

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E EFEITO
PREBIÓTICO DE PECTINA HIDROLISADA OBTIDA
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

TESE DE DOUTORADO

Fernanda Aline de Moura

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E EFEITO
PREBIÓTICO DE PECTINA HIDROLISADA OBTIDA DE
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Fernanda Aline de Moura

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Qualidade de
Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Picolli da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E EFEITO PREBIÓTICO DE
PECTINA HIDROLISADA OBTIDA DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

elaborada por
Fernanda Aline de Moura

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Leila Picolli da Silva, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Luisa Helena Rychecki Hecktheuer, Dr^a. (UFSM)

Marcos Martinez do Vale, Dr. (UFSM)

Cristiane Casagrande Denardin, Dr^a. (UNIPAMPA)

Marina Prigol, Dr^a. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 13 de março de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, prof.^a Leila Picolli da Silva, por todos os ensinamentos, por todo apoio e confiança durante estes quatro anos de doutorado. Muito obrigada por tudo profe!

Agradeço à minha família pela educação que me proporcionaram e pelos valores que me transmitiram. Agradeço também por todo apoio e pela vibração e alegria com que comemoram comigo a conclusão desta etapa. Esta é mais uma conquista nossa!

Agradeço ao meu marido Luiz Marino, pela compreensão por todas as idas e vindas à Santa Maria durante os últimos três anos do doutorado. Agradeço por estar ao meu lado todo o tempo e por valorizar esta conquista.

Agradeço aos colegas de laboratório, Fernanda, Naglezi e Bruno pelos diversos momentos que pude contar com a ajuda e amizade de vocês.

Agradeço à Luccieli, Marília, Andreza e Sabrina por toda ajuda e responsabilidade com a qual encararam comigo este trabalho.

Agradeço aos colegas da UNIPAMPA, que me proporcionaram flexibilização de horários e me apoiaram para conclusão do doutorado.

Agradeço a parceria realizada com a prof.^a Carmen Lúcia de Oliveira Petckowicz, da UFPR, que proporcionou a realização de análises importantes para este trabalho.

Agradeço ao prof. Roger Wagner e sua orientada Bruna Klein pela ajuda nas análises de cromatografia gasosa.

E a você Fernanda Macagnan, a quem tenho tanto a dizer, mas talvez não consiga encontrar as palavras certas... Amiga, sou muita grata a você pelo acolhimento, pela amizade, pelo companheirismo e por toda a ajuda que me destes neste período do doutorado. Te admiro pelo teu caráter, pela tua dedicação e por todo o amor e generosidade que tens no coração. Muito obrigada por tudo Fer!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E EFEITO PREBIÓTICO DE PECTINA HIDROLISADA OBTIDA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

AUTORA: FERNANDA ALINE DE MOURA

ORIENTADORA: LEILA PICOLLI DA SILVA

Data e local da defesa: Santa Maria, 13 de março de 2015.

A pectina é uma fibra alimentar solúvel que, além de seu papel na indústria de alimentos como espessante e emulsificante, proporciona efeitos metabólicos relacionados ao controle do peso, perfil lipídico e glicêmico. É encontrada em quantidades significativas em resíduos da agroindústria, como cascas e bagaços de frutas. A casca de soja, um produto resultante da extração do farelo e do óleo da leguminosa, também possui grande quantidade de pectina em sua composição. Todavia, fontes de características diferentes tendem a fornecer pectinas com organização monomérica e propriedades diferenciadas, as quais determinam sua aplicação tecnológica e papel metabólico. Além disso, estudos têm apontado que os produtos da sua hidrólise, em especial os oligossacarídeos pécticos, apresentam características bifidogênicas, sendo considerados uma nova classe de prebióticos. No entanto, as alterações nas propriedades físico-químicas causadas pela hidrólise e seus efeitos metabólicos são pouco estudadas. As quantidades ideais de consumo de prebióticos pécticos também carecem de maiores evidências para serem estabelecidas. Portanto, o objetivo deste estudo foi selecionar matéria-prima promissora para eficiente extração e hidrólise de pectinas, avaliando o produto resultante (pectina parcialmente hidrolisada) quanto às propriedades físico-químicas e potencial prebiótico *in vivo*. Os resíduos agroindustriais utilizados foram casca de soja, casca de maracujá e bagaço de laranja. A casca de maracujá foi a matéria-prima de maior potencial para extração de pectinas por apresentar rendimento (15,71%) e teor de ácido galacturônico (51,3%), semelhante ao bagaço de laranja (17,96% de rendimento e 60,45% de ácido galacturônico) no concentrado péctico, porém com teores residuais de proteína e lipídeos reduzidos. Embora com elevado teor de pectina em sua composição, o rendimento de extração deste polissacarídeo foi de apenas 5,66% para a casca de soja. Portanto, a casca de maracujá foi escolhida para a produção dos prebióticos pécticos. A hidrólise ácida por duas horas foi eficiente para produzir alterações no perfil de distribuição de massa molar da pectina de casca de maracujá, aumentando a quantidade de compostos de baixa massa molar. As propriedades físico-químicas também foram alteradas pela hidrólise, com diminuição da capacidade de retenção de água e de ligação a cobre, e aumento da capacidade de absorção de gordura. A adição de 0,25% de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada proporcionou efeito prebiótico, confirmado pela maior produção de ácidos graxos de cadeia curta no ceco de ratos em crescimento.

Palavras-chave: Casca de maracujá. Bagaço de laranja. Casca de soja. Oligossacarídeos pécticos. Ácidos graxos de cadeia curta.

ABSTRACT

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND PREBIOTIC EFFECT OF PECTIN HYDROLYSED FROM AGRO-INDUSTRIAL WASTE

AUTHOR: FERNANDA ALINE DE MOURA

ADVISER: LEILA PICOLLI DA SILVA

Date and place of the defense: Santa Maria, 13 de março de 2015.

Pectin is a soluble dietary fiber that in addition to its role in the food industry as a thickener and emulsifier, provides metabolic effects related to weight control, lipids and glucose levels. It is found in significant amounts in agro-industrial residues such as bark and fruit cake. Soybean hulls, a product derived from the bran extraction and legume oil, also has a large amount of pectin in its composition. However, sources of different characteristics tend to provide pectins with monomeric organization and differentiated properties, which determine its technological application and metabolic role. Moreover, studies have indicated that the products of its hydrolysis, in particular pectic oligosaccharides have bifidogenic characteristics are considered as a new class of prebiotics. However, changes in physical and chemical properties caused by hydrolysis and its metabolic effects are not well studied. The optimal amounts of pectic prebiotics consumption also require further evidence to be established. Therefore, the aim of this study was to select promising raw material for efficient extraction and hydrolysis of pectin, evaluating the resulting product (partially hydrolyzed pectin) and the physical and chemical properties and prebiotic potential *in vivo*. The agro-industrial waste used were soybean hulls, passion fruit peel and orange peel. The passion fruit peel was the raw material with the greatest potential for pectin extraction by presenting yield (15.71 %) and galacturonic acid content (51.3 %) , similar to orange peel (17.96 % yield and 60.45 % of galacturonic acid) in pectic concentrate, but with residual levels of protein and lipids reduced. Although high pectin content in its composition , the yield of extraction of the polysaccharide was only 5.66 % for soybean hulls . Therefore, passion fruit peel was chosen for pectin prebiotics production. Acid hydrolysis was efficient for two hours to produce changes in molecular weight distribution profile of passion fruit peel pectin, increasing the amount of low molecular weight compounds. The physico-chemical properties were also altered by hydrolysis, with decreased water holding capacity and the copper connection, and increased capacity for absorbing fat. The addition of 0.25% of partially hydrolyzed passion fruit peel pectin provided prebiotic effect, resulting in increased production of short chain fatty acids in growth in rat cecum.

Keywords: Passion fruit peel. Orange bagasse. Soy hull. Pectic oligosaccharide. Short chain fatty acid.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
MANUSCRITO 1 - Caracterização e propriedades físico-químicas de pectinas extraídas de subprodutos da agroindústria.....	10
Resumo	11
Introdução	11
Materiais e métodos	13
Materiais.....	13
Preparo das amostras	14
Caracterização das matérias-primas.....	14
Extração das pectinas	14
Rendimento, composição química e massa molar das pectinas.....	15
Propriedades físico-químicas das pectinas.....	17
Estatística	17
Resultados e discussão	18
Conclusão	23
MANUSCRITO 2 - Pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada: perfil de massa molar e propriedades físico-químicas.....	35
Resumo	36
Introdução	36
Materiais e métodos	38
Matérias-primas.....	38
Extração da pectina	38
Massa molar dos hidrolisados	39
Propriedades físico-químicas dos hidrolisados	39
Análise Estatística	40
Resultados e discussão	40
Conclusão	42
Referências	43
MANUSCRITO 3 - Efeitos metabólicos e potencial prebiótico de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada adicionada à dieta de ratos em crescimento	50
Resumo	51

Introdução	51
Materiais e métodos	53
Materiais.....	53
Extração da pectina	54
Hidrólise parcial da pectina.....	54
Animais e dietas	55
pH e lipídios nas fezes	56
Análises sanguíneas.....	56
Análises do fígado	56
Ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal	57
Análise estatística	58
Resultados	58
Discussão	59
Conclusões.....	62
Referências	63
DISCUSSÃO	73
CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS.....	75

INTRODUÇÃO

A pectina é um polissacarídeo heterogêneo complexo encontrado na parede celular primária da maioria das plantas. O componente dominante é o ácido galacturônico, que compõem as cadeias pécticas principais, com variações nas proporções de açúcares neutros glicose, galactose, arabinose, ramnose e xilose nas cadeias laterais (ROUND et al., 2010; WIKIERA et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Este polissacarídeo é de grande importância comercial, seja pelas suas propriedades tecnológicas (espessante, emulsificante e estabilizante) (MARTÍNEZ et al., 2010; DOMINIAK et al., 2014; CUI e CHANG, 2014), pelas suas propriedades fisiológicas (influência na saciedade, controle do peso, perfil lipídico e glicêmico, etc.) (GUNNESS e GIDLEY, 2010; BROUNS et al., 2012; WANG et al., 2014; ESPINAL-RUIZ et al., 2014), ou como matéria-prima para produção de derivados hidrolisados, como oligossacarídeos (HOLCK et al., 2011; GULLÓN et al., 2013; GÓMEZ et al., 2014).

Em geral, os maiores teores de pectinas são relatados para frutas e seus produtos de processamento. O bagaço de citros, por exemplo, possui 19% de pectina em sua composição, sendo frequentemente utilizado como matéria-prima para extração comercial deste polissacarídeo (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). A casca de maracujá também é um subproduto abundante da indústria de sucos, mas ainda é pouco explorado, embora apresente teor de pectina entre 14 e 23% na sua composição básica (YAPO, 2009). Teores relevantes deste polissacarídeo (aproximadamente 30%) também são relatados para a casca resultante da fabricação do farelo e do óleo de soja (GNANASAMBANDAM e PROCTOR, 1999). Porém, a organização monomérica e estrutural das pectinas em grãos difere daquelas relatadas para frutos, o que pode levar a características tecnológicas distintas de acordo com a matéria-prima usada para sua extração (MONSOOR, 2005).

Além da aplicação tecnológica, a pectina também pode ser usada como ingrediente funcional de ação prebiótica. Porém, sua elevada viscosidade pode dificultar sua incorporação em formulações alimentícias, alterando características tecnológicas e sensoriais do produto final. A hidrólise da pectina é uma alternativa para sanar este problema e ampliar sua aplicabilidade, uma vez que causa redução da sua viscosidade devido à despolimerização. Adicionalmente, estudos demonstram que pectina de menor massa molar apresenta maior potencial prebiótico (OLANO-MARTIN et al., 2002).

As alterações nas propriedades físico-químicas causadas pela hidrólise e seus efeitos metabólicos são pouco estudadas. As quantidades ideais de consumo de prebióticos pécticos

também carecem de maiores evidências para serem estabelecidas. Portanto, objetivo deste estudo foi selecionar matéria-prima promissora para eficiente extração e hidrólise de pectinas, avaliando o produto resultante (pectina parcialmente hidrolisada) quanto às propriedades físico-químicas e potencial prebiótico *in vivo*.

MANUSCRITO 1 – Formatado conforme as normas do periódico International Journal of Food Science and Technology

Caracterização e propriedades físico-químicas de pectinas extraídas de subprodutos da agroindústria

Caracterização de diferentes pectinas

Fernanda Aline de Moura^{1*}, Fernanda Teixeira Macagnan¹, Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz², Leila Picolli da Silva³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima – 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba-PR, Brazil.

³ Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima – 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

* Correspondent: E-mail address: fernandamoura@unipampa.edu.br

Resumo: As pectinas presentes na parede celular dos vegetais apresentam composição e arranjo molecular heterogêneos, com diferenças marcantes dependendo da fonte de origem, o que determina suas propriedades funcionais e tecnológicas. O objetivo deste trabalho foi extrair substâncias pécnicas de diferentes fontes de origem (casca de soja, casca de maracujá e bagaço de laranja) e determinar composição química e características físico-químicas dos concentrados pécnicos. A eficiência de extração de substâncias pécnicas foi superior a 15% para a casca de maracujá e bagaço de laranja, com teor de ácido galacturônico acima de 50% para ambas. A capacidade de retenção de água, aliada a capacidade de absorção de gordura e capacidade de ligação a cátions são indicativos de que o concentrado pécnico da casca de maracujá possa ser explorado industrialmente como espessante e emulsificante em formulações alimentícias. A presença de compostos fenólicos com capacidade antioxidante confere propriedades adicionais ao concentrado pécnico e ampliam sua aplicação industrial.

Palavras-chave: casca de maracujá, casca de soja, bagaço de laranja, ácido galacturônico

Introdução

As pectinas são macromoléculas complexas e heterogêneas que estão entre os componentes da parede celular dos vegetais. Os seus monossacarídeos constituintes são ácido galacturônico (monossacarídeo dominante), xilose, galactose, manose, arabinose, ramnose, glicose e fucose. As cadeias das pectinas são constituídas de unidades d-ácido galacturônico unidos por ligações α -1,4, parcialmente metil-esterificados no C6, onde ocorrem várias ramificações com cadeias polissacarídicas semelhantes ou com monossacarídeos neutros (Martínez *et al.*, 2010; Yuliarti *et al.*, 2015; Ramos-Aguilar *et al.*, 2015). Sua diversidade de composição e arranjo molecular ampliam suas propriedades físico-químicas e aplicações

tecnológicas. Dentre os principais usos, destaca-se seu papel como espessante, emulsificante e estabilizante (Martínez *et al.*, 2010; Dominiak *et al.*, 2014; Cui & Chang, 2014).

