas. Após a reação, o hidrolisado foi diluído com 50 ml de água destilada e evaporado sob vácuo até *secura*. Como o ácido trifluoroacético é bastante volátil o mesmo foi eliminado na coevaporação com água, ficando o hidrolisado livre de ácido residual. Ressuspendeu-se o resíduo em 5 ml de água.

5.3 Hidrólise com H₂SO₄ concentrado (Hidrólise de Saeman).

Cada amostra de 20 mg de polissacarídeo foi umedecida com ácido sulfúrico 72% (m/m) em água gelada (1,7g) e mantida a 20 °C (temperatura ambiente) por 3 horas. Cada pasta, assim formada, foi diluída com água destilada (11,6 ml) para dar uma solução 2N de H₂SO₄ que foi então aquecida em ampola a 100 °C por 1,2,5 e 8 horas.

5.4 Hidrólise enzimática

As hidrólises enzimáticas foram realizadas com suco gástrico do caramujo *Megalobulimus paranaguensis* ou pectinase de *Aspergillus niger* (Novo Industri) por 12 horas a 40 °C, na base de 100 µl de concentrado enzimático/20 mg de polissacarídeo, acrescentando-se tampão acetato de sódio 20 mM como diluente (5 ml).

5.5 Análise dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (clae)

A análise de açúcares neutros foi realizada utilizando-se um cromatógrafo líquido modelo CG 480 C tendo como detector um refratômetro diferencial modelo Waters 410; a coluna foi do tipo µBondapakc NH2 10 µm (300x3,9mm) tendo como eluente o sistema isocrático acetonitrila:água na proporção (85:15).

5.6 Cromatografia em camada delgada

Hidrolisados ácidos e enzimáticos da goma de *Cereus peruvianus* foram cromatografados em placas de sílica gel 60 da Merck, tendo como sistema de solvente isopropanol:nitrometano:acetato de etila: ácido acético:água (10:4:2:4:0,5) e a revelação foi realizada pela reação com orcinol 0,5% em ácido sulfúrico:metanol (5:95) à 100 °C por 5 minutos. O registro fotográfico do cromatograma foi feito com uma camera Canon T-70 e película a cores.

5.7 Análise por cromatografia gasosa acoplada com espectrômetria de massas (CG-EM)

5.7.1 Derivatização I (alditóis acetatos)

Os hidrolisados foram tratados com borohidreto de sódio de forma que para cada mg de hidrolisado havia 1 mg de borohidreto. Após 2 horas as amostras foram tratadas com resina Dowex 50W-X8, forma H⁺, (4 vezes em excesso) por 30 minutos, então a mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado. A resina foi lavada com 10 ml de água destilada e os filtrados combinados evaporados sob vácuo até secura. O ácido bórico liberado foi removido por codestilação com metanol sob vácuo. Os alditóis foram então tratados com uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1) em ampola selada aquecida a 90 °C por 1 hora. Os derivados acetilados foram extraídos com clorofórmio e a piridina residual eliminada com tolueno.

Os alditóis acetatos foram analisados em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu CG-14A) acoplado com espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS-QP2000A), tendo como gás de arraste o hélio (2 Kg de pressão) sob condições isotérmicas (240 °C) com uma coluna capilar CG-IF-547 de 50 metros de comprimento e diâmetro interno de 0,4 mm (BLATT, 1987). Os espectros foram obtidos por impacto de elétrons, repetitivamente a cada 1 segundo, com varredura de m/z de 20 até 900.

5.7.2. Derivatização II (alditóis sililados)

Após a hidrólise das frações com TFA, procedeu-se a redução dos monômeros obtidos utilizando-se borohidreto de sódio e posterior liofilização. O liofilizado foi derivatizado com BSTFA (Bis-Trifluoroacetamida) em piridina obtendo-se os sililpoliois correspondentes. Os compostos foram separados em uma coluna SE-30 capilar, na faixa de temperatura de 150-250 °C, com velocidade de aquecimento de 5 °C/minuto.

5.8 Determinação do conteúdo de ácidos urônicos

5.8.1 Métodos colorimétricos

Foram utilizados os seguintes métodos colorimétricos para a determinação do teor de ácidos urônicos: carbazol (BITTER & MUIR, 1962) (descrito a seguir) e metahidroxibifenil (BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN, 1973).

5.8.1.1 Método do carbazol

Reagentes:

- a) Tetraborato de sódio 0,025 M em ácido sulfúrico p.a.
- b) Carbazol 0,125 em etanol absoluto (esta solução é estável por 12 semanas a 4°C e no escuro).
- c) Padrão de ácido urônico de 5 mg% em água bidestilada saturada com ácido benzóico.

Procedimento:

5 ml de ácido sulfúrico/borato foi colocado em cada tubo afixado em um suporte para agitação e resfriado a 4°C ; 1 ml da amostra foi cuidadosamente introduzida no tubo de maneira a formar uma camada superficial sobre o ácido. O tubo foi fechado com tampa rosqueável. O suporte contendo o tubo foi agitado. Após a agitação o tubo foi aquecido por 10 minutos em banho de água fervente e depois resfriado à temperatura ambiente; 0,2 ml da solução de carbazol foi então adicionada; o tubo foi novamente agitado e aquecido em banho de água fervente por 15 minutos e resfriado à temperatura ambiente. Cada densidade ótica foi então lida a 530 nm.

5.9 Carboxiredução de polissacarídeos ácidos

A amostra de 40 mg do polissacarídeo foi dissolvida em 30 ml de água e, à esta solução, adicionou-se 1 g de 1-ciclohexil-3(2-morfolinoetil)-carbodimida-m-p-toluenosulfonato sob agitação. O pH foi mantido em torno de 4,75 pela adição de ácido clorídrico 0,01 M. Após 2 horas, adicionou-se borohidreto de sódio 2M (65 ml) gota a gota durante 1 hora. O pH foi então mantido em torno de 7 pela adição simultânea de ácido clorídrico 4 M. A solução foi agitada por 1 hora, dializada contra água destilada por 96 horas e liofilizada. O processo foi repetido por duas vezes para assegurar completa redução (TAYLOR & CONRAD, 1972).

6. Análise de metilação

6.1 Metilação de Hakomori

6.1.1 Preparação do reativo (metilsulfinil-Na)

Hidreto de sódio a 50% disperso em óleo mineral (2g) e DMSO (20 ml) foram misturados sob agitação e colocados em banho de ultrassom a 50°C. Após 1 hora foi obtida uma solução esverdeada. Foi adicionada uma camada de óleo mineral sobre a solução para protegê-la da oxidação. A concentração do reagente assim preparado foi de aproximadamente 2 M e pode ser estocado por 1 mês em geladeira.

6.1.2 Método de metilação (Hakomori)

Uma amostra de polissacarídeo (5 mg) foi dissolvido sob agitação com ultrassom em 1 ml de DMSO em um frasco de 5 ml fechado com rolha de borracha. Um fluxo de nitrogênio foi passado através de duas agulhas introduzidas na rolha. Adicionou-se então 1 ml de metilsulfinil-Na (2M) através de uma seringa. A solução assim formada foi agitada num banho de ultrasson

por 1 hora e deixada em repouso por mais 6 horas. Adicionou-se então 1 ml de iodeto de metila gota a gota com o material resfriado em banho de gelo. A solução foi agitada por ultrassom por 30 minutos, colocada então em água (10 ml), dializada contra água corrente durante uma noite e posteriormente concentrada até a secura sob vácuo a 40 °C.

6.2 Metilação de Haworth

Uma amostra de polissacarídeo (100 mg) foi dissolvida, sob atmosfera de nitrogênio, em hidróxido de sódio 45% (15 ml) contendo 10 mg de borohidreto de sódio. A solução foi resfriada sob banho de gelo e 6 ml de sulfato de metila foi adicionado sob agitação durante 8 horas. A amostra foi agitada por mais 12 horas; a solução foi então neutralizada com ácido sulfúrico 2 M, dialisada e concentrada até a secura.

6.3 Hidrólise do polissacarídeo metilado

Uma amostra do polissacarídeo metilado (5 mg) foi dissolvido em ácido fórmico 90% (3 ml) e aquecido a 100 °C por 2 horas em tubo selado (ampola). A solução foi então seca sob vácuo e redissolvida em ácido sulfúrico 0,25 M (1 ml) e aquecida a 100 °C por 12 horas. A solução foi resfriada e neutralizada com carbonato de bário, filtrada e concentrada sob vácuo a 40 °C (BJORNDAL *et alii*, 1967; BJORNDAL *et alii*, 1970).

7. Métodos de extração de substâncias pécticas

7.1 Extração com solução EDTA/oxalato de amônio

Cutícula de *Cereus peruvianus* livre de goma e de cera foi submetida a 12 ciclos de extrações sucessivas de 2 horas com 2 volumes de uma mistura de 0,25 g% de etilenodiaminotetraacetato (EDTA, sal dissodico) e 0,25 g% de oxalato de amônio dihidratado a 60 °C (McCREADY, 1952). Os

extratos foram reunidos e a substância pécica separada via precipitação com álcool na proporção 1/3.

7.2 Extração com HCl diluído a quente

Pectina cítrica utilizada neste trabalho foi obtida de acordo com o método clássico de extração de pectinas descrito a seguir (McCREADY, 1965). Cerca de 500g de albêdo úmido de laranja foi fatiado (2 mm de espessura) diretamente em um frasco contendo 2,5 litros de água em ebulição cujo pH foi ajustado para 2,2 com ácido clorídrico. A mistura foi aquecida por 30 minutos (95-100 °C) sob agitação ocasional. À mistura aquecida foi adicionado quarenta gramas de terra de diatomácea e a mesma foi filtrada sob vácuo. A torta foi lavada com 500ml de água fervente. O filtrado e o lavado foram reunidos e esfriados rapidamente à temperatura ambiente com a finalidade de evitar a degradação da pectina.

À solução de pectina foi adicionado 1,5 volumes de etanol 95% contendo 2 ml de ácido hidrocloreídrico (1,19) por litro. A mistura foi agitada e em seguida mantida em repouso durante 30 minutos. Após sifonação do solvente o precipitado foi transferido para um filtro de tecido tipo coador e prensado manualmente. A torta foi desintegrada em 2 volumes de etanol 50%, agitada suavemente, e novamente filtrada em filtro de tecido; esta operação foi repetida até que o filtrado apresentasse teste negativo para o cloreto, quando então, a torta foi desintegrada em 2 volumes de etanol 95%, agitada, prensada em filtro de tecido e seca em estufa a 50 °C.

A cutícula do *Cereus peruvianus* foi submetida a este mesmo processo de extração, com exceção de que no lugar de 500 g de material de partida úmido foi utilizado 50 g de material seco e desengordurado na granulometria de 48 mesh.

7.3 Extração com HCl concentrado a temperatura ambiente

O método básico de extração de substâncias pécticas à temperatura ambiente consistiu em tratar a cutícula do *Cereus peruvianus* na granulometria de 48 mesh com ácido clorídrico 6M na proporção 1:3 (massa/volume) por um período de 30 minutos. Após filtração em funil de vidro sinterizado, o resíduo ácido tratado foi lavado com água destilada até que a água de lavagem apresentasse pH 4,3. O resíduo lavado foi transferido para um recipiente juntamente com água destilada na proporção 1:100 (massa/volume). A solubilização da substância péctica foi então realizada pela adição de hidróxido de sódio 1 M, sob agitação, até que fosse atingido o pH 6,0, formando-se uma solução viscosa, a qual foi filtrada em filtro de tecido.

O filtrado foi acidificado com ácido clorídrico 1 M formando-se um gel firme e transparente. O gel assim obtido foi tratado com álcool etílico na proporção de 1:3 (volume/volume) e filtrado em funil de vidro sinterizado sob vácuo, obtendo-se uma substância péctica que, após seca em estufa sob 50 °C, apresentou coloração branca (COSTA *et alii*, 1992; ALVAREZ *et alii*, 1995).

Com o objetivo de otimizar este método básico de extração de substâncias pécticas a partir da cutícula do *Cereus peruvianus* os seguintes parâmetros foram variados: granulometria do material de partida (48, 65, 80 e 100 mesh), concentração do ácido (1, 3 e 6 molar) e tempo de tratamento com o ácido na concentração 6 M (5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos).

8. Eletroforese em papel

Soluções a 10 mg/ml de pectatos da cutícula e pectina de pele de laranja foram digeridas com 1-2 mg de enzimas cruas do suco gástrico do caramujo terrestre *Megalobulimus paranaguensis* (FONTANA *et alii*, 1988) ou Novo Pectinex 3XL por 24 horas a 40 °C. O digerido aquoso, etanol solúvel, foi então eletroforetizado sobre papel Whatman número 1 em tampão borato de sódio pH 9,3 contendo 10mM de CaCl₂ (HAUG & LARSEN, 1961) para 1.965

V.h em 16 mA usando um tanque de tetracloreto de carbono. Açúcares ácidos e neutros foram revelados com nitrato de prata/hidróxido de sódio (TREVELYAN, 1950).

9. Grau de metoxilação

O grau de metoxilação de pectinas foi determinado de acordo com o método descrito pelo NATIONAL RESEARCH COUNCIL(1981).

A - Preparação da amostra.

- 1) Para a determinação do grau de metoxilação, amostras em triplicata de substância péctica foram pesadas quantitativamente (0,5 g) em frasco erlenmayer.
- 2) A amostra foi misturada com 2 ml de isopropanol e, em seguida, adicionou-se 100 ml de água destilada, a qual foi mantida em repouso até completa dissolução da pectina.

B - Determinação do grau de metoxilação

- 1) À amostra preparada de acordo com o ítem A, adicionou-se 5 gotas de fenolftaleína e titulou-se com hidróxido de sódio 0,1 M até que a coloração rosa persistisse por aproximadamente 20 segundos. O volume gasto foi registrado como título ácido (V1).
- 2) À solução mantida sob agitação, adicionou-se 20 ml de uma solução de hidróxido de sódio 0,5 M. Após a adição, a solução foi mantida em repouso durante 15 minutos à temperatura ambiente.
- 3) Novamente sob agitação, adicionou-se 20,0 ml de uma solução de ácido hidrocloreídrico 0,5 M até desaparecimento da coloração rosa.
- 4) Adicionou-se então 3 gotas de fenolftaleína e titulou-se com hidróxido de sódio 0,1 M, determinando-se assim o título de saponificação (V2).
- 5) O grau de metoxilação foi determinado pela relação percentual entre o título ácido (V2) e o título total ($V_t = V_1 + V_2$), $GM = 100 V_2/V_t \%$.

10. Análises espectroscópicas

Os espectros de ^{13}C -NMR (ressonância magnética nuclear) da goma em suspensão em D^6 -DMSO foram obtidos com um aparelho Bruker AC-300 P em um tubo com 5 mm de diâmetro a 70 °C.

Os espectros ^{13}C - NMR da substância pectica foi obtida a partir de uma suspensão em D_2O na concentração de 0,3 g% (massa/volume), sob temperatura de 50 °C, em um tubo de 5 mm de diâmetro, utilizando-se um aparelho GEMINI-300 BB. O pulso foi de 45° com repetição a cada 0,602 segundos. O tempo total de aquisição de dados foi de 66,7 horas.

11. Extração e análise da cera cuticular

A fração cerosa foi obtida mediante extração das cutículas em soxhlet usando clorofórmio como extrator. Três tipos de amostras foram preparadas: a) cera integral (coloração caramelo), b) Cera pré-hidrolisada com KOH alcoólico. (Após saponificação o sistema foi neutralizado com ácido clorídrico e extraído exaustivamente com clorofórmio. O extrato clorofórmico foi evaporado até *secura* e o resíduo foi metanolizado). c) Cera clarificada em coluna de sílica gel (eliminação da pigmentação).

As ceras foram submetidas à metanólise em meio de metanol: H_2SO_4 :benzeno na proporção de 20:1:10 em ampolas seladas a 100 °C por 10 horas. O produto resultante foi particionado entre água e éter, a solução etérea foi separada e concentrada até *secura* para eliminar-se resíduos de metanol e, em seguida, o resíduo foi redissolvido em éter. A solução etérea, assim preparada, foi analisada em um cromatógrafo gasoso (CG14A) acoplado a um espectrômetro de massas (GC QP2000 A), utilizando-se uma coluna capilar tipo Carbowax-20M, com 50 m de comprimento e diâmetro interno de 0,4 mm, com uma pressão de gás hélio de 2 Kg/cm² e temperatura isotérmica de 250 °C

12. Análise de ácidos hidroxi-cinâmicos (ferúlicos)

Amostra de 200 mg de polissacarídeo extraído do parenquima de aletas de *Cereus peruvianus* foi tratado com 50 ml de NaOH 0,1 M, sob fervura durante 5 minutos. Após ser resfriada a solução foi acidificada com HCl (pH 1) e parcionada com acetato de etila. A fase orgânica silil derivatizada foi analisada em coluna capilar SE-30. A temperatura do injeção foi de 200°C, com gradiente de temperatura de 20 °C/minuto. Temperatura do detector 260°C. Amostra preparada da mesma forma porém metilada foi analisada em CG-EM.

13. Separação por membranas

Para fracionamento das amostras foi empregado um sistema montado pela milipore com os seguintes componentes: frequencímetro, moto bomba, tubulações e reservatórios da membrana e do retido. As membranas empregadas apresentavam configuração em espiral.

Foi usado frequencímetro da marca ALLEN BRADREY. Com moto bomba constituída por um motor, um redutor e a bomba propriamente dita. O motor apresentava as seguintes características: 1 HP, 220 V, 60 Hz e 1750 RPM. O redutor foi da marca SM-CYCLO (Virginia USA) modelo HM 3095 A (292 RPM). A bomba foi do tipo diafragma (três diagramas em viton), carcaça em aço inox 316L com capacidade de 8,5 GPM (galões por minuto), modelo D10XRSVSNHC, número 52126 e da marca HYDRA - CELL, dotada de sistema *Stop*. As tubulações e os reservatórios do retido e da membrana foram em aço inox 316 e apresentavam sistema de refrigeração tipo camisa controlada por uma válvula termostaticada.

Após operação do sistema (ultrafiltração, osmose reversa ou diafiltração), a membrana foi cuidadosamente lavada da forma descrita a seguir: a) removeu-se o retido e passou-se água destilada pela membrana (3 ft²) até o retido apresentar aspecto límpido e pressão aproximadamente de 2

a 3 kgf/m²; b) uma solução de NaOH 0,2 N foi recirculada por 30 minutos; c) enxaguou-se a membrana com água destilada até atingir o pH da água com um volume de aproximadamente 25 litros de água e, finalmente, realizou-se o teste de fluxo. para verificar se o processo de limpeza foi efetivo ou ainda se a membrana sofreu algum tipo de dano.

14. Polarimetria

Polarimetria foi realizada com um aparelho da ACATEC, modelo PDA 83000, usando-se uma solução de pectato de sódio 0,1% a 25 °C.

15. Reologia

Medidas de viscosidade intrínseca foram realizadas em viscosímetros capilar Cannon números 50 e 100.

Curvas de fluxo foram obtidas com um viscosímetro Brookfield do tipo cone coaxial, modelo LV-DVII em uma faixa de velocidade de cisalhamento de 0,396 a 79,2 s⁻¹ com os cones coaxiais SC18 e SC31, dotado de adaptador de pequenas amostras acoplado a um banho com temperatura controlada. Os dados de viscosidade, velocidade de cisalhamento e tensão de cisalhamento foram calculados pelo programa DVGATHER. As amostras de extratos brutos foram medidas em solução aquosa na concentração de 1,5 g% (peso/peso).

16. Cromatografia de exclusão estérica

Estimativa da distribuição de massa molar foi realizada combinando-se cromatografia de permeação em gel e detector de espalhamento de luz com colunas do tipo: TKS PW5000 + PW4000 SEC; solvente NaCl 50 mM; filtro em linha de acetato de celulose de 0,2 µm. A amostra (c=0,39 mg/ml) foi separada em um fluxo de 0,82 mL/min a temperatura de 20 °C; luz laser espalhada (HeNe:632) foi detectada em

ângulo de 4,8; a secção de detecção consistiu de detector interferométrico (630 nm) da Optilab da Wyatt Technology (California) e um instrumento de espalhamento de luz de baixo ângulo KMX-6 da LDC analítica; aquisição e processamento de dados foi realizado com o programa PCLALLS. Amostras de polieletrólitos também foram analisadas em solução de DMSO e em solução aquosa de NaCl 1M com o objetivo de produzir distribuições absolutas de massas molares (HUBER, 1992). Estas facilidades foram disponibilizadas pela Universidade de Granz (Prof. Anton Huber), Austria.

17. Análise de cátions

17.1 Absorção atômica

A análise quantitativa de cátions foi realizada em um espectrofotômetro de absorção atômica de duplo feixe modelo CG-AA 7000 ABC. As cinzas foram obtidas pelo método TAPPI 715/58.

17.2 Ressonância paramagnética eletrônica

A análise de distribuição de cátions foi realizada em um espectrômetro não comercial, operando em banda X ($f = 9,3$ GHz). A cavidade foi do tipo comercial modelo Varian modo TE 102 e frequência de modulação de 10 KHz. Os espectros de RPE foram obtidos em temperatura ambiente.

18. Experimentos de remoção de turbidez

18.1 Remoção de turbidez de água para uso doméstico

Para avaliar as propriedades flocculantes do polieletrólito natural (goma de parênquima) utilizou-se o método do teste de jarras (HUDSON & SINGLEY, 1974), em um *jar-test* modelo Millan com velocidade máxima de 125 rpm e mínima de 50 rpm. As amostras de água bruta com diferentes níveis

de turbidez inicial foram tratadas com polieletrólito na faixa de 0,2 a 1 ppm, sendo que a turbidez inicial e residual foram avaliadas em um turbidímetro micronal modelo B250.

Os testes foram realizadas com água de diferentes valores de turbidez captadas do rio Pirapó que abastece a cidade de Maringá.

18.2 Clarificação do chá de estévia (*Stévia rebaudiana*)

Foram realizados testes de clarificação do chá de estévia tratado de acordo com KURODA & KAMIYAMA (1979) utilizando-se polieletrólitos na faixa de 10 a 100 ppm.

19. Determinação da composição de aminoácidos

Foi efetuada uma hidrólise ácida (HCl 6N, 110 ° C, 22 horas) em ampola selada à vácuo. O hidrolisado foi evaporado para remoção completa do HCl e resuspenso em tampão , próprio do analisador Beckman, modelo 7300. A quantificação de cada aminoácido foi feita por comparação de áreas dos picos, com as de uma mistura de padrão de aminoácidos

20. Poder geleificante de substâncias pécticas de baixo teor de metoxila

O procedimento oficial de preparação de géis para pectinas de baixo teor de grupos de metoxilas, foi empregado para a determinação da capacidade de geleificação de pectinas de *Cereus peruvianus* e de pectina cítrica . Exatamente 6 g de pectina padrão (SOSULSKI *et alii* , 1978) foram misturadas com 40 g de sacarose em 425 ml de água contendo 5 ml da solução de ácido cítrico (543 g/l) e 10 ml da solução de citrato de sódio (60 g/l). Após levar a mistura a ebulição, e com vigorosa agitação, adicionou-se 140 g de sacarose e 25 ml da solução de cloreto de cálcio (22,05 g/l) e colocou-se em dois frascos apropriados, após a solução em ebulição ter sido reduzida a 600g. Estocou-se a 25 °C por 24 horas antes de

determinar a força dos dois géis com Exchange Ridgelimeter . Os frascos foram invertidos para colocar os géis sobre as placas de vidro do Ridgelimeter e a % de "Sag" foi lida exatamente depois de dois minutos. O instrumento de teste foi fabricado pela SUNKIST CROWERS Co., Pasadena, EUA (Figura 16). Com este instrumento é possível determinar um abaixamento de até no máximo 34%. A força do gel foi calculada pelo emprego da fórmula padrão $(600/w) \times [2 - (\% \text{ sag} + 4,5/25)]$, na qual w é a massa da amostra em gramas (NATIOANAL RESEARCH COUNCIL, 1972).

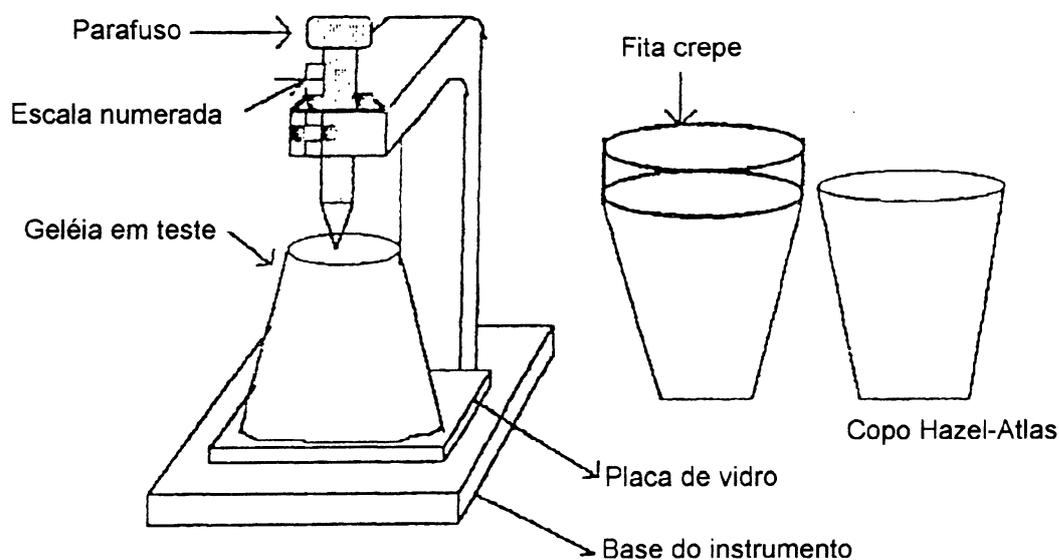


Figura 16 - Ridgímetro para medição da % de sag.

21. Secagem em “spray dryer”

A secagem em “spray dryer” foi realizada em um aparelho tipo B191 marca BUCHI, equipado com uma bomba peristáltica com capacidade de 1,8 litros/hora, dotada de regulador linear de fluxo. O líquido bombeado passava por um capilar de 0,5 mm de diâmetro e entrava em contato com ar comprimido de atomização, o qual tinha fluxo e pressão regulados previamente para valores entre 0 a 800 litros/minuto e 0 a 4,5 Kgf/cm². As microgotas formadas entravam em contato com o ar quente (vindo de um trocador termoelétrico) que era disperso no difusor, efetuando-se assim a troca térmica que acarretava a expansão e evaporação do solvente e, conseqüentemente, desidratação das micropartículas de sólidos, os quais eram arrastados por sucção da câmara de expansão até o coletor de sólidos, num intervalo de tempo de 1 a 35 segundos. O arraste era promovido por uma turbina conectada na saída de separação gás-sólido.

Amostra de extrato aquoso obtido por prensagem mecânica de parênquimas (centrifugada e filtrada) foi desidratada, sob as seguintes condições:

Ar quente: Temperatura programada = 150 °C

Temperatura de entrada = 151 a 149 ° C

Temperatura de saída = 98 a à 100 ° C

Ar de atomização: fluxo = 700 litros/minuto

pressão= 4,5 Kgf/cm²

Bomba de alimentação: vazão = 23% de 1,8 litros/hora = 0,414 litros/hora

Temperatura da câmara de expansão = 50 ° C

Temperatura no coletor do material desidratado = 45 ° C

Umidade do material desidratado = 8 %

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Cultivo

Em nossa região (Norte do Paraná) desconhecemos a existência de grandes populações nativas do cacto *Cereus peruvianus*. A presença do mesmo é observada em residências como planta ornamental. Como nosso experimento previa experimentos que demandariam entre 50 e 100 Kg de massa verde de cladódio, optamos pelo cultivo do *Cereus peruvianus* em uma Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá.

O Cultivo além de servir como fonte de matéria prima para a obtenção de biopolímeros, permitiu também a realização de algumas observações referentes ao rendimento da fitobiomassa de *Cereus peruvianus*.

1.1 Espaçamento e densidade

No Nordeste brasileiro, PESSOA (1969) recomenda os seguintes espaçamentos para a cultura de cactos:

Culturas consorciadas - 2,0 m x 0,50 m

- 2,0 m x 1,00 m

Culturas isoladas - fileiras duplas : 2,0 m x 0,5 m x 1,0 m

- fileiras únicas : 2,0 m x 0,5 m

TIBAU (1979) analisando os dados de rendimento obtidos em função da densidade, espaçamento e época de corte, concluiu que o rendimento aumenta com a idade da planta e com a densidade em qualquer idade de corte.

Observações feitas num campo experimental na Fazenda da Universidade Estadual de Maringá, mostraram ser possível estabelecer a

cultura de *Cereus peruvianus* com espaçamento de uma planta por m², podendo então plantar cerca de 10.000 cactos por hectare. Foram avaliados o crescimento médio anual (tabela 5) e a massa por comprimento de cladódio (tabela 6) com a finalidade de se obter uma estimativa da fitobiomassa de *Cereus peruvianus* produzida por hectare.

1.2 Determinação do crescimento anual médio de cladódios do *Cereus peruvianus*

A partir do primeiro ano de cultivo, quando a cultura já estava bem estabelecida, o desenvolvimento das plantas foi acompanhado através da realização de medidas do comprimento dos cladódios, sendo apresentado na tabela 5 os resultados de medidas realizadas. Os cladódios tiveram um crescimento médio de 1,2 metros por ano.

Tabela 5 - Determinação do crescimento de cladódio de *Cereus peruvianus* no período de 1 ano.

Cladódios período de 1 ano (amostras)	Comprimento do Cladódio (metros)
1	1,0
2	1,3
3	1,2
4	1,3
5	1,4
6	1,2
7	1,3
8	1,1
9	1,0
10	1,1
Média	1,2 ± 0,1

1.3 Determinação da massa verde por metro de cladódio do *Cereus peruvianus*

Segmentos de cladódios de 1m de comprimento foram coletados e tiveram a massa úmida determinada, sendo obtido, conforme tabela 6, a massa média de $7,7 \pm 0,2$ Kg por metro de cladódio úmido.

Tabela 6 - Rendimento de massa verde por metro de cladódio do *Cereus peruvianus*.

Cladódio com 1 m (amostras)	Massa úmida (Kg)
1	7,6
2	7,8
3	7,5
4	7,4
5	7,5
6	7,6
7	7,8
8	7,9
9	7,8
10	7,6
Média	$7,7 \pm 0,2$

1.4 Estimativa do rendimento da fitobiomassa do *Cereus peruvianus*

Em um canteiro experimental na fazenda da Universidade Estadual de Maringá, em uma área de 70 metros quadrados foram plantadas por estacas 50 plantas e por sementes 10 plantas. As estacas após um ano de plantadas foram podadas, sendo que cada planta originou em média dois brotos, esses brotos após um ano alcançaram o comprimento médio de 1,2 m, conforme demonstrado na tabela 5, portanto, uma produção média de massa verde de 18,5 Kg por planta. Os cladódios foram novamente podados e, o que se observou, foi a emergência média de 2 novos brotos em cada

cladódio podado, portanto no terceiro ano cada planta apresentou em média 4 ramos. Mantida a tendência estima-se que o *Cereus peruvianus* a partir do terceiro ano possa produzir cerca de 4,8 m de cladódio por planta, considerando-se o valor médio de 7,7 Kg de massa verde por metro de cladódio, teríamos uma produção de 37,0 Kg de massa verde/planta a partir do terceiro ano.

De acordo com PESSOA (1969) é possível estabelecer culturas do *Cereus peruvianus* de uma planta por metro quadrado, o que tornaria possível plantar 10.000 plantas por hectare, considerando-se uma produção de 37,0 kg/planta a partir do terceiro ano, teríamos uma produção de massa verde em torno de 370 toneladas por hectare. Este experimento, aliado a dados da literatura (NERD *et alii* , 1993) dá uma noção do potencial de produção de fitobiomassa do cacto *Cereus peruvianus*, além de ter servido, como fonte do material utilizado nesta pesquisa.

1.5 Determinação da umidade através da liofilização

Secções de cladódio de *Cereus peruvianus* foram liofilizadas e a média da massa sêca obtida a partir de 6 determinações, conforme mostrado na tabela 7. Pelo método de liofilização obtem-se uma média de massa sêca de $10,50 \pm 0,3$ %. A figura 17 mostra foto de uma secção do *Cereus peruvianus*.

Tabela 7 - Determinação da percentagem de massa sêca do cladódio por liofilização.

Massa úmida (g)	Massa sêca (g)	Massa sêca %
354	37,02	10,45
320	32,04	10,01
270	28,80	10,66
344	35,26	10,25
389	41,75	10,73
385	41,38	10,74
Média		$10,50 \pm 0,3$



Figura 17. Foto da secção de cladódio de *Cereus peruvianus*

A secção liofilizada foi dissecada e cada uma das partes anatômicas teve a sua massa sêca determinada. A tabela 8 mostra a percentagem de cada fração em relação à massa sêca total da secção liofilizada.

1.6 Dissecção e determinação gravimétrica das partes anatômicas de cladódios de plantas com 3 anos de idade

Observa-se na figura 18 uma representação esquemática de uma secção do cladódio de *Cereus peruvianus*, onde se identifica as partes anatômicas. Na tabela 8 são mostrados os valores da percentagem de massa seca das respectivas frações obtidas para cladódios de uma planta com três anos de idade. A soma das massas dos parênquimas representam 71,6%, enquanto que a cutícula representa 18,1 %, e o anel celulósico 9,1 %.

