



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

ISOLAMENTO DA PECTINA EM FRUTOS E SUA CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

MARIANNE DE SOUZA LIMA

RECIFE
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIANNE DE SOUZA LIMA

**ISOLAMENTO DA PECTINA EM FRUTOS E SUA
CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE
INFRAVERMELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição, área de concentração Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof^o Dr. José Almiro da Paixão

RECIFE
2007

Lima, Marianne de Souza
Isolamento da pectina em frutos e sua
caracterização por espectroscopia de infravermelho /
/ Marianne de Souza Lima. – Recife : O Autor, 2007.
77 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Pectinas – extração. 2. Grau de metoxilação -
Infravermelho. I. Título.

634.6
664.25

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2007-46

TÍTULO: Isolamento da pectina em frutos e sua caracterização por espectroscopia infravermelho.

MESTRANDA: Marianne de Souza Lima

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 06/03/07

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford


Prof.^a. Dr.^a. Silvana Salgado Magalhães


Prof.^a. Dr.^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por estar vencendo mais uma etapa na minha vida.

Aos *meus pais*, pelos ensinamentos, bem querer, e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu filho *Vinícius Lamartine*, o presente mais lindo que Deus me deu.

Aos meus irmãos, *César e Mariângela*, ao meu cunhado *Paulo Gustavo*, e ao meu sobrinho *Pedro Lucas*, pelo amor, estímulo e momentos de alegria.

Ao meu esposo *Lamartine*, por todo amor, carinho, incentivo e acima de tudo paciência.

Ao *Profº José Almiro*, que me acolheu e confiou em mim. Obrigada por todos os ensinamentos, orientação e horas de dedicação.

Aos *tios e primos* pelo estímulo e carinho.

Às amigas de turma do mestrado, *Ana Paula, Carolina, Kelvina e Roberta*, pelos momentos de descontração, companheirismo e apoio.

À equipe do Laboratório de Análise e Experimentação de Alimentos – LEAAL, *Alexandre, Arthur, Camilo, Fernanda, Laércio, Lourdes, Marcos, Moisés, Olívia, Silvinha, Solange e Vivaldo*, pela amizade e apoio técnico.

Às professoras, *Alda Verônica, Edleide Pires, Margarida Angélica, Marisilda Ribeiro, Silvana Salgado, Tânia Stamford e Zelyta Faro*, por todos os ensinamentos e profissionalismo.

À professora *Samara Alvachian* Andrade pelas análises estatística e presteza.

À turma da Central Analítica da UFPE, *Conceição, Lúcio, Priscila, Ricardo* e em especial à *Eliete*, pelas análises de infravermelho e acolhimento.

A *Rafael Padilha*, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, que sempre me socorreu com as liofilizações; e por toda a sua amizade.

Às profs. **Samara Andrade** e **Margarida Angélica** pela contribuição científica.

À **Emmanuela, Danielle, Eliane, Helane, Vanessa, Suellen, Cibelle, Tiago, Gustavo, Rafael e Hiram**. A.M.I.G.O.S. que me acompanharam desde a graduação e até hoje sempre me incentivam.

À **Aline, Fábio, Eduardo, Luciano, Auricélio, Carolina, Caroline, Roberta, Renata, Rafaela e Júnior** pela companhia em todos os momentos, principalmente nas madrugadas. Agradeço também pela compreensão na minha ausência em tantos momentos.

À **Neci**, secretária da Pós-Graduação, por toda a paciência e ajuda em momentos que tanto precisei.

A **Roberto** da administração, pela ajuda na obtenção dos meus reagentes.

A CAPES pela bolsa de incentivo à pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Nomenclatura	16
2.2 Ocorrência e função	17
2.3 Estrutura química	18
2.4 Propriedades Físicas e mecanismo de formação de gel	22
2.5 Condições de extração de pectinas	24
2.6 Determinação do grau de metoxilação de pectinas	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Local da experimentação	31
4.2 Material	31
4.2.1 Amostras de frutos	31
4.2.2 Padrões	32
4.2.3 Reagentes	33
4.2.4 Equipamentos	33
4.2.5 Outros materiais	33
4.3 Métodos	34
4.3.1 Extração e Isolamento de pectinas	34
4.3.1.1 Extração e Isolamento de pectinas sob diferentes condições de pH	34
4.3.1.2 Ensaio de otimização	36
4.3.1.2.1 Desenho experimental	38

4.3.2 Determinação da abertura dos poros do tecido de poliéster e dos diâmetros dos fragmentos de pectinas liofilizadas	39
4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho	39
4.3.3.1 Preparo das pastilhas de KBr	39
4.3.3.2 Determinação do grau de metoxilação	39
4.3.3.3 Análise estrutural das pectinas	40
4.3.4 Construção da curva de regressão linear	40
4.4 Análises Estatísticas	40
5. RESULTADOS	41
5.1 Resultados preliminares	41
5.1.1 Caracterização das frações de pectinas extraídas a diferentes pH's: grau de metoxilação e diâmetro dos fragmentos liofilizados	41
5.1.2 Caracterização do tecido de poliéster usado na filtração da pectina	44
5.2 Ensaio para otimização da extração de pectinas	44
5.3 Curva de regressão linear obtida a partir de padrões de pectinas	52
5.4 Determinação do grau de metoxilação dos frutos	55
5.5 Análise estrutural das pectinas	56
6. DISCUSSÃO	57
6.1 Resultados preliminares	57
6.1.1 Caracterização das frações de pectinas extraídas sob diferentes pH's: grau de metoxilação e diâmetro dos fragmentos liofilizados	57
6.1.2 Caracterização do tecido de poliéster usado na filtração e isolamento da pectina	59
6.2 Ensaio para otimização da extração de pectinas	60
6.3 Determinação do grau de metoxilação das pectinas	63
6.4 Análise estrutural da pectina	65
7. CONCLUSÕES	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da pectina	19
Figura 2.	Representação esquemática da cadeia de poligalacturônico variavelmente esterificado com metanol.	21
Figura 3.	Etapa de extração e isolamento de pectinas sob diferentes condições de pH.	35
Figura 4.	Sumarização do processo de extração e isolamento das pectinas	37
Figura 5.	Espectro de Infravermelho da pectina extraída do mesocarpo da laranja (a) Fração 1; (b) Fração 2; (c) Fração 3.	42
Figura 6.	Análise dos fragmentos de pectinas do mesocarpo da laranja	43
Figura 7.	Análise do tecido de poliéster	44
Figura 8.	Grau de Metoxilação (%) da pectina do mesocarpo da laranja	45
Figura 9.	Espectro de Infravermelho da pectina extraída do mesocarpo da laranja	46
Figura 10.	Rendimento (%) obtido na extração de pectina a partir do mesocarpo da laranja	47
Figura 11.	Grau de Metoxilação (%) da pectina da goiaba	49
Figura 12.	Grau de Metoxilação (%) obtido a partir da Goiaba (interação Tipo de Álcool X Tempo de extração)	50
Figura 13.	Espectro de Infravermelho da pectina extraída da goiaba	51
Figura 14.	Rendimento (%) obtido na extração de pectina a partir da goiaba	52
Figura 15.	Espectro de Infravermelho de padrão de pectina cítrica parcialmente metoxilada (a) e de ácido galacturônico (b)	53
Figura 16.	Coefficiente de Correlação Linear entre $[A_{1750}/(A_{1750} + A_{1650})]$ e grau de metoxilação dos padrões de pectinas	54
Figura 17.	Espectro representativo dos frutos grupo I, II e III	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Níveis codificados das variáveis	38
Tabela 2.	Níveis decodificados das variáveis	38
Tabela 3.	Efeito de diferentes pH's sobre o grau de metoxilação nas pectinas extraídas	41
Tabela 4.	Comparação dos diâmetros dos fragmentos de pectinas liofilizada.	43
Tabela 5.	Efeitos principais do planejamento 2^3 para a otimização da extração de pectinas a partir do mesocarpo da laranja	45
Tabela 6.	Efeitos principais do planejamento 2^3 para otimização da extração de pectinas a partir da goiaba	48
Tabela 7	a. . Rendimento (%) e Grau de metoxilação (%) dos frutos do grupo I	55
	b. Rendimento (%) e Grau de metoxilação (%) dos frutos do grupo II	55
	c. Rendimento (%) e Grau de metoxilação (%) dos frutos do grupo III.	55

RESUMO

Pectinas são hidrocolóides naturais encontrados em plantas superiores. O procedimento de extração ainda suscita dúvidas quanto à adequabilidade devido influência das condições de pH, natureza do ácido, tempo de aquecimento, e do tipo do álcool precipitante. O objetivo deste trabalho foi otimizar a metodologia de extração e isolamento de pectinas, bem como a caracterização em frutos, utilizando principais bandas de absorção do infravermelho. Foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 , com as seguintes variáveis independentes: pH; tempo de aquecimento e tipo de álcool em mesocarpo de laranja e goiaba. Para caracterizar frutos foram estrategicamente estudados frutos, que rendem boa geléia (grupo I), e aqueles que variam em composição química, contém fibra (grupo II) e contém amido (grupo III). As variáveis estudadas foram rendimento (%) e grau de metoxilação (%) da pectina. Os dados foram analisados através de análise de variância e comparadas pelo teste de Duncam ao nível de 5% de significância. O grau de metoxilação da pectina isolada do mesocarpo da laranja variou de 60,95 para 70,91% e foi influenciado linearmente pelas três variáveis independentes. Enquanto o rendimento variou de 3,5 para 17,2%, sendo maiores em tempo de aquecimento (30') e pH 2,2. Na otimização da extração da pectina da goiaba pode-se verificar que apenas o pH influenciou significativamente, no grau de metoxilação. Quanto à interação entre o tipo de álcool e o tempo de aquecimento verificou-se que foi significativa, utilizando maior tempo de aquecimento e o etanol. Os dados obtidos neste trabalho com relação a pH e rendimento estão de acordo com outros publicados na literatura e mostra-se inovador em se tratando de caracterização de pectinas naturais com vista à indústria de geléias e pastas. O binômio tempo X temperatura deve ser levado em consideração, particularmente, em elevadas temperaturas por longos tempos de extração, que resultam em hidrólise da cadeia de pectina. Nos frutos do grupo I, as pectinas isoladas apresentaram elevados grau de metoxilação associado ao elevado rendimento. Com relação aos frutos do grupo II, apesar do grau de metoxilação mostrar-se elevado, o rendimento foi inferior ao limite mínimo estabelecido para a geleificação. Os frutos do grupo I mostraram-se com características favoráveis à obtenção de geléias, enquanto, os frutos do grupo II e III mostraram-se deficientes em pelo menos uma das variáveis. A proposta de extração sugerida neste trabalho para frutos em geral mostrou-se mais adequada, sem alterações na estrutura química da molécula de pectina, que permite caracterização de fontes naturais de pectinas.

Palavras-chave: pectinas, extração, grau de metoxilação, infravermelho.

ABSTRACT

The pectins are natural hydrocolloids met in superior vegetables, yet exhibit extraction procedure doubtly, poor suitability in relation pH conditions, acid nature, heat time, and precipitant agent. The goal was raised a methodology of extraction and isolating with better characterization through main bands of absorption. In order to complete this experiment, was carried out through factorial 2^3 plan as independent variables was take: pH, heat time and alcohol nature carrying both in orange mesoderm and guava integral fruits. In order to characterize were taken fruits with jelly properties (group I) and that varying in chemical composition, fibre (group II) and starch (group III). The dependents variables studied were methoxylation degree (%) and yield pectin (%). The statistical procedure was carried in order to evaluate optimization procedure; Duncam test was applied to characterize natural pectins. The methoxylation degree of orange vary from 60.95 to 70.91%, showed linear trend by three independents variables. Performance yield (%) vary from 3.5 to 17.2%, being most elevated with heat time (30') and pH minor (2,2). In other side for optimize extraction procedure through guava fruits only pH influenced methoxylation degree and showed interaction for alcohol nature, heat time using combination extraction nature alcohol (ethanol). The results obtained are rough agreement with others researchers, exhibit yet great applicability by characterizing natural pectins goaling jelly and jam industries. Time *versus* heat for extraction should be considered because involve high temperatures may result hydrolyze of main chain pectin. Fruits of group I showed higher degree of methoxylation and yield. While pectins isolated of group II showed high methoxylation degree while yield, showed bellow of minimal required for setting jelly. The fruits of group I exhibited all effort characterization in order to rendering jelly, while fruits of groups II and III showed impaired at least of one characteristic (pH, yield and/or methoxilation degree). The optimized procedure for extraction of pectin showed efficient for pectin exhibiting higher performance yield, without alterations in structural molecule suggesting good methodology for natural source of pectin.

Key-words: pectins, extraction, degree of methoxylation, infrared.

1.0 Introdução

As pectinas, hidrocolóides naturais presentes em plantas superiores, formam um grupo heteromolecular de polissacarídeos estruturais que são encontrados na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares (lamela média), contribuindo para adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica do tecido (MC CREADY, 1970; BRANDÃO & ANDRADE, 1999; MESBAHI et al., 2005). Além dessas funções, as pectinas são determinantes da textura dos vegetais, que se estabelece durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento. Naturalmente, as pectinas estão associadas à celulose, hemicelulose e lignina, sendo designada enquanto nesta forma de protopectina, podendo serem extraídas com abundância do mesocarpo da maioria dos frutos cítricos.

As protopectinas são pouco solúveis em água, e em presença de ácidos diluídos formam os ácidos pectínicos ou pécticos (MC CREADY, 1970).

Os ácidos pécticos consistem de cadeias de ácidos galacturônicos totalmente livres de metoxilas, com pouca solubilidade em água. Por outro lado, os ácidos pectínicos são formados por cadeias de ácidos galacturônicos, cujos grupos carboxilas do ácido galacturônico estão variavelmente esterificados com metanol, e se solúvel em água são chamadas de pectinas (JAYANI, 2005).

As pectinas são atualmente classificadas de acordo com seu grau de metoxilação, que corresponde à porcentagem dos grupos carboxil esterificado com metanol, porém sabe-se que além deste, a esterificação também pode ser por ácido acético e amida (CAPEL et al., 2005; GUILLOTIN et al., 2006).

As pectinas com teor de grupos carboxílicos esterificados com metanol entre 50-80% são conhecidas como pectinas de alto teor de metoxilas (ATM), portanto, quando o grau de esterificação for entre 25-50%, ou menos, são conhecidas como pectinas de baixo teor de metoxilas, BTM (CAPEL et al., 2005; FISHMAN et al., 2006). Entretanto, desconhece-se qual a base de expressão deste percentual, se equivalente metoxil /g de pectina ou eq. Metoxil /g de tecido.

A importância da pectina na tecnologia e no processamento dos alimentos está associada à firmeza, textura, retenção de sabor e de *flavor*, bem como seu papel como hidrocolóide na função de dispersante e estabilizante de diversas emulsões. A formação de gel é a principal característica funcional da pectina e depende essencialmente das características do meio: pH, teores de sólidos solúveis e cátions divalentes, além de depender dos níveis de pectinas e do grau de metoxilação destas (CHO & HWANG, 2000; GANCZ et al., 2006).

O grau de metoxilação das pectinas é determinado utilizando ferramentas analíticas, por exemplo, a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier. Esta vem sendo recentemente empregada como alternativa aos métodos químicos tradicionais, como por exemplo, o titulométrico (MC CREADY, 1970), que oferece a vantagem de ser mais

rápido, preciso e não requerer hidrólise da pectina (BOERIU et al., 1998; GNANASAMBANDAM & PROCTOR, 2000; MANRIQUE & LAJOLO, 2002; PAIXÃO & SILVA, 2005; SIRISOMBOON et al., 2005) nem dosagem do total de ácido galacturônico (MC FEETERS & ARMSTRONG, 1984; WOOD & SIDDIQUI, 1971; FILISETTI-COZZI & CARPITA, 1991).

O procedimento de extração de pectinas ainda suscita dúvidas quanto à adequabilidade devido ter influência sobretudo de condições de pH (JOYE & LUZIO, et al., 2000; MESBAHI et al., 2005), natureza do ácido (SAHARI et al., 2003) e agente precipitante (KALAPATHY & PROCTOR, 2001).

O método de extração, precipitação e posterior determinação do rendimento e do grau de metoxilação das pectinas mostram-se importante para viabilizar a caracterização e, sobretudo auxiliar na classificação de pectinas naturais.

