

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Departamento de Alimentos**

**FARINHAS DE CASCA DE PEQUI: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, PERFIL  
DE FENÓLICOS, ANTIOXIDANTES E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COMO FONTE  
DE PECTINA VIA EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS**

**Daniela Pereira Leão Vieira**

**Belo Horizonte**

**2017**

**Daniela Pereira Leão Vieira**

**FARINHAS DE CASCA DE PEQUI: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, PERFIL DE FENÓLICOS, ANTIOXIDANTES E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COMO FONTE DE PECTINA VIA EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial  
à obtenção do Grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de alimentos

Orientadora: Profa. Adriana Silva França, Ph.D

**Belo Horizonte**

**2017**

L437f Leão, Daniela Pereira.  
Farinhas de casca de pequi: caracterização físico-química, perfil de fenólicos, antioxidantes e avaliação do potencial como fonte de pectina via extração por micro-ondas / Daniela Pereira Leão Vieira. – 2017.  
129 f. : il.

Orientadora: Adriana Silva França.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Alimentos – Teses. 2. Pequi – Teses. 3. Pectina – Teses. 4. Antioxidantes – Teses. 5. Fibras alimentares – Teses. I. França, Adriana Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 664.8

## Dedicatória

*“É saber se sentir infinito,  
num universo tão vasto e bonito é saber sonhar  
E, então, fazer valer a pena cada verso  
daquele poema sobre acreditar”. (Ana Vilela)  
A todos aqueles que sonharam comigo e  
estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada, dedico.*

## **Agradecimentos**

Esse não foi um trabalho individual. Ao longo desses 4 anos de jornada muitas pessoas contribuíram para a conclusão desse ciclo. Agradeço imensamente ao meu marido Diego, companheiro de todas as horas. Meu maior incentivador e amigo. Ao meu querido pai, José Maria, por todo carinho e à minha mãezinha, Roseli, minha melhor amiga. Meu maior exemplo de mãe, mulher e profissional, por todo o amor dedicado e orações. Aos meus irmãos Olga e Lucas, pela amizade, amor, conselhos e por sempre me animarem e acreditarem em mim. Agradeço também aos meus sogros, Salvador e Helena, que me consideram uma filha e sempre me apoiaram. A todos os meus familiares e amigos que torceram e acreditaram no meu trabalho.

Agradeço com muito carinho cada um dos colegas e amigos do laboratório, parceiros diários nessa trajetória. Por toda ajuda, carinho e aconselhamento ao longo desses anos. Agradeço de maneira especial à Andréia, Nádia, Edna, Fernando, Bruno, Verônica, Michelle, Laís Brito, Laís Maia, Vítor e Pablo. Agradeço também ao colega de pós-graduação Gustavo Cosenza.

À minha querida Orientadora Dra. Adriana Silva França por todo conhecimento e experiências compartilhados, pelas broncas (foram poucas) e conselhos e pela amizade ao longo desses 6 anos de convivência. Ao professor Leandro Soares de Oliveira por todas as contribuições e dedicação à pesquisa.

Aos professores do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG, em especial às professoras do Departamento de Tecnologia, pela confiança e apoio.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Orlando do Departamento de Química da UFMG por toda ajuda, paciência e carinho no desenvolvimento das análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e ao amigo Dr. Júlio César Cardoso (Jacuí) por todo conhecimento compartilhado.

Ao PhD. Manuel A. Coimbra e Rita Bastos da Universidade de Aveiro – Portugal, pela parceria nas análises de Cromatografia a Gás.

À Vanny Ferraz, pelo apoio e conhecimento compartilhado.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo custeio financeiro nos últimos 4 anos.

E o mais importante, agradeço a Deus e à Nossa Senhora de Aparecida, pela presença em minha vida e por me carregarem no colo nos momentos mais difíceis.

## RESUMO

O pequi é um fruto nativo do cerrado brasileiro e muito apreciado em diversas regiões do país. A casca, por outro lado, ainda é pouco estudada e escassos dados são encontrados na literatura acerca de sua caracterização e utilização. Em trabalho anterior foi detectado um elevado teor de fibras alimentares e antioxidantes em farinhas produzidas a partir de casca de pequi, demonstrando o potencial desse subproduto como ingrediente funcional. Devido a isso, o presente trabalho é continuidade desse estudo e apresenta dados para a caracterização das farinhas de casca de pequi. A caracterização das farinhas foi realizada em relação aos componentes com capacidade antioxidante presentes, bem como em relação aos componentes monossacarídicos formadores das fibras alimentares. As análises de caracterização de compostos antioxidantes por métodos espectrofotométricos evidenciaram um elevado teor de carotenoides (2807,65 µg/100 g) e capacidade antioxidante mensurada pelo método FRAP (3121,74 µmol Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g). Além disso, esse foi o primeiro estudo a avaliar o teor de macroantioxidantes (polifenóis não extraíveis) em casca de pequi (281,19 mg/100g) (valores médios). Por meio da análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi possível identificar a presença de ácido gálico, ácido elágico e etil galato nas farinhas de casca de pequi. Não há na literatura até o momento relatos da caracterização das fibras alimentares de casca de pequi. Os resultados obtidos nessa etapa evidenciaram que as farinhas de casca de pequi são compostas majoritariamente por polissacarídeos pécnicos e hemiceluloses como xiloglucanas, arabinogalactanas e glucomananas. Por fim, foi proposto e averiguado o potencial de extração por aquecimento em micro-ondas de pectina das farinhas de casca de pequi. Esse estudo demonstrou a possibilidade de obtenção de pectinas com elevado grau de esterificação (>50%), sendo atrativas para a indústria como aditivo alimentar. Os resultados obtidos nesse trabalho evidenciam o potencial multifuncional das farinhas de casca de pequi como ingrediente alimentício, sendo boa fonte de antioxidantes naturais e fibras alimentares como as pectinas. A detecção desses compostos nas farinhas de casca de pequi torna o produto atrativo comercialmente possibilitando a agregação de valor a um resíduo agrícola ainda subaproveitado do ponto de vista científico, comercial e tecnológico.

**Palavras-chave:** antioxidantes, fibras alimentares, pectina, casca de pequi, subprodutos.

## ABSTRACT

Pequi is a native fruit of the Brazilian cerrado and much appreciated in several regions of the country. On the other hand, there are few studies on its peel and scarce data are found in the literature about its characterization and use. In previous work, a high content of dietary fiber and antioxidants was detected in flours produced from pequi peel, demonstrating the potential of this byproduct as a functional ingredient. Due to this, the present work is a continuation of this study and presents data for the characterization of pequi peel flour. The flour was characterized in relation to the components with antioxidant capacity and to the monosaccharide components forming the dietary fiber. The analysis of characterization of antioxidant compounds by spectrophotometric methods showed a high content of carotenoids (2807.65  $\mu\text{g}$  / 100 g) and antioxidant capacity measured by the FRAP method (3121.74  $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4$  / g). In addition, this was the first study to evaluate the content of macroantioxidants (non-extractable polyphenols) in pequi peel (281.19 mg / 100g) (mean values). Through High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were able to identify the presence of gallic acid, ethyl gallate and ellagic acid in pequi peel flour. Studies of characterization of pequi peel dietary fiber have not been found in the literature. The results obtained by monosaccharide analysis and FTIR evidenced the presence of pectic polysaccharides and hemicelluloses such as xyloglucans, arabinogalactans and glucomannan. Finally, it was proposed and verified the potential of extraction by microwave heating of pectin of the pequi peel flour. This study demonstrated the possibility of obtaining pectins with a high degree of esterification (> 50%), being attractive to the industry as a food additive. The results obtained in this work show the multifunctional potential of pequi peel flour as a food ingredient, being a good source of natural antioxidants and dietary fibers such as pectin. Detection of these compounds in pequi peel flour makes the product commercially attractive by enabling the addition of value to an agricultural residue still underutilized from a scientific, commercial and technological point of view.

**Key words:** antioxidant, dietary fiber, pectin, pequi peel, by-products.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura do fruto do pequi – <i>Caryocar brasiliense</i> Camb.	18
<b>Figura 2:</b> As regiões do espectro eletromagnético e alterações quânticas resultantes da interação de um analito com a radiação eletromagnética	26
<b>Figura 3:</b> Estrutura geral da pectina	34
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática dos componentes estruturais da pectina	35
<b>Figura 5:</b> Espectro Eletromagnético	37
<b>Figura 6:</b> Estrutura geral dos flavonoides	44
<b>Figura 7:</b> Estrutura química dos ácidos benzoicos	44
<b>Figura 8:</b> Estrutura química geral dos ácidos cinâmicos	45
<b>Figura 9:</b> Estrutura geral de Carotenoides	48
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Figura II 1:</b> Higienização, corte, branqueamento e estoque as cascas de pequi	53
<b>Figura I 2:</b> Fluxograma de obtenção de farinhas de casca de pequi (FP)	54
<b>Figura I 3:</b> Cromatogramas e espectros de UV obtidos por CLAE-DAD para os padrões de ácido hidroxibenzoico, ácido gálico, etil galato, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico.	61
<b>Figura I 4:</b> Cromatogramas e espectros de UV obtidos por CLAE-DAD para os padrões de ácido elágico, ácido procatequínico, procianidina B2, catequina e epicatequina.	62
<b>Figura I 5:</b> Estrutura química do ácido gálico.	63
<b>Figura I 6:</b> Cromatograma e espectros-UV obtidos para as amostras de farinha de casca de pequi (TR:1,766 min – ácido gálico; TR: 9,615 min – etil galato).	66
<b>Figura I 7:</b> Estrutura química do etil galato.	67
<b>Figura I 8:</b> Estrutura química do ácido elágico.	68
<b>Figura I 9:</b> Cromatograma e espectros-UV obtidos para as amostras de farinha de casca de pequi (TR: 15,942 min – ácido elágico; TR: 16,830 – derivado de ácido elágico	69
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Figura II 1:</b> Microfotografia de FP1 (farinha de mesocarpo + exocarpo + branqueamento), com amplitude de 1000 x e tensão de 20 kV.	77
<b>Figura II 2:</b> Microfotografia de FP2 (farinha de mesocarpo + branqueamento), com amplitude de 1000 x e tensão de 20 kV.	78
<b>Figura II 3:</b> Média espectral obtida por DRIFT-FTIR, a partir dos espectros originais para os FP branqueados (FP1 e FP2). Sendo FP1: farinha de mesocarpo mais exocarpo e FP2: farinha de mesocarpo.	79
<b>Figura II 4:</b> Média espectral obtida por DRIFT-FTIR a partir das frações obtidas por digestão enzimática. FP1 I: fração insolúvel obtida a partir de FP1; FP1 S: fração solúvel obtida a partir de FP1; FP2 I: fração insolúvel obtida a partir de FP2; FP2 S: fração solúvel obtida a partir de FP2. Sendo FP1: farinha de mesocarpo mais exocarpo e FP2: farinha de mesocarpo.	80
<b>Figura II 5:</b> Espectro de derivada segunda obtida a partir dos espectros originais para as farinhas de casca de pequi (FP1 e FP2).Sendo FP1: farinha de mesocarpo mais exocarpo e FP2: farinha de mesocarpo.	81
<b>Figura II 6:</b> Espectro de derivada segunda obtida a partir dos espectros das frações digeridas enzimaticamente. FP1 I: fração insolúvel obtida a partir de FP1; FP1 S: fração solúvel obtida a partir de FP1; FP2 I: fração insolúvel obtida a partir de FP2; FP2 S: fração solúvel obtida a partir de FP2. Sendo FP1: farinha de mesocarpo mais exocarpo e	82



FP2: farinha de mesocarpo.

### Capítulo 3

<b>Figura III 1:</b> Fluxograma de extração de pectina.	91
<b>Figura III 2:</b> Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados. Extração com ácido cítrico para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).	96
<b>Figura III 3:</b> Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados. Extração com ácido acético para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).	96
<b>Figura III 4:</b> Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e potência na extração de pectina para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).	98
<b>Figura III 5:</b> Gráfico dos efeitos principais para rendimento de pectina extraídas com ácido cítrico: FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).	99
<b>Figura III 6:</b> Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e potência na extração de pectina para FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).	100
<b>Figura III 7:</b> Gráfico dos efeitos principais para rendimento de pectina extraídas com ácido cítrico: FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).	100
<b>Figura III 8:</b> Interação entre potência e temperatura e influência sobre o rendimento de extração de pectina para FP1 (farinha de mesocarpo e exocarpo de pequi).	101
<b>Figura III 9:</b> Interação entre potência e temperatura e influência sobre o rendimento de extração de pectina para FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).	101
<b>Figura III 10:</b> Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e potência na extração de pectina com ácido acético para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).	103
<b>Figura III 11:</b> Gráfico dos efeitos principais para rendimento de pectina extraídas com ácido acético: FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).	104
<b>Figura III 12:</b> Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e potência na extração de pectina com ácido acético para FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).	104
<b>Figura III 13:</b> Gráfico dos efeitos principais para rendimento de pectina extraídas com ácido acético: FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).	105
<b>Figura III 14:</b> Efeito da interação entre os fatores no rendimento de extração de pectina com ácido acético para as amostras de FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).	106
<b>Figura III 15:</b> Efeito da interação entre os fatores no rendimento de extração de pectina com ácido acético para as amostras de FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).	106
<b>Figura III 16:</b> Grau de esterificação das pectinas extraídas com ácido cítrico obtidos para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi) e FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).	109
<b>Figura III 17:</b> Grau de esterificação das pectinas extraídas com ácido acético obtidos para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi) e FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).	109
<b>Figura III 18:</b> Espectros de infravermelho por transformada de Fourier para reflectância difusa das amostras de pectinas isoladas das amostras FP1 e FP2 extraídas com ácido cítrico.	111

## Lista de Tabelas

<b>Tabela I 1:</b> Gradiente de fase móvel utilizado na corrida cromatográfica	57
<b>Tabela I 2:</b> Atividade antioxidante medida pelo método FRAP, teor de carotenoides e taninos condensáveis em farinhas de casca de pequi.	59
<b>Tabela I 3:</b> Teores de ácido gálico, ácido elágico e etil galato nas amostras de farinhas de casca de pequi e em frutos e subprodutos listados na literatura.	64
<b>Tabela II.1:</b> Propriedades de hidratação de farinhas de casca de pequi.	78
<b>Tabela II 2:</b> Composição monossacarídica de FP1, FP2 e suas frações insolúveis e solúveis obtidas por digestão enzimática.	84
<b>Tabela III 1:</b> Delineamento fatorial $2^3$ com 3 pontos centrais para extração de pectina.	93
<b>Tabela III 2:</b> Rendimento de extração de pectina (expresso em porcentagem) obtido para o delineamento fatorial exploratório para cada um dos ácidos utilizados.	94
<b>Tabela III 3:</b> Análise de Variância para as extrações com Ácido Cítrico e Ácido Acético para as amostras FP1.	95
<b>Tabela III 4:</b> Rendimento de pectina extraída de farinhas de casca de pequi (FP1 e FP2) utilizando-se solução de ácido cítrico e aquecimento por micro-ondas.	97
<b>Tabela III 5:</b> Rendimento de pectina extraída de pós rico em fibras a partir de casca de pequi (FP1 e FP2) utilizando-se solução de ácido acético e aquecimento por micro-ondas.	102

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 Frutos do Cerrado Brasileiro.....	16
2.2 O Pequi.....	17
2.3 Composição físico-química de alimentos.....	21
2.3.1 Métodos para a avaliação físico-química de alimentos.....	21
2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	21
2.3.3 Cromatografia a Gás (CG).....	22
2.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	24
2.3.5 Espectroscopia do Infravermelho.....	26
2.4 Carboidratos em Plantas.....	28
2.5 Fibras Alimentares (FA).....	30
2.5.1 Fibras alimentares e subprodutos agrícolas.....	32
2.6 Componentes de fibras alimentares: Pectina.....	33
2.6.1 Métodos de extração de pectina.....	36
2.6.2 Extração de pectina assistida por micro-ondas.....	37
2.7 Fibras alimentares com potencial antioxidante.....	39
2.8 Atividade antioxidante e compostos bioativos na casca de pequi.....	41
2.9 Compostos fenólicos.....	43
2.10 Polifenóis não extraíveis (NEPA).....	45
2.11 Carotenoides.....	47
<b>Capítulo I: Produção das farinhas de casca de pequi e avaliação de compostos bioativos</b>	
1 Introdução.....	52
2 Material e Métodos.....	53
2.1 Processamento de farinhas de casca de pequi.....	53
2.2 Avaliação do potencial de redução de íons ferro pelo método FRAP.....	55
2.3 Determinação do teor de polifenóis não extraíveis (NEPA) por espectrofotometria.....	55
2.4 Determinação do teor de carotenoides totais.....	56
2.5 Avaliação do perfil de compostos fenólicos por CLAE-DAD.....	56
3 Resultados e Discussão.....	58
4 Conclusão parcial.....	70
<b>Capítulo II Caracterização das farinhas de casca de pequi por cromatografia a gás, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura</b>	
1 Introdução.....	72
2 Material e Métodos.....	73
2.1 Caracterização superficial de FP por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	73
2.2 Análise de Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	73
2.3 Avaliação da composição monossacarídica por Cromatografia a Gás.....	74
3 Resultados e Discussão.....	77
3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	77
3.2 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	79
3.3 Composição monossacarídica por Cromatografia a Gás.....	83

<b>4 Conclusão Parcial.....</b>	<b>87</b>
<b>Capítulo III: Avaliação do potencial de extração de pectinas de farinhas de casca de pequi em reator de micro-ondas</b>	
<b>1 Introdução.....</b>	<b>89</b>
<b>2 Material e Métodos.....</b>	<b>90</b>
<b>2.1 Extração de pectina.....</b>	<b>90</b>
<b>2.2 Delineamento Experimental.....</b>	<b>91</b>
<b>2.3 Grau de Esterificação.....</b>	<b>93</b>
<b>3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>94</b>
<b>3.1 Rendimento de extração de pectina.....</b>	<b>94</b>
<b>3.2 Grau de Esterificação das pectinas.....</b>	<b>108</b>
<b>4 Conclusão Parcial.....</b>	<b>112</b>
<b>3 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>113</b>
<b>4 TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>114</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>115</b>

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ABTS	2,2 AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid) diammoninum salt
CG	Cromatografia a Gás
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Arranjo Diodo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil
DW	Matéria seca
EAG	Equivalente em ácido gálico
FA	Fibra Alimentar
FE	Fase Estacionária
FID	Detector por Ionização de Chama
FM	Fase móvel
FP	Farinha de casca de pequi
FP1	Farinha de exocarpo de mesocarpo de pequi
FP1 I	Fibras insolúveis de farinha de exocarpo de mesocarpo de pequi
FP1S	Fibras solúveis de exocarpo de mesocarpo de pequi
FP2	Farinha de mesocarpo de pequi
FP2 I	Fibras insolúveis de farinha de mesocarpo de pequi
FP2 S	Fibras solúveis de mesocarpo de pequi
FRAP	<i>Ferric reducing antioxidant power</i>
FS	Fibras solúveis
FT-IR	Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier
HCl	Ácido Clorídrico
He	Gás Hélio
HG	Homogalacturana
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N <sub>2</sub>	Gás nitrogênio
NEPA	Proantocianidinas não-extraíveis
ORAC	Capacidade de absorção de radicais oxigenados
PA	Proantocianidinas
pH	Potencial Hidrogeniônico
RG I	Ramnogalacturanas do tipo I
RG II	Ramnogalacturanas do tipo II
RMR	Razão molar relativa
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
UV	Ultravioleta
XGA	Xilogalacturonanas

# 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O Brasil encontra-se entre os 3 maiores produtores de frutas do mundo, atrás apenas de China e Índia. Juntos, respondem por 44,2% do total mundial e têm suas produções destinadas principalmente aos seus mercados internos (PARANÁ, 2015). Concomitante à grande produção, são gerados enormes volumes de biomassa vegetal que representa um importante problema ambiental se não houver o manejo ou aproveitamento adequado (AYALA-ZAVALA et al, 2010; PÉREZ-JIMENEZ & VIUDA-MARTOS, 2015). Esses resíduos, por outro lado, os quais incluem cascas, sementes, folhas e demais partes do vegetal refugadas pelo mercado são ricas fontes de fibras alimentares e compostos com capacidade antioxidante, como os compostos fenólicos (PÉREZ-JIMENEZ & VIUDA-MARTOS, 2015).

O consumo de fibras alimentares tem despertado interesse devido seu potencial de redução de riscos contra doenças crônicas como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2011; SAURA-CALIXTO, 2011; ZHUANG et al., 2012; WANG et al., 2015). O aumento no número de pessoas com estas enfermidades pode estar relacionado às mudanças nos hábitos de vida e alimentação.

O *Codex Alimentarius* define Fibras Alimentares (FA) como polímeros de carboidratos com 10 ou mais unidades monoméricas que não são hidrolizados por enzimas endógenas no intestino delgado de humanos. Estes podem pertencer a três diferentes categorias: polímeros de carboidratos comestíveis de ocorrência natural no alimento tal como é consumido; polímeros de carboidratos que foram obtidos da matéria-prima alimentícia por métodos físicos, químicos ou enzimáticos e, que apresentem efeitos fisiológicos benéficos à saúde; e polímeros de carboidratos sintéticos desde que comprovado seu efeito benéfico à saúde (HOWLETT et al., 2010).

Os compostos fenólicos, por outro lado, são metabólitos secundários naturalmente presentes em vegetais vasculares. Uma vez que suas principais funções relacionam-se com estratégias de defesa das plantas contra agentes externos, sua maior concentração se dá nas partes periféricas da mesma, como em sua casca (STALIKAS, 2007).

Algumas fibras alimentares podem conter em sua matriz compostos bioativos que, quando consumidos adequadamente, e em quantidades satisfatórias, podem chegar intactos ao intestino, no qual são liberados da matriz da fibra produzindo metabólitos e um ambiente antioxidante pela ação da microbiota intestinal (SAURA-CALIXTO, 2011). Estas fibras são

denominadas fibras com capacidade antioxidante. Diante disso, os subprodutos da produção agrícola, especialmente resíduos do processamento de frutas tornam-se alternativas viáveis para a obtenção de fibras com capacidade antioxidante.

Muitos dos frutos produzidos no Brasil são variedades já domesticadas e adaptadas às características geográficas da região. Entretanto, o consumo de frutos tropicais nativos tem aumentado devido à pesquisas evidenciando seus valores nutricionais e funcionais (RUFINO et al, 2010). O Brasil possui uma vasta variedade de frutos nativos, ditos exóticos, dentre eles destaca-se o pequi.

O pequi é proveniente do pequizeiro (*Caryocar brasiliense Camb.*), uma espécie nativa do Brasil, de ocorrência generalizada no cerrado, sendo explorado, predominantemente, de forma extrativista. A exploração econômica desta espécie é considerada uma prática ambientalmente sustentável e sua importância socioeconômica é verificada no conjunto de atividades, que englobam coleta, transporte, beneficiamento, comercialização e consumo, tanto do fruto *in natura* quanto dos produtos derivados (CÂNDIDO et al., 2012). Em 2015, o governo do Estado de Minas Gerais reconheceu oficialmente a cadeia produtiva do pequi no norte do Estado, contemplando inicialmente 14 municípios e permitindo a regularização do beneficiamento dos produtos derivados do fruto (JORNAL DO BRASIL, 2015)

Além de bastante apreciado e utilizado em diversas receitas e aplicações, o fruto é também reconhecidamente uma fonte de compostos antioxidantes naturais como carotenoides e compostos fenólicos (LIMA et al, 2007; KHOURI et al, 2007; AMARAL et al, 2014). Apesar disso, a casca, seu principal subproduto ainda é pouco estudada e escassos dados são encontrados na literatura acerca de sua caracterização e utilização. A casca pode representar até 80% da massa total do fruto, gerando mais de 5000 toneladas anuais desse resíduo (VERA et al, 2005; LEÃO et al, 2017).

Um estudo realizado por Leão et al. (2017) revelou a presença de um alto teor de fibras alimentares e compostos antioxidantes em farinhas de casca de pequi. A elevada atividade antioxidante determinada nesse estudo está relacionada ao elevado teor de compostos fenólicos encontrado para este subproduto, sendo superior a de diversos outros resíduos listados na literatura (CHANTARO et al., 2008; HASSAN et al., 2011; SOUZA et al., 2012; ZHUANG et al., 2012). Além disso, as farinhas obtidas nesse estudo apresentaram boas propriedades tecnológicas, destacando-se as propriedades de hidratação como índice de absorção de água,

solubilidade e volume de intumescimento, sugerindo a hipótese de utilização das farinhas como aditivos para alimentos processados.

Tendo em vista os resultados satisfatórios obtidos por Leão et al (2017) tanto para teor de fibras alimentares quanto para atividade antioxidante em farinhas de casca de pequi, esse estudo serviu como base para a continuidade do projeto que objetivou a realização de estudos mais aprofundados para a caracterização deste subproduto.

Não existem na literatura dados de caracterização dos componentes bioativos e de fibras alimentares das farinhas de casca de pequi, e poucos dados a respeito desse subproduto podem ser encontrados. Alguns estudos com casca de pequi listados na literatura incluem a produção e caracterização centesimal de farinha de casca de pequi (SOARES JÚNIOR et al., 2010; LEÃO, 2013); potencial de utilização da casca de pequi no combate de nematoides em galhas de tomateiro, bem como no combate de nematoides no trato gastrointestinal de ovelhas (RIBEIRO et al, 2012; NOGUEIRA et al., 2012) e influência de substituição parcial de ração por farinha de casca de pequi na produção de ovos de codornas e poedeiras (OLIVEIRA et al, 2016; SILVA et al, 2016).

Por todo o exposto, o presente trabalho objetivou a caracterização das frações polissacarídicas e de compostos antioxidantes de farinhas de casca de pequi por metodologias ainda não realizadas na literatura conforme descrito a seguir:

- Determinação do teor de carotenoides total, capacidade antioxidante pelo método de redução de ferro (FRAP), determinação de antioxidantes macromoleculares e investigação dos componentes fenólicos que promovem atividade antioxidante por CLAE-DAD.
- Determinação dos constituintes de fibras alimentares das farinhas de casca de pequi por meio das técnicas Cromatografia a Gás com detector de Ionização de Chama (CG-FID) e Espectroscopia do Infravermelho (FTIR). Avaliação superficial por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e relação com propriedades tecnológicas.
- Avaliação do potencial de extração de pectina (micro-ondas) tendo em vista a utilização como ingrediente alimentício.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem o conhecimento de alguns dos componentes presentes nas farinhas de casca de pequi. O detalhamento das espécies químicas formadoras da matriz da casca de pequi é de fundamental importância para se poder inferir com



segurança quanto ao seu uso na indústria, seja de alimentos ou farmacêutica. Além disso, as informações obtidas com as caracterizações das frações polissacarídicas e bioativas são de extrema importância para a agregação de valor a esse subproduto, em sua maioria descartado como lixo ou subutilizado para alimentação animal ou formação de compostagens.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Frutos do Cerrado Brasileiro

O Brasil é o país detentor da maior diversidade biológica do planeta. A região do cerrado corresponde a 25% do território brasileiro, possuindo cerca de 204 milhões de hectares. Esse ecossistema apresenta uma enorme diversidade faunística e florística e abrange principalmente os estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Maranhão, Piauí e Distrito Federal (SANTOS E ZAMPERO, 2012).

O cerrado representa a principal área de produção de grãos e fazendas de gado do Brasil. As chuvas sazonais e os solos pobres e ácidos são determinantes na vegetação deste ecossistema (LEITE, et al., 2006). Apesar disso, inúmeras espécies de plantas do cerrado já foram identificadas como importantes fontes de alimentos, substâncias medicinais, madeira, plantas melíferas e ornamentais (SOARES JUNIOR et al., 2010).

As árvores frutíferas do cerrado ocupam lugar de destaque nesse ecossistema. Tais frutos, apresentam sabores singulares e elevados teores de açúcares, proteínas, vitaminas e minerais (SANTOS E ZAMPERO, 2012). Alguns exemplos desses frutos incluem o araticum, o buriti, a cagaita e o pequi e apresentam teores de vitaminas do complexo B, tais como as vitaminas B1, B2 e PP, equivalentes ou superiores aos encontrados em frutas como o abacate, a banana e a goiaba, tradicionalmente consideradas como boas fontes destas vitaminas (AGOSTINI-COSTA e VIEIRA, 2004).

Dentre os frutos do Cerrado, o Pequi (*Caryocar brasiliense camb.*) merece destaque. O fruto é consumido pelas populações que habitam as regiões onde são produzidos, sendo o Estado de Minas Gerais (MG) seu principal produtor e consumidor. Por se tratar de um fruto de fácil produção e com características desejáveis em relação ao sabor e valor nutritivo, o pequi pode

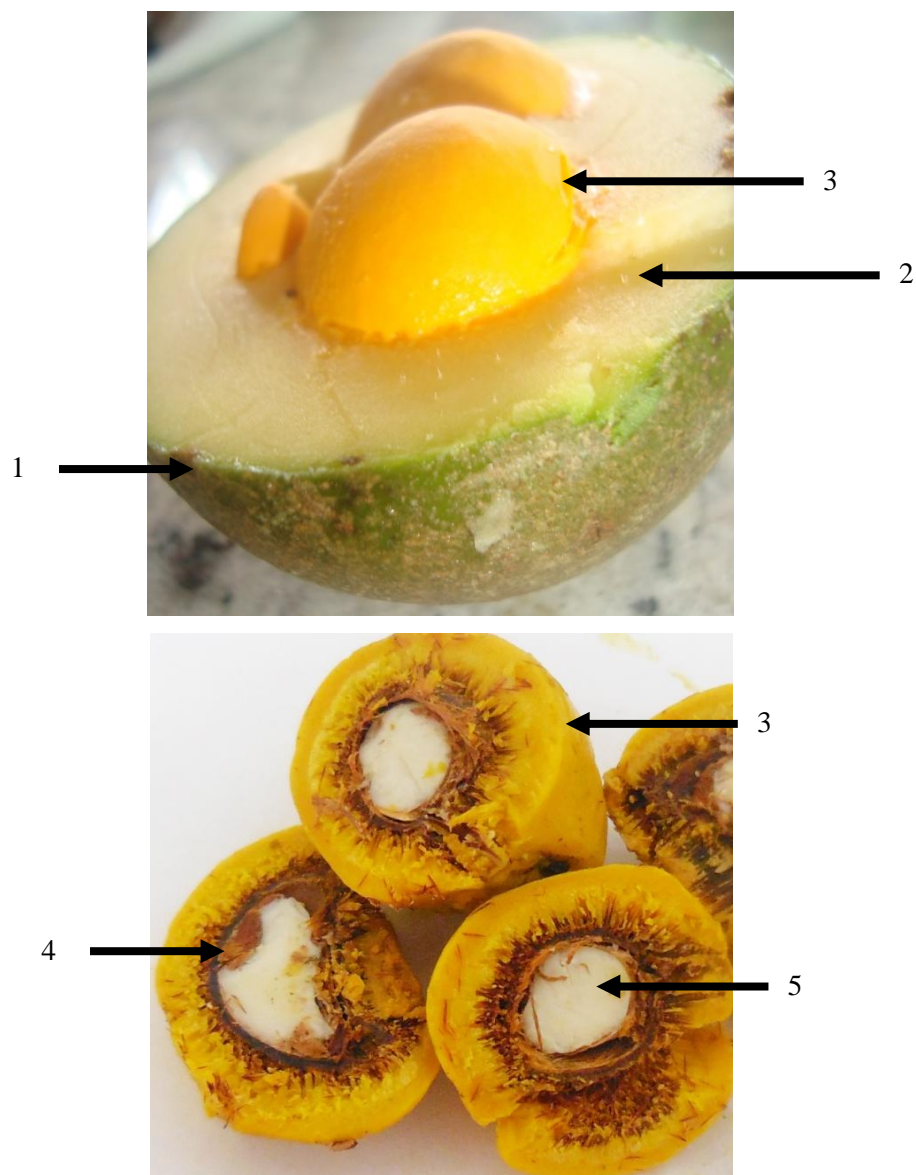
representar uma fonte potencial na alimentação e sobrevivência de uma parcela da população brasileira (LIMA et al., 2007).

## 2.2 O Pequi

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma espécie de ocorrência generalizada no cerrado, sendo explorado, predominantemente, de forma extrativista. Dentre os estados produtores, Minas Gerais destaca-se como o principal produtor e consumidor de pequi. Durante o período da safra no Norte de Minas Gerais, que compreende os meses de novembro a fevereiro, o pequizeiro é uma importante fonte de geração de renda para o agricultor local. Isto ocorre em função do envolvimento de toda família na catação dos frutos e na venda nas cidades circunvizinhas (RIBEIRO et al., 2012; CÂNDIDO et al., 2012).

O pequi (Figura 1) pode ser dividido em:

1. exocarpo (casca externa verde);
  2. mesocarpo (parte interna da casca, de coloração amarelada);
  3. endocarpo (polpa laranja/amarelada);
  4. revestimento de semente (castanho e duro, coberto por uma camada de espinhos finos); e
  5. semente (branca, incluindo o embrião, tegumento, e endosperma).
- } Casca (subproduto)



**Figura 1:** Estrutura do fruto do pequi – *Caryocar brasiliense* Camb. (1- exocarpo; 2- mesocarpo; 3- endocarpo; 4- revestimento da semente; 5- semente).

O fruto é amplamente consumido e muito valorizado pela cultura sertaneja. A espécie é explorada economicamente e sua importância socioeconômica engloba um conjunto de atividades: coleta, transporte, beneficiamento, comercialização e consumo, tanto do fruto *in natura* quanto dos produtos derivados (CÂNDIDO et al., 2012). Além do consumo como alimento (LIMA et al., 2007; BRASIL, 2008), o óleo extraído da polpa apresenta potencial de utilização para formulações cosméticas (NOGUEIRA DE DEUS, 2008; MIRANDA-VILELA et

al., 2009), bem como propriedades anti-inflamatórias (OLIVEIRA et al., 2010a). Já o óleo extraído da semente tem revelado potencial de utilização na produção de biodiesel (BORGES et al., 2012).

Apesar da vasta utilização das partes comestíveis do pequi, poucos estudos são encontrados na literatura para a utilização de seu principal subproduto: a casca. Soares-Junior e colaboradores (2010) desenvolveram e analisaram quimicamente uma farinha de mesocarpo de pequi. O estudo indicou que a farinha de mesocarpo de pequi é uma boa fonte de fibras alimentares, carboidratos, cinzas, magnésio, cálcio, manganês e cobre, mas pobre em lipídios, zinco e ferro.

Nogueira *et al.* (2012) avaliaram o efeito do extrato aquoso de casca de pequi na inibição do desenvolvimento das larvas, inibição da incubação de ovos e redução da contagem de ovos de nematóides nas fezes de ovinos. Os resultados indicaram alta eficiência na inibição da incubação de ovos e moderada ação antihelmíntica dos extratos quando administrada em uma única dose. A utilização de extrato de casca de pequi foi avaliada também no combate de nematoides em galhas de tomateiro. Cinco doses do extrato aquoso (0,0; 2,5; 5; 10 ou 20%) foram avaliadas quanto ao efeito na eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) do nematóide das galhas *in vitro*. Neste estudo, foi avaliado também o efeito da utilização do pó de cascas de pequi em tomateiro em casa de vegetação em quatro doses (0; 7,5; 15 ou 30 g/4 kg de solo). O pó de cascas de pequi foi incorporado sete dias antes do plantio do tomateiro e a inoculação de ovos do nematoide foi feita após o plantio. O extrato aquoso reduziu significativamente a eclosão e aumentou a mortalidade de J2 do nematóide das galhas. Quanto à utilização do pó de casca de pequi, os autores concluíram que têm efeito nematicida ao nematóide das galhas, porém causam fitotoxicidade quando misturado ao solo e seguido do plantio até sete dias da sua aplicação ao solo (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Como ingrediente alimentício, a casca de pequi foi utilizada para a extração de pectina com posterior adição em geleia *light* atuando como agente gelificante. Estudaram-se a influência das variáveis concentração de ácido cítrico, temperatura e tempo de extração sobre o rendimento e o grau de esterificação da pectina extraída da casca de pequi e compararam-na com a pectina cítrica comercial aplicada na formulação de geleia *light*. As pectinas obtidas a partir da casca de pequi, nesse estudo, apresentaram grau de esterificação inferior a 50%, sendo, portanto,

caracterizadas como pectinas de baixo teor de esterificação, podendo formar géis estáveis na ausência de açúcar, sendo viável sua utilização como aditivo alimentar (SIQUEIRA *et al.*, 2012).

No trabalho de Siqueira e colaboradores (2012) a pectina foi extraída pelo método convencional no qual são requeridos grande tempo de extração, o que aumenta o risco de degradação térmica de componentes termosensíveis. Por esses fatores, novas metodologias como a extração por micro-ondas ou ultrassom estão sendo desenvolvidas visando avaliar o efeito desses tratamentos no rendimento e qualidade das pectinas obtidas, bem como a redução do tempo de extração e, conseqüentemente, no consumo de solventes (SEIXAS *et al.*, 2014; MARAN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; THIRUGNANASAMBANDHAM e SIVAKUMAR, 2015). No presente trabalho, a extração de pectina por micro-ondas foi avaliada e será descrita no Capítulo 3.

No trabalho desenvolvido por Leão (2013) e que serve como base para o presente estudo o potencial antioxidante de farinhas de casca de pequi foi avaliado pelos métodos ABTS e DPPH e teor de compostos fenólicos foi estimado pelo método de Folin-Ciocalteu. O valor médio obtido para teor de compostos fenólicos foi de aproximadamente 17 g EAG.100g<sup>-1</sup>, resultados expressivamente superiores aos descritos na literatura para polpa e amêndoa de pequi (0,122 g EAG/100g) (LIMA *et al.*, 2007) e para outros subprodutos agrícolas. Com relação ao potencial antioxidante mensurado pelos métodos ABTS e DPPH, os resultados obtidos para farinhas de casca de pequi também foram bastante elevados (1064 µM de Trolox/g m.s e 47 g m.s./g DPPH, respectivamente). Esses resultados demonstram uma atividade antioxidante muito superior à encontrada para outros frutos do cerrado como o Marolo (657,9 µM de Trolox/g), o Jenipapo (112,46 µM de Trolox/g) e o Maracujá Doce (67,75 µM de Trolox/g) (SOUZA *et al.*, 2012). As farinhas de casca de pequi possuem também elevado teor de fibras alimentares (> 40%) (Leão, 2013), o que demonstra seu potencial como alimento funcional.