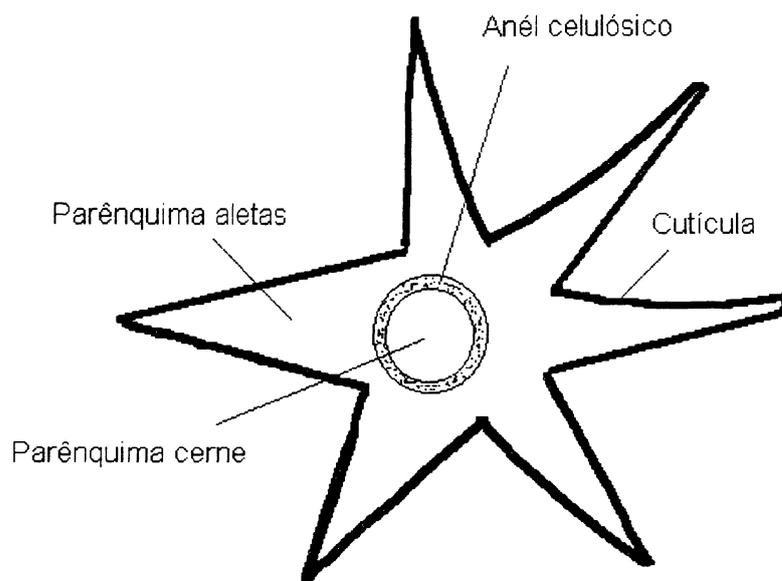


Figura 18 - Representação esquemática de uma secção do *Cereus peruvianus*.

Tabela 8 - Determinação da massa seca das partes anatômicas de um cladódio com 3 anos de idade.

Partes anatômicas	Porcentagem em relação à massa seca total do cladódio
Cera epicuticular	1,2
Cutícula pecto-celulósica	18,1
Parênquima aletas	58,2
Anel central celulósico	9,1
Parênquima do cerne	13,4

1.7 Determinação da umidade em estufa

A massa seca dos cladódios em estufa apresentou média de $13,0 \pm 0,7\%$, 2,5% acima do resultado obtido com a liofilização. Portanto, a liofilização foi mais efetiva na secagem. Deve-se considerar que as secções liofilizadas apresentavam cerca de 2 cm de comprimento, enquanto no método de secagem em estufa foram utilizados segmentos de até 30 cm de comprimento.

Tabela 9 - Determinação da massa seca em estufa de segmentos de cladódios.

Massa úmida de cladódios (g)	Massa Sêca de cladódio (g)	% de masa sêca
1270	171,4	13,5
780	100,6	12,9
540	65,3	12,1
2300	315,0	13,7
Média		$13,0 \pm 0,7$

1.8 Dissecção e determinação gravimétrica das partes anatômicas de um segmento de cladódio com 5 anos de idade

Com a finalidade de se determinar o teor de umidade das diferentes partes anatômicas de cladódios com 5 anos de idade, segmentos de 20 cm de comprimento recém-colhidos, foram dissecados, secos em estufa e o teor de umidade de cada fração determinado. A tabela 10 mostra o percentual de massa seca de cada fração em relação à massa seca total do cladódio, enquanto a tabela 11 mostra o teor de umidade de cada parte anatômica.

Tabela10 - Percentual de massa seca de cada fração em relação à massa seca total do cladódio com 5 anos de idade.

Partes anatômicas	Percentagem de massa seca em relação à massa total do cladódio
Cutícula pecto-celulósica	19,69
Parênquima aquoso (aletas)	48,39
Anel celulósico central	26,34
Parênquima do cerne	5,60

A dissecção e determinação gravimétrica das partes anatômicas de cladódios com 5 anos de idade mostrou que houve redução na massa seca dos parênquimas e aumento da massa seca do cilindro celulósico quando os resultados foram comparados com os obtidos para cladódios com 3 anos de idade (tabela 8). A massa dos parênquimas soma 71,6% , enquanto que para cladódios com 5 anos de idade (tabela 10) a massa dos parênquimas soma 53,9%; o cilindro celulósico representa 9,1%, da massa seca em cladódios com 3 anos de idade sendo que em cladódio com 5 anos de idade o cilindro celulósico representa 26,34 % da massa seca do cladódio; portanto com a idade ocorre um aumento da massa do cilindro e uma redução na massa dos parênquimas. A cutícula pecto-celulósica manteve percentagem de massa seca praticamente constante (18,2%) para cladódios com 3 anos de idade e 19,69%, para cladódios com 5 anos de idade.

Tabela 11 - Teor de umidade de cada fração de *Cereus peruvianus*

Partes Anatômicas do Cladódio	Teor de Umidade %	
	Primeiro Experimento	Segundo Experimento
Parênquima aletas	88,08	88,24
Parênquima do cerne	92,99	93,03
Cilindro Celulósico	71,15	73,46
Cutícula	51,50	55,22

A fração pecto-celulósica (cutícula) é a que tem menos água (51,50%), os parênquimas apresentam umidade entre 88,08 e 93,03 % e o cilindro celulósico apresenta um valor em torno de 73%. Pelos resultados obtidos 86% da fitobiomassa fresca do *Cereus peruvianus* é água, enquanto que pelo método de liofilização, verifica-se que este percentual pode chegar a 89,50%. Portanto, se tivéssemos tecnologias pelas quais pudéssemos aproveitar de forma integral toda a fitobiomassa de *Cereus peruvianus*, nós teríamos um rendimento total de 10,50%.

2.0 Extração dos glicopolímeros a partir dos parênquimas

2.1 Extração por maceração

2.1.1 Efeito da diluição

O parênquima das aletas, que representa 58,2 % da massa seca de *Cereus peruvianus* (tabela 8), foi submetido ao processo de extração da goma por maceração em diferentes relações massa/volume com a finalidade de determinar a melhor relação massa/solvente para o processo de extração. Na tabela 12 são apresentados os rendimentos de extração em diferentes diluições após 10 horas de maceração com agitação ocasional. Observa-se um aumento no rendimento de extração com o aumento da diluição de até 1/6 (m/v), sendo que nas demais diluições o rendimento se mantém constante em torno de 0,4 % em relação a massa macerada.

Tabela 12 - Rendimento de extração em relação a massa úmida de parênquima aletas processada por maceração em diferentes relações massa/volume pelo período de 10 horas.

Massa/volume	Rendimento (%)
1 / 1	0,23
1 / 2	0,30
1 / 4	0,32
1 / 6	0,41
1 / 10	0,42
1 / 20	0,42

2.1.2 Efeito do tempo sobre o rendimento de extração

A tabela 13 mostra a cinética de extração dos polissacarídeos de *Cereus peruvianus* na diluição de 1 : 6 (massa/volume). Após as quatro primeiras horas de extração foi obtido 629 mg, correspondendo a 79% da massa extraída ao final de 10 horas (796 mg). A extração por maceração apresenta o inconveniente da demora e do baixo rendimento, são necessárias 10 horas para se obter um rendimento em torno de 0,4% em relação a massa úmida total macerada (200 g de parênquimas). Observou-se que, mesmo após 10 horas de maceração, a massa residual liberava grande quantidade de líquido viscoso quando submetida à prensagem manual. Com a finalidade de aumentar o rendimento e diminuir o tempo de extração, foram desenvolvidos métodos que incluíssem etapas de prensagem.

Tabela 13 - Cinética de extração por maceração na diluição de 1:6 (massa/volume). Foi macerado 200g de parênquimas aletas.

Tempo de Maceração (horas)	Goma extraída em (mg)
2	469
4	629
6	689
8	739
10	796

2.2 Extração da mucilagem por prensagem manual

Amostras de 1 kg de parênquimas aletas isolados de cladódios recém-colhidos (figura 19), foram cortados em cubos de aproximadamente 1cm³, misturados com água na proporção 1:1 (massa/volume) e submetidos à prensagem manual em um filtro de pano tipo coador; esta operação foi repetida 6 vezes, portanto para cada kilo de massa foram empregados 6 litros de água. Os líquidos de extrações foram reunidos, filtrados em funil de vidro sinterizado e tratados com álcool na proporção 1:3. O precipitado foi separado por filtração e seco em estufa com circulação de ar a 40 °C, resultando um pó de coloração beje. Observa-se pelos dados da tabela 14 que houve um aumento considerável na massa extraída utilizando-se a prensagem manual. A eficiência da extração, comparada à maceração semi-estática (item 2.1) é cerca de 4 vezes superior (1,79% versus 0,42%).



Figura 19 - Parênquima das aletas separadas do cladódio com o auxílio de uma faca e livres da cutícula.

Tabela 14 - Rendimento da extração do polissacarídeo por prensagem manual realizadas com vários lotes de 1Kg de parênquima de aletas úmido.

Massa extraída (Kg)	rendimento %
1	1,67
1	1,77
1	1,80
1	1,95
média	$1,79 \pm 0,11$

2.3 Extração da mucilagem por prensagem mecânica automatizada.

A prensagem manual, apesar de ter se mostrado muito mais eficiente que o processo de maceração, é um processo bastante trabalhoso e inconveniente para o processamento de maiores quantidades de parênquima ("scale up"). Com o objetivo de processar lotes entre 50 e 100 kilogramas de parênquima foi empregada uma prensa do tipo helicoidal de 6 toneladas. Os parênquimas antes de serem prensados eram triturados em um moinho de facas ; a massa misturada em água na razão 1:6 (massa /volume) e então prensada em um prensa helicoidal do tipo rosca sem fim para a separação de sólidos/líquido. O líquido viscoso (figura 20) era então centrifugado em uma centrífuga do tipo rotor tubular a 18.000 rpm para separação de partículas em suspensão, filtrada e em seguida precipitada em álcool etílico na razão 1:3. O precipitado era separado em funil de vidro sinterizado e após lavagem com acetona, sêco em estufa a 40°C, obtendo-se um pó de coloração beje com rendimento médio de 2,22% (Tabela 15) em relação à massa úmida dos parênquimas processados.



Figura 20 - Líquido viscoso isolado por prensagem mecânica do parênquima do *Cereus peruvianus*.

Tabela 15 - Rendimento do processo de extração utilizando prensagem mecânica automatizada.

Massa extraída (Kg)	Rendimento %
50	2,06
67	2,20
50	2,40
média	2,22 ± 0,17

Portanto, comparando-se o método de extração por maceração com os métodos de extração por prensagem manual e prensagem automatizada, conclui-se que, em termos de rendimento, os métodos que incluem etapas de prensagem são muito mais rápidos e eficientes.

2.4 Avaliações preliminares das mucilagens extraídas de *Cereus peruvianus* pelos diferentes métodos

2.4.1 Determinação da viscosidade absoluta

As mucilagens extraídas de parênquimas pelos métodos de maceração (item 2.1) , prensagem mecânica manual (item 2.2) e prensagem mecânica automatizada (item 2.3), tiveram as viscosidades absolutas determinadas bem como a capacidade das mesmas de atuarem como auxiliares de floculação em processos de potabilização de água para uso doméstico. Como pode ser visto pela tabela 16 os extratos brutos obtidos por maceração e prensagem manual apresentaram viscosidades absolutas próximas nas concentrações testadas, enquanto que o extrato bruto obtido por prensagem mecânica automatizada apresentou viscosidade absoluta um pouco inferior sob as mesmas condições analisadas.

Tabela 16 - Determinação dos valores de viscosidade absoluta para os extratos brutos obtidos por diferentes métodos, analisados na concentração de 1,5% (massa/massa).

Métodos	*Viscosidade Mpa.s		
	A	B	C
maceração	4350	3800	3650
pres. Manual	4150	3540	3450
prens. Mec.	3700	3300	3180

* Os valores de viscosidade foram medidos em um viscosímetro Brookfield LV -DV II utilizando-se o cone coaxial SC-18 nas seguintes velocidades de cisalhamento : A ($0,39 \text{ s}^{-1}$), B ($0,79 \text{ s}^{-1}$) e C ($1,98 \text{ s}^{-1}$) .

2.4.2 Determinação da capacidade de atuarem como auxiliares de floculação nos processos de potabilização

As mucilagens obtidas pelos diferentes métodos de extração (itens 2.1, 2.2 e 2.3) tiveram a sua capacidade de atuarem como auxiliares de floculação medida através de experimentos de “jar test” conduzidos na SANEPAR. Como pode ser visto pela tabela 17, as substâncias extraídas pelo três métodos se mostraram eficientes como auxiliares de floculação na remoção de turbidez nas condições testadas. Portanto, o método de extração não teve influência sobre as propriedades dos biopolímeros atuarem como auxiliares de floculação.

Tabela 17-Remoção de turbidez da água bruta captada do rio Pirapó como 180 UNF de turbidez utilizando mucilagens extraídas de *Cereus peruvianus* por diferentes métodos, na concentração de 1 ppm.

Biopolímero (ppm)	Turbidez residual
controle	16
maceração (1ppm)	08
prensagem manual (1 ppm)	06
prensagem mecânica (1 ppm)	09

Como a amostra obtida por prensagem mecânica foi a que apresentou o melhor rendimento e, seus valores de viscosidade foram pouco afetados na faixa de velocidade de cisalhamento testada (tabela 16) e, não foi comprometida a sua capacidade de atuar como auxiliar de floculação (tabela 17), este produto foi escolhido para a realização de caracterização físico-química.

2.5 Avaliação da homogeneidade da amostra

O extrato bruto obtido pelo método de prensagem mecânica foi fracionado por troca iônica em DEAE-celulose (Cl⁻) e as frações obtidas (tabela 18) tiveram a sua composição de açúcares neutros qualitativamente determinada através de cromatografia gasosa, conforme pode ser observado no item 2.5.1 A fração I, eluída com água, representa 1.06% do total das frações ácidas (frações II,III e IV); que tiveram o teor de ácidos urônicos determinados através do método do fenil-fenol e apresentaram valores entre 14 e 18%. Os teores de proteínas variaram de 0,4 a 2,1%. Portanto, nesta análise preliminar, o extrato bruto obtido por prensagem mecânica ficou caracterizado como um ou mais biopolímeros de caráter ácido.

Tabela 18 - Fracionamento do extrato bruto obtido por prensagem mecânica em DEAE-celulose (Cl⁻).

Filtração em Coluna de DEAE - Celulose(Cl⁻)			
Eluente - fração	Carboidratos totais (mg)	Ácidos Urônicos %	Proteínas %
Água - I	2,8	0	1,1
LiCl - II	44,0	17	2,1
HCl - III	46,0	14	1,7
NaOH - IV	171,0	18	0,4

2.5.1 Determinação da composição monomérica das frações obtidas em DEAE-celulose (Cl⁻)

A análise cromatográfica foi feita com os hidrolisados das frações do polissacarídeo obtidas em coluna de DEAE-celulose, conforme mostrado na tabela 18 do item 2.5 . A figura 21, mostra o cromatograma de uma mistura dos padrões (derivatizados) de L-arabinose (arabinitol), da L-ramnose (ramnitol) , do ácido D-galacturônico (6-carboxi-galactitol) e da D-galactose (galactitol). Os cromatogramas mostram que na fração I, eluída com água (figura 22) a composição monomérica é arabinose e galactose na proporção de 1:5,4; na fração II - eluída com LiCl 1M (figura 23) a composição foi de arabinose, ramnose, galactose e ácido galacturônico na proporção de 2,4:1,0:4,7:0,4; na fração III- eluída com HCl a composição foi de arabinose, ramnose, galactose e ácido galacturônico na proporção de 4,9:1,0:6,0:0,5 (figura 24) e finalmente a fração IV (figura 25), eluída com NaOH foi de arabinose, ramnose, galactose e ácido galacturônico na proporção de 6,4:1,0:5,8:0,6.

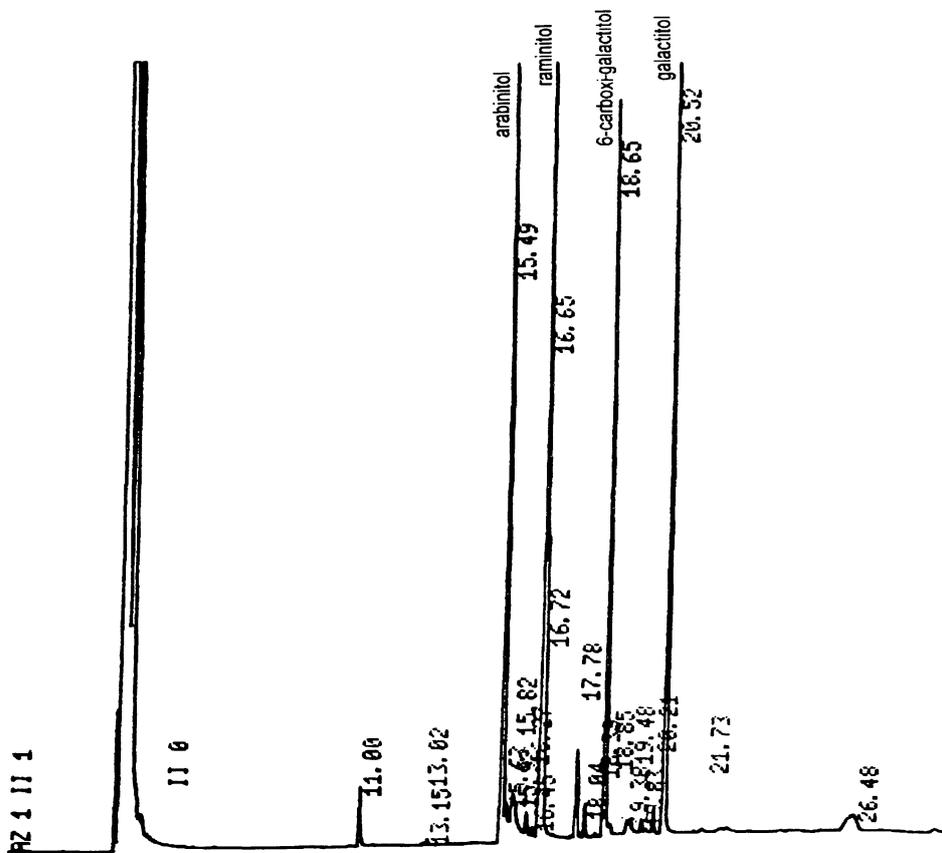


Figura 21 - Cromatograma da mistura de padrões de carboidratos na forma de siliilpoliois: arabinitol, ramnitol, 6-carboxi-galactitol e galactitol.

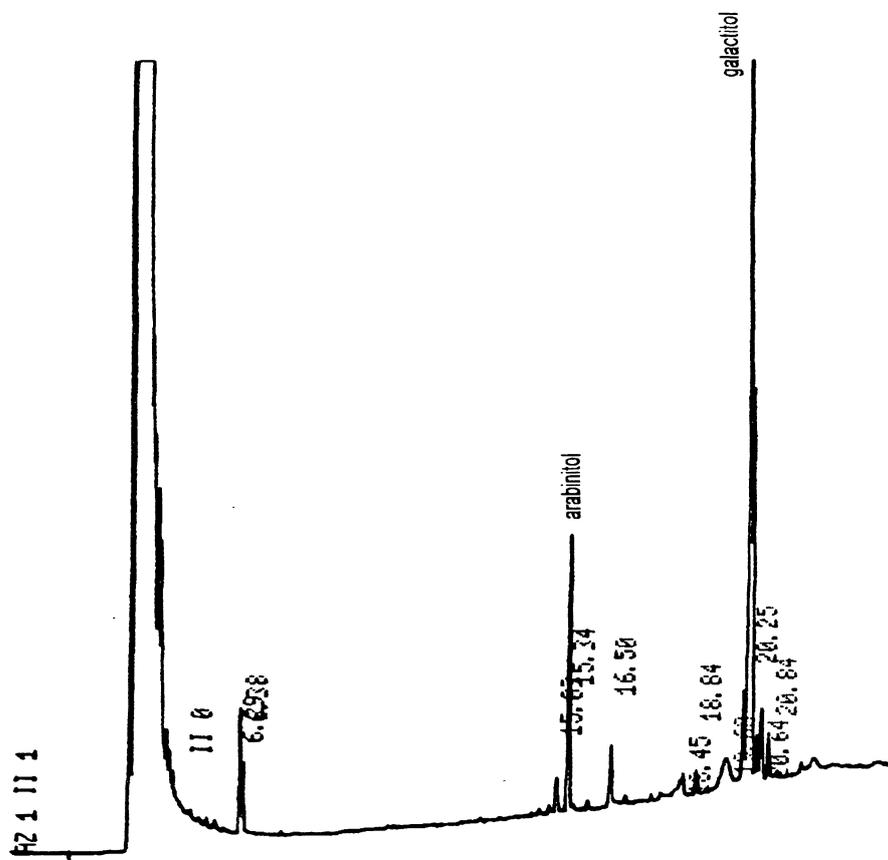


Figura 22 – Cromatograma da fração I eluída com água da coluna de DEAE-celulose. Hidrolisada com TFA 1M durante 7 horas e 30 minutos a 100 °C e derivatizada na forma de silipolios.

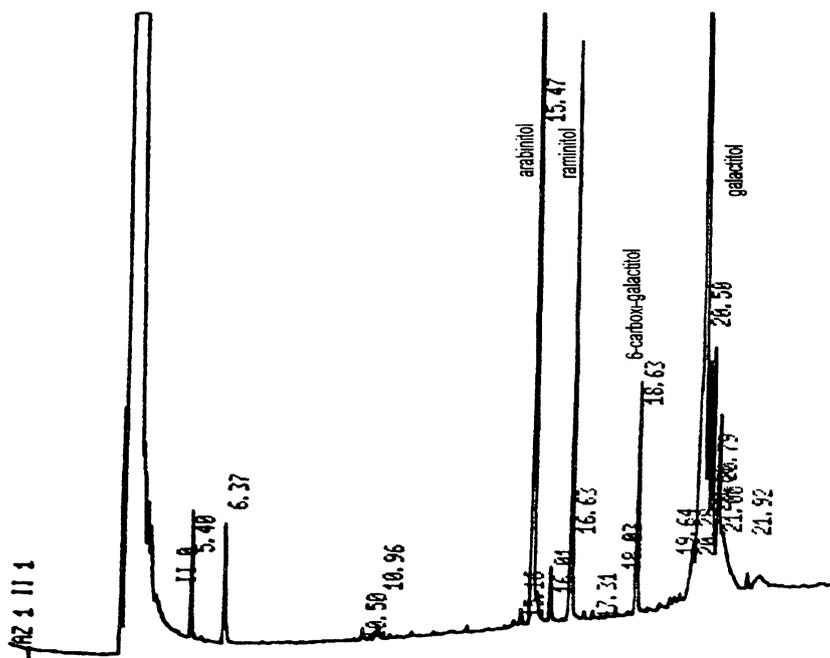


Figura 23 – Cromatograma da fração II eluída com LiCl 1M da coluna de DEAE-celulose. Hidrolisada com TFA 1M durante 7 horas e 30 minutos a 100 ° C e derivatizada na forma de sililpoliois.

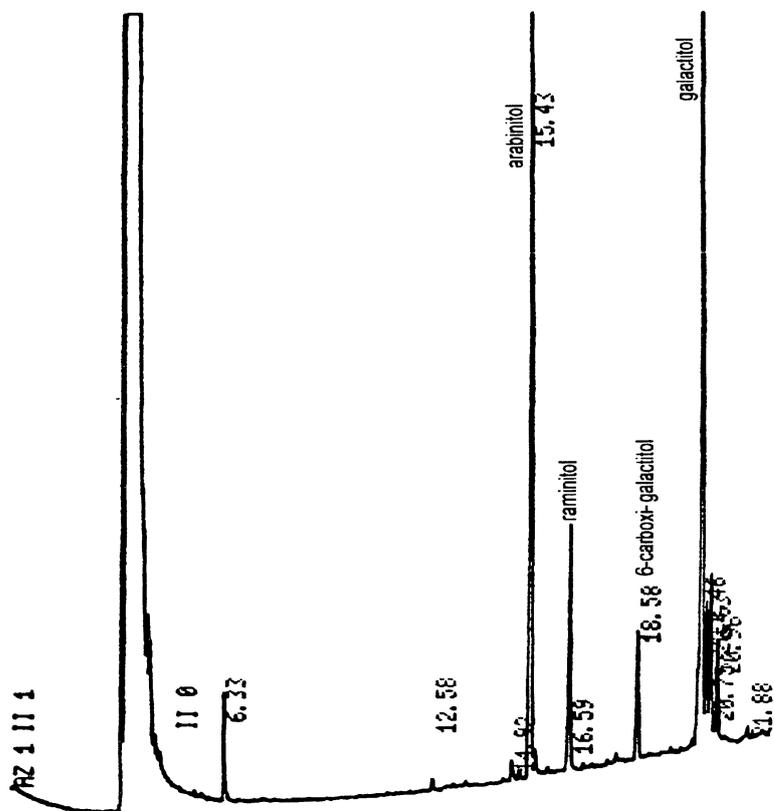


Figura 24 – Cromatograma da fração III eluída com HCl 1M de uma coluna de DEAE-celulose e hidrolisada com TFA 1M durante 7 horas e 30 minutos a 100 °C e derivatizada na forma de silylpoliois.

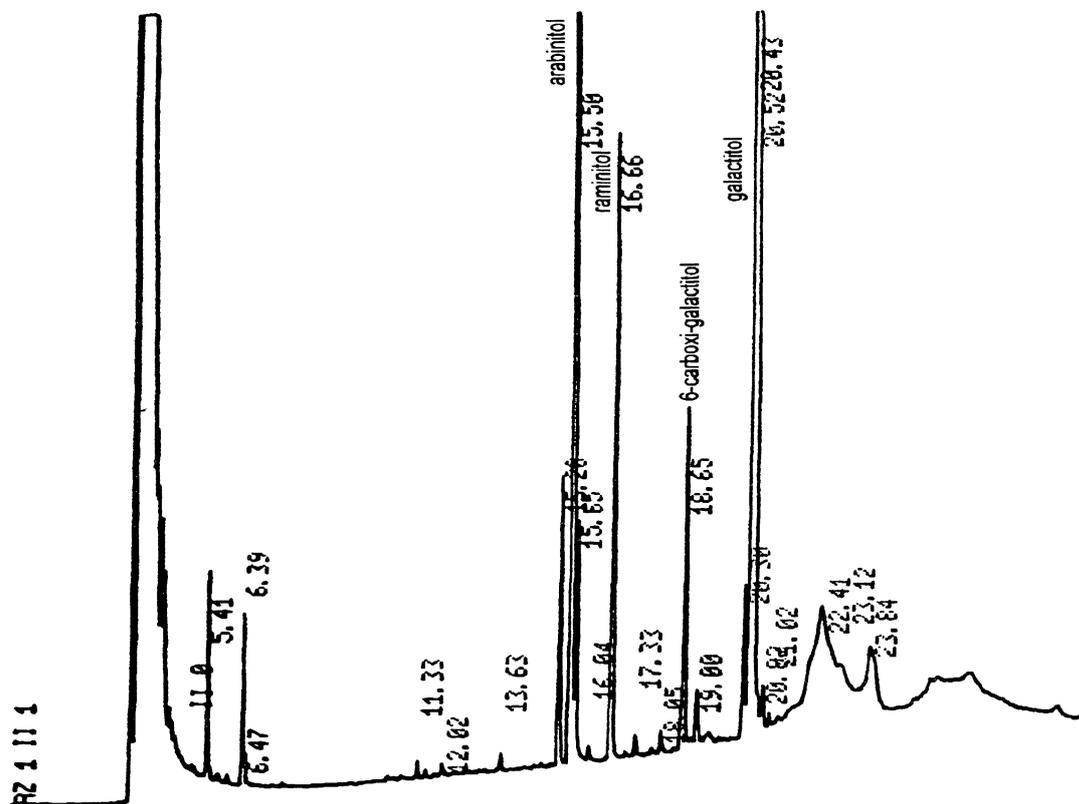


Figura 25 – Cromatograma da ração IV eluída com NaOH 0,5 M de uma coluna de DEAE-celulose e hidrolisada com TFA 1M durante 7 horas e 30 minutos a 100 ° C e derivatizada na forma de sililpoliois.

2.6 Determinação da composição monomérica através de cromatografia líquida de alta eficiência (clae)

O fração polissacarídica obtida pelo processo de prensagem mecânica e centrifugada a 2000 g foi hidrolisada e teve a sua composição monomérica determinada em cromatografia líquida de alta eficiência. A figura 26 corresponde, em ordem crescente de tempo de retenção aos padrões de

L-ramnose , L-arabinose, D-manose, D-glucose e D-galactose , realizados em CLAE, conforme no item 5.5 de Material e Métodos. Comparando-se os dois cromatogramas (figura 26 e figura 27) pode-se concluir que os picos são correspondentes a A) L- ramnose, B) L- arabinose, C) D-galactose cujas proporções são: A=12,52%, B=25,85%, C:62,95.

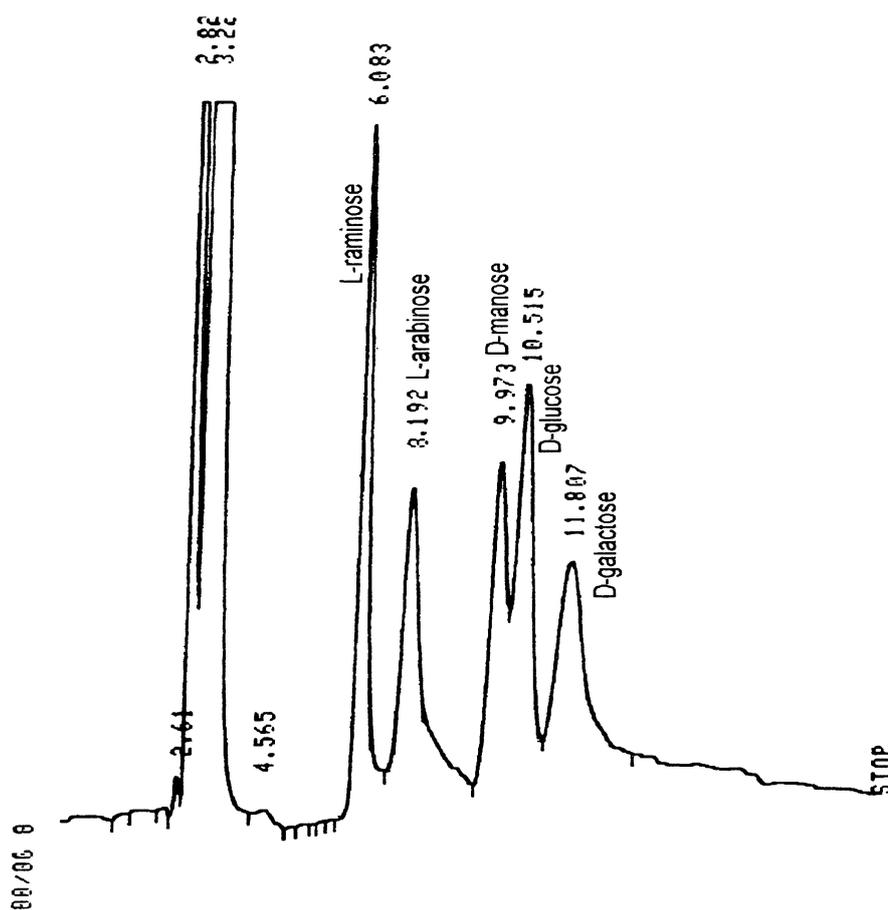


Figura 26 - Perfil cromatográfico de monossacarídeos padrão na concentração de 1 mg/ml analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna LiChrospher(100NH₂, 5 μ m), tendo como sistema de solvente acetonitrilo:água (85:15) e detector de índice de refração.

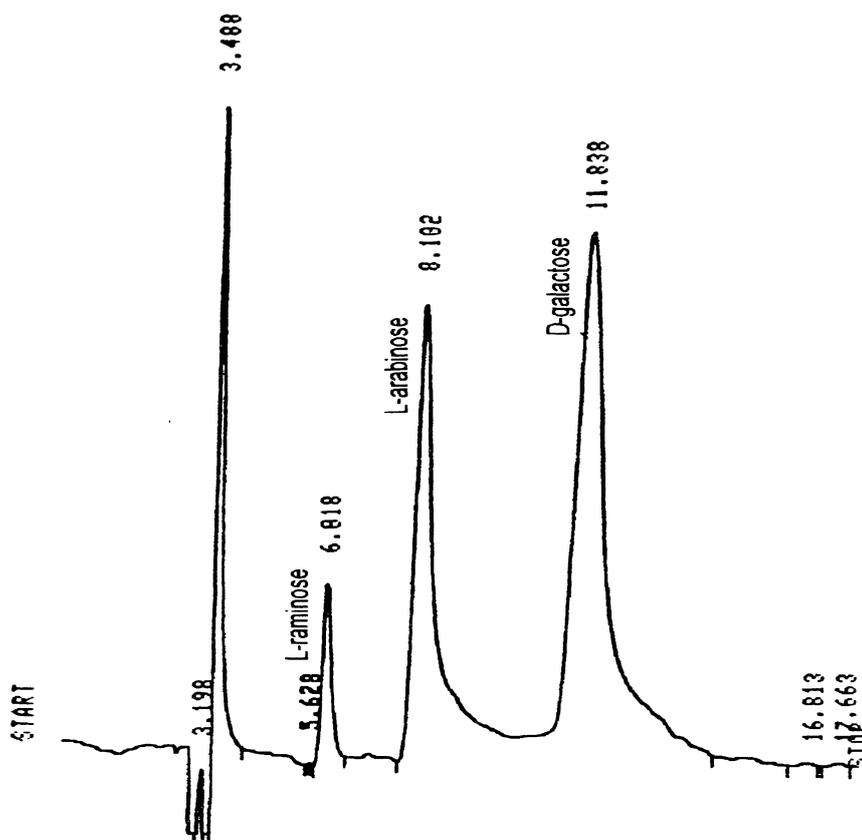


Figura 27 - Amostra de extrato bruto extraído por prensagem mecânica automatizada hidrolisada com TFA 1 M por 8 horas à 100 °C e analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (clae) em coluna LiChrospher (100NH2, 5µm), tendo como sistema de solventes acetonitrilo:água(85:15) e detector de índice de refração.

Tabela 19 - Percentagem de monossacarídeos da mucilagem de parênquima de *Cereus peruvianus* determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência.