2.0 Revisão de Literatura

2.1 Nomenclatura

A fim de padronizar a nomenclatura e facilitar o entendimento das substâncias pécticas, em 1944 o comitê da *American Chemical Society* revisou e definiu estas substâncias complexas como:

- ✓ Substancias pécticas: consiste em todos os materiais que contem ácidos poligalacturônico em sua composição.
- ✓ Protopectina: Consistem na forma natural da pectina, quando associada à celulose, hemicelulose e lignina. São pouco solúveis em água, e em presença de ácidos diluídos formam os ácidos pectínicos ou pécticos, de diferentes tamanhos moleculares e composição.
- ✓ Ácidos pécticos: são cadeias de ácidos galacturônicos totalmente livres de metoxilas e são pouco solúveis em água.
- ✓ Ácidos pectínicos: é usado para designar ácidos poligalacturônicos que contém mais que uma proporção insignificante de grupos metil éster.
- ✓ Pectina: são ácidos pectínicos solúveis em água, com os grupos carboxilas do ácido galacturônico variavelmente esterificados com metanol (JAYANI, 2005).

Na molécula de pectina pode não haver apenas esterificação por metanol. Em algumas formas, dependendo da origem, alguns grupos hidroxílicos da cadeia de ácido galacturônico podem estar acetilados e amidados, parâmetro este que define o grau de acetilação e amidação da pectina, respectivamente, que também influencia nas propriedades funcionais das pectinas (LEVIGNE, et al., 2002; LOOTENS et al., 2003; CAPEL et al., 2005; GUILLOTIN et al., 2006).

2.2 Ocorrência e função

As substâncias pécticas ocorrem sem exceção na parede celular primária e na lamela média das células vegetais (MC CREADY, 1970; LOOTENS et al., 2003; MESBAHI et al., 2005). A seiva da planta usualmente contém apenas traços das substâncias pécticas dissolvidas (MC CREADY, 1970). Há relatos também da presença de pectinas no citosol da célula vegetal (WU, 1987).

As pectinas encontram-se naturalmente em associação com a celulose e hemicelulose, que auxiliam na adesão entre as células, sendo consideradas as pectinas principais agentes cimentantes da parede celular, contribuindo desta forma para firmeza e resistência mecânica (ou coesividade) do tecido (ZHONGDONG et al., 2005).

Nos frutos em particular, onde são encontradas nas formas químicas variadas, e em níveis variáveis, as diferentes formas assumem papéis determinantes para a textura e firmeza do vegetal. Com o desenvolvimento do fruto ocorrem mudanças tais como a despolimerização, a solubilização e a desesterificação de grupamentos, na estrutura química

da pectina mediante ação das enzimas pectinolíticas, tais como a pectinametilesterase (EC 3.1.1.11), e poligalacturonase (EC 3.2.1.15). Essa alteração reflete de forma visível na textura e aceitação, contribuindo para o amolecimento do fruto, delimitando o final do desenvolvimento e maturação do fruto (JAYANI et al., 2005).

As fontes mais ricas de pectinas estão nos frutos cítricos, podendo ser extraídos em abundância principalmente do albedo, região mesocárpica do fruto. Outra fonte natural deste carboidrato é a maçã, que juntamente com aquele constitui as principais matérias-primas para produção de pectina a nível comercial em diferentes graus de metoxilação (> 80%; 50-80%; 2-49% e < 2%) (MC CREADY, 1970).

2.3 Estrutura química

Até recentemente aceitava-se que a cadeia central dos polímeros pécticos constituía-se de domínios de ramnogalacturonana e homogalacturonana (RIDLEY et al., 2001).

Entretanto, uma estrutura alternativa (figura 1) e mais aceita tem sido proposta, e afirma que o homogalacturonana é uma longa cadeia ramificada do ramnogalacturonana (WILLATS et al., 2005., 2003).

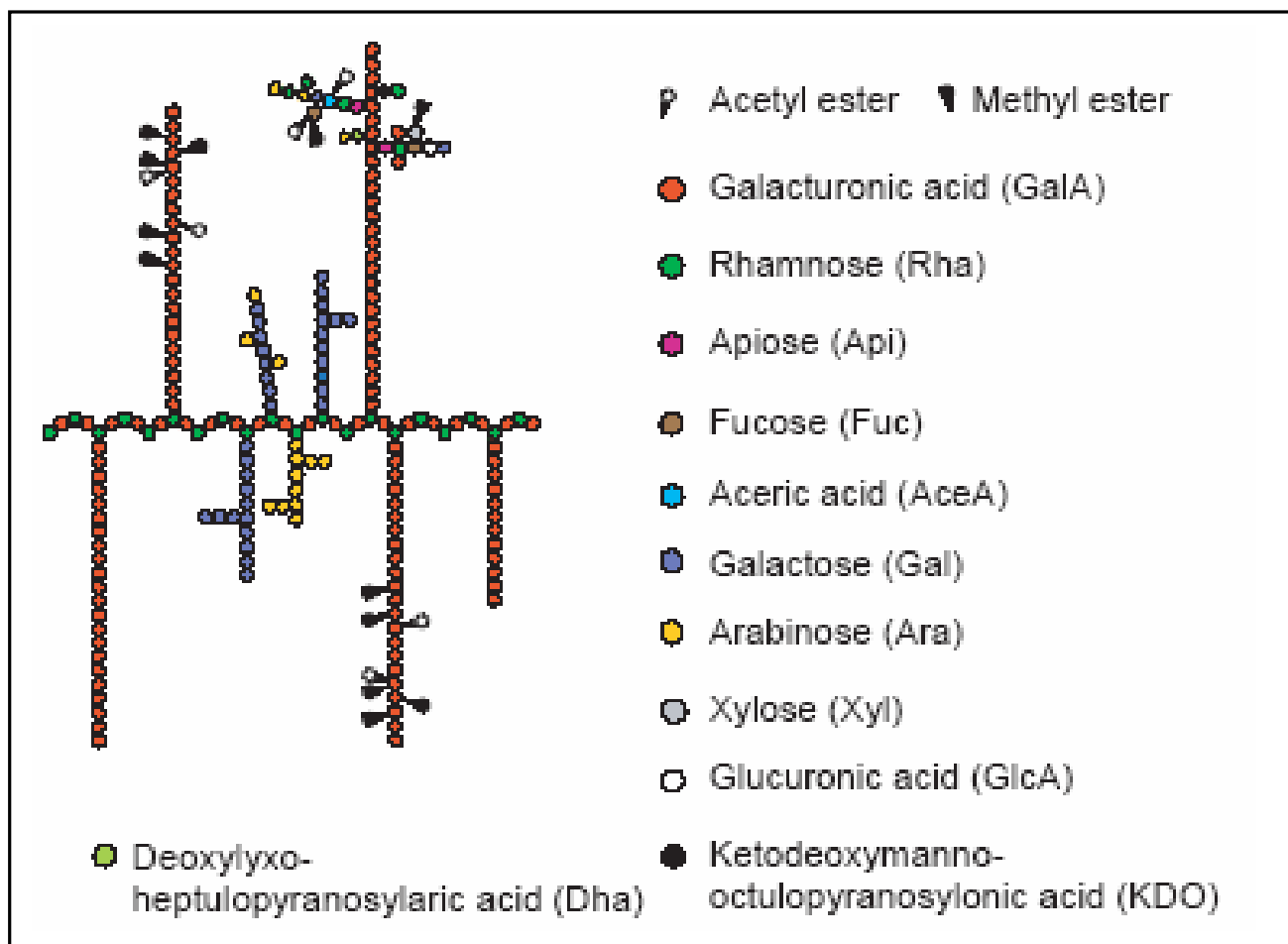


Figura 1. Estrutura da Pectina

Fonte: Willats et al., 2005.

A porção ramnogalacturonana consiste de unidades de ácido galacturônico alternadas com unidades de ramnose [\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(\rightarrow)]. Esta região é marcada, especificamente onde há resíduos de ramnose, por perda da linearidade da estrutura, causado por leves dobraduras na cadeia principal (WILLATS et al., 2005). Ainda os resíduos de ramnose carregam outros açúcares, além do poligalacturônico, tais como D-galactose, D-arabinose, D-xilose, D-fucose e traços de 2-O-metilfucose, que também podem ser encontrados (LOOTENS et al., 2003).

Entretanto, a cadeia principal deste hetero-polissacarídeo é o homogalacturonana (% variável). Este consiste de um polímero linear formado por repetidas unidades de ácidos galacturônicos, unidos através de ligações α -D-(1 \rightarrow 4), formando desta forma uma longa cadeia de poligalacturônico (CAPEL, et al., 2005; MESBAHI et al., 2005; GUILLOTIN et al., 2006) (Figura 2).

Os grupos ácidos carboxilas dos monômeros dos ácidos galacturônicos podem ou não estar esterificados com o metanol (Figura 2) ou ácido acético, onde a porcentagem dos grupos esterificados é expressa como grau de metoxilação ou acetilação, respectivamente (LEVIGNE et al., 2002; MESBAHI et al., 2005; YAPO et al., 2006; FISHMAN et al., 2006). O grupo carboxilas esterificado por metanol, pode atingir até 13%, o que significa a esterificação de aproximadamente 80%, sendo assim chamadas de pectinas de alta metoxilação. As pectinas de baixa metoxilação têm os grupos carboxilas esterificadas com metanol de no máximo 7%, ou seja, grau de esterificação menor que 50% (POMERANZ & MELOAN, 2000). Padrões de galacturônico apresentam grau de metoxilação geralmente muito abaixo de 1%.

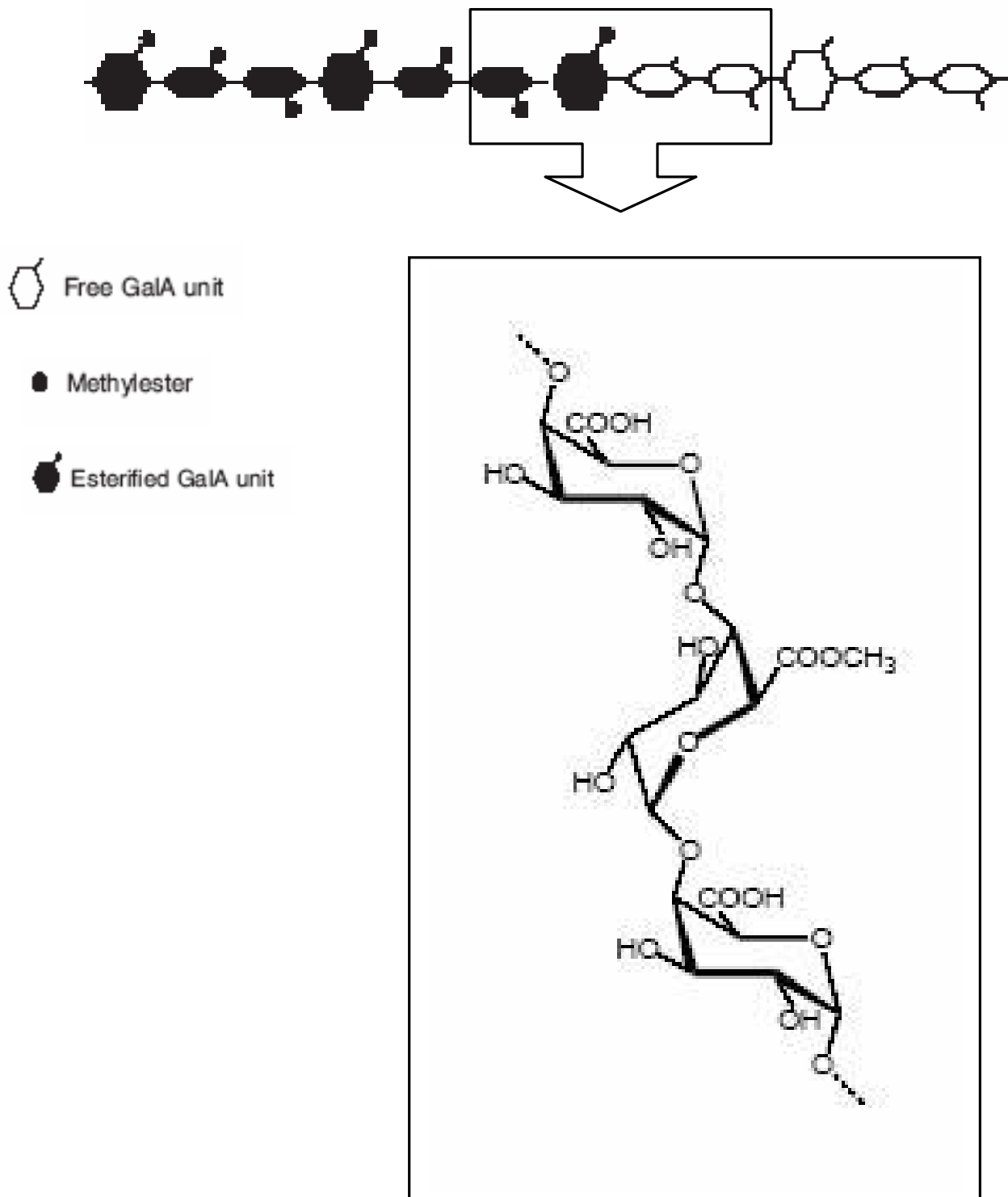


Figura 2. Representação esquemática da cadeia de poligalacturônico variavelmente esterificado com metanol.

A fina estrutura química das pectinas pode ser extremamente heterogênea entre as espécies de vegetais, entre tecidos e até mesmo partes do fruto. Entretanto pode haver uma enorme variedade na estrutura dos domínios da pectina (ramnogalacturonana e homogalacturonana) variando desta forma principalmente o conteúdo e composição dos açúcares, comprimento da cadeia, grau de metoxilação, de acetilação e interferindo, sobretudo no rendimento de extração (MC CREADY, 1970; WILLATS et al., 2005).

2.4 Propriedades físicas e mecanismo de formação de gel

As propriedades físicas das substâncias pécticas são atribuídas principalmente a sua estrutura e composição química (LIN et al, 1975; KIM et al., 1978; SAHARI et al., 2003). Apesar da relevância deste tópico pouco se conhece da estrutura química das pectinas nos diferentes vegetais.

Os grupos carboxilas em particular influenciam na viscosidade e coesividade da solução de pectina, o que por sua vez depende do grau de esterificação por metanol deste polímero. Em solução de pectina totalmente esterificada não é notável mudança apreciável com mudanças no pH, portanto à medida que o grau de metoxilação é reduzido a viscosidade torna-se cada vez mais dependente do pH (DOESBURG, 1965).

Aparentemente, os grupos carboxilas das pectinas de alta metoxilação se ionizam com o aumento do pH. Essa mudança resulta em repulsão eletrostática entre as cadeias causando maiores interações intermolecular o que ocasiona aumento na viscosidade e coalescência. Por outro lado, em pectina de baixa metoxilação e em ácidos pécticos a

associação entre as moléculas ocorre quando o pH está muito abaixo de 4,0, proporcionando também incremento na viscosidade (MC CREADY, 1970; YOO et al., 2006).

Um outro importante fator que controla a viscosidade, a geleificação e, por conseguinte a solubilidade das pectinas é o seu peso molecular que varia entre 30.000-70.000 Kda em pectina de citrus (MC CREADY, 1970). A solubilidade é um parâmetro fortemente influenciado pelas propriedades físico-químicas das pectinas, de modo que tende a aumentar com o aumento do grau de metoxilação e com a redução do peso molecular da pectina (POMERANZ & MELOAN, 2000). Esta característica orienta aplicações industriais e tecnológicas distintas.

As propriedades físicas das moléculas de pectina as tornam um ingrediente importante e bastante utilizado pela indústria alimentícia para aumentar a viscosidade de soluções, e principalmente assumindo papel de hidrocolóide na função de dispersante e estabilizante de diversas emulsões de carboidratos e de proteínas em formulações e alimentos naturais, e na produção de geléias (CHO & HWANG, 2000; TABILO-MUNIZAGA & BARBOSA-CANOVAS, 2005; GANCZ et al., 2006), que incrementa via de regra, valor agregado e tecnológico aos frutos.

A metoxilação das pectinas e os grupos carboxilas livres (íons carboxilatos) também contribuem para o mecanismo de geleificação, sendo a relação $[\text{COOCH}_3 : \text{COO}^-]$ principal indicador da valoração de propriedades funcionais (CHATJIGAKIS et al., 1998; SOHN & CHO et al., 2000; SIRISOMBOON et al., 2005).

Géis de pectina são formados quando regiões da molécula formam ligações cruzadas, dando forma a uma rede cristalina tridimensional onde as moléculas de água e os co/solutos ficam presos e em máxima coalescência (LÖFGREN & HERMANSSON, 2007).