Tendo-se em vista o elevado consumo do fruto do pequi, especialmente em regiões do Cerrado brasileiro e sua importância na agricultura familiar, o elevado teor de resíduo gerado (cascas), e os resultados obtidos até o momento em análises relacionadas ao mesmo, torna-se importante a averiguação do potencial de valorização e utilização desse subproduto como ingrediente alimentício.

## **2.3 Composição físico-química de alimentos**

A avaliação da composição físico-química dos alimentos permite conhecer e classificar as matrizes alimentícias quanto sua composição química, características físicas, estrutura e propriedades. Com a detenção deste conhecimento pode-se compreender as alterações dos constituintes dos alimentos submetidos ao processamento (ARAÚJO et al., 2007).

O estudo da composição química dos alimentos permite identificar propriedades dos materiais e reatividade química de matrizes de alimentos, e como esse entendimento é efetivamente aplicado para melhorar a formulação, processamento e estabilidade de armazenamento de alimentos.

Leão et al (2017) estimaram a composição físico-química de farinhas de casca de pequi. O valor médio para umidade das farinhas variou de 6,39% a 8,03%. Com relação ao teor de proteína, os valores encontrados variaram de 3,25% a 4,86%. O valor médio estimado para resíduo mineral fixo foi 2,4%. Apesar de o fruto do pequi apresentar valores elevados de lipídios, as cascas, por sua vez, apresentaram valores baixos, na ordem de 0,3%. O teor de carboidrato foi calculado por diferença, sendo de 86%, em média. Grande parta da fração carboidrato é composta por fibras alimentares, uma vez que as farinhas de casca de pequi apresentaram cerca de 42% de fibra alimentar total, desse total cerca de 10% correspondem a fibras solúveis.

### **2.3.1 Métodos para avaliação físico-química de alimentos**

#### **2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A Microscopia Eletrônica de Varredura é uma técnica que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida (DEDAVID et al., 2007). Consiste em uma técnica microestrutural, bastante versátil e possui aplicações em diversas áreas de conhecimento, como engenharias, ciências de materiais, geociências, ciências biológicas entre outras (GOLDSTEIN et al., 1992).

O princípio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) baseia-se na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do detector a uma tela catódica cuja varredura encontra-se sincronizada com aquela do feixe incidente. O feixe é então guiado por um sistema de bobinas

de deflexão de modo a varrer a superfície da amostra segundo uma malha retangular. O sinal de imagem resulta da interação do feixe incidente com a superfície da amostra. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, pois a imagem é resultante da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra (DEDAVID et al., 2007).

Os particulados de origem vegetal podem ser caracterizados por meio da geometria das partículas e sua superfície externa, bem como pela forma dos poros e a fração de sua superfície interna acessível (SANTANA et al., 2012). Alves e colaboradores (2010) avaliaram por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a superfície de polpa de pequi liofilizada em diferentes tratamentos. No processo de liofilização foram utilizados diferentes concentrações e tipos de açúcares e álcoois. Por meio da análise das microfotografias foi possível perceber diferenças geradas nas superfícies dos pós pelos tratamentos.

Santana e colaboradores (2012) também avaliaram diferenças na superfície de pós ricos em fibras alimentares preparados a partir de albedo de laranja por diferentes tratamentos. Os autores elucidam que as características superficiais dos particulados vegetais podem afetar de forma significativa suas propriedades físico-químicas, além de influenciar as características de dissolução e na capacidade de retenção de água. As características superficiais podem ainda influir nas propriedades de transporte, na condutividade térmica, na difusão de aromas e de componentes de baixo peso molecular.

### **2.3.3 Cromatografia a gás (CG)**

A cromatografia a gás (CG) é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a determinação de compostos orgânicos voláteis. Uma das grandes vantagens da cromatografia a gás baseia-se na possibilidade de detecção de componentes mesmo em pequenas concentrações, além de uma excelente repetibilidade das análises (CHRISTIAN, 2009).

O desenvolvimento da CG como método analítico foi realizado inicialmente por Martin e Synge (1941). Esses cientistas demonstraram a técnica para a separação e quantificação de uma mistura de doze ácidos graxos. A importância da técnica foi reconhecida de imediato, sendo adotada por diversos laboratórios petroquímicos (SKOOG et al., 2008).

O advento da cromatografia a gás (CG) trouxe avanços substanciais para muitas áreas da química analítica promovendo expressivos avanços na forma de analisar compostos orgânicos voláteis, tanto em velocidade e confiabilidade, como seletividade, precisão e seletividade (CHRISTIAN, 2009). Na cromatografia a gás a amostra, que pode ser um gás ou um líquido é injetada em uma corrente de gás inerte (fase móvel), também chamada de “gás de arraste”. A amostra é conduzida através da coluna, na qual os componentes amostrais são separados de acordo com sua habilidade de distribuição entre as fases móvel (FM) e estacionária (FE). As fases móveis mais comuns em CG são o He, Ar e N<sub>2</sub> que têm a vantagem de serem quimicamente inertes em relação à amostra e à fase estacionária (HARVEY, 2000).

Com relação à fase estacionária (FE), no geral a mesma é composta por um líquido não volátil, imobilizado no interior de uma coluna capilar. A FE deve ser pouco volátil, termicamente estável e com polaridade apropriada para os solutos a serem separados. A escolha da FE adequada para análise é de grande importância para a seletividade do método. A ordem de eluição dos analitos na CG é determinada primeiramente pelo ponto de ebulição do soluto e, em seguida, pela interação do soluto com a fase estacionária. Dessa maneira, solutos com pontos de ebulição significativamente diferentes são facilmente separados, enquanto solutos com pontos de ebulição semelhantes podem ser separados somente se a fase estacionária interagir seletivamente com um dos solutos (HARVEY, 2000) De modo geral, solutos não polares são mais facilmente separados em FE não polares e, solutos polares em FE polares.

Após eluição pela coluna cromatográfica, o analito passará pelo detector e emitirá um sinal que será registrado como um pico no cromatograma. Um detector ideal possui vários parâmetros desejáveis como baixos limites de detecção, uma resposta linear ao longo de uma ampla gama de concentrações de soluto, a capacidade de resposta a todos os solutos ou seletividade para uma classe específica, baixo tempo de resposta, independente da taxa de fluxo e atuar em uma ampla faixa de temperatura (HARVEY, 2000; SKOOG et al., 2008).

Dentre os detectores, o detector por ionização de chama (FID) é o mais utilizado. Nesse tipo de detector, o analito eluído passa por uma pequena chama de hidrogênio e ar. O FID é amplamente utilizado para determinação de compostos orgânicos, uma vez que esses produzem íons e elétrons pela pirólise em uma chama hidrogênio-ar. Para a coleta de sinal, é aplicado um potencial de cerca de 300 V através da chama formando uma pequena corrente de cerca de 10<sup>-9</sup>-



10<sup>-12</sup> A. Quando amplificado, esta corrente fornece um sinal analítico o qual será registrado na forma de pico.

O uso de cromatografia a gás com detector por ionização de chama (CG-FID) tem demonstrado grande relevância para a caracterização da composição monossacarídica de fibras alimentares de subprodutos agrícolas (LIANG et al., 2012; AJILA E PRASADA RAO, 2013; SEIXAS et al., 2014; BADRI et al., 2015; ZHU et al., 2016). A determinação da fração monossacarídica em fibras alimentares permite caracterizá-las quanto sua composição e inferir sobre suas propriedades tecnológicas.

### **2.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consiste em um método de separação de diferentes substâncias químicas contidas em uma amostra a qual é eluída através de uma coluna pela passagem de um líquido a alta pressão. O processo de separação ocorre devido a um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas do soluto (amostra) e duas fases, uma móvel (FM) e outra estacionária (FE) (CHUST, 1990). A FE refere-se ao material do qual é preenchida a coluna cromatográfica, enquanto a FM, consiste em um ou mais solventes que fluem continuamente através do sistema promovendo a eluição do soluto pela coluna. As velocidades de eluição através da coluna dos diferentes solutos contidos na amostra serão distintas, devido às diferentes estruturas moleculares e grupamentos funcionais dos mesmos. Isso ocorre porque essas diferenças geram distintos graus de afinidade com as fases móvel e estacionária, promovendo velocidades de migração diferentes e assim, permitindo separação cromatográfica (MEYER, 2004).

A CLAE é uma técnica amplamente utilizada em diversos segmentos da indústria por se tratar de uma ferramenta eficiente na separação e detecção de diferentes substâncias, mesmo em pequenas concentrações (COLLINS, BRAGA E BONATO, 1997). Na indústria farmacêutica é extremamente necessária às análises de controle de qualidade desde a matéria-prima até o produto final. Nos setores de controle ambiental, a CLAE é utilizada, por exemplo para análise e monitoramento de pesticidas e demais contaminantes em águas e solo. Na indústria alimentícia tem se mostrado bastante eficaz na determinação de toxinas e quantificação de nutrientes mesmo na presença de aditivos (TONHI et al., 2002; LOURENÇO, 2005). Atualmente, a CLAE tem se

mostrado eficiente na detecção de compostos bioativos em matrizes alimentícias, como os compostos fenólicos e carotenoides. Para a eficiência da separação, muitos métodos tem sido propostos, adotando-se diferentes fases móveis e gradientes de eluição, variando de uma matriz para outra.

Os constituintes funcionais de oito diferentes genótipos de *goji berries* foram estudados por Zhang et al (2016). Foram investigados os compostos fenólicos presentes nos frutos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD) utilizando-se duas fases móveis (Fase A: ácido fórmico 0,1%; Fase B: metanol) para o gradiente de eluição. Os compostos fenólicos foram extraídos com solução metanólica 80% e dimetilsulfóxido (DMSO) por 24 horas, sob agitação. A atividade antioxidante total dos diferentes genótipos dos frutos foi também avaliada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. O método cromatográfico para determinação dos compostos fenólicos mostrou-se eficiente na identificação de diferentes substâncias tais como flavonoides (quercetina, miricetina, kaempferol e rutina) e ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico e ácido clorogênico). As amostras também apresentaram elevada atividade antioxidante, sugerindo que os frutos representam boas fontes naturais de antioxidantes para nutrição humana.

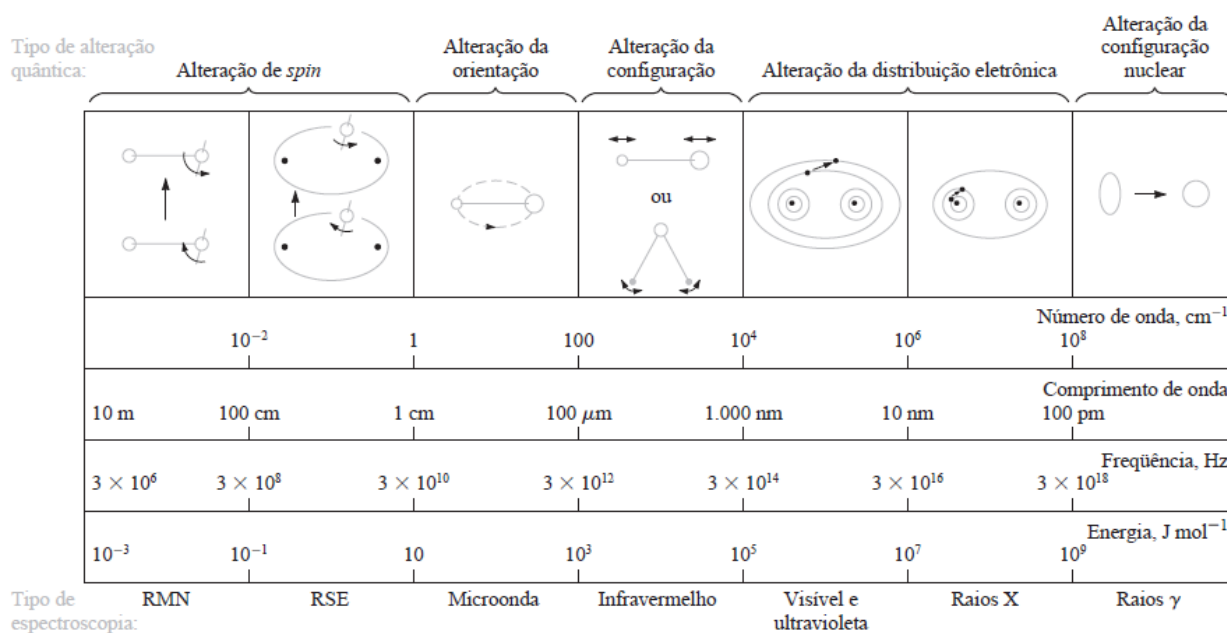
Batista e colaboradores (2016) investigaram o perfil de compostos fenólicos, e atividades antioxidante e antimutagênica de extrato do fruto copaíba (*Copaifera langsdorffii*). O perfil de compostos fenólicos foi investigado utilizando-se CLAE com detectores de arranjo diodo e fluorescência. O ácido fenólico encontrado em maior concentração no extrato de copaíba foi o ácido gálico. Além desse composto, foram identificados em concentrações consideráveis os ácidos o-cumárico e benzoico além de flavonoides como epicatequina galato, quercetina e isoquercetina. Em menores concentrações foram identificadas também procianidinas B1 e B2. O extrato de copaíba apresentou elevada atividade antioxidante, avaliada pelos métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC. Apesar disso, pelos resultados obtidos no estudo *in vivo*, não foi capaz de induzir efeitos mutagênicos ou antimutagênicos em camundongos.

Jorjong, Butkhup & Samappito (2015) avaliaram as diferenças no perfil de compostos fenólicos e atividade antioxidante de 14 cultivares de Mao-Luang (*Antidesma bunius*), um fruto produzido no nordeste da Tailândia. A atividade antioxidante foi investigada pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP. Para avaliação do perfil fenólico utilizou-se CLAE-DAD com duas fases móveis (Fase A: acetonitrila; Fase B: ácido fosfórico em água deionizada, pH 2,58). Os

resultados desse estudo revelaram diferenças significativas no perfil fenólico e atividade antioxidante entre os cultivares, mostrando a influência desse fator no potencial antioxidante das amostras. Ácido gálico, epicatequina e catequina foram os compostos fenólicos encontrados em maior concentração em todos os cultivares avaliados. Estudos de análise de correlação revelaram que ácido gálico, ácido ferúlico e algumas antocianinas são os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante dos frutos estudados.

### 2.3.5 Espectroscopia do Infravermelho

A espectroscopia é o estudo da interação da luz com a matéria. A luz é composta pelas ondas elétrica e magnética que estão em planos perpendiculares entre si. É a parte elétrica da luz, chamada de vetor elétrico, que interage com as moléculas da matéria (SMITH, 1996). A radiação eletromagnética cobre uma ampla faixa de comprimento de onda, desde ondas de rádio que são de baixa energia até raios- $\gamma$  de elevada energia, tal como ilustrado na figura 2.



**Figura 2:** As regiões do espectro eletromagnético e alterações quânticas resultantes da interação de um analito com a radiação eletromagnética. O número de onda, comprimento de onda, frequência e energia são características que descrevem a radiação eletromagnética. *Fonte: Fundamentos da Química Analítica. Skoog, 8ª Edição.*

A radiação infravermelha corresponde aproximadamente à parte do espectro eletromagnético situada entre regiões do visível e das microondas. Sua maior utilização para compostos orgânicos está situada entre 4.000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  e corresponde ao infravermelho médio (KAROUI, DOWNEY E BLECKER, 2010). A radiação infravermelha geralmente não é suficientemente energética para causar transições eletrônicas, porém pode induzir transições nos estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental da molécula (SKOOG, 2008). Dessa maneira, a identificação de componentes por espectroscopia no infravermelho é baseada na propriedade das moléculas de absorver luz na região do infravermelho e realizar uma grande variedade de movimentos vibracionais característicos de sua composição (OLIVEIRA et al., 2014).

Cada grupo funcional ou vínculo específico entre os átomos de uma molécula apresenta uma única frequência vibracional. Essa frequência pode ser utilizada para determinar quais grupos funcionais estão presentes em uma amostra. Quando os efeitos de todos os diferentes grupos funcionais são tomados em conjunto, o resultado é uma única "impressão digital" (*fingerprint*) molecular que pode ser usada para confirmar a identidade de uma amostra (FRANÇA E OLIVEIRA, 2010).

Data-se da Segunda Guerra Mundial uma das primeiras aplicações da espectroscopia no infravermelho. Nesse período, já se sabia que os espectros armazenavam uma grande quantidade de informações sobre a amostra e apresentavam um elevado potencial de utilização (COSTA FILHO; POPPI, 2002). Como técnica de análise quantitativa para o controle de alimentos e produtos industrializados, a espectroscopia no infravermelho obteve crescimento com o advento da Transformada de Fourier (FT-IR) e a utilização do interferômetro de Michelson, que tornou o método mais rápido e robusto (SALIBA et al., 2003). A utilização do interferômetro na técnica FT-IR permite que todas as frequências sejam medidas simultaneamente. Este prevê uma seleção e quantificação muito rápida de componentes, com elevada taxa de transferência de amostras (LUYKX E VAN RUTH, 2008). O interferograma resultante é então submetido à transformada de Fourier, a fim de ser transformado em um espectro.

A espectroscopia no infravermelho é amplamente utilizada para análise de parede celular vegetal (KAČURÁKOVÁ et al., 2000). Celulose e pectina são os polissacarídeos mais extensivamente estudados. Robert e colaboradores (2005) investigaram a presença de diferentes polissacarídeos na parede celular de endosperma de trigo por meio de FT-IR. Os autores

utilizaram um conjunto de diferentes polissacarídeos, os quais apresentavam diferentes níveis de substituição e xilooligossacarídeos mono ou dissubstituídos com resíduos de arabinose. A análise de componentes principais dos espectros obtidos por FT-IR sugeriram que é possível avaliar as proporções relativas dos polímeros e grau de substituição de arabinoxilanas em misturas complexas como na parede celular de grãos de cereais.

Szymanska-Chargot et al (2015) determinaram quali e quantitativamente a composição de parede celular de maçãs durante o seu amadurecimento por meio de FT-IR. Os dados comprovaram que a FT-IR acoplada aos métodos quimiométricos foram eficazes para a determinação rápida e confiável dos principais componentes da parede celular de frutas.

## **2.4 Carboidratos em plantas**

Os carboidratos, quando em sua forma básica, exibem fórmula química geral  $C_n(H_2O)_n$ . São os compostos orgânicos mais abundantes no planeta, sendo constituintes primários de plantas e exoesqueletos de crustáceos e insetos (HUI, 2006)

Carboidratos são componentes essenciais dos organismos vivos. Nos vegetais podem ser encontrados como monossacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados. Representam um importante grupo de metabólitos de vegetais, correspondendo aos principais constituintes químicos, depois da água (NASCIMENTO, 2012). Podem desempenhar funções estruturais ou de reserva. Os primeiros são responsáveis pela formação da parede celular e de outras estruturas na planta. São considerados os compostos mais abundantes da Terra. Os carboidratos de reserva incluem monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos e seus derivados, dentre os quais podem ser citados o amido, sacarose, frutanas, galactomananas e outros.

A parede celular vegetal consiste em um envoltório presente em todas as células de vegetais superiores e desempenha inúmeras funções na planta. Algumas das funções incluem a determinação da forma das células vegetais, textura do tecido e morfologia do vegetal, pela força mecânica e rigidez que apresenta além de desempenharem importante papel de proteção contra ataques de patógenos e predadores (NASCIMENTO, 2012)

A parede celular é composta por diferentes tipos de macromoléculas: celulose, hemicelulose, as pectinas e as proteínas, apresentando um complexo grau de estruturação, além de ser um compartimento dinâmico que passa por mudanças ao longo da vida da célula.

A celulose é o polissacarídeo estrutural mais abundante nos vegetais. Constitui-se de cadeias de unidades de glicose, ligadas covalentemente pelo oxigênio entre o carbono número 1 de uma glicose e o carbono número 4 da glicose adjacente por meio de ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), gerando um polímero linear não ramificado. Este arranjo molecular rígido confere a este polímero alta insolubilidade em água e uma elevada resistência às forças de tração. A interação entre cadeias de celulose leva à formação das microfibrilas. Os espaços arranjados menos regularmente nas microfibrilas e entre as camadas de microfibrilas são preenchidos por substâncias hidrofílicas (hemiceluloses, pectinas e proteínas) da matriz da parede celular, formando uma rede tridimensional hidrofílica. Tal estrutura torna-se responsável pela permeabilidade da parede celular favorecendo a troca de nutrientes, catabólitos e sinais químicos entre as células e o meio extracelular (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2005).

As hemiceluloses são polímeros de pentoses extremamente heterogêneos. São polissacarídeos ramificados cujo eixo consiste em um açúcar como a glicose, e as cadeias laterais de outros açúcares, como a xilose (xiloglicanos).

As pectinas correspondem a uma classe heterogênea de polissacarídeos carregados negativamente, contendo ácido galacturônico sendo ricas em ramnose, arabinose e galactose. São polissacarídeos complexos, altamente ramificados e hidrófilos. Compreendem três classes de polímeros: homogalacturonanas, ramnogalacturonas do tipo I (RG I) e ramnogalacturonanas do tipo II (RG II). Arabinanas, galactanas e arabinogalactanas são frequentemente encontradas em frações pécticas como cadeias laterais das RG I. As pectinas têm a capacidade de reter água, formando gel hidratado que preenche os espaços entre os elementos fibrosos. Também, por terem consistência gelatinosa, apresentam diversas utilidades comerciais (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2005).

## 2.5 Fibras Alimentares (FA)

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica composta especialmente por polissacarídeos de elevado peso molecular. Polissacarídeos como celulose, hemicelulose e pectina são componentes das FA originados da parede celular primária e da lamela média. Por outro lado, as FA podem constituir-se também de componentes não-polissacarídeos originados da parede celular secundária, como lignina, cutina e suberina (ELLEUCH et al., 2011; CHYLÍNSKA et al., 2016). De forma geral, o conceito de FA inclui algumas substâncias presentes em vegetais e que resistem à ações enzimáticas no trato digestivo humano, sendo suas principais fontes os componentes da parede celular e componentes não estruturais (gomas e mucilagens) (JANUZZI, 2007; ELLEUCH et al., 2011).

Dado o potencial benéfico à saúde, quando consumidas de forma adequada, algumas fibras alimentares podem ser classificadas como alimento funcional. De acordo com a RDC 18/1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimento funcional é aquele que, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, pode produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. As alegações de funcionalidade de fibras alimentares aceitas pela ANVISA incluem a betaglucana com efeito na redução da absorção de colesterol; a dextrina resistente, lactulose e goma guar que auxiliam no funcionamento do intestino; frutooligosacarídeos e inulina que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal; psyllium que auxilia na redução da absorção de gordura; e a quitosana que auxilia na redução da absorção de gordura e colesterol.

Diversos estudos tem revelado efeitos benéficos de fibras alimentares extraídas de substratos vegetais. Haska e colaboradores (2011) avaliaram o efeito da adição de subprodutos do processamento do trigo ricos em FA em dietas de ratos e constataram o aumento na formação de ácidos carboxílicos de cadeia longa no intestino deste animais, que contribuem para a redução do pH, podendo ter efeitos benéficos, tais como a redução do crescimento de bactérias patogênicas e o aumento da absorção de minerais. Além disso, as FA apresentaram efeito prebiótico, com o crescimento de bactérias benéficas ao organismo.

O efeito das fibras alimentares de cacau no funcionamento do intestino foi avaliado por Sarriá e colaboradores (2012). O estudo foi realizado com 44 indivíduos (homens e mulheres)

saudáveis, entre 18 e 55 anos de idade. Os resultados mostraram que a suplementação com alimento rico em fibras de cacau, durante 4 semanas, não causou alterações no peso corporal; aumentou a frequência de evacuação e, conseqüentemente, reduziu a sensação de constipação, sem acarretar efeitos colaterais.

Ibrügger e colaboradores (2012) conduziram um estudo para avaliação do efeito da ingestão de fibras alimentares de linhaça na supressão de apetite e redução da ingestão de alimentos. Foram avaliados os efeitos das fibras de linhaça de duas maneiras distintas em dois grupos de jovens saudáveis: consumidas em tabletes (grupo 1 com 25 participantes) e consumidas adicionadas em bebida (grupo 2 com 20 participantes). Ambos os tratamentos provocaram nos jovens o aumento da sensação de saciedade com redução de ingestão energética na refeição posterior. Sendo assim, os autores concluíram que as fibras alimentares da linhaça podem auxiliar no controle do apetite. Esta informação torna-se importante no controle da obesidade.

As frutas correspondem a uma importante fonte de fibras alimentares na alimentação humana, além de conterem grandes quantidades de água, vitaminas e açúcares. Devido a isso, Chylińska et al (2016) previram o conteúdo de pectinas, celulose e hemiceluloses por análise de regressão de mínimos quadrados parciais com base nos espectros obtidos por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Os autores também analisaram a composição das fibras alimentares de frutas baseando-se nos espectros obtidos por FT-IR em combinação com análises quimiométricas (Análise de Componentes Principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA)). Os resultados obtidos demonstraram que a previsão do conteúdo das pectinas, celulose e hemicelulose de fibras alimentares de frutas com base em espectros de FT-IR e usando análise de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) é possível. Além disso, a análise dos espectros de infravermelho e o uso de PCA e HCA foi capaz de distinguir e classificar as diferentes frações de fibras analisadas, provando a viabilidade da utilização de espectroscopia de FT-IR para estudar a composição da parede celular de frutas.

Dado os efeitos benéficos das FA à saúde, o estudo de novas fontes desses compostos torna-se relevante para a complementação de uma dieta saudável. Dentre as fontes de fibras alimentares, os subprodutos agrícolas apresentam-se como boas alternativas uma vez que compreendem partes refugadas dos frutos, as quais são ricas nesses compostos.



### 2.5.1 Fibras alimentares e subprodutos agrícolas

Os subprodutos agrícolas são compostos por partes não comestíveis dos vegetais, tais como cascas, sementes e bagaços que são ricas fontes de fibras alimentares. Devido ao potencial nutricional e tecnológico das FA, diversos estudos tem sido realizados objetivando a produção e caracterização das mesmas.

Nsor-Atindana et al. (2012) avaliaram o efeito de fibras alimentares produzidas a partir de cascas de cacau na redução dos índices glicêmicos e colesterol sanguíneo. Foram preparadas fibras solúveis, insolúveis e total por meio de método enzimático. O efeito de cada fração de FA foi avaliado utilizando-se o modelo *in vitro* por simulação das condições gástricas e intestinais. Os resultados mostraram que ambas as frações de FA de casca de cacau apresentaram antioxidantes intrínsecos e que poderiam servir como fonte alternativa e de baixo custo de fibras alimentares funcionais. Os autores sugeriram a incorporação das fibras de casca de cacau como um ingrediente de baixa caloria para dietas ricas em FA, podendo auxiliar na redução de colesterol e no controle da glicose sanguínea.

As características químicas, físico-químicas, tecnológicas, antibacterianas e antioxidantes de fibras produzidas a partir de co-produtos de maracujá amarelo (polpa e semente ou albedo) foram determinadas com o objetivo de se avaliar seu potencial de utilização como ingrediente alimentar natural. As fibras de semente e polpa de maracujá (FSP) apresentaram maiores teores de proteína e gordura que as fibras de albedo de maracujá (FAM) enquanto que as últimas apresentaram maior teor de cinzas e fibras alimentares. O alto teor de lipídios na FSP pode ser um fator limitante na utilização como ingrediente alimentar. O conteúdo de fibra alimentar solúvel (FS) foi superior nas FAM. Esta grande quantidade de FS nas fibras de albedo indicaram um grande potencial como ingrediente alimentício, podendo atuar como agente espessante, gelificante e estabilizante (LÓPEZ-VARGAS *et al.*, 2013).

Zhang e Wang (2013) avaliaram as propriedades físico-químicas de fibras solúveis produzidas a partir de subprodutos de *Canna edulis*, pertencente ao gênero *Canna* (Cannaceae), largamente cultivada na América do Sul, Vietnã, Tailândia e China. As fibras solúveis foram preparadas por 6 métodos distintos, incluindo-se métodos químico, físico-químico, enzimático, físico-enzimático, químico-enzimático e físico-químico-enzimáticos. Os métodos avaliados tiveram impacto sobre a composição de açúcares simples, teor de íons metálicos, ligações

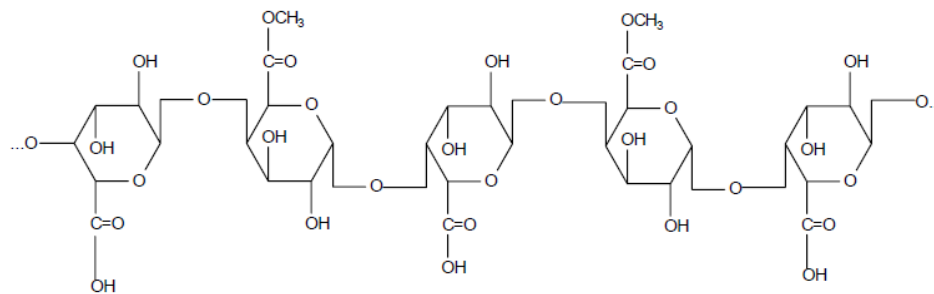
químicas e grupos na estrutura, propriedades térmicas e cor do produto final. O melhor tratamento para a produção das fibras foi o físico-enzimático, devido ao maior rendimento em fibras, segurança de consumo e homogeneidade além de boa estabilidade térmica. Os autores sugerem a utilização da fibra obtida como suplemento ou aditivo em alimentos.

Wang e colaboradores (2015) avaliaram os tratamentos de explosão em vapor (EV) e imersão em solução de ácido sulfúrico (IAS) para aumentar o rendimento e melhorar a funcionalidade de fibras solúveis a partir de cascas de laranja. Quando as cascas foram tratadas com EV a 0,8 Mpa por 7 minutos, combinado com 0,8% de IAS o conteúdo de fibras solúveis aumentou de 8,04% para 33,74% em comparação com o controle. As fibras tratadas apresentaram ainda maior solubilidade e capacidade de absorção de água, capacidade de absorção de óleo, volume de intumescimento e também boas propriedades como emulsificante e estabilizante. Além disso, a análise de calorimetria diferencial de varredura mostrou que as fibras tratadas apresentaram maior pico de temperatura. Por microscopia eletrônica de varredura observou-se uma maior rugosidade nas amostras tratadas. Dessa maneira, os autores concluíram que as fibras solúveis a partir de casca de laranja tratadas com EV e IAS apresentam um grande potencial de aplicação como ingrediente alimentício funcional em alimentos processados.

## **2.6 Componentes de Fibras Alimentares: Pectina**

As pectinas compreendem heteropolissacarídeos complexos que compõe os espaços intercelulares de paredes celulares primárias de células vegetais jovens onde exercem múltiplas funções (SHAKHMATOV et al., 2015). Dentre as principais funções das pectinas no tecido vegetal pode-se citar participação no crescimento, evolução e proteção da parede celular, e manutenção da turgescência da planta (SHAKHMATOV et al., 2015). De forma genérica, a pectina corresponde a um polissacarídeo com cerca de 150 a 500 unidades de ácidos galacturônicos parcialmente estereificados com grupos metoxílicos, unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ - 1,4 em uma longa cadeia molecular (Figura 3) (BOBBIO, 1989).

O principal componente das pectinas é o ácido galacturônico, sendo abundante nas paredes celulares de dicotiledôneas, gimnospermas e algumas monocotiledôneas. Estima-se que cerca de 90% dos ácidos urônicos da parede celular vegetal advém dos resíduos de ácidos galacturônicos dos polissacarídeos pécnicos (CAFFALL & MOHNEN, 2009).

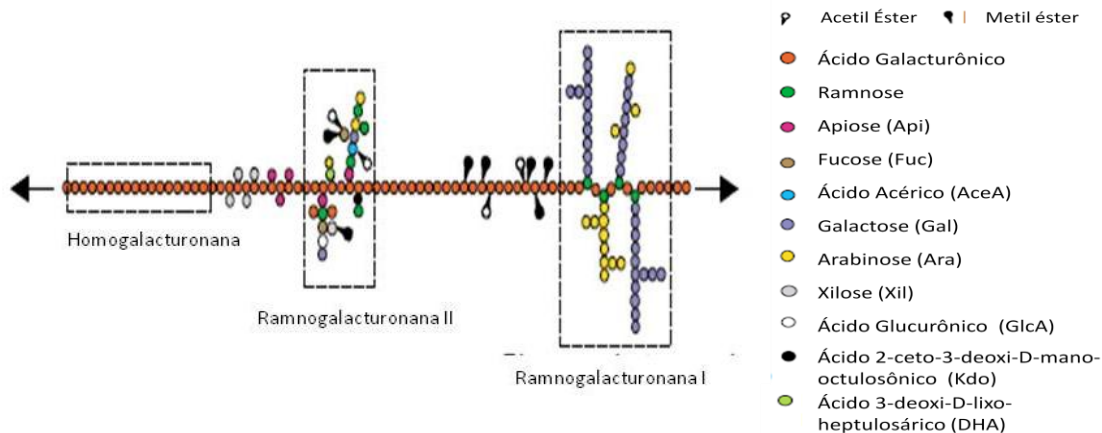


**Figura 3:** Estrutura geral da pectina.

*Fonte: Bobbio, 1989*

Os polissacarídeos pécnicos são ricos em ácidos galacturônicos, podendo estar presente em maior ou menor concentração dependendo da estrutura do polissacarídeo (WILLATS, 2006). As classes estruturais que compõe os polissacarídeos pécnicos incluem as homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I), que incluem as cadeias de arabinogalactanas e arabinanas, ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) e as xilogalacturonanas (XGA). A razão entre HG, XGA, RG-I e RG-II é variável, entretanto, como regra geral, as homogalacturonanas são os maiores constituintes estruturais na parede celular, correspondendo de 55 a 70% de todo conteúdo pécnico, seguido das RG-I (5%-48%), enquanto as XGA e RG-II são componentes minoritários, perfazendo um total de 10% (SHAKHMATOV, 2015).

As homogalacturonanas compreendem polímeros lineares de ácido D-galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, perfazendo mais de 60% das pectinas presentes nas paredes celulares vegetais (CAFFALL E MOHNEN, 2009; BONNIN et al., 2014). As ramnogalacturonanas do tipo I (RG I), por sua vez, possuem um esqueleto principal composto por unidades de L-ramnose unidas por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) e ácido D-galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) alternadas. Cerca de metade dos resíduos de ramnose da cadeia principal são substituídos em O-4 por cadeias laterais contendo D-galactoses e L-arabinofuranoses. As ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) possuem uma estrutura altamente complexa e carrega quatro diferentes cadeias laterais contendo 12 diferentes açúcares e derivados, incluindo alguns pouco comuns (WILLATS, 2006; CAFFALL E MOHNEN, 2009; BONNIN et al., 2014). As estruturas das frações que compõe a pectina são apresentadas na Figura 4.



**Figura 4:** Representação esquemática dos componentes estruturais da pectina.

Fonte: Willats, Knox e Mikkelsen, 2006. (Adaptado).

As pectinas exercem grande importância na indústria de alimentos, sendo um ingrediente alimentício de alto valor agregado, utilizado como agente gelificante e estabilizante em diversos produtos processados (SEIXAS et al., 2014). A pectina utilizada na indústria é comumente obtida de resíduos de maçã e frutas cítricas, sendo composta basicamente por polímero de ácido D-galacturônico ligado por ligações  $\alpha$ -1,4 com pequenas frações de ramnose (WROLSTAD, 2012).

Industrialmente as pectinas obtidas são de alto teor de metoxilação (ATM) e, a partir dessas, são produzidas pectinas de baixo teor de metoxilação (BTM). Esse processo é controlado e constitui-se de etapas ácidas, ou alcalinas de desmetoxilação, ou por reações enzimáticas (CHIM, et al., 2006). As pectinas de alto teor de metoxilação (> 50%) necessitam de um teor mínimo de açúcar, sólidos solúveis superior a 55%, e de meio ácido, pH 3,2 a 3,8, para a formação de gel, o qual é preparado aquecendo-se o meio a altas temperaturas e resfriando-se para que ocorra a geleificação.

### **2.6.1 Métodos de Extração de Pectina**

O início da produção de pectina data das primeiras décadas do século XX, desenvolvendo-se aos poucos na Europa e nos Estados Unidos, usando principalmente o bagaço de maçã. A primeira fábrica de pectina cítrica foi construída em 1926, na Califórnia (CANTERI et al., 2012).

A metodologia de extração de pectinas pode variar de acordo com a matéria-prima, entretanto, de maneira geral, compreende as etapas de extração do vegetal de origem em meio ácido, purificação do extrato e precipitação da pectina. Industrialmente, a extração ocorre em meio ácido diluído, sob aquecimento (CANTERI et al., 2012).

O processo de extração de pectina consiste em múltiplos estágios físicos e químicos, sendo que fatores como temperatura, pH, tempo de extração e tipo de ácido exercem influência nas etapas de hidrólise, extração de macromoléculas do tecido vegetal e sua solubilização (PAGAN, 2001; NAGHSHINEH et al., 2013).