Carboidrato	% de carboidrato	Proporção
ramnose	12,52	1
arabinose	25,85	2
galactose	62,95	5

Análise em cromatografia líquida de alta eficiência confirmou a presença dos mesmos açúcares neutros determinados através de cromatografia gasosa, quais sejam: L-arabinose, D-galactose e L-ramnose. Em

verdade, a análise CLAE é praticamente coincidente com aquela de GLC(GC) da fração II (LiCl; DEAE-celulose), mantém a proporção L-ramnose:D-galactose (aproximadamente 1:5) de todas as frações ácidas obtidas na DEAE-celulose, mas difere no teor de arabinose, que é maior, na média, para as frações de DEAE-celulose. O teor de ácido urônico foi determinado pelo método do fenil-fenol perfazendo 16%, portanto está de acordo com o que foi determinado nas frações II, III e IV obtidas por troca iônica em DEAE-celulose (Cl⁻).

2.7 Análise de fragmentação

A goma de *Cereus peruvianus* foi hidrolisada com ácido e com enzimas. O hidrolisado ácido foi obtido pela ação do TFA 2M e os hidrolisados enzimáticos foram obtidos pela ação de suco de caramujo, e pectinase do *Aspergillus niger*. Cuidadosa análise em cromatografia em camada delgada (figura 23) (após o uso de um solvente com cinco componentes e aquecimento gradual da placa após nebulização com orcinol-ácido sulfúrico, que revelou diferentes cores para cada uma das quatro unidades monoméricas da goma do cacto) revelou arabinose e galactose como monossacarídeos dominantes e/ou periféricos, portanto mais facilmente hidrolizáveis. A arabinose foi o único componente detectado após 15 minutos de hidrólise com TFA 2M. Ramnose foi detectada somente após 4 horas de aquecimento com o mesmo ácido, ou pelo uso de enzimas de caramujo ou de pectinase de *Aspergillus*. Logo, a análise em cromatografia em camada delgada confirma os resultados obtidos em cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência e, ainda, indica a presença de dois tipos de ácidos urônicos, sendo um o ácido galacturônico.

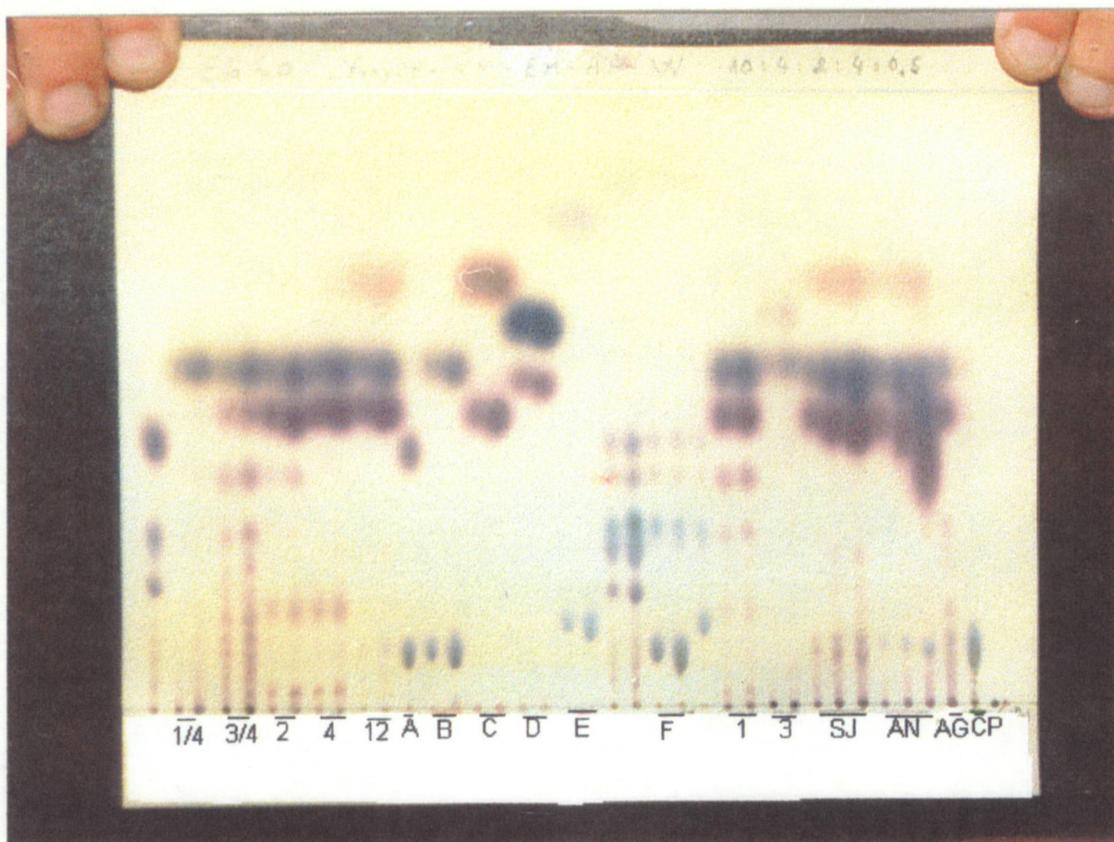


Figura 28 - Cromatografia em camada delgada dos hidrolisados ácido e enzimáticos da goma do *Cereus peruvianus* (Cromoplaca=silica gel 60, Merck; solvente=isopropanol:nitrometano:acetato de etila:ácido acético:água, 10:4:2:4:0.5; visualização= 0,5 g% de orcinol em ácido sulfúrico:metanol 5:95, 100 °C por 5 minutos) Amostras: 1/4, 3/4, 2, 4, 12 = tempo (horas) de hidrólises com TFA 2M em 100 °C; 1,3 hidrólises em pH 1 ou 3 com TFA por 12 horas a 100 °C; SJ e AN= hidrólises enzimáticas com suco gástrico de caramujo ou com pectinase de *Aspergillus niger* por 12 horas a 40 °C; AG e CP= hidrólises controle para enzimas de *A. niger* com larch arabinogalactana e pectina cítrica respectivamente. Padrões (em ordem de Rf decrescente): A= dissacarídeo arabinosil-galactose + ácido D-galacturônico (sal de Na⁺); B= L - arabinose + ácido D-galacturônico; C= L-ramnose + D-galactose; D= D-xilose + D-glucose; E= D-glucoronolactona + ácido D-glucorônico; F= ácido 4-O-metil -glucorônico (impuro; Rf 0.29) + ácido D-galacturônico.

2.8 Eletroforese em papel

A eletroforese em papel foi utilizada com a finalidade de detectar os tipos de ácidos urônicos presentes na goma, pois permite a utilização de quantidades de amostras que são proibitivas em cromatografia de camada delgada. A análise (figura 29) indicou a ocorrência de dois

diferentes ácidos urônicos na estrutura da goma de *Cereus peruvianus*. Um foi o ácido galacturônico confirmando a indicação prévia da cromatografia em camada delgada (incubações enzimáticas), o qual provavelmente se encontra em maior quantidade. Não se descartando que o outro composto ácido, de menor migração eletroforética e em menor quantidade seja 4-O-me-glucurônico. Nas hidrólises enzimáticas uma pequena quantidade de um provável dímero (digalacturônico) fica visível e com migração pouco superior ao aldobiurônico (xilose-4-O-me-glucurônico derivado de *Mimosa scabrella*).

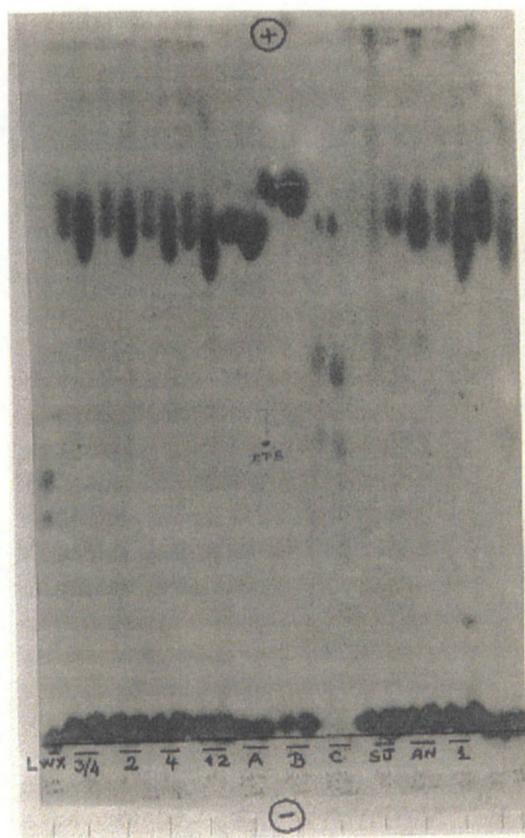


Figura 29 - Eletroforetograma dos hidrolisados ácido e enzimático da goma de *Cereus peruvianus*. (Papel = Whatman 2-chr; tampão volátil = 10% de piridina-0,4% de ácido acético; condições de corrida: 1,5 kV, 20 mA, 65 min.; visualização = nitrato de prata alcalino). Amostras (como na figura 36). Padrões : LWX = oligossacarídeos uronilados de xilana larchwood O-acetilada; A= ácido D-galactourônico + L-arabinose; B= ácido D-glucurônico + L-ramnose; C=ácido4-O-metil-glucurônico+ácidos aldobio e aldotriurônicos.

2.9 Caracterização espectroscópica da ramnoarabinogalactana ácida

Entre as informações dadas pela técnica espectroscópica (figura 30) pode ser apontado o estado O-acetilado da goma (sinais em $\delta = 169,72$ e $20,25$ para os grupos $-C=O$ e $-CH_3$ do ácido acético), $\delta = 17,45$ para o $-CH_3$ da L-ramnose; e sinais fortes em $105,1$ e 107 ppm para os carbonos anoméricos (C-1) das unidades de β -D-galactopiranosil e α -L-arabinofuranosil e para seus grupos (C-6)- e (C-5)- CH_2OH em $61,2$ e $60,2$ ppm, respectivamente. Claramente distinguidos, foram também, os três sinais adicionais para todos os outros carbonos do anel da α -L-arabinofuranosil em extremidades não redutoras ($\delta=77,0$ a 84 ppm) parcialmente superpostas com aquelas sequências da β -D-galactopiranosil. Inesperadamente, não houve nenhuma indicação do alto conteúdo de ácido galacturônico ($\delta = 174,0 - 176,0$ ppm para (C-6)- $COOH$ e $= 100,0 - 101,0$ ppm para o carbono anomérico C-1), já que os sinais são bem menos perceptíveis no espectro. Esta visualização ficou facilitada numa amostra sucessivamente permeada por Dowex-50- H^+ , o que provocou redução dos sinais de arabinose e incremento dos sinais advindo da porção uronila do polímero.

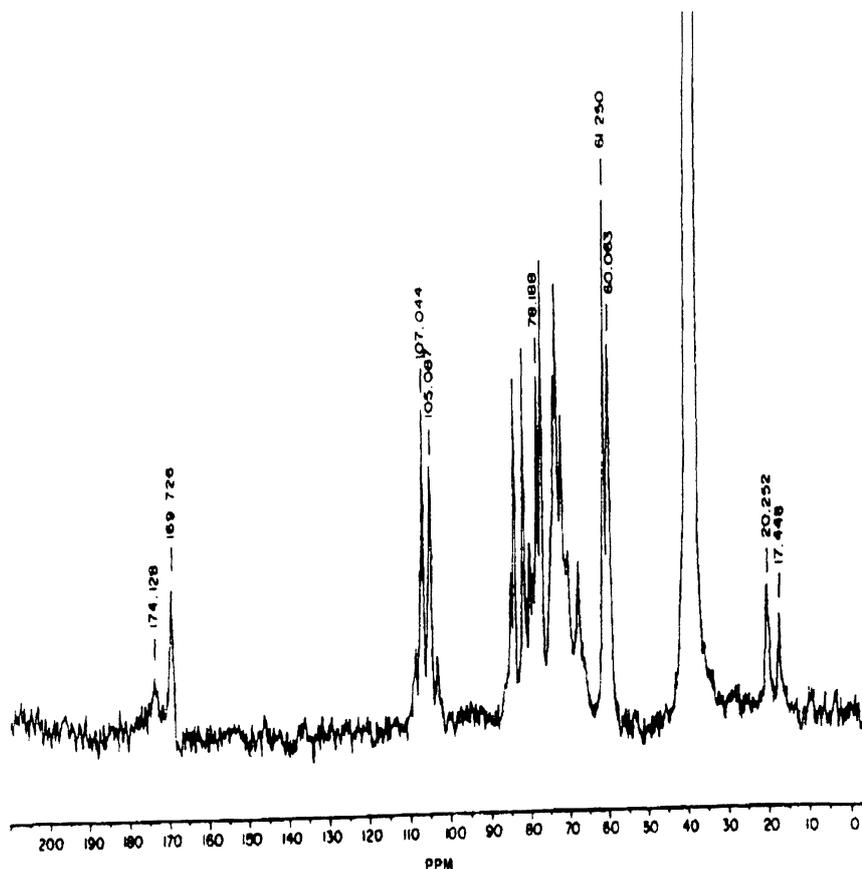


Figura 30 - Espectro ^{13}C -NMR da glicana ácida do *Cereus peruvianus*. O maior pico do lado direito é do DMSO-D 6 .

2.10 Avaliação da massa molar através de GPC

A massa molar ponderal média (Mw) do polissacarídeo foi avaliada em $10,81 \times 10^6$ (em torno de onze milhões) e a massa molar média em número (Mn) foi de 796.800. A razão entre Mw e Mn (Mw/Mn) dá uma indicação quanto ao grau de polidispersão. Para a amostra analisada, o grau de polidispersão foi de 13,57, portanto, a amostra se apresentou bastante polidispersa em termos de massa molar. Pelo cromatograma da figura 31, observa-se o perfil de distribuição de massa molar. Foram separadas sete regiões, sendo a primeira constituída de componentes com massa molar superior a 5.000.000 e a última região a ser eluída, com componentes de

massa molar menores que 1000; na tabela 20 é apresentada as percentagens de área correspondentes a cada região

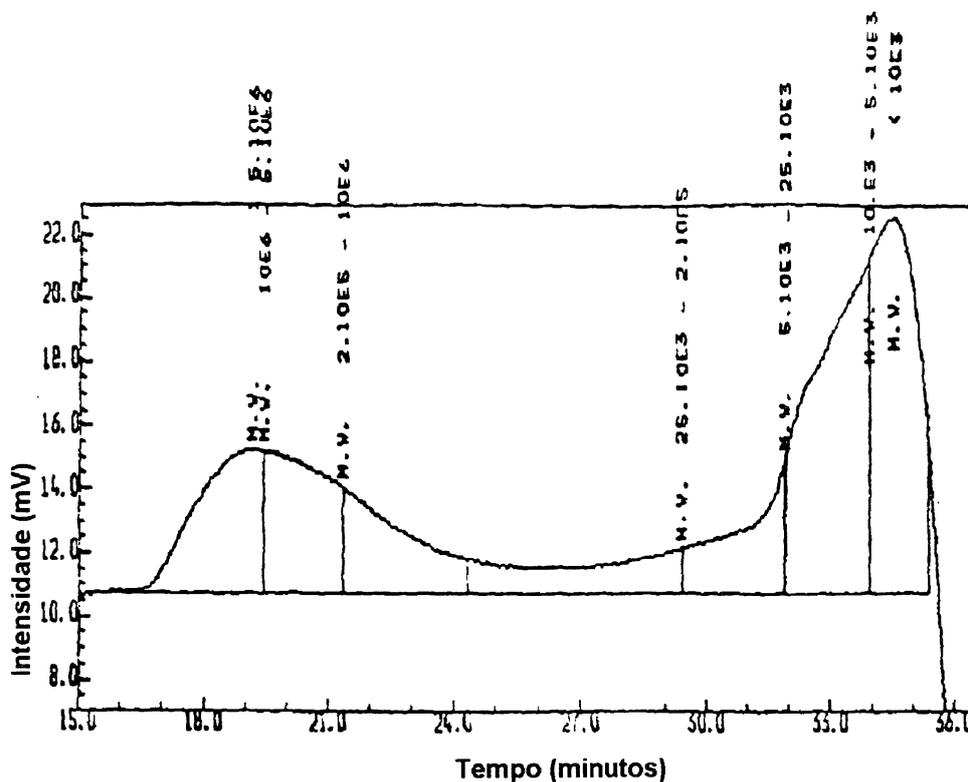


Figura 31 – Distribuição da massa molar do polissacarídeo extraído do *Cereus peruvianus* através de cromatografia de permeação em gel .

Tabela 20 - Áreas correspondentes às frações com diferentes massas molares.

Região –TR (min.)*	Área %	Massas molares
1 - 19,151	13,11	$> 5 \cdot 10^6$
2 - 19,428	12,17	$10^6 - 5 \cdot 10^6$
3 - 21,327	9,45	$2 \cdot 10^5 - 10^6$
4 - 29,391	7,66	$25 \cdot 10^3 - 2 \cdot 10^5$
5 - 31,865	8,19	$5 \cdot 10^3 - 25 \cdot 10^3$
6 - 33,935	25,70	$10^3 - 5 \cdot 10^3$
7 - 34,553	23,71	$< 10^3$

*TR - tempo de retenção em minutos

Duas hipóteses surgiram: O alto valor de massa molar poderia ser resultado de interações intercadeias do tipo covalente ou, poderia ser resultado de pontes de hidrogênio intercadeias, levando à formação de complexos moleculares. Questiona-se também a existência de mais de um tipo de polissacarídeo, pois, observa-se pela tabela 20 sete regiões.

2.11 Análise de ácidos fenol-carboxílicos

Com a finalidade de verificar se interações do tipo covalente poderiam estar influenciando o valor da massa molar estimado por GPC-LS; a presença de alguns ácidos fenol-carboxílicos foi examinada através de cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas. Os ácidos fenol carboxílicos são relatados na literatura (PILNIK & ROMBOUTS, 1985) como capazes de estabelecer pontes de diferulato entre cadeias de polissacarídeos, o que pode levar a um considerável aumento na massa molar e conseqüentemente nos valores de viscosidade intrínseca. O polissacarídeo obtido de *Cereus peruvianus* apresenta valores de viscosidade absoluta bastante elevadas, o que nos levou a investigar a presença de alguns ácidos fenol-carboxílicos no mesmo. Foram os seguintes padrões ácidos fenol carboxílicos examinados: p-coumárico, vanílico, siringico e ferúlico. Observando-se o cromatograma (figura 33) correspondente ao extrato da mucilagem, o qual apresentou fluorescência à luz do UV(intensificável após vapor de amônia), verifica-se a presença de picos com comportamento semelhante aos apresentados pelos padrões, porém, a análise de fragmentação dos mesmos, demonstra que nenhum deles corresponde aos fenol carboxílicos utilizados como padrões, exceto um reduzido percentual de p-coumárico. Portanto, se algum ácido fenol-carboxílico contribue para o aumento da massa molar da goma e, conseqüentemente, da sua viscosidade aparente, tratar-se-ia de ácido fenol-carboxílico diferente dos utilizados como padrões.

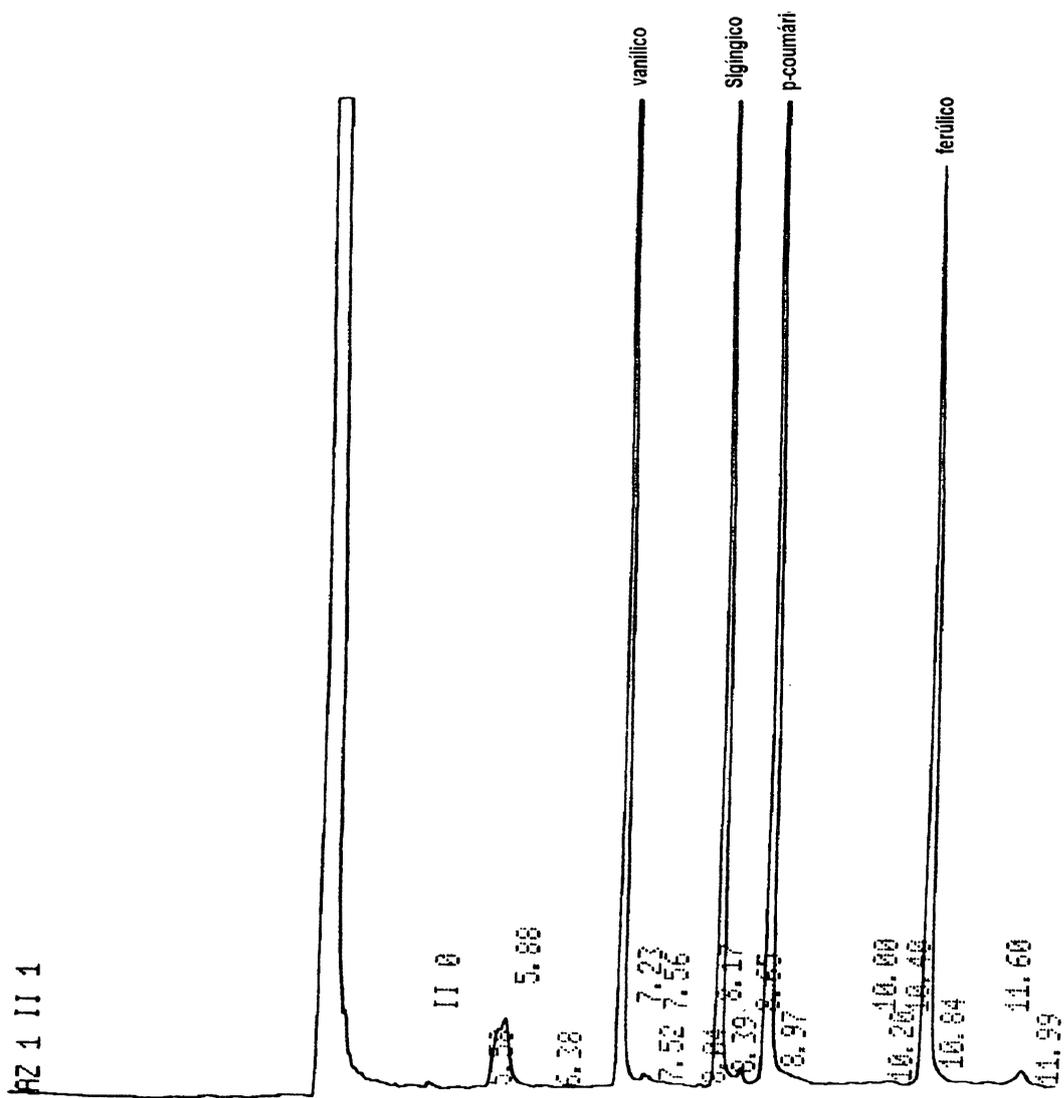


Figura 32 – Cromatograma de uma mistura de padrões de ácidos ferúlicos (silil derivatizados) determinados através de cromatografia gasosa em coluna capilar do tipo SE-30 de 25 metros.

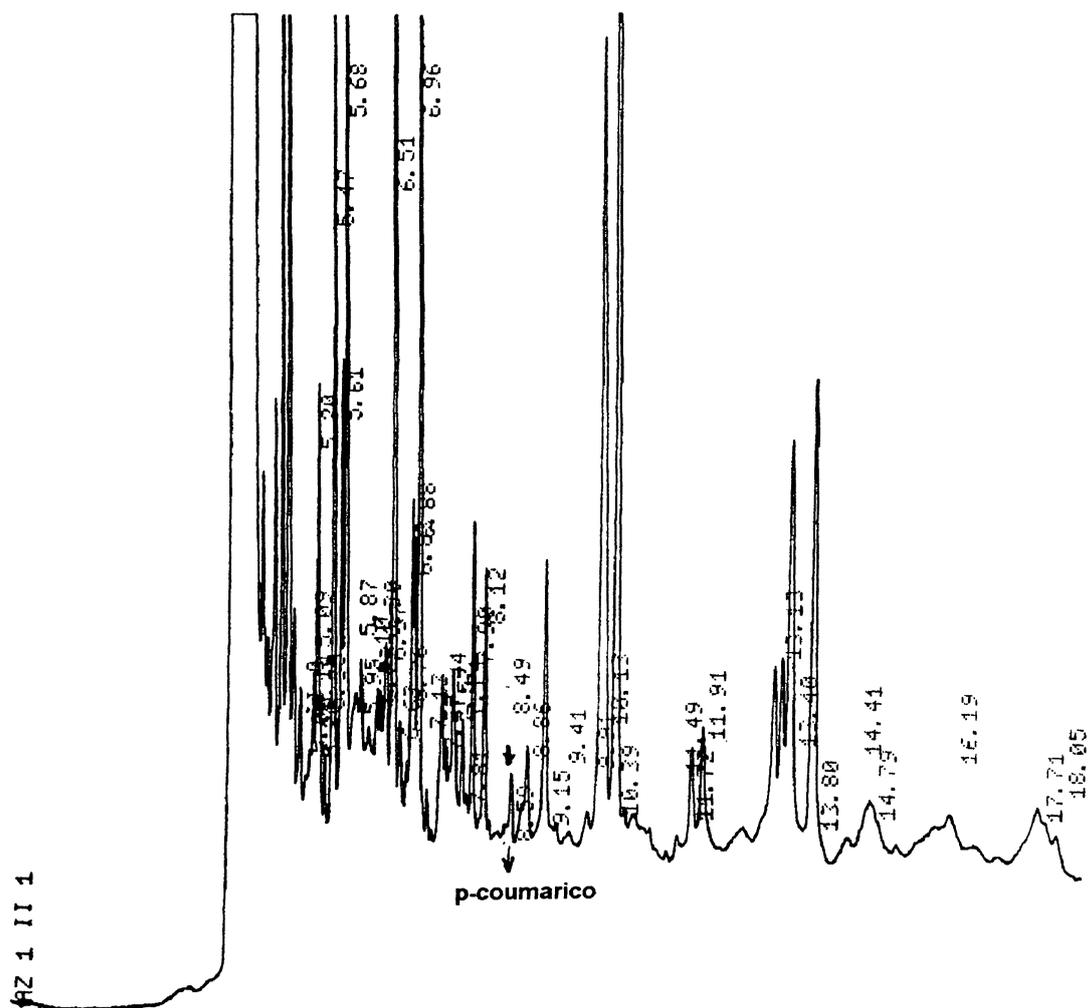


Figura 33 - Análise da presença de ácidos fenol carboxílicos (silil derivatizados) na mucilagem do cacto *Cereus peruvianus*, isolada a partir do parênquima aletas realizada por CG em coluna capilar SE-30 de 25 m..

2.12 Avaliação das pontes de hidrogênio intercadeias sobre a massa molar da mucilagem

O polissacarídeo obtido a partir de *Cereus peruvianus* teve a sua massa molar determinada através de cromatografia de permeação em gel

(G.P.C.) em solução aquosa e em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). Os resultados são apresentados na tabela 21. A massa molar ponderal média foi em torno de $10 \cdot 10^6$ para a amostra solubilizada em NaCl 1M e, em DMSO a massa foi avaliada em $5 \cdot 10^6$, portanto houve um decréscimo considerável da massa molar ponderal média quando se utiliza o solvente DMSO, o que significa que as pontes de hidrogênio apresentam um efeito marcante sobre a massa molar do polissacarídeo, uma vez que DMSO é conhecido pela propriedade de minimizar interações determinadas por pontes de hidrogênio. Portanto, o polissacarídeo obtido a partir do *Cereus peruvianus*, tem a sua massa molar aparente influenciada pelas pontes de hidrogênio, ou seja, o estabelecimento de pontes de hidrogênio intercadeias leva à formação de complexos intermoleculares.

Tabela 21 - Determinação da massa molar média ponderal M_w e da massa molar em número M_n em solução aquosa e em DMSO.

Valores Absolutos por SEC-DRI-LALLS	
Amostra	$M_w + 3\%$ [g. mol ⁻¹]
Poli Aletas em Sol. NaCl 1 M	10.000.000
Poli aletas em DMSO	5.000.000

2.13 Purificação da amostra com a finalidade de remoção de agregados.

Como observado no item 2.10, o polissacarídeo obtido por prensagem mecânica, apresentou-se bastante polidisperso em termos de massa molar ($M_w/M_n = 13,57$) e essa polidispersão é enormemente influenciada pelas pontes de hidrogênio (item 2.12). Uma solução diluída da

amostra foi submetida a um processo de purificação para eliminação de agregados e reprecipitada em etanol. A solução aquosa em presença de NaCl 1M teve a massa molar ponderal média (M_w) e a massa molar média em números avaliadas (M_n) por G.P.C. Como podemos observar pelos dados apresentados na tabela 22, houve uma redução significativa no valor da massa molar ponderal média (M_w) de 11.000.000 (item 2.10) e 10.000.000 (tabela 21 - polissacarídeo não purificado) para 1,4 milhões (tabela 22 - polissacarídeo submetido ao processo de remoção de agregados) e a polidispersão foi reduzida de 13,57 (item 2.10) para 2,99 .

Tabela 22 - Determinação da massa molar ponderal média M_w e da massa molar em número M_n para uma amostra purificada.

Valores Absolutos por SEC- DRI- LALLS			
Amostra	$M_w + 3\%$ [g/ mol]	$M_n + 5\%$ [g/ mol]	$M_w/M_n + 5\%$
Poli Aletas reprecitado com etanol em : sol. NaCl 1M	1.470.000	510.000	2,9

2.14 Determinação das constantes de Staundinger/Mark/Houwink

As constantes de Staundinger/Mark/Houwink, k e a foram determinadas utilizando-se a calibração Universal (tabela 23), sendo obtidos valores de K igual à 0,000027 e para a igual a 1,068. Estes valores indicam que a estrutura apesar de ser polidispersa em termos de massa molar, apresenta homogeneidade em termos de composição monomérica.

Tabela 23 - Detemininação das constantes de Staudinger/Mark/Houwink

Calibração Universal : Constantes de Staudinger/Mark/Houwink		
Amostra	SMH₁ K [g. cm⁻³] + 20 %	SMH₂a + 10 %
Dextrana	0,09780	0,500
Pululana	0,02680	0,650
Polissacarídeo reprecipitado em etanol e dissolvido em solução aquosa de NaCl 1M	0,000027	1,068

2.15 Determinação do número de viscosidade, raio da partícula e densidade do polímero

O polissacarídeo teve a distribuição de viscosidade (figura 34), distribuição do raio equivalente à esfera (figura 35) , e distribuição de densidade (figura 36) determinados. Os valores médios estão sumarizados na tabela 24. Estas medidas foram realizadas em solução aquosa na presença de NaCl 1M. A viscosidade intrínseca média foi de 27 [ml g⁻¹]. A viscosidade intrínseca variou entre 5 e 130 ml g⁻¹, mostrando portanto uma faixa bastante ampla de viscosidade intrínseca, a qual correlaciona com a distribuição de massa molar.

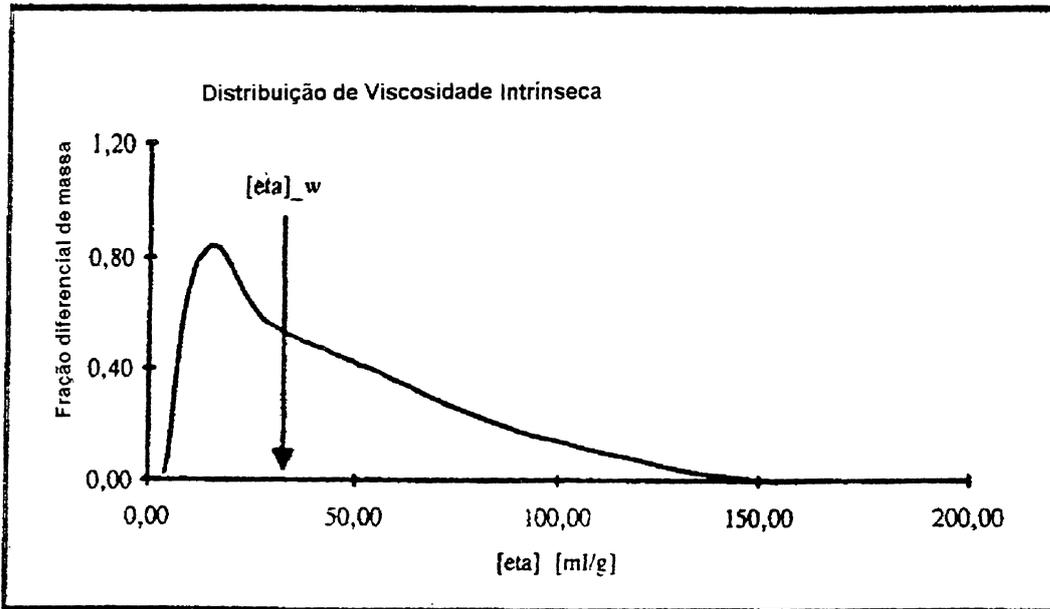


Figura 34 - Distribuição do número de viscosidade

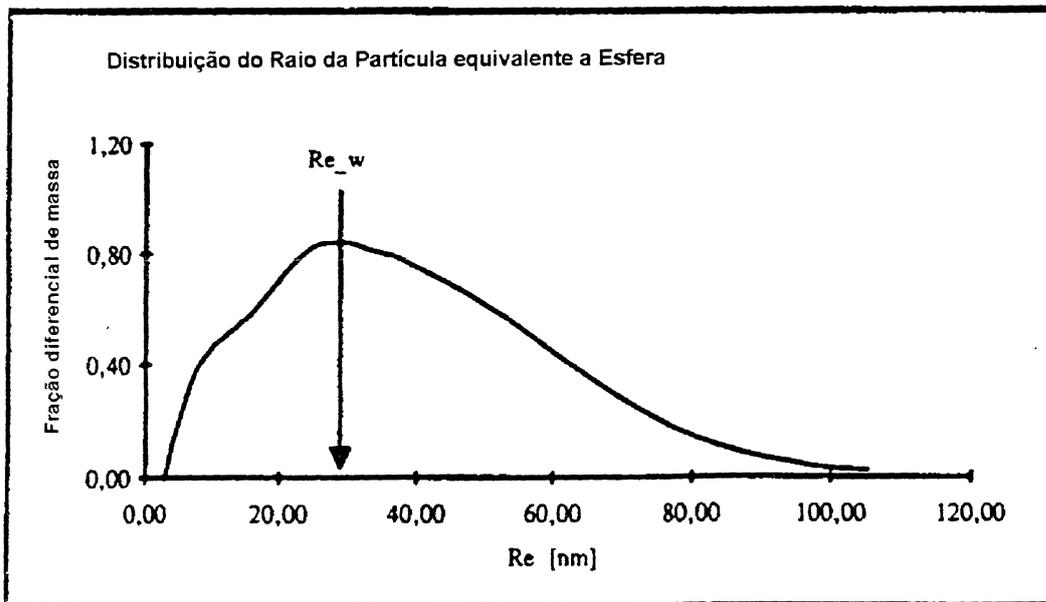


Figura 35 - Determinação da distribuição do raio equivalente à esfera.