Nas pectinas de alta metoxilação, as zonas de junção são formadas por ligações cruzadas do ácido galacturônico por pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas entre os grupos metoxil, promovidos pelo baixo pH (2,2 a 3,0), concentração elevada de açúcar (>60%), que favorece a redução a solvatação da pectina, e assim maior interação entre as moléculas (MAY, 1997; WILLATS et al., 2005). Os níveis de pectinas também mostra ser um fator importante, sendo necessária sua presença em pelo menos 0,1-1% para que a geleificação ocorra, visto que em quantidades reduzidas, géis friáveis podem ser formados (KERR & WICKER, 2000). Por outro lado, em pectinas de baixa metoxilação, a formação do gel envolve ligações simultâneas entre íons de cálcio com grupos carboxilas livres (carboxilatos) formando também a rede cristalina (GROSSO et al., 2000; CAPEL et al., 2005; CARDOSO et al., 2003; LÖFGREN & HERMANSSON, 2007).

2.5 Condições de extração de pectinas

A extração das pectinas é continuamente estudada ao longo dos anos em consequência de sua importância comercial (PANCHEV et al., 1989; MINKOV et al., 1996; HUANG et al., 1998) não somente para a indústria de alimentos (TABILO-MUNIZAGA & BARBOSA-CANOVAS, 2005) e fármacos (YAMADA, 1996; YAMADA, et al., 2003), mas também em cosméticos, materiais de limpeza e revestimentos biodegradáveis (BARBOSA-CANOVAS et al., 1996).

O processo de extração de pectinas se fundamenta em três etapas básicas:

- 1 Extração ácido-aquosa do material vegetal;
- 2 Precipitação do líquido extraído;
- 3 Isolamento da pectina (JOYE & LUZIO, et al., 2000; LIU et al., 2006)

Mc Cready em 1970 e outros pesquisadores mais recentes, tais como Levigne et al (2002) atualmente reportam que a condição de extração tem efeitos não apenas na extração propriamente dita (KALAPATHY & PROCTOR, 2001; LEVIGNE et al., 2002), mas também no rendimento e na estrutura química do material extraído (MICARD & THIBAUT, 1999; JOYE & LUZIO, et al., 2000; SAHARI et al., 2003).

O procedimento de extração de pectinas pode ocorrer mediante a ação de ácidos orgânicos e inorgânicos, e de álcalis. O processo de extração em meio básico rende pectinas de baixa metoxilação, como resultado da saponificação dos grupos éster (JOYE & LUZIO, et al., 2000); bem como redução no comprimento da cadeia do galacturônico por β -eliminação, ou seja, há despolimerização do ácido pectínico, dificultando, sobretudo a filtração (ROMBOUTS & THIBAUT, 1986). Enquanto que por extração ácida oferece maiores rendimentos (rendimento até 20%) de pectinas de alta metoxilação (LEVIGNE et al., 2002), que simula com certa semelhança o que ocorre naturalmente nos frutos. Esta situação é preferível e mais usada pelos pesquisadores também pelo fato de não promover mudanças abruptas na fina estrutura do polissacarídeo o que permite uma caracterização mais confiável (JOYE & LUZIO, et al., 2000), do ponto de vista físico e químico.

No processo de extração ácida, o material é tratado com ácido a temperaturas entre 70°C e 100°C por tempos suficientes para remover quantidades de pectinas, que reproduzam condição de extração exaustiva sem perdas da natureza química da pectina (JOYE & LUZIO, et al., 2000; MESBAHI et al., 2005).

Diversas propostas têm sido abordadas visando definir o pH inicial de extração de pectinas, a fim de garantir maiores rendimentos de extração. Trabalhos reportam que reduzindo o pH inicial de extração obtêm-se melhores rendimentos, sendo desta forma mais conveniente para aplicação em escala industrial (JOYE & LUZIO, et al., 2000; KALAPATHY & PROCTOR, 2001; SAHARI et al., 2003). Porém, se a redução for extrema pode ser desfavorável, podendo ocorrer aceleração na degradação do polímero e desesterificação da pectina (CHO & HWANG, 2000; YAPO et al., 2006).

A clássica metodologia proposta por Mc Cready (1970) recomenda ajustar o pH inicial da solução para 2,2 para seguir posteriormente com as demais etapas. Portanto, Bobbio & Bobbio (1995) sugerem que o ajuste no pH inicial a 3,0 é suficiente para extrair exaustivamente a pectina do material estudado, sendo conflitantes estas duas proposições, em se tratando de pectinas de frutos e hortícolas, que naturalmente, diferem em composição e tamanho molecular, bem como do pH inicial.

As pectinas são facilmente precipitadas mediante a presença de solventes orgânicos ou co-solventes. Os álcoois usualmente empregados são o etanol e o metanol devido à insolubilidade das substâncias pécicas nestes solventes (LIU et al., 2006), enquanto o

isopropanol é recomendado por Kalapathy & Proctor (2001). Cloreto de Alumínio também pode ser utilizado, precipitando as pectinas por *salting out* (JOYE & LUZIO, et al., 2000).

As pectinas precipitadas são facilmente separadas da solução por filtração a vácuo, sendo necessária a lavagem sucessiva com acetona ou álcool que retirem as impurezas, tais como, pigmentos, sólidos solúveis e outros, presentes no material e co-extraído com a pectina (JOYE & LUZIO, et al., 2000; SAHARI et al., 2003). Em seguida utiliza-se uma membrana porosa adequada que retenha o gel formado. Neste ponto, a pectina encontra-se isolada, sendo necessária para sua purificação uma etapa adicional de centrifugação e filtração em membranas especiais de 3 -11 μm (YAPO et al., 2006).

2.6 Determinação do grau de metoxilação de pectinas

O grau de metoxilação é um elemento chave para a aplicabilidade das pectinas na indústria, de forma que interfere nas propriedades funcionais desta molécula, principalmente na habilidade da pectina em geleificar.

Inúmeros são os métodos disponíveis para a medição do grau de metoxilação das pectinas. O mais comumente utilizado pela indústria de alimentos é o método proposto pelo *Food Chemical Codex* (1981). Este método envolve titulação da suspensão de pectinas com hidróxido de sódio antes e depois da saponificação da pectina suspensa. Portanto para aplicação desta metodologia há a necessidade de grandes quantidades de amostra de pectina (100-500 mg), o que se torna um inconveniente quando se analisado em larga escala.

Outro método para a determinação do grau de metoxilação das pectinas envolve a desesterificação das pectinas e determinação do metanol a fim de quantificar a metoxilação das pectinas. Wood & Siddiqui (1971) usaram o procedimento colorimétrico para análise do conteúdo do metanol pela oxidação do metanol a formaldeído com permanganato de potássio, seguido pela condensação com 2,4-pentanediona e amônia para gerar um produto de cor o 3,5-diacetil-1,4-diidro-2,6-dimetilpiridona.

Da mesma forma, há métodos instrumentais, sem derivação, que vem sendo muito utilizado recentemente para esta finalidade, como a cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (VORAGEM et al, 1986; PLÖGER, 1992; BRANDÃO & ANDRADE, 1999; LEVIGNE et. al, 2002) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FILIPPOV & KOHN, 1975; BOERIU et al, 1998; GNANASAMBANDAM & PROCTOR, 2000; SIRISOMBOON et al, 2005), que tem a vantagem de serem mais rápidos, precisos e não requerer hidrólise prévia, mesmo que necessitem de amostras isoladas de pectinas (SOHN & CHO et al., 2000).

De acordo com Manrique & Lajolo (2002), a espectroscopia de infravermelho é uma técnica apropriada para caracterizar as bandas de pectinas que ajudam na quantificação do seu grau de metoxilação, devido à localização diferencial das bandas de absorção originadas por modalidades vibracional específica dos grupos dos átomos do ácido galacturônico (R-COOH) e do metil éster (R-COOCH₃). As bandas de interesse para quantificação do grau de metoxilação são 1650 e 1750 cm⁻¹, porque o primeiro corresponde à vibração dos íons carboxilato, e o segundo, aos ácidos carboxílicos na sua

forma esterificada. A partir da localização destas bandas se permite a determinação do grau de metoxilação das pectinas.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Otimizar as condições de extração, de isolamento e caracterização de pectinas de frutos.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o efeito do pH sobre o grau de metoxilação e sobre o diâmetro de fragmentos das pectinas;
- ✓ Caracterizar membrana de poliéster para verificar a adequabilidade do procedimento de extração para fins quantitativos;
- ✓ Otimizar o procedimento de extração de pectinas em frutos de diferente composição;
- ✓ Avaliar o rendimento de extração de pectinas em frutos de diferente composição;
- ✓ Estimar o grau de metoxilação das pectinas por Espectroscopia de Infravermelho.

4.0 Material e Métodos

4.1 Local da experimentação

Os ensaios de extração foram realizados no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos *Nonete Barbosa Guerra* – LEAAL, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

A liofilização das pectinas isoladas foi realizada no Departamento de Antibióticos e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

As análises instrumentais foram executadas na Central Analítica, do Departamento de Química Fundamental.

4.2 Material

4.2.1 Amostras de frutos

Para avaliar o efeito do pH de extração sobre o grau de metoxilação e diâmetro das pectinas utilizou-se o mesocarpo do maracujá e da laranja.

Para o ensaio de otimização utilizou-se o mesocarpo da laranja para orientar extrações para fins industriais em geral; e a goiaba (fruto inteiro) a fim de representar os frutos de conhecida propriedade de geleificação.

Para determinação do grau de metoxilação e rendimento de pectinas foram selecionados frutos que:

- ✓ Rendem boa geléia (grupo I): Maçã (*Malus silvestris*), Goiaba (*Psidium guajava*), Morango (*Fragaria vesca L.*), Uva (*Vitia vinifera L.*), Jabuticaba (*Myrcia califora Berg*).
- ✓ Frutos que não rendem boa geléia:
 - Que contém fibras (grupo II): Pitanga (*Eugenia uniflora L.*), Acerola (*Malpighia glabra*), Caju (*Anacardium occidentale*), Manga (*Mangifera indica L.*), Sapoti (*Achras sapota L.*).
 - Que contém amido (grupo III): Graviola (*Annona muricata L.*), Pinha (*Annona sp.*), Banana (*Musa paradisiaca*).

Todos os frutos foram obtidos no seu estágio maduro com coloração e firmeza característico.

Foram tomados quantidades suficiente do fruto que permita obter sub-amostras de pelo menos 100g para proceder à extração.

4.2.2 Padrões

Padrões de ácido galacturônico foram obtidos da *Merck* (GM = 10,59%) e da *Sigma* (GM = 1,26 %). Pectinas de baixa e de alta metoxilação foram cedidas pela *Citrus Colloids* (GM = 37,62 % e GM = 70,56 %) e pela *CP Kelco* (Limeira/SP) (GM = 38,15% e GM = 61,05 %).

Também foi utilizado pectina de alta metoxilação padrão *Fluka* (GM = 71,70 %). O grau de metoxilação de todos os padrões foi confirmado por titulometria (MC CREADY, 1970).

4.2.3 Reagentes

Todos os reagentes utilizados na extração de pectinas foram de grau analítico.

Reagentes utilizados: ácido cítrico (Vetec) a 10% (p/v); Etanol 99,9% (Vetec); Metanol 99,9% (Vetec); Acetona (Vetec); Brometo de Potássio para espectroscopia de infravermelho (Merck).

4.2.4 Equipamentos

Chapa aquecedora; Multi-processador; Potenciômetro digital (Technal); Funil de Buchner; Bureta digital (Brand); Liofilizador; Balança analítica; Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier (Bruker IFS66); Compressor (Beckman 00-25); Microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu).

4.2.5 Outros materiais

Vidrarias; Tecido de poliéster comercial; Tela de amianto; Agitadores magnéticos; Pissetas descartáveis.

4.3 Métodos

4.3.1 Extração e isolamento de pectinas

4.3.1.1 Extração e isolamento de pectinas sob diferentes condições de pH

Primeiramente foram pesados 100g da amostra de mesocarpo de maracujá e de laranja. Em seguida foi adicionado 800 ml de água deionizada e triturada em um multi-processador. Posteriormente ajustou-se a pH 2,2 com solução de ácido cítrico 10% em água deionizada usando potenciômetro. Logo após a mistura foi aquecida até fervura por 30 minutos, e finalmente filtrado em um tecido de poliéster. O filtrado constituiu a fração 1. Em 1/3 da fração 1 foi adicionado HCl 10% até ajustar a solução a pH 1,0. Posteriormente, foi fervido por 30 minutos e após esfriar, o pH foi neutralizado (pH 7,0), constituindo a fração 2. No outro 1/3 da amostra foi adicionado NaOH 10% até o pH elevar para 12,0. Este foi fervido por 30 minutos e após esfriar o pH foi neutralizado (pH 7,0), constituindo assim a fração 3 (Figura 3). As frações 1, 2 e 3 de pectinas foram isoladas para a remoção dos açúcares e dos pigmentos, como se segue: um volume aleatório (q.s.p.) de etanol 95% foi adicionado na amostra, com a finalidade de precipitar exaustivamente toda a pectina. O precipitado foi filtrado e lavado sucessivamente com etanol 99%, e posteriormente foi lavado com acetona 99%. O precipitado final foi deixado secar a temperatura ambiente por 24h de acordo com a metodologia de Mc Cready (1970), adaptado para liofilização (PAIXÃO & SILVA, 2005).

Fluxograma

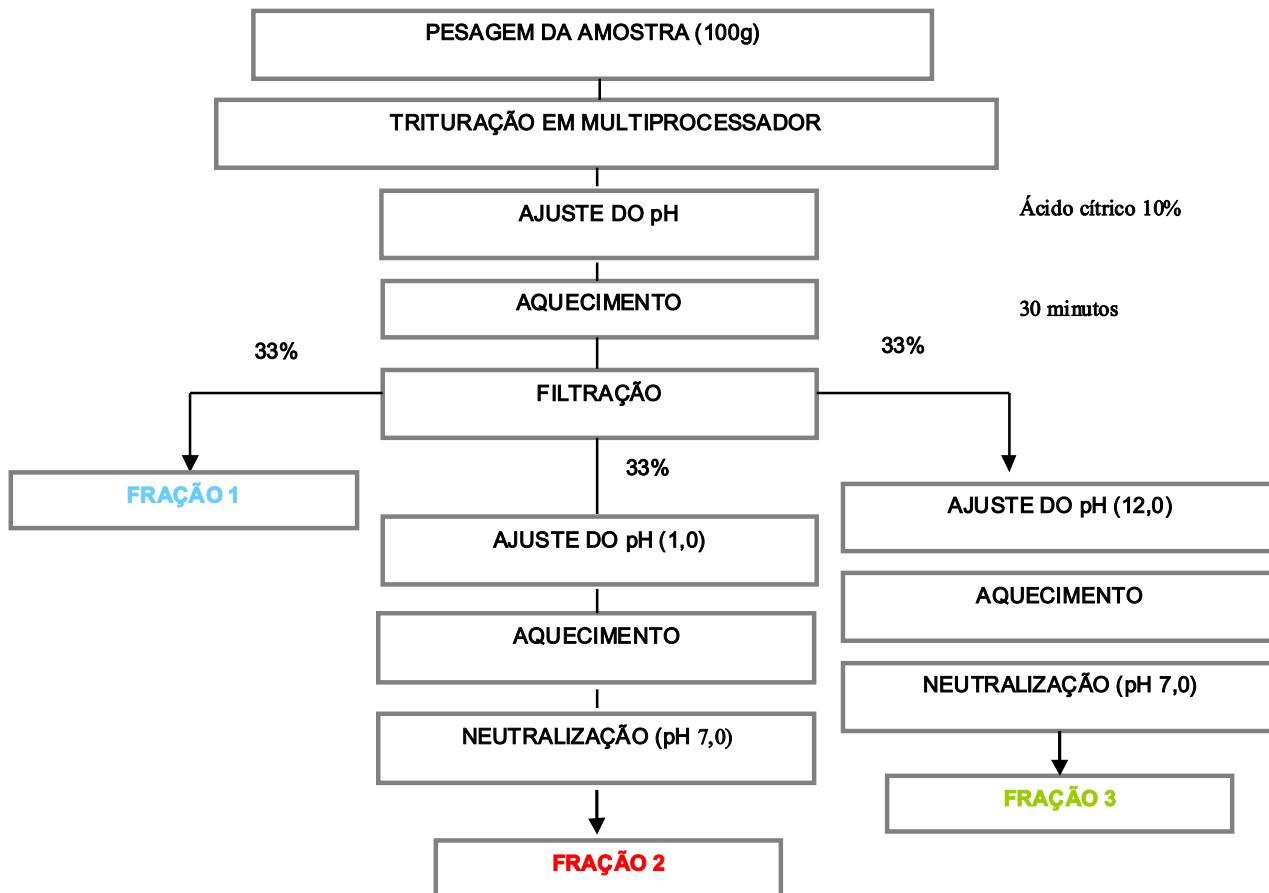


Figura 3. Etapa de extração e isolamento de pectinas sob diferentes condições de pH.