Alguns efeitos sobre a saúde também são associados às pectinas, dentre eles a diminuição do colesterol (redução de 6 a 7% do LDL colesterol) e da glicose sanguíneos (diminuição da resposta glicêmica e secreção de insulina), atividade antioxidante (pela presença de compostos fenólicos associados à fibra) e inibição do desenvolvimento de tumores e metástases (Gunness & Gidley, 2010; Brouns *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

As principais fontes comerciais de pectinas são as cascas de citros e bagaço de maçã. Mas outras fontes com comercialização menos significativa também são exploradas, como a casca de maracujá, casca de soja, abóbora, kiwi, pimenta, casca de banana, polpa de abacaxi e bagaço de azeitona (Kalapathy & Proctor, 2001; Canteri *et al.*, 2010; Yapo, 2010; Cui & Chang, 2014; Yuliarti *et al.*, 2015; Ramos-Aguilar *et al.*, 2015; Rubio-Senent *et al.*, 2015). Algumas destas matérias-primas para extração de pectina são resíduos abundantes provenientes das agroindustriais, como a casca de soja e a casca de maracujá. Neste contexto, a extração de pectina é uma aplicação interessante para estes resíduos, diminuindo seu impacto ambiental.

O método de extração de pectinas geralmente ocorre em meio ácido, entre 70 a 90 °C. O concentrado final é composto por pectinas de diferentes massas molares e graus de esterificação, que tem sua qualidade avaliada pelo teor de ácido galacturônico. As pectinas de interesse comercial apresentam teor de ácido galacturônico acima de 65% na matéria seca livre de cinzas, mas com massas molares variando entre 100.000 a 200.000 Da (Joye & Luzio, 2000). Dependendo do grau de esterificação, a pectina terá aplicações distintas. A capacidade de formar gel sem adição de açúcar é inerente de pectinas de baixo grau de esterificação (abaixo de 50%), tornando-as importantes para uso em produtos de reduzido valor calórico. No entanto, essa reação exige a presença de cátions divalentes (ex. Ca^{+2}) e pH entre 2 e 7 para

formação de gel (Yapo, 2009a). Já a pectina com alto grau de esterificação necessita de altas concentrações de açúcar para formar gel.

Sabe-se que distintas espécies vegetais, distintos tecidos em uma mesma planta e distintos estágios de maturação promovem diferenças marcantes quanto à estruturação de cadeias pécicas, no que tange a composição monossacarídica, massa molar e grau de esterificação (Yapo, 2010; Yuliarti *et al.*, 2015; Ramos-Aguilar *et al.*, 2015). Este fato leva a crer que a matéria-prima influenciará decisivamente na qualidade e aplicabilidade tecnológica dos concentrados pécicos. Portanto, é de grande importância a investigação da estrutura molecular da pectina, uma vez que as suas propriedades físico-químicas e funcionais estão fortemente relacionadas com a sua estrutura e composição (Brouns *et al.*, 2012; Cui & Chang, 2014).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi extrair substâncias pécicas de diferentes fontes de origem (casca de soja, casca de maracujá e bagaço de laranja) e determinar composição química e características físico-químicas dos concentrados pécicos.

Materiais e métodos

Materiais

O bagaço de laranja resultante de extração de suco foi cedido pelo Grupo Fischer. A casca de maracujá amarelo foi obtida de frutas adquiridas no comércio da cidade de Santa Maria, RS, após retirada da polpa e sementes. A casca de soja, resultante da produção de farelo e óleo de soja, foi cedida pela empresa Camera Agroalimentos.

Preparo das amostras

O bagaço de laranja e a casca de maracujá foram recebidos úmidos, sendo prontamente secos em estufa a 50 °C com circulação forçada de ar, por 48 horas. A casca de soja foi recebida seca. As amostras foram moídas em micromoinho e armazenadas sob refrigeração (4 °C).

Caracterização das matérias-primas

As matérias-primas bagaço de laranja, casca de maracujá e casca de soja foram caracterizadas quanto à sua composição química. A umidade e os conteúdos de proteínas e cinzas foram determinados de acordo com os métodos nº 44-15A, 46-13 e 08-01 da AACC, e os lipídios pelo método de Bligh & Dyer (1959). Para determinação de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel foi utilizado método 991.43 da AOAC. A quantificação de ácido galacturônico (monossacarídeos ácidos) foi determinada pelo método fotométrico de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973), e os açúcares redutores de acordo com Lane & Eynon (1934).

Extração das pectinas

A extração das pectinas do bagaço de laranja e da casca de soja foram realizadas com solução de HCl 0,1 N, a 90 °C, com agitação, por 45 min. As pectinas da casca de maracujá foram extraídas pelo mesmo processo, entretanto, foi utilizado HCl 0,05 N. As concentrações da solução de HCl a 0,05 N e 0,1 N, obtidas da literatura (Kalapathy & Procotor, 2001), foram testadas previamente, sendo utilizadas as que promoveram maior rendimento de extração para

cada matéria-prima. As proporções de amostra e solução ácida foram diferentes para cada um dos resíduos, considerando a sua capacidade de hidratação. Foram utilizados 600 mL de solução de HCl para 25 g de bagaço de laranja; 350 mL de solução de HCl para 50 g de casca de soja; e 700 mL de solução de HCl para 25 g de casca de maracujá. Após a extração, foi realizada centrifugação, a 3700 rpm por 15 min, sendo então coletado o sobrenadante e adicionado etanol a 96%, em quantidade suficiente para duplicar o volume de solução, para precipitação das pectinas. A solução permaneceu 12 horas sob refrigeração, sendo então coletada a fração péctica, a qual foi lavada novamente com etanol a 96% permanecendo em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente após cada adição do etanol. Este processo foi repetido mais uma vez para as pectinas de soja, e mais duas vezes para as pectinas de bagaço de laranja e de casca de maracujá. Em seguida, as pectinas foram secas em estufa a 50 °C com circulação forçada de ar, moída em micromoinho e armazenada a 4 °C para posteriores análises.

Rendimento, composição química e massa molar das pectinas

O rendimento de extração das pectinas foi calculado pela relação entre o peso produto final e o peso da matéria-prima submetida à extração. A umidade, teor de proteínas e cinzas das pectinas foram determinados de acordo com os métodos nº 44-15A, 46-13 e 08-01 da AACC, e os lipídios pelo método de Bligh & Dyer (1959). O grau de esterificação e conteúdo de grupos metoxila foi determinado pelo método de Schultz (1965), modificado por Yapó (2009b).

Para determinação da composição monossacarídica as amostras foram hidrolisadas com trifluoracético 1 M, durante 5 horas a 100 °C. Ao término da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (Biermann, 1989). Após a hidrólise ácida total, os

monossacarídeos foram solubilizados em água destilada e reduzidos pela adição de cerca de 10 mg de boridreto de sódio por 16h a 4 °C (Wolfrom & Thompson, 1963b). Posteriormente, foi adicionado resina catiônica fortemente ácida para remoção dos ions Na^+ . As soluções foram filtradas e o solvente evaporado à vácuo e então adicionado 1 mL de metanol para remoção do ácido bórico e o borato de metila formado foi evaporado à vácuo. Este processo foi repetido por três vezes. Os alditóis formados foram acetilados pela adição de 0,5 mL de anidrido acético e 0,5 mL de piridina, em tubos vedados, permanecendo durante 12 horas à temperatura ambiente (Wolfrom & Thompson, 1963a). A reação foi interrompida pela adição de gelo, sendo a seguir procedida a extração dos acetato de alditóis, através da adição de clorofórmio e posterior eliminação de piridina em tratamentos sucessivos com sulfato de cobre 5% e água destilada. Após a evaporação do solvente, os acetatos de alditóis formados foram submetidos a cromatografia líquido-gasosa (GLC) para determinação da composição dos monossacarídeos neutros.

Os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por GLC usando um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo Electron Corporation) equipado com uma coluna capilar DB-225 (0.25 mm x 30 m). As temperaturas do injetor e do detector por ionização de chama (FID) foram de 250 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada de 100 °C a 215 °C a uma taxa de aquecimento de aquecimento de 40 °C/min. Hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL/min. Para a determinação do teor de monossacarídeos ácidos foi realizada a dosagem de ácidos urônicos, pelo método de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973), tendo como solução padrão ácido galacturônico nas concentrações de 10-100 µg/mL e leitura em 520 nm.

As análises de massa molar foram realizadas em um equipamento constituído por uma bomba (Waters 515), injetor, 4 colunas de ultrahydrogel – 120, 250, 500 e 2000 – com limites de exclusão 5.10^3 , 8.10^4 , 4.10^5 e 7.10^6 respectivamente e um detector de índice de refração

diferencial modelo 2410 (Waters). O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_2 0,1 M contendo 200 ppm de NaN_3 . As amostras foram solubilizadas na concentração de 1,0 mg/mL na solução do eluente. Antes das análises as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose com poro de 0,22 μm .

Propriedades físico-químicas das pectinas

A capacidade de absorção de gordura das pectinas foi realizada pelo método de Lin & Humbert (1974), e a capacidade de troca catiônica foi determinada através da capacidade de ligação a cobre pelo método McBurney *et al.* (1983). A capacidade de retenção de água foi medida pelo método de McConnel *et al.* (1974). Os compostos fenólicos foram extraídos pelo método proposto por Pérez-Jiménez *et al.* (2008). Primeiramente foi realizada extração dos compostos com uso de metanol/água (50:50 v/v, pH 2), seguido de extração adicional com acetona/água (70:30 v/v), resultando no Extrato 1. O resíduo desta extração aquosa-orgânica foi tratado com metanol/ H_2SO_4 a 85 °C por 20 horas para liberação dos polifenóis associados à fibra (Extrato 2). Os compostos fenólicos totais foram obtidos pela soma dos valores encontrados em cada extrato, pelo método Folin-Ciocalteau (Singleton *et al.*, 1999). Em seguida foi avaliada a atividade antioxidante pela capacidade de redução do ferro (FRAP), de acordo com Benzie & Strain (1996). Os resultados foram calculados como equivalente de ácido gálico (EAG) e expressos em mg EAG/g de amostra.

Estatística

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para os compostos fenólicos e atividade antioxidante, através do programa Statistical Package for the Social Sciences

(SPSS), versão 18.0. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de p menores que 0,05.

Resultados e discussão

As matérias-primas apresentaram alta concentração de fibra alimentar e, notadamente, a casca de soja apresentou predominância de fibra alimentar insolúvel (Tabela 1). As cascas de maracujá e de soja destacaram-se como fontes abundantes de pectinas, com teores de ácido galacturônico superiores aos encontrados no bagaço de laranja, considerado fonte nobre de pectina para fins comerciais (Ferreira-Leitão *et al.* 2010).

O concentrado péctico de casca de soja apresentou baixo rendimento de extração, enquanto a pectina de casca de maracujá e de bagaço de laranja apresentaram valores superiores (Figura 1). Kalapathy & Proctor (2001) obtiveram rendimentos de extração de pectina de casca de soja entre 12 e 19% utilizando concentrações diferentes de ácido para extração. Com ácido clorídrico 0,1 N estes mesmos autores obtiveram rendimentos de extração de 17 e 28%, acima dos percentuais obtidos neste estudo. A única diferença entre os métodos de extração foi que Kalapathy & Proctor (2001) utilizaram 2-propanol acidificado para precipitação da pectina, enquanto em nosso trabalho utilizamos álcool etílico. Ainda, alguns fatores ambientais, de cultivo e de processamento podem resultar em teores e arranjos moleculares diferenciados de pectina na matéria-prima, afetando seu rendimento de extração. O rendimento de extração da pectina de casca de maracujá foi superior aos 13,9% encontrados por Yapo (2009a), utilizando ácido nítrico a 0,3M.

A Tabela 2 apresenta os dados referentes à composição química dos concentrados pécticos extraídos da casca de soja, casca de maracujá e bagaço de laranja. O concentrado péctico de casca de maracujá apresentou alto teor de ácido galacturônico, embora seja menor

do que o observado em concentrados pécticos extraídos de casca de limão (69,6%), de casca de maracujá (entre 68,4 e 71,9%), de abóbora (75 a 78%) e de casca de soja (68 a 72%) (Yapo, 2009a; Kalapathy & Proctor, 2001; Cui & Chang, 2014). Um fato a destacar é que o método de extração assemelha-se aos utilizados para outros polissacarídeos solúveis, como beta-glicanas e hemiceluloses, onde utiliza-se apenas água a altas temperaturas, sem acidificação (Moura *et al.*, 2011; Krogell *et al.*, 2013). No entanto, o uso de meios acidificados não é seletivo apenas para extração de pectinas, uma vez que estas outras moléculas glicídicas também são solubilizadas. Na casca de soja este efeito pode ser notado mais acentuadamente, em função da pectina representar apenas 30% da fração glicídica, o restante é composto por hemiceluloses (50%) e celulose (20%) (Liu *et al.*, 2013). Os altos teores de arabinose, manose e galactose presentes no concentrado péctico da casca de soja reforçam esta hipótese e evidenciam a diferença entre os polissacarídeos deste concentrado e os presentes nos concentrados de casca de maracujá e bagaço de laranja. O grande percentual de carboidratos insolúveis na casca de soja confere maior dificuldade de extração das substâncias pécticas. Extração com oxalato de amônio e aquecimento por micro-ondas utilizado por Liu *et al.* (2013) resultou em polissacarídeos constituídos principalmente de galactose (47,45 mol%), xilose (25,09 mol%) e teor de ácido galacturônico (15,07%) inferior ao obtido neste estudo (18,41%).

O concentrado péctico da casca de maracujá apresentou grau de esterificação superior a 70%, que costuma ser o valor máximo encontrado para pectinas extraídas com uso de ácidos (Dominiak *et al.*, 2014). Alto grau de esterificação confere à pectina a capacidade de formar gel rapidamente em altas temperaturas, além de uma ação mais efetiva sobre o perfil lipídico (Brouns *et al.*, 2012; Dominiak *et al.*, 2014). No entanto, o grau de esterificação representa a razão entre os grupos carboxila esterificados com metanol e os grupos carboxila livres, enquanto que o percentual de grupos metoxila refere-se à quantidade de grupos metoxila em

uma amostra (Gnanasambandam & Proctor, 1999). Portanto, embora apenas o grau de esterificação seja mensurado na maioria dos estudos, este índice não deve ser avaliado isoladamente, pois não representa a real quantidade de metil-esterificações da amostra, principalmente quando o percentual de ácido galacturônico é baixo. Gnanasambandam & Proctor (1999) realizaram extração de pectina da casca de soja com ácido nítrico 0,1N e o produto final apresentou conteúdo de grupos metoxila de 4,05%, valor acima do obtido no concentrado péctico de casca de soja, e abaixo dos valores obtidos para os concentrados de casca de maracujá e bagaço de laranja em nosso trabalho.