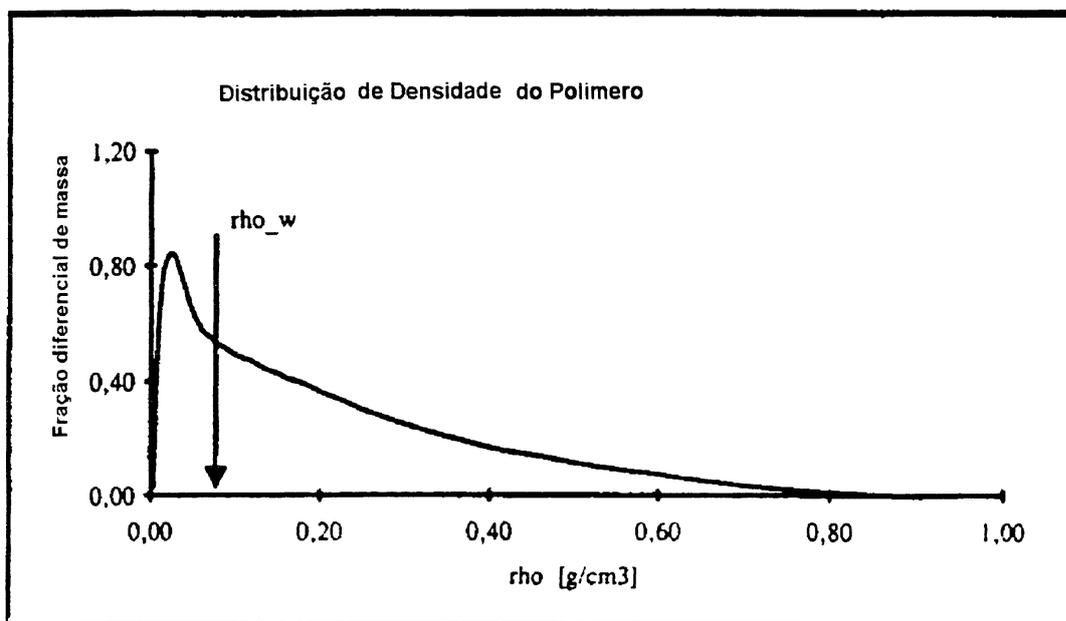


Figura 36 - Distribuição de densidade do polímero.

Tabela 24 - Calibração universal e SEC - DRI/LALLS para o polissacarídeo reprecipitado em etanol e dissolvido em solução aquosa de NaCl 1M.

Parâmetro	X- w	X-n
Número de viscosidade intrínseca: $1X = [\eta] \cdot [ml \cdot g^{-1}]$	27	16
Raio da partícula equivalente à esfera: $X = R_e [nm]$	27	16
Densidade do Polímero $X = \rho_e [g \cdot cm^{-3}]$	0,076	0,022

2.16 Ultrafiltração do Polissacarídeo extraído por prensagem mecânica automatizada.

O polissacarídeo extraído por prensagem mecânica automatizada teve a sua distribuição de massa molar examinada através de cromatografia de permeação em gel (G.P.C.) item 2.10 e, se mostrou bastante polidisperso

em termos de massa molar, sendo que 70% das áreas determinadas correspondem a substâncias com massas molares inferiores à 25 kDaltons. Com a finalidade de isolar a fração de maior massa molar, uma solução aquosa de polissacarídeo (10L, 0,1%) obtida por prensagem mecânica em presença de NaCl 1M, foi ultrafiltrada utilizando-se um sistema da Milipore equipado com módulo em espiral e membrana de acetato de celulose com corte de 100 kDaltons (figura 37) de acordo com o item 13 de Materiais e Métodos. A fração retida na membrana de 100 kD foi precipitada em álcool 1:3, e o permeado foi concentrado em membrana de acetato de celulose com 1 kD de corte, sendo este segundo retido, também precipitado com álcool.

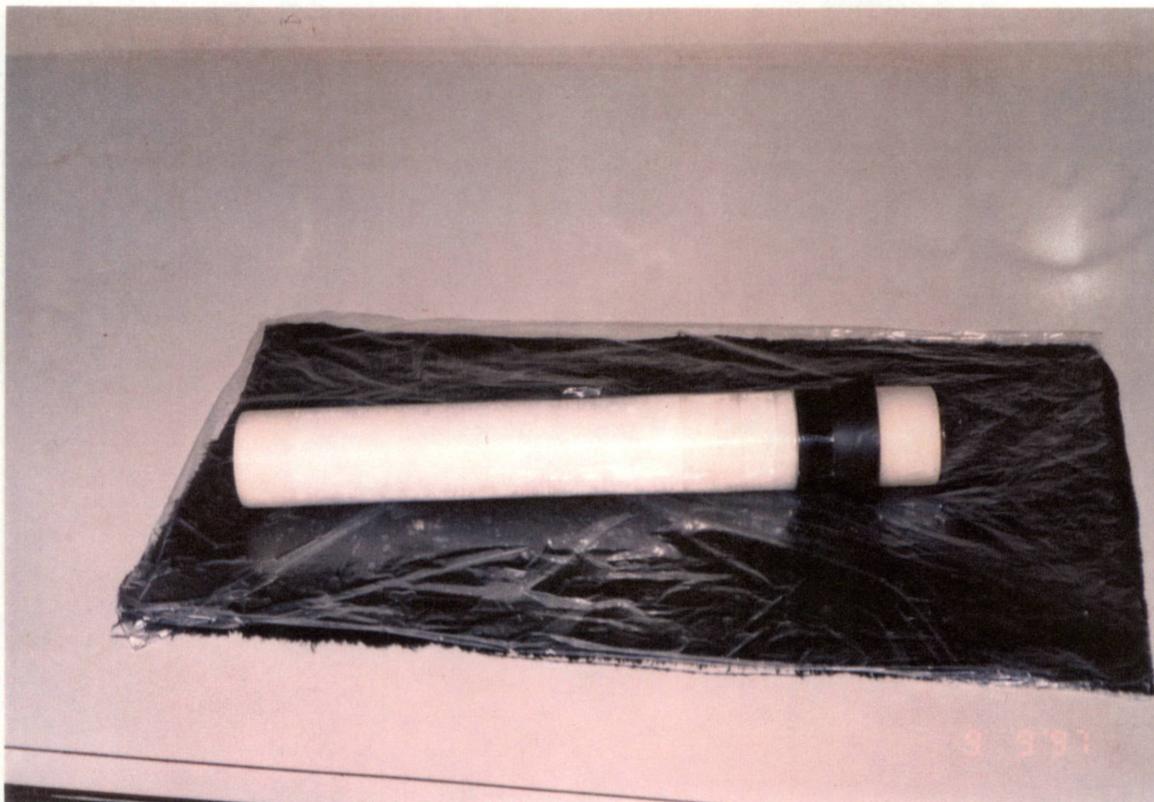


Figura 37 – Foto da membrana em espiral de acetato de celulose com 100 kD de corte utilizada para fracionar a solução de polieletrólito na concentração inicial de 0,1 % de sólidos totais.

Tabela 25 - Massas recuperadas nas membranas de 100 kD e 1kD (retentatos).

	100 kd	1 kd
massa recuperada em g	5,2	1,6
Rendimento %	52	16

Observa-se pela tabela 25 , que 52% da massa do polissacarídeo extraído por prensagem mecânica, apresenta massa molar acima do corte da membrana de 100 kd e, portanto, não foi capaz de permear a membrana. Do permeado, ficaram retidas 16% na membrana de 1kD.

2.17 Determinação da viscosidade absoluta do polissacarídeo integral e das frações obtidas por ultrafiltração

Soluções de polissacarídeos na concentração de 1,5% tiveram a sua viscosidade determinada em um viscosímetro da Brookfield LV modelo DVII. Observa-se pela tabela 26 que houve um ganho significativo dos valores de viscosidade sob baixo valores de velocidade de cisalhamento. Embora tenha ocorrido ganho nos valores de viscosidade nas condições testadas em relação ao polissacarídeo integral, temos que considerar que apenas 52% da massa foi retida na membrana de 100 kd.

Tabela 26 - Avaliação da viscosidade absoluta do polissacarídeo integral e do polissacarídeo concentrado em membrana de 100 kD.

$\dot{\gamma}$ (sec ⁻¹)	viscosidade mPa.s	
	Poli A 1,5% *	Poli A (100 kD) 1,5%**
0,39	4030	7600
0,79	3800	4700
1,98	1700	1900
3,96	780	970
7,92	430	520
15,84	170	160
39,64	87	60
79,20	42	35

* Poli A - polissacarídeo extraído por prensagem mecânica

** Poli A (100 kD) - polissacarídeo retido na membrana de 100 kD

O polissacarídeo concentrado em membrana de 100 kD apresenta valores de viscosidade absoluta superiores ao polissacarídeo integral sob baixas velocidades de cisalhamento, como mostrado na tabela 26.

2.18 Avaliação do polissacarídeo integral e do polissacarídeo concentrado em 100kD como auxiliar de floculação nos processos de potabilização de água

Polissacarídeos extraídos do cladódio de *Cereus peruvianus* têm sido descritos como agentes auxiliares de floculação (RODRIGUEZ 1984) atuando, portanto, como polieletrólitos. O polissacarídeo extraído por prensagem mecânica e a fração isolada através de ultrafiltração (retida em membrana de 100 kD) tiveram a sua capacidade de auxiliar de floculação testada em uma unidade da Sanepar. Como pode ser visto pelo gráfico da figura 38 o polieletrólito, na faixa de concentração entre 0,2 a 1,0 ppm,

funcionou como um auxiliar de floculação reduzindo a turbidez residual. Só com o sulfato de alumínio na concentração de 30 ppm para uma água com 45 UNF, foi removido 64% da turbidez. Com 30 ppm de sulfato mais o polissacarídeo na concentração de 1 ppm a remoção de turbidez chegou a 90 % (turbidez residual 10%). O polissacarídeo integral nas concentrações de 0,2 ppm e 0,4 ppm foi mais efetivo que o polissacarídeo concentrado em membrana com 100 kD de corte. A foto da figura 39 mostra o resultado do teste de jarras realizado com o polissacarídeo retido na membrana de 100 kD.

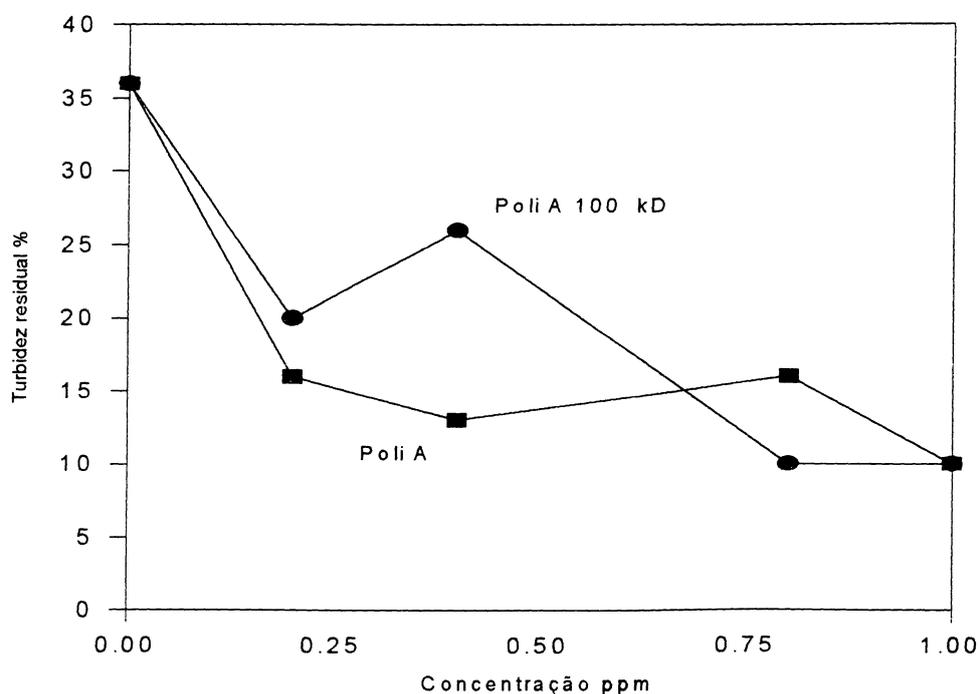


Figura 38 - Turbidez residual da água ribeirinha em função da concentração de poli A (polissacarídeo integral) e poli A 100 kD (fração do poli A retido na membrana de 100 kD)



Figura 39 - A foto acima mostra um teste de jarras realizado com o polissacarídeo retido em membrana de 100 kD. Em todos os bequeres foram adicionados 30 ppm de sulfato de alumínio. No bequer da esquerda não foi adicionado polieletrólito. Nos demais bequeres além do sulfato foi adicionado (da esquerda para a direita) : 0,2 ppm, 0,4 ppm, 0,6 ppm e 0,8 ppm de polieletrólito.

2.19 Desidratação em “spray dryer” do extrato aquoso do parênquima de *Cereus peruvianus* obtido por prensagem mecânica

O extrato aquoso obtido por prensagem mecânica, filtrado e centrifugado foi desidratado em “Spray dryer”. O produto obtido apresentou a vantagem de ser rapidamente reidratado, ao contrário dos polissacarídeos desidratados por precipitação alcóolica ; valores de viscosidade absoluta foram mantidos, como mostrado na tabela 27. As propriedades de auxiliar de floculação também foram mantidas como pode ser observado pela foto da figura 40. A solução contida no bequer central recebeu 30 ppm de sulfato de alumínio + 1 ppm de polieletrólito, enquanto nos demais bequeres foi adicionado apenas sulfato de alumínio 30 ppm. A foto da figura 41 mostra a desidratação do extrato aquoso em “spray dryer”.

Tabela 27 - Viscosidade absoluta do polieletrólito desidratado em “spray dryer”, cuja análise foi feita na concentração de 1,5%.

γ (seg ⁻¹)	Viscosidade absoluta mPa.s, PoliA*
0,39	4100
0,79	3750
1,98	1680
3,96	730
7,92	420

* À concentração de 1,5 % (massa/massa).

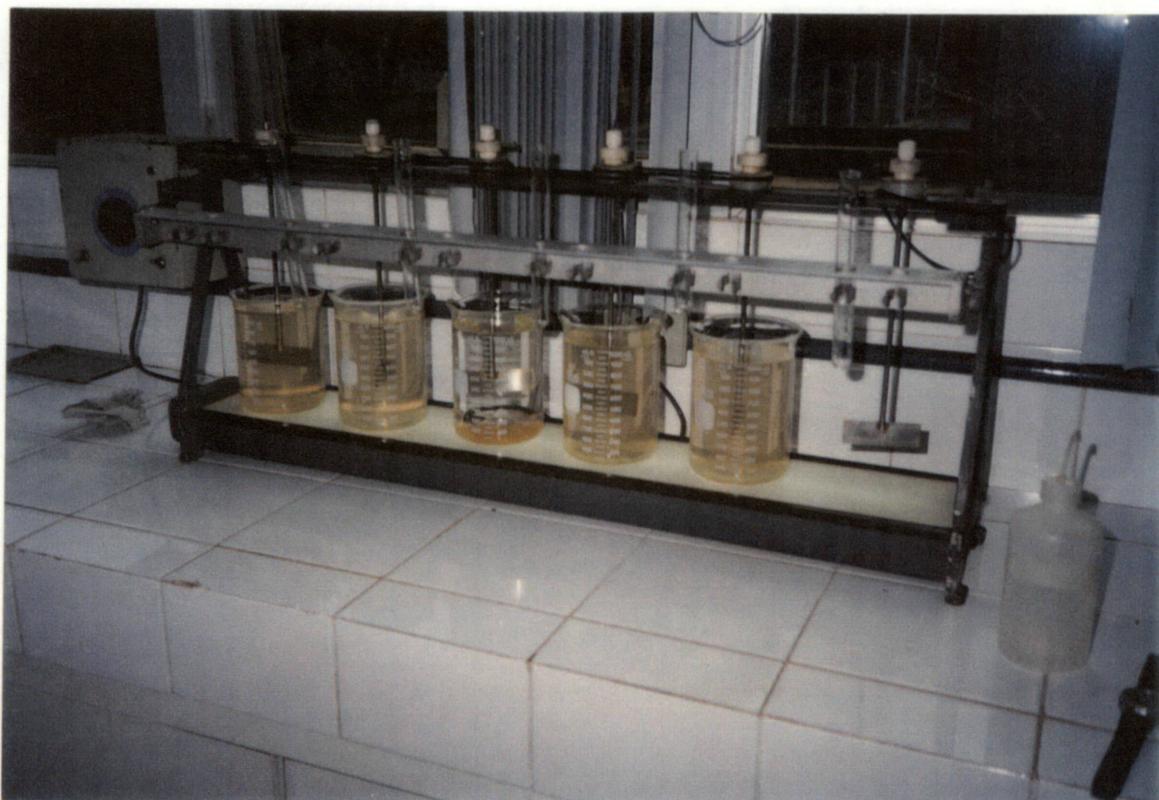


Figura 40 - Teste de jarras com o polissacarídeo obtido mediante concentração do extrato em osmose reversa e seco em spray dryer . O teste foi realizado com água bruta (42 UNF) na estação da Sanepar. Em todos os bequeres foram adicionados 30 ppm de sulfato de alumínio, sendo que no bequer do centro foi adicionado 30 ppm de alumínio + 1 ppm do polissacarídeo.



Figura 41 - Mucilagem do parênquima desidratada em "Spray dryer", após ser concentrada em osmose reversa.

2.20 Tratamento do chá de estévia com polieletrólito

O chá bruto de estévia obtido por percolação com água a 50 °C deve ser clarificado antes de ser submetido às demais etapas de extração do esteviosídeo. A clarificação utilizando sais metálicos em concentrações que variam entre 2 e 3% tem sido largamente empregada. Com o objetivo de reduzir o emprego de sulfato de alumínio, o polieletrólito do parênquima de *Cereus peruvianus* foi utilizado como auxiliar de floculação apresentando excelentes resultados (figura 42). A decantação foi muito mais rápida e eficiente utilizando-se solução de sulfato de alumínio 0,5 % em presença de 50 ppm de polieletrólito do que quando empregado apenas o sulfato de alumínio na concentração de 3%, como mostrado na figura 42. Os chás tratados (clarificados) foram submetidos a extração e os produtos obtidos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. O produto obtido a partir do chá pré-tratado com o polieletrólito de *Cereus* apresentou maior nível de pureza, 91,8% de adoçantes totais contra 86,5% para o produto obtido a partir do chá sem pré-tratamento com polieletrólito (figuras 43, 44, e 45). Ademais o esteviosídeo tratado com polieletrólito (o que pode ser evidenciado pela avaliação espectroscópica de diluições apropriadas de cada chá) apresentou um menor nível de pigmentação, o que favorece a sua formulação em produtos acabados sólidos e líquidos. O maior benefício do emprego do polieletrólito não é reduzir custos com sulfato de alumínio, mas sim melhorar as propriedades organolépticas do esteviosídeo, pois com o emprego do polissacarídeo, reduz-se a concentração necessária de sulfato de alumínio o que diminui os riscos de obtenção de um produto com gosto metálico.

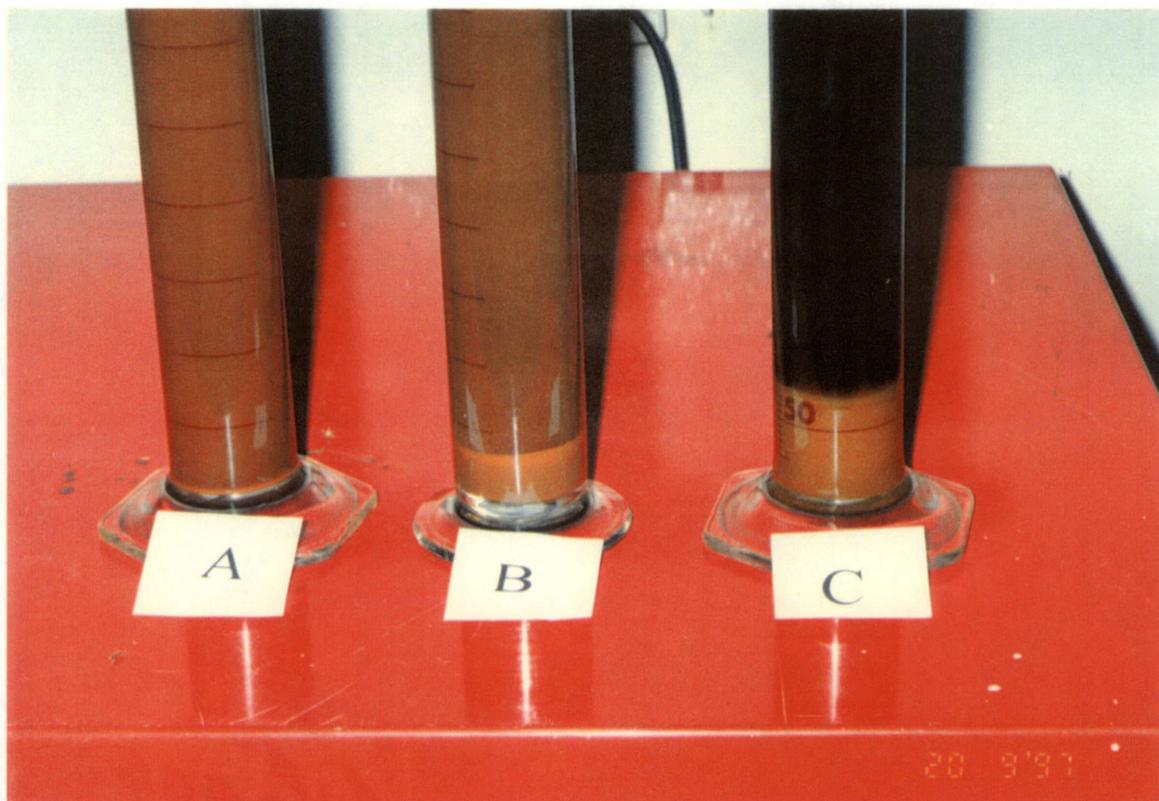


Figura 42 - Foto de amostras de chá de estévia : a) controle sem tratamento (primeiro da esquerda) , b) sulfato de alumínio 3% e c) sulfato de alumínio 0,5% + 50 ppm de polieletrólito.

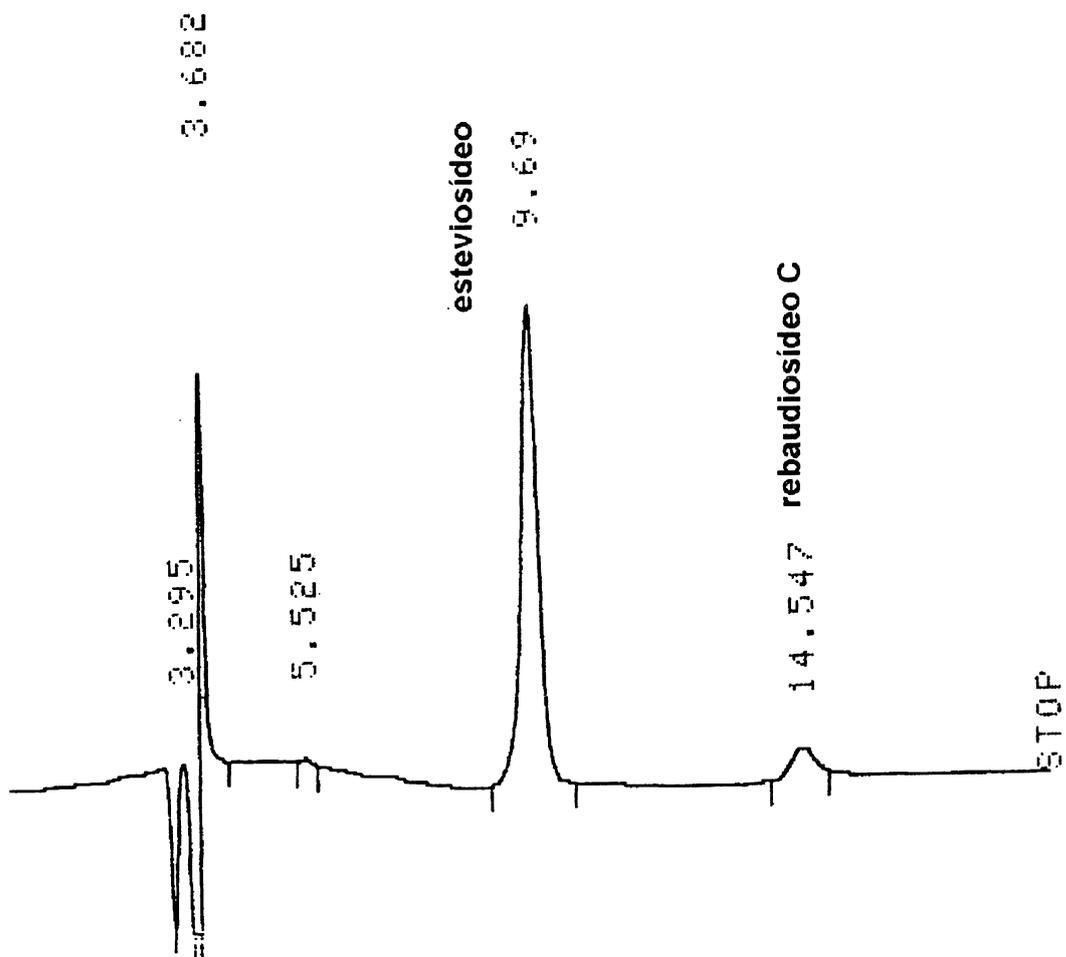


Figura 43 - Cromatograma do esteviosídeo obtido pelo tratamento do chá de estévia com sulfato de alumínio 0,5% + 50 ppm de polieltrólito. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se uma coluna LiChrospher (100NH₂, 5 μ) com sistema de solvente acetonitrilo:água (85:15). As substâncias foram quantificadas por comparação de áreas com padrões de esteviosídeo e rebaudiosídeo C cromatografados nas mesmas condições.

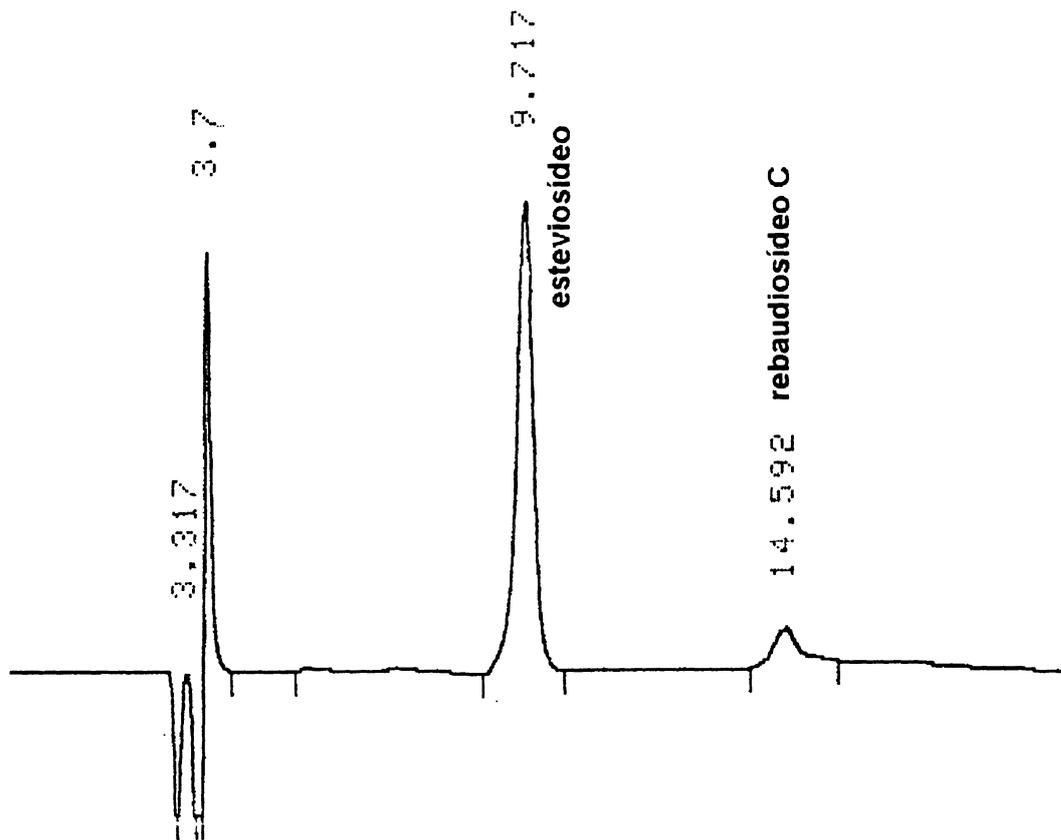


figura 44 - Cromatograma do esteviosídeo obtido a partir do chá tratado com sulfato de alumínio 3%. As condições de análises foram as mesmas descritas na figura 43.

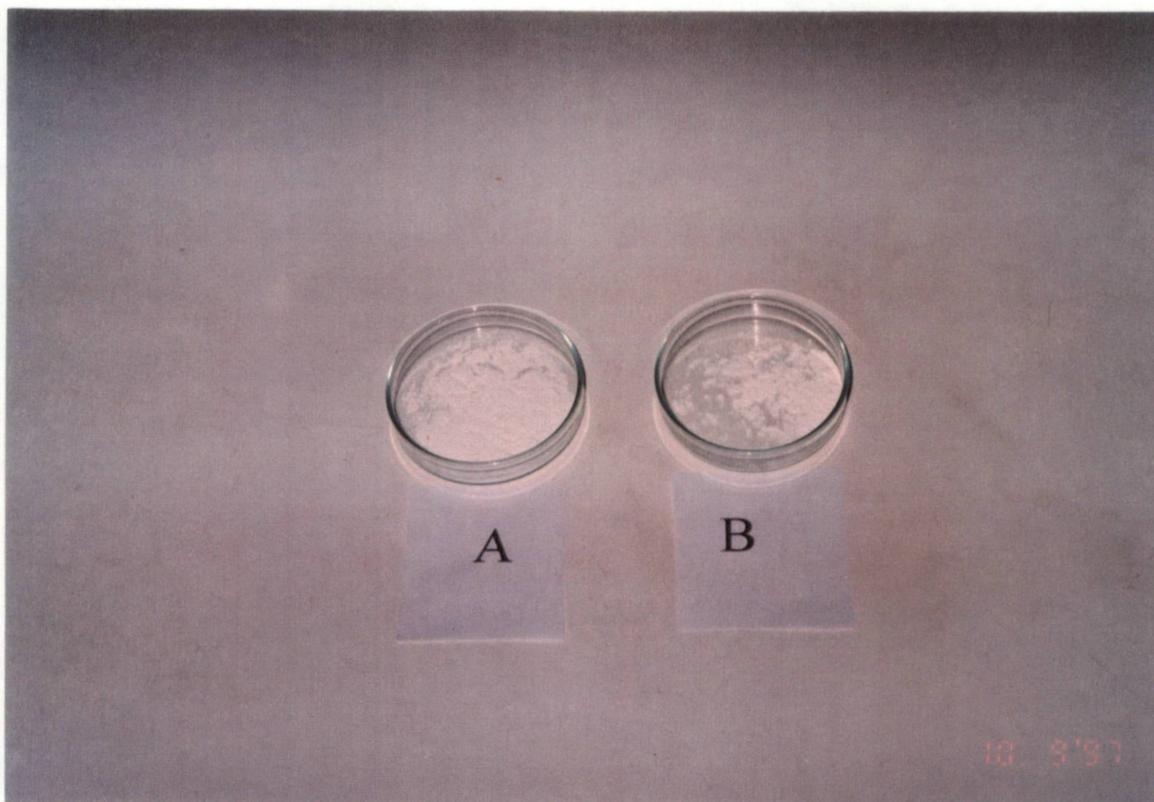


Figura 45 - Foto dos produtos obtidos a partir do chá de estévia tratado com sulfato de alumínio 3% (A) e a partir do chá tratado com sulfato de alumínio 0,5% + 50 ppm de polieletrólito (B).

2.21 Influência de alguns fatores sobre a viscosidade absoluta do polieletrólito

Os fatores analisados foram: técnicas de preparo da solução; influência de temperatura; influência do tempo com e sem presença de conservantes.

2.21.1 Preparo da solução de polieletrólito

Como o objetivo de verificar se a técnica utilizada na obtenção da solução de polieletrólito influi na viscosidade da mesma, foram preparadas várias amostras a 1,5g % (m/m) com métodos diferentes como segue :

AMOSTRA 1 - Em 0,75 g de polieletrólito foram adicionados 49,25 g de água destilada fria, com agitação manual até completa dissolução do polieletrólito.

AMOSTRA 2 - Em 0,75 g de polieletrólito foram adicionados 49,25 g de água destilada fervente (solução à 1,5 % m/m), seguida de agitação manual até completa dissolução.

AMOSTRA 3- Em 0,75 g de polieletrólito foram adicionados 49,25 g de água destilada fria. A agitação foi realizada em agitador magnético, sem aquecimento.

As amostras 1,2, 3 foram preparadas com polieletrólito tamisados em tamis número 100.

AMOSTRA 4 - Foi utilizada a mesma técnica de preparo da amostra 1, mas o polieletrólito não foi tamisado

AMOSTRA 5 - Mesma técnica da amostra 3, mas com polieletrólito tamisado e aplicando-se aquecimento durante a agitação.