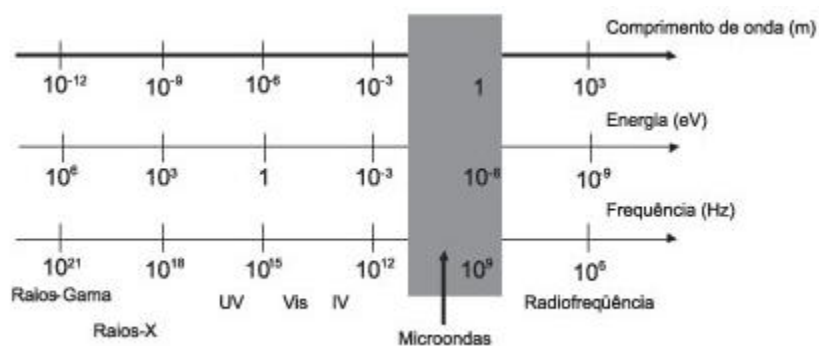
O método convencional de extração de pectina requer grande tempo de extração, o que aumenta o risco de degradação térmica de componentes termosensíveis. Em adição, a extração de pectina pelo método convencional pode exigir ácidos minerais fortes (ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, por exemplo) que reduzem a vida útil dos equipamentos além de causarem efeitos deletérios ao meio ambiente. Desta maneira, alternativas que reduzam o tempo de extração e, conseqüentemente, o consumo de solventes, tem sido investigadas (SEIXAS et al., 2014).

Como método alternativo à extração de pectinas, o uso de micro-ondas tem apresentado grande potencial. Isso porque no processo de irradiação por micro-ondas as reações são aceleradas, uma vez que a energia é dissipada diretamente para os componentes reacionais, resultando em temperaturas elevadas de forma instantânea (MOTASEMI E ANI, 2012). Além disso, podem ser citadas ainda como vantagens de utilização de micro-ondas na síntese de uma reação: redução de produtos indesejáveis; maiores taxas de aquecimento (aquecimento extremamente rápido); economia de energia; maior seletividade e rendimento; e a redução dos custos (SOUZA E MIRANDA, 2011).

## 2.6.2 Extração de pectina assistida por micro-ondas

O uso de micro-ondas para a extração de substâncias de matrizes vegetais tem demonstrado grande potencial e vem sendo avaliado em vários estudos (SEIXAS et al., 2014; MARAN et al., 2015; THIRUGNANASAMBANDHAM E SIVAKUMAR, 2015). As vantagens desse método de extração incluem menor tempo de extração e pequeno volume de solventes. O controle do aquecimento do sistema também torna a extração por micro-ondas atraente, especialmente quando a substância a ser extraída é um composto bioativo, sensível ao calor. Dessa maneira, o rápido aquecimento, por um tempo muito curto se torna necessário (CHUMNANPAISONT et al., 2014).

As micro-ondas compreendem as ondas eletromagnéticas com comprimento de onda variando entre 1 mm e 1 m. Essas ondas se situam entre as regiões do rádio e do infravermelho (LIDSTRÖM et al., 2001; CARVALHO, 2005) (Figura 5). A radiação de micro-ondas pode ser dividida em um componente do campo elétrico e uma componente de campo magnético. O último componente é responsável pelo aquecimento dielétrico, que é efetuado por meio de dois mecanismos principais: polarização dipolar; e condução iônica (LIDSTRÖM et al., 2001; SOUZA E MIRANDA, 2011).



**Figura 5:** Espectro Eletromagnético

Fonte: Geyde e Wei, 1998.

Uma das interações da componente campo elétrico com a matriz é chamada mecanismo de polarização dipolar. Para uma substância gerar aquecimento quando irradiada com micro-ondas é imprescindível um momento dipolo e uma molécula de água. Um dipolo é sensível a campos elétricos externos e tentará alinhar-se com o campo por rotação, gerando aquecimento. Quando o campo é removido as moléculas voltam ao estado desordenado e a energia que foi

absorvida para a orientação dos dipolos é dissipada na forma de calor. Uma vez que o campo elétrico é oscilante, os dipolos ou íons tendem a se realinhar ao campo elétrico e perdem energia novamente sob a forma de calor, isso ocorre, devido principalmente aos choques moleculares e perdas dielétricas (LIDSTRÖM et al., 2001).

Um estudo realizado por Seixas e colaboradores (2014), avaliou a extração de pectina assistida por micro-ondas de cascas de maracujá. Nesse estudo, foi utilizado forno de micro-ondas doméstico, variando-se a potência, tempo de extração e o tipo de solução ácida utilizada no processo. O maior rendimento obtido se deu a uma potência de 628 W e 9 min de extração (18,2%), utilizando-se ácido tartárico como agente extrator. Entretanto, a pectina obtida foi de baixa qualidade, apresentando baixo teor de metoxilação e baixa pureza.

Thirugnanasambandham e colaboradores (2014) realizaram extração de pectinas de cascas de pitaiá por aquecimento em micro-ondas doméstico e obtiveram rendimento máximo de 7,5%. Vale salientar que, em micro-ondas domésticos, não se pode controlar a variável temperatura, a qual se mostrou a mais relevante para o aumento do rendimento de extração.

Um estudo de Maran et al. (2015) avaliou os parâmetros ótimos para extração de pectina de casca de manga por aquecimento em micro-ondas. Foram avaliados potência das micro-ondas, pH da solução extratora, tempo de extração e proporção de amostra para solvente. Todos os parâmetros avaliados tiveram grande influência no teor de pectina extraída, sendo a condição ótima de extração a potência de 423 W, pH 2.7, tempo de extração de 134 segundos e razão sólido-líquido de 1:18 g/mL.

Na literatura, foi encontrado apenas um estudo avaliando a viabilidade de extração de pectinas da casca de pequi. Nesse estudo, Siqueira e colaboradores (2012) realizaram a extração de pectina pelo método convencional o qual requer elevado tempo de extração, o que aumenta o risco de degradação térmica de componentes termosensíveis (SEIXAS et al., 2014). Por essas razões, no presente estudo é proposta a extração de pectinas em pós rico em fibras a partir de casca de pequi por aquecimento em micro-ondas para avaliar a viabilidade do processo e as características das pectinas obtidas.

## 2.7 Fibras Alimentares com Potencial Antioxidante

As fibras alimentares e os antioxidantes são reconhecidos como dois fatores importantes para a redução de riscos de algumas doenças. As fibras alimentares (FA) estão intimamente relacionadas com a regulação intestinal e redução dos riscos de desenvolvimento de doenças cardíacas, hipertensão, diabetes e outras. Os antioxidantes, por outro lado, protegem contra danos oxidativos no DNA, proteínas e lipídeos, e podem ter um impacto positivo sobre a regulação da expressão gênica (SAURA-CALIXTO, 2011).

Existe atualmente uma vasta literatura sobre FA e antioxidantes, tratando-os separadamente, como compostos não relacionados, provavelmente devido às diferenças substanciais em suas estruturas físico-químicas, químicas e biológicas. Entretanto, no trato gastrointestinal, seguem um processo fisiológico comum e sinérgico. Assim, fibras com propriedades antioxidantes são definidas como um produto natural que combina os efeitos benéficos das FA e antioxidantes naturais como, por exemplo, os polifenóis (SAURA-CALIXTO, 2011). Desta maneira, este tipo de fibras pode ser indicado tanto para a redução de riscos de doenças cardiovasculares e do trato gastrointestinal como também sob a forma de aditivo alimentar, como maneira de evitar a oxidação lipídica (RUFINO et al., 2011).

Hassan et al. (2011) avaliaram a composição de fibras alimentares (FA) em pó produzidas a partir de cascas de manga (*Mangifera pajang K.*), bem como sua capacidade antioxidante. O composto em pó apresentou elevado teor de FA (72,3 g/100 g do composto em pó) e uma relação equilibrada entre fibras solúveis e insolúveis (46,3/53,7%). A capacidade antioxidante foi determinada pelo ensaio DPPH usando um leitor de Elisa, e o composto apresentou um forte potencial antioxidante devido à presença de polifenóis associados. Os pesquisadores concluíram que o produto em pó de cascas de manga é uma rica fonte de FA, antioxidantes e outros compostos bioativos, que podem ser incorporados em produtos alimentares para melhorar suas propriedades nutricionais.

Bhaskar et al. (2012) avaliaram a composição das fibras alimentares com efeito antioxidante de subprodutos da produção de banana (flor (FF) e pseudocaule (FP) de bananeira). Ambos os subprodutos apresentaram elevado teor de fibra alimentar (65,6% para FF e 28,8% para FP), e uma grande variedade de carboidratos, sendo os mais abundantes a hemicelulose e substâncias pécticas. As frações de hemicelulose apresentaram elevado teor de compostos



antioxidantes, sendo a FF com a maior concentração de compostos fenólicos. Para a determinação da natureza destes compostos, os autores isolaram as frações de hemicelulose das FF e identificaram por meio de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) a presença de ácidos fenólicos como ácido gálico, catecol, ácido protocatecuico, ácidos cafeico e ferúlico, ácido p-cumárico, entre outros.

Tseng e Zhao (2013) avaliaram o potencial antioxidante de fibras alimentares de bagaço de uva e sua utilização como estabilizante natural em iogurte e molho para salada. Além de atuar como estabilizante, as fibras também retardaram a oxidação lipídica dos produtos durante sua estocagem em geladeira. Os produtos adicionados das fibras apresentaram atividade antioxidante, embora esta tenha sido reduzida durante a estocagem, principalmente no iogurte. Um teste sensorial de aceitação também foi realizado com provadores treinados, sendo os produtos com maior aceitação o iogurte com 1% de adição de fibras, o molho para saladas tipo Italiano com 0,5% de adição e o molho Thousand Island para saladas com 1% de adição das fibras.

O potencial antioxidante de farinha esterilizada de batata yacon foi investigado por Sousa e colaboradores (2015). Os resultados revelaram uma elevada atividade antioxidante em extratos de farinha de yacon obtidos por ebulição em água deionizada durante 10 minutos. O extrato apresentou capacidade antioxidante de  $222 \pm 2$  mg (equivalente de ácido ascórbico) / 100 g DW e um teor total de polifenóis de  $275 \pm 3$  mg (equivalente de ácido gálico) / 100 g DW. Os resultados estão associados à presença de quatro compostos fenólicos principais: ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cumárico e ácido protocatecuico, bem como ao aminoácido triptofano. Dos compostos fenólicos identificados, o ácido clorogênico foi o mais abundante, seguido pelo ácido cafeico. Ensaio biológico indicaram que os extratos apresentaram de fato proteção antioxidante e não apresentaram atividade pró-oxidante. Os autores concluíram que a farinha esterilizada de batata yacon possui potencial de utilização na indústria de alimentos como ingrediente na produção de alimentos funcionais.

Um estudo realizado por Cândido, Silva e Agostini-Costa (2015) avaliou os componentes bioativos e capacidade antioxidante de buriti proveniente dos biomas Cerrado e Amazonas brasileiros. Os métodos utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante foram o ABTS, DPPH, FRAP e ORAC. Os buritis provenientes do cerrado apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante em todos os testes realizados. O perfil de

carotenoides foi confirmado pela presença de  $\beta$ -caroteno em ambas as regiões estudadas. Os autores constataram que a região de origem do fruto influenciou significativamente a capacidade antioxidante dos frutos analisados. Foi observada uma correlação positiva significativa entre o conteúdo total de compostos fenólicos e capacidade antioxidante através dos diferentes métodos aplicados. Os resultados mostraram uma promissora utilização do buriti como fonte de carotenoides e antioxidantes naturais.

Soquetta e colaboradores (2016) avaliaram as propriedades físico-químicas e microbiológicas, bem como os compostos bioativos de farinha feita com casca e bagaço de duas variedades de kiwi (*Actinidia deliciosa*) e dois estágios de maturação. A farinha desenvolvida com ambas as variedades apresentaram elevados teores de compostos bioativos e atividade antioxidante. As farinhas obtidas com os resíduos de kiwi podem ser uma fonte natural de antioxidantes e fibras alimentares possibilitando a redução de resíduos agro-alimentares. Segundo os autores, a farinha desenvolvida é um ingrediente promissor e que pode ser utilizado para enriquecimento de produtos com fibras alimentares e compostos bioativos.

## **2.8 Atividade antioxidante e compostos bioativos na casca de pequi**

O pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) possui antioxidantes naturais como compostos fenólicos e carotenoides. Diversos estudos tem avaliado e confirmado o potencial antioxidante das partes comestíveis do fruto como polpa e semente (LIMA, 2008; ROESLER et al., 2008; MACHADO et al., 2013). Apesar disso, existem na literatura poucos estudos que explorem o potencial da casca, seu principal subproduto, como fonte de compostos bioativos.

Em estudo anterior, Leão et al. (2017) avaliou a capacidade antioxidante das farinhas de casca de pequi (FP) pelos métodos DPPH e ABTS. Além disso, foi determinado o teor de compostos fenólicos pelo método Folin Ciocalteu. Os resultados encontrados revelaram um grande potencial das FP como fonte de antioxidantes naturais.

Monteiro et al (2015) avaliaram o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos de casca de pequi. Os resultados médios obtidos para teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante pelo método DPPH foram ligeiramente inferiores aos descritos por Leão et al. (2017). Essas diferenças podem decorrer dos distintos métodos de extração utilizados em cada estudo, bem como da origem dos frutos avaliados. Apesar das diferenças encontradas,

ambos os estudos confirmam um elevado potencial de utilização da casca de pequi como fonte de compostos bioativos, especialmente compostos fenólicos.

Os elevados teores de compostos bioativos, bem como capacidade antioxidante identificados na farinha de casca do pequi tornam relevante a continuação da pesquisa visando estabelecer o comportamento dessa matéria-prima frente a outros métodos analíticos. O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é utilizado para mensurar a capacidade antioxidante e apresenta um mecanismo de oxidação distinto dos já realizados para a avaliação da capacidade antioxidante de casca de pequi. Pode ser utilizado não somente em extratos de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo do potencial antioxidante de substâncias puras, com resultados semelhantes àqueles obtidos por metodologias mais complexas (EMBRAPA, 2006).

O pequi é o segundo fruto do cerrado com maior teor de carotenoides dentre os já estudados, ficando atrás apenas dos frutos do buriti (RODRIGUES-AMAYA et al., 2008). Dado ao elevado teor de carotenoides no fruto, o mesmo possui grandes quantidades de vitamina A, sendo este valor quase vinte vezes superior ao da cenoura e pupunha, e duas vezes superior ao do dendê (ALVES et al., 2008). Esses dados, juntamente com a elevada capacidade antioxidante detectada nas farinhas de cascas de pequi tornam relevante a averiguação do teor de carotenoides totais nos mesmos.

Além de antioxidantes, a farinha de casca de pequi também possui elevado teor de fibras alimentares (LEÃO et al., 2017). Saura-Calixto (2011) define fibras alimentares com propriedades antioxidantes como um produto natural que combina os efeitos benéficos das fibras alimentares e antioxidantes naturais como, por exemplo, os polifenóis. Podem ser usadas tanto para a redução do risco de doenças cardiovasculares e do trato gastrointestinal, como também sob a forma de aditivo alimentar em frutos do mar e produtos cárneos como forma de evitar a oxidação lipídica (RUFINO et al., 2011).

As fibras alimentares com capacidade antioxidante possuem presos à sua matriz antioxidantes que não podem ser mensurados por técnicas convencionais. A esses compostos dá-se o nome de “antioxidantes macromoleculares” ou “polifenóis não-extraíveis”. Uma vez que, em métodos de avaliação do potencial antioxidante, são mensurados apenas aqueles compostos presentes no extrato, a capacidade antioxidante do alimento pode ser subestimada, pois deixa-se de avaliar a contribuição dos compostos retidos no resíduo da extração (SAURA-CALIXTO, 2011)..

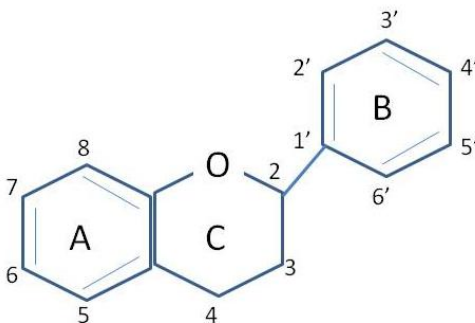
A determinação dos polifenóis não-extraíveis torna-se possível com o tratamento químico e/ou enzimático dos resíduos aquosos ou orgânicos dos extratos utilizados para determinação dos polifenóis extraíveis. Esse processo permite a liberação dos compostos fenólicos da matriz alimentícia antes da mensuração por métodos cromatográficos ou espectrofotométricos (ZURITA et al., 2012).

## 2.9 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos correspondem a estruturas originadas do metabolismo secundário das plantas. São essenciais para o crescimento e reprodução das mesmas e se formam sob condições de estresse como infecções, injúrias, e radiações UV (BARBULOVA, COLUCCI E APONE, 2015). As estruturas químicas dos compostos fenólicos apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante (ANGELO & JORGE, 2007). Como antioxidantes, os compostos fenólicos podem atuar por diferentes vias, seja pela eliminação de radicais livres, pela absorção de radicais de oxigênio ou como quelantes de íon metálicos (SOUTINHO, 2012).

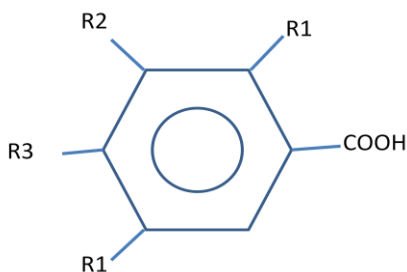
Existe uma vasta diversidade estrutural entre os compostos fenólicos, o que os divide em diferentes classes. Dentre as classes encontradas de compostos fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (PÉREZ-JIMENEZ & SAURA-CALIXTO, 2015).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides são os mais amplamente distribuídos na natureza. Neste grupo estão presentes os flavonois, as flavonas, as flavanonas, as antocianinas e os taninos. Os compostos desse grupo possuem em comum a estrutura  $C_6-C_3-C_6$ , com dois anéis fenólicos (A e B) e um anel pirânico (C) que os une (Figura 6). Os diferentes compostos dentro da classe dos flavonoides se originam por substituições nos anéis A e B (SOARES, 2002).



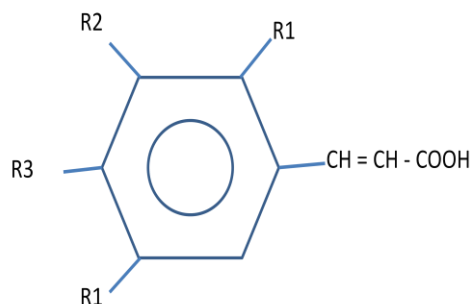
**Figura 6:** Estrutura geral dos flavonoides.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos alimentos (SOARES, 2002). Os ácidos fenólicos são comumente divididos em 3 grupos. O primeiro é composto pelos ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, os ácidos benzoicos, os quais possuem estrutura geral ( $C_6-C_1$ ) (Figura 7). Alguns exemplos desse grupo compreendem o ácido gálico ( $R_2=R_3=R_4=OH$ ) e o ácido p-hidróxibenzoico ( $R_3=OH$ ).



**Figura 7:** Estrutura química dos ácidos benzoicos.

O segundo grupo é formado por compostos de nove carbonos e estrutura ( $C_6-C_3$ ), os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 8) do qual são representantes os ácidos ( $R_1=OH$ ) o-, ( $R_2=OH$ ) m- e ( $R_3=OH$ ) p-cumárico, respectivamente. Por fim, o terceiro grupo é composto pelas cumarinas, que são derivadas do ácido cinâmico pela ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico.



**Figura 8:** Estrutura química geral dos ácidos cinâmicos.

Os compostos fenólicos encontram-se amplamente distribuídos em diferentes partes dos vegetais, incluindo cascas e sementes. Em face disso, o aproveitamento de partes não comestíveis de frutas e outros vegetais, além de ser uma estratégia relevante para minimizar os potenciais problemas ambientais causados pela disposição inadequada, representa uma alternativa para o melhor aproveitamento dos compostos bioativos presentes (AZEVEDO et al, 2015).

As farinhas de casca de pequi apresentam um elevado teor de compostos fenólicos em estando diretamente relacionado à elevada atividade antioxidante encontrada nas mesmas. Entretanto, torna-se agora necessária a investigação dos compostos fenólicos presentes nessas farinhas. Para isso, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodo conforme descrito no item 2.5 do Capítulo I.

## 2.10 Polifenóis não extraíveis (NEPA)

Os alimentos vegetais são amplas fontes de compostos bioativos que exercem atividade antioxidante, se consumidos de forma adequada na dieta. Esses compostos incluem vitaminas como a C e E, carotenoides, flavonoides e outros compostos fenólicos. A alta complexidade da composição dos antioxidantes em alimentos torna o estudo desses compostos isoladamente bastante dispendioso e pode resultar em valores limitados uma vez que não considera uma possível interação entre esses compostos e a matriz alimentícia (SERRANO, GONI E SAURA-CALIXTO, 2007).

Diversos estudos tem demonstrado apenas a capacidade antioxidante por extração de compostos polifenólicos com solventes químicos, como metanol, acetona e clorofórmio. Entretanto, alguns antioxidantes podem permanecer nos resíduos obtidos a partir dessa extração.

Observando-se também do ponto de vista fisiológico, os compostos antioxidantes devem estar disponíveis em uma certa quantidade nos tecidos alvo para exercer suas propriedades. Portanto, as propriedades biológicas desses compostos dependem de sua bioacessibilidade, isto é, de sua liberação da matriz alimentar durante o processo de digestão. Assim, os compostos antioxidantes podem diferir tanto quali como quantitativamente dos obtidos pela extração química utilizada na maioria dos estudos (PÉREZ-JIMENEZ, DÍAZ-RÚBIO, SAURA-CALIXTO, 2013) .

Dentre os compostos que permanecem no resíduo de extração, destacam-se os taninos condensáveis (flavonóides amplamente distribuídos no reino vegetal). Os taninos condensáveis ou proantocianidinas (PA) correspondem a um enorme grupo de polifenóis, sendo considerado por diversos autores como polifenóis não extraíveis (NEPA) (JIMENEZ, ARRANZ E SAURA-CALIXTO, 2009; PÉREZ-JIMENEZ, DÍAZ-RÚBIO, SAURA-CALIXTO, 2013). São oligômeros e polímeros de flavan-3-ol e flavan-3,4-diois, amplamente distribuídos no reino vegetal. Conferem propriedade de cor e adstringência nos alimentos e, além disso, estudos tem relacionado as propriedades desses compostos com a prevenção de doenças crônicas e desordens gastrointestinais (PÉREZ-JIMENEZ, ARRANZ E SAURA-CALIXTO, 2009).

O conhecimento do conteúdo de PA em alimentos e dietas é fundamental para esclarecer sua significância para a saúde humana. Grande parte dos dados sobre mensuração de PA referem-se à análise de CLAE de extratos aquosos e/ou orgânicos de alimentos. Entretanto, tal conteúdo refere-se à porção extraível de PA, uma vez que os extratos são em sua maioria obtidos com acetona, água ou ácido acético. É relevante salientar que as PA oligoméricas são altamente solúveis nesses solventes, por outro lado, a maior parte das PA de alto peso molecular e PA complexadas a proteínas ou paredes celulares polissacarídicas permanecem insolúveis (HUEMMER E SCHEREIER, 2008). Dessa maneira, essa fração não extraível de proantocianidinas (NEPA) pode não ser contabilizada pelas análises convencionais, subestimando a capacidade antioxidante do alimento.

As NEPA são responsáveis por uma grande parte das PA presentes em alimentos, com efeitos significativos na saúde. Podem chegar intactas ao cólon onde sofrem ruptura à metabólitos absorvíveis como por exemplo ácidos fenilacético, fenilpropiónico e fenilbutírico, tornando-se substratos fermentáveis para a microbiota intestinal. Podem também formar metabólitos não absorvíveis que permanecem no lúmen do cólon e lá são capazes de neutralizar os efeitos de pró-oxidantes dietéticos produzidos durante o metabolismo de bactérias no cólon,

bem como diferentes ácidos graxos de cadeia curta que trazem efeitos benéficos à saúde (GOÑI, MARTÍN E SAURA-CALIXTO, 2005; ACOSTA-ESTRADA, et al 2014).

A determinação de NEPA é possível com o tratamento químico e/ou enzimático dos resíduos aquosos ou orgânicos dos extratos utilizados para determinação dos polifenóis extraíveis. Esse processo permite a liberação dos polifenóis da matriz alimentícia antes das análises cromatográficas ou espectrofotométricas.

## 2.11 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais, solúveis em lipídios e possuem ação antioxidante. Esses pigmentos estão presentes em uma vasta variedade de vegetais. Nas plantas, apresentam função como pigmento do pós colheita que suplementa a habilidade da clorofila em capturar energia na forma de luz. Os carotenoides protegem a estrutura fotossintética pois atuam como um interceptor de radicais livres, prevenindo assim eventos oxidativos que podem causar danos irreversíveis à membrana celular e ao DNA vegetal (HANDBOOK OF FOOD SCIENCE, TECHNOLOGY, AND ENGINEERING, 2005; VON LINTIG E SIES, 2013)

A estrutura principal dos carotenoides é formada por uma cadeia de polieno de 40 carbonos derivada do isopreno. Um polieno é formado por ligações duplas conjugadas que permitem aos carotenoides liberar energia a partir de outras moléculas por meio de um mecanismo de transfereência de energia não radioativo. Essa característica pode ser responsável pelo comportamento antioxidante observado nos carotenoides (FENNEMA, 2007).

A ação antioxidante dos carotenoides deve-se à capacidade de capturar oxigênio singlete e radicais peroxila. São fontes naturais eficientes na inativação do oxigênio singlete, podendo atuar de duas maneiras diferentes: via física, a qual ocorre pela transferência de energia das moléculas de oxigênio singlete aos carotenoides e, via química constituindo apenas cerca de 0,5% da inativação de oxigênio singlete (LIMA, 2008).

A molécula de um carotenóide é formada pela união cauda-cabeça de oito unidades isoprenóides C<sub>5</sub> à exceção em sua posição central, onde essa junção ocorre no sentido cauda-cauda, resultando em uma molécula simétrica. O esqueleto dos carotenoides pode ser modificado de diferentes maneiras, como ciclização, hidrogenação, introdução de grupos contendo oxigênio,



rearranjos e outras combinações que permitem uma ampla variedade de estruturas para esses compostos (RODRIGUES-AMAYA et al., 2008).

Os carotenoides podem ser classificados em duas grandes classes, os carotenos e as xantofilas. Os carotenos contém apenas moléculas de carbono e hidrogênio em sua estrutura ( $\beta$ -caroteno, licopeno) enquanto as xantofilas possuem também o oxigênio (BRITTON, 1995; UENOJO, et al, 2007). Os grupos oxigenados substituíntes mais comuns são os grupos hidroxila (como da  $\beta$ -criptoxantina), ceto (como da cantaxantina), epóxido (como da violaxantina) e aldeído (como da  $\beta$ -citraurina). Quanto à conformação, os carotenoides classificam-se como acíclicos (licopeno), monocíclicos ( $\gamma$ -caroteno) ou bicíclicos ( $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno) (Figura 9) (RODRIGUES-AMAYA et al., 2008).

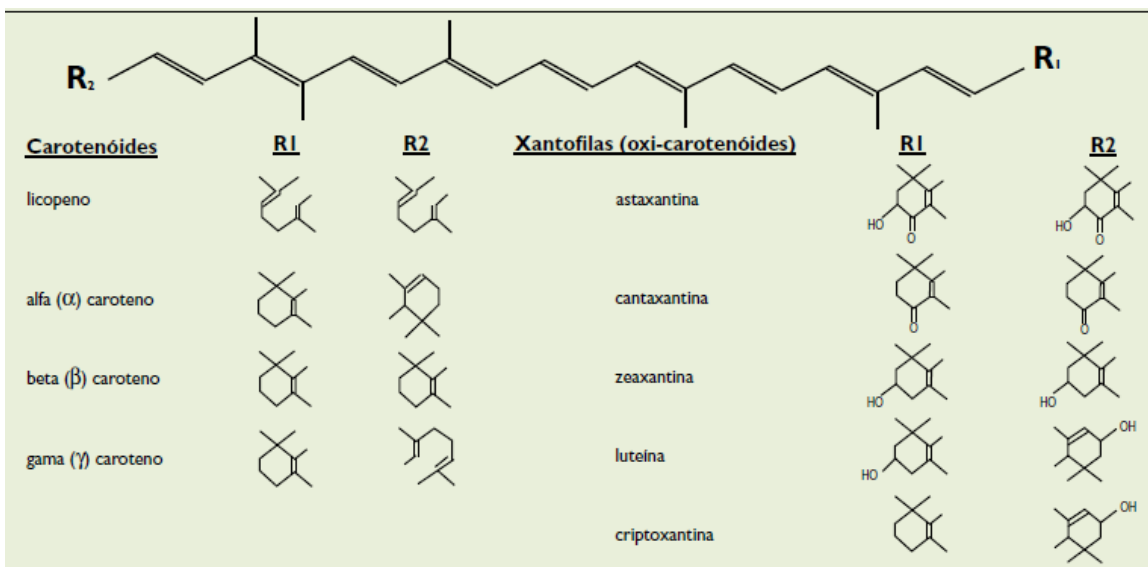


Figura 9: Estrutura geral de Carotenoides.

Fonte: Carotenoides. Metabolismo e doenças. Revista Aditivos e Ingredientes

Os carotenoides encontram-se principalmente nas partes aéreas das plantas como folhas, flores e frutos. Dentre os carotenoides, o  $\beta$ -caroteno é o mais comum nos alimentos. Esse composto tem ação conhecida na promoção da saúde, como por exemplo melhoria do sistema imune e redução do risco de doenças degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares (FENNEMA, 2007). O  $\beta$ -caroteno atua também como precursor da vitamina A, sendo essa uma de suas principais funções fisiológicas.

Uma vez que os seres humanos não tem a capacidade de síntese de carotenoides o consumo de frutas e legumes é importante, pois esses alimentos são fontes primárias desses compostos. Entretanto, muitas vezes a quantidade ingerida não é suficiente para suprir as necessidades diárias, sendo necessária a suplementação. Com a mudança nos hábitos de vida da população, os consumidores tem preferido ingredientes e aditivos naturais à moléculas sintéticas. Nesse contexto, os subprodutos de frutas e vegetais surgem como boas fontes desses compostos e vem sendo pesquisados como potenciais substratos para extração de diferentes compostos bioativos (FREITAS et al, 2015).

Barbulova e colaboradores (2015) apresentam uma extensa revisão sobre diferentes compostos bioativos extraídos de diferentes subprodutos agrícolas e evidenciam suas diversas aplicações na indústria de cosmético e alimentos. Dentre esses compostos, os carotenoides extraídos e isolados de subprodutos agrícolas como resíduos de tomate, abacaxi e uvas apresentam um elevado valor de mercado podendo ser adicionado em diferentes formulações cosméticas e nutracêuticas.

Um estudo realizado recentemente por Freitas e colaboradores (2015) avaliou o efeito da radiação UV nos compostos bioativos de subprodutos de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr.). A radiação ultravioleta é um método de sanitização seguro para diversos produtos de horticultura, especialmente por não deixar resíduos químicos de sanitizantes na superfície desses produtos, como pode ocorrer em processos de sanitização convencionais. Além disso, reduz a formação de águas residuárias contendo sanitizantes e assim contrinuindo para o meio ambiente. Por outro lado, a irradiação de ultravioleta pode levar a um estresse na superfície do vegetal, levando à formação de metabólitos secundários e, conseqüente à biossíntese de compostos bioativos. Os resultados obtidos apontaram um aumento no teor de vitamina C,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno nos subprodutos de abacaxi, demonstrando que uma dose de radiação UV de  $1,6 \text{ KJ m}^{-2}$  durante 3 minutos em cada lado da superfície do abacaxi foi eficiente para promover um aumento na síntese de metabólitos secundários bioativos na casca do fruto.

Nour e colaboradores (2015) utilizaram resíduos de tomate (sementes e cascas) para a elaboração de pães, suplementando a farinha de trigo em níveis que variaram de 6 a 10% (p/p) com os mesmos. Os pesquisadores avaliaram as características físico-químicas, de assamento e também sensoriais dos pães obtidos. A adição dos resíduos de tomate promoveram mudanças no

produto obtido como o aumento do conteúdo de umidade, acidez titulável e crocância. Os pães com adição de 6% de resíduos de tomate apresentaram boa aceitação diante dos consumidores.

Embora um grande número de pesquisas venha sendo desenvolvido a fim de se avaliar a presença de carotenoides em subprodutos agrícolas, relatos na literatura desses compostos em subprodutos do pequi são escassos. É sabido que que o fruto do pequi é uma rica fonte de carotenoides e outros compostos com capacidade antioxidante (AZEVEDO-MELEIRO E RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LIMA, 2007; ALVES et al, 2008) entretanto, apenas um estudo foi encontrado na literatura abordando a presença desses compostos na casca (MONTEIRO et al, 2015). Portanto, a avaliação da presença de carotenoides em farinhas de casca de pequi torna-se extremamente relevante, posto que a casca compreende seu maior subproduto.

## **Capítulo I: Produção das farinhas de casca de pequi e avaliação de compostos bioativos**



# 1 Introdução

A produção de farinhas de casca de frutos tem sido bastante estudada e citada na literatura científica. Isso porque, sob a forma de farinha, esses produtos podem ser mais facilmente incorporados à dieta, seja diretamente, ou como ingrediente em produtos processados. Além disso, o processamento desses resíduos sob a forma de farinhas promove a concentração de compostos bioativos bem como a redução de água livre no produto e, conseqüentemente, extensão de sua vida útil. Também ocorre redução da massa e volume, o que facilita a distribuição do mesmo (SOQUETA et al, 2016). O interesse no desenvolvimento desses produtos está atrelado ao fato de que, nas cascas, estão contidos elevados teores de compostos bioativos, como fibras alimentares e compostos com capacidade antioxidante que, se consumidos de maneira adequada, podem trazer benefícios à saúde.

A casca do pequi compreende seu principal subproduto. Em 2016, estima-se que a produção do fruto foi de aproximadamente 20.000 toneladas, um valor bastante expressivo tendo-se em vista que o pequi é um fruto nativo ainda não domesticado (TURINI,2016). Juntamente com a elevada produção são geradas grandes quantidades de resíduos. Alternativas para a valorização e utilização desses resíduos tornam-se, dessa maneira, relevantes uma vez que a casca de pequi possui elevado teor de fibras alimentares e compostos com capacidade antioxidante (LEÃO et al, 2017).

Neste capítulo são apresentadas as etapas relacionadas à produção das farinhas a partir da casca de pequi, bem como os resultados das análises de determinação de componentes bioativos. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de redução de íons ferro (FRAP). Também foram determinados os teores de carotenoides totais e polifenóis não extraíveis nas amostras estudadas. O perfil de compostos fenólicos foi avaliado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo diodo. Esta etapa foi conduzida no Departamento de Engenharia Mecânica da UFMG (DEMEC/UFMG), no Laboratório do Núcleo de Excelência em Aproveitamento de Resíduos Sólidos.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Processamento das farinhas de casca de pequi

Para o preparo das farinhas de casca de pequi foram utilizadas cascas de frutos da safra de 2013/2014. Os frutos foram adquiridos no CEASA-MG, sendo, em geral, provenientes da região de Paraopeba-MG. A quantidade de fruto adquirida foi de 20 quilogramas.

As etapas preliminares para a obtenção das farinhas consistiram em seleção e higienização dos frutos; separação das cascas e branqueamento em água a 90 °C/3 min/4 °C/3 min (Figura I1).

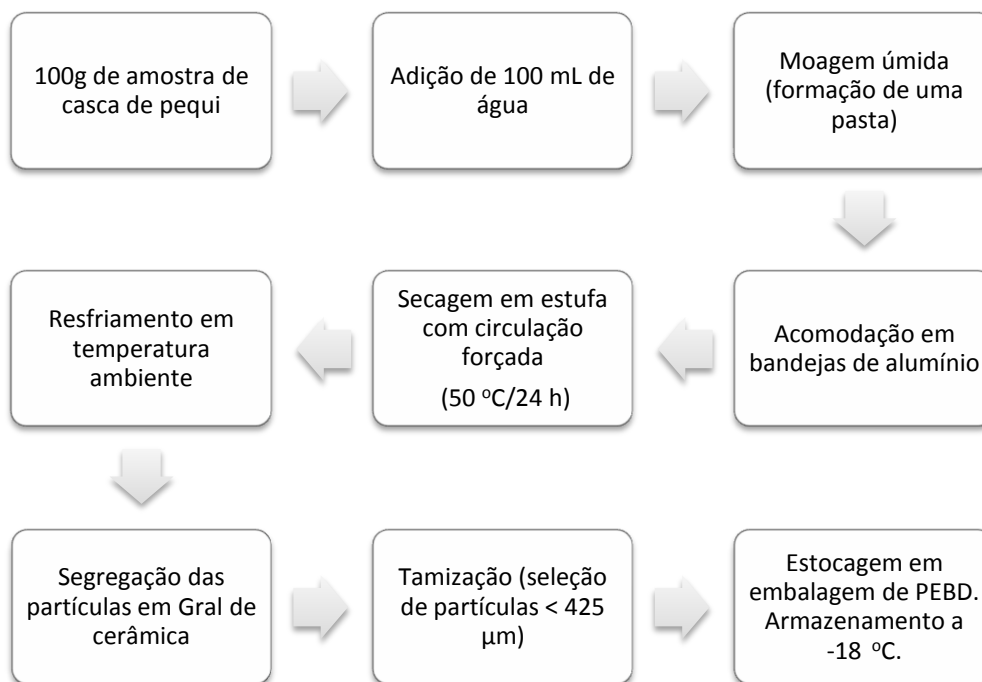


**Figura I1:** Higienização, corte, branqueamento e estoque as cascas de pequi.

Inicialmente os frutos foram lavados em água corrente e detergente neutro e em seguida sanitizados em solução aquosa com 15 ppm de hipoclorito de sódio por 15 minutos. Após o processo de limpeza, as cascas de pequi foram divididas em dois grupos: com exocarpo e sem exocarpo (exocarpo removido com auxílio de faca em aço inoxidável) com o objetivo de verificar diferenças no perfil de compostos bioativos. Os grupos foram designados como FP1 (mesocarpo com exocarpo submetidos ao processo de branqueamento) e FP2 (apenas o

mesocarpo submetido ao processo de branqueamento). As cascas foram cortadas com o auxílio de uma faca em aço inoxidável para obtenção de partes com tamanhos mais uniformes.