O concentrado péctico de casca de soja apresentou alto teor residual de proteína, provavelmente devido à alta higroscopicidade deste constituinte, o qual foi solubilizado juntamente com os polissacarídeos durante a extração. O relevante teor de compostos fenólicos nos concentrados demonstrou que o processo de extração não foi eficiente para romper totalmente a associação destes constituintes com os polissacarídeos complexos dos tecidos vegetais.

A capacidade de retenção de água, a capacidade de absorção de gordura, a capacidade de ligação a cobre e a atividade antioxidante foram superiores para o concentrado de casca de maracujá (Tabela 3). Essas características indicam a versatilidade dessas substâncias pécticas para inclusão na formulação de alimentos, além de sugerir um papel importante no metabolismo humano. A capacidade de retenção de água é uma propriedade relevante do ponto de vista tecnológico e fisiológico, pois pode aumentar o volume e modificar a viscosidade e textura dos alimentos, além de reduzir calorias e alterar a digestão e absorção de gorduras (Gunness & Gidley, 2010; Rubio-Senent *et al.*, 2015). A capacidade de absorção de gordura parece estar relacionada com o grau de acetilação e de esterificação das moléculas, devido ao aumento da sua hidrofobicidade (Rubio-Senent *et al.*, 2015). O grau de acetilação não foi mensurado neste trabalho, mas o grau de esterificação foi maior para o concentrado de

casca de maracujá, o mesmo que apresentou a maior capacidade de absorção de gordura. Ainda, a alta capacidade de retenção de água associada à alta capacidade de absorção de gordura, indica boa capacidade de emulsificação, pois facilita a solubilização ou dispersão de dois líquidos não miscíveis. A capacidade de retenção de água exibida pelo concentrado péctico de casca e maracujá foi semelhante ao encontrado por Rubio-Senent *et al.* (2015) para pectina comercial proveniente de citros (10,35 g de água/g de amostra). Os mesmos autores extraíram pectinas de bagaço de azeitona e obtiveram um concentrado com alta capacidade de absorção de gordura (6,17 g de óleo/g de amostra).

Polissacarídeos como a pectina podem agir como quelantes de metais, seja pela presença de seus grupamentos ácidos com alta afinidade por cátions, ou pela substituição das moléculas de água da esfera de solvatação de cátions pelos grupos hidroxila do polissacarídeo (Chen *et al.*, 2010). Esses dois fatores justificam a alta capacidade de ligação a cobre demonstrada pelos concentrados pécticos de casca de maracujá e de bagaço de laranja. Boa capacidade de ligação a cátions confere a polissacarídeos propriedades importantes na saúde humana e na tecnologia de alimentos. Na saúde humana uma alta capacidade de ligação catiônica aumenta a associação da fibra com os sais biliares no trato gastrintestinal, diminuindo sua participação na digestão das gorduras dietéticas e diminuindo a reabsorção de sais biliares (Lee *et al.*, 2002). Na tecnologia de alimentos, alta capacidade de ligação a cátions auxilia na estabilidade de emulsões, pois o complexo polissacarídeo-metal impede a interação do metal com os ácidos graxos, evitando sua oxidação. Entretanto, níveis muito altos de complexos polissacarídeo-metal podem levar à instabilidade física da emulsão e floculação (Chen *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante é um parâmetro importante tanto para o processamento de alimentos quanto para a nutrição, o que reforça a busca por substâncias naturais bioativas (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2010). O objetivo primário dos concentrados pécticos

não é sua utilização na formulação de alimentos pela atividade antioxidante, todavia, esta pode ser uma propriedade adicional. Alguns estudos atribuem atividade antioxidante aos polissacarídeos (Lai *et al.*, 2010; Dalonso & Petkowicz, 2012). Porém, essas constatações não levaram em consideração o teor de compostos fenólicos associados à fibra, liberados pela ação das enzimas digestivas e pela fermentação intestinal, e que podem produzir efeitos biológicos significativos (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Nosso trabalho mostrou correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos nos concentrados e sua atividade antioxidante ($r = 0,99$, $P = 0,0002$). A amostra que continha maior teor de compostos fenólicos foi o concentrado péctico de casca de maracujá, o qual apresentou maior atividade antioxidante.

Na Figura 2 são apresentados os perfis de eluição dos concentrados pécticos, detectados pelo espalhamento de luz e índice de refração, os quais possibilitam a obtenção de informações sobre perfil de massa molar da amostra. O espalhamento de luz estática nos fornece informações sobre o tamanho, massa molar e concentração do polímero, uma vez que a intensidade da luz polarizada por uma molécula é diretamente proporcional ao seu volume hidrodinâmico (Dominiak *et al.*, 2014; Yuliarti *et al.*, 2015). No detector de espalhamento de luz foram observados picos únicos para cada uma das três amostras analisadas, com tempo de eluição entre 35 e 40 minutos, o que indica a presença de um polímero de alta massa molar.

O índice de refração relaciona-se a concentração da solução polimérica (Yuliarti *et al.*, 2015). As moléculas maiores, de maior massa, aparecem primeiro no perfil de eluição por apresentarem tempo de retenção reduzido, enquanto que as de menor massa aparecem ao final (Dominiak *et al.*, 2014). Pelo índice de refração foram observados um pico maior eluindo entre 40 e 55 minutos, e picos menores eluindo em tempos maiores, demonstrando a heterogeneidade das amostras (Canteri *et al.*, 2010; Dominiak *et al.*, 2014). A alta intensidade do sinal detectado pelo índice de refração não coincide com o sinal do espalhamento de luz, indicando que

compostos de alta massa molar estão presentes em baixas concentrações nas amostras (Canteri *et al.*, 2010). As lavagens com etanol realizadas durante o processo de extração das pectinas são capazes de solubilizar e carrear alguns carboidratos de baixa massa molar do concentrado, principalmente os mono e dissacarídeos. No entanto, os oligossacarídeos e polissacarídeos de menores massas molares permanecem no meio, necessitando de outros tipos de processos de separação para total remoção.

Conclusão

A eficiência de extração de substâncias pécnicas foi superior a 15% para a casca de maracujá e bagaço de laranja, com teor de ácido galacturônico acima de 50% para ambas, no entanto, com menores teores residuais de proteínas e lipídios para a pectina de casca de maracujá. A capacidade de retenção de água, aliada à capacidade de absorção de gordura e capacidade de ligação a cátions são indicativos de que o concentrado pécnico da casca de maracujá possa ser explorado industrialmente como espessante e emulsificante em formulações alimentares. A presença de compostos fenólicos com capacidade antioxidante confere propriedades adicionais ao concentrado pécnico e ampliam sua aplicação industrial.

Referências

American Association of Cereal Chemists. (1995). *Official methods of analysis*. 9th ed. 2. Saint Paul.

Association of Official Analytical Chemists. (1995). *Official methods of analysis*. 16th ed. Washington.

Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.

Biermann, C.J. (1989). Hydrolysis and the other cleavage of glycosidic linkages. In: *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS* (edited by C.J. BIERMANN, & G.D.MCGINNIS). Pp. 27-41. Florida: CRC Press.

Bligh, E.G & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911-917.

Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, **54**, 484-489.

Brouns, F., Theuwissen, E., Adam, A., Bell, M., Berger, A. & Mensink, R.P. (2012) Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *European Journal of Clinical Nutrition*, **66**, 591-599.

Canteri, M.H., Scheer, A., Petkowicz, C., Ginies, C., Renard, C. & Wosiacki, G. (2010). Physicochemical composition of the yellow passion fruit pericarp fractions and respective pectic substances. *Journal of Food and Nutrition Research*, **49**, 113-122.

Chen, B., McClements, D.J. & Decker E.A. (2010). Role of continuous phase anionic polysaccharides on the oxidative stability of menhaden oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 3779-3784.

Cui, S.W. & Chang, Y.H. (2014). Emulsifying and structural properties of pectin enzymatically extracted from pumpkin. *LWT - Food Science and Technology*, **58**, 396-403.

Dalonso, N. & Petckowicz, C.L.O. (2012). Guarana powder polysaccharides: Characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. *Food Chemistry*, **134**, 1804–1812.

Dominiak, M., Søndergaard, K.M., Wichmann, J., Vidal-Melgosa, S., Willats, W.G.T., Meyer, A.S. & Mikkelsen, J.D. (2014). Application of enzymes for efficient extraction, modification, and development of functional properties of lime pectin. *Food Hydrocolloids*, **40**, 273-282.

Ferreira-Leitão, V., Perrone, C.C., Rodrigues, J., Franke, A.P.M., Macrelli, S., Zacchi, G. (2010). Research an approach to the utilization of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, **3**, 1-8.

Gnanasambandam, R. & Proctor, A. (1999). Preparation of soy hull pectin. *Food Chemistry*, **65**, 461-467.

Gunness, P. & Gidley, M.J. (2010). Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food and Function*, **1**, 149–155.

Joye, D.D. & Luzio, G.A. (2000). Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. *Carbohydrate Polymers*, **43**, 337–342.

Kalapathy, U. & Proctor, A. (2001). Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. *Food Chemistry*, **73**, 393-396.

Krogell, J., Korotkova, E., Eränen, K., Pranovich, A., Salmi, T., Murzin, D. & Willför, S. (2013). Intensification of hemicellulose hot-water extraction from spruce wood in a batch extractor – Effects of wood particle size. *Bioresource Technology*, **143**, 212–220.

Lai, F., Wen, Q., Li, L., Wu, H. & Li, X. (2010). Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vigna radiata L.*) hull with ultrasonic assisted treatment. *Carbohydrate Polymers*, **81**, 323–329.

Lane, J.H. & Eynon, L. (1934). *Determination of reducing sugars by Fehling's solutions with methylene blue indicator*. Pp. 1-8. London: Normam Rodge.

Lee, J.K., Kim, S.Y., Kim, S.U. & Kim, J.H. (2002). Synthesis of cationic polysaccharide derivatives and their hypocholesterolaemic capacity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **35**, 181–189

Lin, M.J.Y. & Humbert, E.S. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, **39**, 368–370.

Liu, H., Guo, X., Li, J., Zhu, D. & Li, J. (2013). The effects of MgSO₄, D-glucono-d-lactone (GDL), sucrose, and urea on gelation properties of pectic polysaccharide from soy hull. *Food Hydrocolloids*, **31**, 137-145.

Martínez, M., Gullón, B., Yáñez, R., Alonso, J.L. & Parajó, J.C. (2010). Kinetic assessment on the autohydrolysis of pectin-rich by-products. *Chemical Engineering Journal*, **162**, 480–486.

McBurney, M.I., Van Soest, P.J. & Chase, L.E. (1983). Cation exchange capacity and buffering capacity of neutral-detergent fibres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **34**, 910-916.

McConnel, A.A., Eastwood, M.A. & Mitchell, W.D. (1974). Physical characteristics of vegetable foodstuffs that could influence bowel function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **25**, 1457-1464.

Moura, F.A., Pereira, J.M., Silva, D.O., Zavareze, E.R., Moreira, A.S., Helbig, E. & Dias, A.R.G. (2011). Effects of oxidative treatment on the physicochemical, rheological and functional properties of oat β-glucan. *Food Chemistry*, **128**, 982–987.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I. & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, **41**, 274–285.

Ramos-Aguilar, O.P., Ornelas-Paz, J.J., Ruiz-Cruz, S., Zamudio-Flores, P.B., Cervantes-Paz, B., Gardea-Béjar, A.A., Pérez-Martínez, J.D., Ibarra-Junquera, V. & Reyes-Hernández, J. (2015). Effect of ripening and heat processing on the physicochemical and rheological properties of pepper pectins. *Carbohydrate Polymers*, **115**, 112–121.

Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A. & Fernández-Bolaños, J. (2015). Pectin extracted from thermally treated olive oil by-products: characterization, physico-chemical properties, in vitro bile acid and glucose binding. *Food Hydrocolloids*, **43**, 311-321.

Schultz T.H. (1965). Determination of the degree of esterification of pectin, determination of the ester methoxyl content of pectin by saponification and titration. Determination of the anhydro uronic acid content by decarboxylation and titration of the liberated carbon dioxide. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*. 5. Pp.189-194. New York: Academic Press.

Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuelaraventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178.

Wang, X., Chen, Q. & Lü, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, **38**, 129-137.

Wolfrom, M.L. & Thompson, A. (1963a). Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **2**, 211-215.

Wolfrom, M.L. & Thompson, A. (1963b). Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **2**, 65-68.

Yapo, B.M. (2009a). Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 1572–1578.

Yapo, B.M. (2009b). Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*, **42**, 1197–1202.

Yapo, B.M. (2010). Improvement of the compositional quality of monocot pectin extracts contaminated with glucuronic acid-containing components using a step-wise purification procedure. *Food and Bioprocess Processing*, **88**, 283–290.

Yuliarti, O., Matia-Merino, L., Goh, K.K.T., Mawson, J., Williams, M.A.K. & Brennan, C. (2015). Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods. *Food Chemistry*, **166**, 479–485.

Tabela 1. Composição química e propriedades físico-químicas da casca de soja, casca de maracujá e bagaço de laranja.

Composição química (base seca)	Casca de soja	Casca de maracujá	Bagaço de laranja
Fibra alimentar total (%)	83,73	62,64	54,62
Fibra alimentar solúvel (%)	9,49	19,22	24,98
Fibra alimentar insolúvel (%)	74,25	43,43	29,65
Ácido galacturônico (%)	18,85	23,21	16,01
Açúcares redutores (%)	n.d.*	9,16	29,42
Proteína (%)	11,84	5,26	4,84
Lipídios (%)	1,67	1,26	4,29
Cinzas (%)	4,09	6,04	3,26

*Não detectado.