4.3.1.2 Ensaio de otimização

Antes de iniciar a extração e o isolamento das pectinas nos frutos pertencentes aos grupos I, II, e III, procedeu-se à otimização para determinar as melhores condições de extração, utilizando como material de estudo a goiaba e o mesocarpo da laranja. A partir deste resultado, orientou-se a técnica de extração a serem aplicada nos demais frutos.

Inicialmente foram pesados 100g da amostra de fruto. Em seguida foi adicionado 400 ml (se tratando de fruto inteiro) ou 800 ml (extração no mesocarpo) de água deionizada e triturada em um multi-processador. Posteriormente ajustou-se a pH (2,2 e 3,0) com solução de ácido cítrico 10% em água deionizada usando potenciômetro. Logo após a mistura foi aquecida até fervura (15 e 30 minutos). E finalmente filtrado em um tecido de poliéster definido por microscopia eletrônica de varredura. Para o isolamento da pectina, o procedimento foi semelhante ao da etapa anterior, porém verificou-se o efeito do álcool, etanol e metanol 95%, para precipitar e isolar a pectina.

Para cada tipo de extração realizada (proposta de Bobbio & Bobbio, 1995; e de Mc Cready, 1970), o rendimento foi calculado e o grau de metoxilação foi determinado por espectroscopia de infravermelho.

Na figura 4 estão sumarizadas as etapas de extração e do isolamento da pectina.

Fluxograma

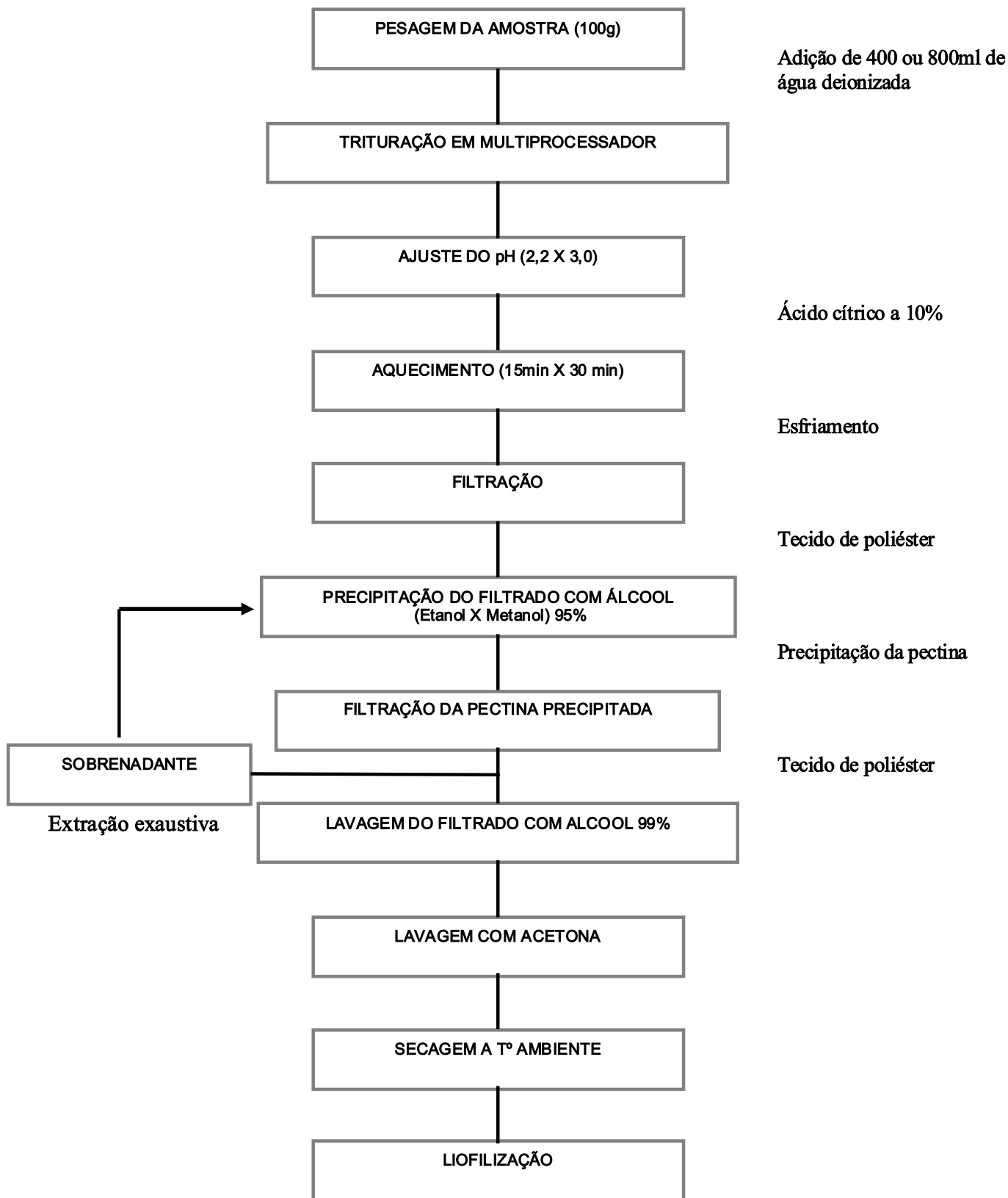


Figura 4. Sumarização do processo de extração e isolamento das pectinas.

4.3.1.2.1 Desenho experimental

Foi utilizado um Planejamento fatorial 2^3 , com as seguintes variáveis independentes: 1- pH; 2- Tempo de extração (minutos) e 3- Tipo de álcool. Este planejamento gerou 8 ensaios, com duas repetições cada, cujas condições (níveis codificados e decodificados) encontram-se apresentadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente (BARROS NETO et al., 2001). As respostas de interesse foram rendimento (%) e grau de metoxilação (%).

Tabela 1. Níveis codificados das variáveis.

Ensaio	pH	Tipo de álcool	Tempo de extração (minutos)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

Tabela 2. Níveis decodificados das variáveis

Níveis codificados	pH	Tipo de álcool	Tempo de extração (minutos)
-1	2,2	Etanol	15
1	3	Metanol	30

4.3.2 Determinação da abertura dos poros do tecido de poliéster e dos diâmetros dos fragmentos de pectinas liofilizadas

O tecido de poliéster utilizado na filtração foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (Voltagem: 20 Kv; *Spotsize*: 10). Foi analisada a amostra de tecido em camada simples. A abertura dos poros e o diâmetro das pectinas liofilizadas foram determinados pelo Software de Morfometria *Image J*.

4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho

4.3.3.1 Preparo das pastilhas de KBr

Previamente à análise de infravermelho, todo material, bem como as amostras, foram dessecados à vácuo contendo sílica gel. As amostras foram homogeneizadas com o KBr (90:10 sal-amostra), e com o auxílio do compressor, foi obtido as pastilhas, as quais foram encaminhadas para análise no espectrômetro.

Espectro FT-IR foi coletado em absorvância na faixa de 400-4000 cm^{-1} , na resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.3.2 Determinação do grau de metoxilação

Após análise por espectroscopia de infravermelho, das amostras isoladas, foi feita a identificação das bandas 1650 e 1750 cm^{-1} , no que através da equação: $[A_{1750} \text{ cm}^{-1} / (A_{1650} \text{ cm}^{-1} + A_{1750} \text{ cm}^{-1})]$ quantifica o grau de metoxilação das amostras (MANRIQUE & LAJOLO, 2002).

4.3.3 Análise estrutural das pectinas

A espectroscopia de Infravermelho foi utilizada para obter informações da estrutura química das pectinas extraídas em diferentes frutos. A partir das análises descritivas das bandas (número de onda, cm^{-1}) e suas respectivas vibrações dos grupos funcionais: 3600-2500: estiramento O-H; 3000-2800: C-H (estiramento simétrico e assimétrico); 1760-1745: C=O esterificado; 1640-1620: COO^- (estiramento assimétrico); 1400: COO^- (estiramento simétrico).

4.3.4 Construção da curva de regressão linear

O grau de metoxilação dos padrões de pectinas forma determinados por titulometria (em quintuplicatas) de acordo com a proposta de Mc Cready (1970). A curva foi construída com auxílio do programa computacional *Origin5.0*.

4.4 Análises Estatísticas

Os dados resultantes de rendimento de extração (%) e de grau de metoxilação (%) foram analisados através de análise de variância (ANOVA), sendo comparados pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

Com vistas à otimização da extração da pectina, as respostas obtidas pelo planejamento fatorial foram avaliadas quanto aos efeitos principais e as interações entre os fatores.

Estas análises estatísticas foram realizadas através do programa computacional Statistic 6.1 (STATSOFT, 1997).

5. Resultados

5.1 Resultados preliminares

5.1.1 Caracterização das frações de pectinas extraídas a diferentes pH's: grau de metoxilação e diâmetro dos fragmentos liofilizados

As pectinas extraídas sob diferentes condições de pH mostraram mudanças significativas no grau de metoxilação, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Efeito de diferentes pH's sobre o grau de metoxilação nas pectinas extraídas.

	Grau de Metoxilação (%)		
	Fração 1 (pH 2,2)	Fração 2 (pH 1,0)	Fração 3 (pH 12,0)
Mesocarpo da Laranja	69,50±1,02 ^a	52,15±0,00 ^b	14,02±0,10 ^c
Mesocarpo do Maracujá	69,22±0,28 ^a	48,64±2,82 ^b	20,44±0,90 ^c

Letras iguais na horizontal não diferem significativamente a nível de 5% de significância pelo teste de Duncam.

A desmetoxilação ocorrida da fração 1 → 3, observada na tabela 3, pode ser visualizada na figura 5.

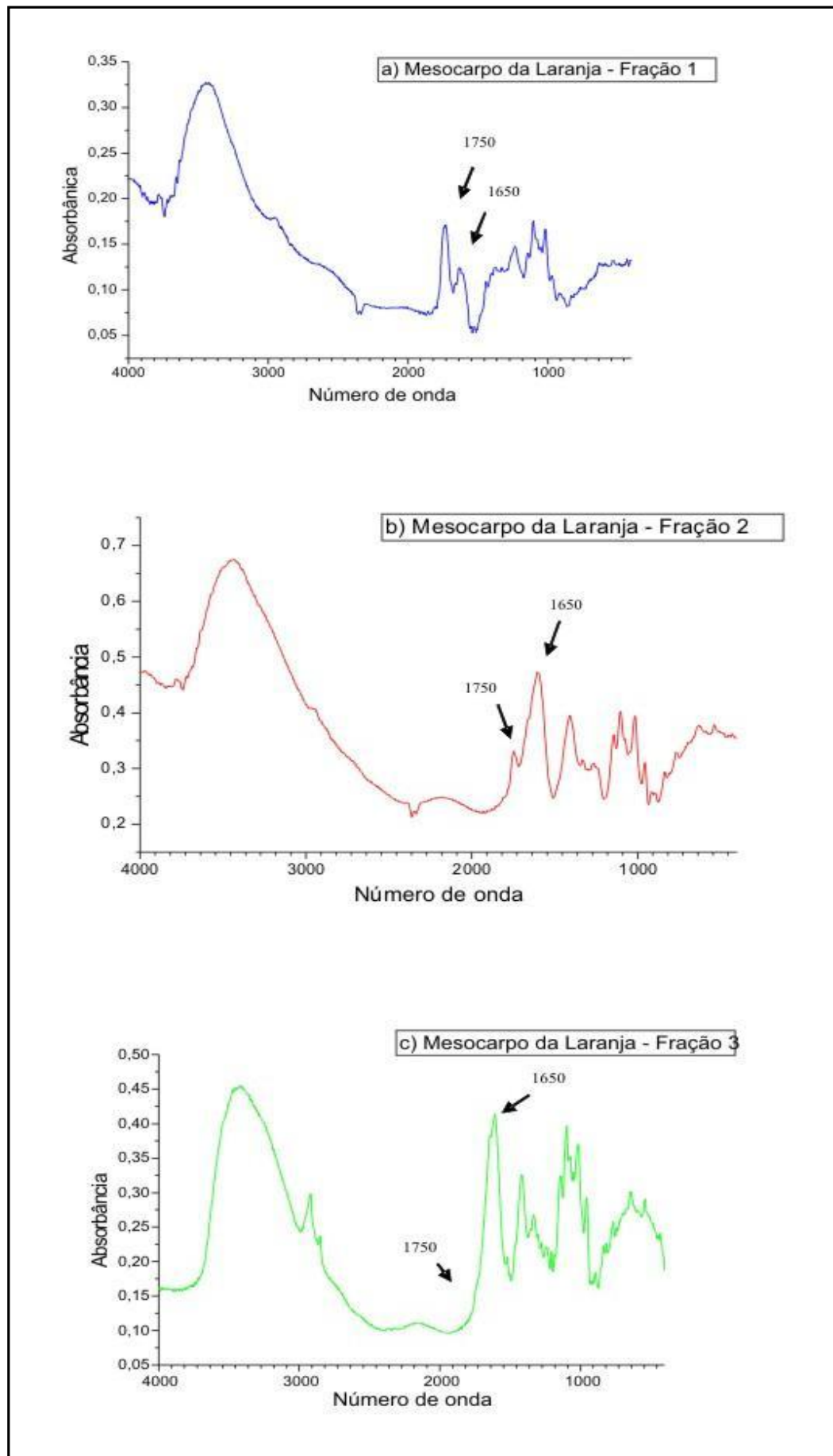


Figura 5. Espectro de Infravermelho das pectinas extraídas do mesocarpo da laranja sob diferentes pH's.

Os diâmetros dos fragmentos das pectinas liofilizadas do mesocarpo da laranja (Figura 6) extraídas sob diferentes condições de pH (frações 1 → 3) foram obtidos para comparação das dimensões (tabela 4).

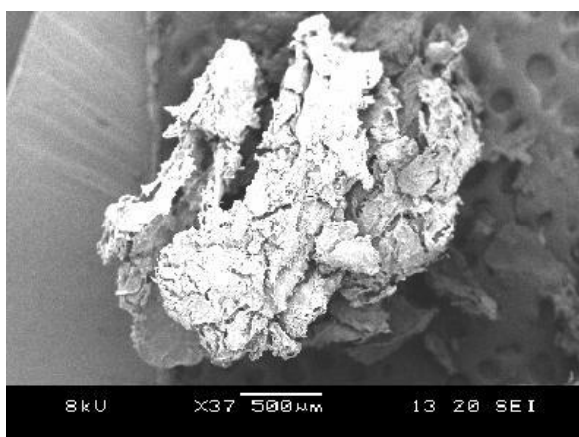


Figura 6. Análise dos fragmentos de pectinas do mesocarpo da laranja.

Tabela 4. Comparação dos diâmetros dos fragmentos de pectinas liofilizada.

Frações	Diâmetro (μm^2)
1 (pH 2,2)	4.478,8
2 (pH 1,0)	2.842,2
3 (pH 12,0)	2.523,06

Nota-se na tabela 4, uma redução no diâmetro médio das pectinas liofilizadas da fração 1 para 3.

5.1.2 Caracterização do tecido de poliéster usado na filtração da pectina

A caracterização do tecido de poliéster utilizado na filtração para o isolamento de pectinas (figura 4) foi obtida mediante a resolução quanto à abertura dos poros do tecido (figura 7). A abertura média dos poros do tecido de poliéster analisados foi de $1.072,35 \mu\text{m}^2$.