Tabela 28 - Análise da viscosidade absoluta de soluções de polieletrólitos preparadas de várias formas.

$\dot{\gamma}$ (seg ⁻¹)	Viscosidade MPa.s				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
0,39	3210	3340	3510	3710	1440
0,79	2093	2200	2243	2347	1127
1,98	1103	2243	1200	1240	723
3,96	679	1200	735	755	501
7,92	423	735	456	467	339

Pelos dados apresentados na tabela 28, chegou-se a conclusão que as técnicas utilizadas no preparo das amostras 1, 2, e 3 (solubilização em água) são as mais adequadas e que não há a necessidade de tamisar o polieletrólito antes de usá-lo, uma vez que a amostra número 4, preparada pela mesma técnica da amostra número 1, com exceção que não foi tamisada, apresentou viscosidade absoluta na faixa de velocidade de cisalhamento testada, ligeiramente superior que as amostras 1, 2 e 3 que foram tamisadas. A amostra número 5, que foi aquecida durante a agitação, apresentou uma redução drástica nos valores de viscosidade absoluta, demonstrando, portanto, que o aquecimento e agitação prolongados (4 horas) são contraproducentes, abolindo boa parte da propriedade viscosificante original. Acredita-se que o aquecimento por períodos prolongados possa provocar hidrólise do biopolímero, o que reduziria as dimensões das cadeias e, conseqüentemente, o valor de viscosidade absoluta como observado para a amostra número 5.

2.21.2 Influência da temperatura na viscosidade de uma solução de polieletrólito

Um dos fatores que pode ter um efeito marcante no comportamento reológico de um material é a temperatura. Alguns materiais

são bastante sensíveis à variações de temperatura, e uma variação relativamente pequena pode resultar em uma mudança significativa na viscosidade. Uma solução de polieletrólito na concentração de 1,5 g % m/m teve a sua viscosidade medida nas seguintes temperaturas: 8, 25, 40, 55, 70 e 80°C, em ordem crescente, e em cada temperatura foi variada a velocidade de cisalhamento. Pela tabela 29 constata-se que a viscosidade decresce com o aumento de temperatura em todas as velocidades de cisalhamento testadas. Para cada temperatura, também houve redução da viscosidade em função da velocidade de cisalhamento, ou seja, em todas as temperaturas avaliadas a solução de polieletrólito 1,5% exibiu pseudoplasticidade.

Tabela 29 - Efeito da temperatura sobre a viscosidade de uma solução de polieletrólito de parênquima de *Cereus peruvianus* 1,5% (p/p): valores após aquecimento até cada temperatura de medida.

γ (seg ⁻¹)	Viscosidade mPa.s					
	8 °C	25 °C	40 °C	55 °C	70 °C	80 °C
0,39	4495	3290	2350	1920	1090	818
0,79	2800	2110	1590	1330	817	621
1,98	1435	1140	879	772	511	411
3,96	873	697	556	494	347	284
7,92		432	350	313	234	197
15,84			219	197	151	131
39,64					85.5	75,5
79,25						49.0

A solução foi mantida por 20 minutos à 80 °C e, em seguida, a temperatura do banho foi resfriada e as viscosidades medidas de 80 °C até 8 °C, portanto, em sentido decrescente. Observa-se que após 20 minutos de aquecimento a solução de polieletrólito apresentou um ganho de viscosidade em toda a faixa de velocidade de cisalhamento testada. Com a redução da temperatura (resfriamento) os valores de viscosidade absoluta reassumiram

os valores próximos dos originais, ou seja a partir de pré-aquecimento direto em cada faixa de temperatura na faixa de 8 a 70 ° C. Esta importante observação, pelo menos na faixa de pH e tempo testadas, alinha-se em favor da qualidade do polieletrólito, ou seja, comportamento reológico termo-reversível.

Tabela 30 - Medidas da viscosidade de uma amostra de polieletrólito de parênquima de *Cereus peruvianus* a 1,5% (p/p): pré-aquecimento até 80°C e medidas após reversão a cada temperatura desejada.

$\dot{\gamma}$ (seg ⁻¹)	Viscosidade mPa.s					
	80 °C	70 °C	55 °C	40 °C	25 °C	8 °C
0,39	1100	1230	1600	2090	2730	3910
0,79	832	902	1130	1435	1839	2450
1,98	521	543	669	832	1005	1305
3,96	357	367	436	523	627	807
7,92	235	242	284	333	393	
15,84	152	157	180	210	247	
39,63	85,5	88,8				
79,20						

Das tabelas 29 e 30 observa-se que a amostra quando aquecida de 8 a 80 °C e novamente resfriada retoma praticamente os seus valores iniciais de viscosidade, indicando portanto uma certa estabilidade nesta faixa de temperatura no intervalo de tempo de 50 minutos, que foi o período de duração do experimento.

2.21.3. Influência do tempo sobre a viscosidade

A viscosidade de diferentes soluções foram determinadas nos seguintes intervalos de tempos, após o preparo das amostras: 1 dia, 3 dias, 10 dias, 17 dias e 31 dias (tabela 31). Desta maneira foi observado o comportamento das soluções por um período de 1 mês quando estocadas à temperatura ambiente.

Tabela 31 - Viscosidade da amostra 1 (sem conservante) em diferentes velocidades de cisalhamento durante o período de 1 mês.

	Viscosidade mPa.s					
	1 dia	3 dias	10 dias	17 dias	25 dias	31 dias
0,39	3090	1885	521	215	115	85,5
0,79	2005	1320	416	168	83,2	60,1
1,98	1080	792	298	126	57,1	26,1
3,96	670	511	220	101	47,1	22
7,92	417	332	167	86,6	44,6	21,5
15,84		214	121	70,1	39,1	19,2
39,60			78,5	51,6	33,3	18,2
73,21				40,7	28,2	16,7

Foi observado na amostra 1 (solução sem conservante), durante o desenvolvimento desta etapa, uma diminuição muito acentuada e rápida da viscosidade e aparecimento de odor intenso e desagradável, indícios claros de contaminação microbiológica. Através de bacterioscopia (amostra 1) e do cultivo em ágar-sangue, observou-se a presença de leveduras e bacilos Gram positivos (BGP).

Observa-se nas tabelas 32 e 33 que, no período de 1 mês, o problema de contaminação microbiológica pode ser satisfatoriamente contornado e que o metil-parabeno (manutenção de aproximadamente 2/3 da

viscosidade) foi mais eficiente que o benzoato de sódio na ação conservante e anti-microbiana.

Tabela 32 - Viscosidade da amostra 2 (conservante: benzoato de sódio), em diferentes velocidades de cisalhamento, durante o período de 1 mês.

Viscosidade mPa.s						
	1 dia	3 dias	10 dias	17dias	25 dias	31 dias
0,39	3020	2675	2405	2170	1430	741
0,79	1960	1770	1630	1470	1050	591
1,98	1075	976	906	839	638	401
3,96	668	665	568	536	423	293
7,92	416	382	358	339	281	210
15,84		240	227	215	184	148
39,60						88,8
73,21						

Tabela 33 - Viscosidade da amostra 3 (conservante: metil parabeno) durante o período de 1 mês.

Viscosidade mPa.s						
	1 dia	3 dias	10 dias	17dias	25 dias	31 dias
0,39	3335	3175	2860	2645	2435	2210
0,79	2120	2050	1890	1770	1650	1450
1,98	1150	1120	1040	979	909	835
3,96	715	681	638	611	574	538
7,92						217
15,84						
39,60						
73,21						

2.22 Avaliação do efeito sinérgico com proteínas recuperadas de resíduos curtidos da indústria de beneficiamento de couro bovino

A proteína colagênica (perfil de aminoácidos na tabela 34) obtida a partir do pó de rebaixadeira por digestão termoquímica ou enzimática e posterior purificação por ultrafiltração e osmose reversa, apresenta viscosidade absoluta relativamente baixa em comparação com a viscosidade aparente de outras proteínas, como a caseína por exemplo. Uma das possíveis aplicações da proteína recuperada de aparas curtidas (figura 46) é na formulação de xampus. Blendas de proteína com polieletrólito apresentaram viscosidade absoluta significativamente maiores do que a soma das viscosidades apresentadas pelos componentes da blenda isoladamente sob baixas velocidades de cisalhamento. A tabela 35 mostra os valores de viscosidade para uma solução de proteína recuperada na concentração de 28,5%; os valores de viscosidade aparente de uma solução de polieletrólito 1,5% e os valores para a blenda contendo 28,5% de proteína mais 1,5% de polieletrólito. O efeito sinérgico é notável (cerca de 50% na menor velocidade de cisalhamento).

Tabela 34 - Perfil de aminoácidos da proteína recuperada de aparas curtidas.

Aminoácidos	Média (g/100g de amostra)
Ác. Aspártico	8,02 ± 0,37
Treonina	1,10± 0,02
Serina	1,48±0,06
Ác. glutâmico	10,03±0,38
Prolina	11,77±0,55
Glicina	21,94±1,10
Alanina	8,88±0,54
Valina	2,05±0,18
Metionina	0,62±0,09
Isoleucina	1,31±0,18
Leucina	2,63±0,16
Tirosina	zero
Fenilalanina	1,68±0,08
Histidina	0,82±0,30
Lisina	3,69±0,16
Arginina	6,46±0,31

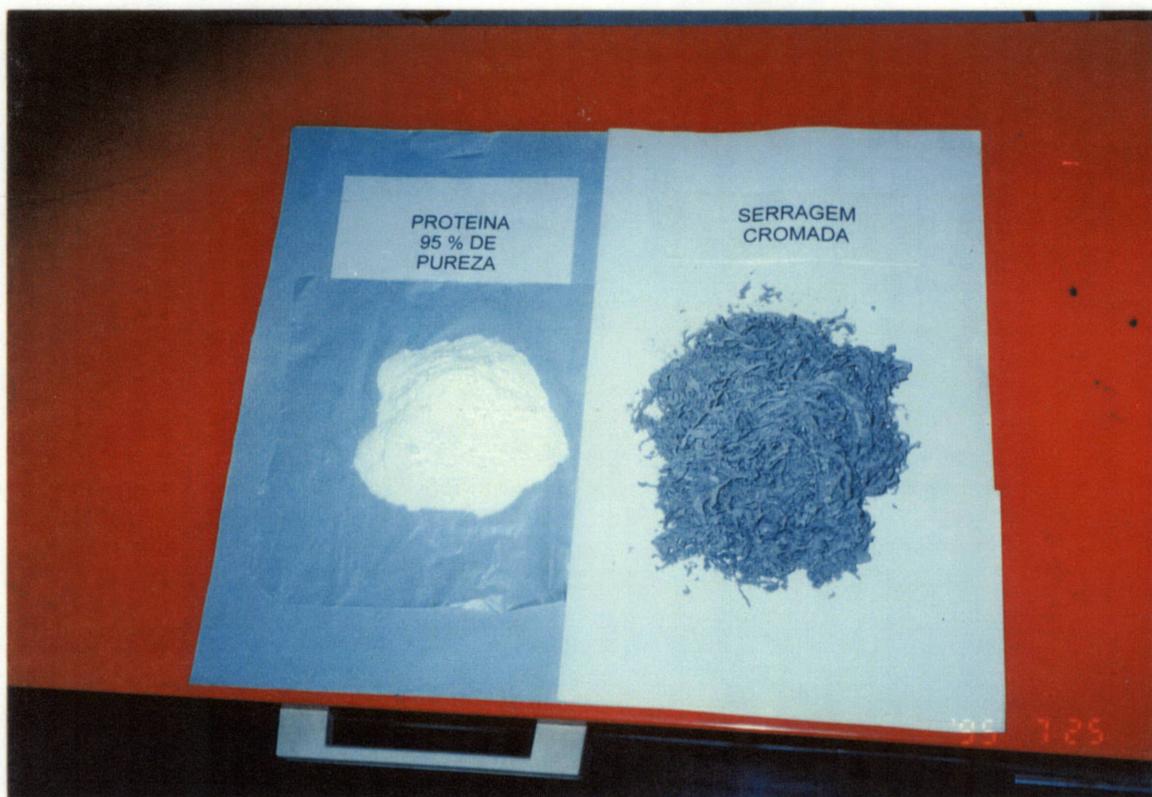


Figura 46 - A foto acima mostra as aparas curtidas (resíduos sólidos de curtumes) e, do lado esquerdo a proteína colagênica recuperada através de técnicas de ultrafiltração e osmose reversa .

Tabela 35 - Avaliação da viscosidade absoluta de solução proteica colagênica, solução de polieletrólito e solução resultante da combinação de ambos os solutos.

γ (seg ⁻¹)	Viscosidade Absoluta mPa.s		
	Proteína 28,5 %	Polieletrólito 1,5%	Blenda *
0,39	2150	3970	9600
0,79	1400	2400	4850
1,98	600	1150	1850
3,96	180	630	970
7,92	120	190	485
15,84	61	90	234

- Blenda - solução contendo 28,5 % de proteína mais 1,5 % de polieletrólito.

3.0 Cutícula do cacto colunar *Cereus peruvianus* como fonte de pectina e cera

3.1 Desengorduramento/ extração de ceras

A cutícula seca do *Cereus peruvianus* foi desengordurada com clorofórmio em extrator tipo Soxhlet e apresentou um teor de ceras de 10,33%, de acordo com os resultados mostrados na tabela 36.

Tabela 36 - Rendimento da extração de ceras da cutícula do *Cereus peruvianus*.

Número de extrações	Rendimento %
1	9,40
2	10,20
3	11,40
média	10,33 ± 1,00

É bem conhecida a importância da proteção cerosa para as plantas suculentas de regiões áridas no que diz respeito, principalmente, às perdas de água. Esta fração lipídica teve os seus principais componentes determinados qualitativamente através de Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrômetro de Massa (item 3.23).

3.2 Determinação do teor de proteínas totais

A cutícula desengordurada e triturada em um moinho de facas teve o seu teor de proteínas totais determinadas (tabela 37) pelo método de Kjeldhal.

Tabela 37 - Determinação do teor de proteínas totais na cutícula de *Cereus peruvianus*.

Número de determinações	Teor de Proteínas Totais g%
1	4,18
2	4,56
3	4,20
Média	4,31 ± 0,21

3.3 Extração de substâncias pécticas com a mistura EDTA/oxalato de amônio

A cutícula do *Cereus peruvianus* triturada em um moinho de facas foi extraída com uma mistura de EDTA/oxalato de amônio 0,25% em estufa 80 °C. Foram realizadas 23 extrações em uma amostra de 10 gramas. A razão massa líquido de extração em cada ciclo foi de 1:10 . Os líquidos de extrações foram reunidos e tratados com álcool na proporção 1:3, obtendo-se um rendimento de 39,8 % em relação à massa sêca desengordurada da cutícula do *Cereus peruvianus* (ALVAREZ *et alli*, 1995).

3.4 Extração com ácido diluído

A cutícula finamente dividida foi extraída pelo método comumente utilizado para extração de pectinas de pele de citrus e bagaço de maçãs (descrito no item 7.2 de Material e Métodos) o qual emprega ácido mineral diluído (HCl) e temperatura de 100 °C para a extração. Foi obtido um rendimento de 9,47 % de substâncias pécticas, logo um rendimento bem menor que aquele obtido pelo procedimento de extração, utilizando uma mistura quelante de íons divalentes.

3.5 Extração de substâncias pécticas pelo método ácido/base (A/B)

A cutícula do *Cereus peruvianus* na granulometria de 48 mesh foi submetida ao método de extração descrito no item 7.3 de Material e Métodos, que consiste basicamente em tratar a cutícula com ácido clorídrico concentrado e, em seguida, solubilizar as substâncias pécticas na forma de pectatos de sódio, utilizando uma solução de hidróxido de sódio. Este método possibilitou um rendimento de 37 % de substâncias pécticas em relação à cutícula seca e desengordurada. Embora o rendimento seja inferior do que aquele obtido pelo tratamento com a solução sequestrante de cálcio, foi bem maior que o rendimento obtido pelo tratamento com ácido clorídrico diluído a quente (100°C). O método apresentou a vantagem de ser mais rápido e menos trabalhoso que o método utilizando solução sequestrante de cálcio.

Diante deste fato nos propusemos a determinar quais tipos de cátions estavam sendo removidos pelo tratamento ácido/básico, otimizar o método de extração, comparar o material que estava sendo obtido pelos dois processos, a fim de confirmar se o produto obtido pelo método ácido/base era uma substância que estava presente *in natura* na cutícula ou, se era um artefato do método de extração.

3.6. Determinação do teor de cinzas na cutícula antes e depois do tratamento ácido

A cutícula desengordurada teve o seu teor de cinzas determinado, cujos resultados são mostrados nas tabelas 38 e 39.

Tabela 38 -Teor de cinzas da cutícula de *Cereus peruvianus* antes do tratamento com HCl 6 M.

Determinações	Teor de cinzas %
1	9,86
2	9,70
3	8,70
Média	9,42 ± 0,62

Observa-se pela tabela 38 um teor elevado de cinzas na cutícula. A cutícula foi submetida a tratamento ácido (tabela 39) e apresentou resultados que são uma indicação segura de que o tratamento ácido realmente promove a descationização, liberando assim as substâncias pécticas que podem ser solubilizadas na forma de pectatos de sódio. Com a finalidade de determinarmos a composição de cátions foi feita o monitoramento da cutícula antes e após o tratamento ácido através de absorção atômica (vide item 3.7).

Tabela 39 - Teor de cinzas da cutícula do *Cereus peruvianus* após tratamento com HCl 6M

Deteminações	Teor de Cinzas
1	0,51
2	0,51
3	0,50
média	0,51

3.7 - Determinação do teor de cátions na cutícula antes e depois do tratamento ácido (processo de descationização)

A cutícula nativa desengordurada (CND) , como pode ser visto pela tabela 40 apresenta um alto teor de cálcio , cerca de 37.700 ppm. Após ser submetida ao tratamento com ácido clorídrico 6M por 30 minutos numa proporção de 1:3 (massa/volume) e lavada exaustivamente com água

deionizada, a cutícula foi denominada de CNDTA , observa-se que o magnésio foi totalmente removido pelo tratamento ácido, bem como 96% do cálcio. As substâncias pécticas da cutícula descationizada foram solubilizadas pelo emprego de hidróxido de sódio (1N) . Portanto, observa-se que os cátions divalentes Ca^{++} e Mg^{++} são removidos pelo tratamento ácido, permitindo-se assim que as substâncias pécticas (SP) sejam solubilizadas na forma de sal de sódio.

Tabela 40 - Determinação da composição de cátions na cutícula do *Cereus peruvianus*, antes e após tratamento ácido, e nas substâncias pécticas.

Amostras	Cations (ppm)					
	Cu^+	Fe^{++}	Ca^{++}	Mg^{++}	K^+	Na^+
CND	1,8	64	37.703	3952	nd	114
CNDTA	1,8	56,2	1.648,2	nd	nd	34
SP	1,8	66,17	357,5	127	nd	3500

CND - Cutícula nativa desengordurada.

CNDTA - Cutícula nativa desengordurada após tratamento ácido.

SP - Substâncias pécticas.

nd - não detectado.

3.8- Recuperação do sulfato de cálcio a partir do filtrado ácido.

Como observamos que uma grande quantidade de cátions divalentes estavam sendo removidos na forma de cloretos solúveis no filtrado ácido , resolvemos concentrar o filtrado e fazer o tratamento do mesmo com ácido sulfúrico 10% para a obtenção do sulfato de cálcio (gesso).

Tabela 41 - Determinação gravimétrica do sulfato de cálcio obtido a partir da cutícula do *Cereus peruvianus*.

Massa de Cutícula tratada (g)	Sulfato de Cálcio Isolado (g)	Rendimento em %	Teor de Cinzas
50	3,89	7,80	86
100	7,12	7,60	89
100	7,14	7,50	90
média		7,63 ± 0,15	90

O subproduto em análise teve o teor de cinzas determinado , sendo que 90 % do pretense sulfato de cálcio é constituído de material não volátil à 700 °C. Com a finalidade de verificar a composição de cátions deste precipitado, o mesmo foi submetido à análise de espectrofotometria de absorção atômica (v. próximo item).

3.9 Análise em Espectrofotometria de Absorção Atômica do sal isolado do filtrado ácido

O sal isolado do filtrado ácido, através do tratamento com ácido sulfúrico 10%, teve a sua composição determinada por espectrofotometria de Absorção atômica, conforme tabela 42.

Tabela 42 - Determinação de alguns cátions por espectrofotometria de absorção atômica do precipitado isolado do filtrado ácido.

Amostra	Cátions (ppm)		
	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺
Precipitado isolado do filtrado ácido	260.104,00	47,51	21,90

Com bases nestes resultados, percebe-se que realmente o precipitado obtido a partir do filtrado ácido é constituído principalmente de sal de cálcio na forma de sulfato de cálcio. A presença do mangânes na amostra nos motivou a monitorar a presença do mesmo através de

Ressonância Paramagnética Eletrônica, uma vez que é possível inferir a respeito de sua vizinhança.

3.10 Análise de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

O processo de extração de substâncias pécnicas foi monitorado através de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). As seguintes frações foram examinadas: Cutícula nativa desengordurada (CND), cutícula nativa desengordura e descationizada pelo tratamento ácido (CNDTA). Devido a limitações na fonte, só foi possível examinar o manganês, e através do mesmo algumas informações puderam ser tiradas em relação ao próprio manganês e, também em relação à sua vizinhança durante o processo de extração que compreende basicamente duas etapas: uma etapa de descationização e outra de solubilização de substâncias pécnicas na forma de pectatos de sódio. Esta técnica é interessante pois não há necessidade de abertura da amostra, e a mesma também não é modificada ou destruída durante o processo de análise. A análise da CND (cutícula nativa desengordurada) mostra a presença de seis linhas centradas em 3100 gauss (figura 47 - CND), geradas pela estrutura hiperfina do manganês, indicando a presença de outros cátions na vizinhança do mesmo e ainda mostra que o mesmo está bastante diluído. Na cutícula descationizada (CNDTA), que já demosramos através de espectrofotometria de absorção atômica, que cálcio e magnésio são removidos quase que completamente, o espectro de ressonância paramagnética eletrônica mostra o desaparecimento da estrutura hiperfina do manganês, indicando que outros cátions da sua vizinhança foram removidos pelo tratamento e que o manganês agora apresenta como vizinhos o próprio manganês (figura 47 -CNDTA), porém, como pode ser visto, em uma concentração bem reduzida. Logo, a ressonância paramagnética eletrônica confirma que o processo de extração se baseia na remoção de cátions, preferencialmente de cátions alcalinos terrosos (conforme tabela 42).

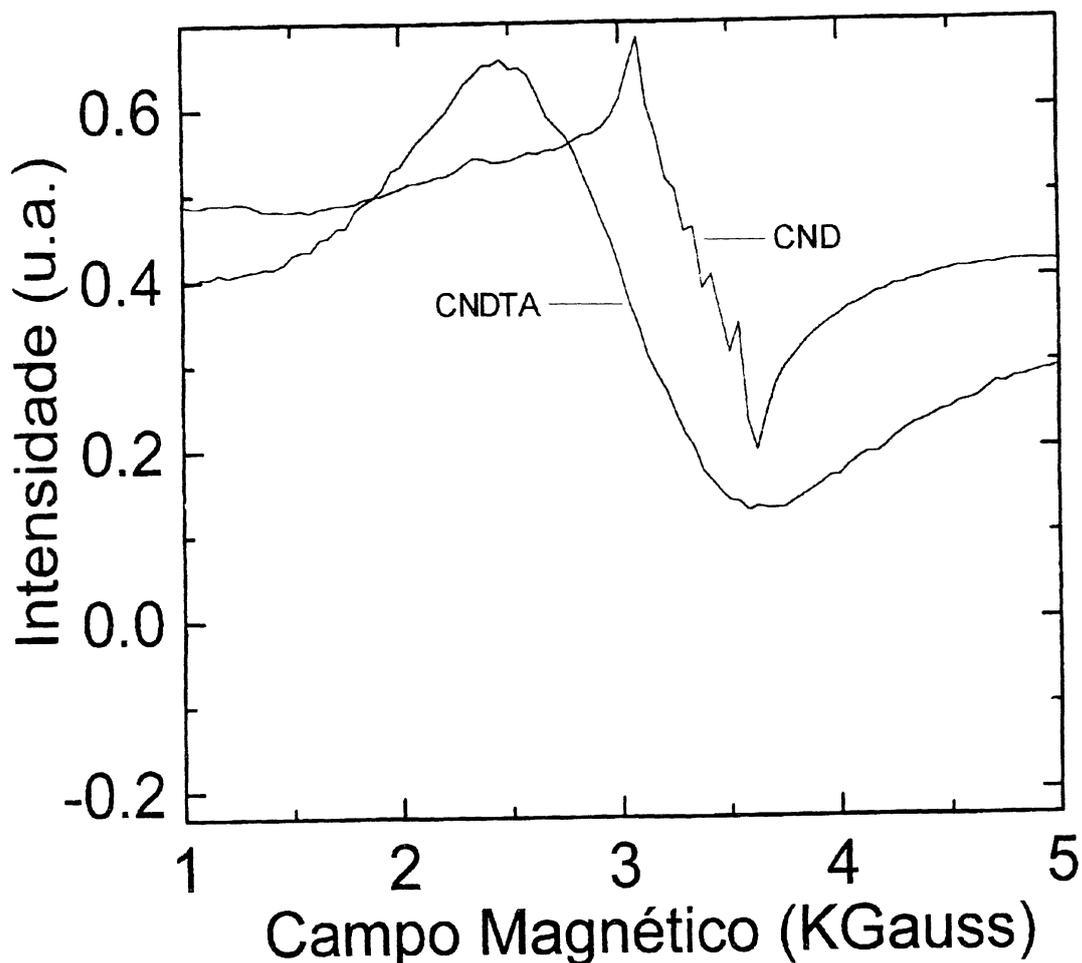


Figura 47 - Análise de ressonância paramagnética eletrônica na cutícula antes (CND) e depois do tratamento ácido (CNDTA).

3.11 Comparação das substâncias pécnicas obtidas pelo método A/B e pelo método EDTA/Oxalato de amônio

Uma comparação prévia em termos de rendimento e parâmetros físico-químicos foi realizada, antes de procedermos estudos visando a otimização do método de extração de substâncias pécnicas cuticulares.

I - Comparação em termos de rendimento:

As substâncias pécnicas obtidas pelo tratamento com solução sequestrante ou quelante de íons divalentes apresentou rendimento de 39,8% (item 3.3) contra rendimento de 37% (item 3.5) obtida pelo tratamento A/B.

II- Comparação via determinação de alguns parâmetros físico-químicos das substâncias pécticas obtidas por diferentes métodos.

Através de ambos métodos (tabela 43) as substâncias pécticas se apresentaram com alto teor de ácidos urônicos, 96,0% para as substâncias extraídas pelo método A/B (ácido/base) e 94,50% para as substâncias pécticas extraídas pelo método E/O (EDTA/Oxalato de amônio), portanto o método de extração teve pouca influência sobre o teor de ácidos urônicos. Observamos uma diferença em relação ao teor de acetila, que foi de 0,15 para o processo E/O e não foi detectada a presença de acetila no produto extraído pelo método A/B; também foi detectada diferença no grau de metoxilação (metoxiluronato), o material extraído com E/O apresentou grau de metoxilação (metoxiluronato) de 7,35 enquanto que o material extraído com A/B foi de 1,67. Os valores de rotação ótica em torno de $[\alpha] +220$ são consistentes com o alto teor de ácido urônico determinado através do método fenil-fenol. Conclui-se portanto, que as substâncias pecticas extraidas por ambos métodos, são ácidos pécticos ou pectinas de baixo teor de grupos metoxilas.

Tabela 43 - Propriedades físicas e químicas das substâncias pécticas obtidas pelo método A/B e pelo método E/O.

	Substâncias Pécticas	Pécticas
g%	CP – E/O	CP - A/B
Ácidos urônicos	94,50	96,00
O-acetil	0,15	-
Metoxil	1,11	0,25
Metoxiluronato	7,35	1,67
$[\alpha]^{20}_D$	+ 222	+ 220

3.12. Aplicação do método A/B (ácido/base) para a extração de pectinas de outras fontes

O método A/B foi aplicado também para extração de substâncias pécticas, utilizando-se como fonte o albedo da laranja e o

bagaço da *Pfáfia iresinóides* (ginseng brasileiro). O albedo da laranja quando tratado a frio com ácido clorídrico 6M se dissolveu completamente, dificultando em muito a lavagem para remoção do ácido. O bagaço da *Pfáfia* teve um comportamento mais próximo ao da cutícula do *Cereus peruvianus*; o material tratado com ácido foi facilmente lavado e a posterior solubilização em álcali foi bastante parecida com a da cutícula do *Cereus peruvianus*.

Tabela 44 - Rendimento e propriedades físicas e químicas de pectinas extraídas de outras fontes pelo método A/B (ácido/base).

Fonte	Método A/B Rendimento G(%)	Rotação Óptica [α] _D	Teor de Ácidos Urônicos %
<i>Pfáfia iresinóides</i>	16,0%	+ 227	78
Albedo de laranja	18%	+ 255	74

A pectina de laranja extraída pelo método A/B apresentou teor de ácidos urônicos compatíveis com os dados descritos na literatura, porém apresentou um baixo grau de metoxilação 15%. A pectina de laranja se apresentou com um aspecto fibroso, uma clara indicação que se trata de uma substância de baixo teor de grupos metoxilas, o que está de acordo com o alto valor de rotação óptica determinada. A pectina da *Pfáfia* quando extraída pelo método A/B também apresentou baixo teor de grupos metoxilas e alto valor de rotação óptica. Estes dados mostram, de forma inequívoca, que o processo de extração A/B conduz à desesterificação. Talvez o processo A/B não tenha uma influência muito grande sobre o grau de metoxilação e até sobre a massa molar da pectina do *Cereus peruvianus*, pelo simples fato da mesma já estar desesterificada na cutícula nativa. Observa-se pelo processo de extração com ácido diluído (item 3.4), método que não provoca a desesterificação em grande extensão, que a pectina obtida (rendimento de 9,47%) também apresenta um baixo grau de metoxilação 12%. O fato da pectina de *Cereus peruvianus* se encontrar com

um baixo nível de esterificação na cutícula pode minimizar a despolimerização durante o processo de extração pelo método ácido/base, uma vez que a reação de β -eliminação não seria tão dramática para pectinas desesterificadas quanto o é para pectinas de alto teor de grupos metoxilas.

3.13 Caracterização da substância péctica da cutícula do *Cereus peruvianus* através de Cromatografia Gasosa acoplado com Espectrômetria de Massa.

A substância péctica foi carboxireduzida pelo método descrito no ítem 5.9 de Material e Métodos, e o hidrolisado reduzido e acetilado foi analisado em espectrofotômetro de massa acoplado com cromatografia gasosa. O pico maior (figura 49) foi identificado como hexacetato, com tempo de retenção igual ao do hexaacetato obtido a partir da galactose (figura 48). Não foi identificado nenhum outro pico correspondentes aos açúcares (alditóis acetados) mostrados na figura 48. Logo, conclui-se que a substância péctica cuticular corresponde a um homopoligalacturonato.

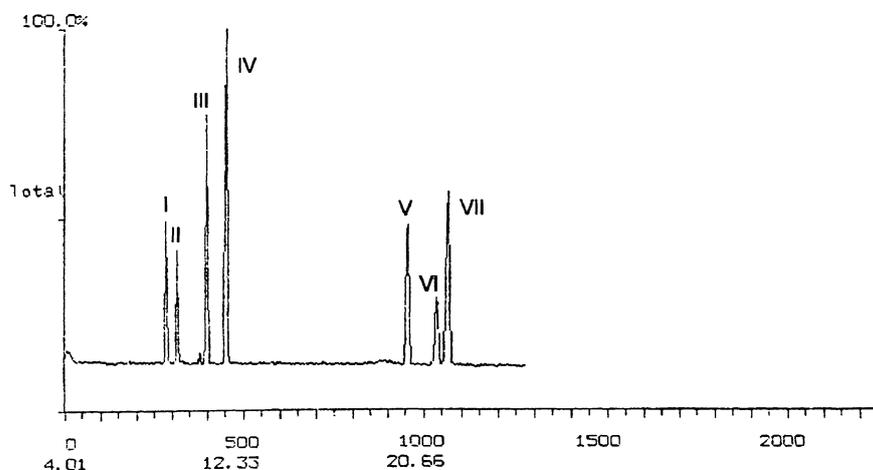


Figura 48 - Mistura de padrões contendo L-ramnose (I), L-fucose (II), D-arabinose (III), D-xilose (IV), D-manose (V), D-glucose (VI), D-galactose (VII) na forma de alditóis acetatos.

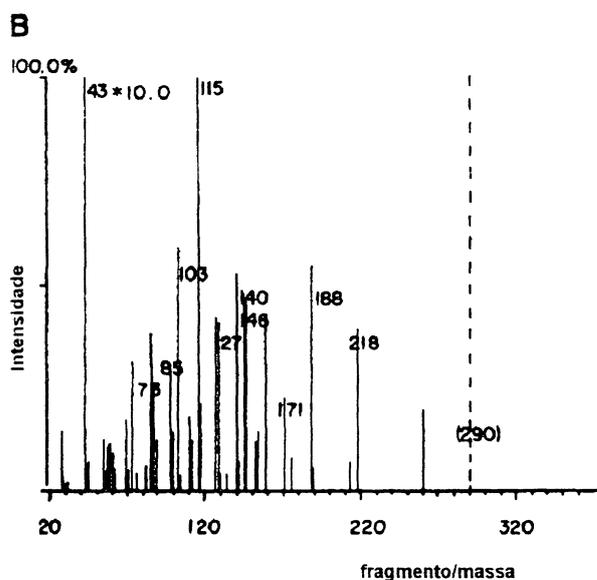
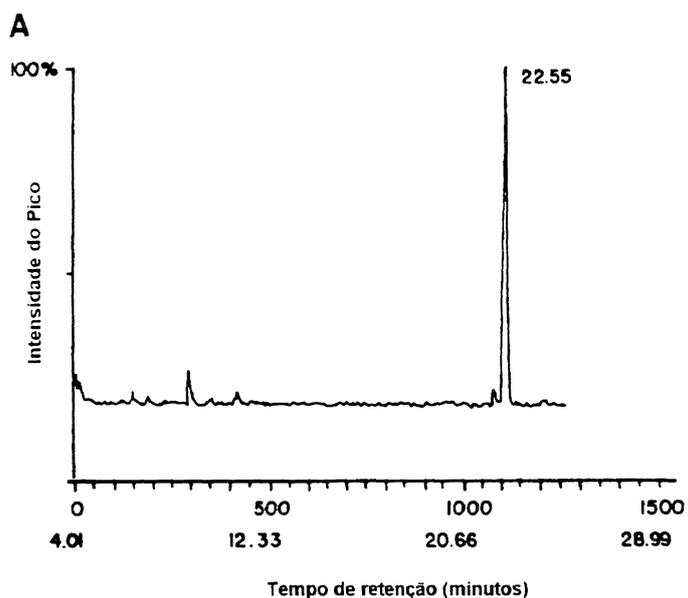


Figura 49 - Poligalacturonato da cutícula do *Cereus peruvianus*, carboxireduzido, hidrolisado, reduzido e paracetilado. A análise foi obtida utilizando-se uma coluna capilar do tipo IF-547 à temperatura de 240 °C. b) espectro de massas do pico com tempo de retenção igual a 22,55 min.