O processo de produção das farinhas de casca de pequi (FP) foi realizado segundo Leão (2013) e é apresentado na Figura I 2.



**Figura I 2:** Fluxograma de obtenção de farinhas de casca de pequi (FP).

Para as análises de espectroscopia no infravermelho e cromatografia a gás foram utilizadas também as frações solúveis e insolúveis digeridas enzimaticamente conforme descrito em Leão (2013). Brevemente, as farinhas obtidas conforme descrito na Figura I 2 foram digeridas com  $\alpha$ -amilase (100 °C/ 15 minutos) e, em seguida por pepsina e pancreatina, ambos a 40 °C por 1 hora. O produto da digestão foi filtrado para obtenção da fração insolúvel. O filtrado foi precipitado com álcool etílico para obtenção da fração solúvel. O precipitado foi então filtrado e as frações insolúvel e solúvel foram secas a 40 °C por aproximadamente 6 horas.

As amostras foram estocadas em embalagens plásticas lacradas e armazenadas a -18 °C até o momento da utilização.

## **2.2 Avaliação do Potencial de Redução de Íons Ferro pelo método FRAP**

Os extratos para verificação da capacidade antioxidante pelo método FRAP foram produzidos conforme descrito em trabalho de Leão (2013). Brevemente, as amostras preparadas foram pesadas (g) em tubos de centrífuga recobertos com papel alumínio e extraídos sequencialmente com 20 ml de solução de metanol (50:50, v/v) em temperatura ambiente por 1 hora. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos e o sobrenadante coletado. Ao resíduo oriundo da primeira extração, adicionou-se 20 ml de solução de acetona (70:30, v/v) e novamente extraiu-se por 1 hora à temperatura ambiente. Após a extração, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes da primeira e segunda extração combinados. O volume final foi ajustado com água destilada, completando-se 50 ml.

A capacidade antioxidante das amostras foi estimada pela análise de FRAP de acordo com método descrito na literatura (BENZIE E STRAIN, 1996) com algumas modificações. Em resumo, 2,7 ml de reagente FRAP (TPTZ,  $\text{FeCl}_3$  e tampão acetato) preparado no momento da análise foi adicionado a 90  $\mu\text{l}$  de diferentes diluições do extrato das amostras juntamente com 270  $\mu\text{l}$  de água destilada. O sistema foi mantido em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, foi determinada a absorbância a 595 nm. As amostras foram analisadas em triplicata. Para a determinação da curva padrão, diferentes concentrações de solução de sulfato ferroso (500  $\mu\text{M}$  – 2000  $\mu\text{M}$ ) foram utilizadas.

## **2.3 Determinação do Teor de Polifenóis Não Extraíveis (NEPA) por Espectrofotometria**

Utilizou-se como matéria-prima para o doseamento de taninos condensáveis os resíduos sólidos obtidos na preparação dos extratos (item 2.1). Inicialmente, os resíduos foram transferidos para cápsulas de porcelana e secos a 35 °C por cerca de 18h. Os resíduos secos foram tratados com 10 ml de solução HCl/Butanol (5:95, v/v) contendo 0,7g  $\text{FeCl}_3$ /l a 100 °C por 1 hora. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram recolhidos. Foram realizadas 2 lavagens nos resíduos com 5 ml da solução HCl/Butanol/ $\text{FeCl}_3$ , chegando a um volume final de 20 ml. O extrato foi diluído até concentração



de 100 mg/l e as absorvâncias obtidas a 450 nm e 555 nm foram somadas. As concentrações de taninos condensados nas amostras foram deduzidas pela soma das absorvâncias a 555 e 450 nm, plotadas contra a concentração de taninos condensados (0-100 mg/l) utilizados para a obtenção da curva padrão (ZURITA, et al., 2012).

## 2.4 Determinação do Teor de Carotenoides Totais

Para a determinação do conteúdo de carotenoides totais utilizou-se metodologia descrita por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Em tubo de ensaio coberto com papel alumínio, foi pesado 1 g da amostra e, em seguida, adicionados 19 mL de acetona P.A. A mistura resultante foi filtrada em ambiente sem iluminação. A leitura do sobrenadante foi feita em espectrofotômetro a 661 nm para clorofila A, 644 nm para clorofila B e 470 nm para o cálculo dos carotenoides. Para o branco utilizou-se acetona P.A. As análises foram realizadas em triplicata. O cálculo das concentrações de clorofila **a** (Ca), clorofila **b** (Cb) e carotenoides totais são dados, respectivamente, pelas equações abaixo.

$$(1) \text{ Ca } (\mu\text{g/ml}) = 11,24 A_{661} - 2,04 A_{644}$$

$$(2) \text{ Cb } (\mu\text{g/ml}) = 20,13 A_{644} - 4,19 A_{661}$$

$$(3) \text{ C}_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000 A_{470} - 1,90C_a - 63,14C_b)/214$$

## 2.5 Avaliação do Perfil de Compostos Fenólicos por CLAE-DAD

Para a análise cromatográfica foi utilizado cromatógrafo de fase líquida marca Shimadzu, modelo Prominence. Foi utilizada coluna de Kinetex C-18 de fase reversa com 4,6mm x 15cm e diâmetro de partícula de 2,6 um. As fases móveis utilizadas foram:

Fase A: água:acetonitrila:ácido fosfórico (92,6:7:0,4) (v/v)

Fase B: acetonitrila: ácido fosfórico (99,6: 0,4) (v/v)

O gradiente de eluição, foi definido no processo de otimização do método sendo baseado no trabalho de Cosenza (2015) e é apresentado na Tabela I 1.

**Tabela I 1:** Gradiente de fase móvel utilizado na corrida cromatográfica.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,1	99,0	1,0
8,0	97,0	3,0
12,0	92,0	8,0
15,0	90,0	10,0
20,0	85,0	15,0
25,0	60,0	40,0
30,0	20,0	80,0
35,0	5,0	95,0
42,0	99,0	1,0

Para a avaliação dos compostos fenólicos presentes nas amostras das farinhas de pequi foram preparados extratos de cada um dos grupos amostrais. Os extratos foram preparados em duas etapas. Inicialmente, 0,8 g de amostra de farinha de casca de pequi foram pesadas em tubos de centrífuga recobertos com papel alumínio e extraídos com 20 ml de solução metanólica (50% v/v) em Incubadora com Agitação Orbital Mod. Marco Q-250 a 200 rpm a 25 °C por 60 minutos. Após a extração os tubos foram centrifugados e o sobrenadante coletado. Ao resíduo da extração metanólica foi adicionado 20 ml de solução de acetona (70% v/v) e o processo de extração foi repetido. Após a segunda extração, os sobrenadantes foram combinados e concentrados a vácuo (máximo 60 °C) para a obtenção dos extratos secos.

Para a análise cromatográfica, 100 mg de cada extrato foram diluídos em 5 ml de metanol (grau cromatográfico) e filtrados em filtros de seringa de 0,22 µm. Em seguida, 400 µl do extrato diluído foram adicionados a 5 ml de água Milli-Q para a obtenção de extratos finais com concentração de 1600 µg/ml. Os extratos foram adicionados a vials de vidro com capacidade para 1.5 ml e injetados no equipamento.

Foram utilizados padrões de ácido gálico, ácido elágico, ácido ferúlico, galato de etila, ácido p-cumárico, ácido hidróxibenzoico, catequina, epicatequina, ácido procatequínico e ácido cafeico. Para a curva de calibração foram utilizados 8 pontos, variando-se a concentração de cada padrão entre 2,8 µg/ml a 70 µg/ml. A quantificação dos teores dos compostos fenólicos encontrados foi realizada utilizando-se as áreas dos picos de cada um dos compostos detectados nas amostras. As amostras foram analisadas em duplicata.

### 3. Resultados e Discussão

O método FRAP, que mede o poder antioxidante de redução do ferro é uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros. O método pode ser aplicado para estudos da atividade antioxidante em extratos de alimentos e bebidas, e, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias mais complexas (RUFINO et al., 2006).

Os resultados encontrados pelo método FRAP nas amostras de farinhas analisadas confirmam a elevada capacidade antioxidante obtida pelos métodos ABTS e DPPH por Leão et al. (2017). Os valores obtidos pela análise de FRAP estão apresentados na Tabela I 2. As amostras avaliadas neste estudo pelo método FRAP apresentaram capacidade antioxidante (FP1:  $3216,28 \pm 141,9$ ; FP2:  $3027,3 \pm 89,8$ ) muito superior a encontrada para outros frutos tropicais, como acerola ( $148 \pm 16 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ ), camu-camu ( $279 \pm 1,5 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ ) e jaboticaba ( $87,9 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ ) (RUFINO et al., 2010). Valores de mesma grandeza foram descritos por Moyer e colaboradores (2002) para diferentes variedades de mirtilo. Dentre as amostras analisadas, o genótipo *Vaccinium virgatum Aiton*, apresentou os melhores resultados ( $161,4 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ ).

Guo e colaboradores (2003) determinaram a atividade antioxidante de diversos frutos e suas frações de casca e sementes pelo método FRAP. Os resultados apontaram uma maior atividade antioxidante nas cascas dos frutos. Dentre as amostras analisadas, a casca de romã branca apresentou o maior potencial antioxidante ( $821,1 \pm 4,1 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ ). Este resultado, embora expressivo, é muito inferior aos descritos para as amostras de casca de pequi no presente estudo (FP1:  $3216,28 \pm 141,9 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ ; FP2:  $3027,2 \pm 89 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ ).

Diversas pesquisas tem focado no estudo das frações dos polifenóis extraíveis por solventes aquosos e/ou orgânicos. Entretanto, uma fração considerável dos polifenóis permanecem nos resíduos destas extrações. A esta fração, denomina-se polifenóis não extraíveis (PÉREZ-JIMENEZ, ARRANZ E SAURA-CALIXTO, 2009).

Grande parte destes polifenóis não extraíveis correspondem a proantocianidinas, que são taninos condensáveis associados com fibras alimentares e proteínas. A determinação destes compostos requerem tratamentos químicos e/ou enzimáticos dos resíduos aquosos e/ou

orgânicos para liberar os polifenóis da matriz alimentícia antes das análises espectrofotométricas (ZURITA et al., 2012).

Os processos de determinação do conteúdo de taninos condensáveis por leitura de absorbância a 555 nm, correspondem às soluções vermelhas de antocianinas produzidas por despolimerização das cadeias de interflavonas. Entretanto, a condensação direta entre flavonóis e antocianinas fornecem compostos amarelos com cromóforos xantilium também presentes na reação e estes absorvem a 450 nm (ZURITA et al., 2012). Desta maneira, conforme apresentado na Tabela I 2, os resultados obtidos são expressos pela soma das absorbâncias obtidas a 555 nm e 450 nm.

**Tabela I 2:** Atividade antioxidante medida pelo método FRAP, teor de carotenoides e taninos condensáveis em farinhas de casca de pequi.

<b>Amostras</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}</math>)</b>	<b>Polifenóis não extraíveis (mg/100g)</b>	<b>Carotenoides Totais (<math>\mu\text{g}/100\text{g}</math>)</b>
<b>FP1</b>	3216,3 $\pm$ 141,9 <sup>a</sup>	346,8 $\pm$ 87,0 <sup>a</sup>	3499,0 $\pm$ 28,9 <sup>a</sup>
<b>FP2</b>	3027,3 $\pm$ 89,8 <sup>a</sup>	215,5 $\pm$ 24,0 <sup>a</sup>	2116,5 $\pm$ 39,0 <sup>b</sup>

Médias seguidas de desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes, pelo método T de Student a 5% de significância. FP1 (farinha de exocarpo + mesocarpo de pequi); FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).

Os valores obtidos para polifenóis não extraíveis (NEPA) para os grupos de farinhas de casca de pequi foram superiores aos encontrados para pêra e maçã com casca (70 mg/100g; 55 mg/100g) (PÉREZ-JIMÉNEZ et al.,2009; ZURITA et al., 2012). O teor de taninos condensados, também foi superior aos descritos por Pérez-Jiménez et al. (2009) para uva branca (168 mg/100g) e morango (206 mg/100g). Em contrapartida, os valores obtidos no presente estudo foram inferiores aos encontrados para cramberry (520 mg/100g), grãos cozidos de feijão pinto (591 mg/100g) e banana (1751 mg/100g) (PÉREZ-JIMÉNEZ et al.,2009; ZURITA et al., 2012).

Os polifenóis não extraíveis, a exemplo dos taninos condensáveis, são compostos que após a ingestão, não são significativamente liberados da matriz alimentícia, resistindo à mastigação, acidez estomacal e também às enzimas digestivas. Desta maneira, chegam

praticamente intactos ao intestino, onde sofrem diversas modificações pela microbiota colônica (PÉREZ-JIMÉNEZ, et al., 2013).

Outro fato importante consiste na associação dos compostos não extraíveis à matriz de fibras alimentares, sendo considerados constituintes das mesmas. Pesquisas recentes tem enfatizado grande contribuição destes compostos às ações benéficas das fibras alimentares para a saúde humana (VIAGLIONE et al., 2008; SAURA-CALIXTO, 2011). Desta maneira, as farinhas de casca de pequi, apresentam-se com alto potencial de utilização, uma vez que além do elevado teor de compostos antioxidantes, em especial os compostos fenólicos, possuem alto teor de fibras alimentares.

O elevado teor de carotenoides na polpa de pequi já foi constatado e referenciado por diversos trabalhos na literatura (RAMOS, et al., 2001; AZEVEDO-MELEIRO et al., 2004; LIMA et al., 2007; ROESLER et al, 2008; ALVES et al., 2008), entretanto, não foram encontrados estudos referentes ao conteúdo de carotenoides totais na casca de pequi.

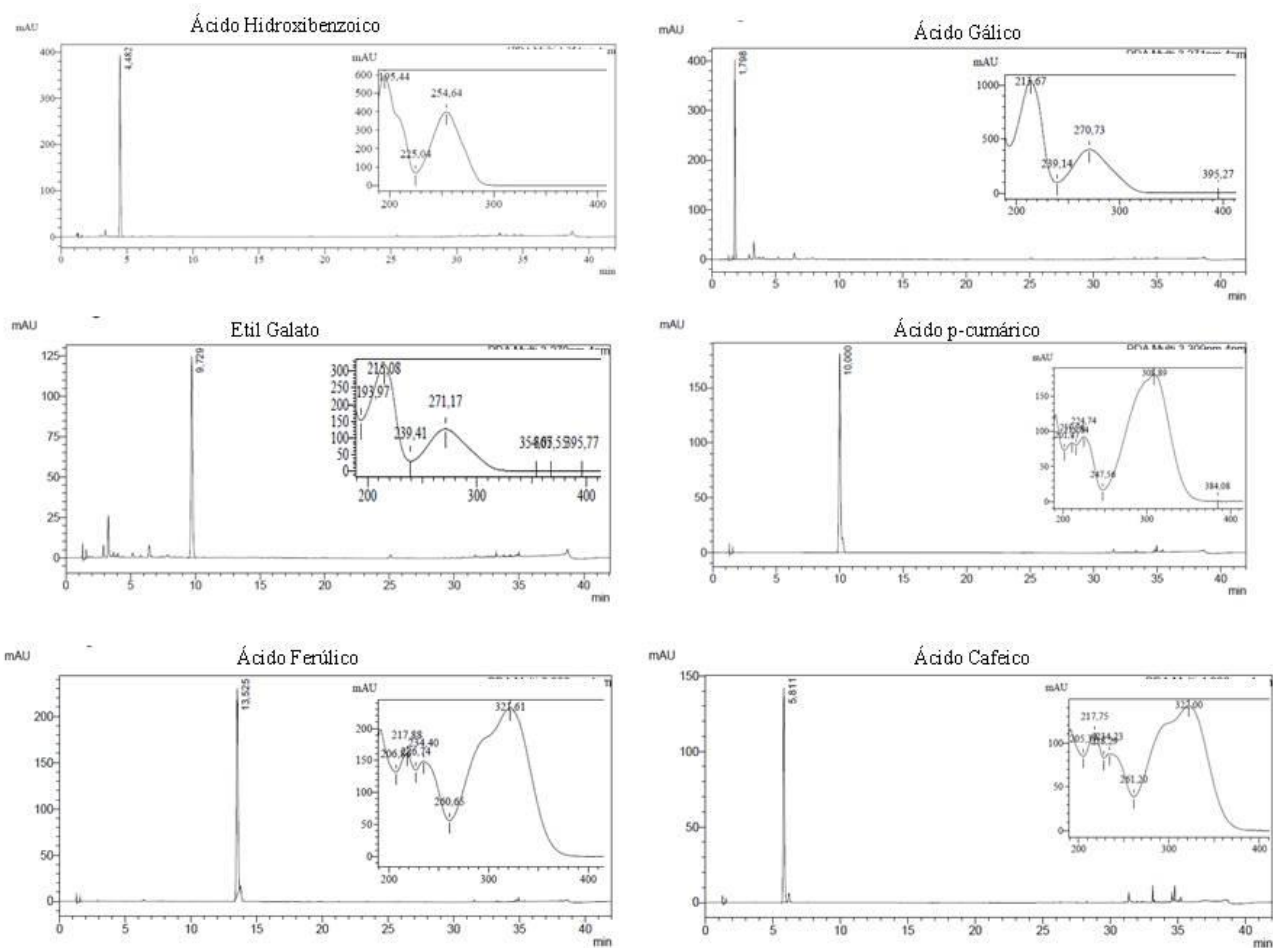
Os resultados encontrados no presente estudo para o teor de carotenoides são expressivamente elevados (Tabela I 2) , corroborando com os demais resultados elevados obtidos para a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS (LEÃO, 2013). As amostras com exocarpo (FP1-  $3499,03 \pm 28,9 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) apresentaram teores significativamente mais elevados que os encontrados para as amostras sem exocarpo (FP2- $2116,5 \pm 39 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ). Esse resultado nos permite inferir sobre um maior teor de carotenoides no exocarpo, devido à maior concentração de cloroplastos nessa parte do fruto, os quais armazenam clorofila e outros pigmentos fotossintetizantes. Os resultados corroboram com estudos descritos na literatura, nos quais frutos com casca apresentaram maior teor de carotenoides do que os frutos descascados (AGÓCS et al, 2007; CAMPBELL E PADILLA-ZAKOUR, 2013).

Lima et al (2007) avaliaram o teor de carotenoides em polpa de pequi e encontraram valores de  $7250 \mu\text{g}/100\text{g}$ . De acordo com os autores, dentre os frutos do cerrado o teor de carotenoides do pequi é superado apenas pela polpa de buriti, com  $16700 \mu\text{g}/100\text{g}$ . Como esperado, os teores de carotenoides encontrados no presente estudo para FP1 e FP2 foram inferiores aos descritos para a polpa.

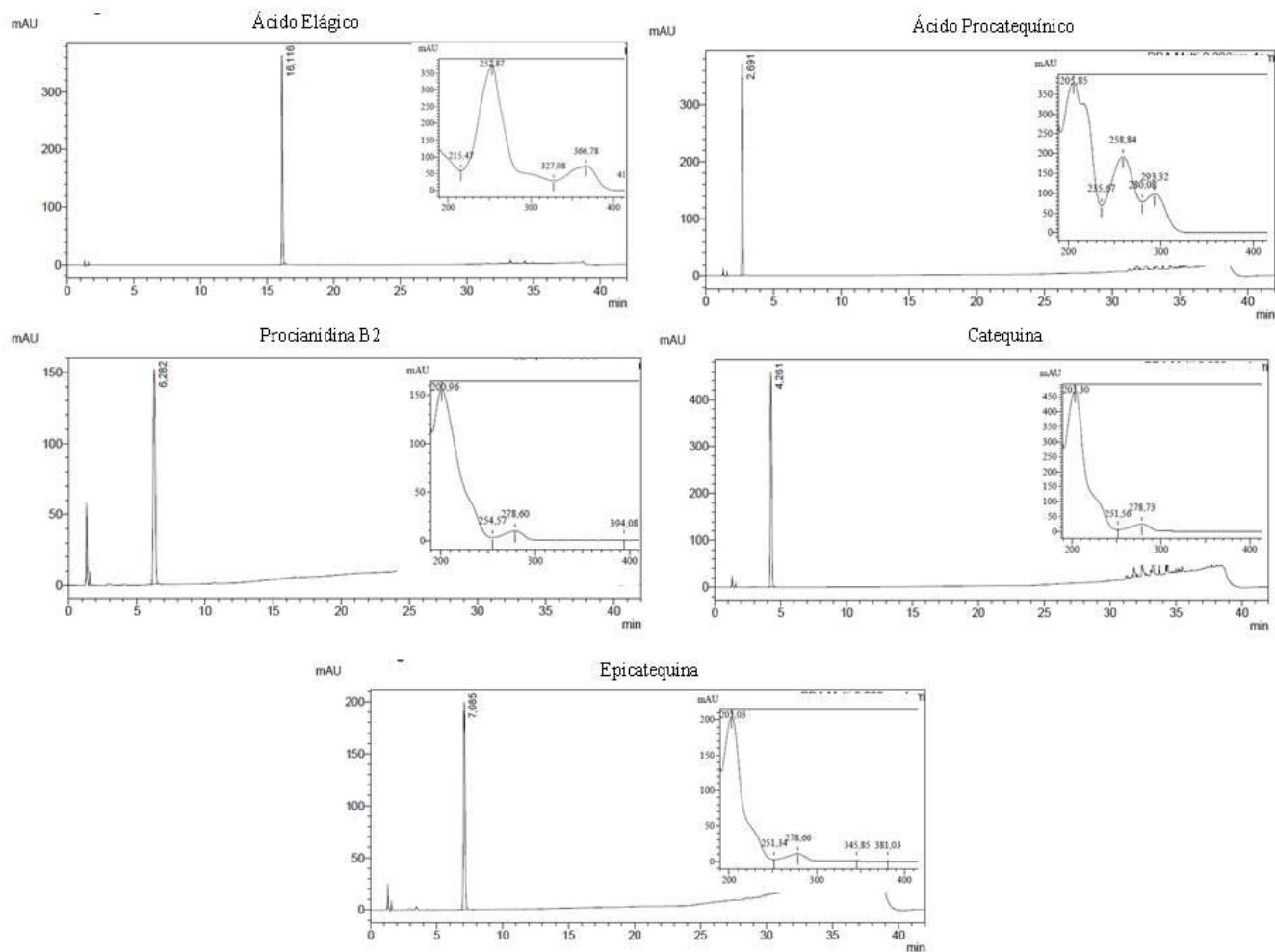
O teor de carotenoides totais obtidos para ambos os grupos amostrais (FP1 e FP2) foram superiores aos descritos por Azevêdo e colaboradores (2015) para resíduos liofilizados de camu-camu ( $1467,9 \pm 1,6 \mu\text{g}/100\text{g}$ ). Em contrapartida, os valores encontrados para FP1 e FP2 foram

inferiores aos descritos por Nóbrega et al. (2015) para resíduos do despulpamento de acerola submetidos a diferentes tratamentos de secagem (4520-5530  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ).

Para a avaliação do perfil de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foram investigados 11 padrões cromatográficos. O cromatograma de cada um desses padrões e seus respectivos espectros-UV são apresentados nas figuras I 3 e I 4.



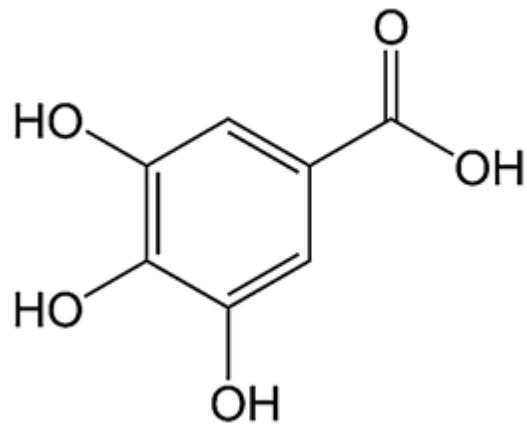
**Figura I 3:** Cromatogramas e espectros de UV obtidos por CLAE-DAD para os padrões de ácido hidroxibenzoico, ácido gálico, etil galato, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico.



**Figura I 4:** Cromatogramas e espectros de UV obtidos por CLAE-DAD para os padrões de ácido elágico, ácido procatequínico, procianidina B2, catequina e epicatequina.

Dentre os padrões avaliados pelo método, três foram identificados nas amostras de farinhas de casca de pequi, sendo eles o ácido gálico, ácido elágico e etil galato. Para a quantificação dos compostos identificados foram construídas curvas padrão com concentrações de padrão variando de 2,8 µg/ml a 70 µg/ml.

Os compostos fenólicos são derivados do metabolismo secundário de plantas. A maior parte desses compostos é derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas, que constituem a via do ácido chiquímico ou do acetato (BARBOSA, 2010). O ácido gálico (Figura I 5) corresponde a um derivado da via do ácido chiquímico que, por sua vez, é um intermediário do metabolismo secundário. O ácido gálico é um componente de taninos hidrolisáveis em plantas, os quais tem sido referenciados na literatura como importantes devido a sua seletiva citotoxicidade contra uma variedade de tumores celulares (BARBOSA, 2010).



**Figura I 5:** Estrutura química do ácido gálico.

*Fonte: Zeb (2015)*

Na Tabela I 3 são apresentadas as concentrações de ácido gálico, ácido elágico e etil galato obtidas pra as farinhas de casca de pequi e em outros frutos ou subprodutos vegetais listados na literatura.



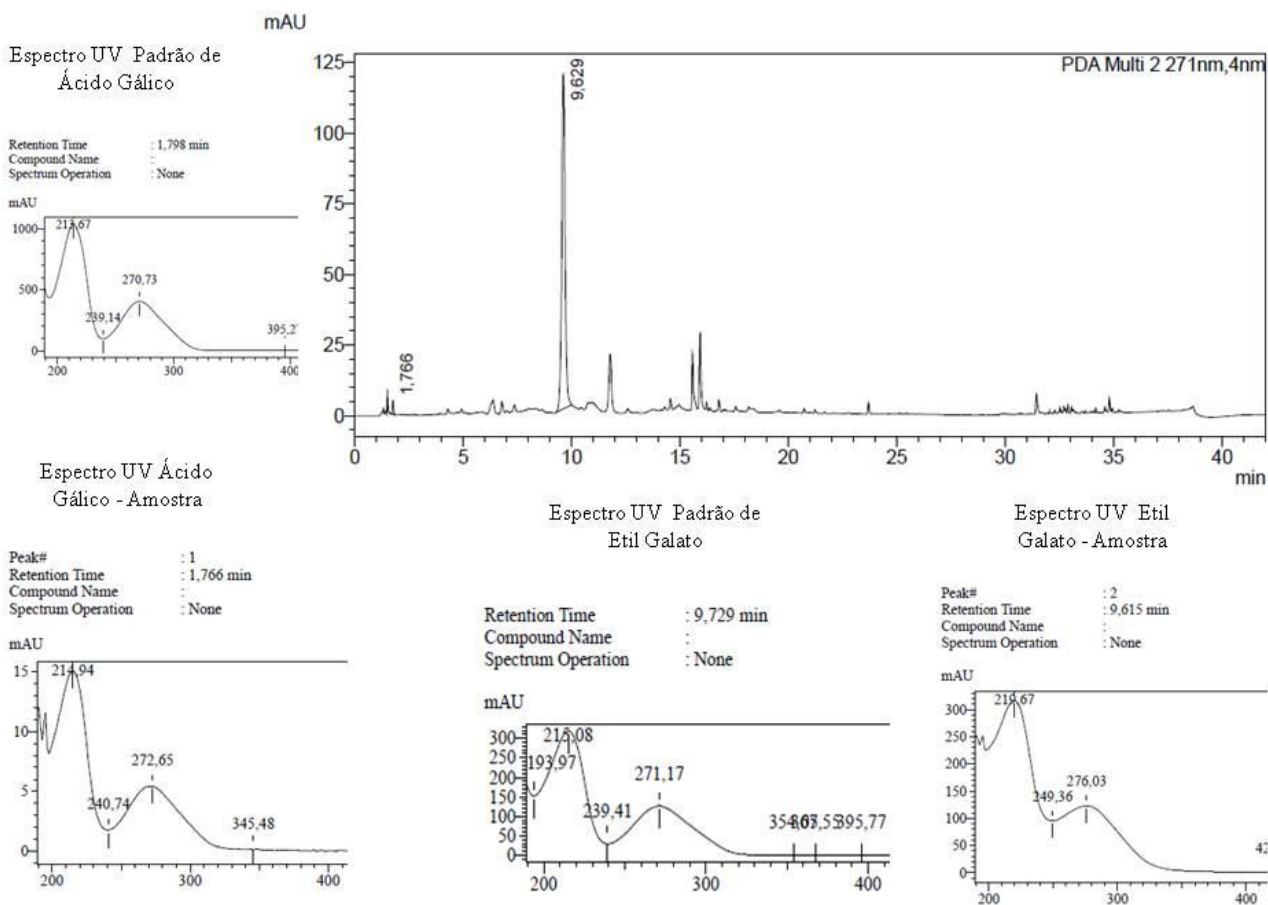
**Tabela I 3:** Teores de ácido gálico, ácido elágico e etil galato nas amostras de farinhas de casca de pequi e em frutos e subprodutos listados na literatura.

<b>Amostra</b>	<b>Ácido gálico (mg/100g)</b>	<b>Ácido Elágico (mg/100g)</b>	<b>Etil Galato (mg/100g)</b>	<b>Referência</b>
Polpa liofilizada de Pequiá ( <i>Caryocar villosum</i> )	18,24	10,4	-	Chisté & Mercadante (2016)
Polpa de pequi ( <i>Caryocar brasilienses</i> camb.) (amostra fresca).	0,956	3,22	-	Lima (2008)
Amêndoa de pequi ( <i>Caryocar brasilienses</i> camb.) (amostra fresca).	1,38	3,84	-	Lima (2008)
<b>FP1- Farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi (amostra seca)</b>	<b>44,53</b>	<b>1002,3</b>	<b>5205,9</b>	<b>Presente Estudo</b>
<b>FP2- Farinha de mesocarpo de pequi (amostra seca)</b>	<b>11,52</b>	<b>509,47</b>	<b>2874,6</b>	<b>Presente Estudo</b>
Taperebá ( <i>Spondias mombin</i> ) (amostra seca)	57,70	-	7,62	Bataglioni et al (2015)
Caju ( <i>Anacardium occidentale</i> ) (amostra seca)	14,85	-	4,25	Bataglioni et al (2015)
Polpa de Copaíba ( <i>Copaifera langsdorffii</i> )	195,00	-	-	Batista et al (2016)
Folhas de uva (amostra seca)	1,26	1,32	-	Zeb et al (2015)
Cascas liofilizadas de caju amarelo	39,84	48,68	-	Moo Huchin et al (2015)
Cascas liofilizadas de caju vermelho	33,64	95,64	-	Moo Huchin et al (2015)
Cascas liofilizadas de abiaba ( <i>Chrysophyllum cainito</i> )	229,49	121,8	-	Moo Huchin et al (2015)

De maneira geral, os compostos encontrados nas farinhas de casca de pequi apresentaram maiores teores nas amostras com exocarpo (FP1). Esse resultado é pertinente uma vez que os compostos fenólicos são metabólitos secundários com função de proteção nos frutos contra injúrias externas. Dessa maneira, há uma maior concentração desses compostos nas camadas mais externas das cascas de frutos. Esse comportamento corrobora com os dados obtidos por Leão et al (2017) para a análise de compostos fenólicos totais, na qual as amostras de FP1 apresentaram maior teor de compostos fenólicos que as amostras FP2.

Na figura I 6 é representado o cromatograma e espectros-UV de ácido gálico e etil galato encontrados nas amostras de farinhas de casca de pequi. O teor de ácido gálico encontrado nas amostras (FP1:  $44,53 \pm 0,003$ ; FP2:  $11,52 \pm 0,003$ ) foram superiores aos descritos por Lima (2008) para polpa e amêndoas frescas de pequi. Essa diferença pode ser devido à maior concentração desse composto nas camadas mais externas do fruto e, também, pelo fato de no presente estudo tratar-se de amostras de farinhas, cujo teor de umidade é bastante inferior ao das amostras *in natura*. O teor de ácido gálico nas amostras de farinha de casca de pequi também foram superiores aos descritos para folhas de uva (ZEB et al, 2015) e comparáveis aos encontrados para cascas liofilizadas de caju amarelo, e cascas liofilizadas de caju vermelho (MOO-HUCHIN et al, 2015). Por outro lado, os teores de ácido gálico encontrados no presente estudo para as farinhas de casca de pequi foram inferiores aos descritos para cascas liofilizadas de abiaba (MOO-HUCHIN et al, 2015), polpa de copaíba (BATISTA et al, 2016) e taperebá (BATAGLION et al, 2015).

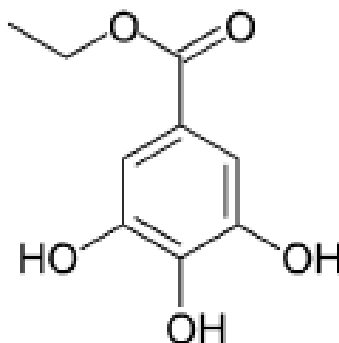
Estudos com ácido gálico tem revelado seu potencial anti-carcinogênico. Oliveira (2014) avaliou o efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma. Os resultados obtidos revelaram o potencial do ácido gálico na redução da proliferação de células cancerígenas. Kim (2007) apresentou dados que revelam duas funções do ácido gálico, como antimelanogênico e agente antioxidante, sugerindo esse composto como eficiente para a saúde da pele.



**Figura I 6:** Cromatograma e espectros-UV obtidos para as amostras de farinha de casca de pequi (TR:1,766 min – ácido gálico; TR: 9,615 min – etil galato).

O etil galato ou galato de etila (Figura I 7) pertence ao grupo dos taninos hidrolisáveis derivados do ácido gálico, ou galotaninos e corresponde a um éster derivado do ácido gálico. Os galotaninos são taninos hidrolizáveis compostos de um núcleo de glicose esterificados com resíduos de ácido gálico. O etil galato foi o composto em maior concentração encontrado nas farinhas de casca de pequi, com valores superiores aos descritos para outros frutos e subprodutos na literatura. Os galotaninos exercem efeitos benéficos sobre a saúde relacionados com os seus efeitos antioxidantes, anti-mutagénicos, propriedades anti-inflamatórias e anti-diabéticas (DORTA et al, 2014). O elevado teor encontrado pode ser devido à co-eluição de outros galotaninos com estruturas químicas semelhantes como metil e propil galato, resultando em uma maior concentração desses compostos. Um estudo realizado por Dorta et al (2014) com cascas de diferentes variedades de manga revelou quantidades de galotaninos superiores às descritas no

presente estudo. Foram detectados teores de  $29950 \pm 4.65$  mg/100g (casca de manga Keitt),  $36090 \pm 2,24$  mg/100g (casca de manga Sensation) e  $28560 \pm 2,39$  mg/100g (casca de manga Gomera).



**Figura I 7:** Estrutura química do etil galato.

Fonte: Takahashi et al. (2015).

Alguns estudos tem relatado funções benéficas do etil galato para a saúde. Mehla et al (2011) avaliaram os constituintes ativos com propriedades medicinais de *Pistacia integerrima* Linn. (*kakadshringhi*), um fruto da família dos pistaches que vem sendo utilizado pelo sistema de medicina tradicional na Índia como agente terapêutico em diversas doenças inflamatórias. Os resultados obtidos nesse estudo identificaram o etil galato como o principal constituinte ativo de *Pistacia integerrima*, demonstrando seu potencial como agente antiinflamatório.

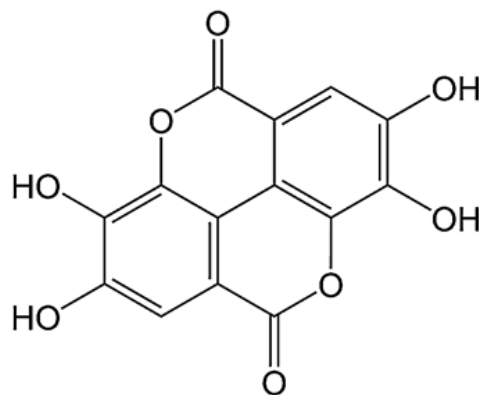
Kalaivani, Rajasekaran e Mathew (2011) avaliaram a capacidade de sequestro de radicais, citotoxicidade e atividade hemolítica de etil galato extraído de folhas *Acacia nilotica* Wild., uma planta medicinal com potencial atividade antioxidante. A capacidade de sequestro de radicais livres pelo etil galato foi demonstrada em diferentes ensaios *in vitro*, com o objetivo de avaliar os possíveis mecanismos antioxidantes. Os resultados revelaram que o etil galato atua como doador de hidrogênio, quelante de metais e eliminador de radicais livres. O etil galato foi eficaz na eliminação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). O ensaio de degradação da desoxirribose revelou que o etil galato exibe maior capacidade de quelação de íons ferro do que capacidade de remoção direta do radical hidroxilo. Os resultados obtidos também demonstraram que o etil galato não possui atividade hemolítica contra eritrócitos de camundongos e humanos,

revelando seu mecanismo citotóxico e não toxicidade. Os resultados apresentados nesse estudo fornecem informações importantes para a utilização farmacológica desse composto visando suas propriedades antioxidantes.