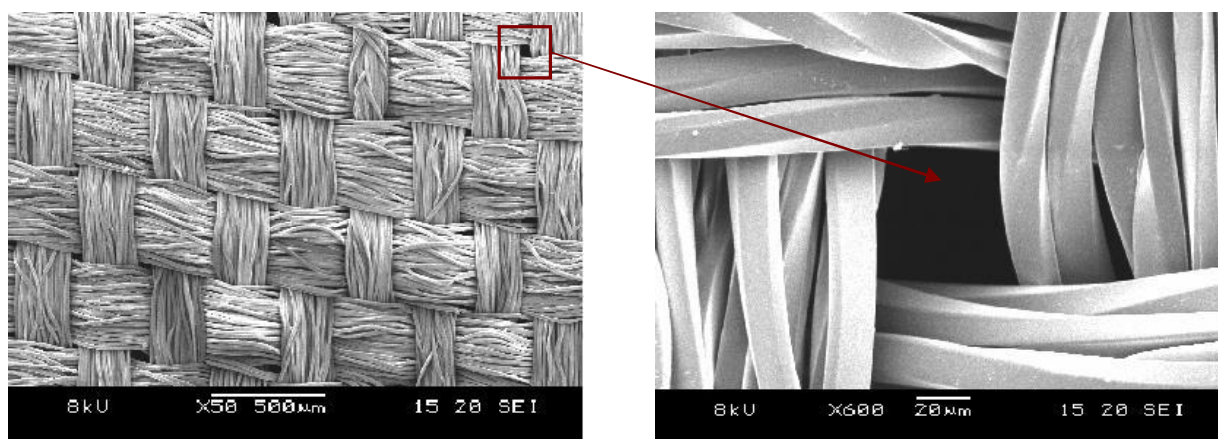


Figura 7. Análise do tecido de poliéster.

5.2 Ensaio para otimização da extração de pectinas

No caso do mesocarpo da laranja, o grau de metoxilação variou de 60,95 para 70,91% (figura 8). Pode-se observar na tabela 5 que este foi influenciado linearmente pelas três variáveis. O grau de metoxilação foi influenciado linearmente com sinal positivo pelo tipo de álcool e tempo de extração, ou seja, foi obtido maior grau de metoxilação com metanol e tempo de 30 minutos, ao passo que o pH influenciou com sinal negativo, favorecendo assim o menor pH.

Tabela 5. Efeitos principais do planejamento 2^3 para a otimização da extração de pectinas a partir do mesocarpo da laranja

Fatores	Rendimento (%)	Grau de metoxilação (%)
pH (1)	-6,59	-3,88
Tipo de álcool (2)	NS	3,61
Tempo de extração (3)	6,94	2,46
1 e 2	NS	NS
1 e 3	-1,79	NS
2 e 3	-1,09	NS
1,2 e 3	NS	NS

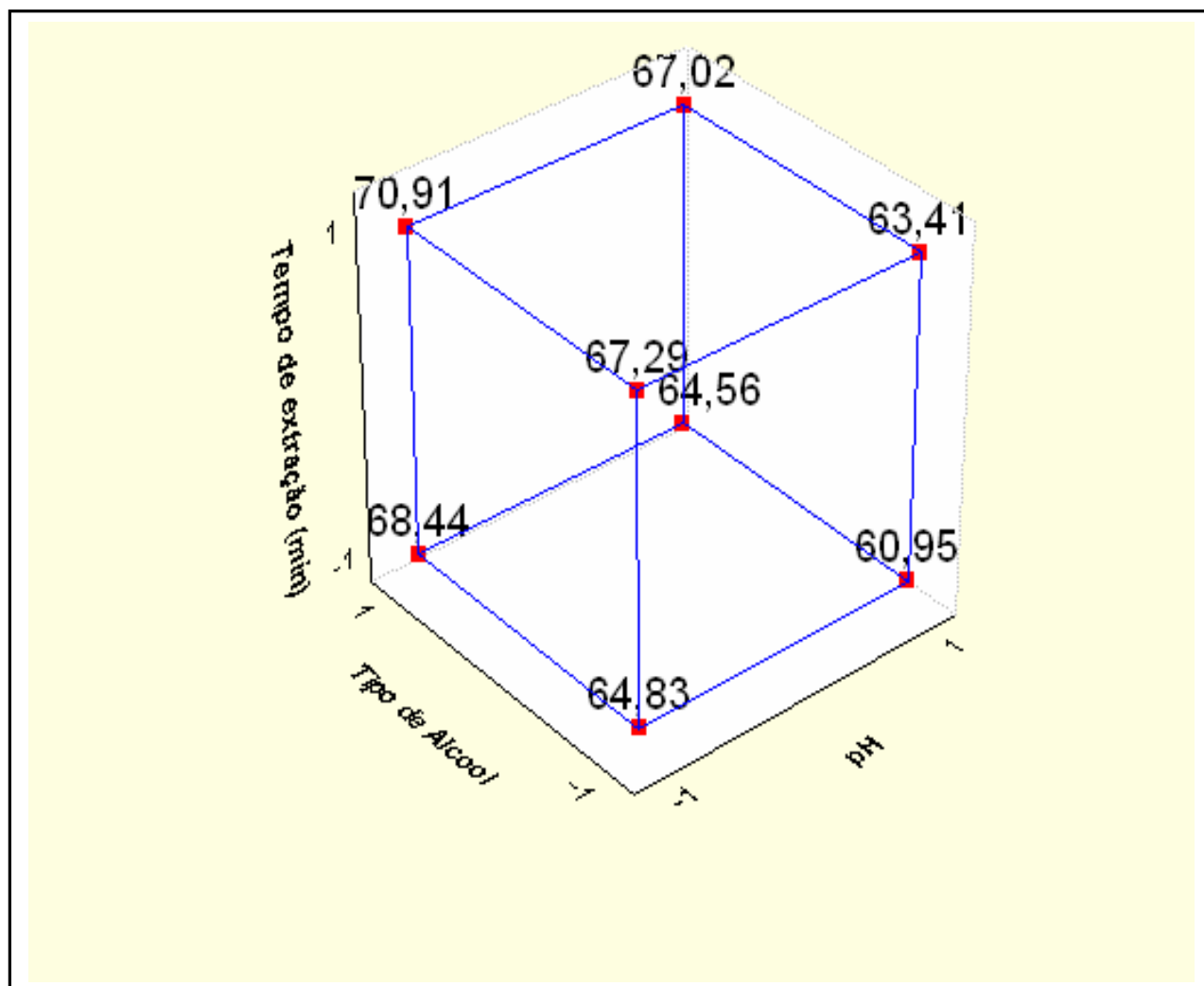


Figura 8. Grau de Metoxilação (%) da pectina do mesocarpo da laranja.

A partir da figura 9 pode-se visualizar o espectro de infravermelho da pectina extraída do mesocarpo da laranja.

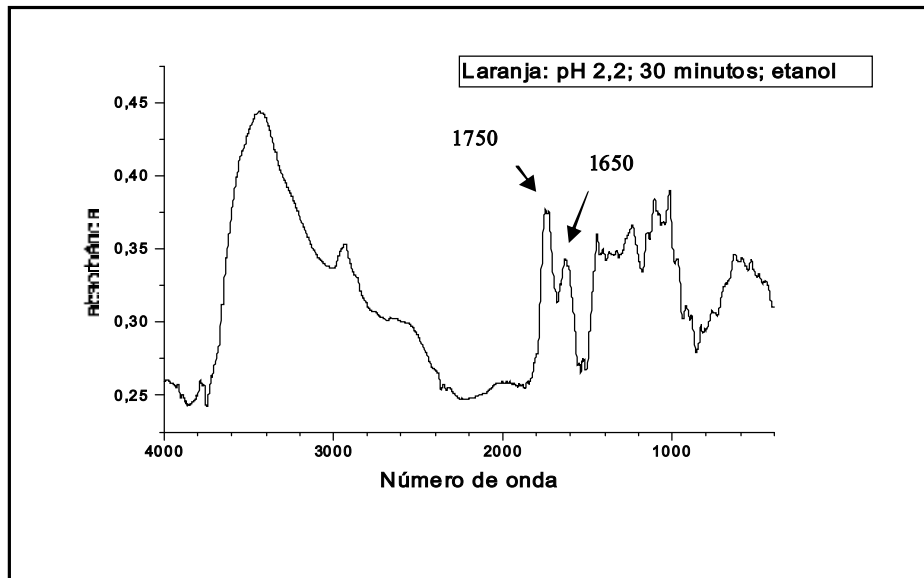


Figura 9. Espectro de Infravermelho da pectina extraída do mesocarpo da laranja.

O rendimento obtido pela extração da pectina variou de 3,5 para 17,2% para o mesocarpo da laranja. Analisando a figura 10, percebe-se que o maior percentual foi obtido quando o tratamento foi ocorrido no maior tempo de extração e menor pH inicial. O rendimento não foi influenciado pelo tipo de álcool, sofrendo maior influência do tempo de extração e em seguida do pH (tabela 5).

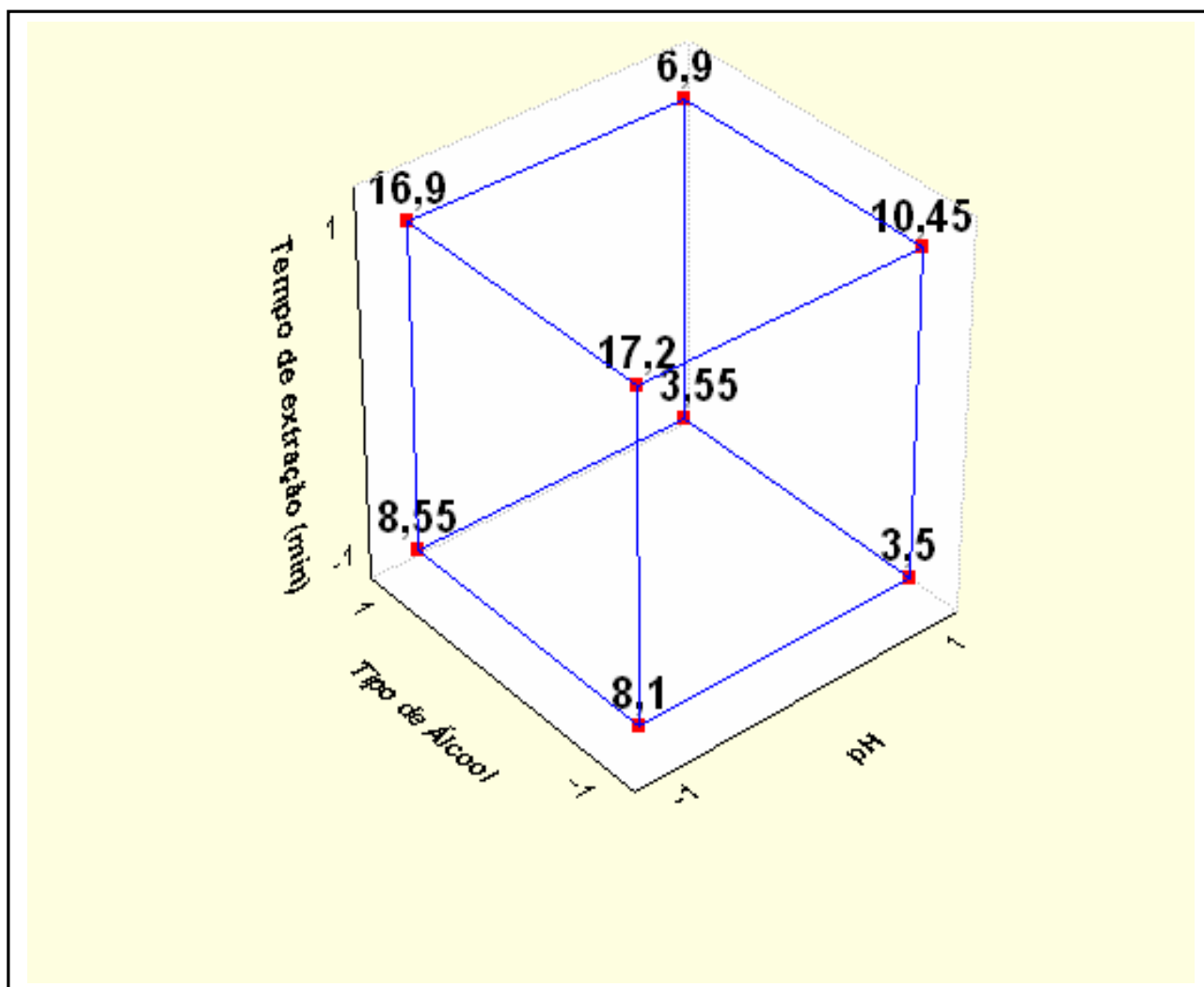


Figura 10. Rendimento (%) obtido na extração de pectina a partir do mesocarpo da laranja.

Com relação ao grau de metoxilação da pectina obtida da goiaba (tabela 6 e figura 11), pode-se verificar que apenas o pH influenciou significativamente, ou seja, a extração procedida a pH 2,2 rendeu maior percentual na metoxilação.

Tabela 6. Efeitos principais do planejamento 2^3 para otimização da extração de pectinas a partir da goiaba.

Fatores	Rendimento (%)	Grau de metoxilação (%)
pH (1)	-0,30	-5,37
Tipo de álcool (2)	-0,07	NS
Tempo de extração (3)	0,29	NS
1 e 2	0,06	NS
1 e 3	-0,17	NS
2 e 3	NS	-3,96
1,2 e 3	NS	4,02

NS: não significativo

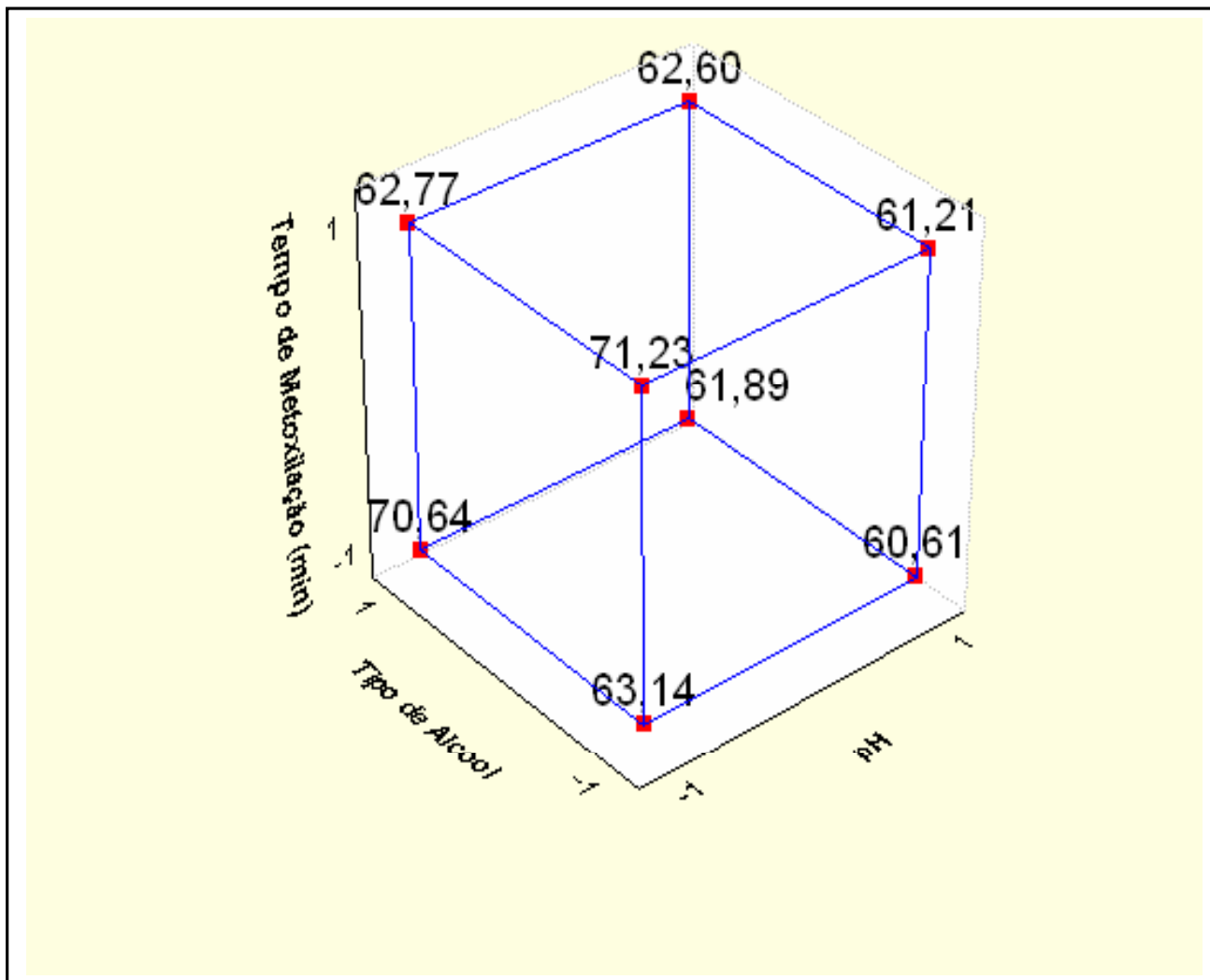


Figura 11. Grau de Metoxilação (%) da pectina da goiaba.