3.14 Hidrólise enzimática e análise dos produtos através de eletroforese em papel

O material foi extensivamente enzimolizado por 2 conjuntos de complexos enzimáticos, e analisados por eletroforese em papel, mostrando D-galacturônico como único componente. Na figura 50, linhas 4 -5 e 6 -7

para pectato extraído pelo método ácido/base e incubados com enzima obtida de *Megalobulimus paranaguensis* e pectinase fungica respectivamente, demonstrando, portanto, que o ácido péctico realmente não apresenta açúcares neutros tais como a D-galactose que normalmente é encontrada. O ácido péctico extraído com a mistura de extração EDTA/Oxalato de amônio também foi incubado com as mesmas preparações enzimáticas, como pode ser vista nas linhas 10-11 e 12-13, respectivamente. Ambas preparações enzimáticas cruas, apresentavam atividades de galactosidase e ramnosidase que foram inferidas do exame das linhas 15 e 16, onde D-galactose ou L-arabinose e traços de L-ramnose foram vistas claramente como subprodutos da digestão da pectina de laranja. Conclui-se, portanto, que o ácido péctico (principalmente como sal de Ca^{++}) é estrutura nativa encontrada na cutícula dos cladódios do *Cereus peruvianus*.

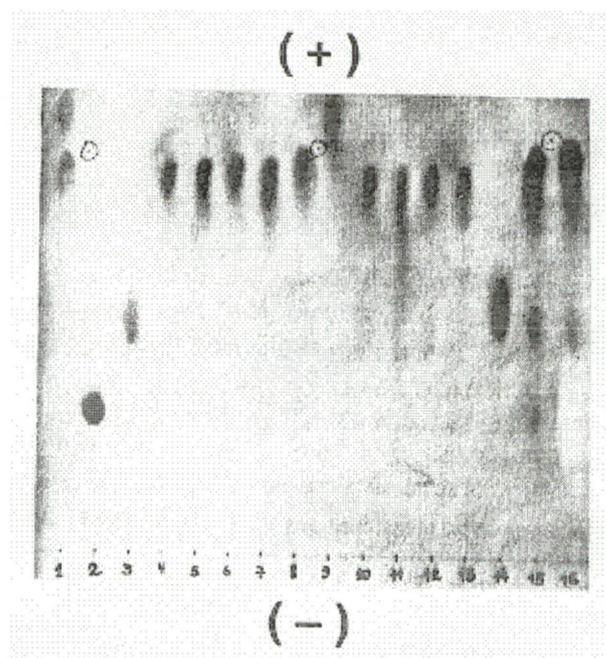


Figura 50 - Eletroforetograma dos digeridos enzimáticos de pectatos da cutícula do *Cereus peruvianus*. Padrão 1: mistura de D-glucurônico + ácido D-galacturônico (em ordem de mobilidade), 2: L-ramnose, 3: D-galactose, 8: ácido D-galacturônico, 9: ácido D-glucorônico , e 14: L-arabinose. Amostras: 4,5 e 6 e 7: pectato CP-A/B (ácido/base) digerido com enzimas de molusco e Pectinex(Novo), respectivamente, 10, 11 e 12,13 : pectato CP-E/O (EDTA/oxalato de amônio) digerido com as mesmas preparações, respectivamente. 15 e 16 - pectina cítrica digerida com as mesmas preparações. o : marcador bromofenol.

3.15 Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C para a substância péctica isolada pelo método A/B (ácido/base)

O ácido péctico extraído da cutícula de *Cereus peruvianus* teve sua estrutura determinada através de ressonância magnética nuclear de carbono ^{13}C . No espectro, figura 51, foram observados sinais que caracterizam a estrutura como sendo composta de uma única unidade monomérica. Podem ser vistos claramente um sinal em 102.351 ppm, que corresponde ao carbono 1, um sinal em 81.210 ppm correspondendo ao carbono 5; logo essa análise confirma a natureza homopolimérica do polissacarídeo extraído da cutícula do *Cereus peruvianus*, posto que os sinais principais e secundários (6 ao todo) correspondem à unidade monomérica α -D-galactopiranosilurônica. O sinal de campo baixo ($\delta=177.414$ ppm) corresponde às carboxilas.

3.16 Análise de metilação

A amostra carboxireduzida foi metilada através do procedimento descrito em Material e Métodos (item 6.0), hidrolisada e analisada através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa. Foram identificadas as substâncias correspondentes aos seguintes picos, um sendo correspondente à extremidade não redutora (2,3,4,6-tetra-metil galactose) e o outro correspondente à ligação do tipo 1 \rightarrow 4 (2,3,6-tri-metil-galactose). Portanto, a substância isolada corresponde a um ácido poligalacturônico linear, onde as unidades de galactose estão ligadas através de ligações do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$.

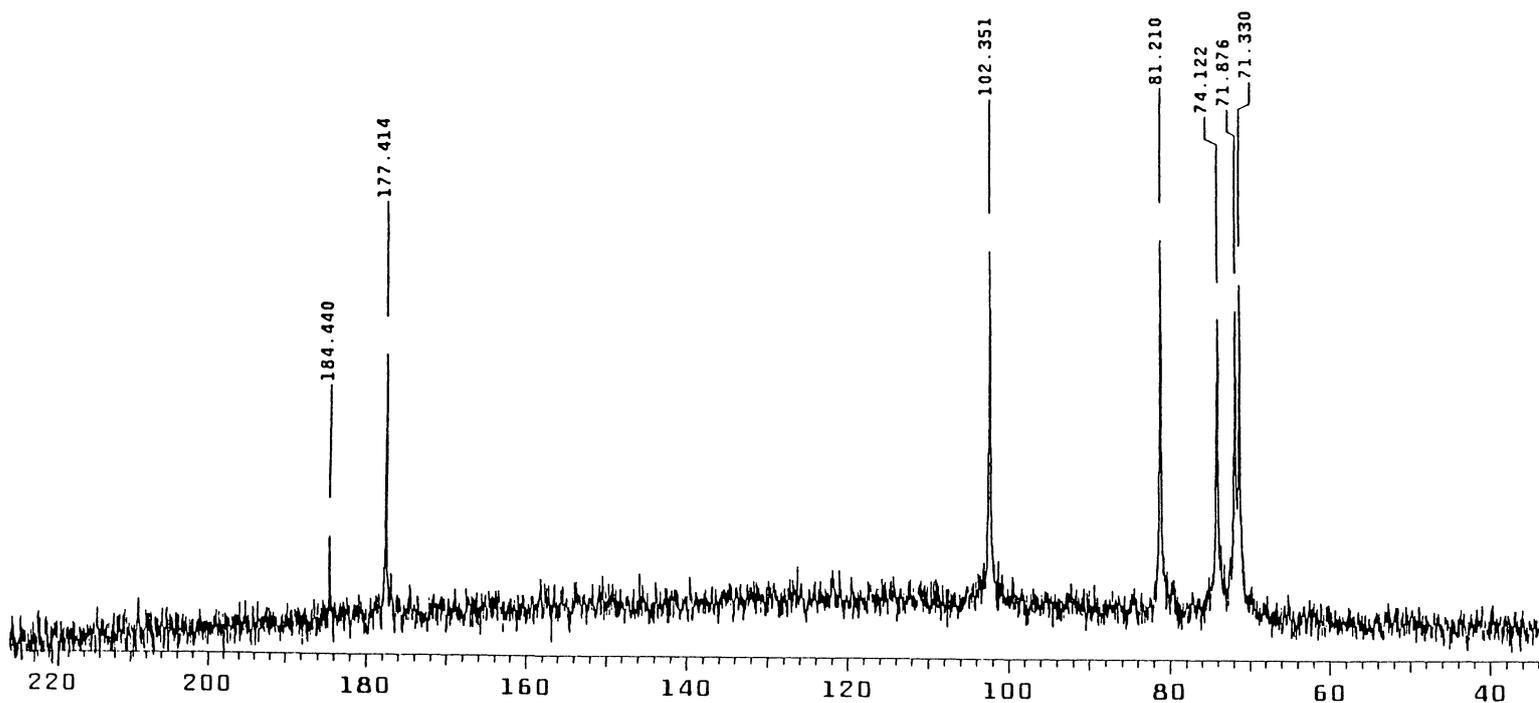


Figura 51 - Espectro do ^{13}C -nmr da substância péctica extraída da cutícula do *Cereus peruvianus* em

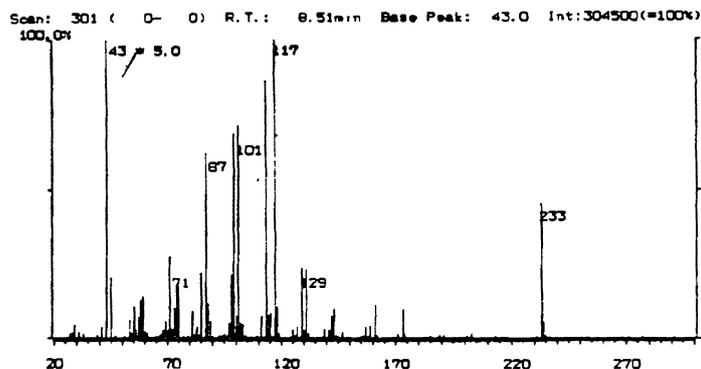
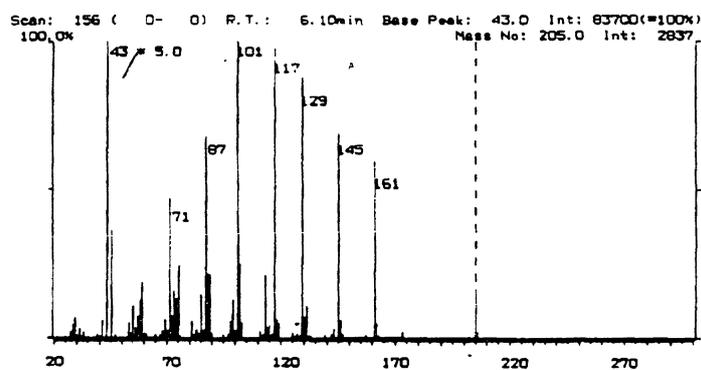
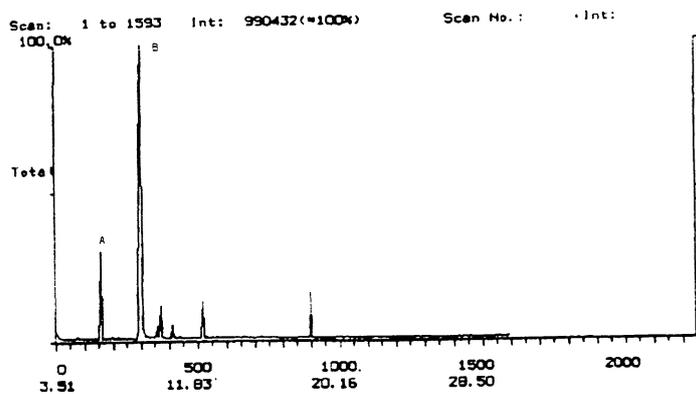


Figura 52 - a) Cromatograma do hidrolisado do metilado do ácido poligalacturônico b) espectros dos picos correspondentes à 2,3,4,6 tetra-O-metil-galactose e 2,3,6 - tri-O-metil galactose.

3.17 Otimização do método de extração

Com a finalidade de observar o efeito da concentração do ácido mineral (HCl) sobre o rendimento de extração e propriedades físico-químicas da substância péctica , principalmente sobre suas propriedades reológicas e capacidade de geleificação, foram realizados uma série de experimentos que são a seguir descritos .

3.17.1 Efeito da granulometria sobre o rendimento de extração

Com a finalidade de verificar a influência da granulometria sobre o processo de extração, amostras moídas preliminarmente em moinho de faca e martelo, seguida de moagem em moinho de bolas até diferentes meshes e depois separadas em peneiras tamizes foram submetidas à extração ácido/base. O melhor rendimento, na concentração de HCl 6M foi na granulometria de 100 mesh, portanto a granulometria tem enorme influência sobre o rendimento de extração (tabela 45).

Tabela 45 - Rendimento de pectatos extraídos pelo método A/B em função da granulometria.

Granulometria da amostra (mesh)	Rendimento em %
48	32,0
65	38,5
80	45,7
100	52,0

3.17.2 Efeito da concentração do ácido

A cutícula do *Cereus peruvianus* na granulometria de 100 mesh foi submetida a extrações sob temperatura ambiente, variando-se a concentração do ácido clorídrico de 1 a 6 N. O tempo de tratamento foi mantido constante em 30 minutos.

Tabela 46 - Rendimento da substância péctica em função da concentração utilizado na fase de descationização.

Quantidade de cutícula (g)	HCl (M)	Ác. Pécico (g)	Rendimento %
10	6 molar	5,2	52
10	3 molar	3,4	34
10	1 molar	0,6	6

O rendimento do ácido pécico extraído, como mostrado na tabela 46 , foi dependente da concentração de ácido utilizada; ou seja, de 6M para 1M houve uma queda no rendimento de 52% para 6%, portanto, quando se faz a extração à temperatura ambiente, a concentração do ácido tem grande influência sobre o rendimento da substância extraída.

O resíduo ácido tratado teve o teor de cálcio analisado através de espectrofotometria de absorção atômica, sendo obtidos os seguintes resultados, que são apresentados na tabela 47.

Tabela 47 - Análise do teor de cálcio no resíduo após o processo de descationização com HCl em diferentes concentrações.

Conc. Do Ácido HCl (M)	Teor de cálcio no resíduo em ppm
6	947
3	7.350
1	34.800

Observa-se que a remoção do cálcio aumenta à medida em que aumenta-se a concentração do ácido clorídrico utilizado no tratamento. Logo, em termos de rendimento, a melhor concentração para se realizar a extração, entre as concentrações testadas, é a concentração de 6M.

3.17.3 A cinética da remoção do cálcio com ácido clorídrico 6M

Com a finalidade de determinar o tempo ideal para a realização do tratamento ácido foi feita uma série de tratamentos em função do tempo. Os resíduos, após serem exaustivamente lavados até o lavado apresentar pH 4,3, foram lavados com álcool e secos em estufa com circulação de ar a 50 °C. Os resíduos tiveram o teor de cálcio determinado através de absorção atômica. Observa-se pela tabela 48 que a remoção de cálcio é tempo-dependente, ou seja, depende do tempo de tratamento. Em

30 minutos foram removidos 95% do cálcio, e após 60 minutos de tratamento a remoção foi de 98,40%, portanto a maior parte do cálcio é removida após 30 minutos de tratamento, é interessante observar que o tempo de tratamento é bastante importante, pois após 20 minutos a concentração de cálcio na cutícula ainda é de 30 % . Este experimento foi realizado com a cutícula na granulometria de 100 mesh.

Tabela 48 - Cinética de extração do cálcio da cutícula do *Cereus peruvianus*.

Tempo de tratamento ácido (minutos)	Teor de cálcio no resíduo tratado (ppm)
Cutícula	39.876,15
5	32.250,12
10	29.240,56
15	23.383,70
20	12.256,23
30	1870,45
60	636,13

3.18 Determinação da massa molar através de cromatografia de exclusão estérica

A heterogeneidade da estrutura do polissacarídeo, em termos da variabilidade de unidades de monossacarídeos, é uma restrição conhecida para a correta determinação da massa molar. Tendo determinado a ausência de unidades ramificadoras neutras no pectato da cutícula do *Cereus peruvianus*, esta circunstância estimulou a determinação de características moleculares por meio de cromatografia de exclusão molecular com duplo monitoramento. A detecção da massa universal por índice de refração diferencial (DRI) produziu SEC-eluogramas que indicaram uma diferença significativa de massa molar do pico principal para amostras CP A/B (curva A) e OP - A/B (curva D) comparado a amostra CP-E/O (curva B) por causa de sua posição sobre o eixo secretenção (figura 53).

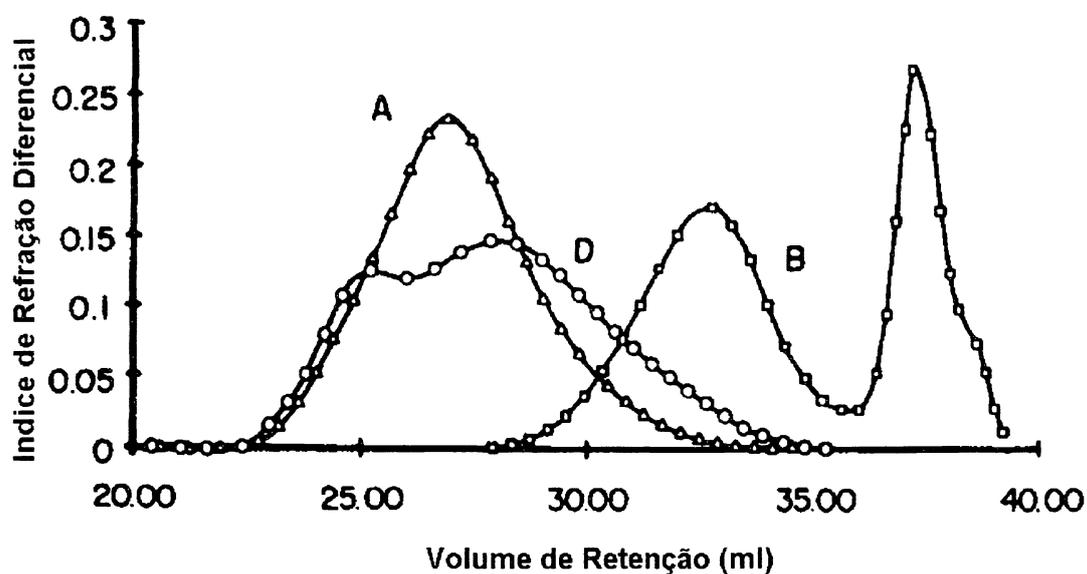


Figura 53: Separação de pectatos com distribuição de massa molar com detector de índice de refração diferencial. A=CP-A/B, pectato do *Cereus peruvianus* obtido por extração ácido/base, B = CP-E/O, pectato do *Cereus peruvianus* extraído com EDTA/Oxalato de amônio 0,25%; e D, pectato de albedo de laranja extraído pelo método ácido/base.

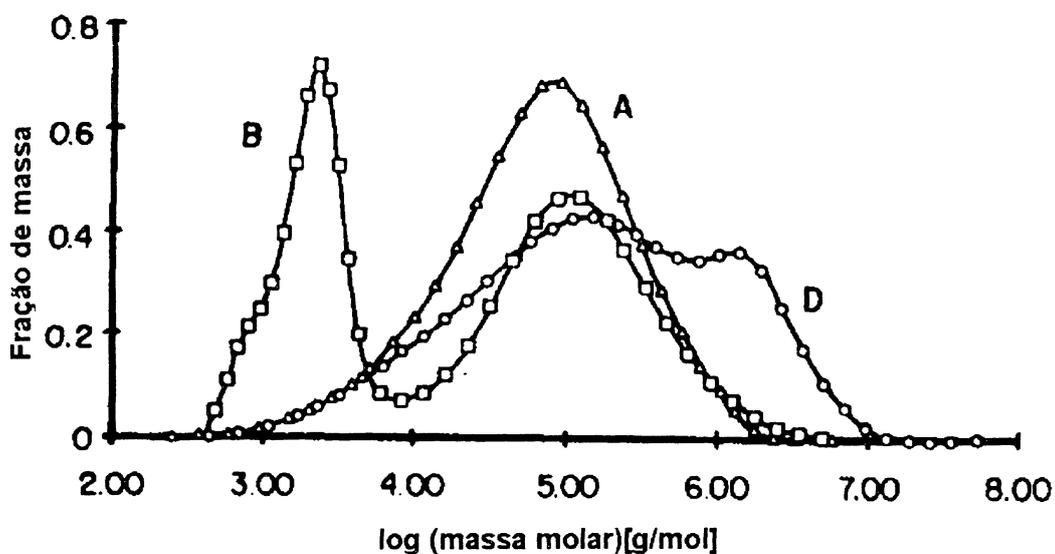


Figura 54 - Distribuição de massa molar absoluta com duplo monitoramento (Espalhamento de luz laser de baixo ângulo e índice de refração - DRI - LALLS). A=CP-A/B, Pectato do *Cereus peruvianus* obtido por extração ácido/base, B = CP-E/O, pectato do *Cereus peruvianus* extraído com EDTA/Oxalato de amônio 0,25%; e D, pectato de albedo de laranja extraída pelo método ácido/base.

A inclusão adicional de monitoramento simultâneo corrigiram estes primeiros dados e mudaram os contribuintes principais para valores fechados a $\log (M)= 5$ (100.000 g/mol) (figura 54). Embora a massa molar média de CP-A/B e CP-E/O, sejam praticamente iguais, veja tabela 49, a distribuição de massa molar, figura 54, mostrou que o ácido pécico extraído via EDTA/Oxalato de amônio é constituído por duas populações, uma de

moléculas de alta massa molar e outra de moléculas de baixa massa molar. O ácido péctico extraído através do método ácido/base, apresentou uma única fração, porém com ampla distribuição de massa molar.

Pela análise feita, utilizando-se apenas o monitoramento com índice de refração, o que se verificava era um perfil diferente para pectatos obtidos por diferentes métodos de extração. Com a introdução de um outro detector, ou seja, espalhamento de luz laser de baixo ângulo, verificamos que esta diferença realmente não existia, os pectatos obtidos a partir do *Cereus peruvianus* pelos dois métodos apresentam uma distribuição de massa molar que se distribue em torno de 100.000 daltons.

O pectato obtido pelo método EDTA/Oxalato de amônio apresentou duas populações bem definidas, sendo que a constituída de moléculas de massas molares menores, apresentaram massas molares que variam entre 300 D e 6000 D. A segunda população teve distribuição de massas entre 10.000 e 3.000.000 D, sendo a massa molar ponderal média calculada em 140.000 D. O pectato obtido do *Cereus peruvianus* pelo tratamento ácido/base não apresentou duas populações bem definidas, foi detectada uma única população com constituintes de baixa massa molar, da ordem de 1000 D até moléculas de 3.000.0000 D. A massa molar média foi de 150.000 D. Logo, a massa molar média obtida para pectato do *Cereus peruvianus* pelos dois métodos foram bastante próximas, ou seja, em torno de 150.000. A média de massa molar um pouco acima para o ácido péctico obtido pelo método A/B, ou seja, 150.000 D, enquanto que para o ácido péctico obtido pelo EDTA/Oxalato foi de 140.000 D, reflete a participação de um número maior de constituintes de baixa massa molar na amostra de pectato obtido pelo EDTA/Oxalato. Talvez, a presença de um número maior de moléculas de baixa massa molar na amostra EDTA/Oxalato possa ser explicada por uma remoção mais efetiva de cálcio, gerando com isso um maior nível de desagregação e, conseqüentemente, um maior número de moléculas de menor massa molar. O ácido péctico obtido a partir de albedo de laranja apresentou uma única população com uma distribuição bastante ampla, contendo moléculas de massa molar da ordem de 1000 D até 10.000.000 de D. A massa molar média foi de 710.000 D.

Conclui-se, portanto, que o método de extração ácido/base não provoca a hidrólise do ácido péctico como poderia se supor, uma vez que a massa molar média obtida pelo processo ácido/ base e até superior á massa molar média obtida pelo processo EDTA/Oxalato de amônio.

Tabela 49 - Estimativa da massa molar por cromatografia de exclusão molecular com duplo monitoramento.

Amostra	Mn, g/mol	Mw, g/mol
CP-A/B*	20.000	150.000
CP-E/O**	12.000	140.000
OP-A/B***	26.000	715.000

* Ácido péctico extraído pelo método ácido/bse de *Cereus*

** Ácido péctico extraído pelo método EDTA/Oxalato de amônio de *Cereus*

*** Substância péctica extraída do albedo de laranja método ácido/base

3.19 Fracionamento da substância péctica através de ultrafiltração

Fracionamento do ácido poligalacturônico em membrana de 100 KD, utilizando sistema de ultrafiltração da Milipore equipado com membrana de 3 pés quadrados (ft²) de área filtrante na forma de acetato de celulose. O ácido poligalacturônico na concentração de 0,01 % foi filtrado sendo que o retido pela membrana de 100 kD foi denominado concentrado, enquanto que a fração filtrada foi denominada de permeado. O concentrado apresentou faixa de massa molar acima do corte da membrana (corte molecular), enquanto o permeado apresentou massa molar abaixo do corte da membrana, ou seja, abaixo de 100 kD. Como pode ser visto pela figura 57, o ácido poligalacturônico concentrado apresentou viscosidade intrínseca (em presença de 0,1 M de NaCl) 30 % superior a viscosidade intrínseca de poligalacturônico integral (figura 55), ou seja, não submetido à ultrafiltração. O permeado (figura 56) apresentou viscosidade intrínseca (também na presença de NaCl 0,1N) em torno de 40 % menor que o integral e 70 % menor que a viscosidade intrínseca do concentrado.

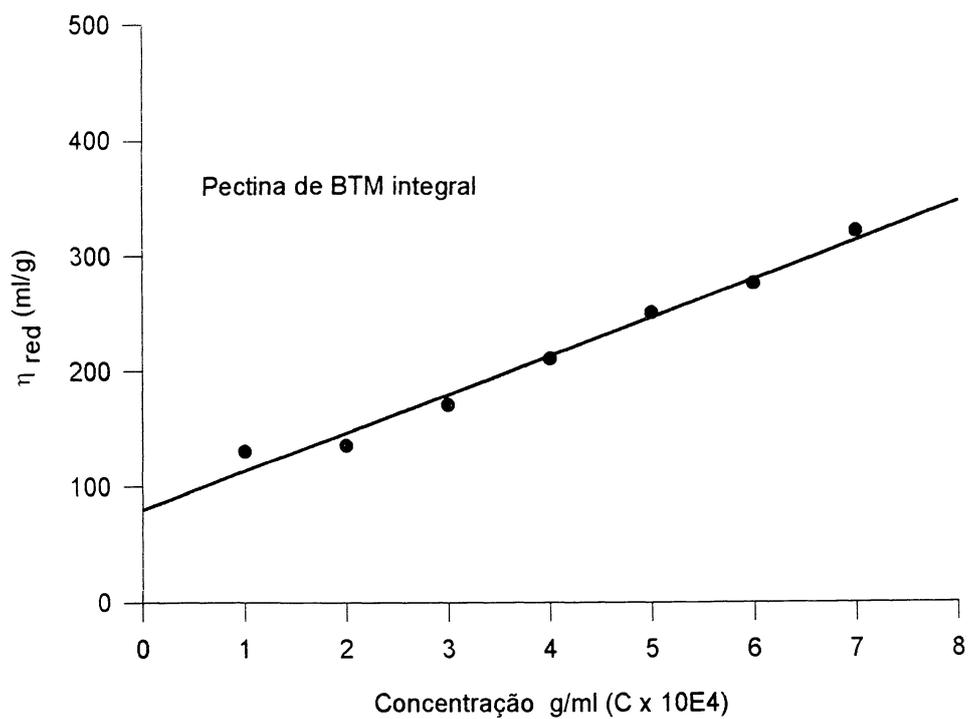


Figura 55 - Determinação da viscosidade intrínseca do Ácido Poligalacturônico em presença de NaCl 0,1 M.

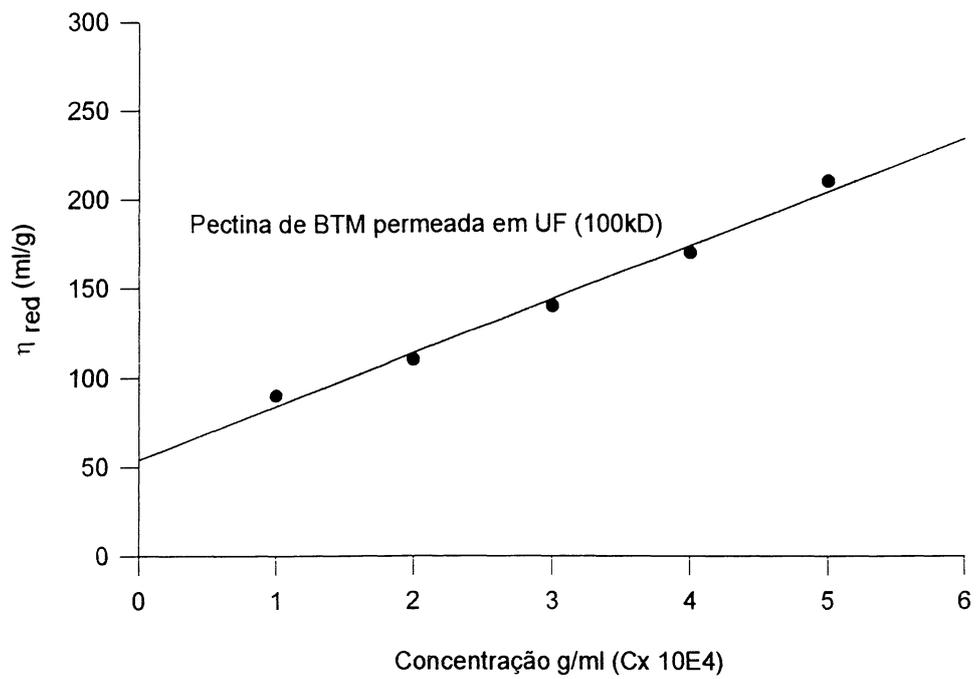


Figura 56 - Determinação da viscosidade intrínseca (em presença de NaCl 0,1N) do permeado do ácido poligalacturônico obtida via membrana de acetato de celulose de 100 KD .

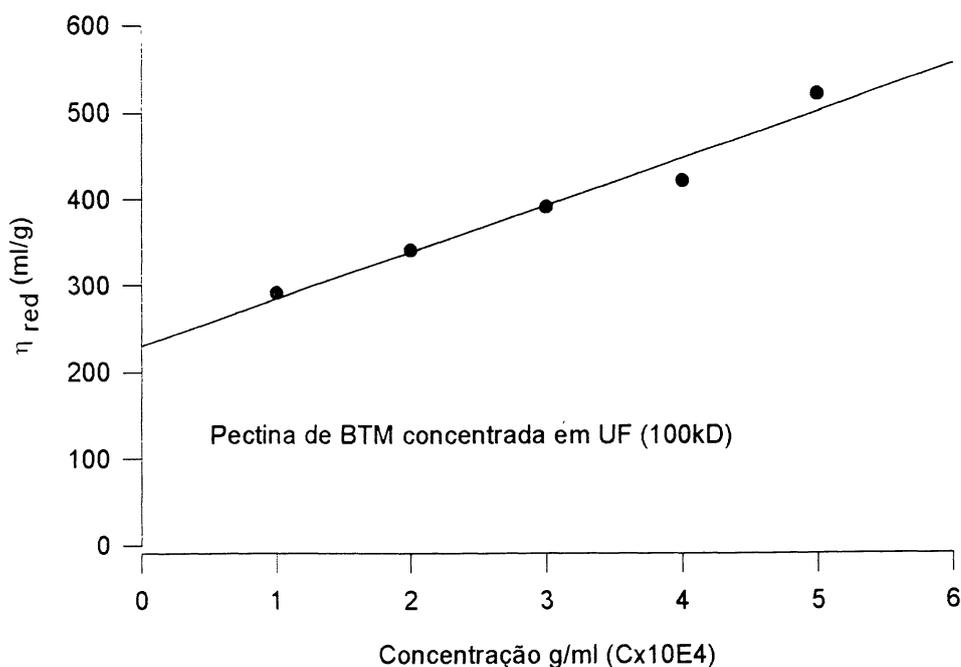


Figura 57 - Determinação da viscosidade intrínseca (em presença de NaCl 0,1N) do concentrado do ácido poligalacturônico obtida via membrana de acetato de celulose de 100 KD .

3.20 Determinação das condições ótimas de geleificação para pectinas obtidas a partir do *Cereus peruvianus*

3.20.1 Influência do pH sobre géis com diferentes conteúdos de sólido totais

Na figura 58 observa-se o efeito do pH sobre a força de géis preparados com pectina de baixo teor de metoxila e extraído pelo método ácido/base a partir da cutícula de *Cereus peruvianus*. Os géis foram preparados de acordo com o procedimento padrão para a preparação de géis com pectinas de baixo teor de metoxila descrito em item 20 de Material e Métodos , com diferentes concentrações de sacarose (20%, 25%, 30% e

35%) e com conteúdo fixo de cálcio em 30 mg/g de pectina. Os géis preparados com 30 % de sacarose aproximam-se do padrão, sob toda a faixa de pH testada. Na concentração de 35% de sacarose não foi possível a formação de géis para pHs abaixo de 2,4 e nem para valores acima de 3,3. Os géis preparados com 25 % de sacarose apresentaram força padrão 100 próximo ao pH 3, acima de 3,3 a força do gel diminuiu acentuadamente. Observa-se que a força dos géis preparados com conteúdo fixo de cálcio de 30 mg/g de pectina, tiveram a sua força reduzida com a redução do teor de sacarose e os géis com menores teores de sólidos totais foram mais sensíveis à mudanças de pH.