Um outro composto encontrado em elevada concentração nas farinhas de casca de pequi foi o ácido elágico (Figura I 8). O ácido elágico é precursor de uma classe de taninos hidrolisáveis denominada taninos elágicos ou elagitaninos. Estudos recentes descritos na literatura tem associado o ácido elágico a efeitos benéficos no tratamento de doenças hepáticas e mal de Parkinson (GARCÍA-NIÑO & ZAZUETA, 2015; BALUCHNEJADMOJARAD et al, 2017).

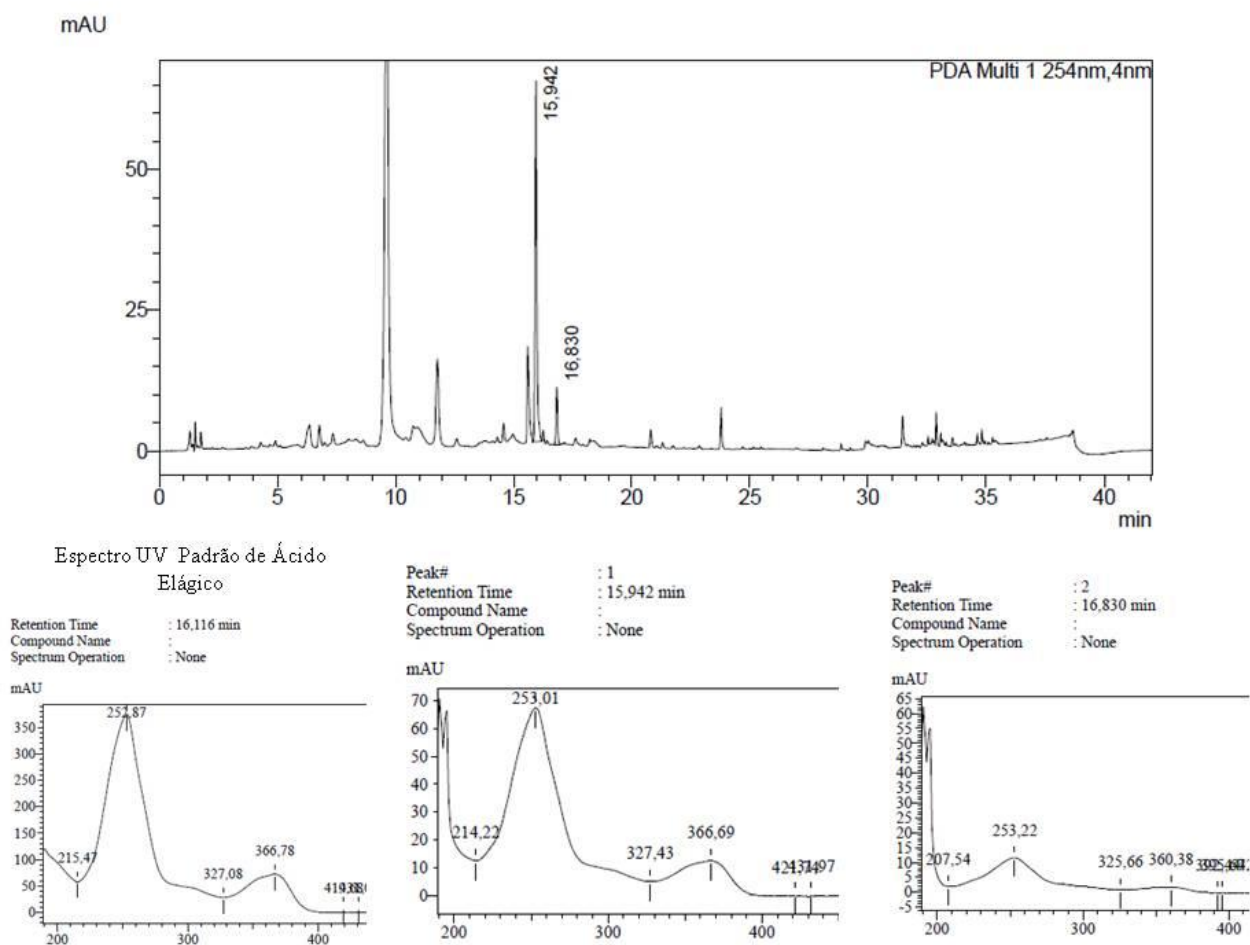
As amostras de farinha de casca de pequi apresentaram teores de ácido elágico de  $1002,30 \pm 0,72$  mg/100g para FP1 e  $509,47 \pm 0,37$  mg/100g para FP2. Novamente, os teores encontrados foram maiores para as amostras contendo exocarpo. O cromatograma com identificação do pico de ácido elágico, bem como seu respectivo espectro-UV é apresentado na figura I 9. Um segundo pico, representado em 16,830 minutos, apresenta espectro-UV semelhante ao do padrão de ácido elágico, sugerindo a presença de derivados desse ácido, como os elagitaninos.

Um estudo realizado por Gonçalves (2012) detectou a presença de ácido elágico em polpa comercial de camu-camu na concentração de  $737 \pm 18$  mg/100g de amostra seca. Esses valores são comparáveis aos descritos no presente estudo para as amostras de farinhas de casca de pequi. A autora justifica que os elevados teores encontrados deve-se ao fato de que esses compostos podem se apresentar juntamente com os elagitaninos, fato que pode ter ocorrido também no presente estudo.



**Figura I 8:** Estrutura química do ácido elágico.

*Fonte: Zeb (2015)*



**Figura I 9:** Cromatograma e espectros-UV obtidos para as amostras de farinha de casca de pequi (TR: 15,942 min – ácido elágico; TR: 16,830 – derivado de ácido elágico).

García-Niño & Zazueta (2015) apresentam uma longa revisão listando as propriedades farmacológicas e os mecanismos moleculares ativados pelo ácido elágico em termos de proteção do fígado. De acordo com os autores, o ácido elágico possui propriedades antioxidante, anti-hepatotóxica, antisteatósica, anti-colestática, anti-hepatocarcinogênica e ainda propriedades antivirais. Os mecanismos moleculares ativados pelo ácido elágico incluem a eliminação de radicais, regulação das enzimas de fase I e II, modulação de citocinas pró-inflamatórias e profibróticas, a regulação de vias bioquímicas envolvidas na síntese e degradação de lipídios e a manutenção de níveis de oligoelementos essenciais. Os autores afirmam que, apesar do amplo

potencial terapêutico do ácido elágico, o número escasso de estudos com pacientes hepáticos é escasso, limitando sua aplicação clínica.

Os resultados encontrados para a avaliação do perfil de compostos fenólicos em farinhas de casca de pequi revelaram a presença de ácidos fenólicos precursores de taninos hidrolisáveis, como o ácido gálico, precursores de galotaninos tais como o etil galato e, ácido elágico, precursor dos elagitaninos. Dietas com altos índices de ingestão de chá verde e frutas ricas em taninos tem sido associadas à ações anti-carcinogênicas. Pesquisas relacionadas à atividade biológica dos taninos tem evidenciado importante ação contra determinados microrganismos, agentes carcinogênicos e causadores de toxicidade hepática. Além disso, podem exibir efeitos antiinflamatórios e cicatrizantes (MONTEIRO et al, 2015).

#### **4. Conclusão Parcial**

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o potencial das amostras de farinhas de casca de pequi como fonte de carotenoides. O método FRAP foi eficaz para a avaliação da capacidade antioxidante das farinhas a partir de casca de pequi, confirmando os resultados obtidos por Leão (2013) pelos métodos DPPH e ABTS. Os resultados obtidos pela análise de antioxidantes macromoleculares indicam que a atividade antioxidante das farinhas de casca de pequi pode ser superior à determinada pelos métodos FRAP, DPPH e ABTS, uma vez que nos resíduos de extração foram detectados elevados teores desses compostos bioativos. Pela análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi possível detectar a presença de ácido gálico, etil galato e ácido elágico nas amostras de farinha de casca de pequi. Assim como nas demais análises para verificação da capacidade antioxidante, os resultados obtidos por CLAE revelaram uma maior concentração dos compostos detectados nas amostras de farinha com exocarpo (FP1). Os teores dos compostos detectados nas farinhas de casca de pequi foram expressivamente superiores aos descritos para polpa e semente de pequi, como também para outros subprodutos vegetais. Esses compostos são relatados na literatura com propriedades anticarcinogênicas e hepatoprotetora, demonstrando o potencial farmacológico e nutracêutico das amostras avaliadas no presente estudo.

**Capítulo II: Caracterização das farinhas de casca de  
pequi por cromatografia a gás, espectroscopia de  
infravermelho e microscopia eletrônica de varredura**





# 1. Introdução

As frutas são formadas por uma matriz alimentar complexa composta por carboidratos, proteínas, gorduras, fibras alimentares e diferentes minerais, além de conterem grandes quantidades de água. Sua caracterização torna-se importante para a avaliação do potencial de aproveitamento das mesmas, do ponto de vista nutricional e econômico.

Os frutos nativos do cerrado brasileiro apresentam um enorme potencial de utilização no sistema agrícola, e apresentam grande importância econômica no Brasil central (NASCIMENTO & COCOZZA, 2015). Dentre esses frutos, o pequi (*Caryocar brasilienses camb.*) assume um papel de destaque, devido à sua grande ocorrência e exploração pela população regional. O pequi apresenta características peculiares de sabor, cor e aroma que o torna atrativo para consumo *in natura* ou processado. O fruto do pequizeiro é caracterizado como uma drupa de casca verde, contendo de uma a quatro sementes por fruto, chamadas pirenos. No interior dos pirenos existe uma amêndoa comestível e bastante apreciada na culinária. Os frutos são caracterizados por um elevado teor de lipídios, vitaminas (A, E e C) e diferentes minerais como fósforo, potássio e magnésio. Em contrapartida, são encontrados poucos estudos sobre caracterização da casca do fruto, bem como de produtos produzidos a partir desse subproduto, como as farinhas, por exemplo (NASCIMENTO & COCOZZA, 2015).

Dessa maneira, neste capítulo, são apresentados os estudos relacionados à caracterização superficial dos grupos amostrais de farinhas de casca de pequi por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sua caracterização da fração polissacarídica por meio de cromatografia a gás (CG) e espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IV). Os resultados obtidos pelas análises de caracterização são importantes para elucidar a composição das matrizes componentes das fibras alimentares presentes na farinha de casca de pequi e, assim inferir sobre sua funcionalidade e aplicação tecnológica.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Caracterização superficial de FP por Microscopia Eletrônica de Varredura**

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Microanálises (MICROLAB) da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP. As microfotografias foram obtidas utilizando-se Microscópio JEOL, Modelo JSM-5510. As farinhas foram fixadas com fita dupla face de carbono sobre um suporte, o qual foi revestido por borrifamento sob vácuo, com uma fina camada de ouro metálico. Posteriormente, cada amostra foi transferida para o microscópio eletrônico de varredura e analisadas a uma tensão de 20 kV com ampliações de 1000 x.

### **2.2 Análise de Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Foi utilizado um Espectrofotômetro Shimadzu IRAffinity-1 FTIR (Shimadzu, Japão) com um detector DLATGS (Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-Alanine), que abrange a faixa de  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , 20 scans e apodização Happ-Genzel utilizada antes da transformação de Fourier. As medições de reflectância difusa (RD) foram realizadas com o uso do acessório de amostragem da Shimadzu (DRS8000A). Cada amostra foi misturada com brometo de potássio (KBr) na proporção de 10% de amostra para 90% de KBr (% m/m). O KBr puro foi utilizada para obtenção do espectro branco. Todos os espectros foram registrados no intervalo de  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  e 20 varreduras.

### 2.3 Avaliação da composição monossacarídica por cromatografia a gás

A composição monossacarídica das amostras FP1, FP2, bem como de suas frações de fibras insolúveis e solúveis (FP1I, FP1S, FP2I e FP2S) foi determinada para os acetatos de alditol correspondentes por meio de dois métodos distintos. O primeiro método foi realizado em parceria com o Departamento de Química da Universidade de Aveiro – Portugal, conforme descrito por Bastos, Coelho & Coimbra (2015) o qual permite a quantificação de glicose proveniente de celulose. Também foi avaliado o teor de ácidos urônicos. Os monossacarídeos foram quantificados utilizando-se 2-deoxiglicose como padrão interno. Os monossacarídeos das amostras (1-2 mg) foram obtidos por pré-hidrólise em 0,2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (p/p) por 3 horas, em temperatura ambiente e, subsequentemente por hidrólise em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M por 2,5 horas a 100 °C. Após 1 hora de hidrólise, 0,5 mL da solução foi coletada para a determinação de ácidos urônicos. Os monossacarídeos foram reduzidos com NaBH<sub>4</sub> (15% em NH<sub>3</sub> 3M) por 1 hora a 30 °C, seguido por acetilação com 3 mL de anidrido acético e 450 µL de 1-metilimidazol por 30 minutos a 30 °C. Os acetatos de alditol foram separados por extração líquido-líquido com água e diclorometano e, após evaporação do solvente orgânico foram solubilizados em acetona anidra. Os acetatos foram analisados por cromatografia a gás com detector de ionização de chama. Utilizou-se CG-FID Perkin Elmer-Clarus 400 com coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,15 µm). A programação da temperatura no forno da coluna foi de 200 °C-220 °C a uma taxa de 4 °C/min por 7 minutos e elevada a 230 °C a uma taxa de 2 °C /min por 1 minuto. A temperatura do injetor foi de 220 °C e do detector 230 °C. O gás hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1,7 mL/min.

O método colorimétrico m-fenilfenol foi utilizado para a determinação do conteúdo de ácidos urônicos utilizando-se o ácido galacturônico como padrão. 3 mL de ácido bórico 50mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% (p/p) foi adicionado a 0,5 mL da amostra hidrolizada diluída (1:4) e, após agitação, os tubos foram aquecidos a 100 °C por 10 minutos. Após resfriamento, 100 µL de m-fenilfenol foi adicionado e a mistura reagiu por 30 minutos em ausência de luz. Feito isso, a absorbância foi ensurada a 520 nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas.

O segundo método utilizado segue protocolo descrito em *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (2001). Basicamente, a diferença entre os dois métodos encontra-se no processo de digestão das amostras. No segundo método, as amostras são digeridas em ácido

trifluoroacético, o qual não é capaz de digerir a celulose. Dessa maneira, a porcentagem de glicose determinada por esse método refere-se a polissacarídicos não celulósicos, presentes primordialmente nas hemiceluloses. A alose foi utilizada como padrão interno para a quantificação dos monossacarídeos.

Os acetatos de alditol foram separados em coluna capilar BPX-70 (30 m x 0.32 mm x 0,25 µm; SGE Chromatography Products). As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás Varian 3900 equipado com detector de ionização de chama. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1,5 ml/min. O volume de injeção foi de 2µl utilizando-se split de ½. A temperatura inicial do forno foi de 38 °C e mantida por 30 segundos. Em seguida, foi elevada a 170 °C a uma taxa de 50 °C/min. Por fim, a temperatura do forno foi elevada a 230 °C a 2 °C/min e mantida por 5 minutos. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 38 minutos. O detector foi aquecido a 250 °C e o injetor a 230 °C.

A resposta molar relativa (RMR) para cada derivado de monossacarídeo foi calculada relativa à alose (RMR=1) segundo a equação II 1.

$$RMR_{a/alose} = (A_a/m_a/MM_a) / (A_{alose}/m_{alose}/MM_{alose}) \quad (\text{eq II 1})$$

Onde,

$RMR_{a/alose}$  = razão molar relativa do açúcar em relação à alose;  $A_a$  = área do pico do derivado do açúcar ;  $m_a$  = massa do açúcar (em gramas);  $MM_a$  = massa molar do açúcar;  $A_{alose}$  = área do pico do derivado da alose;  $m_{alose}$  = massa da alose (em gramas);  $MM_{alose}$  = massa molar da xilose.

A partir dos cálculos da RMR para cada açúcar, a composição monossacarídica das frações foi determinada calculando-se as porcentagens molares relativas (% mol), de acordo com a Equação II 2:

$$\% \text{ mol} = [(A_a/RMR_{a/alose}).100]/(\sum A_a/RMR_{a/alose}) \quad (\text{eq. II 2})$$

A obtenção dos acetatos de alditol compreendeu três etapas subsequentes: hidrólise ácida da amostra para a liberação dos monossacarídeos constituintes, redução e acetilação.

Inicialmente, 5 mg de amostra foi digerida em 0,5 ml de ácido trifluoroacético (TFA) 2M por 60 minutos a 121 °C. Após a digestão e resfriamento, 25 µl de alose (padrão interno) 20 mg/ml foram acrescentados. As amostras digeridas contendo o padrão interno foram filtradas em filtro PTFE 0,22 µm. O filtrado foi evaporado até *secura* em fluxo suave de gás nitrogênio.

Para a redução dos monossacarídeos a seus alditóis correspondentes adicionou-se 100 µl de água ultra pura ao hidrolizado seco. Em seguida, foram adicionados 20 µl de amônia 15 M e 1 ml de solução 0,5 M de borohidreto de sódio em dimetilsulfóxido (DMSO). O sistema foi incubado por 90 minutos a 40 °C. Por fim, 100 µl de ácido acético 18 M foi adicionado ao sistema, completando a etapa de redução.

Para a etapa de acetilação, adicionou-se aos alditóis reduzidos 200 µl de 1-metilimidazol e, em seguida, 2 ml de anidrido acético. O sistema foi homogeneizado e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, 5 ml de água ultrapura foram adicionados para eliminar o excesso de anidrido acético. Uma nova incubação à temperatura ambiente foi realizada até o resfriamento. Os acetatos de alditóis foram extraídos sequencialmente com 1 ml de diclorometano (DCM). Os acetatos de alditóis formados foram secos em fluxo de N<sub>2</sub> e, no momento da análise adicionou-se 2mL de DCM para conseguinte realização da corrida cromatográfica em cromatógrafo a gás com detecção por ionização de chama (GC-FID).

Treze padrões de açúcares (meso-eritritol, 2-deoxi-D-ribose, L(+)-ramnose, α-D(+)-fucose, D(-)-ribose, L(+)-arabinose, D(+)-xilose, 2-deoxi-D-glicose, β-D-alose, D(+)-manose, D(+)-galactose, α-D (+)-glicose, *mio*-inositol) foram submetidos às reações de redução e acetilação conforme descrito para os hidrolisados.

Os cálculos foram realizados conforme descrito por Ferraz (1991). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

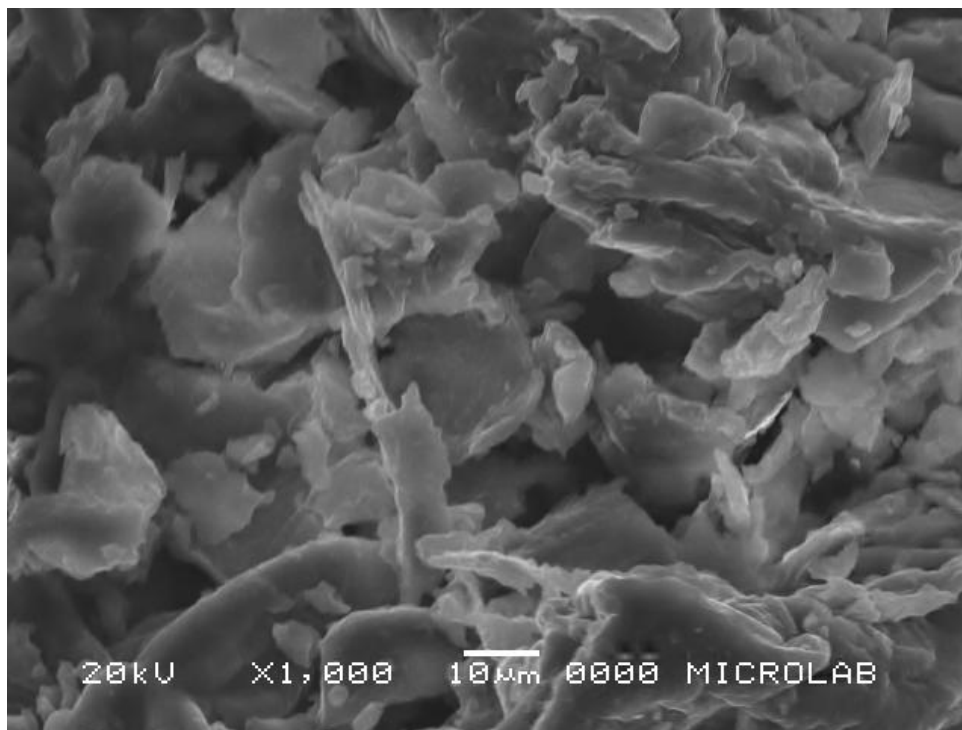
### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Pela análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura, Figuras II 1 e II 2, observa-se que as estruturas das amostras caracterizam-se por poros irregulares com forma relativamente complexa, entretanto sem diferenças perceptíveis entre os tratamentos. De maneira geral, o aumento na irregularidade da superfície e quantidade de poros, influenciam as propriedades do material, tais como: propriedades físico-químicas e de hidratação (Santana *et al.*, 2012).



**Figura II 1:** Microfotografia de FP1 (farinha de mesocarpo + exocarpo + branqueamento), com amplitude de 1000 x e tensão de 20 kV.



**Figura II 2:** Microfotografia de FP2 (farinha de mesocarpo + branqueamento), com amplitude de 1000 x e tensão de 20 kV.

Em seu estudo anterior, Leão (2013) avaliou as propriedades de hidratação das farinhas produzidas a partir de casca de pequi e obteve bons resultados para capacidade de absorção de água e volume de intumescimento, quando comparada a farinhas produzidas por cascas de outros vegetais. Entretanto, os tratamentos não apresentaram diferença significativa em relação a essas análises, exceto o volume de intumescimento. Essa diferença deve-se a um maior teor de fibras solúveis encontrados em FP2 nesse estudo.

**Tabela II.1:** Propriedades de hidratação de farinhas de casca de pequi.

<b>Amostra</b>	<b>Capacidade de Retenção de Água</b>	<b>Volume de Intumescimento</b>	<b>Índice de Solubilidade em Água</b>
FP1	3.98±0.04 <sup>a</sup>	8.82±0.4 <sup>b</sup>	16.7±0.5 <sup>a</sup>
FP2	3.74±0.4 <sup>a</sup>	11.34±0.9 <sup>a</sup>	19.84±4.0 <sup>a</sup>

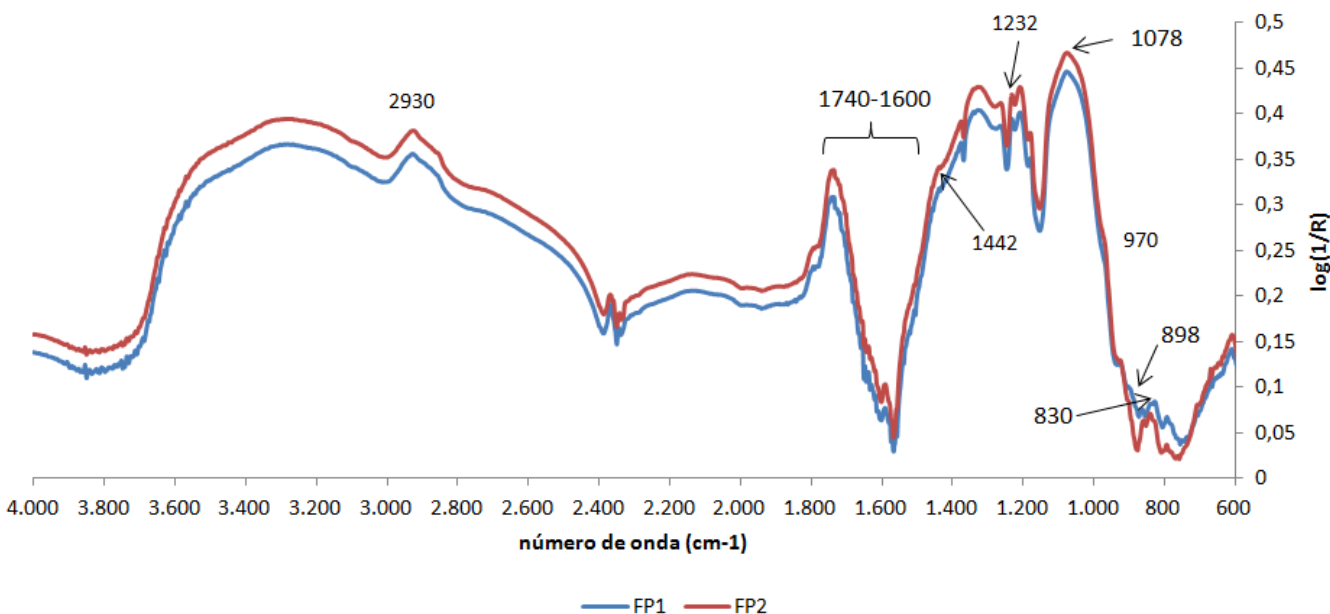
Médias seguidas de desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam valores significativamente diferentes, pelo método T de Student a 5% de significância. FP1: farinha de mesocarpo + exocarpo; FP2: farinha de mesocarpo.

Fonte: Leão et al., 2017.

Dessa maneira, as estruturas semelhantes observadas em ambas as amostras estão em consonância com os resultados similares obtidos nas análises tecnológicas. Os principais resultados obtidos por Leão (2013) para as propriedades tecnológicas de hidratação estão descritos na tabela II.1. Não foram encontrados na literatura dados comparativos referentes à caracterização de farinha de cascas de frutas por MEV.

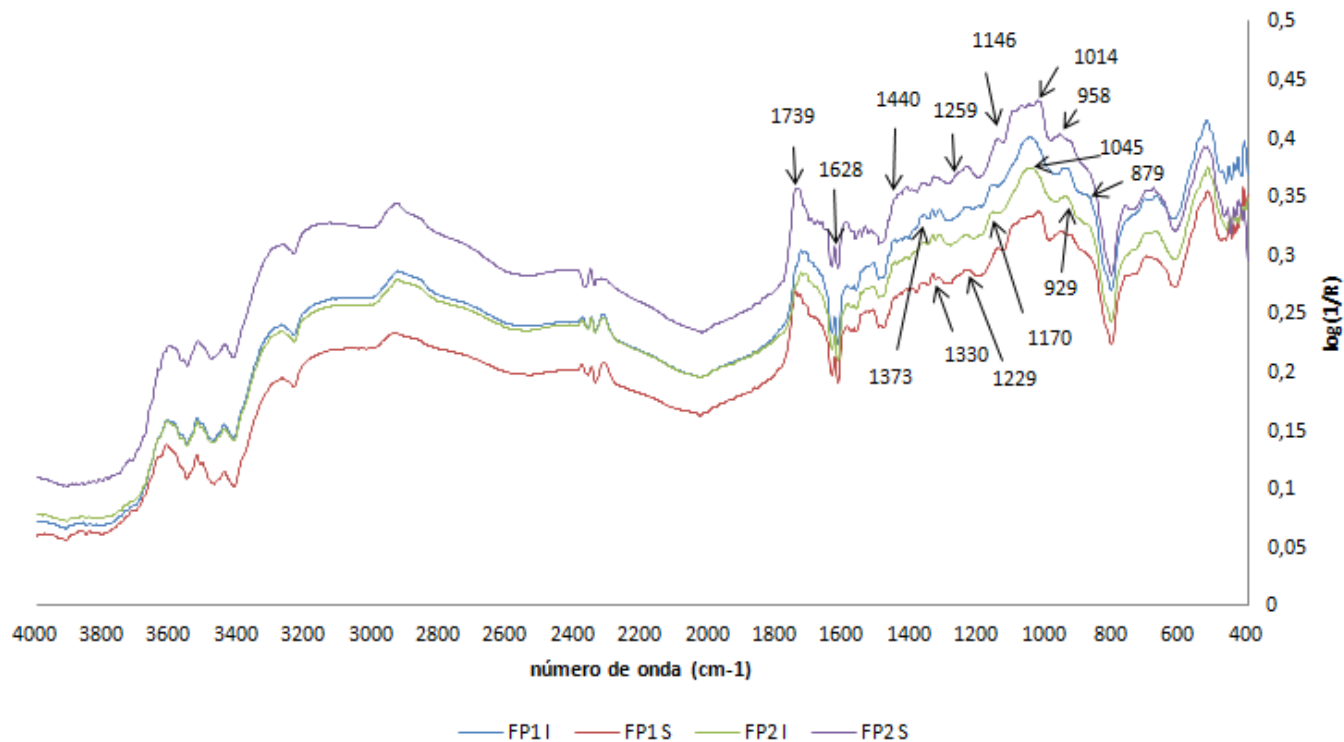
### 3.2 Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Uma avaliação comparativa dos espectros de FP1 e FP2 (Figura II 3) indica grande similaridade entre eles, com pequenas diferenças na intensidade das bandas. As amostras de FP2 apresentaram valores de absorbância ligeiramente maiores que os observados para FP1. Com relação às frações digeridas enzimaticamente (FP1 e FP2 solúvel e insolúvel) (Figura II 4) os espectros também apresentaram grande similaridade, com pequenas diferenças na região entre  $1200-800\text{ cm}^{-1}$  (característica de carboidratos), entre as frações solúveis e insolúveis.



**Figura II 3:** Média espectral obtida por DRIFT-FTIR, a partir dos espectros originais para os FP branqueados (FP1 e FP2). Sendo FP1: farinha de mesocarpo mais exocarpo e FP2: farinha de mesocarpo.

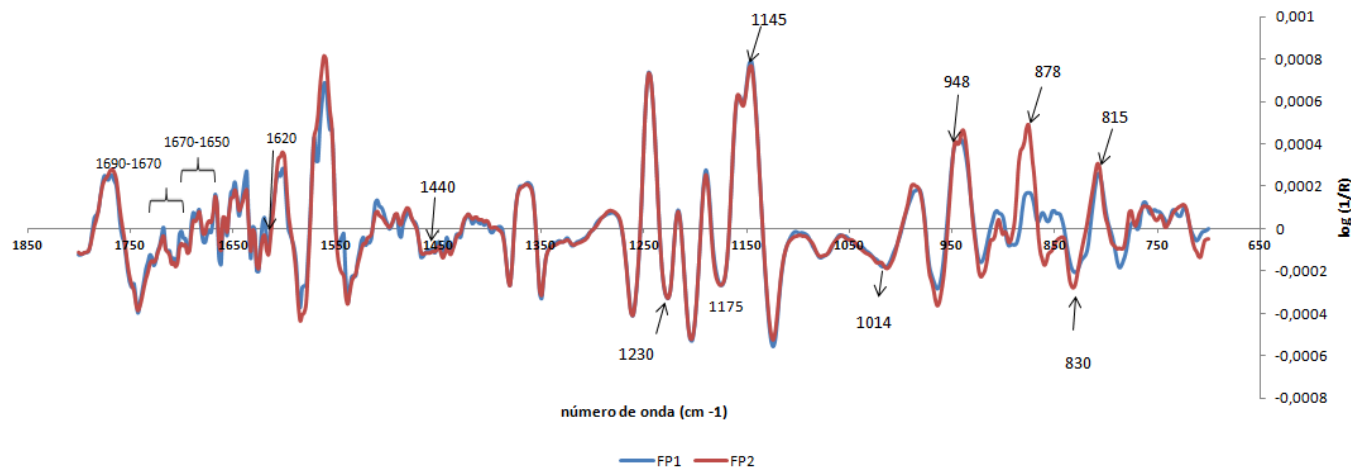




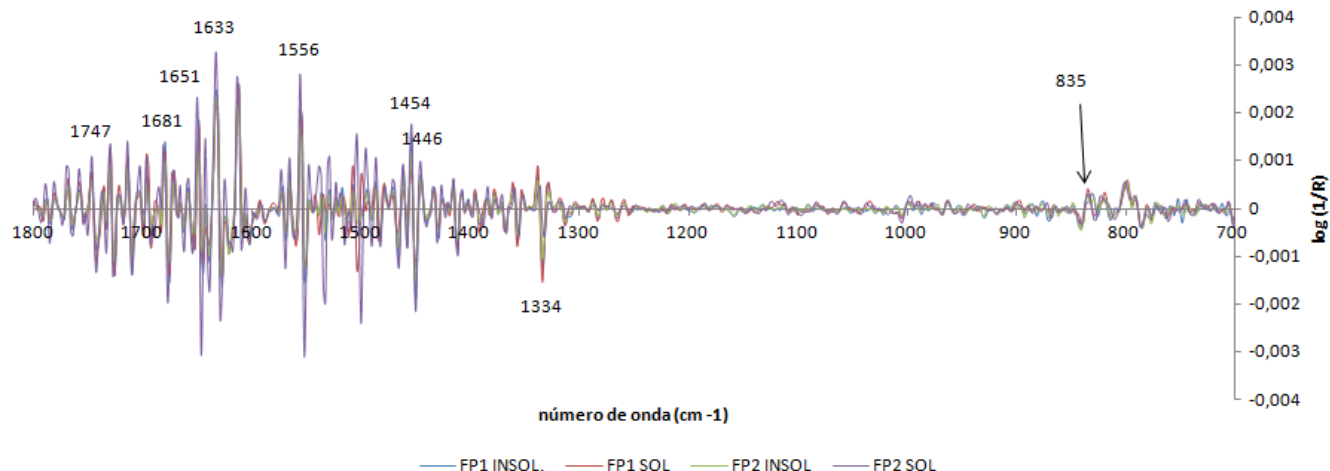
**Figura II 4:** Média espectral obtida por DRIFT-FTIR a partir das frações obtidas por digestão enzimática. FP1 I: fração insolúvel obtida a partir de FP1; FP1 S: fração solúvel obtida a partir de FP1; FP2 I: fração insolúvel obtida a partir de FP2; FP2 S: fração solúvel obtida a partir de FP2. Sendo FP1: farinha de mesocarpo mais exocarpo e FP2: farinha de mesocarpo.

As regiões entre  $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  são de especial interesse uma vez que tratam-se de regiões características da absorção de carboidratos constituintes da parede celular vegetal. Em todos os espectros analisados (FP1, FP2, FP1 I, FP1 S, FP2 I e FP2 S) são observadas bandas na região de  $1740\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ , características de grupos esterificados e não esterificados em pectinas, sendo que a banda clara em  $1740\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a ésteres carbonílicos e a banda em  $1630\text{ cm}^{-1}$  atribuída a carboxilatos anti-simétricos (BARROS et al., 2002). Nesta mesma região, podem ser encontradas bandas relacionadas com a amida I e II, associadas às proteínas, no entanto, os picos não são bem resolvidos nesta porção dos espectros. Para ser capaz de avaliar a presença de uma fração proteica na amostra, as segundas derivadas dos espectros das farinhas e das frações digeridas (Figura II 5 e II 6) foram analisadas e bandas claras nas regiões  $1670\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1690\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$  foram identificadas, sendo atribuídas a grupos amida I ligados e não ligados ao hidrogénio, respectivamente. Além disso, bandas em  $1650\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$  associadas a amidas II são observadas em ambos os espectros de derivada segunda.

Em cada espectro são observadas claramente a presença de várias bandas atribuídas comumente a polissacarídeos pécnicos, tais como: 830, 878, 1230 e 1440  $\text{cm}^{-1}$ . A banda  $\sim 830 \text{ cm}^{-1}$  pertencente à “região anomérica” do *fingerprint* é atribuída à vibrações de ligações  $\alpha$  no anel entre unidades de ácido 1,4-galacturônico, os quais compreendem usualmente a cadeia principal das pectinas (SZYMANSKA-CHARGOT et al., 2015). A banda em  $\sim 878 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída a resíduos de ácido  $\beta$ -manurônico (GÓMEZ-ORDÓÑEZ & RUPÉREZ, 2011). Uma banda com máximo em 1045  $\text{cm}^{-1}$  nas frações insolúveis e pico com máximo em 1259  $\text{cm}^{-1}$  nas frações solúveis de FP1 e FP2 são atribuídas a estiramento de ligações C-O nos grupos C-OH bem como estiramento de ligações C-C da estrutura principal de carboidratos.



**Figura II 5:** Espectro de derivada segunda obtida a partir dos espectros originais para as farinhas de casca de pequi (FP1 e FP2). Sendo FP1: farinha de mesocarpo mais exocarpo e FP2: farinha de mesocarpo.



**Figura II 6:** Espectro de derivada segunda obtida a partir dos espectros das frações digeridas enzimaticamente. FP1 I: fração insolúvel obtida a partir de FP1; FP1 S: fração solúvel obtida a partir de FP1; FP2 I: fração insolúvel obtida a partir de FP2; FP2 S: fração solúvel obtida a partir de FP2. Sendo FP1: farinha de mesocarpo mais exocarpo e FP2: farinha de mesocarpo.

Pode-se observar nos espectros de FP1 e FP2 em  $1078\text{ cm}^{-1}$  um pico distinto, de maior intensidade característico de  $\beta$ -arabinogalactanas (KAČURÁKOVÁ et al., 2000). A resolução por meio de derivada segunda dos espectros de FP1 e FP2 evidenciou bandas em 1145, 1104, 1014 e  $952\text{ cm}^{-1}$  sendo características para a distinção de ácido galacturônico. Essas bandas, evidenciadas pela resolução da derivada segunda de FP1 e FP2 são claramente percebidas nos espectros das frações digeridas enzimaticamente. A banda com máximo em  $\sim 1145$  é atribuída a estiramento assimétrico de grupamentos O-C-O de pectinas. A banda com máximo em 1014 foi identificada apenas nas frações solúveis de FP1 e FP2 e foi atribuída por Szymanska-Chargot & Zdunek (2013) a estiramento C-O e C-C de pectinas. Também foi evidenciada pela resolução da derivada segunda de FP1 e FP2 e nos espectros das frações insolúveis uma banda em  $1175\text{ cm}^{-1}$ , característica para distinção de xilose, e uma banda a  $\sim 972\text{ cm}^{-1}$  demonstrando uma quantidade deste monossacarídeo na amostra (Coimbra, Barros, Rutledge & Delgadillo, 1999). A banda observada em  $1373\text{ cm}^{-1}$  nas frações insolúveis de FP1 e FP2 podem ser atribuídas a resíduos de xiloglucanas. A banda em  $\sim 898\text{ cm}^{-1}$  está relacionada à vibrações do C1 de celulosas ou à vibrações no anel e é característica de ligações  $\beta$ -glicosídicas (SYNYTSYA et al., 2003; SZYMANSKA-CHARGOT et al., 2015).