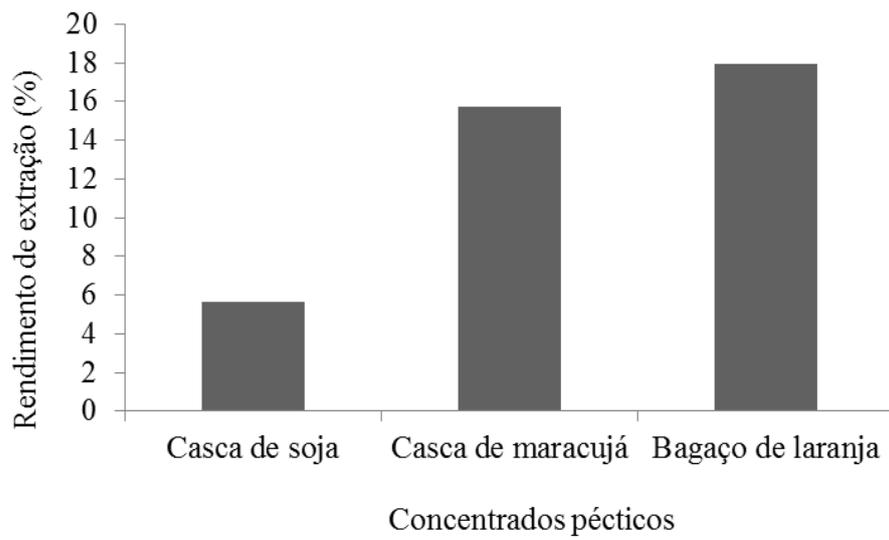


Figura 1. Rendimento de extração de concentrados pécticos de casca de soja, casca de maracujá e bagaço de laranja.

Tabela 2. Composição química dos concentrados pécnicos extraídos de casca de soja, casca de maracujá e bagaço de laranja.

Composição química (% em base seca)	Concentrado pécnico		
	Casca de soja	Casca de maracujá	Bagaço de laranja
Ramnose	1,47	5,10	3,28
Fucose	0,51	0,00	0,00
Arabinose	7,41	2,01	2,48
Xilose	1,17	1,84	0,48
Manose	31,47	0,84	0,64
Galactose	11,44	8,12	7,77
Glicose	1,47	14,48	4,96
Ácido galacturônico	18,41	51,30	60,45
Grau de esterificação	68,96	84,17	60,79
Grupos metoxila	3,05	9,08	8,08
Proteína	13,70	2,93	4,15
Lipídios	0,52	0,38	1,77
Cinzas	4,25	4,13	3,65
Compostos fenólicos (mg EAG/g)	11,53	16,85	13,19

Tabela 3. Propriedades físico-químicas dos concentrados pécticos extraídos de casca de soja, casca de maracujá e bagaço de laranja.

Propriedade físico-química	Concentrado péctico		
	Casca de soja	Casca de maracujá	Bagaço de laranja
Capacidade de retenção de água (g água/g amostra)	6,08	11,59	7,57
Capacidade de absorção de gordura (g de óleo/g de amostra)	2,73	4,05	2,97
CLCu* (mg Cu/g de amostra)	16,61	117,51	73,47
Atividade antioxidante (μ M Trolox/g)	29,68	63,24	45,92

* Capacidade de ligação a cobre.

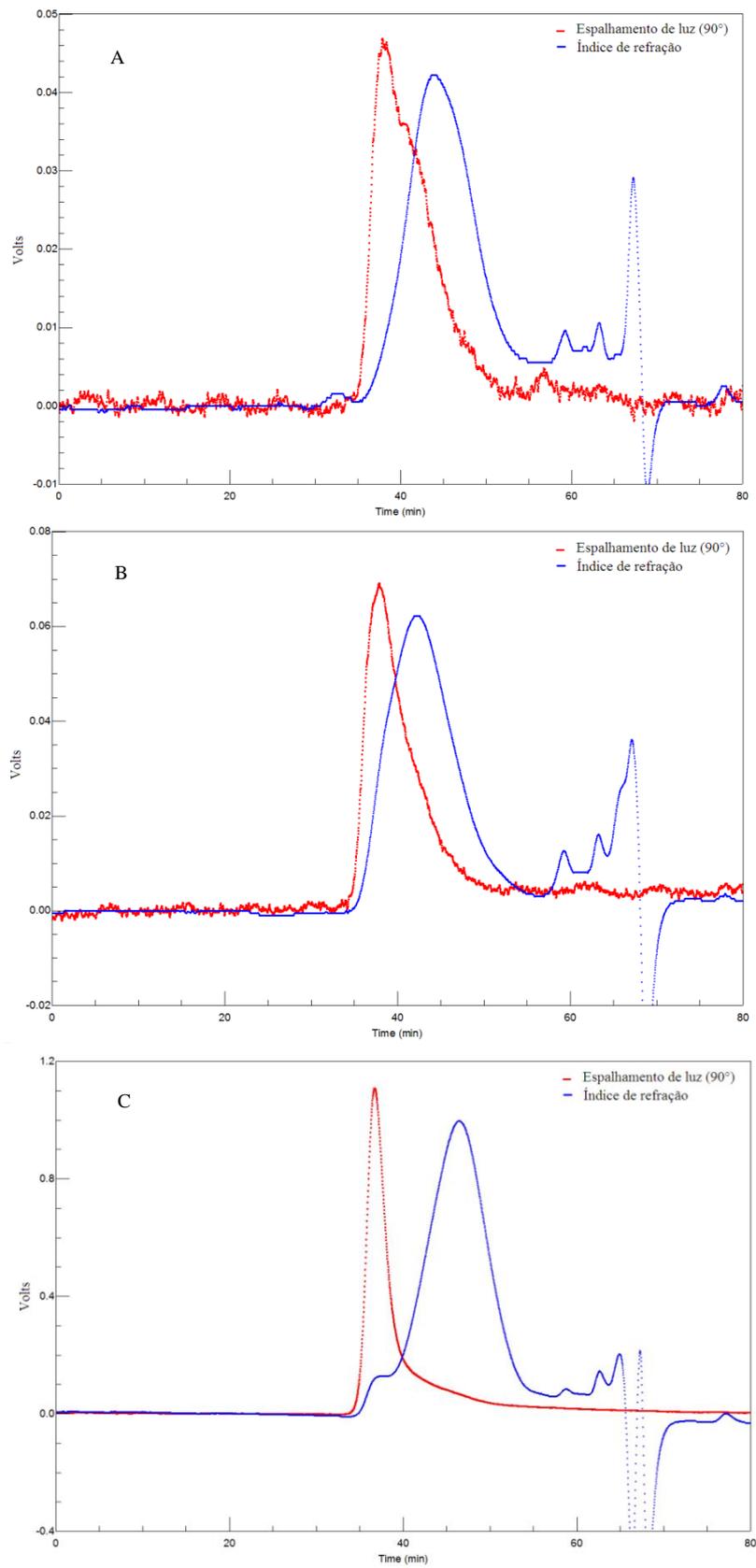


Figura 2. Perfil de eluição dos concentrados péclicos: A – casca de soja, B – casca de maracujá, C – bagaço de laranja.

MANUSCRITO 2 – Formatado conforme as normas do periódico LWT - Food
Science and Technology

**Pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada: perfil de massa molar e
propriedades físico-químicas**

Fernanda Aline de Moura^{1*}, Fernanda Teixeira Macagnan¹, Carmen Lúcia de Oliveira
Petkowicz², Leila Picolli da Silva³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima – 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, CP 19046, CEP 81531-980, Curitiba-PR, Brazil.

³ Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima – 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

* Corresponding author: Tel. +55 55 3220 8083
E-mail address: fernandamoura@unipampa.edu.br

Resumo: As propriedades físico-químicas dos carboidratos estão intimamente relacionadas à sua estrutura (massa molar, arranjo molecular e composição). São estas características que determinam o papel fisiológico e tecnológico dos compostos glicídicos. Os oligossacarídeos pécticos, produzidos a partir da hidrólise da pectina, apresentam maior potencial prebiótico, entretanto, diferentes matérias-primas e processos de produção resultam produtos com propriedades diferenciadas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de distribuição de massa molar e as propriedades físico-químicas de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada, obtidos por hidrólise ácida em tempos crescentes de reação. A pectina parcialmente hidrolisada apresentou diferenças de perfil de massa molar em relação à pectina sem hidrólise, com aumento da concentração de compostos de menor massa molar, mas com preservação de cadeias de ácido poligalacturônico. A redução da capacidade de retenção de água e de ligação a cátions, aliado ao aumento da capacidade de absorção de gordura das pectinas parcialmente hidrolisadas ampliam as possibilidades de inclusão deste ingrediente funcional em formulações alimentícias.

Palavras-chave: despolimerização, oligossacarídeos pécticos, retenção de água, absorção de gordura, ligações iônicas.

1. Introdução

As fibras alimentares solúveis são carboidratos complexos e diversificados quanto a sua composição monossacarídica, massa molar e arranjo molecular, o que influi decisivamente sobre suas propriedades físico-químicas. São estas propriedades que determinam o papel da fibra no metabolismo humano e sua influência nas características sensoriais e tecnológicas dos produtos aos quais serão incorporadas (Olano-Martin, Gibson, &

Rastall 2001; Brouns et al., 2012; Kermani, Shpigelman, Pham, Van Loey, & Hendrickx, 2015).

Do ponto de vista fisiológico, as fibras alimentares têm papel importante como ingrediente funcional, agindo na digestão e absorção dos nutrientes da dieta (Espinal-Ruiz Parada-Alfonso, Restrepo-Sánchez, Narváez-Cuenca, & McClements, 2014a; Espinal-Ruiz Parada-Alfonso, Restrepo-Sánchez, Narváez-Cuenca, & McClements, 2014b; Rubio-Senent Rodríguez-Gutiérrez, Lama-Muñoz, & Fernández-Bolaños, 2015), com reflexos na saciedade, controle de peso, perfil lipídico e glicemia (Gunness & Gidley, 2010; Brouns et al., 2012; Cani et al., 2009). Dentre as fibras com estas propriedades, destaca-se a pectina, um componente da parede celular em frutas e vegetais, disponível em abundância em alguns tipos de resíduos da indústria de alimentos, como casca de maracujá, cascas de citros, bagaço de maçã e polpa de beterraba (Canteri et al., 2010; Combo et al., 2013; Gómez et al., 2014). Suas características estruturais são diversificadas de acordo com a fonte, mas com predominância de ácido galacturônico nas cadeias principais e de monossacarídeos neutros nas laterais (Round, Rigby, MacDougall, & Morris, 2010; Wikiera, Mika, Starzynska-Janiszewska, & Stodolak, 2015; Zhang, Zhang, Liu, Ding, & Ye, 2015). Pela abundância e baixo custo, sua caracterização estrutural e aplicações são constantemente estudadas, com o intuito de ampliar sua utilização como ingrediente funcional.

Atualmente vem se destacando resultados de estudos que indicam hidrolisados pécticos como efetivos agentes prebiótico (Gullón, Gullón, Sanz, Alonso, & Parajó, 2011; Chen et al., 2013; Gómez et al., 2014), pois embora fibras de alto peso molecular expressem atividade prebiótica, são os carboidratos não digeríveis de menor massa molar - os oligossacarídeos - que produzem uma fermentação intestinal mais seletiva (Olano-Martin et al., 2001). Os processos de hidrólise das pectinas resultam em oligossacarídeos de grande diversidade molecular, que representam uma nova classe de aditivos prebióticos, de obtenção

industrialmente factível, economicamente viável e ambientalmente correta. Neste cenário, a matéria-prima e o processo produtivo determinarão as características estruturais e propriedades físico-químicas dos hidrolisados, bem como sua ação fisiológica e aplicabilidade em formulações alimentícias (Combo et al., 2013). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de distribuição de massa molar e as propriedades físico-químicas de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada, obtidos por hidrólise ácida em tempos crescentes de reação.

2. Materiais e métodos

2.1 Matérias-primas

Casca de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) obtida pela extração de polpa e sementes.

2.2 Extração da pectina

A extração da pectina da casca de maracujá foi realizada com solução de HCl 0,05 N, a 90 °C, com agitação, por 45 min, numa proporção de 700 mL de solução de HCl para 25 g de casca de maracujá. Após a extração foi realizada centrifugação a 3700 rpm por 15 min, sendo então coletado o sobrenadante e adicionado etanol a 96%, em quantidade suficiente para duplicar o volume de solução. A solução permaneceu 12 horas sob refrigeração, sendo então coletado sobrenadante, o qual foi lavado novamente com etanol a 96% permanecendo em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. A lavagem com etanol foi repetida mais duas vezes. Em seguida, a pectina foi seca em estufa a 50 °C com circulação forçada de ar, moída em micromoinho e armazenada a 4 °C. O produto obtido apresentou teor residual de proteínas, cinzas e gordura de 2,67%, 3,77% e 0,35%, respectivamente. A fração glicídica

(93,21%) apresentou 6,1% de ramnose, 2,4% de arabinose, 2,2% de xilose, 1% de manose, 9,7% de galactose, 17,3% de glicose e 61,6% de ácido galacturônico.

2.3 Hidrólise da pectina

Para a hidrólise, a pectina extraída da casca de maracujá foi dissolvida em solução de HCl 0,25 N, numa proporção amostra(g):solução(mL) de 1:50, a 60 °C, sob agitação, com variações no tempo de reação: 2, 3 e 4 horas. Para interromper a hidrólise foi adicionado KOH para neutralização (pH 7,0). O material neutralizado foi liofilizado.

2.4 Massa molar dos hidrolisados

As análises de massa molar foram realizadas em um equipamento constituído por uma bomba (Waters 515), injetor, quatro colunas de ultrahydrogel – 120, 250, 500 e 2000 – com limites de exclusão $5 \cdot 10^3$, $8 \cdot 10^4$, $4 \cdot 10^5$ e $7 \cdot 10^6$ respectivamente e um detector de índice de refração diferencial modelo 2410 (Waters). O eluente utilizado foi uma solução de NaNO_2 0,1 M contendo 200 ppm de NaN_3 . As amostras foram solubilizadas na concentração de 1,0 mg/mL na solução do eluente. Antes das análises as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose com poro de 0,22 μm .

2.5 Propriedades físico-químicas dos hidrolisados

A capacidade de absorção de óleo das amostras foi realizada pelo método de Lin e Humbert (1974), a capacidade de retenção de água foi medida pelo método de McConnel, Eastwood, e Mitchell (1974), e a capacidade de troca catiônica foi determinada através da capacidade de ligação a cobre pelo método McBurney, Van Soest, e Chase (1983).

2.6 Análise Estatística

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata e as de massa molar em duplicata. Os resultados das análises físico-químicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, através do programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 18.0. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

3. Resultados e discussão

A presença de polímero de alta massa molar é visualizado em sinal único no perfil de eluição da pectina sem hidrólise (0 h), pelo espalhamento de luz entre 35 e 40 minutos (Figura 1), sendo diretamente proporcional à concentração do produto e seu volume hidrodinâmico (Dominiak et al., 2014). Este sinal não coincide com o de maior amplitude observado pelo índice de refração, o qual reflete a concentração dos polímeros (Dominiak et al., 2014; Yuliarti et al., 2015). Considerando que os compostos de alta massa molar tendem a ter menores tempos de retenção, verifica-se grande heterogeneidade do material pela comparação dos sinais, com baixa concentração de compostos de alta massa molar (Canteri et al., 2010; Dominiak et al., 2014; Yuliarti et al., 2015).