Quanto à interação entre o tipo de álcool e o tempo de extração verificou-se que foi significativa (Figura 12), utilizando maior tempo de extração com etanol ou vice versa, pode-se obter maior grau de metoxilação. A interação entre variáveis foi significativa, os maiores valores foram obtidos com tempo de extração, menor pH e o tipo de álcool (Figura 11).

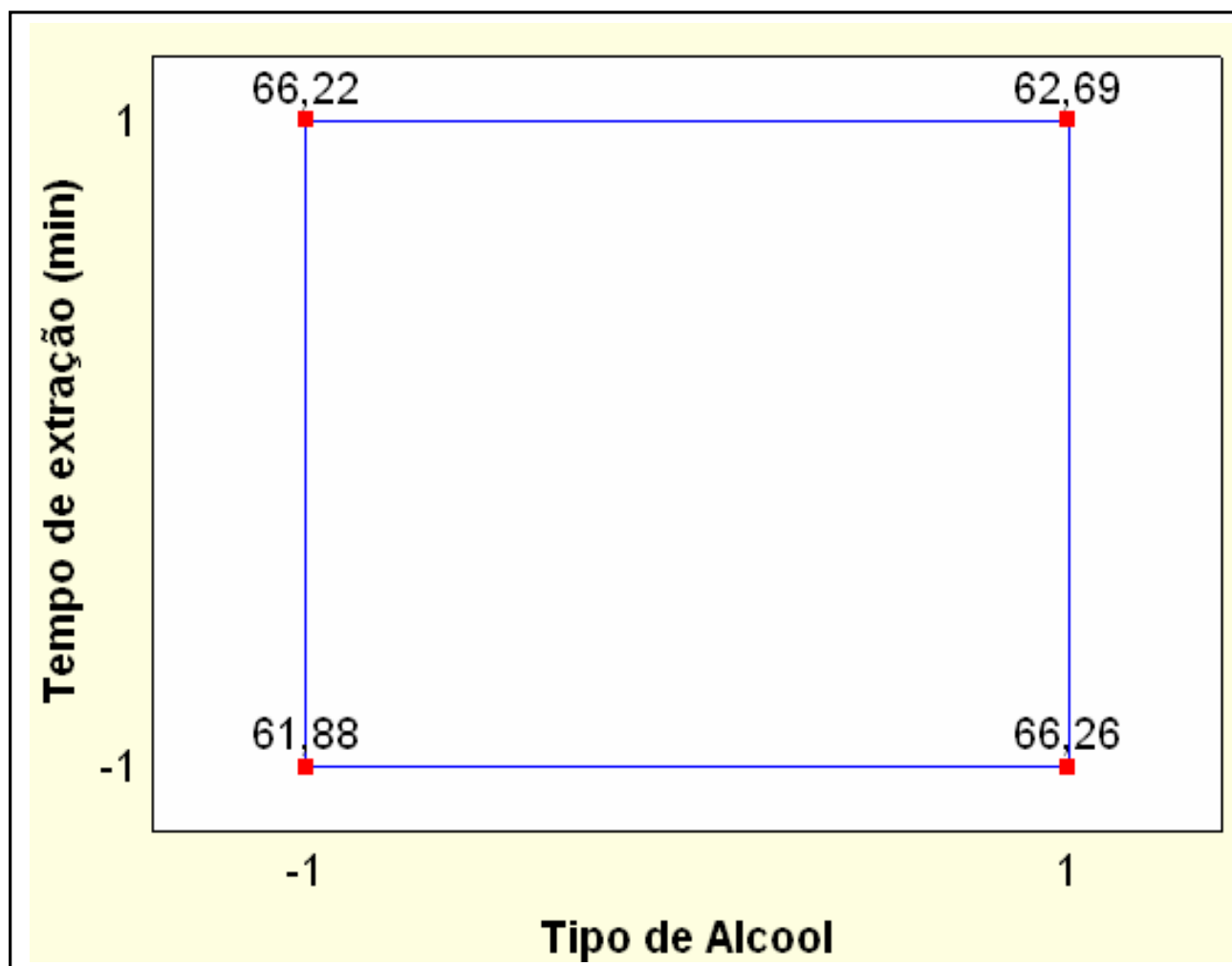


Figura 12. Grau de Metoxilação (%) obtido a partir da Goiaba (interação Tipo de Álcool X Tempo de extração).

A partir da figura 13 pode-se visualizar o espectro de infravermelho da pectina extraída da goiaba nas condições definidas de extração.

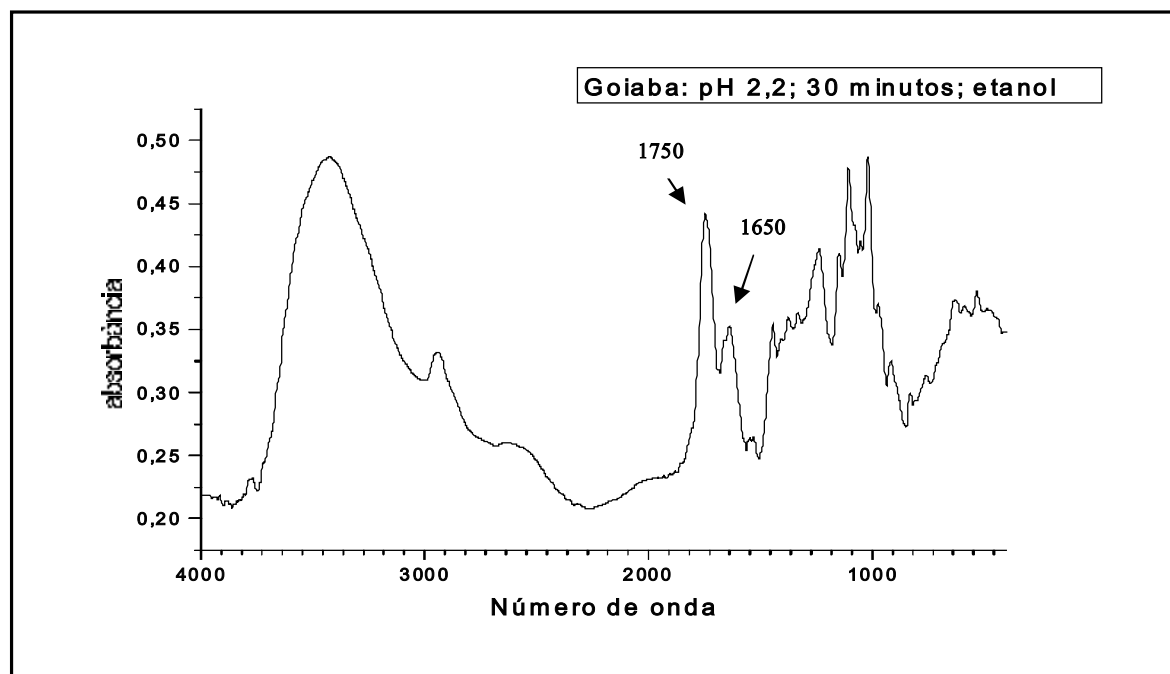


Figura 13. Espectro de Infravermelho da pectina extraída da goiaba.

O rendimento de extração da pectina obtido a partir da goiaba variou de 1,07 para 1,74%. Ao analisar a tabela 6 e figura 14, nota-se que o rendimento teve o mesmo comportamento observado para o mesocarpo da laranja em relação ao pH e tempo de extração. Quanto maior o tempo de extração e menor o pH, maiores os rendimentos obtidos. Com relação ao tipo de álcool, pode-se observar que o rendimento da goiaba teve uma influência moderada sobre esta resposta sugerindo que o etanol é o álcool mais apropriado para precipitação da pectina.

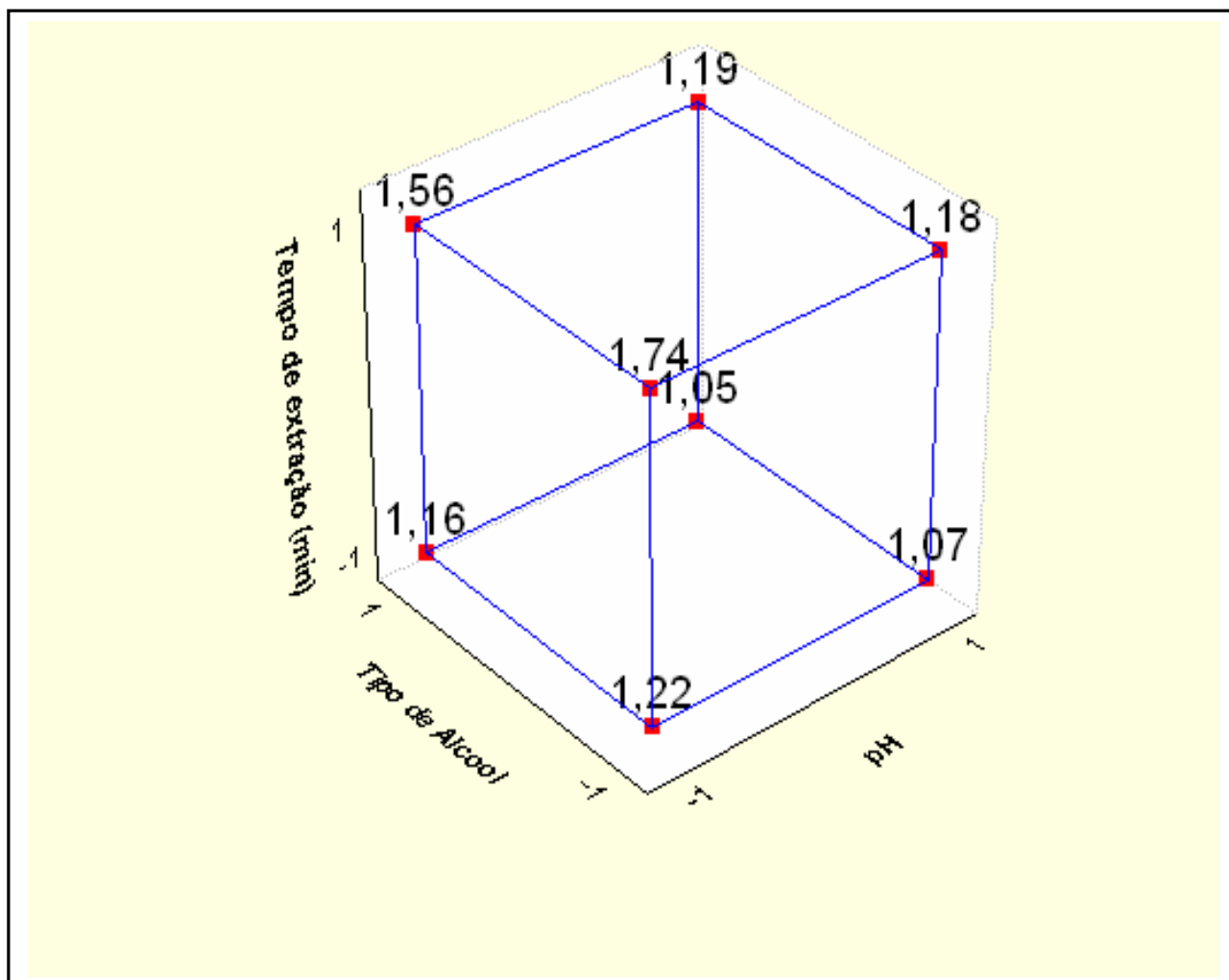


Figura 14. Rendimento (%) obtido na extração de pectina a partir da goiaba.

5.3 Curva de regressão linear obtida a partir de padrões de pectinas

As bandas de interesse particular para determinação do grau de metoxilação de pectinas por espectroscopia de infravermelho são aquelas que aparecem no comprimento de onda de 1650 e 1750 cm^{-1} . O primeiro corresponde à vibração simétrica dos íons carboxilatos ($-\text{COO}^-$), enquanto que o segundo corresponde à vibração dos grupos carboxilas na sua forma esterificada com metanol ($-\text{COOCH}_3\text{OH}$), como pode ser visualizado na figura 15, respectivamente para pectina cítrica (alta metoxilação) e ácido galacturônico (<2%).

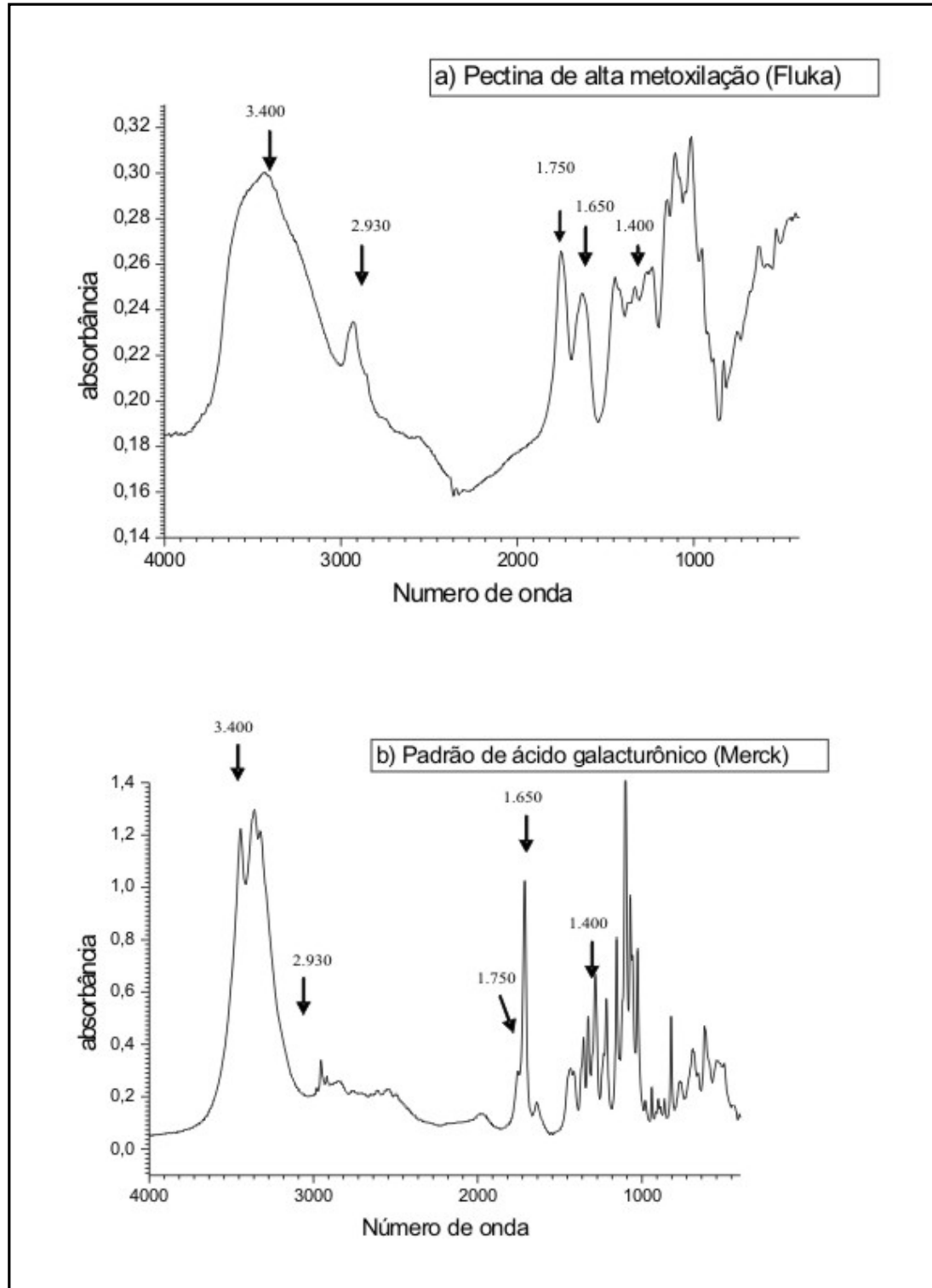


Figura 15. Espectro de Infravermelho de padrão de pectina cítrica parcialmente metoxilada (a) e de ácido galacturônico (b).

A relação entre a intensidade de absorvância [$A_{1750} \text{ cm}^{-1} / (A_{1650} \text{ cm}^{-1} + A_{1750} \text{ cm}^{-1})$] mostra ser proporcional ao grau de metoxilação. Esta relação foi calculada para cada padrão de pectina (N=6), em triplicata, com grau de metoxilação variável, através de análise de regressão linear, modelada pelos quadrados mínimos utilizando o software *Origin5.0*. O coeficiente de correlação linear para a curva de calibração foi 0,9335 (Figura 16).