Pelas análises realizadas nos espectros das amostras FP1 e FP2 bem como nos espectros de suas frações digeridas enzimaticamente pode-se perceber a presença de polissacarídeos

pécticos, como ácido galacturônico e manurônico, sendo indicativos da presença de pectina. Além de polissacarídeos pécticos, pode-se inferir sobre a presença de diferentes hemiceluloses como xiloglucanas e arabinogalactanas.

### **3.3. Composição monossacarídica por Cromatografia a Gás**

A composição monossacarídica das amostras, expressa em porcentagens molares relativas (% mol), foi determinada a partir da RMR de cada açúcar, conforme descrito por Ferraz (1991). A utilização desse método permite a correção de diferenças de respostas fornecidas pelo detector aos diferentes açúcares e possíveis perdas que possam ter ocorrido durante a derivatização (MALAGOLI et al., 2014). Os dados obtidos para ambos os métodos utilizados (digestão com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e TFA) são apresentados na Tabela II 2.

**Tabela II 2:** Composição monossacarídica de FP1, FP2 e suas frações insolúveis e solúveis obtidas por digestão enzimática.

Carboidratos (mol %)										
Fração		Ramnose	Fucose	Arabinose	Xilose	Manose	Galactose	Glicose	Mio- inositol	Ácidos Urônicos
<b>FP1</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	t	11	6	5	17	42		18
	TFA	0,6	t	11	6	4	22	24	4,2	
<b>FP1I</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	1	8	9	5	15	51		10
	TFA	1	1	10	10	2	23	15	1,1	
<b>FP1S</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	t	12	1	1	17	12		56
	TFA	1,6	t	16	2	1	22	11	0,7	
<b>FP2</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	t	11	6	5	18	44		15
	TFA	1	t	11	5	4	22	24	4,6	
<b>FP2I</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	1	9	9	4	18	50		10
	TFA	1	1	8,4	10	2	21	19	1,5	
<b>FP2S</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	t	14	1	1	19	15		50
	TFA	2	t	20	1	1	24	11	0,8	

FP1: farinha de mesocarpo externo + exocarpo; FP1I e FP1S, fibras alimentares insolúveis e solúveis de FP1, respectivamente. FP2: farinha de mesocarpo externo; FP2I e FP2S, fibras alimentares insolúveis e solúveis de FP2, respectivamente. Análises realizadas em triplicatas.

Os resultados indicam composições químicas similares entre as amostras com exocarpo (FP1) e sem exocarpo (FP2), bem como em suas frações digeridas enzimaticamente. Os teores de monossacarídeos determinados por ambos os métodos são semelhantes, à exceção da glicose pois, como citado anteriormente, o método com digestão por TFA não permite a identificação de glicose referente à celulose. Dessa maneira, a glicose determinada por esse método é referente a outros polissacarídeos presentes em diferentes tipos de hemiceluses e polissacarídeos pécnicos. As pequenas diferenças encontradas são esperadas uma vez que as amostras foram analisadas em diferentes equipamentos e digeridas com diferentes ácidos.

Sete monossacarídeos foram detectados nas amostras avaliadas em ambos os métodos utilizados, sendo eles: ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glicose. O método com digestão em TFA foi capaz de detectar a presença de *mio*-inositol. Pelo método m-fenilfenol determinou-se também o teor de ácidos urônicos.

O conhecimento da composição monossacarídica permite fazer inferências aos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal. A parede celular é composta por diferentes frações de polissacarídeos incluindo celulose, xiloglucanos, heteroxilanas, mananas e polissacarídeos pécticos. As paredes celulares de frutas, verduras e cereais compreendem a principal fonte de fibras alimentares dos seres humanos, tornando-se importante para a manutenção da saúde (WROLSTAD, 2014). Além de benefícios à saúde, as diferentes fibras alimentares possuem propriedades tecnológicas como absorção de água e intumescimento e são importantes no processamento de alimentos.

Os resultados obtidos pela análise da composição monossacarídica indicam a presença de polissacarídeos pécticos e diferentes hemiceluloses corroborando com a análise dos espectros obtidos por FTIR (ítem 3.2 Capítulo II). As hemiceluloses são formadas por uma grande variedade de substâncias incluindo pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (ácidos 4-*O*-metil-glucurônico e galacturônico).

Correlacionando-se o perfil de monossacarídeos obtidos pela análise de cromatografia a gás com a análise dos espectros obtidos por FTIR-DRIFTS pode-se inferir que as amostras são compostas principalmente por polissacarídeos pécticos e hemiceluloses como arabinogalactanas, xiloglucanas e glucomananas.

Conforme esperado, as frações solúveis das amostras avaliadas apresentaram teores expressivamente maiores de ácidos urônicos, sendo indicativo da presença de polissacarídeos pécticos. A presença de polissacarídeos pécticos torna-se importante principalmente do ponto de vista tecnológico, uma vez que a pectina possui grande importância no processamento de alimentos. Dentre suas principais funções, as pectinas atuam na textura e viscosidade de produtos processados, além de exercer funções fisiológicas, por se tratar de uma fibra solúvel.

O teor de xilose nas frações insolúveis de FP1 e FP2 foi significativamente superior ao detectado para as frações solúveis sendo indicativo de que a maior parte das  $\beta$ -xilanas presente nas amostras FP1 e FP2 são compostos de cadeias lineares com poucas ramificações. Glicose, galactose, xilose e fucose podem ser constituintes ainda de xiloglucanas, as quais representam a hemicelulose mais abundante em frutos e vegetais. As xiloglucanas são formadas por uma cadeia principal de glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 onde três de cada quatro moléculas de glicose possuem uma xilose ligada ao carbono 6. Nas cadeias laterais de xilose estão presentes também

outros monossacarídeos como a galactose e, em menor proporção a fucose (WROLSTAD, 2014).

A arabinose e galactose são os principais constituintes das arabinogalactanas, sendo que a porcentagem desses monossacarídeos na molécula interferem diretamente em suas propriedades físico-químicas e tecnológicas (SAEED et al., 2011). Percebe-se que, nas frações insolúveis de ambas as amostras (FP1 e FP2) a relação entre o teor de galactose e arabinose é aproximadamente 2:1, já para as frações solúveis, essa relação é aproximadamente 2:1,5. Essa distinção entre as frações pode ser um indicativo de arabinogalactanas de cadeias mais curtas e mais ramificadas nas frações solúveis do que as presentes nas frações insolúveis.

Um fato interessante é a presença de mio-inositol em todas as amostras analisadas. Inositóis são membros da família dos carboidratos cíclicos e abundante em alguns alimentos vegetais, em especial cereais e frutas, e pobres em alimentos de origem animal (RUIZ-ACEITUNO et al, 2014). No organismo humano o mio-inositol pode ser sintetizado pela glicose-6-fosfato, entretanto, para esse açúcar exercer seu papel funcional seu consumo deve ser complementado pela ingestão de frutos cítricos e cereais, por exemplo (MASUDA et al, 2003).

O mio-inositol é um isômero da glicose e precursor de diferentes componentes com funções diversificadas. Os derivados de mio-inositol podem ser gerados por vias lipídio-dependentes ou independentes. Dentre os derivados, o fosfatidilinositol atua tanto como componente estrutural em membranas de moléculas lipídicas ou como sinalizador (VALLURU E VAN DEN ENDE, 2011). O mio-onositol tem sido associado ao tratamento de diferentes doenças psiquiátricas, como a depressão, síndrome do pânico e transtorno obsessivo compulsivo uma vez que possui capacidade para modular a interação entre neurotransmissores, drogas, receptores e proteínas de sinalização (HARVEY et al., 2002). Estudos recentes tem associado ainda a suplementação com mio-inositol à redução dos índices de diabetes gestacional (CELENTANO et al, 2016; CLEMENTS E DANELL, 2016).

Na literatura não foram encontrados estudos investigando a presença de mio-inositol ou seus derivados em resíduos de frutos. Entretanto, Masuda e colaboradores (2003) avaliaram o teor de mio-inositol em diferentes frutas cítricas, como limão, tangerina, laranja e grapefruit. O teor desse açúcar descrito nos frutos estudados variou de 0,6-2,1%, valores similares aos encontrados no presente estudo para as frações digeridas enzimaticamente das farinhas, e

menores do que os encontrados para os pós integrais. Vale salientar contudo, que no estudo de Masuda os resultados obtidos dizem respeito à polpa fresca, sem casca.

De maneira geral a composição monossacarídica das amostras e suas frações digeridas enzimaticamente foram similares. Pelo método do ácido sulfúrico realizado em parceria com o Departamento de Química da Universidade de Aveiro – Portugal foram determinados os teores de ácidos urônicos e também a glicose proveniente da celulose. Pelo método do ácido trifluoroacético foi detectada a presença de mio-inositol, um açúcar derivado da glicose e com potencial papel funcional para o organismo humano.

## **4 Conclusão parcial**

A caracterização físico-química das amostras de farinha de casca de pequi permitiu inferir sobre características de sua superfície e sua composição polissacarídica. A análise de MEV revelou uma estrutura superficial porosa e irregular que auxilia o entendimento das boas propriedades de hidratação detectadas nas amostras por Leão (2013). Por meio das análises de cromatografia a gás foi possível detectar diferentes monossacarídeos formadores das hemiceluloses que compõe a fração de fibra alimentar das amostras. A presença de mio-inositol nas amostras avaliadas chama a atenção devido ao potencial funcional e modulador desse monossacarídeo. A análise dos espectros de FTIR corrobora com os resultados obtidos pela análise de cromatografia a gás. Pode-se inferir, por meio das análises realizadas que os principais polissacarídeos presentes nas farinhas de casca de pequi compreendem polissacarídeos pécicos e hemiceluloses como xiloglucanas, arabinogalactanas e glucomananas. Esses polissacarídeos são usualmente empregados na indústria de alimentos devido suas capacidades de formação de gel, absorção de água e capacidade de intumescimento. A presença dessas hemiceluloses nas amostras analisadas sugere sua utilização como aditivo alimentício. Não foram encontrados na literatura dados referentes à composição polissacarídica de farinhas de casca de pequi, bem como dados acerca de sua estrutura superficial. Visando a agregação de valor e a aplicabilidade como aditivo alimentar, no próximo capítulo será explorado o potencial de extração de pectinas das farinhas de casca de pequi.



**Capítulo III: Avaliação do potencial de extração  
de pectinas de farinhas de casca de pequi em  
reator de micro-ondas**



# 1. Introdução

Pectina é um polissacarídeo existente na parede celular e lamela média de células vegetais sendo constituída por ésteres metilados de ácido poligalacturônico (SWAMY & MUTHUKUMARAPPAN, 2017). As pectinas comerciais são obtidas principalmente de cascas de frutas resultantes do processamento de suco (principalmente bagaço de maçã e cascas de frutas cítricas). São extensivamente utilizadas na indústria de alimentos como agente gelificante, de textura e estabilizante (PETKOWICS, VRIESMANN & WILLIANS, 2017). Além de um importante papel tecnológico, as pectinas também possuem papel fisiológico, atuando de forma benéfica na redução do colesterol sanguíneo e na redução de risco de doenças cardíacas (JAFARI et al, 2017).

Devido à elevada demanda de pectina no mercado mundial, a obtenção desse polissacarídeo a partir de fontes alternativas tem se tornado relevante. Na literatura, são encontrados estudos referentes à obtenção de pectinas a partir de diferentes subprodutos do processamento de alimentos, tais como, casca de mamão papaia, casca de manga, casca de banana, casca de melancia e bagaço de cenoura, por exemplo (MARAN & PRAKASH, 2015; MARAN et al., 2015; SWAMY & MUTHUKUMARAPPAN, 2017; PETKOWICS, VRIESMANN & WILLIANS, 2017; JAFARI et al., 2017).

Além de novas fontes para a extração de pectina, novas metodologias tem sido avaliadas com o intuito de reduzir o tempo de extração bem como o consumo de reagentes. Nas novas metodologias estudadas são propostas também a utilização de reagentes menos agressivos ao meio ambiente e que também reduzam o desgaste dos equipamentos utilizados. Dentre as técnicas utilizadas, a irradiação por micro-ondas tem alcançado bons resultados em relação ao rendimento de extração, bem como à qualidade das pectinas obtidas (SEIXAS, et al., 2014; MARAN et al., 2015; THIRUGNANASAMBANDHAM & SIVAKUMAR, 2015).

As farinhas de casca de pequi avaliadas no presente estudo, apresentaram elevado teor de ácidos urônicos (formadores de polissacrídeos pécticos) quando analisada sua composição monossacarídica (Capítulo 2). Devido a isso, neste capítulo, são apresentados os estudos relacionados à extração assistida por micro-ondas de pectinas de farinhas de casca de pequi. São

apresentados os rendimentos de extração obtidos em cada um dos tratamentos avaliados bem como a caracterização das pectinas obtidas quanto ao grau de esterificação.

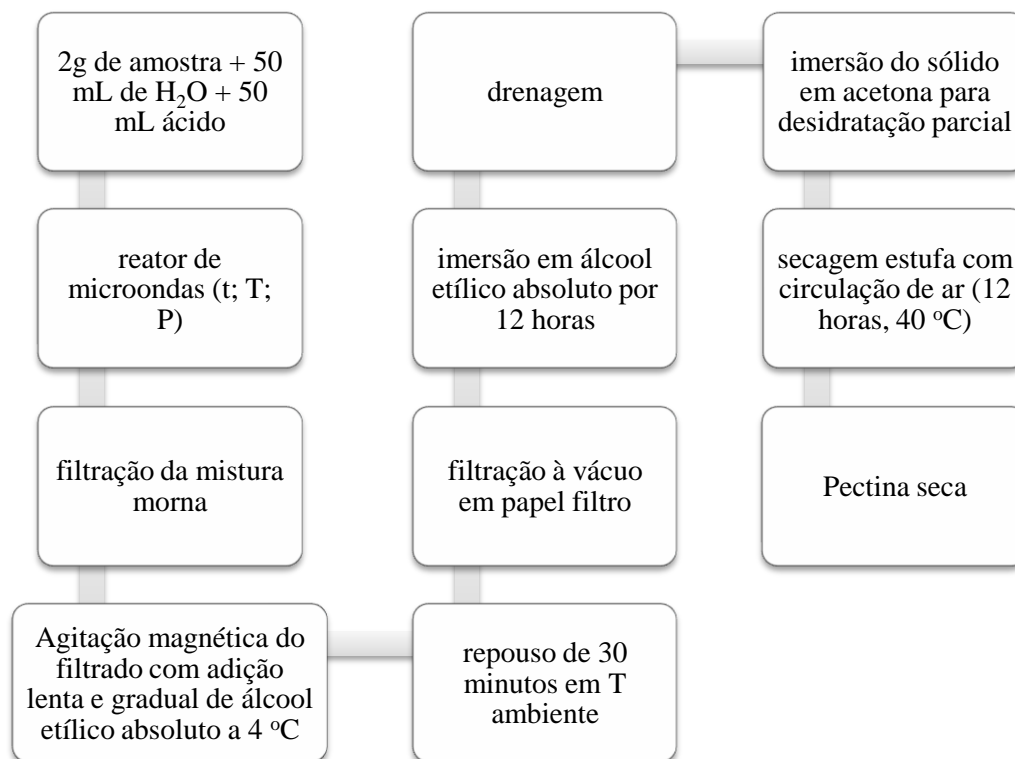
## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Extração de Pectina**

A pectina das farinhas de casca de pequi foi extraída utilizando método realizado por Seixas e colaboradores (2014) com algumas modificações. Para a extração de pectina, foram avaliados dois tipos de soluções de ácidos orgânicos, sendo o ácido cítrico e o ácido acético. O experimento foi conduzido em Reator de Microondas Synth modelo *Microwave Synthesis Labstation*.

Foram pesados 2g de amostra e adicionado 50 mL de água destilada e 50 ml da solução ácida (pH 2,0). A mistura foi adicionada ao reator de micro-ondas. O reator foi conectado ao condensador acoplado ao sistema para evitar qualquer perda de amostra por ebulição. O sistema foi submetido ao aquecimento por micro-ondas com tempo, potência e temperatura controlados.

O material obtido da extração foi filtrado ainda morno em malhas de aço inox de 250  $\mu\text{m}$ . O filtrado foi resfriado a 4 °C e colocado sob agitação magnética. Lentamente foram adicionados aproximadamente 150 mL de álcool etílico absoluto (também à 4 °C) para promover a flotação da pectina. O sistema foi mantido sob agitação por 10 minutos e, posteriormente em repouso por 30 minutos. A pectina obtida foi separada por filtração à vácuo em papel filtro qualitativo (8-12  $\mu\text{m}$ ). O gel de pectina obtido foi imergido em álcool etílico absoluto por 12 horas e, em seguida, desidratado parcialmente com acetona. A secagem da pectina foi realizada em estufa com circulação de ar, a 40 °C por aproximadamente 12 horas. O processo de extração de pectina está esquematizado na Figura III 1.



**Figura III 1:** Fluxograma de extração de pectina.

## 2.2 Delineamento Experimental

Um Delineamento Experimental foi utilizado (DOE) para obter condições de extração ótimas para os parâmetros avaliados. Embora mais simples, um processo de otimização univariante levaria mais tempo e um maior número de experimentos, sem fornecer informações sobre a interação entre os fatores estudados. Entre todos os DOE disponíveis, os projetos fatoriais, como os projetos 2k, são amplamente utilizados, por sua capacidade de avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis com um número reduzido de experimentos (Bruns, Scarminio & De Barros Neto, 2006). Assim, foi realizado um delineamento experimental exploratório completo com 2 níveis e 3 variáveis. Depois disso, realizou-se um Delineamento Compostos Central Rotacional (DCCR) para determinar as condições ótimas para a extração de pectina e para construir as superfícies de resposta, considerando apenas os fatores significativos do projeto fatorial completo realizado anteriormente. Para ambos os projetos, foram realizadas três repetições do ponto central para permitir a estimativa do erro puro (Tabela III 1). Os *softwares* Minitab 17 e Statistica 10 foram

empregados para análise de dados e avaliação da superfície de resposta, respectivamente. A significância da regressão e dos efeitos estudados foram estimados usando ANOVA, a um nível de confiança de 95% e o ajuste do modelo foi avaliado através de  $R^2$ ,  $R^2$  ajustado.

As variáveis avaliadas foram o tempo de extração (3, 6 e 9 min), a potência de micro-ondas (400, 600 e 800 W) e a temperatura (60, 80 e 100 °C). Embora o pH seja um parâmetro de extração relevante, os dados da literatura sobre a extração de pectina assistida por micro-ondas indicaram que o rendimento de pectina é maximizado a valores de pH variando de 1 a 3 (Bagherian et al., 2011; Seixas et al., 2014; Maran et al, 2015). Isso porque solventes de extração mais ácidos possuem a habilidade de entrar diretamente em contato com a pectina insolúvel e favorece a hidrólise de constituintes dessa pectina em pectina solúvel, aumentando assim a recuperação da pectina. O baixo pH também reduz o peso molecular da pectina que pode ser solubilizada por tecidos vegetais sem qualquer degradação propiciando a precipitação das moléculas de pectina (El-Nawawi & Shehata, 1988; Maran et al., 2015). O baixo pH também reduz o peso molecular da pectina, que pode ser solubilizada por tecidos vegetais sem qualquer degradação propiciando a precipitação das moléculas de pectina (Maran et al, 2015). Valores de pH superiores a 3, podem promover agregação de pectina, retardando assim a liberação de pectina e diminuindo o rendimento de extração. Os valores de pH das amostras de farinha de casca de pequi foram medidos (água + farinha + ácido cítrico) encontrando-se um valor médio de 2,3. Como esse valor já estava no intervalo recomendado, esse parâmetro não foi otimizado neste estudo.

**Tabela III 1:** Delineamento fatorial  $2^3$  com 3 pontos centrais para extração de pectina.

Experimento	Potência (W)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	400	3	60
2	800	3	60
3	400	9	60
4	800	9	60
5	600	6	80
6	600	6	80
7	600	6	80
8	400	3	100
9	800	3	100
10	400	9	100
11	800	9	100

*Delineamento gerado utilizando Minitab.*

### 2.3 Grau de esterificação

O grau de esterificação foi avaliado por espectroscopia do infravermelho. As análises foram realizadas no equipamento IRAffinity-1 (Shimadzu, Japão), com um detector DLATGS (Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-Alanine), que abrange a faixa de  $7800-370\text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , 20 scans e apodização Happ-Genzel utilizada antes da transformação de Fourier. As análises foram realizadas em atmosfera seca e à temperatura de  $20 \pm 0,5\text{ °C}$ . As medições de refletância difusa (RD) foram realizadas com o uso do acessório de amostragem da Shimadzu (DRS8000A). O cálculo das áreas foi realizado utilizando-se o software *OringiPro 8.5* a partir da razão das áreas dos picos correspondentes aos grupos carboxílicos livres ( $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ ) e esterificados ( $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ ) (MONSOOR, 2005). O grau de esterificação foi calculado de acordo com a equação III 1. Os resultados foram expressos em porcentagem.

$$\text{Grau de esterificação (\%)} = \frac{100 \times (\text{área COOR})}{(\text{área COOH} + \text{área COOR})} \quad (\text{eq. III 1})$$

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Rendimento de Extração de Pectina

Para o delineamento experimental foi utilizada a amostra FP1 em solução de ácido cítrico (0,1 M; pH 2,0) e solução de ácido acético (0,5 M; pH 2,0) com o objetivo de avaliar o efeito das variáveis estudadas e o tipo de ácido no rendimento de extração de pectina. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela III 2.

**Tabela III 2:** Rendimento de extração de pectina (expresso em porcentagem) obtido para o delineamento fatorial exploratório para cada um dos ácidos utilizados.

Experimento	Potência	Tempo (min)	Temperatura (°C)	FP1 (%)	
	(W)			Ác. Cítrico	Ác. Acético
1	400	3	60	12,75	12,38
2	800	3	60	15,29	15,21
3	400	9	60	15,02	13,92
4	800	9	60	17,18	13,91
5	600	6	80	19,67	14,76
6	600	6	80	18,74	14,65
7	600	6	80	18,57	15,22
8	400	3	100	17,25	16,17
9	800	3	100	18,25	18,63
10	400	9	100	17,60	13,64
11	800	9	100	20,33	17,03

FP1: farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi.

De acordo com os valores obtidos, percebe-se um aumento no rendimento de extração com o aumento da potência e temperatura, sendo o experimento 1, com as condições mais brandas, o que apresentou menor rendimento de extração para ambos os ácidos utilizados. O modelo  $R^2$  e o  $R^2$  ajustado (0.9858 e 0.9290, respectivamente) indicam um bom ajuste do modelo proposto aos dados. Pela Análise de Variância (ANOVA) (Tabela III 3) percebe-se comportamentos distintos das amostras frente ao tipo de ácido utilizado para a extração de

pectina. Para as extrações com ácido cítrico, a ANOVA não foi significativa para o fator tempo de extração ( $p < 0,05$ ), o que demonstra que esse não influencia no rendimento de pectina. De maneira análoga, as interações entre as fontes de variação, isto é, tempo X potência, tempo X temperatura, potência X temperatura e tempo X potência X temperatura, também não foram significativas, demonstrando que as variáveis interferem no rendimento de extração isoladamente. Dentre as variáveis analisadas, a temperatura exerce maior impacto no rendimento de extração de pectina, seguida pela potência, como pode ser observado no diagrama de Pareto (Figura III 2).

Para as extrações com ácido acético percebe-se, analisando-se os resultados obtidos na ANOVA ( $p < 0,05$ ), que todos os fatores são significativos no rendimento de extração de pectina. O diagrama de Pareto para os efeitos padronizados (Figura III 3) deixa clara a influência de cada fator no rendimento de extração de pectina por ácido acético, sendo a temperatura o fator que exerce maior impacto no rendimento obtido. De maneira contrária ao ocorrido para as extrações com ácido cítrico, os resultados obtidos pela ANOVA e confirmados pelo diagrama de Pareto para as extrações com ácido acético demonstram uma interação significativa entre tempo X temperatura e tempo X temperatura X potência para o rendimento de extração.

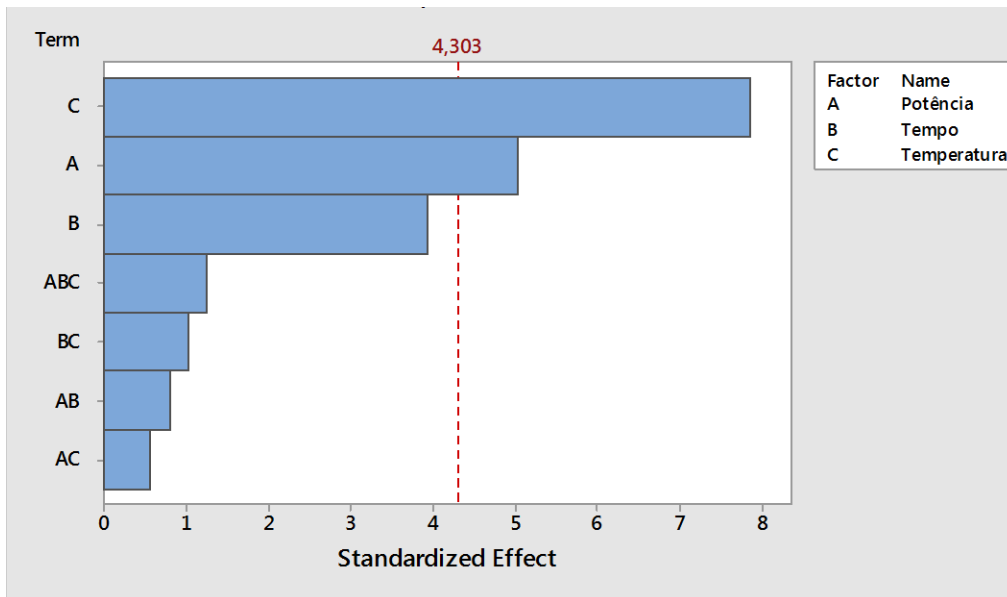
**Tabela III 3:** Análise de Variância para as extrações com Ácido Cítrico e Ácido Acético para as amostras FP1.

Fontes de Variação	F calculado	Valor p	F calculado	Valor p
	Ác. Cítrico	Ác. Cítrico	Ác. Acético	Ác. Acético
Potência	25,33	<b>0,037</b>	138,08	<b>0,007</b>
Tempo	15,48	0,059	20,69	<b>0,045</b>
Temperatura	62,02	<b>0,016</b>	102,76	<b>0,010</b>
Pot. X Tempo	0,65	0,505	4,99	0,155
Pot. X Temp.	0,34	0,621	12,55	0,071
Tempo X Temp.	1,07	0,410	26,11	<b>0,036</b>
Pot. X Tempo X Temp.	1,59	0,335	19,43	<b>0,048</b>

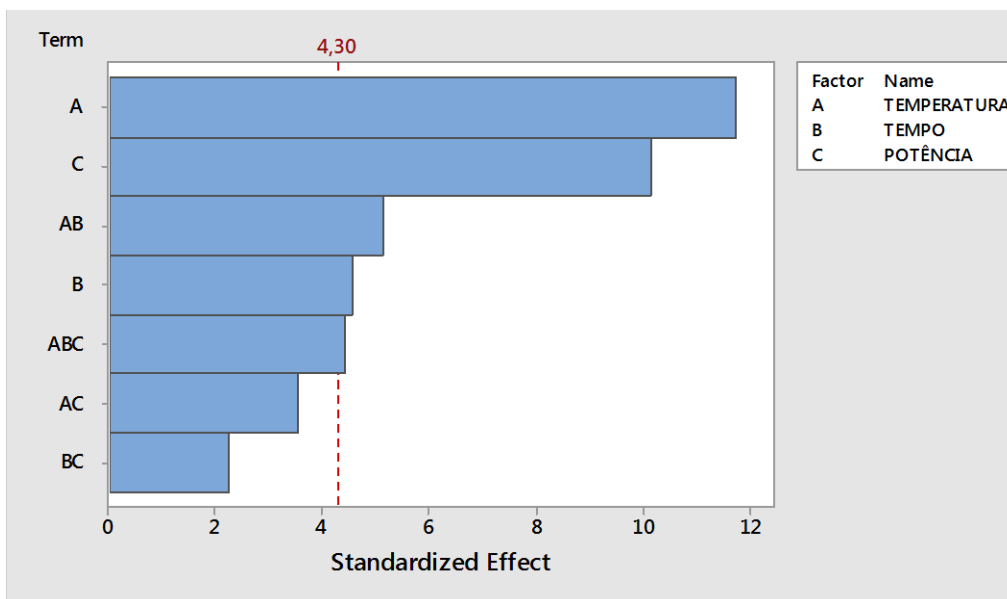
*ANOVA significativa:  $p < 0,05$*

FP1: farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi.





**Figura III 2:** Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados. Extração com ácido cítrico para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).



**Figura III 3:** Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados. Extração com ácido acético para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).

Como os fatores afetaram de forma distinta o rendimento de extração, diferentes delineamentos foram utilizados para a construção da superfície de resposta para cada tipo de ácido empregado. Dessa maneira os resultados para as extrações com ácido cítrico e ácido acético foram apresentados separadamente.

Uma vez que o tempo de extração não foi relevante para as extrações com ácido cítrico, um delineamento Composto Central Rotacional com 2 fatores contínuos foi realizado fixando-se o menor tempo de extração, isto é, 3 minutos para ambos os grupos amostrais (FP1 e FP2) (Tabela III 4).

**Tabela III 4:** Rendimento de pectina extraída de farinhas de casca de pequi (FP1 e FP2) utilizando-se solução de ácido cítrico e aquecimento por micro-ondas.

<b>Temperatura</b> (°C)	<b>Potência (W)</b>	<b>Rendimento FP1</b> %	<b>Rendimento FP2</b> %
52	600	14,56	10,56
60	400	12,75	9,91
60	800	15,29	12,83
80	317	16,45	11,28
80	600	13,53	12,11
80	600	13,64	13,59
80	600	13,64	10,68
80	883	16,36	11,25
100	400	17,25	16,30
100	800	18,25	15,60
108	600	20,79	16,23

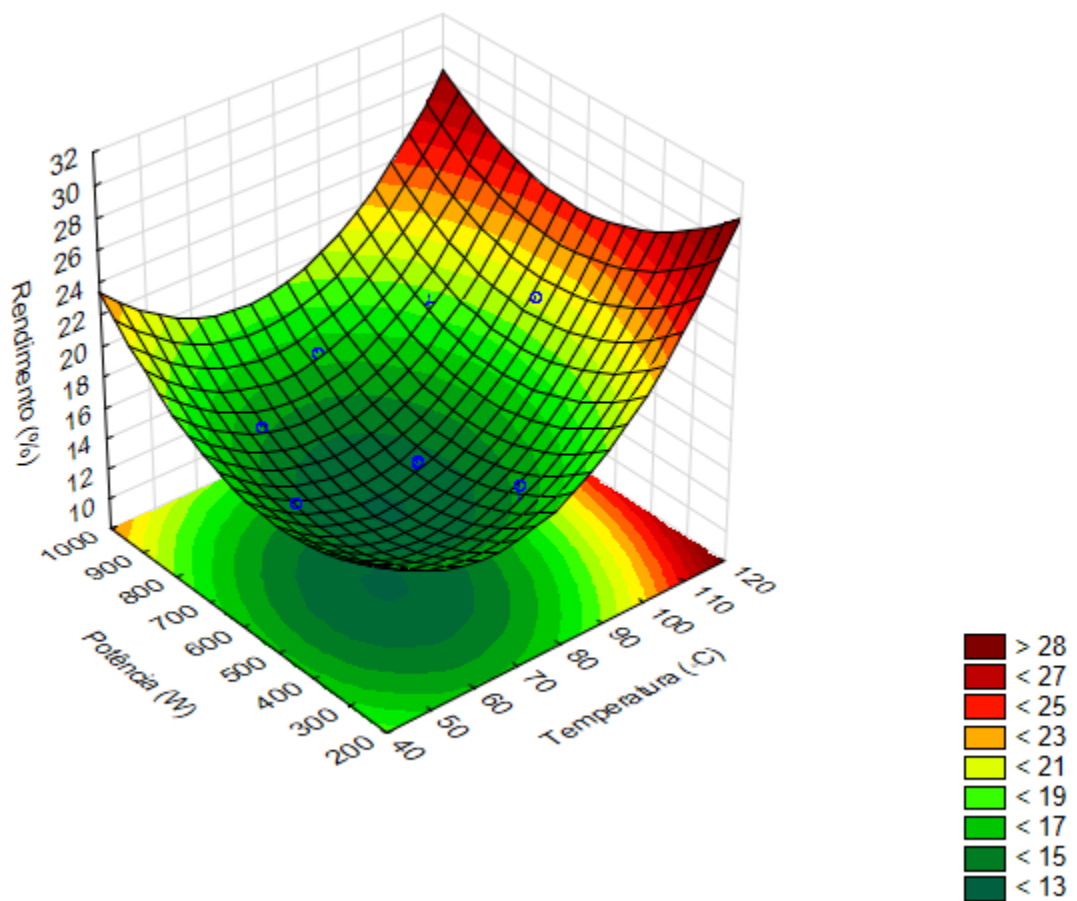
*Delineamento gerado utilizando Minitab.*

FP1: farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi. FP2: farinha de mesocarpo de pequi.

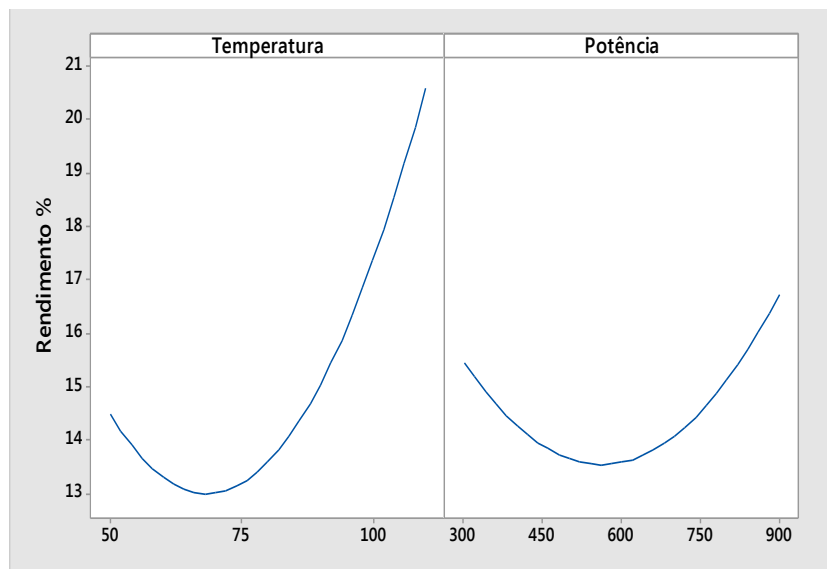
Pode-se perceber pela análise dos resultados que todos os tratamentos foram eficientes para extração de pectina. De maneira geral, as amostras de FP1 apresentaram maiores teores de pectina, o que já era esperado uma vez que as amostras contendo exocarpo apresentaram maiores teores de ácidos urônicos (Tabela II 2). Para ambos os grupos amostrais, há uma tendência no aumento do rendimento de extração com o aumento da temperatura, seguido pelo aumento da potência.

Nas figuras III 4 e III 6 são apresentadas as superfícies de resposta para os rendimentos de pectina em função da potência e temperatura para as amostras FP1 e FP2, respectivamente. As figuras III 5 e III 7, por sua vez, apresentam os gráficos com a relevância de cada fator avaliado no rendimento obtido de pectina.

Percebe-se pela análise das figuras III 4 e III 5 (FP1), um aumento considerável do rendimento de extração com o aumento da temperatura e da potência. Mesmo em potências mais baixas, aumentando-se a temperatura, consegue-se um incremento na extração de pectina.

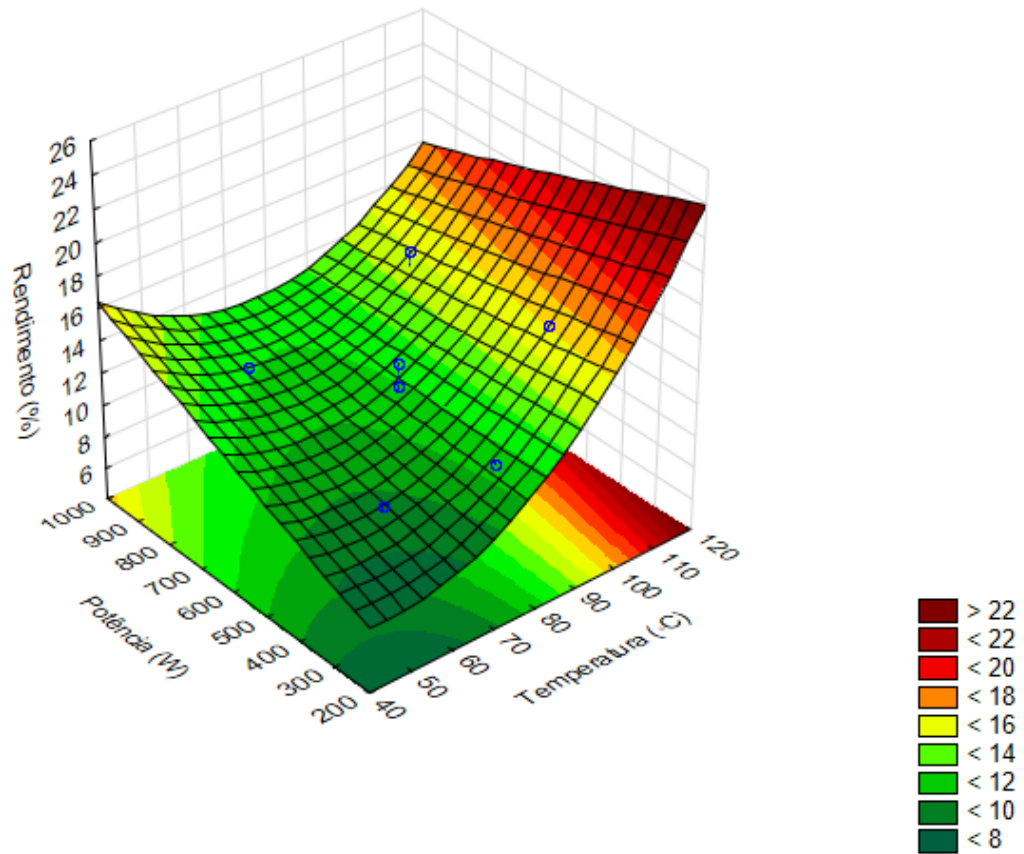


**Figura III 4:** Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e potência na extração de pectina para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).