A heterogeneidade de distribuição de massa das pectinas foi mais acentuada a partir de 2 horas de hidrólise com ácido clorídrico 0,25 N (Figura 1), mas com permanência do mesmo sinal que aparece na pectina sem hidrólise pelo espalhamento de luz. Este fato indica a presença de polissacarídeo de alta massa molar, resistente ao processo de hidrólise. Estudos relatam a alta estabilidade do ácido poligalacturônico e a preservação da cadeia principal da pectina em ambientes ácidos, liberando correntes laterais de açúcares neutros (Wikiera et al., 2015; Zhang et al., 2015). Nas pectinas parcialmente hidrolisadas observou-se diminuição da intensidade do primeiro sinal e aumento do tempo de retenção, entre 40 e 55 minutos, com

aumento da intensidade dos sinais a partir de 60 minutos. Este comportamento demonstra que a hidrólise ácida foi efetiva para diminuir a massa molar da maioria dos compostos pécnicos.

Na hidrólise ácida as variáveis a serem controladas são a concentração do ácido ou o pH, a temperatura e o tempo de reação (Lama-Muñoz, Rodríguez-Gutiérrez, Rubio-Senent, & Fernández-Bolaños, 2012). Todas estas variáveis podem ser otimizadas para aumentar a eficiência e diminuir os custos do processo. Neste estudo utilizamos ácido clorídrico em concentração moderada e baixa temperatura, buscando eficiência da hidrólise com variação do tempo de reação. Ácidos muito concentrados e temperaturas elevadas favorecem a formação de compostos indesejados como derivados do furfural (Wikiera et al., 2015).

As pectinas parcialmente hidrolisadas produzidas com três e quatro horas de reação não apresentaram alterações estruturais marcantes em relação à produzida com duas horas de reação. Portanto, conclui-se que duas horas de hidrólise são suficientes para obter mudança no perfil de massa molar na pectina de casca de maracujá. Este fato indica maior efetividade do processo, com menores custos de produção.

A hidrólise ácida provocou queda considerável na capacidade de retenção de água da pectina, independente do tempo de reação estudado (Figura 2). Mas a capacidade de absorção de gordura teve comportamento inverso, com maior valor para 2 horas de hidrólise. Evidências sobre a preservação da cadeia principal de ácido poligalacturônico da pectina e liberação das correntes laterais de açúcares neutros pela hidrólise ácida (Wikiera et al., 2015; Zhang et al., 2015) permitem deduzir que ocorra modificação do perfil de cargas expostas, alterando sua afinidade com compostos polares e apolares, o que provoca alterações das relações hidrofóbicas e hidrofílicas das pectinas parcialmente hidrolisadas. Da mesma forma, deve-se considerar que a estrutura física da molécula se altera, modificando espaços intracelulares e sua dinâmica absorptiva.

A capacidade de ligação a cobre diminuiu nas pectinas parcialmente hidrolisadas, mas ainda assim foi superior a 60 mg de cobre/g de amostra para todas as amostras. Este resultado demonstra a capacidade da pectina em se ligar a compostos quimicamente reativos como os sais biliares, impedindo a sua reabsorção intestinal e sua atuação na digestão e absorção de lipídios. A natureza das ligações entre os sais biliares e as fibras solúveis ainda não foi totalmente esclarecida, mas sabe-se que esta associação contribui para a diminuição dos níveis sanguíneos de colesterol (Gunness & Gidley, 2010). A alta capacidade de ligação a cátions da pectina envolve três fenômenos: adsorção, trocas iônicas e interações eletrostáticas (Dronnet, Renard, Axelos, & Tbibault, 1997). Uma vez que os hidrolisados sofreram alterações na sua estrutura, com diminuição da massa molar e diminuição da capacidade de retenção de água, provavelmente houve também diminuição da capacidade de adsorção. Além disso, as interações eletrostáticas podem ter sido reduzidas, pelo enfraquecimento das estruturas complexas das cadeias pécicas.

As alterações ocorridas nas pectinas parcialmente hidrolisadas, em especial na produzida com 2 horas de reação, amplia sua aplicação como emulsificante e estabilizante, principalmente pelo aumento da capacidade de absorção de gordura e diminuição da capacidade de ligação a cátions. Por ser um polissacarídeo de alta capacidade de ligação a cátions, quando adicionada em alta concentração com o objetivo de facilitar a solubilização de líquidos não-miscíveis, pode provocar esgotamento da emulsão e floculação, formando precipitados pela associação da pectina com proteínas e minerais (Dronnet et al., 1997; Kermani et al., 2015).

4. Conclusão

A hidrólise ácida de duas horas foi efetiva para promover alterações na massa molar e propriedades físico-químicas da pectina. A pectina parcialmente hidrolisada por duas horas

apresentou diferenças de perfil de massa molar em relação à pectina sem hidrólise, com aumento da concentração de compostos de menor massa molar, mas com preservação de cadeias de ácido poligalacturônico. A redução da capacidade de retenção de água e de ligação a cátions, aliado ao aumento da capacidade de absorção de gordura das pectinas parcialmente hidrolisadas ampliam as possibilidades de inclusão deste ingrediente funcional em formulações alimentícias.

Referências

- Brouns, F., Theuwissen, E., Adam, A., Bell, M., Berger, A., & Mensink, R. P. (2012). Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hypercholesterolemic men and women. *European Journal of Clinical Nutrition*, *66*, 591–599.
- Cani, P. D., Lecourt, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., et al. (2009). Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*, 1236–1243.
- Canteri, M. H., Scheer, A., Petkowicz, C., Ginies, C., Renard, C., & Wosiacki, G. (2010). Physicochemical composition of the yellow passion fruit pericarp fractions and respective pectic substances. *Journal of Food and Nutrition Research*, *49*, 113–122.
- Chen, J., Liang, R.-H., Liu, W., Li, T., Liu, C.-M., Wu S.-S., et al. (2013). Pectic-oligosaccharides prepared by dynamic high-pressure microfluidization and their in vitro fermentation properties. *Carbohydrate Polymers*, *91*, 175–182.
- Combo, A. M. M., Aguedo, M., Quiévy, N., Danthine, S., Goffin, D., Jacquet, N., et al. (2013). Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *52*, 148–156.

- Dominiak, M., Søndergaard, K. M., Wichmann, J., Vidal-Melgosa, S., Willats, W. G. T., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D. (2014). Application of enzymes for efficient extraction, modification, and development of functional properties of lime pectin. *Food Hydrocolloids*, *40*, 273-282.
- Dronnet, V. M., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., & Tibbault, J.-F. (1997). Binding of divalent metal cations by sugar-beet pulp. *Carbohydrate Polymers*, *34*, 13-82.
- Espinal-Ruiz, M., Parada-Alfonso, F., Restrepo-Sánchez, L.-P., Narváez-Cuenca, C.-E., & McClements, D. J. (2014a). Impact of dietary fibers [methyl cellulose, chitosan, and pectin] on digestion of lipids under simulated gastrointestinal conditions. *Food and Function*, *5*, 3083–3095.
- Espinal-Ruiz, M., Parada-Alfonso, F., Restrepo-Sánchez, L.-P., Narváez-Cuenca, C.-E., & McClements, D. J. (2014b). Interaction of a Dietary Fiber (Pectin) with Gastrointestinal Components (Bile Salts, Calcium, and Lipase): A Calorimetry, Electrophoresis, and Turbidity Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 12620–12630.
- Gómez, B., Gullón, B., Remoroza, C., Schols, H. A., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2014). Purification, Characterization, and Prebiotic Properties of Pectic Oligosaccharides from Orange Peel Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 9769–9782.
- Gullón, B., Gullón, P., Sanz, Y., Alonso, J. L., & Parajó J.C. (2011). Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 1687-1696.
- Gunness, P., & Gidley, M. J. (2010). Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food and Function*, *1*, 149–155.
- Kermani, Z. J., Shpigelman, A., Pham, H. T. T., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure. *Food Hydrocolloids*, *44*, 424-434.

- Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senent, F., & Fernández-Bolaños, J. (2012). Production, characterization and isolation of neutral and pectic oligosaccharides with low molecular weights from olive by-products thermally treated. *Food Hydrocolloids*, *28*, 92-104.
- Lin, M. J. Y., & Humbert, E. S. (1974). Certain functional properties of sunflower meal products. *Journal of Food Science*, *39*, 368–370.
- McBurney, M. I., Van Soest, P. J., & Chase, L. E. (1983). Cation exchange capacity and buffering capacity of neutral-detergent fibres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *34*, 910-916.
- McConnel, A. A., Eastwood, M. A., & Mitchell, W. D. (1974). Physical characteristics of vegetable foodstuffs that could influence bowel function. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *25*, 1457-1464.
- Olano-Martin, E., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2002). Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, *93*, 505–511.
- Round, A. N., Rigby, N. M., MacDougall, A. J., & Morris, V. J. (2010). A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, *345*, 487–497.
- Rubio-Senent, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., & Fernández-Bolaños, J. (2015). Pectin extracted from thermally treated olive oil by-products: characterization, physico-chemical properties, *in vitro* bile acid and glucose binding. *Food Hydrocolloids*, *43*, 311-321.
- Wikiera, A., Mika, M., Starzynska-Janiszewska, A., & Stodolak, B. (2015). Development of complete hydrolysis of pectins from apple pomace. *Food Chemistry*, *172*, 675–680.

- Yuliarti, O., Matia-Merino, L., Goh, K. K. T., Mawson, J., Williams, M. A. K., & Brennan, C. (2015). Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods. *Food Chemistry*, *166*, 479–485.
- Zhang, L., Zhang, X., Liu, D., Ding, T., & Ye, X. (2015). Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin. *LWT - Food Science and Technology*, *61*, 630-637.

Figure captions

Fig. 1. Perfis de eluição das pectinas parcialmente hidrolisadas com ácido clorídrico 0,25 N em tempos crescentes de reação: a) 0 hora; b) 2 horas; c) 3 horas; d) 4 horas.

Fig. 2. Capacidade de retenção de água, capacidade de absorção de gordura e capacidade de ligação a cobre de pectinas parcialmente hidrolisadas com ácido clorídrico 0,25 N em tempos crescentes de reação.

Figura 1

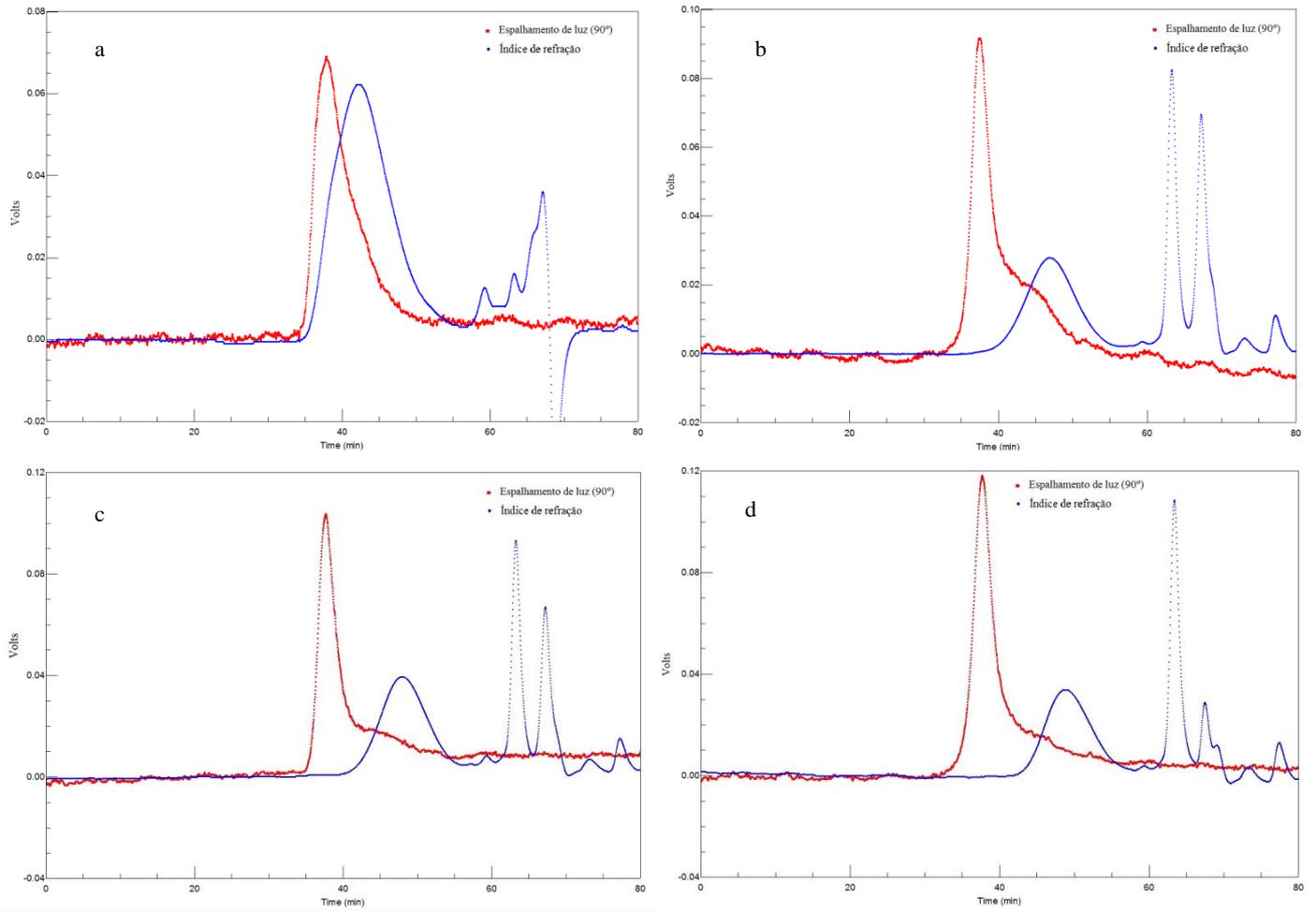
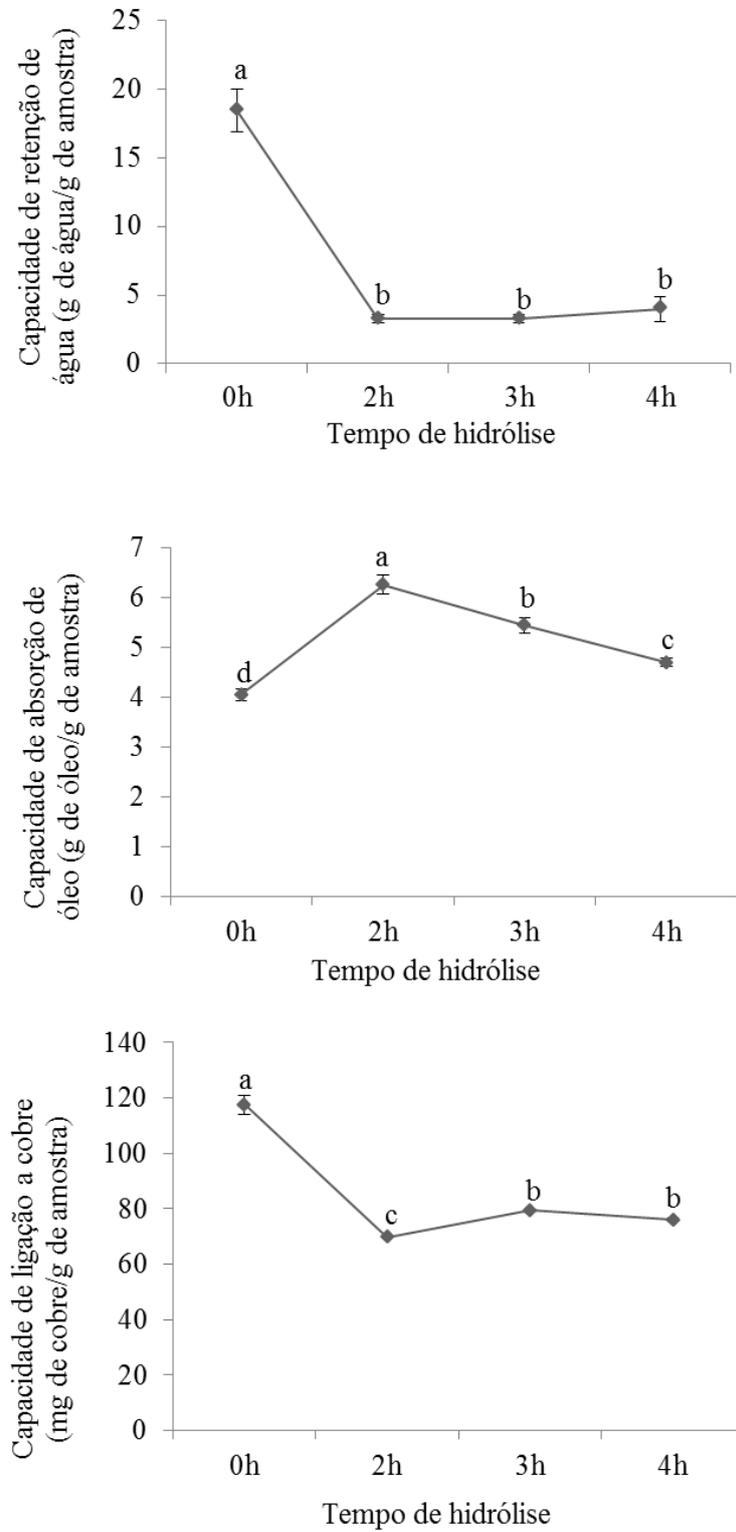