Para confirmação dos resultados de grau de metoxilação, os padrões foram analisados em quintuplicatas por titulometria segundo Mc Cready (1970).

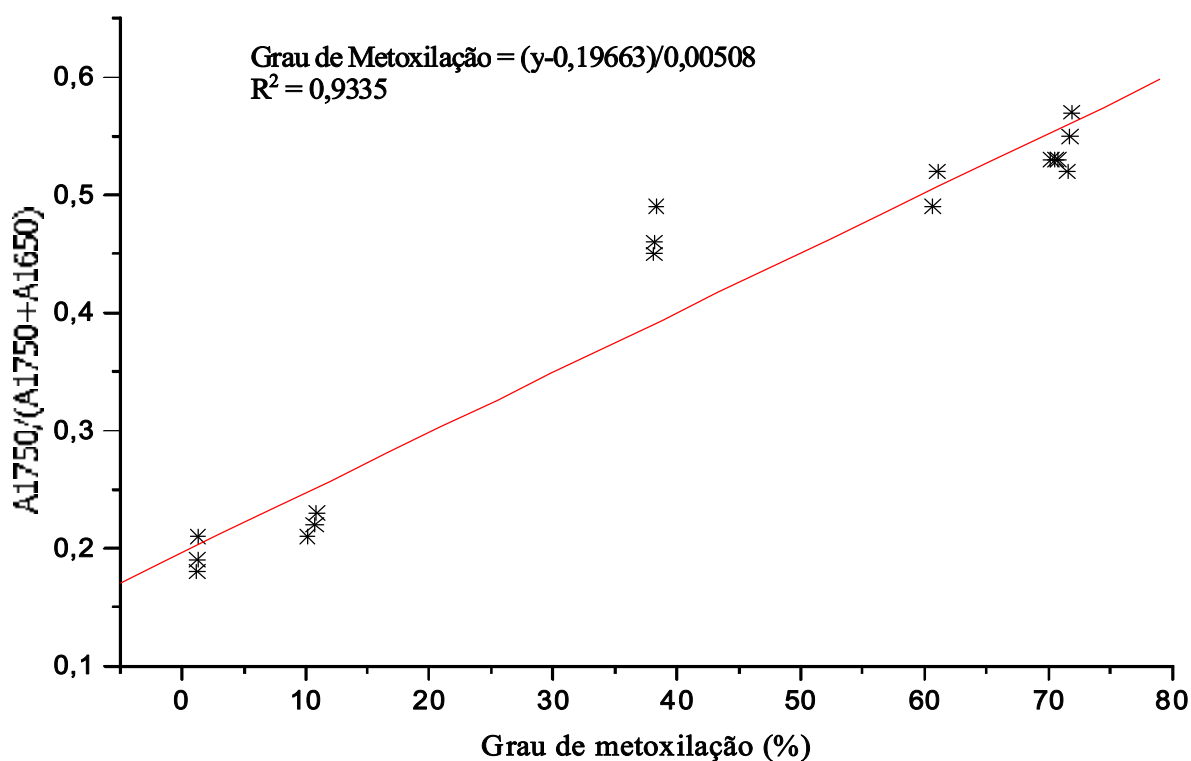


Figura 16. Coeficiente de Correlação Linear entre $[A_{1750}/(A_{1750} + A_{1650})]$ e grau de metoxilação dos padrões de pectinas.

A curva de calibração da figura 16 foi usada para calcular o grau de metoxilação das pectinas extraídas durante todo o experimento.

5.4 Determinação do grau de metoxilação dos frutos

Os frutos dos grupos I, II e III, foram caracterizados (Tabelas 7a, 7b e 7c), a fim de verificar sua adequabilidade para utilização como matéria-prima na produção de geléias.

Tabela 7a. pH do fruto, Rendimento (%) e Grau de metoxilação (%) das pectinas do grupo I.

	pH	Rendimento (%)	Grau de Metoxilação (%)
Goiaba	3,85±0,06 ^b	1,74±0,08 ^a	71,55±1,77 ^c
Morango	3,78±0,13 ^b	1,08±0,0 ^b	71,65±0,07 ^c
Uva	3,91±0,77 ^b	0,03±0,01 ^d	81,30±0,28 ^a
Maça	4,0±0,03 ^a	1,72±0,03 ^a	75,32±0,11 ^b
Jaboticaba	3,0±0,28 ^c	0,89±0,09 ^c	71,00±0,0 ^c

Letras iguais na vertical não diferem significativamente a nível de 5% de significância pelo teste de Duncan

Tabela 7b. pH do fruto, Rendimento (%) e Grau de metoxilação (%) das pectinas do grupo II.

	pH	Rendimento (%)	Grau de Metoxilação (%)
Pitanga	2,98±0,17 ^c	0,05±0,00 ^b	53,80±0,28 ^c
Acerola	4,5±0,42 ^b	0,045±0,01 ^{bc}	54,05±0,07 ^c
Caju	4,6±0,42 ^b	0,024±0,01 ^{cd}	47,40±0,56 ^d
Manga	4,55±0,49 ^b	1,19±0,01 ^a	68,65±0,49 ^a
Sapoti	5,70±0,00 ^a	0,02±0,01 ^d	59,70±0,28 ^b

Letras iguais na vertical não diferem significativamente a nível de 5% de significância pelo teste de Duncan

Tabela 7c. pH do fruto, Rendimento (%) e Grau de metoxilação (%) das pectinas do grupo III.

	pH	Rendimento (%)	Grau de Metoxilação (%)
Graviola	3,9±0,00 ^b	2,15±0,07 ^a	49,40±0,14 ^c
Pinha	5,47±0,39 ^a	0,41±0,00 ^c	64,25±0,92 ^a
Banana	3,4±0,00 ^b	1,05±0,04 ^b	59,80±0,28 ^b

Letras iguais na vertical não diferem significativamente a nível de 5% de significância pelo teste de Duncan

5.5 Análise estrutural das pectinas

Os espectros representativos de cada grupo podem ser observados na figura 17.

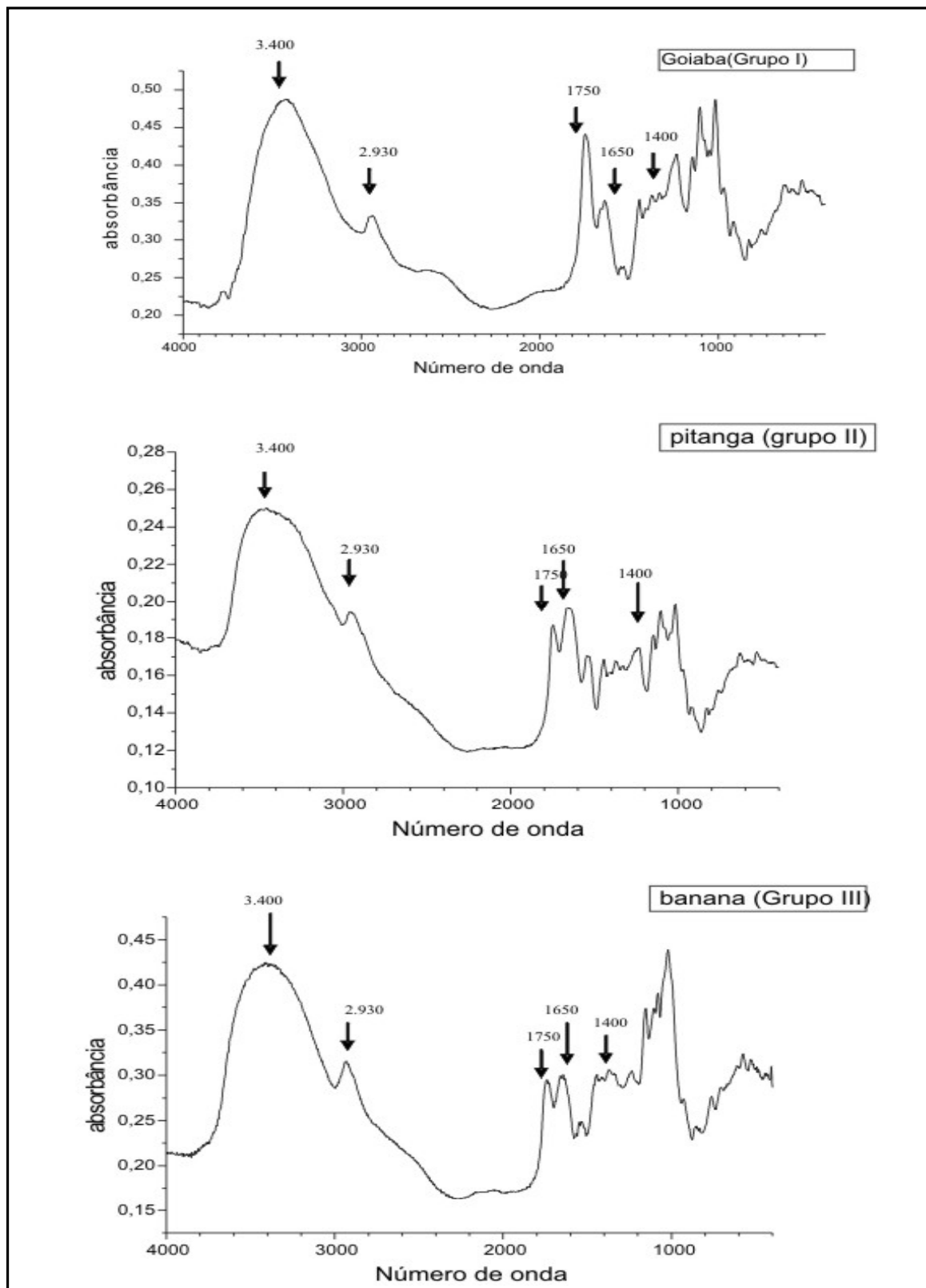


Figura 17. Espectro de Infravermelho dos frutos do Grupo I, II e III.

6.0 Discussão

6.1 Resultados preliminares

6.1.1 Caracterização das frações de pectinas extraídas sob diferentes pH's: grau de metoxilação e diâmetro dos fragmentos liofilizados

A proposta original de Mc Cready (1970) sugere a utilização do pH 2,2 na extração de pectinas e Bobbio & Bobbio (1995) sugere o pH 3,0.

Nos frutos o pH variou de 2,5 a 5,7, entretanto é recomendada para garantir melhor rendimento na extração, uma etapa de ajuste do pH (2,2 e 3,0) não se sabendo qual deles impactua sobre o grau de metoxilação. Devido à dificuldade de se avaliar grau de metoxilação em pectinas, não se sabe, portanto qual o efeito do pH sobre a estrutura da pectina.

Por outro lado, a condição drástica de acidez (pH 1,0) relatada em outros trabalhos (LEVIGNE et al., 2002; YAPO et al., 2006) promove a desesterificação e despolimerização da cadeia de pectinas, igualmente ao tratamento alcalino (pH 12,0) que resulta numa saponificação dos grupamentos éster metílico, como também na redução da cadeia de poligalacturônico por β -eliminação, que rende em pectinas de diferentes tamanhos (Figura

4). Ambos os tratamentos reduz o grau de metoxilação em níveis abaixo de 50%, como por exemplo, no caso do mesocarpo de frutos cítricos a pH 1,0 e a pH 12,0 (tabela 3).

Por outro lado, os três pH's analisados permitem obter pectinas diferenciadas quanto ao grau de metoxilação e quanto ao tamanho, orientando aplicações tecnológicas distintas, particularmente devido a diferenças na firmeza do gel (KERR & WICKER, 2000). Observou-se neste estudo redução do diâmetro médio da partícula (Tabela 4).

A redução no tamanho dos fragmentos de pectinas liofilizadas é consequência da redução da firmeza do gel formado durante a etapa de extração (precipitação). A firmeza do gel está relacionada à quantidade de pectina presente e, sobretudo pelo grau de metoxilação, sendo as pectinas de elevado grau de metoxilação (acima de 50%), particularmente, as promotoras de géis de maior resistência, desde que encontradas em níveis acima de 0,1-1% de pectina. Alguns relatos com padrões sugerem que a partir de 0,1% já é possível obter géis (KERR & WICKER, 2000).

O tempo de extração também influencia no tamanho de partículas. Yapo et al (2006) verificaram que ao extrair pectinas de beterraba a pH 1,5, 90°C, variando no tempo de extração de 1h para 4 h, percebeu uma redução no tamanho de partícula, quando analisado por cromatografia de exclusão molecular, com dois picos característicos. A separação destas moléculas por diferenças no seu tamanho molecular, onde as de maiores tamanhos são mais facilmente eluídas (9 ml) com a fase móvel ficando as moléculas menores retidas (12 ml) em colunas apropriadas.

Uma alternativa à aplicação desta técnica cromatográfica, é a análise direta dos tamanhos de partículas por microscopia eletrônica de varredura, realizada neste trabalho, pois é um procedimento que requer menor custo e mínimo tempo de execução associada à mão de obra devidamente qualificada.

6.1.2 Caracterização do tecido de poliéster usado na filtração e isolamento da pectina

A natureza do tecido ou malha recomendada para reter as frações é, sobretudo negligenciada na literatura, particularmente devido à metodologia original de Mc Cready (1970) recomenda a utilização de *cloth cheese* (KALAPATHY & PROCTOR, 2001); SAHARY et al., 2003).

O tecido de poliéster utilizado como filtro na etapa de isolamento mostrou-se eficaz na retenção das pectinas nas três frações analisadas, visto que no momento da filtração, as pectinas isoladas e posteriormente liofilizadas estão em máxima coalescência, com subsequente aumento do diâmetro do gel, permitindo apenas a passagem de moléculas de menor tamanho (diâmetro inferior a $2.523,06 \mu\text{m}^2$), segundo a tabela 4. Não há relatos de qual a melhor forma de reter as frações diferenciadas de pectinas. Mc Cready (1970) sugere a utilização de *cloth cheese*, portanto a maioria dos pesquisadores prefere o uso da centrifugação (2.700 g) para isolar a pectina (KALAPATHY & PROCTOR, 2001) e uso de membranas seletivas de 3-11 μm para purificação (YAPO et al., 2006).

6.2 Ensaio para otimização da extração de pectinas

Os maiores percentuais de grau de metoxilação para ambos os frutos foram observadas no menor pH analisado (2,2 X 3,0), demonstrado na figura 7 e 10. Levigne et al., (2002), relataram que o percentual do grau de metoxilação tende a aumentar com a elevação do pH inicial de extração, ao analisar este efeito entre o pH 1,0 e 3,0. A mesma observação foi realizada por Yapo et al (2006) que analisaram a metoxilação de pectinas extraídas a pH 1,5 e 2,0, utilizando etanol 96% como precipitante.

Dessa forma, deve-se considerar o pH analisado, de forma que nesta situação, o pH fortemente ácido (pH 1,0 e 1,5) promove a desesterificação da cadeia de poligalacturônico, o que reflete na redução do grau de metoxilação. Este fato pode ser confirmado na tabela 3, onde se percebe que a extração a pH 1,0 reduz significativamente o grau de metoxilação, sendo esta mais acentuada ainda se a extração ocorrer a pH 12,0.

Os dados obtidos neste trabalho com relação a pH e rendimento estão de acordo com outros publicados na literatura (MICARD & THIBAUT, 1999; LEVIGNE et al., 2002; MESBAHI et al., 2005; YAPO et al., 2006) e tem grande aplicabilidade, principalmente em se tratando de produção de pectinas em larga escala, para indústria de geléias.

Outro fator a ser considerado além do pH, é a concentração do ácido, se esta aumenta de 0,05N a 0,2 N de HCl promove redução (de 26-28% para 21%) no rendimento de extração de pectinas da casca da soja, quando precipitada por isopropanol (KALAPATHY & PROCTOR, 2001), enquanto o mesmo não foi observado no percentual de grau de metoxilação. Apesar de interação significativa no rendimento, ao se comparar pH 3,5 em relação ao 2,0 não se observou interações significativas no grau de metoxilação.

A proposta de Mc Cready (1970), sugere ajuste de pH com ácido cítrico, minimizando o impacto da natureza do ácido sobre a pectina produzindo resultados confiáveis por representar originalmente o modelo de composição química encontrada em vegetais, e particularmente nos frutos. No entanto, deve-se observar que severas condições durante a extração (baixo pH e tempo de extração) podem acelerar a degradação deste polímero (CHO & HWANG, 2000).