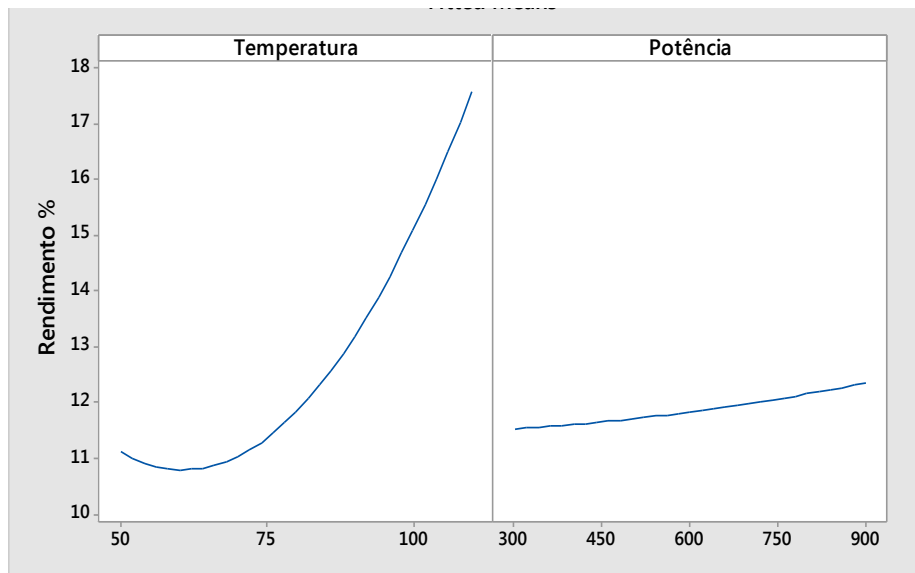


**Figura III 5:** Gráfico dos efeitos principais para rendimento de pectina extraídas com ácido cítrico: FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).

Nos gráficos III 6 e III 7 (FP2), por sua vez, é possível verificar que a potência exerceu uma influência menos intensa do que na extração de FP1. Uma possível explicação é devido à ausência de exocarpo e menor teor de fibras e substâncias lignocelulósicas, favorecendo a extração de pectina mesmo em potências mais baixas.



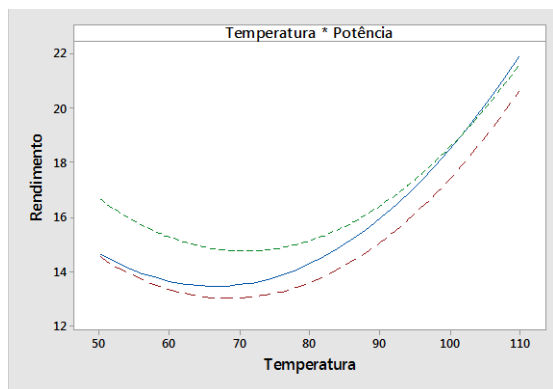
**Figura III 6:** Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e potência na extração de pectina para FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).



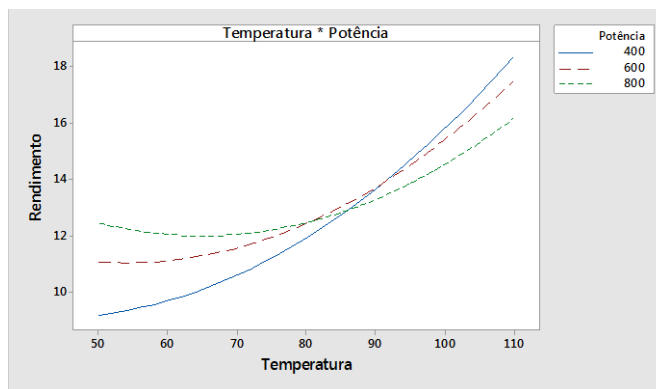
**Figura III 7:** Gráfico dos efeitos principais para rendimento de pectina extraídas com ácido cítrico: FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).

Dentre os tratamentos realizados, pode-se concluir que os melhores parâmetros de extração foram obtidos à temperatura de 108 °C e potência máxima de 600 W (Tabela III 4). O uso de potências mais elevadas levou a um decréscimo do rendimento de pectina. Isso pode ter ocorrido uma vez que o aumento da potência a níveis muito elevados pode ocasionar desordem molecular com consequente degradação de polissacarídeos pécnicos, acarretando redução no teor de pectina extraída (MARAN et al, 2015).

Nas Figuras III 8 e III 9, são apresentados os gráficos de interação das parcelas para o rendimento. Percebe-se que o teor de pectina obtida tende a aumentar com o incremento dos dois fatores avaliados, entretanto, a temperatura promove um maior aumento no teor de pectina obtida quando comparado com o aumento da potência.



**Figura III 8:** Interação entre potência e temperatura e influência sobre o rendimento de extração de pectina para FP1 (farinha de mesocarpo e exocarpo de pequi).



**Figura III 9** Interação entre potência e temperatura e influência sobre o rendimento de extração de pectina para FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).

Para as extrações com ácido acético o delineamento Composto Central Rotacional foi realizado considerando-se todos os três fatores previamente avaliados, uma vez que todos eles influenciaram significativamente o rendimento de extração. Os resultados obtidos para a extração são apresentados na Tabela III 5.

**Tabela III 5:** Rendimento de pectina extraída de pós rico em fibras a partir de casca de pequi (FP1 e FP2) utilizando-se solução de ácido acético e aquecimento por micro-ondas.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Potência (W)	Rendimento FP1 %	Rendimento FP2 %
46	6	600	17,13	11,53
60	3	400	15,21	13,34
60	3	800	12,38	10,41
60	9	400	13,92	12,30
60	9	800	13,91	11,97
80	6	263	16,10	13,91
80	6	600	14,76	12,33
80	6	600	14,65	11,83
80	6	600	15,22	11,93
80	1	600	16,37	13,69
80	11	600	15,53	15,36
80	6	936	16,43	13,84
100	3	400	16,17	15,32
100	9	400	13,64	14,20
100	3	800	18,63	15,69
100	9	800	17,03	14,67
114	6	600	17,89	14,00

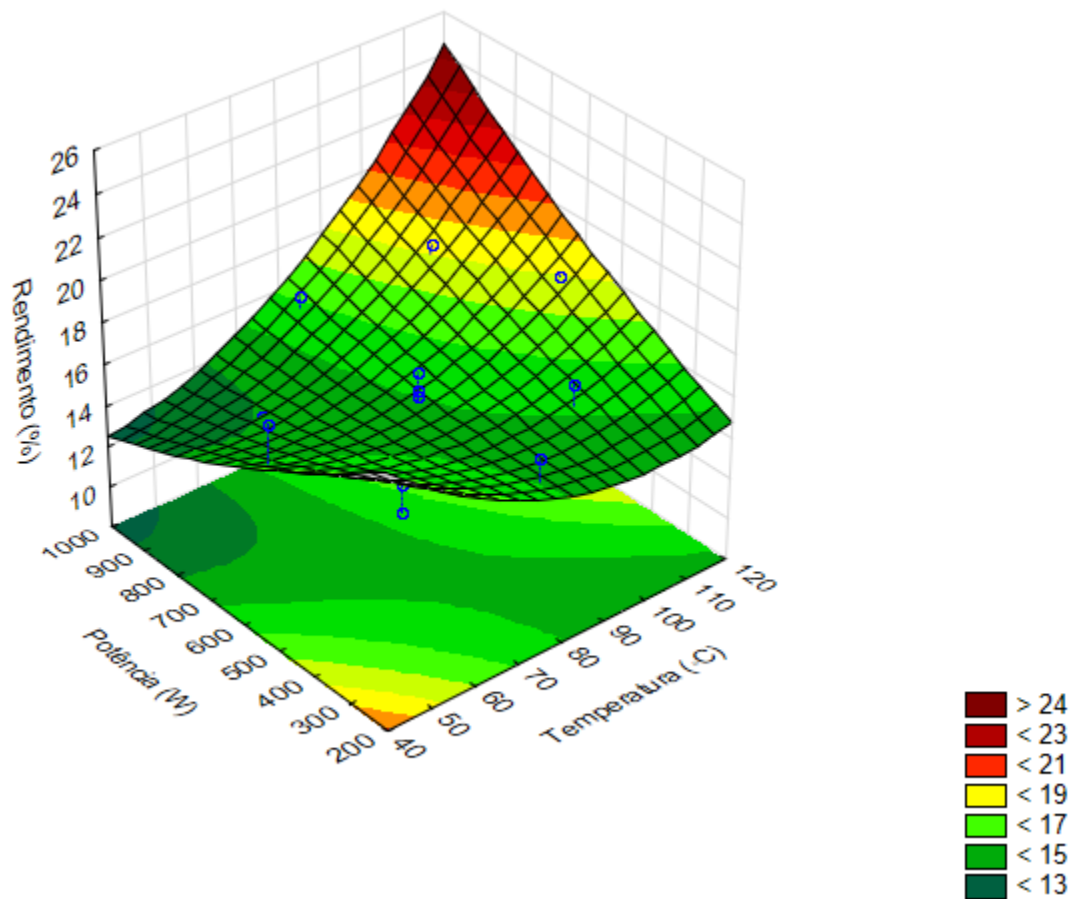
*Delineamento gerado utilizando Minitab.*

FP1: farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi. FP2: farinha de mesocarpo de pequi.

De forma semelhante aos resultados obtidos pelas extrações com ácido cítrico, nota-se o aumento no rendimento de extração com o aumento da temperatura. Para ambas as amostras, o maior rendimento de extração foi obtido utilizando-se altas temperaturas e potências sendo os melhores resultados obtidos com o tratamento  $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $P = 800\text{ W}$ ; e  $t = 3$  minutos. Quando comparados com os resultados obtidos pela a extração com ácido cítrico, percebe-se rendimento ligeiramente inferior para as amostras extraídas com ácido acético.

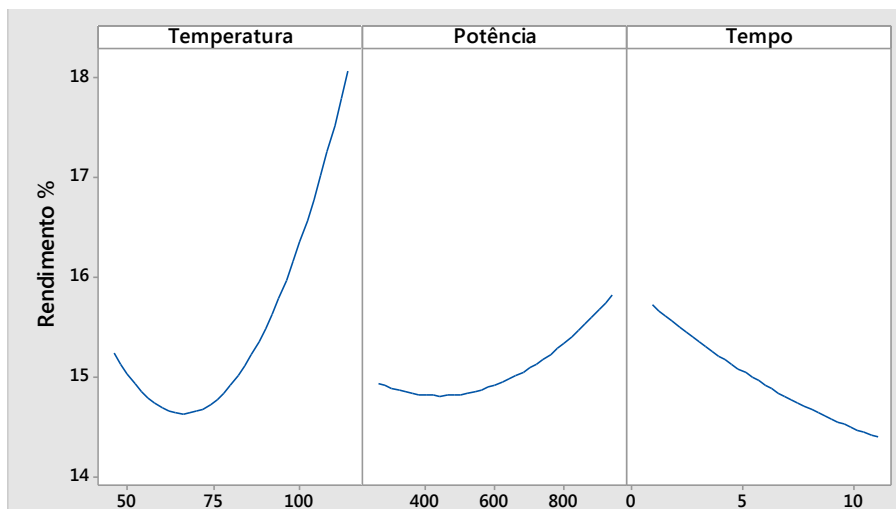
Os gráficos III 10 e III 12 apresentam as superfícies de resposta para os rendimentos de pectina extraídas com ácido acético em função da potência e temperatura para as amostras FP1 e

FP2, respectivamente. Nas figuras III 11 e III 13 são apresentados os gráficos dos efeitos principais no rendimento obtido de pectina para FP1 e FP2, respectivamente. Percebe-se pela análise dos gráficos III 10 e III 11 (FP1), um aumento considerável do rendimento de extração com o aumento da temperatura e da potência. Mesmo em potências mais baixas, aumentando-se a temperatura, consegue-se um incremento na extração de pectina. Por outro lado, o aumento do tempo causa uma redução do rendimento de pectina.

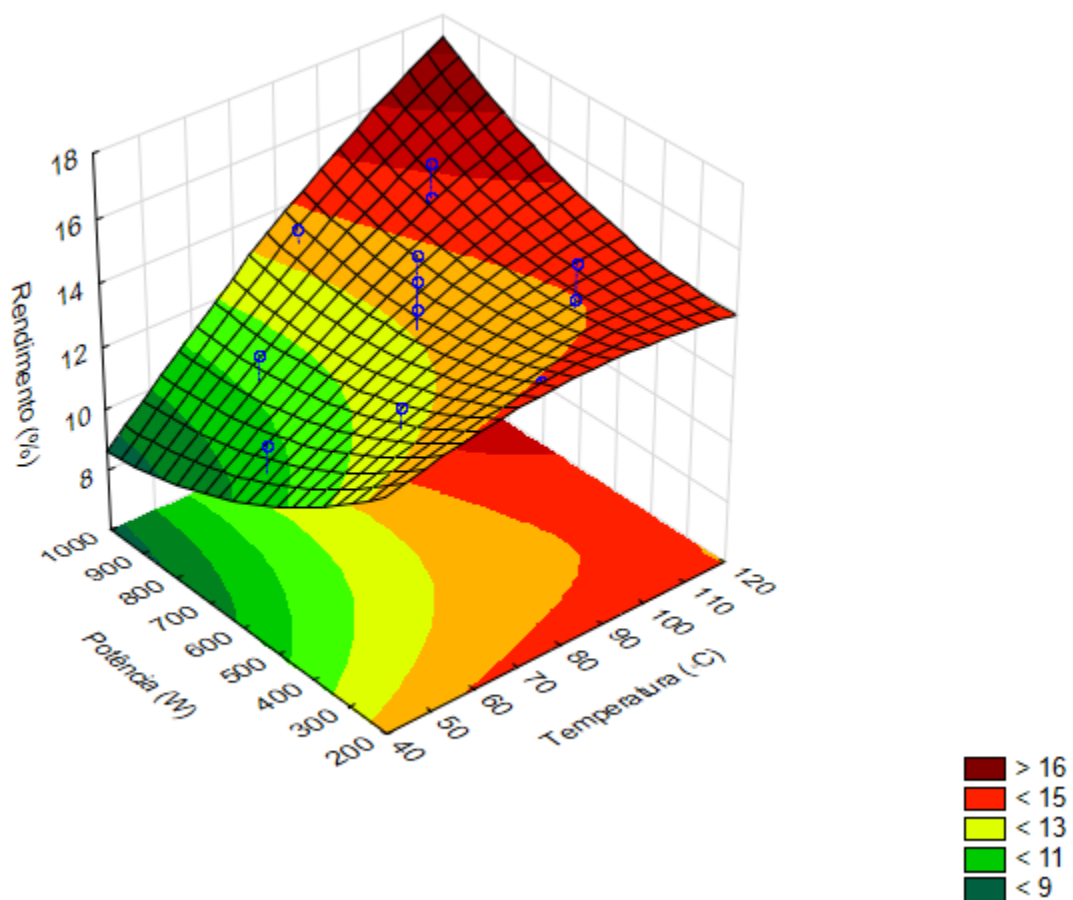


**Figura III 10:** Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e potência na extração de pectina com ácido acético para FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).

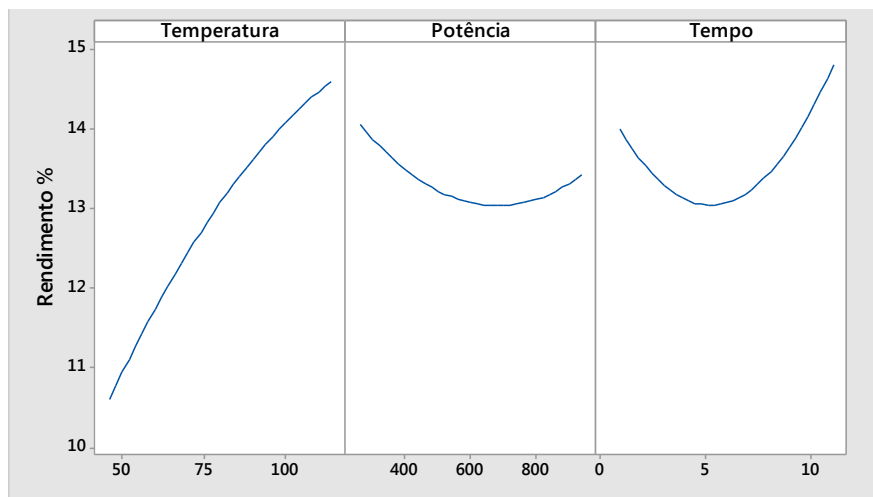




**Figura III 11:** Gráfico dos efeitos principais para rendimento de pectina extraídas com ácido acético: FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).



**Figura III 12** Superfície de resposta mostrando o efeito da temperatura e potência na extração de pectina com ácido acético para FP2.

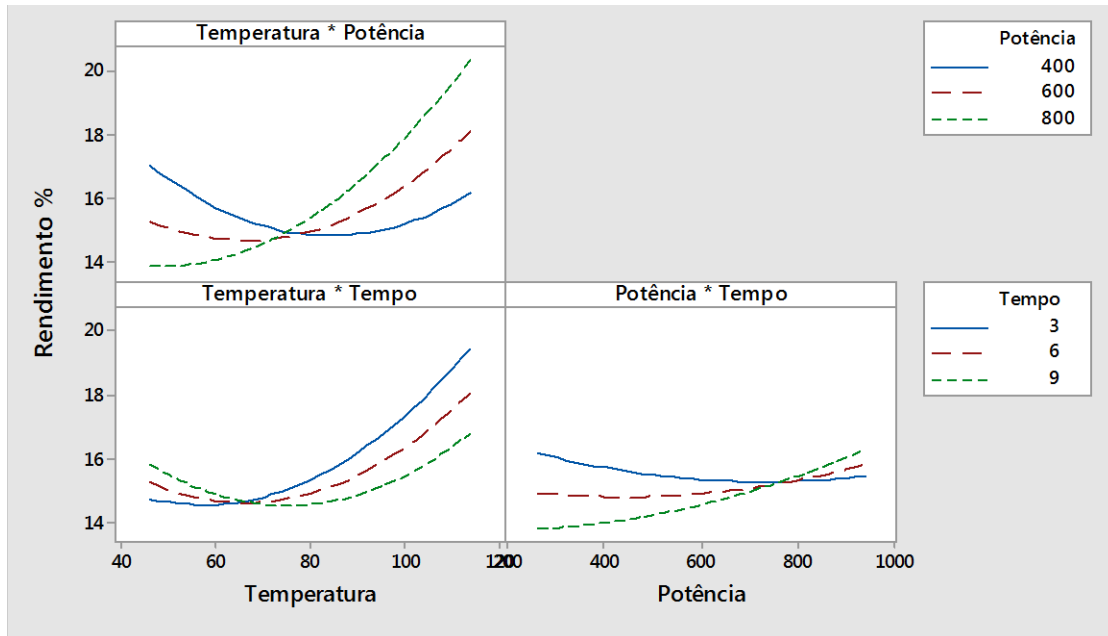


**Figura III 13:** Gráfico dos efeitos principais para rendimento de pectina extraídas com ácido acético: FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).

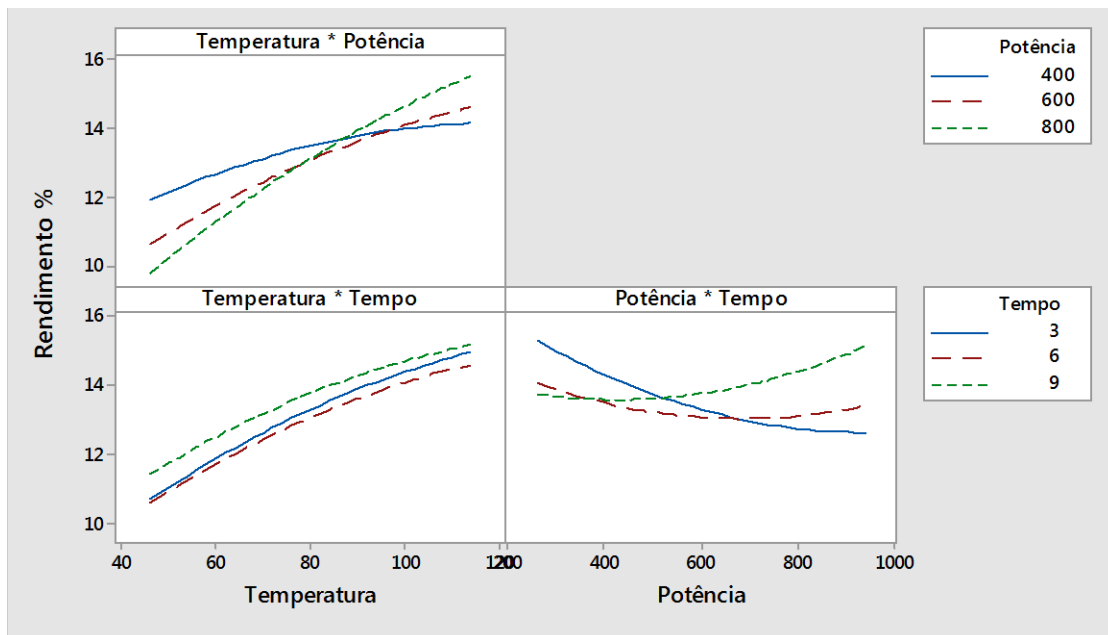
Em FP2, percebe-se um comportamento diferenciado. A temperatura permanece como o fator de maior impacto no rendimento de pectina. Tratamentos com elevada potência e temperatura e baixo tempo de extração também acarretam em elevado rendimento. Entretanto, se, em um mesmo tratamento, são utilizados potência e tempo elevados, ocorre um decréscimo de rendimento. Esse fato também é confirmado analisando-se a interação entre os fatores estudados nos gráficos apresentados na figura III 15. A redução do teor de pectina pela combinação de altas potências e tempos elevados pode ser explicado uma vez que o material celular exposto por um tempo elevado a altas potências de micro-ondas pode levar à desordem molecular e, conseqüentemente, à degradação de polissacarídeos pécnicos (MARAN et al., 2015). Além disso, a absorção da energia das micro-ondas no sistema de extração promove um acúmulo térmico da solução de extração, permitindo a dissolução da pectina na solução extratora. Se esse sistema é exposto por um tempo excessivo às micro-ondas, favorecem a degradação das moléculas da cadeia de pectina, afetando o rendimento de extração. A não observância desse fato nas amostras FP1 pode dever-se à presença do exocarpo.

Os gráficos das figuras III 14 e III 15 apresentam a maneira como a interação entre cada fator interfere no rendimento de extração de pectina das amostras FP1 e FP2, respectivamente, extraídas com ácido acético. Percebe-se que a temperatura é o fator mais relevante no rendimento de extração de pectina, isso fica claro observando-se a interação entre temperatura x potência e temperatura x tempo. Por outro lado, contrastando-se potência e tempo, a interação

dos fatores pouco influi no rendimento de extração, esse comportamento corrobora com os resultados apresentados no diagrama de Pareto (Figura III 3) no qual a interação dos fatores potência X tempo não é significativa.



**Figura III 14:** Efeito da interação entre os fatores no rendimento de extração de pectina com ácido acético para as amostras de FP1 (farinha de exocarpo e mesocarpo de pequi).



**Figura III 15:** Efeito da interação entre os fatores no rendimento de extração de pectina com ácido acético para as amostras de FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).

De maneira geral, pode-se concluir que ambos os ácidos utilizados foram eficientes na extração de pectina com aquecimento em micro-ondas para farinhas obtidas a partir de casca de pequi, entretanto, as extrações com ácido cítrico resultaram em maiores rendimentos de pectina. Para ambos os ácidos utilizados, percebe-se um maior rendimento de extração para as amostras FP1. Isso pode ser devido ao maior teor de fibras alimentares encontrado para FP1 (43,3%) em relação a FP2 (39,8%) (Leão, 2013; Leão et al, 2017) e ao maior teor de ácidos urônicos presentes nessa amostra (Capítulo 2).

O fator tempo não afetou de forma significativa o rendimento de extração de pectina em nenhum dos tratamentos adotados, sendo assim, um menor tempo de extração pode ser empregado para a realização do processo de extração. O tempo reduzido de extração por micro-ondas se dá uma vez que a energia é dissipada diretamente para os componentes reacionais, resultando em temperaturas elevadas de forma instantânea. Dessa maneira, o calor transferido é mais efetivo do que no aquecimento convencional, e a reação pode ser concluída em um tempo bem menor (MOTASEMI E ANI, 2012).

O fator temperatura foi o mais influente no rendimento de extração de pectina, sendo estatisticamente significativo em todos os tratamentos avaliados. Percebe-se também, uma tendência de aumento de extração quando os fatores potência e temperatura são elevados em um curto período de extração. As pectinas se encontram nos espaços arranjados nas microfibrilas e entre as camadas de microfibrilas da parede celular vegetal, formando uma rede tridimensional hidrofílica (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2005). Quando há a absorção da energia das micro-ondas no sistema de extração ocorre um acúmulo térmico da solução de extração, permitindo a dissolução da pectina na solução. Isso ocorre porque a energia das micro-ondas atua como uma radiação eletromagnética, que aumenta o afrouxamento da matriz da parede celular rapidamente, aumentando a penetração do solvente no interior da matriz da planta e conduzindo à lixiviação de pectina durante o processo de aquecimento por micro-ondas. Com o aumento da potência e temperatura, mais energia eletromagnética é transferida de forma rápida às biomoléculas, por condução iônica e rotações dipolo. Esses fenômenos resultam em mais potência dissipada no interior do material solvente e vegetal e, em seguida, geram movimento molecular e aquecimento no sistema de extração de forma rápida, melhorando a eficiência de extração.

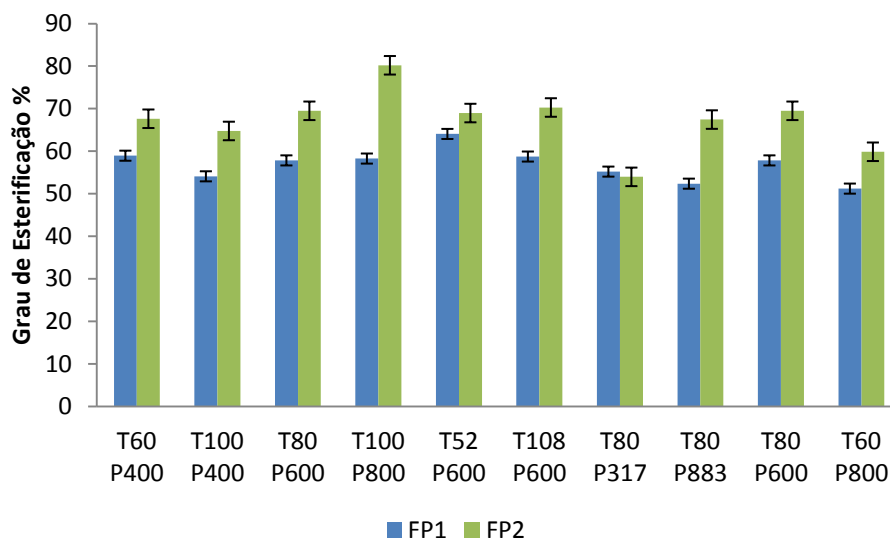
A casca de pequi demonstrou grande potencial para extração de pectinas utilizando-se aquecimento em micro-ondas. Uma comparação com a extração de pectina por aquecimento

convencional indicou que os rendimentos de extração obtidos no presente trabalho são superiores ou proporcionais a de outros resíduos, incluindo resíduos de Jacat (Begun et al., 2014) e cascas de maracujá (Liew et al., 2014). Os presentes resultados em termos de rendimento também foram semelhantes aos relatados para extração convencional de pectina de cascas de pequi (68-98 °C / 60-80 min) empregando ácido cítrico (Siqueira et al., 2012). No entanto, o aquecimento convencional exigiu tempo de extração mais longo, o que levou à degradação das ligações éster em grupos carboxílicos e conseqüentemente um produto de baixo teor de esterificação (12 - 49%) em comparação com os resultados obtidos para a extração em micro-ondas (51 - 80% DE). Ambos os ácidos utilizados no presente estudo foram eficientes para a extração, entretanto, extrações com ácido cítrico resultaram em rendimentos ligeiramente superiores. Por isso e, por se tratar de um ácido orgânico com baixa toxicidade e baixo custo, o ácido cítrico torna-se uma alternativa mais interessante para a extração de pectina utilizando-se aquecimento em micro-ondas.

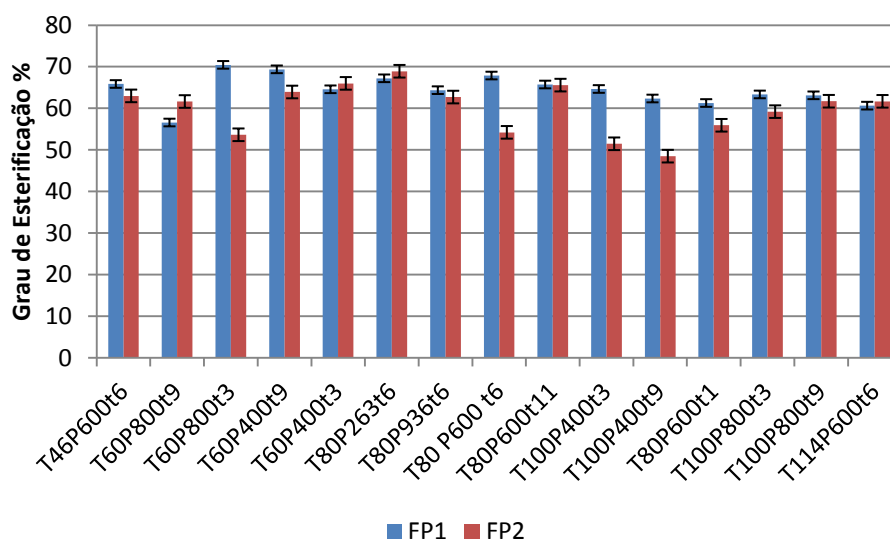
### **3.2 Grau de Esterificação das Pectinas**

O grau de esterificação, que é utilizado como critério de classificação das pectinas, mede a proporção dos grupos de ácido galacturônico metilados em relação ao total de grupos de ácido galacturônico presentes na molécula de pectina. O grau de esterificação afeta especialmente o mecanismo de formação de géis pela pectina.

Os resultados encontrados para o grau de esterificação de pectina extraídas com ácido cítrico e ácido acético são apresentados nas figuras III 16 e III 17, respectivamente.



**Figura III 16:** Grau de esterificação das pectinas extraídas com ácido cítrico obtidos para FP1 (farinha de exocarpo r mesocarpo de pequi) e FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).

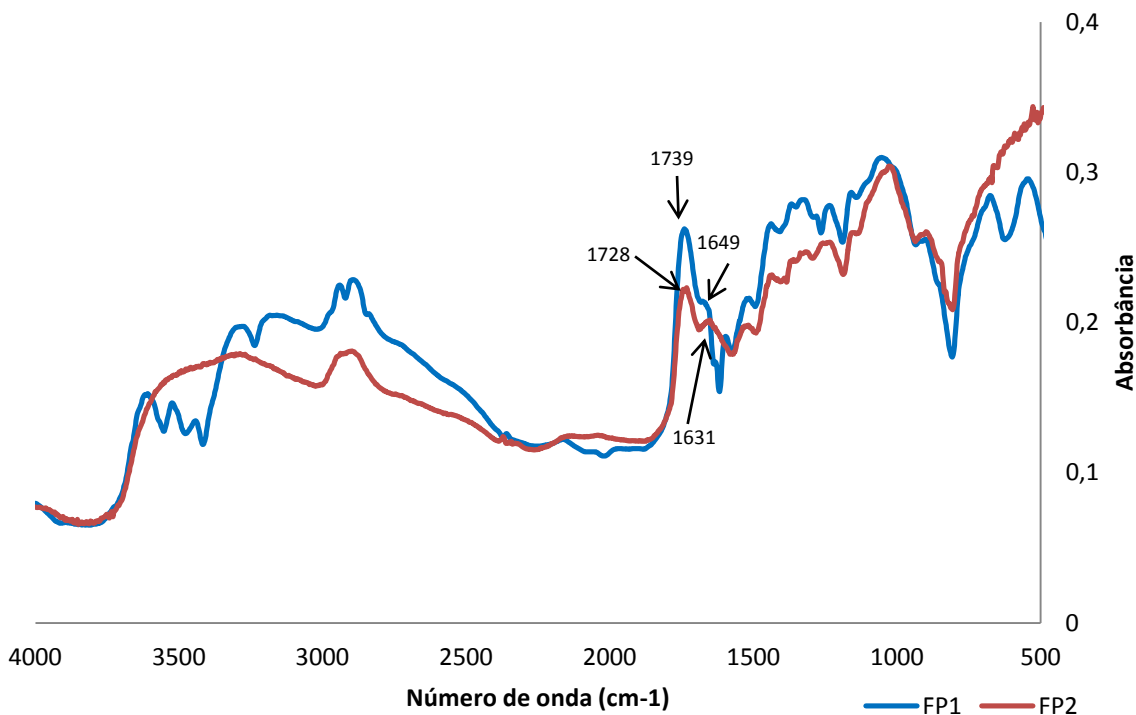


**Figura III 17:** Grau de esterificação das pectinas extraídas com ácido acético obtidos para FP1 (farinha de exocarpo r mesocarpo de pequi) e FP2 (farinha de mesocarpo de pequi).

As pectinas obtidas a partir de farinhas de casca de pequi no presente estudo foram de alto grau de esterificação (> 50%) tanto para extrações com ácido cítrico quanto para extrações com ácido acético. Apenas um tratamento de FP2 (extração com ácido acético 100 °C/400W/9 minutos) apresentou grau de esterificação ligeiramente inferior a 50% (48,5%). Os graus de esterificação variaram, em geral, de 50% a 70%, demonstrando que os tratamentos exerceram

influência nesse parâmetro. Pectinas com auto grau de esterificação são consideradas mais importantes e são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos como agentes geleificantes e estabilizantes de bebidas, sorvetes e produtos de confeitaria. A presença de cadeias laterais, principalmente com unidades de arabinose e galactose, afeta significativamente as propriedades funcionais das pectinas, tais como solubilidade, geleificação, formação de filme e propriedades reológicas, além de favorecer a agregação em soluções concentradas (BRANDÃO E ANDRADE, 1999).

Os espectros apresentaram grande semelhança, tanto entre os grupos amostrais, quanto entre os tipos de ácidos utilizados. Por isso, são apresentados na figura III 18, como forma de exemplificação os espectros das pectinas isoladas de FP1 e FP2 por extração com ácido cítrico. Nota-se uma forte banda O-CH<sub>3</sub> entre 3000 e 2800 cm<sup>-1</sup> devido aos grupos metil-éster do ácido galacturônico das pectinas. Entretanto, dado a uma intensa resposta do estiramento O-H que ocorre em uma banda ampla (3600-2500 cm<sup>-1</sup>) a intensidade de O-CH<sub>3</sub> pode ser mascarada, não servindo como um bom indicativo de metoxilação em pectinas (GNANASAMBANDAM E PROCTOR, 2000). Uma segunda região (1800-1500 cm<sup>-1</sup>) de forte absorção desperta especial interesse na investigação do grau de esterificação das pectinas uma vez que permite inferir sobre a absorção de grupos carboxílicos e éster carboxílicos presentes nas mesmas (CHATJIGAKIS et al, 1998).



**Figura III 18:** Espectros de infravermelho por transformada de Fourier para reflectância difusa das amostras de pectinas isoladas das amostras FP1 e FP2 extraídas com ácido cítrico.

A análise dessa região espectral revelou a presença de duas bandas em torno de  $1740\text{ cm}^{-1}$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ , sendo a primeira mais pronunciada, o que é coerente ao elevado grau de esterificação obtido para as pectinas isoladas. Isso porque a banda centrada em  $1740\text{ cm}^{-1}$  corresponde à absorção de grupos carboxílicos esterificados das moléculas de pectina, enquanto a banda em  $1650\text{ cm}^{-1}$  refere-se à absorção de ânions carboxilatos.

Muitos estudos baseiam-se na relação entre a área sobre a banda encontrada em  $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  para determinação do grau de esterificação de pectinas. Entretanto, picos referentes à absorção de outros grupamentos funcionais podem ocorrer na mesma região espectral, contribuindo de maneira errônea para o aumento da absorção dos picos de interesse para o cálculo do grau de esterificação.

Devido a isso, foi realizada a derivada segunda dos espectros (não apresentada) obtidos para as amostras de pectina a partir de FP1 e FP2. A derivação espectral permite uma melhor individualização dos constituintes pelo aumento do número de bandas de absorção. Isso permite a eliminação de bandas largas e melhorando a detectabilidade das pequenas características espectrais (DONATO et al, 2010).