Figura 2



MANUSCRITO 3 – Formatado conforme as normas do periódico Journal of
Functional Foods

**Efeitos metabólicos e potencial prebiótico de pectina de casca de maracujá parcialmente
hidrolisada adicionada à dieta de ratos em crescimento**

Fernanda Aline de Moura^{1*}, Fernanda Teixeira Macagnan¹, Roger Wagner², Leila Picolli da
Silva³

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima – 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

² Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima – 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

² Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima – 1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

* Corresponding author: Tel. +55 55 3220 8083
E-mail address: fernandamoura@unipampa.edu.br

Resumo: Prebióticos produzidos a partir da hidrólise da pectina têm recebido atenção pelos seus efeitos *in vitro*. Entretanto, até o momento existem poucos os estudos que avaliam seu efeito *in vivo*, principalmente no que diz respeito à quantidade a ser consumida para obter efeitos benéficos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos metabólicos e o potencial prebiótico de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada, adicionada em baixas concentrações na dieta de ratos em crescimento. A pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada incluída em baixas concentração na dieta de ratos em crescimento não promoveu redução de colesterol (hepático e sanguíneo) e glicemia, além de promover maior consumo de dieta e ganho de peso. Seu efeito prebiótico foi confirmado pela maior produção de ácidos graxos de cadeia curta no ceco, com efeitos mais pronunciados entre 0,25 e 0,5% de adição. Estes resultados indicam ação importante da pectina parcialmente hidrolisada no intestino.

Palavras-chave: oligossacarídeos pécticos, ácidos graxos cadeia curta, colesterol, glicemia.

1. Introdução

Prebióticos são ingredientes fermentados seletivamente, que promovem mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota intestinal, resultando em benefícios sobre a saúde e bem estar do hospedeiro (Roberfroid et al., 2010). A atividade prebiótica é exercida principalmente pelos carboidratos capazes de resistir à digestão e absorção, como alguns oligossacarídeos (ex. frutooligossacarídeos e galactooligossacarídeos), que possuem elevado potencial bifidogênico (Olano-Martin, Gibson, & Rastall, 2002).

De acordo com Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, e Bressollier (2013) os prebióticos ainda são pouco compreendidos em sua origem, processos empregados para sua geração, seus perfis de fermentação e quantidades ideais de consumo para exercer efeito sobre a saúde.

Somado a isso, há interesse crescente em identificar, desenvolver, avaliar e comercializar novos ingredientes com propriedades funcionais.

Os oligossacarídeos produzidos a partir da hidrólise da pectina têm sido apontados como uma nova classe de prebióticos capazes de exercer propriedades benéficas à saúde (Holck et al., 2011; Gullón et al., 2013; Gómez et al., 2014). Porém, a maioria das investigações ainda concentra-se nas fases de produção e caracterização, uma vez que diferentes matérias-primas e métodos de hidrólise podem ser utilizados, gerando produtos finais distintos (oligogalacturonídeos, galactooligossacarídeos, arabinooligossacarídeos, glucooligossacarídeos, xilooligossacarídeos, entre outros) (Gullón, Gullón, Sanz, Alonso, & Parajó, 2011; Gullón et al., 2013). Alguns efeitos *in vitro* já foram identificados, como estimulação de bactérias da classe *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, com produção de ácidos graxos de cadeia curta e simultânea diminuição do número de bactérias das classes *Bacteroides* e *Clostridia* (Chen et al., 2013) e efeito protetor contra toxina Shiga de *Escherichia coli* O157:H7 (Olano-Martin, Williams, Gibson, & Rastall, 2003). Os poucos estudos *in vivo* dos hidrolisados pécticos, também demonstraram efeitos metabólicos relevantes em dietas para ratos e camundongos (Li et al., 2010; Zhu et al., 2013; Li, Li, Dong, Zhu, & Liu 2014).

Para que os efeitos deste novo grupo de prebióticos sejam potencializados, há necessidade de estabelecer quantidade ideal de consumo diária, considerando sua fonte e efeitos potenciais. Para diferentes tipos de prebióticos, incluindo pectina de baixa massa molar, as quantidades citadas na literatura são altas e variáveis (em torno de 5 a 10%) (Yamaguchi, Shimizu & Hatanaka, 1994; Adam et al., 2014). *A priori*, busca-se estabelecer a quantidade mínima de efeitos desejáveis, barateando o custo de inclusão dos ingredientes funcionais em produtos industrializados.

Os métodos de avaliação do efeito prebiótico *in vivo* ideais devem envolver identificação e contagem de microrganismos no trato intestinal. No entanto, métodos indiretos que mensurem produtos da fermentação pela microbiota intestinal, como os ácidos graxos de cadeia curta acetato, propionato e butirato; podem ser usados como indicadores do potencial prebiótico de ingredientes (Gibson, Probert, Loo, Rastall, & Roberfroid 2004). Outros efeitos metabólicos também podem ser notados pela ação de alguns prebióticos, como alterações na ingestão alimentar e na distribuição ou ganho de massa corporal, no pH intestinal e fecal (que tendem a diminuir pela produção de ácidos graxos de cadeia curta), no perfil lipídico (inibição da síntese de colesterol hepático pelo propionato), no perfil glicêmico e insulinêmico, na absorção de minerais e no sistema imunológico (Roberfroid et al., 2010; Gullón et al., 2013).

Essa constatação demonstra a necessidade de extensas avaliações em animais e humanos, pois a complexidade da composição e estrutura dos prebióticos, das interações destes com a microbiota intestinal e sua relação com os efeitos fisiológicos são aspectos decisivos no processo de confirmação das propriedades prebióticas de um novo ingrediente (Roberfroid et al., 2010). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos metabólicos e o potencial prebiótico de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada, adicionada em baixas concentrações na dieta de ratos *Wistar* em crescimento.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

Casca de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) obtida pela extração de polpa e sementes.

2.2 Extração da pectina

A extração da pectina da casca de maracujá foi realizada com solução de HCl 0,05 N, a 90 °C, com agitação, por 45 min, numa proporção de 700 mL de solução de HCl para 25 g de casca de maracujá. Após a extração foi realizada centrifugação a 3700 rpm por 15 min, sendo então coletado o sobrenadante e adicionado etanol a 96%, em quantidade suficiente para duplicar o volume de solução. Esta solução permaneceu 12 horas sob refrigeração, após foi coletado o sobrenadante, o qual foi lavado novamente com etanol a 96% permanecendo em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente. A lavagem com etanol foi repetida mais duas vezes. Em seguida, a pectina foi seca em estufa a 50 °C com circulação forçada de ar, moída em micromoinho e armazenada a 4 °C. O concentrado péctico apresentou 93,21% de carboidrato, composto por ramnose (6,1%), arabinose (2,4%), xilose (2,2%), manose (1%), galactose (9,7%), glicose (17,3%) e ácido urônico (61,6%).

2.3 Hidrólise parcial da pectina

Para a hidrólise, a pectina foi dissolvida em solução de HCl 0,25 N, numa proporção amostra(g):solução(mL) de 1:50, a 60 °C, por 2 horas sob agitação. Para interromper a hidrólise foi adicionado KOH para neutralização (pH 7,0). O material neutralizado foi submetido à secagem em estufa a 50 °C, com circulação forçada de ar por 12 horas. A composição final da fração glicídica foi de 12,87% de ramnose, 0,67% de fucose, 10,57% de arabinose, 4,63% de xilose, 2,2% de manose, 11,23% de galactose, 14,53% de glicose e 43,3% de ácido galacturônico.

2.4 Animais e dietas

Para o ensaio biológico foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos recém-desmamados (aproximadamente 21 dias), divididos em cinco grupos (n=8). As dietas para roedores em crescimento foram formuladas de acordo com Reeves, Nielsen, & Fahey Jr (1993) (Tabela 1), sendo acrescidas de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada em níveis crescentes, constituindo cinco tratamentos: 0% de pectina parcialmente hidrolisada (Controle), 0,25% de pectina parcialmente hidrolisada, 0,50% de pectina parcialmente hidrolisada, 0,75% de pectina parcialmente hidrolisada e 1% de pectina parcialmente hidrolisada.

O ensaio biológico teve duração de 38 dias, sendo os cinco primeiros de adaptação. Durante todo o período do experimento, a temperatura foi mantida a 22 ± 2 °C e a luminosidade controlada, com ciclo claro/escuro de 12 horas. O consumo de dieta foi verificado diariamente, e as fezes foram coletadas durante os últimos 13 dias de experimento.

A partir do 28º dia de experimento os animais foram selecionados aleatoriamente durante quatro dias consecutivos, em grupos de oito, para análise da concentração sanguínea pós-prandial de glicose, sendo aqueles submetidos à intervenção, excluídos na seleção seguinte. Após 12 h de jejum, os animais receberam 2 g ração. A glicemia de jejum (antes do consumo da ração) e aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a ingestão foi determinada por coleta de sangue da região caudal do rato, através de incisão com agulha e medidor de glicemia capilar (Breeze®2 - Bayer).

O peso dos animais foi aferido semanalmente. Ao final do ensaio os animais ficaram em jejum de 12 horas, sendo em seguida anestesiados com 60 a 80 mg de cetamina + 8 a 15 mg de xilazina/kg via intraperitoneal. Após anestesia foi coletado sangue por punção cardíaca, sendo em seguida realizada a eutanásia dos animais por meio de uma superdose de anestésico.

Por dissecação foram extraídos o fígado e a gordura epididimal, e em seguida coletado o conteúdo cecal para avaliação do conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta. A partir do peso da gordura epididimal e do peso corporal dos ratos calculou-se a relação gordura epididimal/peso corporal. O fígado foi armazenado sob congelamento para posteriores análises.

O projeto foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria, tendo sido aprovado em reunião de 23/05/2013, sob Número de Parecer 085/2012 (2).

2.5 pH e lipídios nas fezes

As fezes foram secas em estufa a 50 °C por 12 horas, sendo em seguida trituradas em micromoinho. O pH fecal foi medido com uso de pH-metro, utilizando-se 1 g de amostra dissolvido em 10 mL de água destilada. Para determinação do conteúdo de lipídios das fezes foi utilizado método de Bligh e Dyer (1959).

2.6 Análises sanguíneas

O sangue coletado através de punção cardíaca foi centrifugado para separação do soro sanguíneo, e deste foi determinado o colesterol total, HDL colesterol e triacilgliceróis (TAG) através de sistemas enzimáticos específicos (Colesterol enzimático líquido - Doles®, Colesterol HDL - Doles®, Triglicérides enzimático líquido - Doles®, respectivamente).

2.7 Análises do fígado

Para determinação do conteúdo de lipídios no fígado foi utilizado método de Bligh e Dyer (1959). Para quantificação de colesterol total foi realizada homogeneização de 0,5 g de fígado em 2,5 mL de álcool isopropílico. Após 24 h em repouso sob refrigeração, a mistura foi centrifugada a 2700 rpm por 5 minutos, sendo retirado do sobrenadante uma alíquota para quantificação do colesterol total, prosseguindo conforme instruções do kit colorimétrico (Colesterol enzimático líquido - Doles®).