Com relação à influência do tempo de extração, a metodologia proposta por Mc Cready (1970) e Bobbio & Bobbio (1995) sugere a fervura por 30 minutos, que para o caso do mesocarpo da laranja influenciou positivamente na metoxilação da pectina (tabela 5). Portanto, não se pode afirmar uma correlação direta entre tempo de extração e grau de metoxilação, pois se a extração ocorrer por tempo superior a 30' (temperatura superior a 100°C) poderá acarretar a formação de produtos da reação de *Maillard*, como por exemplo, as aldossaminas e furfurais, o que pode causar desesterificação e despolimerização da molécula de pectinas ou deixá-la livres, e assim afetar os valores reais do seu grau de metoxilação.

Com relação ao rendimento de extração, o tempo de 30 minutos foi o que obteve maiores rendimentos em relação ao de 15 minutos, tanto para o mesocarpo de laranja, como para a goiaba. Assim, a relação direta entre rendimento e tempo de extração, conforme dita por outros autores (MESBAHI et al., 2005; YAPO et al., 2006) pode ser vista na figura 9 e 13.

De acordo com alguns pesquisadores (MICARD & THIBALTH, 1999; MESBAHI et al., 2005; YAPO et al., 2006), o pH e tempo de extração são parâmetros que mais impactam no rendimento de extração de pectinas, e que a temperatura pode influenciar apenas ligeiramente, quando analisados isoladamente. Portanto, o binômio tempo X temperatura, deve ser levado em consideração, afinal, elevadas temperaturas por longos tempos de extração podem resultar em hidrólise e degradação da cadeia de pectina (MESBAHI et al., 2005).

Mc Cready (1970) e Bobbio & Bobbio (1995), nas suas propostas sugerem a utilização de etanol para precipitar pectinas e aglutinar os géis. Portanto em outros trabalhos percebe-se que alguns autores não seguem esta proposta e optam por outro tipo de álcool, como o isopropanol (KALAPATHY & PROCTOR, 2001), para esta mesma finalidade, mesmo sabendo que este tipo de álcool é mais oneroso que outros utilizados para o mesmo intuito, como por exemplo, o metanol e etanol.

Para verificar o efeito do álcool utilizado no momento da precipitação ainda são necessários trabalhos que elucidem mais qual a interação do tipo do álcool com o rendimento e grau de metoxilação de pectinas. É preciso uma explicação mais plausível de

modo a esclarecer como a química do álcool (comprimento de cadeia, polaridade) pode interferir nesses parâmetros, de modo a permitir a escolha do álcool (metanol, etanol, isopropanol) que ofereça vantagens, tais como, rendimentos desejáveis, a não modificação na química da pectina, além de ser de baixo custo, e de reduzida toxicidade.

6.3 Determinação do grau de metoxilação das pectinas.

Os parâmetros, grau de metoxilação e rendimento de pectina, são fatores importantes para orientação da firmeza do gel e, subsequentemente para valorização e aplicação de frutos como matéria-prima para indústria alimentícia, para notadamente, a industrialização de geléias.

A extração visando melhor rendimento e a caracterização de pectinas (grau de metoxilação), mostra-se como ferramentas na seleção de frutos para fins tecnológicos, principalmente para a produção de geléias.

Os ingredientes básicos necessários para que o mecanismo de geleificação (geléia) ocorra pode está presente no próprio fruto. Portanto, a deficiência do fruto em um dos parâmetros refletindo na qualidade da pectina, podendo ser corrigida antes da formulação.

As formulações em geral, sugerem limite de 65% de açúcar (sacarose); acidez ao redor do pH 3,0; e pectinas de alta metoxilação (>50%), portanto desconhece-se qual a concentração ideal requerida, pois nas formulações tradicionais sugerem um mínimo de

1%, enquanto dados mais recentes obtidos em padrões afirmam em 0,1% já se observa a coalescência requerida para firmeza de gel (KERR & WICKER, 2000).

De um modo geral, géis de pectina são estabelecidos quando regiões da molécula formam ligações cruzadas, através de uma rede cristalina tridimensional onde as moléculas de água e os co/solutos ficam retidos. Particularmente para as pectinas de alta metoxilação, a geleificação ocorre quando zonas de junção são formadas por ligações cruzadas do ácido galacturônico por pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas entre os grupos metoxil presentes, promovidos pela concentração de açúcar e baixo pH (WILLATS et al., 2005). Por outro lado, em pectinas de baixa metoxilação a formação do gel envolve ligações simultâneas entre íons de cálcio com grupos carboxilas livres (GROSSO et al., 2000; CAPEL et al., 2005; CARDOSO et al., 2003; LÖFGREN & HERMANSSON, 2007).

Nos frutos do grupo I (tabela 7a), as pectinas analisadas apresentaram elevados graus de metoxilação (> 70,0%); alto percentual de rendimento, com exceção à uva que forneceu valores inferiores, mas que é compensado pelo mais alto grau de metoxilação (>80,0%); e pH próximo ao ideal para geleificação.

Ao se analisar os três parâmetros da tabela 7 (pH, rendimento e grau de metoxilação) nos grupos II e III, percebe-se que ocorre uma deficiência em um dos valores estabelecidos para que ocorra geleificação, requerendo ainda a correção de sólidos solúveis.

Com relação aos frutos do grupo II, apesar do grau de metoxilação mostrar-se elevado (>50%) à exceção do caju, o percentual de rendimento foi inferior ao limite

mínimo estabelecido pela literatura em quase todos os frutos para geleificação, com exceção à manga, que teve um percentual de 1,19%. O pH dos frutos foi elevado, superior a 3,0 com exceção da pitanga. Portanto, no caso deste grupo, deve-se haver um ajuste tanto no pH com ácido cítrico, e adição de pectinas.

Nos frutos do grupo III, a graviola apresentou um pH favorável, e um rendimento elevado, porém de pectinas de baixa metoxilação (< 50%). Já a pinha mostrou um pH muito elevado para a geleificação natural, mas com rendimento e grau de metoxilação supostamente adequado. Com relação à banana, observaram-se boas condições nas três variáveis para geleificação.

Entretanto, os valores de grau de metoxilação necessitam serem avaliados por outro método a fim de obter a exatidão dos mesmos e assim apropriar melhor esta discussão.

6.4 Análise estrutural da pectina

Analisando as figuras 16a, 16b e 16c, encontra-se uma banda em comum aos espectros, que aparece próximo a 3.400cm^{-1} , devido às vibrações do O-H das pontes de hidrogênio inter e intramolecular. A banda próxima a 2.930 cm^{-1} corresponde às vibrações C-H dos grupos CH, CH₂ e CH₃, as bandas 1600 e 1420cm^{-1} correspondem às vibrações da estrutura COO⁻ assimétricas e simétricas, respectivamente (GNANASAMBANDAM & PROCTOR, 2000).

Os carboidratos mostram elevada absorvência entre 1.200 e 900 cm^{-1} , que constituem região de “impressão digital” específica para cada polissacarídeo. Estas bandas são formadas por complexas interações vibracionais, e como consequência, é impossível identificar uma banda desta região como uma vibração de um grupo de átomo específico (MANRIQUE & LAJOLO, 2002).

Os espectros obtidos neste trabalho foram satisfatórios, de forma que as bandas representativas às vibrações dos átomos foram identificadas (figura 16a, 16b e 16c), concordando com o trabalho de Manrique & Lajolo (2002) e Gnanasambandam & Proctor (2000). Entretanto, outras bandas poderiam ser mais exploradas a fim de tentar quantificar com mais exatidão o grau de metoxilação das pectinas. Essa exploração foi realizada neste trabalho ao considerar a vibração da banda em 1400cm^{-1} (estiramento dos íons carboxilatos), porém sem resultados satisfatório, devido esta vibração ser fraca em relação a 1750 e 1650 cm^{-1} .

7.0 Conclusões

Os resultados obtidos nas condições utilizadas nos experimentos permitem concluir:

- ✓ O grau de metoxilação de pectinas extraídas é modificado de acordo com o pH de extração, sendo as fortes condições de acidez e alcalinidade promotoras de desmetoxilação;
- ✓ Os fragmentos de pectinas liofilizadas tendem a reduzir o diâmetro à medida que progride a diminuição o grau de metoxilação;
- ✓ O tecido de poliéster analisado mostrou-se hábil no isolamento de pectinas, sendo assim uma técnica mais acessível que os métodos usualmente empregados;
- ✓ O procedimento de extração da pectina em frutos foi otimizado quanto a pH, tempo de extração e natureza do álcool, donde escolheu-se a forma mais eficiente de extração combinando rendimento e grau de metoxilação.
- ✓ Os frutos do grupo I mostraram-se com características favoráveis à obtenção de geléias, por outro lado, os frutos do grupo II e III não tiveram comportamento similar, quando comparadas as características (pH do fruto, rendimento ou grau de metoxilação).

8.0 Referências Bibliográficas

BARBOSA-CANOVAS, G. V., KOKINI, J. L., MA, L., & IBARZ, A. The rheology of semi liquid foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 39, p. 1–69, 1996.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. H. **Introdução à química de alimentos**. Editora varela. São Paulo, p. 223, 1992.

BOERIU, C. G., STOLLE-SMITS, T., & VAN DIJK, C. Characterization of cell wall pectins by near infrared spectroscopy. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, 6, A299–A301, 1998.

BRANDÃO, E.M. & ANDRADE, C.T. Influencia de fatores estruturais no processo de geleificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 1, p. 38,1999.

CAPEL, F.; NICOLAI, T.; DURAND, D.; BOULENGUER, P.; LANGENDORFF, V. Calcium and acid induced gelation of (amidated) low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, p. 1-7, 2005.

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

CHATJIGAKIS, A.K., PAPPAS, C., PROXENIA, N., KALANTZI, O., RODIS, P., POLISSIOU, M. FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 395–408. 1998.

CHO, YONG-JIN & HWANG, JAE-KWAN. Modeling the yield and intrinsic viscosity of pectin in acidic solubilization of apple pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 44, p. 85-89, 2000.

FILIPPOV, M.P. & KORN, R. Determination of the esterification degree of carboxyl groups of pectin with methanol by means of infrared spectroscopy. **Chemistry Zvesti** 29, p.88-91, 1975.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C., CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, 91, 157–162, 1991.

FISHMAN M. L.; CHAU, H. K.; HOAGLAND, P. D.; HOTCHKISS, A. T. Microwave-assisted extraction of lime pectin. **Food Hydrocolloids**, p. 1-8, 2006.

FOOD CHEMICAL CODEX. (3rd ed.). Washington, DC: **National Academy of Sciences**, (1981).

GANCZ, K.; ALEXANDER, M.; CORREDIG M. In situ study of flocculation of whey protein-stabilized emulsions caused by addition of high methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 293-298, 2006

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

GROSSO, C.R.F.; BOBBIO, P.A. & AIROLDI, C. Effect of sugar and sorbitol on the formation of low methoxyl pectin gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 421-424, 2000.

GUILLOTIN S.E.; VAN LOEY, A.; BOULENGUER, P.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A.G.J. Rapid HPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl-esterification and amidation. **Food Hydrocolloids**, v. 1, p. 1-7, 2006.

HUANG L. **Electron microscope biospecimen preparation technology**, p. 91–95. Nanjing, China: Jiangsu Science and Technology Publishing House, 1982.

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

JOYE, D.D. & LUZIO, G.A. Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 337-342, 2000.

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

KERR, W.L. & WICKER, L. NMR proton relaxation measurements of water associated with high methoxyl and low methoxyl pectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 133, 2000.

KIM, W. J., SOSULSKI, F. W., & LEE, C. K. Chemical and gelation characteristics of ammonia-demethylated sunflower pectins. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1436-1439, 1978.

LEVIGNE, S.; THOMAS, M.; RALET, M.C.; QUEMENER, B.; THIBAUT, J.F. Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 547-550, 2002.

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

LIN, M. J. Y., SOSULSKI, F. W., HUMBERT, E. S., & DOWNEY, R. K. Distribution and composition of pectin in sunflower plants. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 55, p. 507–513, 1975.

LIU, Y.; SHI, J.; LANGRISH, T.A.G. Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. **Chemical Engineering Journal**, v. 1, p. 1-7, 2006.

LÖFGREN, C & HERMANSSON, ANNE-MARIE. Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 480-486, 2007.

LOOTENS, D.; CAPEL, F.; DURAND, D.; NICOLAI, T.; BOULENGUER, P.; LANGENDORFF, V. Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.237-244, 2003.

MANRIQUE, G. D. & LAJOLO, F.M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, p. 99-107, 2002.

MAY, C. D. (1997). Pectins. In A. Imeson (Ed.), **Thickening and gelling agents for food** (pp. 124–152). London: Blackie Academic and Professional.

MC FEETERS, R.F; ARMSTRONG, S.A. Measurement of pectin methylation in plant cell walls. **Analytical Biochemistry**, n. 139, p. 212-217, 1984.

MICARD, V., & THIBAUT, J.-F. Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins. **Carbohydrate Polymers**, v.39, p.265–273, 1999.

MC CREADY, R. M. Pectin IN: Joslyn, **Methods in food analysis**. New York, Academic Press, 10 Ed., 1970.

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

MINKOV, S., MINCHEV, A., & PAEV, K. Modelling of the hydrolysis and extraction of apple pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 29, p.107–113, 1996.

PAIXÃO, J. A. & SILVA, J. L. **Caracterização de pectinas naturais por pectinametilesterase e infravermelho**, CONIC, 2005, UFPE, Recife – PE.

PANCHEV, I. N., KIRTCHEV, N. A., & KRATCHANOV, C. Kinetic model of pectin extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 11, p.193-204, 1989.

PLÖGER, A. Conductivity detection of pectin. A rapid HPLC method to analyze degree of esterification. **Journal Food Science**, v. 57, p. 1185-1186, 1992.

POMERANZ, Y & MELOAN, C. **Food Analysis: Theory and Practice**. New York, 3^aed., 2000.

RIDLEY, B. L., O'NEILL, M. A., & MOHNEN, D. Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 6, p. 929–967, 2001.

ROMBOUTS, F. M., & THIBAUT, J.-F. Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 154, p. 177–188, 1986.

SAHARI, A. L.; AKBARIAN, A.; HAMED, M. Effect of variety and acid washing method on extraction yield and quality of sunflower head pectin. **Food Chemistry**, v. 83, p. 43-47, 2003.

SIRISOMBOON, P.; TANAKA, M.; FUJITA, S. & KOJIMA, T. Evaluation of pectin constituents of Japanese pear by near infrared spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, 2005.

SOHN, M. R., & CHO, R. K. Possibility of nondestructive evaluation of pectin in apple fruit using near-infrared reflectance spectroscopy. **Journal of the Korean Society for Horticulture Science**, v. 41, p. 65–70, 2000.

STATSOFT, Inc. STATISTICA for Windows 6.0 [Computer program manual]. Tulsa: StatiSoft, 1997.

TABILO-MUNIZAGA, G. & BARBOSA-CANOVAS, G. V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 147-156, 2005.

VINCKEN, J. P., SCHOLS, H. A., OOMEN, R. J., MCCANN, M. C., ULVSKOV, P., VORAGEN, A. G. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant physiology**, v. 4, p. 1781–1789, 2003.

VORAGEN, A.G.J.; SCHOLS, H.A. & PILNIK, W. Determination of the degree of methylation and acetylation of pectin by HPLC. **Food Hydrocolloids**, v.1, p.65-70, 1986.

YAPO, B.M.; ROBERT, C.; ETIENNE, I.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, p. 1-9, 2005.

YOO, SANG-HO; FISHMAN, M. L.; HOTCHKISS JR, A. T.; LEE, H. G. Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.62-67, 2006.

WILLATS, W.G.T.; KNOX, J. P. & MIKKELSEN J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Food Science & Technology**, P.1-8, 2005.

WOOD, P. & SIDDIQUI, I., 1971. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. **Analytical Biochemistry**. n.39, p. 418–428.

WU, D. **The biochemistry of BR**. Higher Education Press, p. 414, 1987.

YAMADA, H. Contribution of pectins on health care. In J. Visser,&A.G. J. Voragen, **Pectins and pectinases**, Amsterdam p. 173–190, 1 Ed. , 1996.

YAMADA, H., KIYOHARA, H., & MATSUMOTO, T. Recent studies on possible functions of bioactive pectins and pectic polysaccharides from medicinal herbs. In F. Voragen, H. Schols, & R. Visser (Eds.), **Advances in pectin and pectinase research**, Dordrecht, p. 481–490, 2003.

ZHONGDONG, L.; GUOHUA, W.; YUNCHANG, G.; KENNEDY, J. F. Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. **Carbohydrate Polymers**, p. 1-5, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)