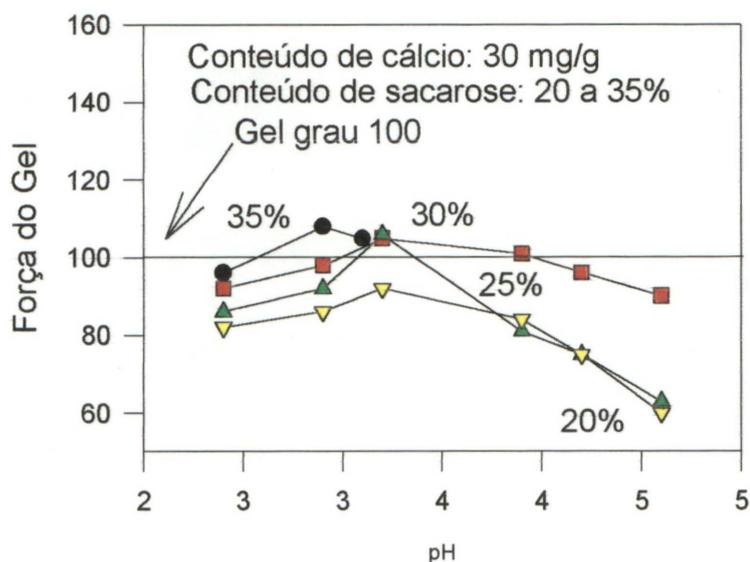


Figura 58 - Influência do pH sobre a força de géis preparados em quatro concentrações diferentes de sacarose (20, 25, 30 e 35%) e íons cálcio no nível de 30 mg/g de pectina.

3.20.2 Influência do teor de cálcio sobre géis preparados com 30% de sólidos totais

Com o objetivo de se estudar a influência do teor de cálcio sobre a força do gel, foram preparados géis com teor de 30% de sacarose

em presença de diferentes concentrações de cálcio (conteúdo de cálcio variando de 20 a 35 mg/g de pectina). Géis preparados com 30% de sólidos e teor de cálcio em 35 mg/g de pectina foram muito sensíveis à faixa de pH, ocorrendo a precipitação da pectina em valores de pH abaixo de 2,4 e acima de 3,3. Os géis foram sensíveis ao conteúdo de cálcio, sendo observada uma redução da força do gel à medida em que houve redução do conteúdo de cálcio. Para a concentração de sacarose testada a melhor concentração de cálcio é 30 mg/g de pectina.

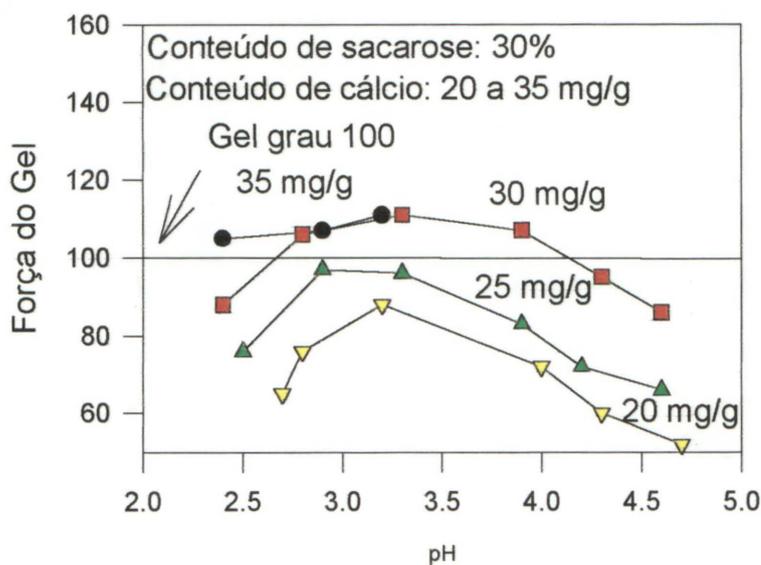


Figura 59 - A influência do teor de cálcio sobre géis preparados com 30% de sacarose em níveis cálcio (20, 25, 30, e 35 mg/g de pectina). Os números sobre as curvas se referem ao conteúdo de cálcio.

3.21 Pectina obtida pelo método ácido/base e ultrafiltrada

3.21.1 Influência do pH sobre géis com diferentes conteúdos de sólidos totais

A pectina obtida por ultrafiltração em uma membrana acetato de celulose de 100 kD apresentou viscosidade intrínseca de 2,2 dl/g, portanto, superior à pectina obtida pelo método ácido/base sem ultrafiltração

(0,09 dl/g). Este acréscimo obtido, nos estimulou a verificar se este ganho de viscosidade intrínseca iria ou não se refletir na capacidade de geleificação da mesma, ou seja na força do gel formado. Foram preparados géis com diferentes conteúdos de sacarose em uma faixa de pH de 2,4 a 4,6.

Observa-se pela figura 60 que os géis preparados com 35% de sacarose continuam sensíveis ao pH como os géis preparados com a pectina não ultrafiltrada. Houve uma melhora na força dos géis em todas as concentrações testadas, com exceção dos géis preparados com 35 % de sólidos totais. Os géis preparados com 25% de sólidos se aproximaram do padrão em praticamente toda a faixa testada e, também, foram menos sensíveis às variações de pH, portanto a ultrafiltração da pectina contribuiu para a melhoria das características do gel preparados com 25% de sacarose e 30 mg de cálcio nas condições testadas. Os géis preparados com 30 % de sacarose mostraram-se com força acima do grau 100 praticamente por toda a faixa de pH testada. Portanto, a ultrafiltração da pectina permitiu a formação de géis com 25 % de sacarose e 30 mg de cálcio com grau de firmeza muito próximo aos valores obtidos para os géis preparados com pectina não ultrafiltrada na concentração de 30 % de sacarose e 30 mg de cálcio.

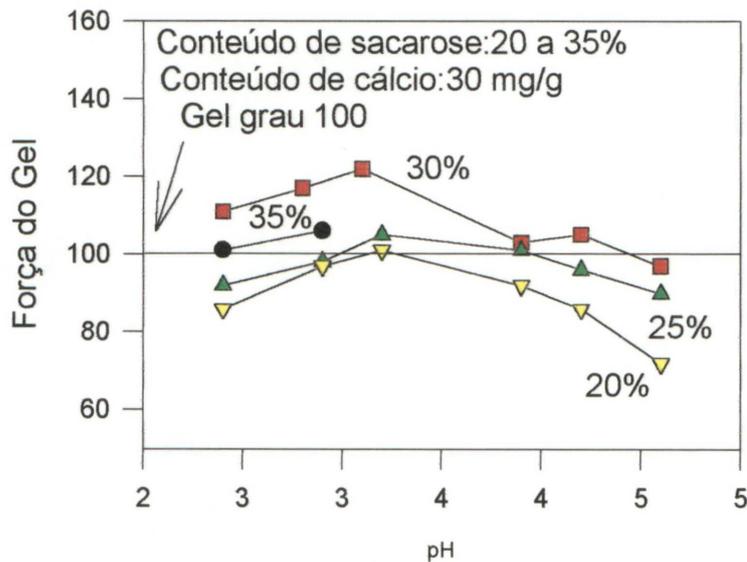


Figura 60 - influência do pH sobre géis preparados em quatro níveis de concentração de sacarose (20, 25 e 30, 35%) e íons cálcio no nível de 30 mg/g de pectina.

3.21.2 Determinação do teor de cálcio para a formação de gel padrão 100 com pectina ácido/base ultrafiltrada

A pectina ultrafiltrada teve o nível de cálcio necessário à geleificação verificado na concentração de 25 % de sacarose, que foi a concentração mínima de sacarose testada que formou géis que se aproximaram do padrão sob 30 mg de cálcio . O conteúdo de cálcio nas concentrações de 25 e 30 mg resultaram em géis com potência próxima ao padrão em toda a faixa de pH testada (figura 61) , formando géis fracos na concentração de 20 mg de cálcio e colapsando em pH abaixo de 2,7 quando o conteúdo de cálcio era de 35 mg/g de pectina. Portanto, quando a pectina obtida pelo método ácido /base é ultrafiltrada, ela pode formar géis com força

padrão utilizando uma quantidade menor de sacarose (25%) com níveis de cálcio entre 20 e 35 mg /g de pectina.

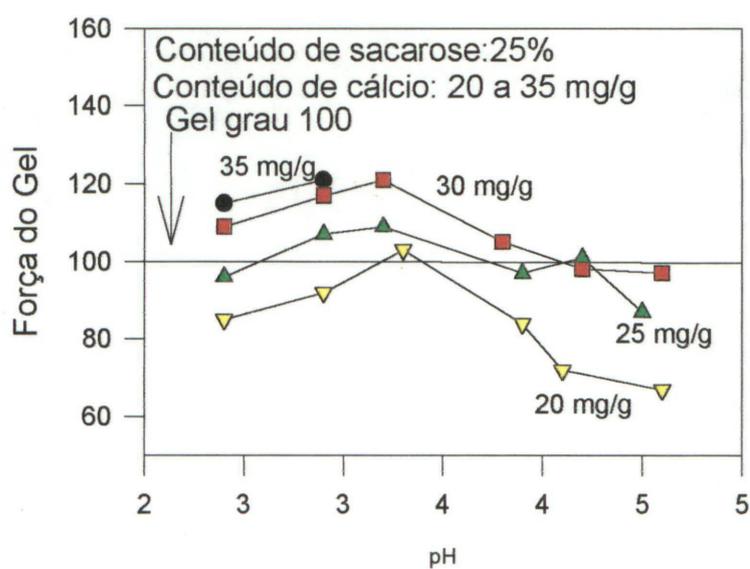


Figura 61- Efeito da concentração de cálcio sobre géis preparados com pectina obtida pelo tratamento ácido/base e ultrafiltrada contendo 25% de sacarose. Os números próximo as curvas referem-se ao conteúdo de cálcio

3.22 Forma dos estômatos

Durante a secagem da cutícula removida dos cladódios de *Cereus peruvianus* observa-se intensa escamação. Estas placas cerosas, quando vistas ao microscópio óptico, revelam a forma dos estômatos (figura 62). A camada de cera epicuticular, que representa cerca de 10% da massa seca da cutícula, além de desempenhar importante função como capa protetora contra a perda de água é reportada ser uma difícil barreira a ser superada pelos herbicidas.

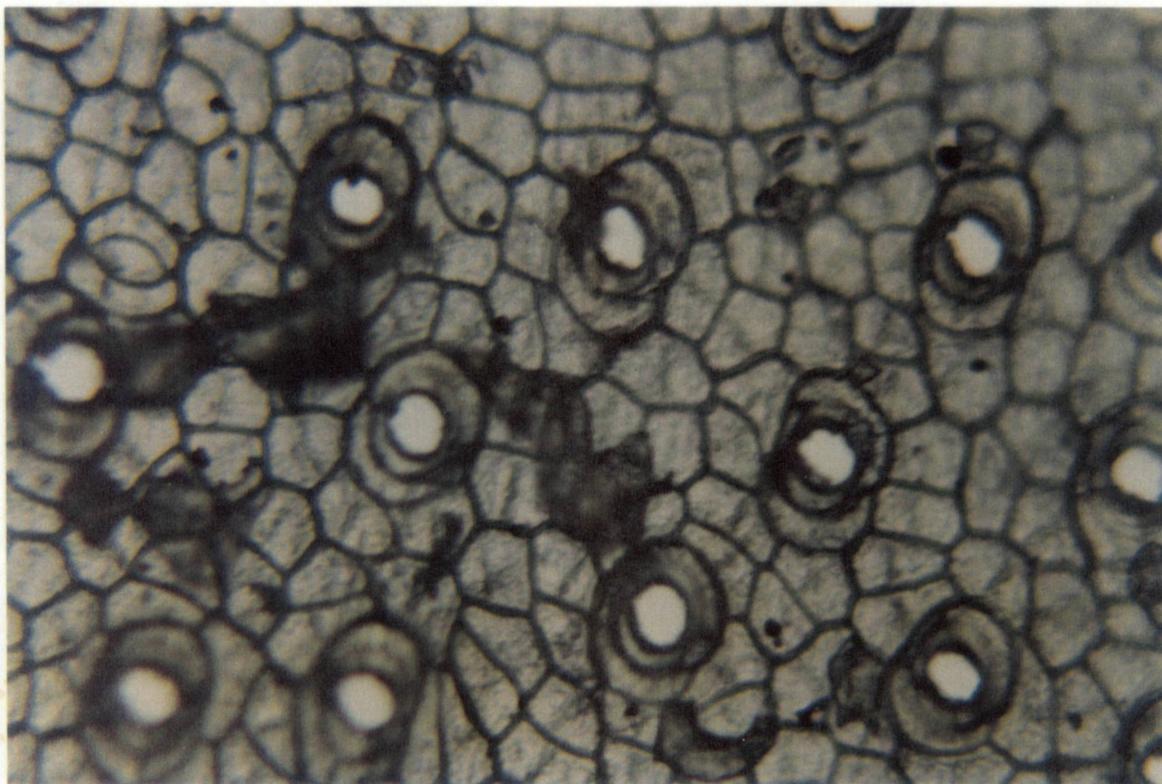


Figura 62 - Foto de escamas cerosas desprendidas da cutícula do *Cereus peruvianus* durante o processo de secagem. A foto mostra a forma dos estômatos .

3.23 Análise da fração lipídica em Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massa

Três diferentes amostras da fração lipídica cuticular foram submetidas à metanólise e analisadas de acordo com item 11 de Material e Métodos.

A figura 63 mostra o perfil cromatográfico obtido para a cera integral metanolizada (metil-éster derivados). Três picos nítidos se destacaram, com tempos de retenção bem distintos e muito boa resolução. As figuras 63.1, 63.3 e 63.5 mostram os espectros de massas, respectivamente do ápice dos pico I, pico II e pico III. Para identificar quais são os componentes químicos que dão origem aos picos, os espectros de massa de cada pico foram comparados com espectros padrões registrados na biblioteca computadorizada de espectros de massa da NBS/NIH/EPA contidos nas classes de lipídios e ácidos graxos e hidrocarbonetos oxigenados. Desta forma a figura 63.2 mostra a comparação feita para o espectro de massas do pico I, identificando-o como ácido hexadecanóico metil éster que é o derivado metilado correspondente ao ácido palmítico (16:0). A figura 63.3 mostra o espectro de massas do pico II, enquanto que a figura 63.4 compara o espectro, identificando-o como correspondente ao ácido araquídico de 20 átomos de carbono (20:0). A figura 63.5 mostra o espectro de massas obtido para o pico III, enquanto a figura 63.6 mostra a comparação do espectro de massas do pico III, identificando-o como ácido docasonóico metil éster, correspondendo ao derivado metilado do ácido beênico (22:0).

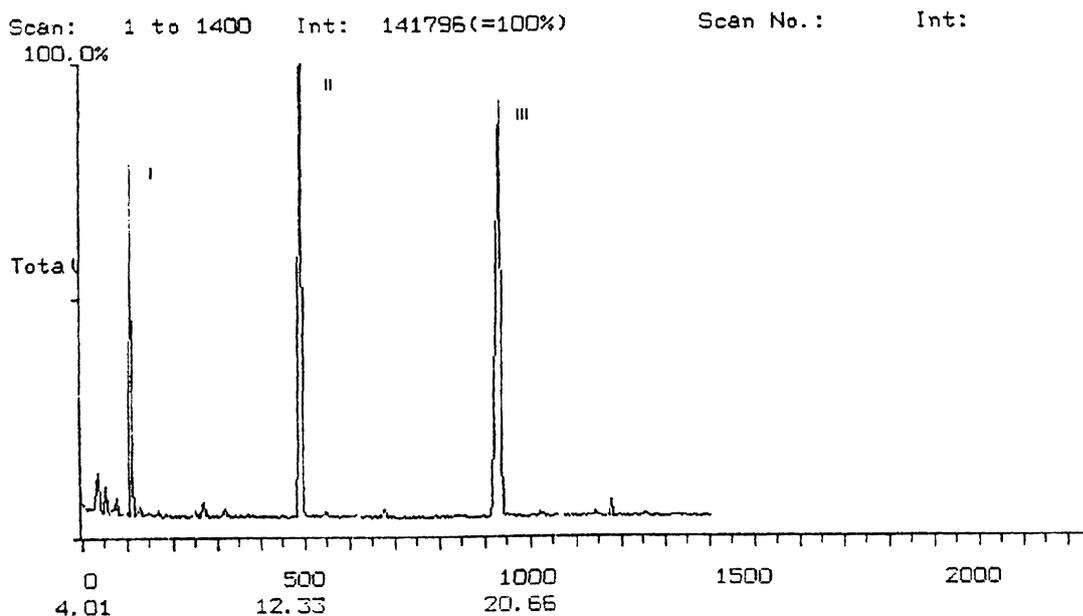


Figura 63 - Cromatograma da cera integral da cutícula metanolizada do *Cereus peruvianus* obtida em espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi do tipo Carbowax-M20, de 0,4 mm de diâmetro e 50 m de comprimento. A coluna capilar foi mantida em condições isotérmicas a 240 °C.

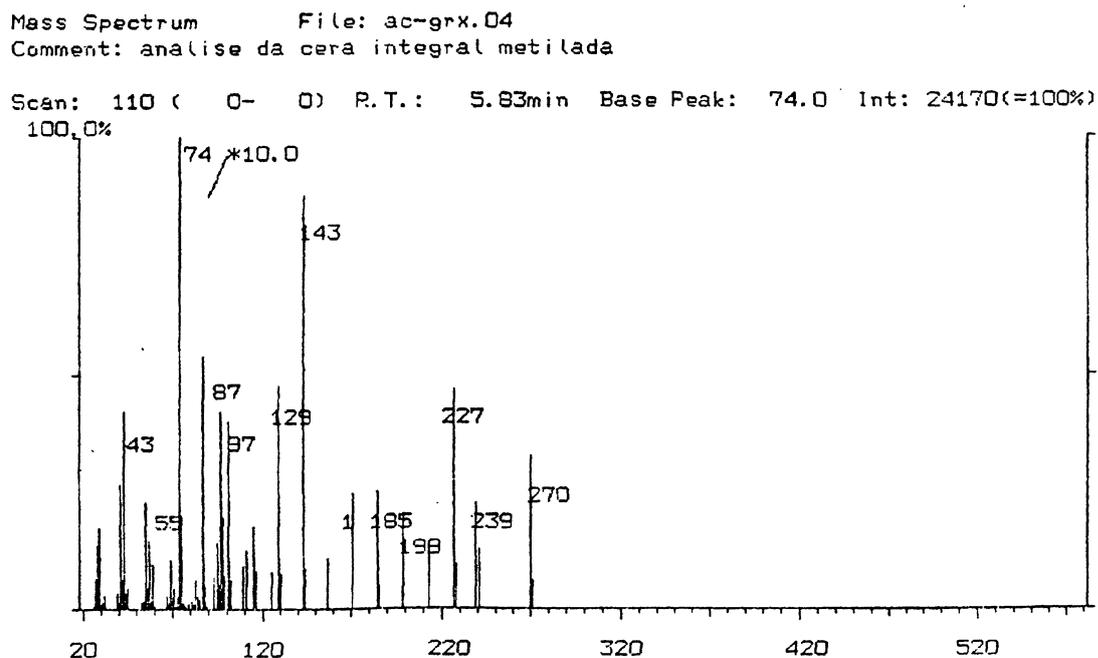


Figura 63.1 - Espectro de massas do pico I do cromatograma mostrado na figura 63. As condições de análise são as mesmas descritas na figura 63.

Similarity Search Results (Measured Data)
 Filename : ac-grx.04 Scan No: 110(0- 0) RT : 5.83
 Comment : analise da cera integral metilada

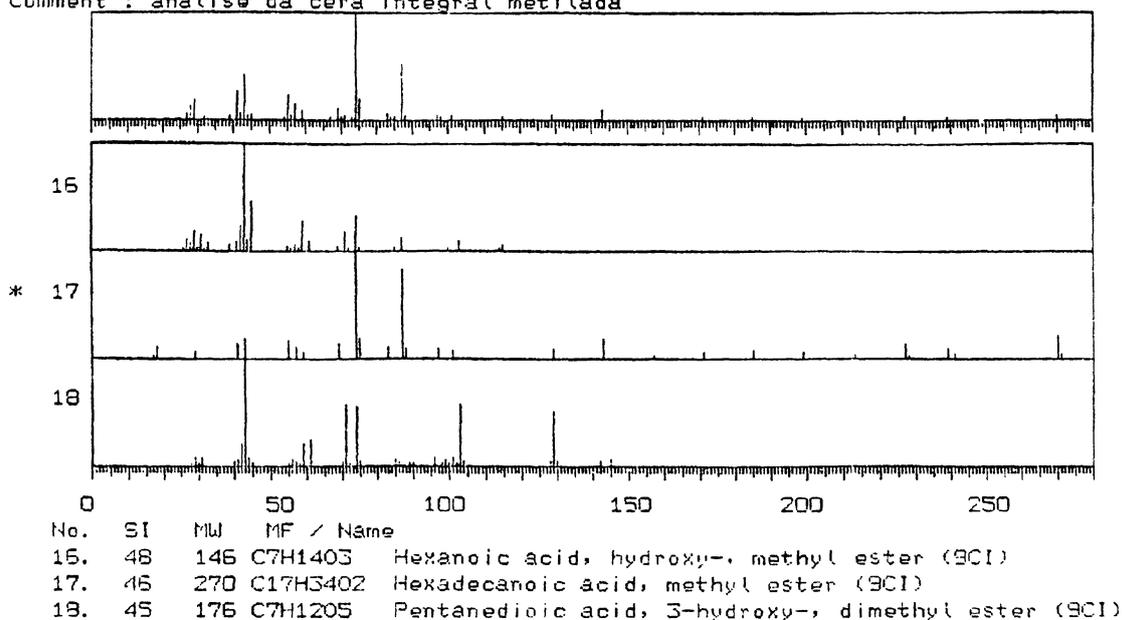


Figura 63.2 - Mostra o resultado da pesquisa de análise de similaridade do espectro do pico I com padrões de espectros da biblioteca de espectros de massa NBS/NIH/EPA.

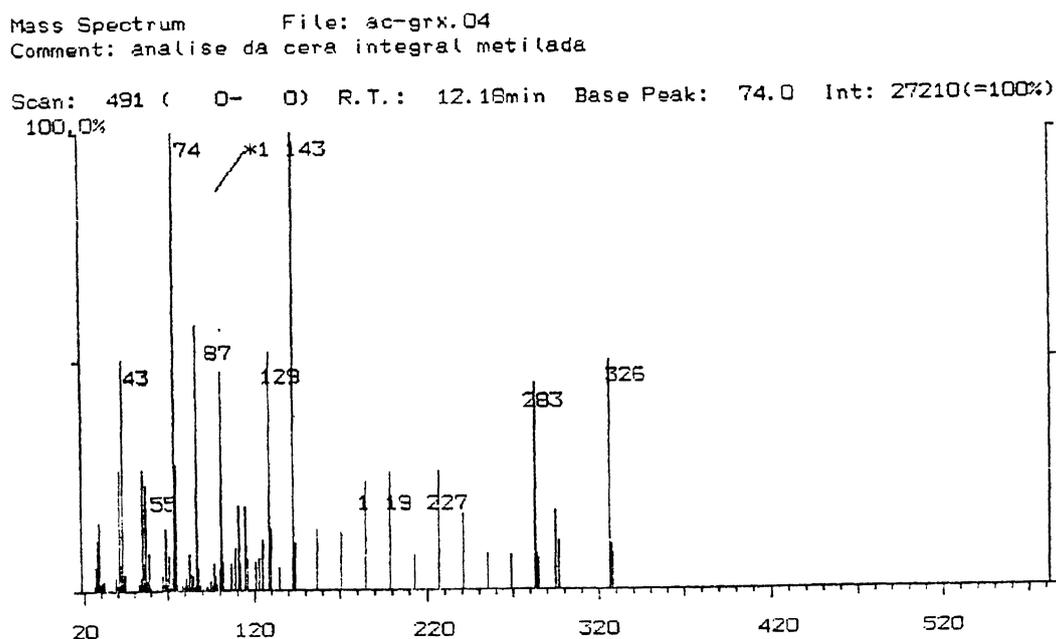


Figura 63.3 - Espectro de massas do pico II do cromatograma mostrado na figura 63.

Similarity Search Results (Measured Data)
 Filename : ac-grx.04 Scan No: 491(0- 0) RT : 12.18
 Comment : análise da cera integral metilada

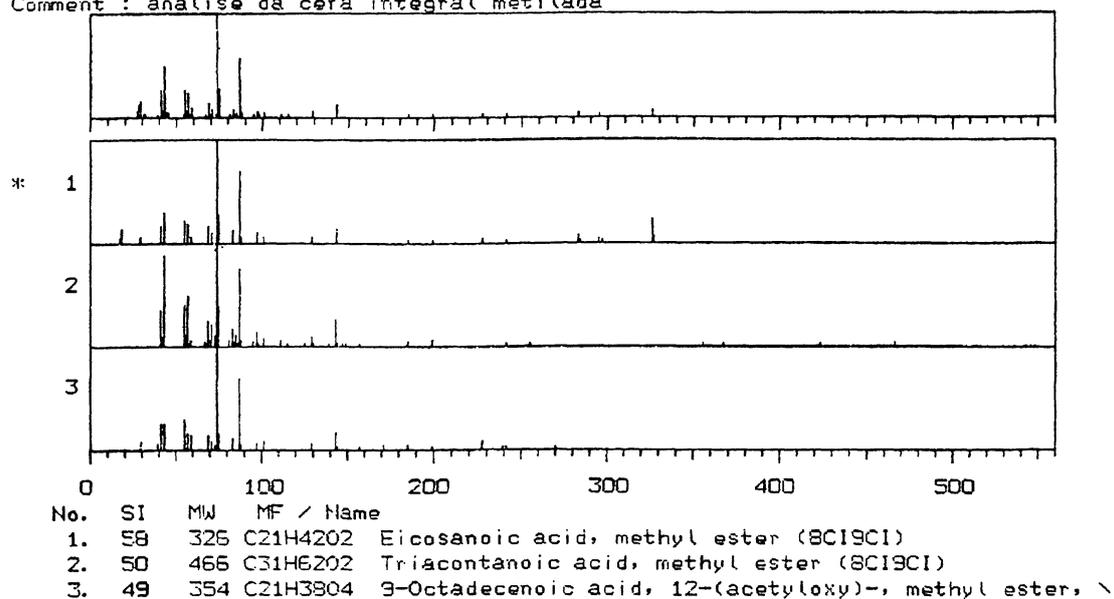


Figura 63.4 - Mostra o resultado da pesquisa de análise de similaridade do espectro do pico II com padrões de espectros da biblioteca de espectros de massa NBS/NIH/EPA.

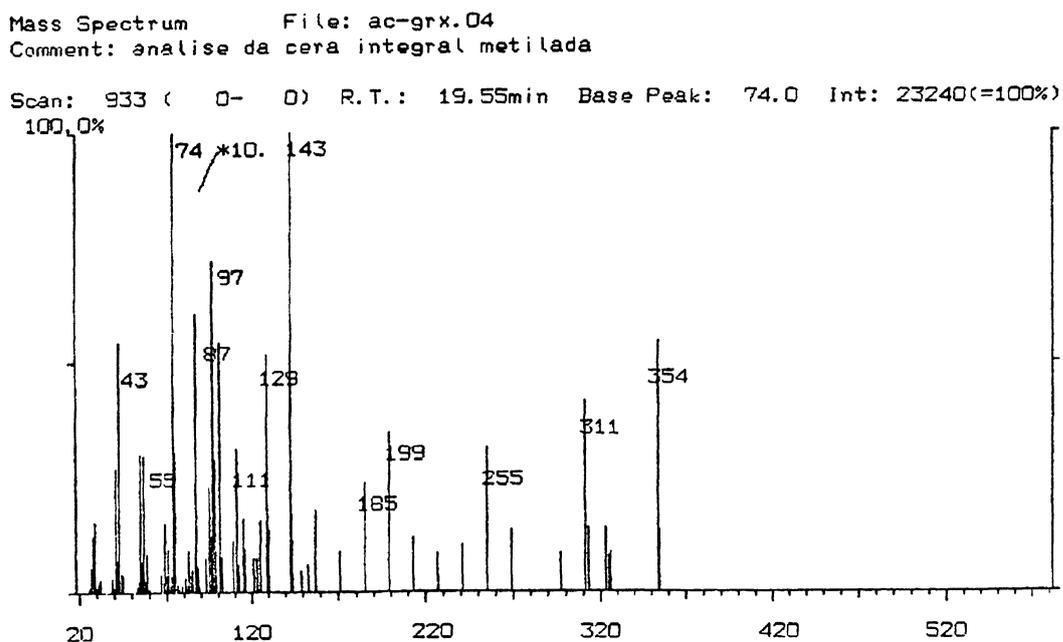


Figura 63.5 - Espectro de massas do pico III do cromatograma mostrado na figura 63.

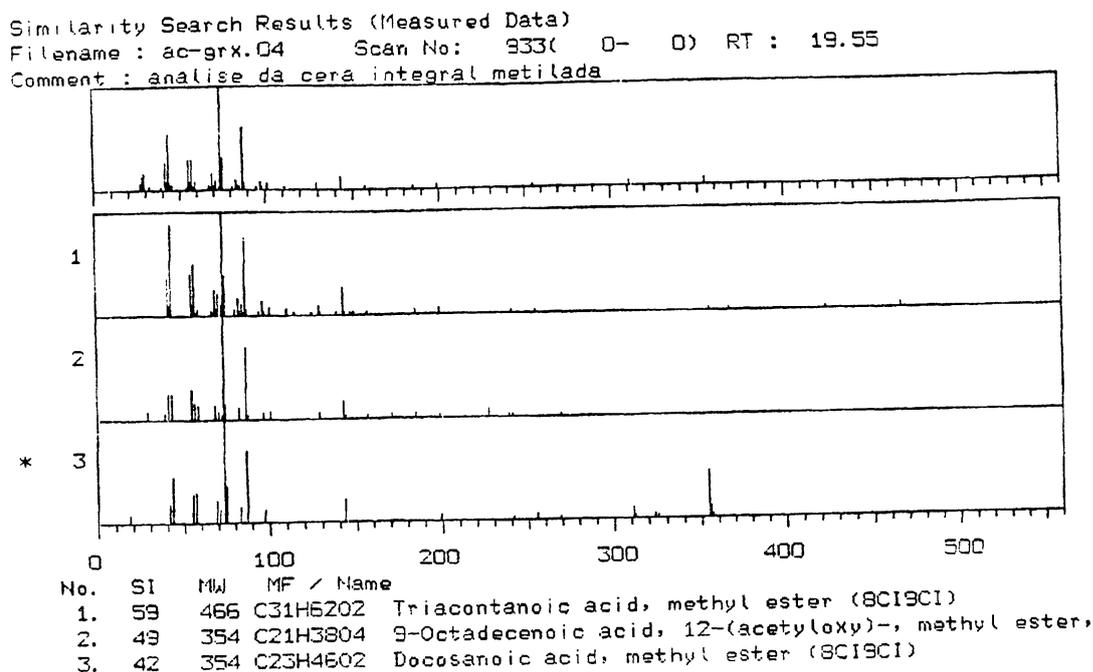


Figura 63.6- Mostra a resultado da pesquisa de similaridade do espectro do pico III com padrões de espectros da biblioteca de espectros de massa NBS/NIH/EPA.

Desta forma, os resultados indicam que a cera extraída do *Cereus peruvianus* é composta de esteres dos ácidos graxos palmítico, araquídico e beênico, todos ácidos graxos saturados. Os outros picos mostrados no cromatograma não foram identificados a partir do seu comportamento de fragmentação.

As figuras 64 e 65 mostram, respectivamente, os cromatogramas da cera integral previamente saponificada e da cera purificada. A análise dos espectros de massas (figuras não mostradas) revelaram os mesmos constituintes detectados para a cera integral, quais sejam : ácido palmítico, ácido araquídico e ácido beênico. HUGHES & MOYNA (1980) analisando a cera cuticular do *Cereus peruvianus* demonstraram que dentre os ácidos graxos o mais abundante é o ácido palmítico tanto na forma livre como na forma de ester. DEMBITSKY & REZANKA (1995) demonstraram que a cera epicuticular é constituída de uma mistura complexa de esteres de ácidos graxos e dentre eles o mais abundante é o ácido palmítico de 16 átomos de carbono.

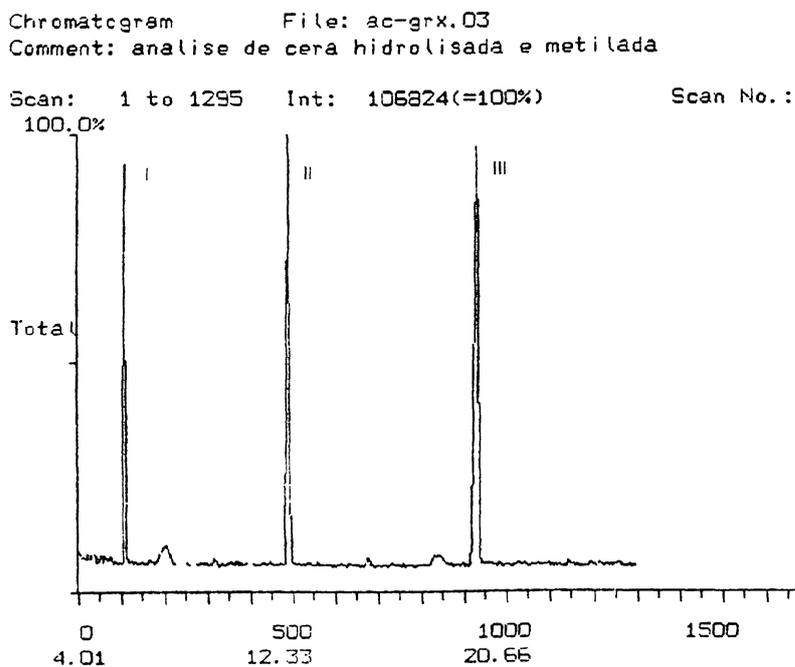


Figura 64 - Cromatograma da cera cuticular integral do *Cereus peruvianus* previamente saponificada na forma de metil esterres. As condições de análise são as mesmas descritas na legenda da figura 63.