2.8 Ácidos graxos de cadeia curta no conteúdo cecal

O conteúdo cecal foi analisado quanto à produção de ácidos graxos de cadeia curta por cromatografia gasosa conforme método proposto por Bianchi et al. (2011), com adaptações. Em tubos de ensaio foram colocados 0,5 g de amostra e 5,5 mL de água destilada, com subsequente agitação em vortex. Em seguida ocorreu centrifugação a 3500 rpm por 10 min. Uma alíquota de 1 mL foi retirada do sobrenadante e colocada em vial de extração de 5 mL, adicionando-se solução H₂SO₄ 1M para acidificação da amostra (pH ≈ 2). A extração dos ácidos graxos de cadeia curta foi realizada pelo método microextração em fase sólida (SPME), utilizando a fibra Car/PDMS (Supelco, 10 mm), a uma temperatura de 40 °C sob agitação, com um tempo de equilíbrio de 10 minutos e, após, 30 minutos de extração. A fibra de SPME foi dessorvida no injetor (230 °C, modo Split; razão 1:20) de um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização em chama (CG-FID Varian, Star 3400 CX). A separação dos voláteis foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida ZBWax Plus (30 m/0,25 mm, 0,25 µm) usando hidrogênio como gás de arraste (pressão 15psi, fluxo 1,3 mL/min). O forno do cromatógrafo foi programado para iniciar em 50 °C por 1 min, posteriormente foi acionada uma rampa com um gradiente de 5 °C/min até 110 °C, 15 °C/min até 230 °C, mantendo-se em isoterma por 10 minutos. A temperatura do detector de ionização

em chama foi de 230 °C. A identificação dos ácidos graxos de cadeia curta foi realizada pela comparação dos tempos de retenção do analito com os padrões autênticos ácido acético, propiônico e butírico (Sigma Aldrich), e a quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração calculada na faixa de 250- 3000 mg/L com os mesmos padrões.

2.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 18.0. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

3. Resultados

O consumo de dieta foi significativamente maior em todos os níveis de adição de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada em relação ao controle, da mesma forma que o ganho de peso durante o período experimental, e o peso das fezes coletadas nos últimos dias de experimento (Tabela 2). A razão gordura epididimal/peso corporal dos animais que receberam dieta contendo 0,5% de pectina parcialmente hidrolisada foi significativamente maior que o controle. O peso das fezes coletadas na fase final do ensaio biológico apresentou variação entre todos os níveis de que receberam pectina parcialmente hidrolisada em relação ao controle. O pH das fezes foi significativamente menor em relação ao controle apenas no nível de adição de 1% de pectina parcialmente hidrolisada. Todavia, o pH das fezes não diferiu significativamente entre os crescentes níveis de pectina parcialmente

hidrolisada. O teor de gordura eliminada nas fezes não diferiu entre os tratamentos, mas o percentual de gordura no fígado foi significativamente menor com a adição de 0,25% de pectina parcialmente hidrolisada em relação a 0,5% e 0,75%, sem diferir significativamente do controle. O teor de colesterol no fígado dos animais não apresentou variação significativa entre os níveis de adição.

A produção de ácido propiônico foi significativamente maior no ceco dos animais que receberam 0,25%, 0,5% e 0,75% de pectina hidrolisada em comparação ao controle. A produção de ácido butírico foi superior ao controle apenas para os tratamentos com 0,25 e 0,5% de pectina parcialmente hidrolisada. Embora tenha ocorrido uma tendência de aumento da produção de ácido acético nos níveis 0,25%, 0,5% e 0,75% de pectina, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 1).

Os níveis de colesterol total, colesterol HDL e triacilgliceróis do soro dos animais não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Figura 2).

Não foram observadas diferenças significativas da glicemia entre os tratamentos com os animais em jejum e em até 120 minutos após o consumo das dietas (Figura 3). A curva glicêmica se mostrou semelhante para todos os tratamentos em até 2 horas após o consumo das dietas.

4. Discussão

Alguns estudos demonstram que o consumo de prebióticos está associado à redução do ganho de massa corporal e redução de massa adiposa em ratos, geralmente ocasionado pela diminuição do consumo alimentar (Saad et al., 2013; Adam et al.; 2014). Porém, em nosso estudo a adição da pectina parcialmente hidrolisada promoveu aumento de 50% do consumo em comparação a dieta controle, o que se refletiu diretamente sobre o maior ganho de peso

corporal. O aumento do percentual de pectina parcialmente hidrolisada na dieta não foi acompanhado por aumento progressivo de consumo e de ganho de peso. Independente do nível de adição, o ganho de peso foi semelhante. A explicação para o maior consumo de dieta pode residir no fato da presença da pectina parcialmente hidrolisada ter conferido melhores características sensoriais à dieta, fato que só pode ser comprovado mediante análise sensorial, mas ainda não há estudos específicos de avaliação da adição de oligossacarídeos pécnicos aos alimentos. A maioria dos estudos com animais utiliza níveis superiores de prebiótico do que em nosso estudo. Geralmente são acrescentados de 5 a 10% do ingrediente nas dietas (Yamaguchi et al., 1994; Adam et al., 2014), podendo chegar a 20% (Parnell & Reimer, 2012). Administrando 5% de pectina ou pectina de baixo peso molecular Yamaguchi et al. (1994) não observaram diminuição do consumo alimentar e do ganho de peso em ratos tratados previamente com dieta aterogênica contendo colesterol e ácido biliar, em comparação a um grupo controle com a mesma dieta aterogênica e sem adição de fibra alimentar.

Outro resultado surpreendente é a razão gordura epididimal/peso corporal dos animais que receberam 0,5% de pectina parcialmente hidrolisada, significativamente maior que o controle. Os demais tratamentos com pectina parcialmente hidrolisada não diferiram estatisticamente do controle e do tratamento com 0,5%. Este fato demonstra que não houve diminuição de massa adiposa nos tratamentos com pectina parcialmente hidrolisada, nem maior eliminação de gordura, verificado pela ausência de diferença na proporção de gordura no fígado e nas fezes. Doses de oligossacarídeos pécnicos de 50, 150 e 300 mg/kg corporal durante 10 semanas foram eficientes para diminuir a gordura epididimal e perirenal em camundongos alimentados com dieta contendo alto teor de gordura, mas foram semelhantes ao grupo que recebeu dieta padrão sem acréscimo de gordura (Li et al., 2010; Li et al., 2014). Em nosso estudo, as doses diárias de prebiótico foram superiores (172 a 688 mg/kg) aos estudos citados. A diferença na composição dos prebióticos utilizados pode ser a causa das

diferenças notadas nos estudos, uma vez que Li et al. (2010) e Li et al. (2014) utilizaram oligossacarídeos provenientes de pectina de outras fontes, de massa molar ou grau de polimerização selecionados e alto percentual de ácido urônico (93,6% e 99,7%) , enquanto em nosso estudo utilizamos uma mistura de carboidratos de diferentes massas molares e com menor teor de ácido urônico. Além disso, em nosso estudo não foi utilizado modelo de dieta para indução de acúmulo de gordura, e o tempo de experimento foi menor (4,7 semanas).

O consumo de prebióticos está relacionado ao aumento do peso fecal (Saad et al., 2013). No entanto, em nosso trabalho, esse aumento de peso das fezes deve ser também atribuído ao maior consumo alimentar observado nos grupos que receberam a pectina parcialmente hidrolisada. Portanto, não há como afirmar que o aumento de peso das fezes está relacionado somente ao consumo da pectina parcialmente hidrolisada. A diminuição do pH das fezes ocorre pela produção de ácidos graxos de cadeia curta e lactato durante a fermentação (Sierra et al., 2015). Em nosso estudo houve uma tendência de diminuição do pH em todos os tratamentos com pectina parcialmente hidrolisada em relação ao controle, mas apenas o tratamento com 1% de pectina parcialmente hidrolisada foi significativamente menor que o controle e estatisticamente igual aos demais níveis de inclusão da pectina parcialmente hidrolisada. De acordo com Maki et al. (2012), o efeito direto das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta sobre o pH fecal pode não ser o mesmo visualizado em estudos *in vitro*, pois os ácidos graxos de cadeia curta são absorvidos através da mucosa intestinal. O ácido butírico, por exemplo, tem importante ação local, uma vez que é utilizado como substrato energético pelos colonócitos (Maki et al.; 2012).

A pectina parcialmente hidrolisada não promoveu mudanças significativas no metabolismo do colesterol e nos níveis sanguíneos de triacilgliceróis e glicose. Um dos mecanismos sugeridos para a ação dos prebióticos sobre o metabolismo do colesterol é a produção de ácidos graxos de cadeia curta, em especial o ácido propiônico, que altera o

metabolismo hepático do colesterol pela redução da atividade da enzima HMG-CoA redutase e da Acetil-CoA redutase, que catalisa a síntese de acetil-CoA a partir do acetato (Gunness & Gidley, 2010). No entanto, em nosso estudo, apesar da maior produção de ácido propiônico nos tratamentos com pectina parcialmente hidrolisada, não houve influência no metabolismo do colesterol. Os estudos de investigação deste mecanismo ainda são inconclusivos, e nem sempre é observada relação da produção de ácido propiônico e supressão da síntese de colesterol (Gunness & Gidley, 2010; Tong et al., 2015). Ainda, os efeitos sobre a glicemia, triacilgliceróis sanguíneos e metabolismo do colesterol estão relacionados com a viscosidade da fibra alimentar, a qual afeta a digestão e absorção de glicose, gordura e colesterol dietético, bem como, a reabsorção de sais biliares (Gunness & Gidley, 2010). A hidrólise diminui a viscosidade da pectina (Gulfi Arrigoni, & Amadò 2005), portanto, seus efeitos metabólicos podem ser menos pronunciados do que os observados com a pectina intacta.

5. Conclusões

A pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada incluída em baixas concentrações na dieta de ratos *Wistar* em crescimento não promoveu redução de colesterol (hepático e sanguíneo) e glicemia, além de promover maior consumo de dieta e ganho de peso. Seu efeito prebiótico foi confirmado pela maior produção de ácidos graxos de cadeia curta no ceco, principalmente os ácidos propiônico e butírico, com efeitos mais pronunciados entre 0,25 e 0,5% de adição. Estes resultados indicam ação importante da pectina parcialmente hidrolisada no intestino, mas seus efeitos *in vivo* e quantidades ideais de consumo necessitam de mais estudos para serem estabelecidos.

REFERÊNCIAS

- Adam, C. L., Williams, P. A., Dalby, M. J., Garden, K., Lynn M Thomson, L. M., Richardson, A. J., et al. (2014). Different types of soluble fermentable dietary fibre decrease food intake, body weight gain and adiposity in young adult male rats. *Nutrition & Metabolism*, *11*, 1-12.
- Bianchi, F., Dall'Asta, M., Del Rio, D., Mangia, A., Musci, M., & Scazzina, F. (2011). Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometric method for the determination of short-chain fatty acids from intestinal fermentation. *Food Chemistry*, *129*, 200–205.
- Bligh, E. G & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*, 911-917.
- Chen, J., Liang, R.-H., Liu, W., Li, T., Liu, C.-M., Wu S.-S., et al. (2013). Pectic-oligosaccharides prepared by dynamic high-pressure microfluidization and their in vitro fermentation properties. *Carbohydrate Polymers*, *91*, 175–182.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, *17*, 259–275.
- Gómez, B., Gullón, B., Remoroza, C., Schols, H. A., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2014). Purification, Characterization, and Prebiotic Properties of Pectic Oligosaccharides from Orange Peel Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 9769–9782.
- Gulfi, M., Arrigoni, E., Amadò, R. Influence of structure on in vitro fermentability of commercial pectins and partially hydrolysed pectin preparations. (2005). *Carbohydrate Polymers*, *59*, 247–255.

- Gullón, B., Gómez, B., Martínez-Sabajanes, M., Yañez, R., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2013). Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, *30*, 153-161.
- Gullón, B., Gullón, P., Sanz, Y., Alonso, J. L., & Parajó J.C. (2011). Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 1687-1696.
- Gunness, P., & Gidley, M. J. (2010). Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. *Food and Function*, *1*, 149–155.
- Holck, J., Hjernø, K., Lorentzen, A., Vignæs, L. K., Hemmingsen, L., Licht, T. R., & Mikkelsen, J. D. (2011). Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after *in vitro* fermentation. *Process Biochemistry*, *46*, 1039–1049.
- Li, T., Li, S., Du, L., Wang, N., Guo, M., Zhang, J., Yan, F., et al. (2010). Effects of haw pectic oligosaccharide on lipid metabolism and oxidative stress in experimental hyperlipidemia mice induced by high-fat diet. *Food Chemistry*, *121*, 1010–1013.
- Li, T., Li, S., Dong, Y., Zhu, R., & Liu, Y. (2014). Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglyceride synthesis in mice fed with a high-fat diet. *Food Chemistry*, *145*, 335–341.
- Maki, K. C., Gibson, G. R., Dickmann, R. S., Kendall, C. W. C., Chen, C.-Y. O., Costabile, A., et al. (2012). Digestive and physiologic effects of a wheat bran extract, arabinoxylan-oligosaccharide, in breakfast cereal. *Nutrition*, *28*, 1115–1121.
- Olano-Martin, E., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2002). Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, *93*, 505–511.

- Olano-Martin, Williams, E. M. R. Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. *FEMS Microbiology Letters*, *218*, 101-105.
- Parnell, J. A., & Reimer, R. A. (2012). Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. *British Journal of Nutrition*, *107*, 601–613.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey Jr, G. C. (1993). AIN-93M purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *Journal of Nutrition*, *123*, 1939-1951.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., et al. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, *103*, S1-S63.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, *50*, 1-16.
- Sierra, C., Bernal, M.-J., Blasco, J., Martínez, R., Dalmau, J., & Ortuño, I. (2015). Prebiotic effect during the first year of life in healthy infants fed formula containing GOS as the only prebiotic: a multicentre, randomised, double-blind and placebo-controlled trial. *European Journal of Nutrition*, *54*, 89–99.
- Tong, L.-T., Zhong, K., Liu, L., Zhou, X., Qiu, J., & Zhou, S. (2015). Effects of dietary hull-less barley b-glucan on the cholesterol metabolism of hypercholesterolemic hamsters. *Food Chemistry*, *169*, 344–349.
- Yamaguchi, F., Shimizu, N., & Hatanaka, C. (1994). Preparation and physiological effect of low-molecular-weight pectin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *58*, 679-682.

Zhu, R., Li, T., Dong, Y., Liu, Y., Li, S., Chen, G., Zhao, Z., et al. (2013). Pectin pentasaccharide from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. Var. *major*) ameliorates disorders of cholesterol metabolism in high-fat diet fed mice. *Food Research International*, 54, 262–268.