No presente estudo, duas bandas características de absorção de ácidos carboxílicos e ésteres carboxílicos de moléculas de pectinas foram detectadas em  $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  e  $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Quando aplicada a derivada segunda na região entre  $1800\text{ cm}^{-1}$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  foram detectados 4 picos relevantes:  $1612\text{ cm}^{-1}$ ,  $1632\text{ cm}^{-1}$ ,  $1649\text{ cm}^{-1}$  e  $1747\text{ cm}^{-1}$ . O pico obtido em  $1649\text{ cm}^{-1}$  é característico de amidas do tipo I, sendo um indicativo da presença de proteínas. Em estudo anterior, Leão (2013) identificou a presença de proteínas em farinhas de casca de pequi com um teor de aproximadamente 3,5%. O pico identificado em  $1632\text{ cm}^{-1}$  é correspondente à absorção de água. Dessa maneira, ambos os picos citados podem contribuir para a absorção verificada em  $1649\text{ cm}^{-1}$ . O terceiro pico que contribui para a banda em  $1649\text{ cm}^{-1}$  é absorvido em  $1612\text{ cm}^{-1}$  e foi identificado como absorção do estiramento carboxilato dos grupos éster da pectina (CHATJIGAKIS et al, 1998). Evidentemente, apenas a área desse terceiro pico foi calculada para a determinação do grau de esterificação das pectinas.

#### **4 Conclusão Parcial**

Os resultados obtidos nesse capítulo indicam que a extração de pectinas por aquecimento em reator de micro-ondas das farinhas de pequi é eficiente em um tempo de 3 minutos. A temperatura foi o principal fator no rendimento das pectinas obtidas. O melhor tratamento para extração de pectinas com ambos os ácidos testados foi  $108\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $600\text{ W}$ . De maneira geral as amostras de FP1 apresentaram rendimento ligeiramente superior às amostras de FP2. Em contrapartida, as pectinas obtidas a partir de FP2 apresentaram grau de esterificação ligeiramente superior às obtidas de FP1. Apesar disso, as pectinas obtidas em todos os tratamentos apresentaram alto grau de esterificação demonstrando o potencial das farinhas de pequi como fonte de pectinas de interesse comercial.

### 3 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos pelas análises de polifenóis não-extraíveis (antioxidantes macromoleculares) confirmaram que a capacidade antioxidante das farinhas de cascas de pequi (FP1 e FP2) é ainda maior do que aquela obtida por Leão (2013) e, posteriormente confirmada por Monteiro et al. (2015). Isso porque, descobriu-se no presente estudo que estão retidos na matriz das fibras alimentares teores consideráveis de compostos com capacidade antioxidante, como os taninos condensáveis. Além da presença de compostos retidos na matriz da fibra, foi detectado nas farinhas um elevado teor de carotenoides, o que pode explicar, em parte, a atividade antioxidante das amostras em estudo.

O perfil de compostos fenólicos, avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência revelou a presença de ácido gálico, ácido elágico e etil galato nas amostras de farinhas de casca de pequi. O ácido gálico tem sido relatado como importante no tratamento de alguns tipos de câncer, como hepatocarcinomas e melanomas. O etil galato, um éster derivado do ácido gálico e pertencente ao grupo dos galotaninos, foi encontrado em altas concentrações nas amostras de farinha de casca de pequi. Estudos com etil galato tem demonstrado seu potencial antiinflamatório, cicatrizante e anticarcinogênico. O ácido elágico, presente em concentrações elevadas nas farinhas de casca de pequi, tem se mostrado promissor no tratamento diversas doenças hepáticas.

Os resultados obtidos pela análise de cromatografia a gás e FTIR evidenciam a presença de diferentes polissacarídeos pécnicos, como ácidos galacturônico e manurônico sendo indicativo da presença de pectina nas amostras. A avaliação dos resultados das análises de infravermelho e cromatografia a gás sugerem ainda a presença de diferentes hemiceluloses, como  $\beta$ -arabinogalactanas, xiloglucanas e glucomanas.

O processo de extração de pectina com aquecimento em micro-ondas foi efetivo para ambos os grupos amostrais (FP1 e FP2). De maneira geral, as amostras FP1 apresentaram maior teor de pectina, o que já era esperado, uma vez que esse grupo possui um maior teor de fibras alimentares quando comparado a FP2. O ácido cítrico resultou em maior rendimento de extração quando comparado ao ácido acético e, para o primeiro, o tempo foi estatisticamente não significativo, sendo assim, um menor tempo de extração pode ser empregado. Além disso o

ácido cítrico possui menor toxicidade e baixo custo, sendo a melhor opção de solução extratora. Com relação ao grau de esterificação, as pectinas obtidas foram de alto grau de esterificação (>50%), demonstrando grande potencial de aplicação na indústria em alimentos processados como ingrediente gelificante.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que a casca do pequi, seu principal resíduo, possui grande potencial de utilização como ingrediente funcional, sendo fonte de antioxidantes e fibras alimentares. Além disso, possui um importante papel tecnológico, uma vez que foi determinada a presença e viabilidade de extração de pectinas de alto grau de esterificação.

## 4 TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho para o teor total de carotenoides, e de polifenóis não extraíveis (antioxidantes macromoleculares) sugere-se a investigação do perfil desses compostos presentes nas amostras de farinhas de casca de pequi por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Uma vez que, pela análise de avaliação do perfil de compostos fenólicos detectou-se compostos precursores e derivados de taninos, sugere-se a determinação de taninos totais em farinhas de casca de pequi.

Ao longo de todo o experimento desenvolvido percebeu-se uma intensa formação de espuma quando da mistura das amostras com soluções aquosas e/ou alcoólicas. Dessa maneira, torna-se interessante a avaliação da presença de saponinas nas amostras de farinha de casca de pequi. As saponinas possuem capacidade emulsificante, tornando o produto interessante do ponto de vista tecnológico. Além disso, taninos e saponinas já foram identificados como princípios ativos de vários extratos vegetais pesquisados pela farmacognosia mundial, podendo ser a presença desses compostos, um fator de agregação de valor ao produto.

Para uma utilização segura e adequada das farinhas de casca de pequi, torna-se relevante a realização de experimentação *in vivo* para se definir uma ingestão diária do produto.

Por fim, sugere-se o isolamento e utilização das pectinas extraídas por aquecimento em micro-ondas, em algum alimento processado, como geleias ou doces de frutas, por exemplo.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-ESTRADA, B.A.; GUTIERREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDIVAR, S.O. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry* 152, 46–55, 2014.
- AGÓCS, A., NAGY, V., SZABÓ, Z., MÁRK, L., OHMACHT, R., DELI, J. (2007). Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8, 390–394.
- AGOSTINI-COSTA, T.; VIEIRA, R. F. Os alimentos naturais do Cerrado. *Economia e Desenvolvimento*. Dez. 2004.
- AJILA, C.M.; PRASADA RAO, U.J.S. Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of functional foods* 5 (2013) 444–450.
- ALVES, C. O.; RESENDE, J. V.; CRUVINEL, R.S.R.; PRADO, M. E. T. *Stability of the microstructure and carotenoids contents of the freeze-dried pequi (Caryocar brasiliense Camb.) pulp in the powdered form*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(4): 830-839, out.-dez. 2008.
- AMARAL, L. F. B., MORIEL, P., FOGLIO, M. A. AND MAZZOLA, P. G. (2014). Evaluation of the cytotoxicity and phototoxicity of Caryocar brasiliense supercritical carbon dioxide extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:450 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/450>
- ANGELO, P. M. ; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – A brief review. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(1): 232-240, 2007.
- ARAÚJO, V. M. C.; MONTEBELLO, N. P.; BOTELHO, R. B. A; BORGIA, L. A. *Alquimia dos Alimentos*. Senac ISBN-10: 8598694304; ISBN-13: 978-8598694306, 2007.
- ARRANZ, S.; SAURA CALIXTO, F.; SHAHA, S.; KROON, P.A. High Contents of Nonextractable Polyphenols in Fruits Suggest That Polyphenol Contents of Plant Foods Have Been Underestimated. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7298–7303, 2009.
- ARUONA, O. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* 523–524 (2003) 9–20.
- AYALA-ZAVALA, J.F.; ROSAS-DOMÍNGUEZ, C.; VEGA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A. Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science* 75 (2010) 175-181.

- AZEVÊDO, J. C. S.; BORGES, K. C.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P.; VATTEM, D. A. Neuroprotective effects of dried camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh) residue in *C. elegans*. *Food Research International* 73 (2015) 135–141
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* 17 (2004) 385–396.
- BADRI, K.; JUAN, C.A.; HASSAN, O.; MUSTAPHA, W.A.W. Analytical approaches of determining monosaccharides from alkaline-treated palm fiber. *Malaysian Journal of Analytical Sciences, Vol 19 No 1: 46 – 54, 2015.*
- BALUCHNEJADMOJARAD, T., RABIEE, N., ZABIHNEJAD, S. & ROGHANI, M. Ellagic acid exerts protective effect in intrastriatal 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease: Possible involvement of ERb/Nrf2/HO-1 signaling. *Brain Research* 1662, 23–30, 2017.
- BARBULOVA, A.; COLUCCI, G.; APONE, F. New Trends in Cosmetics: By-Products of Plant Origin and Their Potential Use as Cosmetic Active Ingredients. *Cosmetics* 2, 82-92; 2015. doi:10.3390/cosmetics2020082
- BATISTA, A. G., FERRARI, A. S., DA CUNHA, D. C., DA SILVA, J. K., CAZARIN, C. B. B., CORREA, L. C., PRADO, M. A., CARVALHO-SILVA, L. B., ESTEVES, E. A., JÚNIOR, M. R. M. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chemistry* 197 (2016) 1153–1159.
- BARROS, A.S., MAFRA, I., FERREIRA, D., CARDOSO, S., REIS, A., LOPES DA SILVA, J.A., DELGADILLO, I., RUTLEDGE, DN. & COIMBRA, M.A. (2002) Determination of the degree of methylesterification of pectic polysaccharides by FT-IR using an outer product PLS1 regression. *Carbohydrates Polymers*, 50, 85-94.
- BASTOS, R., COELHO, E. & COIMBRA, M.A. (2015). Modifications of *Saccharomyces pastorianus* cell wall polysaccharides with brewing process. *Carbohydrate Polymers*, 124, 322-330.
- BATAGLION, G. A., SILVA, F. M. A., EBERLIN, M. N., KOOLEN, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC–MS/MS. *Food Chemistry* 180, 280–287, 2015.
- BATISTA, A. G., FERRARI, A. S., CUNHA, D. C., SILVA, J. K., CAZARIN, C. B. B., CORREA, L. C., PRADO, M. A., CARVALHO-SILVA, L. B., ESTEVES, E. A., MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. M. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chemistry* 197, 1153–1159, 2016.
- BENZIE, I.F.F. and STRAIN J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239. P. 70-76, 1996.

- BHASKAR, J. MAHADEVAMMA, S.; CHILKUNDA, N. D.; SALIMATH, P. V. Banana (*Musa* sp. var. elakki bale) Flower and Pseudostem: Dietary Fiber and Associated Antioxidant Capacity. *J. Agric.Food Chem.* 2012, 60, 427–432.
- BOBBIO, F. O; BOBBIO, P.A. Introdução à química de alimentos. 1. ed. São Paulo: Varela, 1989. 225p
- BOCHEK, A. M.; ZABIVALOVA, N. M.; PETROPAVLOVSKI, G. A. Determination of the Esterification Degree of Polygalacturonic Acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, Vol. 74, No. 5, 2001, pp. 796 3799.
- BORGES, K. A.; BATISTA, A. C. F.; RODRIGUES, H. S.; TERRONES, M. H.; VIEIRA, A. T.; OLIVEIRA, M. F. Production of methyl and ethyl biodiesel fuel from pequi oil (*Caryocar brasiliensis* Camb.) *Chemistry and Technology of Fuels and Oils*, Vol. 48, No. 2, May, 2012
- BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, p. 38 – 44, 1999.
- BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9, 1551-1558 (1995).
- CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate research**, v. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009. ISSN 0008-6215.
- CÂNDIDO, P.A.; MALAFAIA, G.C.; REZENDE, M. L. A exploração do pequi na região norte de Minas Gerais: abordagem por meio do Sistema Agroalimentar Localizado. *Revista IDEAS*, v. 5, n. 2, p. 118- 138, 2012.
- CÂNDIDO, T.L.N.; SILVA, M.R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. *Food Chemistry* 177, 313–319, 2015.
- CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SHEER, A. P. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. *Polímeros*, vol. 22, n. 2, p. 149-157, 2012
- CARVALHO, R. P. Microondas/Regina Pinto de Carvalho. – 1ª ed.-São Paulo: Editora Livraria da Física: Sociedade Brasileira de Física, 2005. – (Temas atuais de Física).
- CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em Análise de Alimentos/ Heloísa Máscia Cecchi 2ª Ed. Revisada- Campinas- SP: Editora da UNICAMP, 2003.
- CELENTANO, C. et al. Myo-Inositol Supplementation to Prevent Gestational Diabetes Mellitus. **Current diabetes reports**, v. 16, n. 3, p. 1-7, 2016. ISSN 1534-4827.

- CHATJIGAKIS, A. et al. 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, n. 4, p. 395-408, 1998. ISSN 0144-8617.
- CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C.; BRUSCATTO, M. H. Doces em massa *light* de morango: caracterização físico-química e sensorial. *Alim. Nutr.*, Araraquara v.17, n.3, p.295-301, jul./set. 2006.
- CHISTÉ, R. C. & MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of Carotenoids and Phenolic Compounds from the Amazonian Fruit *Caryocar villosum*. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 5884–5892, 2012.
- CHRISTIAN, G.D. Química Analítica. Traduzido da sexta edição de: Analytical Chemistry. Copyright MMIV John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved. ISBN: 0-471-21472-8, 2009.
- CHUMNANPAISONT, N.; NIAMNUY, C.; DEVAHASTIN, S. Mathematical model for continuous and intermittent microwave-assisted extraction of bioactive compound from plant material: Extraction of  $\beta$ -carotene from carrot peels. **Chemical Engineering Science**, v. 116, p. 442-451, 2014. ISSN 0009-2509.
- CHUST, R. B. (1990). Introdução à cromatografia de líquidos. BOLETIM SPQ – Sociedade Portuguesa de Química, 39.
- CHYLIŃSKA, M.; SZYMAŃSKA-CHARGOT, M.; KRUK, B.; ZDUNEK, A. Study on dietary fibre by Fourier transform-infrared spectroscopy and chemometric methods. *Food Chemistry* 196, 114–122, 2016.
- CIOLA, REMOLO. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC/ Remolo Ciola.- São Paulo: Edgard Blücher, 2003.
- CLEMENTS, R. S., JR., M.D. AND BETTY DARNELL, M.S., RD. Myo-inositol content of common foods: development of a high-myo-inositol diet. *The American Journal of Clinical Nutrition* 33: september 1980, pp. 1954- 1967.
- COSENZA, G. P. Quinas amargas brasileiras: histórico, perfil fitoquímico e atividade antihiperlipidêmica e antihiperlipidêmica. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015. 218p. Tese (doutorado).
- COSTA FILHO, P. A.; POPPI, R. J. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio: determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. *Química Nova*, São Paulo – SP, v. 25, n. 1, p. 46-52, 2002.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico] / Berenice Anina Dedavid, Carmem Isse Gomes, Giovanna Machado. – Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007.

- DONATO, E. et al. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 125-130, 2010. ISSN 2179-443X.
- FENNEMA'S FOOD CHEMISTRY 4<sup>TH</sup> EDITION/ (EDITED BY) SRINIVASAN DAMODARAN, KIRK PARKIN AND OWEN R. FENNEMA, p. cm. (Food Science and Technology; 169). Rev. ed. of.: Food Chemistry/ edited by Owen R. Fennema, 1996.
- FERRAZ, V. P. Métodos cromatográficos para a análise de aminoácidos e açúcares em sementes de *Canavalia gladiata*. 1991. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.
- FREITAS, A.; MOLDÃO-MARTINS, M.; COSTA, H. S.; ALBUQUERQUE, T. G.; VALENTE, A.; SANCHES-SILVA, A. Effect of UV-C radiation on bioactive compounds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) by-products. *J Sci Food Agric*; 95: 44–52, 2015.
- GARCÍA-NIÑO, W. R. & ZAZUETA, C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacological Research* 97, 84–103, 2015.
- GEYDE, R. N.; WEI, J. B.; **Canadian Journal Chemical**, n.5, v.76, p.525-532, 1998.
- GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food chemistry**, v. 68, n. 3, p. 327-332, 2000. ISSN 0308-8146.
- GOLDSTEIN J.I.; NEWBURY D. E.; ECHIL P; Joy DC; Romig Jr AD; Lyman CE; Fiori C; Lifshin E. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. New York: Plenum Press; 1992.
- GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E. & RUPÉREZ, P. (2011) FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweed. *Food Hydrocolloids*, 25, 1514-1520.
- GOÑI, I., MARTIN, N., & SAURA-CALIXTO, F. In vitro digestibility and intestinal fermentation of grape seed and peel. *Food Chemistry*, 90, 281–286, 2005.
- GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research* 23 (2003) 1719–1726
- HANDBOOK OF FOOD SCIENCE, TECHNOLOGY, AND ENGINEERING / edited by Y.H. Hui. p. cm. -- (Food science and technology ; 148) ISBN 1-57444-551-0 (v. 1 : alk. paper) -- ISBN 0-8493-9848-7. 2005.
- HARVEY, D. Modern analytical chemistry. McGraw-Hill, New York, 2000.



- HARVEY, B.H.; BRINK, C.B.; SEEDAT, S.; STEIN, D. J. Defining the neuromolecular action of myo-inositol Application to obsessive-compulsive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 26 (2002) 21– 32
- HASKA, L.; ANDERSSON, R.; NYMAN, M. The Effect of Dietary Fiber from Wheat Processing Streams on the Formation of Carboxylic Acids and Microbiota in the Hindgut of Rats. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 3406–3413.
- HASSAN,F.A.; ISMAIL, A.; HAMID, A. A.; AZLAN, A.; AL-SHERAJI, S. H. Characterisation of fiber-rich powder and antioxidant capacity of *Mangifera pajang* K. fruit peels. *Food Chemistry* v.126, p.283–288, 2011.
- HOWLETT, J. F.; BETTERIDGE, V.A.; CHAMP, M.; CRAIG, S. A. S.; MEHEUST, A.; JONES, J. M. Definição de fibra alimentar – discussões no Ninth Vahouny Fiber Symposium: construindo acordo científico. *Food & Nutrition Research* 2010. 54: 5750 - DOI: 10.3402/fnr.v54i0.5750.
- HUEMMER, W., & SCHEREIER, P. Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 1381–1398, 2008.
- IBRÜGGER, S.; KRISTENSEN, M.; MIKKELSEN, M. S.; ASTRUP, A. Flaxseed dietary fiber supplements for suppression of appetite and food intake. *Appetite* 58 (2012) 490–495.
- JAFARI, F., KHODAIYAN, F., KIANI, H. & HOSSEINI, S. S., Pectin from carrot pomace: Optimization of extraction and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.013>
- JORNAL DO BRASIL. Governo mineiro reconhece cadeia produtiva do Pequi. **Disponível em:** <http://www.jb.com.br/economia/noticias/2015/05/28/governo-mineiro-reconhece-cadeia-produtiva-do-pequi/>. **Acessado em : 31/08/2016**
- JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- KAČURÁKOVÁ, M., CAPEK, P., SASINKOVÁ, V., WELLNER, N. & EBRINGEROVÁ, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43, 195-203.
- KALAIVANI, T., RAJASEKARAN, C. & LAZAR MATHEW. Free Radical Scavenging, Cytotoxic, and Hemolytic Activities of an Active Antioxidant Compound Ethyl Gallate from Leaves of *Acacia Nilotica* (L.) Wild. Ex. Delile Subsp. *Indica* (Benth.) Brenan. *Journal of Food Science*, Vol. 76, Nr. 6, 2011.

- KHOURI, J., RESCK, I. S., POÇAS-FONSECA, M., SOUSA, T. M. M., PEREIRA, L. O., OLIVEIRA, A. B. B. AND GRISOLIA, C. K. (2007). Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense Camb*). *Genetics and Molecular Biology*, 30, 2, 442-448.
- KIM, J.Y.; Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid; *Biol. Pharm. Bull.*, 30(6), 1052-1055, 2007.
- LEÃO, D. P. Avaliação comparativa do potencial de farelo de trigo comercial e pericarpo de pequi como substratos na produção de fibras com capacidade antioxidante. Belo Horizonte: Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.86 p. (Dissertação: Mestrado em Ciência dos Alimentos).
- LEÃO, D. P., FRANÇA, A. S., OLIVEIRA, L. S., BASTOS, R., & COIMBRA, M. A. Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*) fruit by-products. *Food Chemistry*, 225, 146-153, 2017.
- LEITE, G. L. D.; VELOSO, R. V.S.; ZANUNCIO, J. C.; FERNANDES, L. A.; ALMEIDA, C. I. M. Phenology of *Caryocar brasiliense* in the Brazilian cerrado region. *Forest Ecology and Management*. 9P. 2006.
- LIANG, R.; CHEN, J.; LIU, W.; LIU, C.; YU, W.; YUAN, M.; ZHOU, X. Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*Ficus pumila* Linn.) seeds. *Carbohydrate Polymers* 87 (2012) 76– 83.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, F4.3.1-F4.3.8, 2001.
- LIMA. A. Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. 182 p. São Paulo, 2008.
- LIMA, A.; SILVA, A. M. O.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 695-698, Dezembro 2007.
- LIMA, K. G. Avaliação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma HEPG2. Porto Alegre. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 57 p., 2014.

- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, F4.3.1-F4.3.8, 2001.
- LIDSTRÖM P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESTMAN, J. Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron*, 57. 9225-9283, 2001.
- LÓPEZ-VARGAS, J. H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International* 51 (2013) 756–763.
- LOURENÇO, J. *Preparação e Caracterização de Fases Estacionárias de Dimetil-Metil-Fenil Siloxano Sobre Sílica Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.
- LUYKX, D.M.A.M., VAN RUTH, S.M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products, *Food Chemistry*, 107, 897-911. 2008.
- MACHADO, M.T.C, MELLO, B.C.B.S., HUBINGER, M.D. (2013) Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration, *Journal of Food Engineering*, in press, doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.007.
- MALAGOLI, B. G. et al. Chemical characterization and antiherpes activity of sulfated polysaccharides from *Lithothamnion muelleri*. **International journal of biological macromolecules**, v. 66, p. 332-337, 2014. ISSN 0141-8130.
- MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers* 97 (2013) 703– 709
- MARAN, J. P.; PRAKASH, K. A. Process variables influence on microwave assisted extraction of pectin from waste *Carcia papaya* L. peel. *International Journal of Biological Macromolecules* 73 (2015) 202–206.
- MASUDA, T. et al. Quantitative determination of sugars and myo-inositol in citrus fruits grown in Japan using high-performance anion-exchange chromatography. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 49, n. 1, p. 64-68, 2003. ISSN 0301-4800.
- MCNAIR, HAROLD MONROE. *Basic gas Chromatography/ Harold McNair , James M. Miller. - 2<sup>nd</sup> ed. P. cm. ISBN 978-0-470-43954-8, 2009.*

- MEHLA, K., BALWANI, S., KULSHRESHTHA, A., NANDI, D., JAISANKAR, P., GHOSH, B. Ethyl gallate isolated from *Pistacia integerrima* Linn. inhibits cell adhesion molecules by blocking AP-1 transcription factor. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1345– 1352, 2011.
- MIRANDA-VILELA, A.L., PEREIRA, L.C.S., GONÇALVES, C.A., GRISOLIA, C.K. (2009) Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners, *Nutrition Research, Volume 29*, 850-858
- MOO-HUCHIN, V. M., MOO-HUCHIN, M. I., ESTRADA-LEON, R. J., CUEVAS-GLORY, L., ESTRADA-MOTA, I. A., ORTIZ-VAZQUEZ, E., BETANCUR-ANCONA, D., SAURIDUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry* 166, 17–22, 2015.
- MONTEIRO, S.S., DA SILVA, R.R., DA S. MARTINS, S.C., BARIN, J. S. AND DA ROSA, C. S. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb.). *International Food Research Journal* 22(5): 1985-1992 (2015).
- MONSOOR, M. A., KALAPATHY, U., e PROCTOR, A. (2001B). Improved method for determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 2756–2760.
- MONSOOR, M. A. Effect of drying methods on the functional properties of soy hull pectin. *Carbohydrate Polymers* 61 (2005) 362–367
- MOTASEMI, F.; ANI, F. N. A review on microwave-assisted production of biodiesel. *Renew Sustain Energy Review*, n.16, p.4719-4733, 2012.
- MOYER, R.A.; HUMMER, K. E.; FINN, C.E.; FREI, B.; WROLSTAD, R.E. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 519-525
- NAGHSHINEH, M.; OLSEN, K.; GEORGIU, C. A. Sustainable production of pectin from lime peel by high hydrostatic pressure treatment. *Food Chemistry* 136 (2013) 472–478
- NASCIMENTO, A. M. POLISSACARÍDEOS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Spilanthes oleracea* L. (JAMBU) Curitiba: Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 2012. 100 p. (Dissertação: Mestrado em Ciências (Bioquímica)).
- NAVARRO-GONZÁLEZ, I.; GARCÍA-VALVERDE, V.; GARCÍA-ALONSO, J.; PERIAGO, M. J. Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International* 44 (2011) 1528–1535

- NÓBREGA, E. M.; OLIVEIRA, E. L.; GENOVESE, M. I.; CORREIA, R. T. P. The impact of hot air drying on the physical-chemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of acerola (*Malpighia emarginata*) residue. *Journal of Food Processing and Preservation* 39 (2015) 131–141.
- NOGUEIRA DE DEUS, T. Extração e caracterização de óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) para o uso sustentável em formulações cosméticas óleo água. Dissertação, Universidade Estadual de Goiás, Ecologia e Produção Sustentável. 2008.
- NOGUEIRA, F. A.; FONSECA, L.D.; SILVA, R. B.; FERREIRA, A. V. P.; NERY, P.S.; GERASEEV, L.C.; DUARTE, E.R. In vitro and in vivo efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. *Parasitol Res* (2012) 111:325–330.
- NOUR, V.; IONICA, M.E; TRANDAFIR, I. Bread enriched in lycopene and other bioactive compounds by addition of dry tomato waste. *J Food Sci Technol* 52(12):8260–8267. December, 2015.
- NSOR-ATINDANA, J.; ZHONG, F.; MOTHIBE, K. J. In vitro hypoglycemic and cholesterol lowering effects of dietary fiber prepared from cocoa (*Theobroma cacao* L.) shells. *Food Funct.*, 2012, 3, 1044–1050
- OLIVEIRA, M.L.M., NUNES-PINHEIRO, D.C.S., TOME, A.R., MOTA, E.F., LIMA-VERDE, I.A., PINHEIRO, F.G.M., CAMPELLO, C.C., MORAIS, S.M. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds, *Journal of Ethnopharmacology*. v.129, p. 214-219, 2010a.
- OLIVEIRA, G. A., CASTILHO, F., RENARD, C. M. G. C., BUREAU, S.(2014). Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Research International* 60, 154–162
- OLIVEIRA, M. C., SILVA, D. M., MARCHESIN, W. A., EL-WAHAB ATTIA, Y. A., LIMA, S. C. O. AND OLIVEIRA, H. C. (2016). Pequi peel flour in diets for Japanese quail. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. Maringá, v. 38, n. 1, p. 101-106.
- PAGÁN, J.; IBARZ, A.; LLORCA, M.; PAGÁN, A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. **Food Research International**, Barking, v. 34, n. 7, p. 605-612, 2001.
- PARANÁ (ESTADO). SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL- Departamento de Economia Rural, 2015.
- PÉREZ-JIMENEZ, J. & VIUDA-MARTOS, M. Introduction to the special issue Byproducts from agri-food industry: New strategies for their revalorization. *Food Research International* 73, 1–2, 2015.

- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; SAURA-CALIXTO, F. Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data: An approach to quantification of the missing proanthocyanidins. *Food Research International* 42 (2009) 1381–1388
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; DÍAZ-RUBIO, M.H.; SAURA CALIXTO, F. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, 26, 118–129, 2013.
- PETKOWICZ, C. L. O., VRIESMANN, L. C., WILLIAMS, P. A. Pectins from food waste Extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin, *Food Hydrocolloids*, 65, 57-67, 2017.
- PROVIN, L. Extração, caracterização química e propriedades reológicas de pectinas da casca de *Caryocar brasiliense* Cambess. Curitiba. Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, 2012. 130p. (Dissertação: Mestrado em Ciências - Bioquímica).
- RIBEIRO HB; RIBEIRO RCF; XAVIER AA; CAMPOS VP; DIAS-ARIEIRA CR; MIZOBUTSI EH. 2012. Resíduos de frutos de pequi no controle do nematóide das galhas em tomateiro. *Horticultura Brasileira* 30: 453-458, 2012.
- ROBERT, P.; MARQUIS, M.; BARRON, C.; GUILLON, F. AND SAULNIER, L. FT-IR Investigation of Cell Wall Polysaccharides from Cereal Grains. Arabinoxylan Infrared Assignment. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7014-7018.
- RODRIGUES-AMAYA, DELIA B. Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composicao de carotenoides em alimentos / Delia B. Rodrigues-Amaya, Mieko Kimura e Jaime Amaya-Farfan [autores]; Lidio Coradin e Vivian Beck Pombo, Organizadores. – Brasília: MMA/SBF, 2008. 100 p.
- ROESLER, R., CATHARINO, R. R., MALTA, L. G., EBERLIN, M. N., PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* v.110, p. 711–717, 2008.
- RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G. .; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. (2006). Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Metodologia Científica. Comunicado Técnico 125.
- RUFINO, M. S. M; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* 121 (2010) 996–1002
- RUIZ-ACEITUNO, L. et al. Optimization of pressurized liquid extraction of inositols from pine nuts (*Pinus pinea* L.). **Food chemistry**, v. 153, p. 450-456, 2014. ISSN 0308-8146.

- SAEED, F. et al. Arabinoxylans and arabinogalactans: a comprehensive treatise. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 51, n. 5, p. 467-476, 2011. ISSN 1040-8398.
- SALIBA, E. O. S.; GONTIJO NETO, M. M.; RODRIGUEZ, N. M.; MIRANDA, L. F.; OBEID, J. A.; TEIXEIRA, G. L.; OLIVEIRA, M. A. Predição da composição química do sorgo pela técnica de espectroscopia de reflectância no infravermelho próximo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 357-360, 2003.
- SANTOS, T. J. R.; ZAMPERO, R. Árvores Frutíferas do Cerrado e a Sustentabilidade. *Revista Científica Aprender*. 6 ed. ISSN 1983-5450, 2012.
- SARRIÁ, B.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ-ESPINOSA, A.; GÓMEZ-JUARISTI, M.; GOYA, L.; MATEOS, R.; BRAVO, L. Effects of regularly consuming dietary fibre rich soluble cocoa products on bowel habits in healthy subjects: a free-living, two-stage, randomized, crossover, single-blind intervention. Sarriá et al. *Nutrition & Metabolism* 2012.
- SAURA-CALIXTO F. Dietary fibre as a carrier of dietary antioxidants: an essential physiological function. *J Agric Food Chem* 59, 43–49, 2011.
- SAURA-CALIXTO, F. Concept and Health-Related Properties of Nonextractable Polyphenols: The Missing Dietary Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11195–11200, 2012.
- SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity *Food Research International* 40; 15–21, 2007.
- SEIXAS, F. L.; FUKUDA, D.L.; TURBIANI, F. R. B.; GARCIA, P. S.; PETKOWICZ, C. I. DE O.; JAGADEVAN, S.; GIMENES, M. L. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids* 38, 186 a 192, 2014.
- SHAKHMATOV, E. G., UDORATINA, E. V., ATUKMAEV, K. V., and MAKAROVA, E. N., Extraction and structural characteristics of pectin polysaccharides from *Abies sibirica* L., *Carbohydrate Polymers*, v. 123, p. 228–236, 2015.
- SILVA, A. L., LAGE, R. R. P., FARIA FILHO, D. E., AZEVEDO, I. L., DIAS, A. N. AND FARIA, D. E. (2016). Pequi peel meal in laying hen diet. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. Maringá, v. 38, n. 2, p. 151-154
- SIQUEIRA, B. S.; ALVES, L. D.; VASCONCELOS, P. N.; DAMIANI, C.; SOARES JÚNIOR, M. **Pectina extraída de casca de pequi e aplicação em geleia light de manga**. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 2, p. 560-567, Junho 2012.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R.; *Princípios de análise instrumental*. Sexta edição. Ed. Cengage Learning ISBN-13: 978-607-481-390-6, 2008.

- SMITH, B. C. Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Boca Raton: CRC Press, 1996. 86 p.
- SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. Rev. Nutr., Campinas, 15(1):71-81, jan./abr., 2002.
- SOARES JÚNIOR, M. S.; BASSINELLO, P. Z.; CALIARI, M.; REIS, R. C.; LACERDA, D. B. C. L.; KOAKUZU, S. N. Development and chemical characterization of flour obtained from the external mesocarp of “pequizeiro” fruit. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 30(4): 949-954, out.-dez. 2010.
- SOQUETTA, M. B.; STEFANELLO, F. S.; HUERTA, K. M.; MONTEIRO, S. S.; ROSA, C. S.; TERRA, N.N. Characterization of physiochemical and microbiological properties, and bioactive compounds, of flour made from the skin and bagasse of kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). Food Chemistry 199, 471–478, 2016.
- SOUSA, S.; PINTO, J.; RODRIGUES, C.; GIAO, M.; PEREIRA, C.; TAVARIA, F.; MALCATA, F. X.; GOMES, A.; BERTOLDO PACHECO, M. T.; PINTADO, M. Antioxidant properties of sterilized yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour. Food Chemistry 188, 504–509, 2015.
- SOUTINHO, S. M. A. Avaliação dos compostos fenólicos e da actividade antioxidante de frutos vermelhos produzidos em modo biológico. Viseu. Escola Superior de Viseu, Portugal, 2012, 95p. (Dissertação – Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar).
- SOUZA, R. M. A. O.; MIRANDA, L. S. M. Microwave assisted organic synthesis: a history of success in Brazil. **Química Nova**, n.3, v.34, p.497-506, 2011.
- STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. J. Sep. Sci. 2007, 30, 3268 – 3295.
- SWANY, G. J. & MUTHUKUMARAPPAN, K. Optimization of continuous and intermittent microwave extraction of pectin from banana peels. Food Chemistry 220, 108–114, 2017.
- SYNYTSYA, A. et al. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 1, p. 97-106, 2003. ISSN 0144-8617.
- SZYMANSKA-CHARGOT, M., CHYLINSKA, M., KRUK, B. & ZDUNEK, A. (2002). Combining FT-IR spectroscopy and multivariate analysis for qualitative and quantitative analysis of the cell wall composition changes during apples development. Carbohydrates Polymers, 115, 93-103.
- TAKAHASHI, Y., OTSUKI, A., MORI, Y., KAWAKAMI, Y. & ITO, H. Inhibition of leukocyte-type 12-lipoxygenase by guava tea leaves prevents development of atherosclerosis. Food Chemistry, 186, 2-5, 2015.



- THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SIVAKUMAR, V.; MARAN, J.P. Process optimization and analysis of microwave assisted extraction of pectin from dragon fruit peel. *Carbohydrate Polymers* 112, 622–626, 2014.
- TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) BASEADAS em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 4, 616-623, 2002.
- TSENG, A.; ZHAO, Y. Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry* 138 (2013) 356–365.
- UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 616-622, 2007.
- VALLURU, R.; VAN DEN ENDE, W. Myo-inositol and beyond – Emerging networks under stress. *Plant Science* 181 (2011) 387– 400
- VERA, R.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L.; CHAVES, L. J.; LEANDRO, W. M.; SOUZA, E. R. B. Caracterização física de frutos do pequi ( *Caryocar brasiliense* Camb.) no estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 35 (2): 71-79, 2005.
- VON LINTIG, J.; SIES, H. Carotenoids. Guest Editorial / *Archives of Biochemistry and Biophysics* 539 (2013) 99–101
- WAI, W. W.; ALKARKHI, A. F. M.; EASA, A. M. Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. *food and bioproducts processing* 88 ( 2010 ) 209–214
- WANG, L.; XU, H.; YUAN, F.; FAN, R.; GAO, Y. Preparation and physicochemical properties of soluble dietary fiber from orange peel assisted by steam explosion and dilute acid soaking. *Food Chemistry* 185, 90–98, 2015.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 97–104
- WROLSTAD, R. E. *Food Carbohydrate Chemistry*. Food carbohydrate chemistry / Ronald E. Wrolstad. – 1st ed. p. cm. – (Institute of food technologists series ; 48).
- XIANZHE, Z., FANGPING, Y., CHENGHAI, L., & XIANGWEN, X. (2011). Effect of process parameters of microwave assisted extraction (MAE) on polysaccharides yield from pumpkin. *Journal of Northeast Agricultural University*, 8(2), 79–86.

- YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers* 86 (2011) 373– 385
- ZEB, A. A reversed phase HPLC-DAD method for the determination of phenolic compounds in plant leaves. *Anal. Methods*, 7, 7753–7757, 2015.
- ZHANG, J.; WANG, Z. W. Soluble dietary fiber from *Canna edulis* Ker by-product and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 92 (2013) 289– 296.
- ZHANG, Q., CHEN, W., ZHAO, J., XI, W. Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes. *Food Chemistry* 200,230–236, 2016.
- ZHU, F.; DU, B.; ZHENG,L.; LI, J. Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry* 186. 207–212, 2015.
- ZHUANG, Y.; ZHANG, Y.; Sun, L. Characteristics of fibre-rich powder and antioxidant activity of pitaya (*Hylocereus undatus*) peels. *International Journal of Food Science and Technology* 2012, 47, 1279–1285.
- ZURITA, J.; DÍAZ-RUBIO, M.H.; SAURA-CALIXTO, F. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; 63(8): 936–939, 2012.