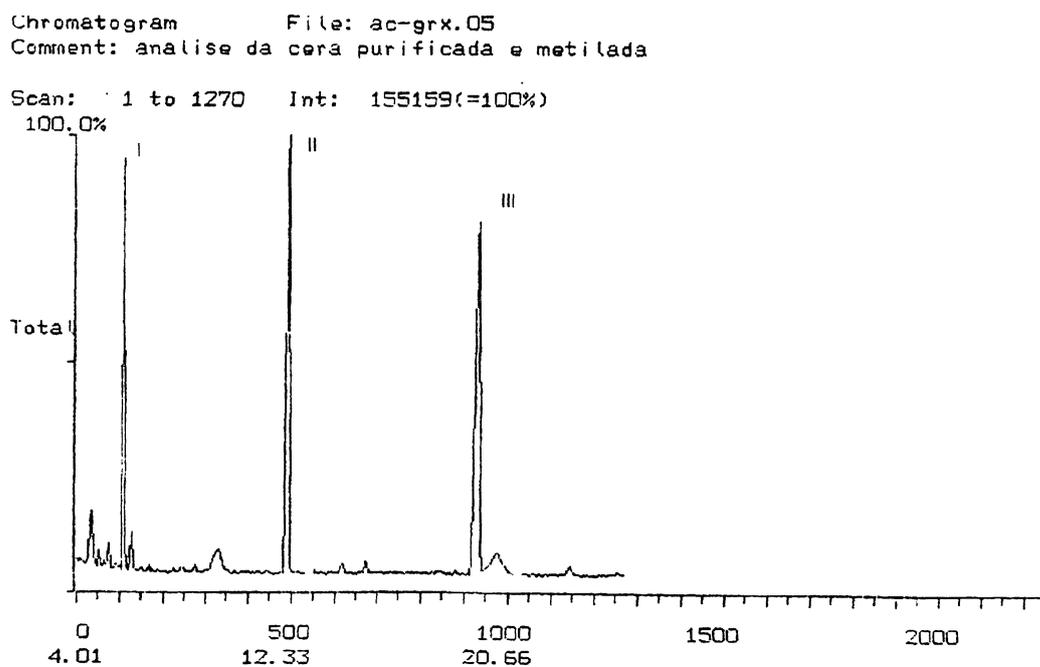


Figura 65 - Cromatograma da cera cuticular do *Cereus peruvianus* purificada em coluna de sílica. As condições de análise são as mesmas descritas na legenda da figura 63

CONCLUSÕES

01. O *Cereus peruvianus* quando cultivado em espaçamento de 1 planta por metro quadrado pode apresentar rendimento, a partir do terceiro ano de cultivo, rendimento de fitobiomassa em torno de 300 toneladas por hectare/ano.

02. A massa seca da fitobiomassa do *Cereus peruvianus* representa cerca de 10% da massa total.

03. Com a idade da planta, a massa dos parênquimas (fonte de polieletrólitos) se reduz, enquanto a massa do anel celulósico central aumenta.

04. Os processos de extração de polieletrólitos a partir dos parênquimas que incluem etapas de prensagem mecânica são mais efetivos.

05. O polissacarídeo (polieletrólito), extraído do parênquimas aletas, apresentam natureza acídica e são compostos pelos mesmos monossacarídeos neutros que entram na composição de mucilagens de outras plantas suculentas, quais sejam: L-arabinose, D-galactose e L-ramnose.

06. A análise de degradação demonstrou que os resíduos de L-arabinose são mais facilmente removíveis sob hidrólise ácida e que, portanto, devem estar na forma de arabinofuranose em posições mais externas do polissacarídeo, a exemplo do que já foi demonstrado para outras mucilagens de cactáceas.

07. Pontes de hidrogênio tem influência sobre o valor de massa molar da glicana aniônica, determinada através de cromatografia de exclusão estérica.

08. A fração retida em membrana de 100 kDaltons apresentou viscosidade aparente superior a viscosidade aparente do polissacarídeo integral (sem ser submetido a ultrafiltração), e foi efetiva como auxiliar de floculação na faixa de 0,2 a 1 ppm em processos de tratamento de água para uso doméstico.

09. O polieletrólito na concentração de 50 ppm, utilizado como auxiliar de floculação na clarificação do chá de estévia, permitiu uma redução de 83% do emprego de sulfato de alumínio no processo de clarificação, obtendo-se um esteviosídeo com melhor rendimento e menor nível de pigmentação.

10. O polieletrólito desidratado em “spray dryer” não perde suas propriedades de auxiliar de floculação, mantém suas propriedades reológicas e apresenta a vantagem de ser mais facilmente solubilizado em água do que o polieletrólito separado por precipitação alcoólica.

11. A viscosidade aparente de proteínas (proteínas colagênicas), recuperadas de aparas de peles bovinas curtidas, apresenta aumento sinérgico quando misturadas com polieletrólito.

12. A cutícula do *Cereus peruvianus* apresenta uma fração lipídica que corresponde a 10,33% de sua massa seca.

13. O rendimento de substâncias pécticas, extraídas a frio com ácido clorídrico concentrado (6M), foi de 52 % em relação à massa seca da cutícula desengordurada em condições otimizadas.

14. A substância péctica foi identificada como uma homogalacturonona de baixo teor de metoxila.

15. A substância péctica, extraída pelo método A/B (tratamento ácido/básico) , apresentou massa molar média de 150.000 D, enquanto a substância péctica extraída pela mistura EDTA/oxalato apresentou massa molar média de 140.000, o que sugere que o processo A/B não provoca depolimerização da substância péctica.

16. O processo de extração A/B de substâncias pécticas foi monitorado através de espectrofotometria de absorção atômica e Ressonância Paramagnética Eletrônica e ficou demonstrado que o mesmo se baseia na remoção de cations, principalmente Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} .

17. O estudo da cinética de extração do cálcio da cutícula com ácido clorídrico 6M demonstrou que 95% do cálcio é removido após 30 minutos de tratamento a temperatura ambiente.

18. A substância péctica extraída a frio e fracionada em ultrafiltração, utilizando-se uma membrana de 100 kDaltons, apresentou viscosidade intrínseca superior a viscosidade intrínseca da pectina integral.

19. A pectina extraída pelo método A/B apresentou gel com força grau 100 em presença de 30 mg de cálcio e 30% de sólidos totais em uma extensa faixa de pH (2,4 a 4,3).

20. A força do gel com pectina de baixo metoxila foi reduzida com a redução do conteúdo de sólidos totais na faixa de 30 a 20%. Géis preparados com 30% de sólidos totais tiveram a sua força reduzida com a redução do conteúdo de cálcio na faixa de 30 a 20 mg/g (cálcio por grama de gel) em toda faixa de pH testada.

21. A pectina ultrafiltrada também teve a sua força reduzida com a redução da concentração de sólidos totais em uma concentração fixa de cálcio (30 mg/g), mas foi bem menos pronunciada que a dependência verificada para a pectina não ultrafiltrada.

22. A pectina ultrafiltrada, em presença de 25 mg/g de cálcio por grama de gel, teve a sua força próxima do grau 100 em quase toda a faixa de pH testada com 25% de sólidos totais.

23. A fração lipídica, que apresentou rendimento de 10,33 %, teve a composição de ácidos graxos qualitativamente determinado e foram identificados os seguintes constituintes: ácido palmítico, ácido beênico e araquídico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIN, P; NEUKON, H. & DEUEL, H. Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. **Arch. Biochem. Biophys.**, **90**:46-51 1960.
- ALDERETE, A. The Absorptive Properties of the Fleshy pulp of Some Spécies of *Opuntia* and *Cereus*. **Publs. Inst. Invest. Microquim. Universidade Nacional Litoral. (Rosário, Argentina).**, **21**: 69, 1955.
- ALVAREZ, M.; COSTA, S.C.; HUBER, A . ; BARON, M. & FONTANA, J. D. " The cuticle of the cactus *Cereus peruvianus* as a source of a homo- α -D-galacturonan". **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **51/52**, 367-377, 1995.
- ASPINALL, G. O . Chemistry of cell wall polysaccharides. In: **The Biochemistry of Plants**. Preiss, J. (ed.) , Academic Press, New York, 1980. p. 480-486
- AXELOS, M. A . V. Ion complexation of biopolimers: Macromolecular structure and viscoelastic properties of gels. **Die Makromolekulare Chemie, Macromolecular Symposia**, **39**:323-328, 1990.
- BACKEBERG, C. & KNUTH, F.M. **Kaktus ABC**. Gyldendalske Bogjhandel-Nordish Forlag, Kobenhavn, 1935.
- BACKEBERG, C. **Die Cactaceae. Handbuch der Kakteenkunde II. Cereoideae (Hylocereeae - Cereae [Austrocereinae])**. Jena, Gustav Fischer Verlag, 1959.
- BAKER, G. L. & GOLDWIN, M.W. Jellyng pectin products suitable for use with salads, deserts, fruit juices. Tc. Us 223574, 4 de março, 1941. (c.f. Chemical Abstracts 35, p 3730 , 1941).

- BARNES, H. A . ; HUNTON, J. F. e WALTERS , K. **An Introduction to Rheology**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, Inc., 1989. 199 p.
- BARTOLOME, L. G. & HOFF, J.E. Firming of potatoes: Biochemical effects of preheating. **Agric. Food. Chem.**, **20**: 266-70, 1972.
- BICALHO, U. O. & PENTEADO, M.V.C. Estudo do Fruto e do Articulo da *Opuntia ficus- indica* (L) Miler Cultivada em Valinhos S.P. I - Características Bromatológicas. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, **17**(1): 93-101, 1981.
- BICALHO, U. O & PENTEADO, M.V.C. Estudo do Fruto e do Articulo da *Opuntia ficus-indica* (L) Miler Cultivada em Valinhos -SP. II - Características Bioquímicas. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo**, **18**(1): 68-74 ,1982.
- BITTER, T. & MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Anal. Biochem.**, **4**: 330-334, 1962.
- BLACK, S. A . & SMIT, C.J.B. The effects of demethylation procedures on the quality of low-ester pectins used in dessert gels. **J. Food. Sci.**, **37** (5): 730-732 ,1972.
- BLUMENKRANTZ, N. & ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, **54**: 484-489, 1973.
- BOBBIO , PAULO A. & BOBBIO, F. O. **Química de Processamento de Alimentos**. Livraria Varela, São Paulo. 1984 p. 67-68.
- BOCK, W. & LANGE, D. Production of low methoxil pectin extracts with ammonia ; effect of deesterification conditions on the gelation capacity. **Nahrung.**, **7**(1): 71-8,1963.

- BRACONNOT, H. Recherches sur un nouvel acide universellement rependu dans tous les vegetaux. **Ann. Chim. Phys. Ser. II**, **28**:173-1825.
- BRITTON, N. L. & ROSE, J. N. **The Cactaceae. Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family IV.** Carnegie Institution, Washington-DC, 1923.
- BROW, F. ; HIRST, E.L. & JONES, J.K.N. Cholla gum. **J. Chem. Soc.**, 1761-6, 1949.
- BRYANT, E.F. Aci amides of pectinic acid. US 2480710, agosto 30, 1949 (cf. **Chemical Abstracts** **44**, 2018c, 1950).
- CAMPELLO, B. E. & CORRÊA, A. S. Emprego das Cactáceas Forrageiras no Polígono das Sêcas. **Serv. Inf. Agric. n. 845, Minist. Agric. Rio de Janeiro**, (1960). p 1-34.
- CHRISTENSEN , S. H. Pectins. In: **Food Hydrocolloids III.** GLICKSMAN, M. (ed.) , CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986. p. 203-205.
- COLIN, H. & LEMOYNE, S. Uronic material from the pith of Helianthus. **Compt. Rend.**, **211**: 44-47, 1940.
- CORREA, A. S. Revisão dos Conhecimentos sobre as "Palmas Forrageiras". **Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco. Boletim**, **5**:1-44, 1963.
- COSTA, S.C.; ALVAREZ, M. & UTUMI, H. Extração de Pectinas da Cutícula do *Cereus peruvianus*. **Anais do IV Encontro Científico da UEM**, 1992.

- CRUSE, R.R. "A chemurgic survey of the desert flora in the American southwest". **Economic Botany**, **3**: 111-134, 1949.
- CRUSE, R.R. Desert Plant Chemurgy: A Current Review. **Economic Botany**, **27**: 210-230, 1973.
- DEMBYTSK, V. M. & REZANKA, T. Molecular species of wax esters in *Cereus peruvianus*. *Phytochemistry*, **42** (4): 1075-1080, 1995.
- DE VRIES, J. A . ; ROMBOUTS, F. M. ; VORAGEM, A . G. J. & PILNIK, W. Enzymic degradation of apple pectins. **Carborydr. Polym.**, **2**: 25-33 ,1982.
- DE VRIES, J. A . ; DEN VIJL, C.H.; VORAGEN, A . G. J. ; ROMBOUTS, F. M. & PILNIK, W. Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. Enzimatic degradation of apple pectins. **Carbohydr. Polym.**, **3**:193-205 ,1983.
- DESROSIER, N.W. **Conservacion de alimentos**. 1. ed. México: Compañia Editorial Continental, 1964. 468 p.
- Di GIACOMO, A . & RISPOLI, G. Pectins containing low level methoxil groups.I-Preparation of low methoxil pectins by means of deesterification with ammonia. **Boll. Lab. Chim. Provinciali (Bologna)**, **12** : 479-84, 1961.
- DOËSBURG, J.J. & GREVERS, G. Setting time and setting temperature of pectin jellies. **Food Research** **25**, 130,135, 1960.
- DUBOIS, M. ; GILLES, K. A . ; HAMILTON, J. K. ; REBERS, P.A . & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related susbstances. **Anal. Chem.**, **28**:350-356, 1956.

- DURAND, D.; BERTRAND, C.; BUSNEL, J. P. ; EMERY, J. ; AXELOS, M.V. A . ; THIBAULT , J.F.; LEFEBVRE, J. ; DOUBLIER, J. L. ; CLARK, A . H. & LIPS , A . Physical gelation induced by ion complexation : Pectin-calcium systems. In: **Physical Networks**. BURCHARD, W & ROSS-MURPHY, S.B. (eds.), Elsevier Applied Science Publishers, New York, 1990, p. 283-300
- ESPINOSA, A . J.; BORROCAL, A .R.; JARRA, M.; ZORRILLA, G.C.; ZANABRIA, P.C. &MEDINAT, J. Properties and preliminary investigations on the preservation of the fruits and juice of the barbay fig (*Opuntia ficus indica*). **Fruits**, **28(4)**: 285-293, 1973.
- FERNANDES, A.C. "Industrial Utilization of *Opuntia ficus-indica*". **10th Congr. Intern. Ind. Agr. y Aliment. Madrid, 1078**, 1954
- FISHMAN, L.M. et al . Studies of Pectin Solution Properties by High-Performance Size Exclusion Chromatography. **J. Agric. Food. Chem.**, **32**: 372-378, 1978.
- FIZMAN, S.M. Propriedades funcionales de los hidrocoloides polisacáridicos: mecanismos de geleificación. **Rev. Agroquím. Technol. Alim.**, **29(4)**: 415-424, 1989.
- FONTANA, J.D.; GEBARA, M.; BLUMEL,M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C,.R. & JOHNSON, K.G. , **Methods Enzimol.**, **160**:560-571, 1988.
- GAVA, A . J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 7. Ed. São Paulo: Nobel, 1986. p. 233-239.
- GIBSON, A . C. The ever-changing landscape of cactus systematics. **Ann. MO. Bot. Grad**, **73(3)**: 532-555, 1986.

- GRAHAM, R.P. & SHEPARD, A. D. Pilot-plant production of low-methoxil pectin from citrus peel. **J. Agr. Food Chem.**, **1**: 993-1001, 1953.
- GROSSO, C. F. Efeito de diferentes açúcares, pectinas e ligações de água na formação de géis pécticos. Campinas, 1992. 116p Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.
- GRUESS, W.V. Pectina , geléia e geleados. In: **Produtos Industriais de Frutas e Hortaliças**. São Paulo, Edgar Blucher, 1973, p. 410-46.
- GUDSHORORN, W. **O livro dos Cactus**. Coleção Habitat, Tradução de Maria do Carmo Cary. Editorial Presença Ltda. , 1975.
- HAUG, A . & LARSEN, B. **Acta Chem. Scand.** **15**, 1395-1396 ,1961
- HILLS, C.H.; MOTTERN, H.H.; NUTTING,G.C. & SPEISER, R. Enzyme - demethylated pectinates and their gelation. **Food Technology**, **3**: 90-94,1949.
- HUBER, A . Characterization of aqueous solved polysaccharides by means of chromatography-multidetction. In: **Analyses of polymer/molar-mass distribution of polymers, polyelectrolytes and latices**. KULICKE, W.M (ed.), Huthing & Wepf Verlag,1992. p. 248-270.
- HUDSON, H. & SINGLEY,J. Upgrading existing water-treatment plants. **AWWA Seminar, 20120**, 1974.
- HUGHES, J.; RAMOS, G. & MOYNA, P. "Main components in *Cereus peruvianus* epicuticular wax". **J. Nat. Prod.**, **43 (5)**: 565-566, 1980.
- HUNT , D.R., **Order 31. Cactaceae in Hutchinson, The Genera of Flowering Plants.. Dicotyledones. II**. Claredon Press, Oxford, 1967.

- HUNT, D.R. & TAYLOR, N.P. (eds). The genera of the Cactaceae: towards a new consensus. **Bradleya**, **4**: 65-78, 1986.
- IBAÑEZ- CAMACHO, R. ; MECKES-LOZOYA, M. & MELLADO-CAMPOS, V. The Hypoglycemic Effect of Opuntia Streptacantha Studied in Diferent Animal Experimental Models. **Journal of Ethnopharmacology**, (**7**): 175-181, 1983.
- JOSEPH, G.H. A note concerning na interesting reaction between pectin and cow milk. **J. Soc. Chem. Ind.**, **49**: 159-160, 1930.
- JOSEPH, G. H. ; KIESER, A . H. & BRYANT, CE. F. High-polymer ammonia-demthylated pectinates and their gelation. **Food Tecnology.**, **3** 85-90, 1949.
- KATCHALSK, A . & FEITELSON, J. Kinectics of alcaline hydrolysis of pectinic acids. **J. Polymer Sci.**, **13**: 358-92 ,1954.
- KAUFMAN, C. W.; FEHKBERG, E.R. & OLSEN , A . G . Chemists adpt pectins to new industrial uses. Part I. **Food Insds.**, **14**: 57-8, 1009 1942.
- KAWABATA, A . & SAWAYAMA, S. Effect of pH and salts on the texture of low-methoxil pectin jelly. **Journal of the Japanese Society of Food and Nutrition**, **28** (1):, 17-24, 1975.
- KIM, W.J. , SMIT, C.J.B. and RAO, V.N.M. Demethylation of pectin using acid and ammonia . **J.Food. Sci.**, **43**: 74-78, 1978.
- KOHN, R. and FURDA, I. Binding of calcium ions to acetyl derivatives of pectin. **Coll. Czerch. Chem. Commun.**, **33**: 2217-2225, 1968

- KOHN, R. La liaison du calcium aux groupes carboxyliques de la pectine. **La Sucrierie Belge**, **88**(1): 13-19; 83-89, 1969.
- KOHN, R. Binding of divalent cations to oligomeric fragments of pectin. **Carbohydr. Res.**, **160**: 343-353, 1987.
- KURODA, A . & KAMIYAMA, S. Stévia leaf extract purification. **Japão Patente 79124000**, 1979.
- LEO, H.T. & TAYLOR, C.C. Low-sugar pectinic acid gels. US 3034901, 15 maio, 1962. Appl. Aug. 8, 1962, 3pp. (cf. Chemical Abstracts, 57, 5079f, 1962.
- LERCKER, G.; LERICI, C.R. & CAPELLA, P. "Caratteri chimici del fico d'India (cactus Opuntia)". **Carbodrati e lipidi del frutto. Riv. Ital. Sostanze Grasse**, **53**(10): 250-257, 1976.
- LIN, M. J. Y. , SOSULSKI. F. W. , HUMBERT, E.S. AND DOWNWY, R..K. Dsitribution and Composition of pectins in Sunflower plants. **Can. J. Plant. Sci.**, **55**: 507-513 ,1975.
- LINEWEAVER , H. Acceleration by electrolytes of alkaline desesterification of pectin. **J. Am. Chem. Soc.**, **67**,(7):1292-1293, 1945.
- LIU, W. & NORISUYE, T. Order-disorder conformation change of xanthan in 0.01 M aqueous sodium chloride: Dimensional behaviour **Biopolymers**, **27**:1641-1654,1988.
- LOPES, A . & LI-HSIENG, L. Low-methoxil pectin apple gels. **Food Technol. (Chigaco)**, **22**(8): 1023-8, 1968.
- MAY, C. D. Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. **Carbohy. Polymers**, **12**: 79-99, 1990.

- McCREADY, R.M.; OWENS, H. S. & MACLAY, W.D. Alkaly-hydrolyzed pectins are potential Industrial products. **Food Industries**, **16** (10): 69-71, 139-40, 1944.
- McCREADY, R. M.; OWENS, H. S. & MACLAY, W.D. Low-methoxil pectinic acids. US 2448818, Setembro 7, 1948 (cf. Chemical Abstracts, 42, 9004g, 1948)
- McCREADY, R. M. & McCOMB, E.A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, **24**(12): 1986-1988, 1952.
- McCREADY, R. M. Pectin and pectic acid. In: **Methods in carbohydrate chemistry**. Academica, New York, Vol. V, p.167-70, 1965.
- McGARVIE, D & PAROLIS, H. **J. Chem. Soc., Perkin trans. 1**: 1464-1466 ,1979a.
- McGARVIE, D. & PAROLIS, H. The Mucilage of *Opuntia ficus-indica* . **Carbohydrate Research**, **69**: 171-179, 1979b.
- McGARVIE, D. Methilation Analysis of *Opuntia ficus-indica*. **Carbohydrate Research**, **88** : 305-314 1981.
- MEDEIROS, M. J. Chemical Structure and Nutritive Value of Cactus as Fodder. **Inst. Pesquisas Agron. Pernambuco, Publ.**, **5**: 16 (1958-59) 53: 15421 f.
- MELLA, M.A.R. Estudio Bromatológico de Tunas (*Opuntia ficus-indica*) y Peras (*Pyrus communis*). **Anales Fac. Quím. Farm. Univ. Chile**, **10**: 94,1958.

- MERRILL, R.C. & WEEKS, M. The thermal degradation of pectin. **J. Am. Chem. Soc.**, **67**: 2244-47, 1945.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. **Anatomia of the Dicotyledone**. Vol. I Oxford, Clarendon Press 1972.
- MINDT, L., SAAG, K.; SANDERSON, G.R.; MOYNA, P. & RAMOS, G. Cactacea Mucilage Composition. **J. Sci. Food Agric.**, **26**: 993-1000 1975.
- MITCHELL, W. A . Ammoniated pectins. **Food Technology**, **4**:123-133, 1950.
- MOYNA, P. & TÚBIO, R. "Mucilages in succulent plants". **Planta med.**, **32**, 201-205, 1977.
- MOYNA, P. & DIFABIO, J. L. Composition of Cactacea Mucilages. **Planta Med.** , **34**(2): 222-223, 1978.
- MYERS, P.B. & BAKER, G. L. Fruit jellies. V - The role of pectin. 1- The viscosity and jelligyng properties of pectin solutions. **Expot. Sta. Bull.** **149 (1927)** (c.f. Chemical Abstracts 21 , 3988, 1927).
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Pectin. In: **Food Chemicals Codex** (2 edição), 1972. p.577.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Pectin. In: **Food Chemicals Codex** (3 edição),1981. p.790.
- NELSON, N.A . Photometric adptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.**, **153**:375-380, 1944.
- NERD, A . ; RAVEH, E. & MIZRAHI, Y. Adaptation on five columnar cactus species to various conditions in the Negev desert of Israel. **Economic Botany**, **47**(3): 304-311, 1993.

- NEUKON, H. & DEUEL, H. Alkaline degradation of pectin. **Chem. E Ind. (London)** 1958, 683.
- NOZAKI, N.; MESSERSCHMIDT, I. & RODRIGUEZ, D.G. Remoção de poluentes em efluentes de curtumes com polieletrólitos naturais. Estudos de especiação química do cromo. **Arq. Biol. Tecnol.** **36(4)**:761-770, 1993.
- OAKENFULL & SCOTT , L. Hydrophobic Interaction in the Gelation of High Methoxyl Pectins. **Journal of Food Science**, **49**: 1093-1098 1984.
- OSPINA, C.M.E. "Contribución al estudio de *Opuntia ospiniae* (cactaceae). **Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.** , **1** (4): 71-76, 1971.
- O'MÉLIA, C.R. "Coagulation". In: Water treatment plant design. Cap. 4 Ann Arbor Science Publishers, Inc. Edited by Robert L. Sanks, USA, 1979.
- OWENS, H.S. & MACLAY, W.D. Pectic Materials. US 244266, junho 29, 1948 (cf. **Chemical Abstracts**, **42** , P6472e,1948).
- OWENS, H.S. ; MCCREEDY, R.M. & MACLAY, W. D. Gelation characteristics of acid-precipitated pectinates. **Food Technology** **3**, 77-8 , 1949.
- OWENS, H. S. ; MCCREEDY , R. M. & MACLAY, W.D. Isolation of low-methoxil pectin. US 2496303, fev. 7, 1950 (cf. **Chemical Abstracts**, **44**, 4603e, 1950).
- PARIKH, V. M. & JONES, J.K.N. Cholla gum . I Structure of the degraded cholla gum. **Can. J. Chem.**, **44**: 327-333, 1966a.

- PARIKH, V. M. & JONES, J.K.N. Cholla gum. II Structure of the undergraded cholla gum. **Can. J. Chem.**, **44**: 1531-1539, 1966b.
- PAUL, r. & GRADSEIGNE, R. Extraction and utilization of pectase. **Bull. Assoc. Chem. Sucri. Dist.** **46**, 233-7 , 245-6 (1929). (c.f. Chemical Abstracts 24, 2511², 1930).
- PIMIENTA - BARRIOS, E. NOBEL, P.S. Pitaya (*Stenocereus* spp., Cactaceae): An Ancient and Modern Fruit Crop of Mexico. **Economy Botany**, **48**(1): 76-83, 1993.
- PESSOA, A.S. Cultura da Palma Forrageira. 2^a. ed., Recife, SUDENE. Agrícola número 5 - 99 p., 1969.
- PILNIK, W & VORAGEN, A . G. J. In: Pectic substances and other Uronides. The Biochemistry of Fruits and their Products, Vol.I. Academic Press, New York, pp.53-73, 1970.
- PILNIK, W. & ROMBOUTS, F.M. Polysaccharides and food processing. **Carbohydrate Research**, **142** , 93-105, 1985.
- POWELL, D. A . , MORRIS, E. R. , GIDLEY, M. J. AND REES, D. A . Conformations and interactions of pectins . II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. **J. Mol. Biol.** **155**: 517-531,1982.
- RACAPÉ, E. ; THIBAUT, J.F.; REITSMA, J.C.E. ; PILNIK, W. Properties of amidated pectins II. Polyelectrolyte behaviour and calcium binding of amidated pectins and amidated pectic acid. **Biopolymers**, **28**: 1435-12448, 1989.
- RAUCH, G.H. **Jam manufacture**. 2. Ed. London: Leonard Hill Books, 1965. 191p.

- REES, D. A . Polysaccharide conformation in solutions and gels-recent results on pectins. **Carbohyd. Polym.**, **2**: 254-263, 1982.
- RING, S.G. ; L'ALSON, K. J. & MORRIS, V.J. Static and dynamic lighth-scattering studies of amylose solutions. **Macromolecules**, **8**:182-188, 1985.
- RISPOLI, G. & Di GIACOMO, A . Pectins containing low level methoxil groups. II - Principal characteristics of gelatinization. **Boll. Lab. Chim. Provinciali (Bologna)**, **13** (2): 122-8, 1962.
- RODRIGUEZ, D. G. **Polieletrólitos Naturais**. Tese de Mestrado apresentada à Escola de Engenharia da UFMG, 1984.
- ROMBOUTS, F.M & THIBAUT, J.F. Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. **Carbohydr. Res.**, **154**: 177-188,1986.
- SAJJAANANTAKUL, T. ; VAN BUREN, J.P. & DOWNING, D.L. Effect of methyl ester content on heat degradation of chelator-soluble carrot pectins. **J. Food Science**, **54**: 1272-1277, 1989.
- SANDS, L. & KLAAS, R. The composition of cholla gum. I. The isolation of L-arabinose, D-galactose, and L-rhaminose. **J. Am. Chem. Soc.**, **51**: 3441-3446, 1929.
- SCHLAUCH, M.S. Coagulation for gravity type clarification and thickening. In: **Polyelectrolytes for water and wastewater tratment**. SCHWOYER, W. L. K. , ed. , CRC Press, Florida, 1981, p.91-144.
- SCHURMANN, K.M., Gesamtbeschreinbuing der Kakteen. (Monographia Cacterarum) I, Verlag von J. Neumann, Neudamm, 1899.
- SELVENDRAN, R.R.; STEVENS, B . J. H. & DU PONT, M . S. Dietary fiber: chemistry, analisys, and properties. **Adv. Food. Res.**, **31**: 117-209 ,1987.

- SEWER- LEWANDOWSKA, B. ; ZDZIENNICKI, A . & ZDZIENNICKA, D.
 Conditions for gelling slightly methylated pectins. **Pr. Inst. Lab. Badaw Przem. Spozy**, **22(4)**: 483-502,1972.
- SHULTZ, T. H. ; LOTZKAR, H.; OWENS, H.S. & MACLAY, H.D. Influence of method of desesterification on the viscosity and acid behaviour of pectinic acid solutions. **J. Phys. Chem.**, **49**: 564-63, 1945.
- SMIT, C. J. B. & BRYANT, E. F. Changes in molecular weight of pectin during methilation with diazomethane. **J. Food Sci.**, **34**: 191-3 ,1969.
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **J. Biol. Chem.**,**160**:61-68, 1945.
- SOSULSKI, F. L.; LIN, M.J.Y. & HUMBERT, E.S. Gelation characteristics of acid-precipitated pectin from sunflower heads. **Can. Inst. Food Sci. Technol.**, **11(3)**: 113-116, 1978.
- SPEISER, R.; EDDY, C.R. & HILLS, C.H. Kinetics of desesterification of pectin. **J. Phys. Chem.**, **49**: 563-579, 1945.
- SPEISER ,R. & EDDY ,C.R. Effect of molecular weight and method of desesterification on the gelling behaviour of pectin. **J. Am. Chem. Soc.**, **63**: 287-93, 1946.
- TABAK, S. & PUSCHEL, C. Química das Cactáceas. I. Polissacarídeo do Cactus *Cereus triangularis*. **An. Acad. bra. Ciênc.**, **41(1)**: 63-66, 1969.
- TAYLOR, H. & CONRAD, E. Stoichiometry Depolymeration of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following action of their carbodimide - activated carboxyl groups. **Biochemistry**, **11(8)**:1383-1388, 1972.

- THIBAUT, J. F. & RINAUDO, M. Interactions of mono- and divalent cations with alkali and enzyme-deesterified pectins. **Biopolymers**, **24**: 2131-2144, 1985.
- TIBAU, A.O. *Pecuária Intensiva, com uma introdução sobre forrageiras e pastos*. São Paulo, Nobel 210 p. 1979.
- TOWLE, G. A. & CHRISTENSEN, O. Pectin. ch.XIX. In: **Industrial Gums**. WHISTLER, R.L. & BE MILLER, J.N. (Eds.), Academic Press, New York, 1973. 429 p. 1973.
- TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. **Nature**, **166**: 444, 1950.
- TUTIN, F. Behaviour of pectin towards alkalies and pectase. **Biochem. J.**, **15**: 494-497, 1921.
- VAN BUREN, J. P. The Chemistry of Texture in fruits and vegetables. **J. Texture Studies**, **10**: 1, 1979.
- VAN DEVENTER-SCHRIEMER, W. H. & PILNIK, W. Studies of pectin degradation. **Acta Alimentaria**, **16**: 143-153, 1987.
- VIDAL, C. & VARELA, G. Amino Acid Distribution in the Prickly Pear and Acorn. Possibilities of Improving the Nutritional Value of their proteins. **Arch. Pharm.**, **9**(11-12): 413-423, 1968.
- VILLAREAL, F; MENDOZA, P.R.; ARELLANO, V. & MORENO, J. Estudio Químico Sobre Seis Especies de Nopales (*Opuntia* spp). **Ciência (Mex.)**, **22**:59-65, 1963.

VILLAREAL, F. ; ALVA, B. E. & ROMERO, G. Estudio químico sobre jugos de tunas enlatadas. **Ciência (Mex.)**, **23**(2): 75, 1964.

WALKINSHAW, M. D. & ARNOTT, S. Conformation and interactions of pectins. I. X-ray diffraction analyses of sodium pectate in neutral and acidified forms. II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. **J. Mol. Biol.**, **153**: 1055-1073 e 1075-1085, 1981.

WOODMANSEE, C.W.; BAKER, G.L.; POLLARI,V.E. & MURRAY,W.G. How sugars affect dispersibility of pectins in gel powers. **Food industries**, **18**: 356-7 ,1946.

YOSHIMURA , K. (1895). **Bull. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokio**, **2**: 207

YOSHIMURA , K. (1896). **Chem. Centralbl.**, **67**: 46.