Figure captions

Figura 1. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta no material cecal de ratos *Wistar* com dieta contendo pectina parcialmente hidrolisada em níveis crescentes de adição. Letras diferentes nas barras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 2. Níveis de colesterol total, colesterol HDL e triacilgliceróis do soro de ratos *Wistar* com dieta contendo pectina parcialmente hidrolisada em níveis crescentes de adição.

Figura 3. Curva glicêmica de ratos *Wistar* após consumo de dieta com pectina parcialmente hidrolisada em níveis crescentes de adição. PPH: pectina parcialmente hidrolisada.

Tabela 1. Formulação básica das dietas experimentais em g.kg⁻¹ de dieta.

Ingredientes (g)	g.kg⁻¹
Caseína	200
Maltodextrina	132
Amido	397
Sacarose	100
Óleo de soja	70
Fibra (celulose microcristalina)	50
Mix mineral*	35
Mix vitamínico**	10
L-cistina	3
Bitartarato de colina	2,5
Tetra-butil hidroquinona	0,014

*Mix mineral (g ou mg/kg): Ca 142,94 g; P 44,61 g; K 102,81 g; Na 29,11 g; Cl 44,89 g; S 8,57 g; Mg 14,48 g; Fe 1,00 g; Zn 0,86 g; Si 0,14 g; Mn 0,30 g; Cu 0,17 g; Cr 0,03 g; B 14,26 mg; F 28,73 mg; Ni 14,31 mg; Li 2,85 mg; Se 4,28 mg; I 5,93 mg; Mo 4,32 mg; V 2,87 mg. *Mix vitamínico (g ou mg/kg): ácido nicotínico 3,00 g; pantotenato de cálcio 1,60 g; piridoxina-HCl 0,70 g; tiamina-HCl 0,60 g; riboflavina 0,60 g; ácido fólico 0,20 g; biotina 0,02 g; vitamina B12 2,50 mcg; vitamina E 7.500UI; vitamina A 400.000UI; vitamina D3 100.000UI; vitamina K1 0,075 g.

Tabela 2. Efeitos da adição de pectina parcialmente hidrolisada em níveis crescentes na dieta de ratos *Wistar* em crescimento.

	Níveis de adição de pectina parcialmente hidrolisada				
	0%	0,25%	0,50%	0,75%	1,00%
Consumo diário (g)	10,42 ^b ±0,96	16,64 ^a ±1,45	16,45 ^a ±1,68	16,64 ^a ±0,82	16,86 ^a ±1,26
Ganho de peso (g)	110,00 ^b ±5,95	169,37 ^a ±20,16	164,26 ^a ±16,78	161,05 ^a ±15,45	168,03 ^a ±18,29
RGE/PC*	0,79 ^b ±0,14	1,00 ^{ab} ±0,25	1,32 ^a ±0,19	1,02 ^{ab} ±0,17	1,08 ^{ab} ±0,13
Peso das fezes (g)**	14,11 ^b ±1,90	18,73 ^a ±2,35	19,32 ^a ±2,85	19,83 ^a ±3,18	18,72 ^a ±2,44
pH das fezes	5,94 ^a ±0,20	5,78 ^{ab} ±0,08	5,76 ^{ab} ±0,12	5,76 ^{ab} ±0,16	5,74 ^b ±0,08
Gordura nas fezes (%)	5,00±1,00	4,58±0,53	4,08±0,38	4,50±0,58	4,29±0,64
Gordura no fígado (%)	4,29 ^{ab} ±0,18	3,81 ^b ±0,27	4,55 ^a ±0,30	4,53 ^a ±0,41	4,19 ^{ab} ±0,51
Colesterol no fígado (mg/g)	1,38±0,34	1,49±0,30	1,70±0,44	1,52±0,20	1,62±0,37

Média±desvio padrão. Médias com letras sobrescritas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). *Relação gordura epididimal/peso corporal. **Coletadas nos últimos 13 dias de experimento.

Figura 1

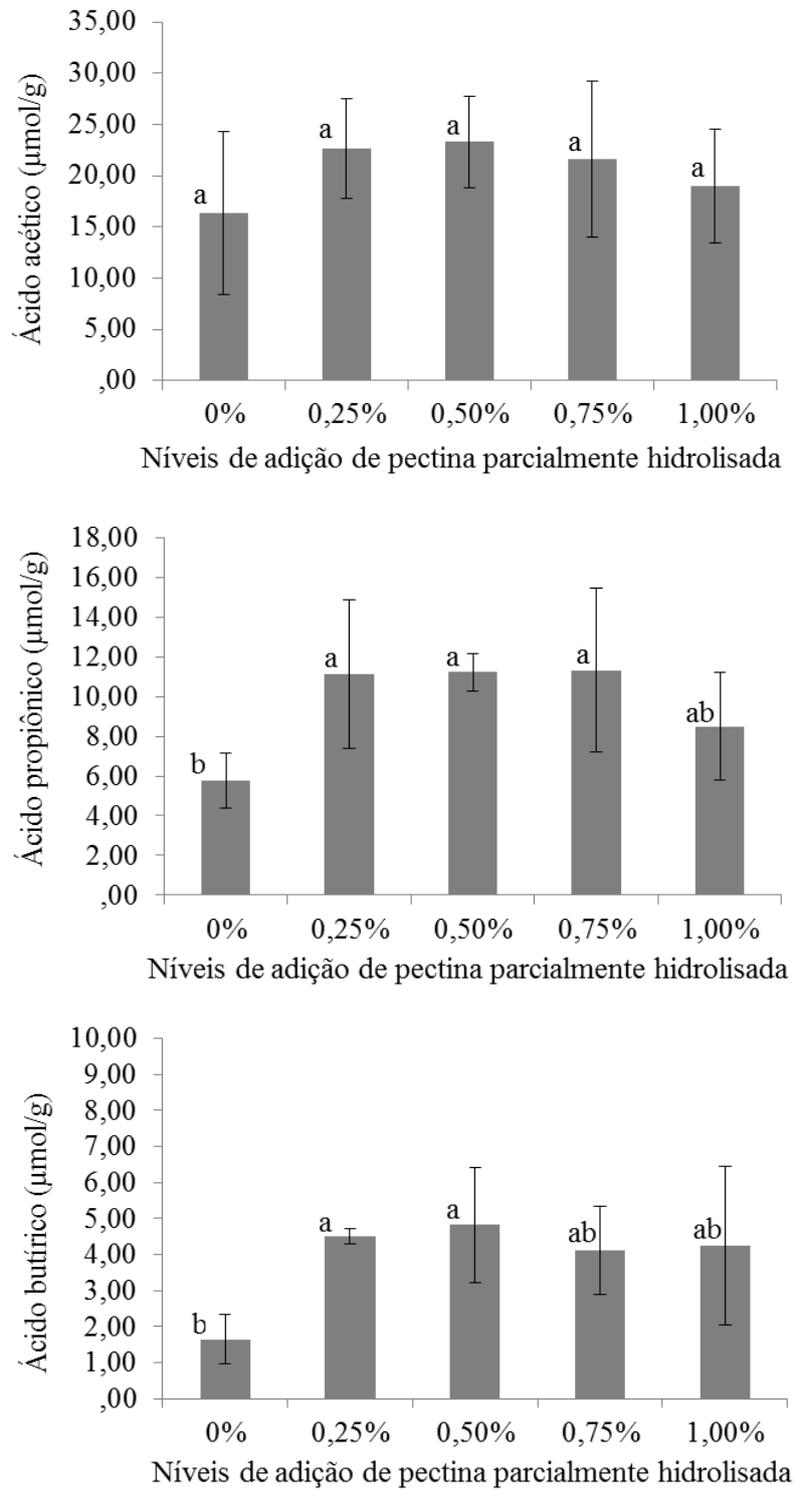


Figura 2

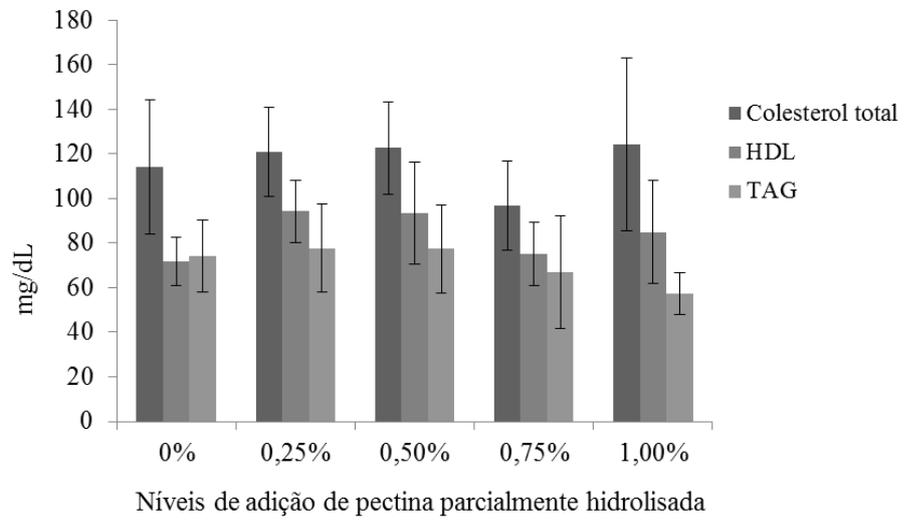
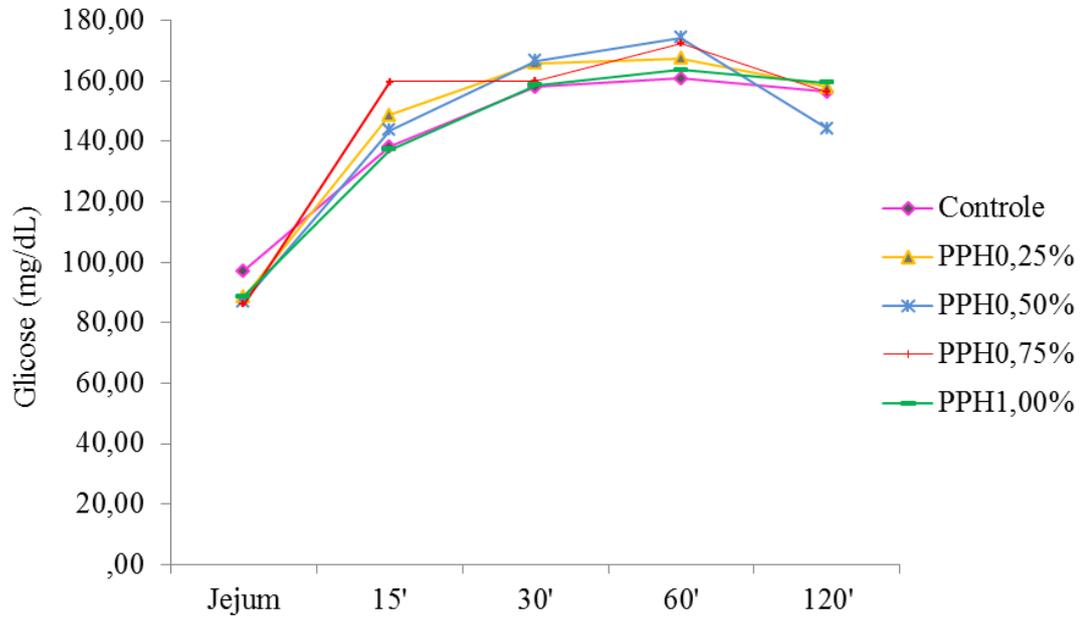


Figura 3



DISCUSSÃO

A casca de maracujá foi a matéria-prima de maior potencial para extração de pectinas por apresentar rendimento (15,71%) e teor de ácido galacturônico (51,3%), semelhante ao bagaço de laranja (17,96% de rendimento e 60,45% de ácido galacturônico) no concentrado péctico, porém com teores residuais de proteína e lipídeos reduzidos. Além disso, a casca de maracujá é um resíduo abundante da indústria de sucos, mas ainda pouco explorado. Embora com elevado teor de pectina em sua composição, o rendimento de extração deste polissacarídeo foi de apenas 5,66% para a casca de soja, demonstrando baixa aptidão desta fonte para obtenção de concentrados pécticos.

Os testes de hidrólise do concentrado péctico obtido da casca de maracujá demonstraram que duas horas de reação com ácido clorídrico 0,25 N promoveram mudanças significativas no perfil de distribuição de massa molar. A hidrólise aumentou a quantidade de compostos de baixa massa molar, porém, verificou-se a presença de um composto resistente à hidrólise. Este mesmo comportamento foi verificado nos demais tempos de hidrólise (três e quatro horas).

As alterações de massa molar também refletiram em mudanças nas propriedades físico-químicas, com diminuição da capacidade de retenção de água e da capacidade de ligação a cobre. A capacidade de absorção de gordura aumentou com a hidrólise, atingindo maior intensidade com duas horas de reação. Portanto, foi possível obter processo eficiente, com propriedades físico-químicas diferenciadas em relação ao material original, com menor tempo de reação.

O efeito prebiótico *in vivo* da pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada em concentrações mínimas (0,25%) foi confirmado pela alta produção de ácidos graxos de cadeia curta no ceco de ratos em crescimento. Os ácidos graxos de cadeia curta são produtos da fermentação bacteriana intestinal, portanto seu aumento nos tratamentos com pectina parcialmente hidrolisada evidencia o efeito bifidogênico da mesma. Todavia, nenhuma das concentrações testadas (0,25% a 1%) promoveu alterações metabólicas relacionadas à diminuição do consumo de dieta e da massa corporal, ou melhorias no perfil lipídico e glicêmico.

CONCLUSÃO

A casca de maracujá consistiu em uma boa fonte alternativa de pectinas, pelo alto rendimento de extração e teor de ácido galacturônico no concentrado, com menor teor residual de proteínas e lipídeos. A hidrólise ácida por duas horas foi eficiente para produzir alterações no perfil de distribuição de massa molar da pectina de casca de maracujá, aumentando a quantidade de compostos de baixa massa molar. As propriedades físico-químicas também foram alteradas pela hidrólise, com diminuição da capacidade de retenção de água e de ligação a cobre, e aumento da capacidade de absorção de gordura. A adição de 0,25% de pectina de casca de maracujá parcialmente hidrolisada proporcionou efeito prebiótico, confirmado pela maior produção de ácidos graxos de cadeia curta no ceco de ratos em crescimento. Todavia, mais estudos sobre os efeitos biológicos de prebióticos pectínicos devem ser realizados, com intuito de esclarecer seus mecanismos de ação e estabelecer a quantidade ideal de consumo.

REFERÊNCIAS

- BROUNS, F. et al Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hypercholesterolemic men and women. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 591–599. 2012.
- CUI, S. W.; CHANG, Y. H. Emulsifying and structural properties of pectin enzymatically extracted from pumpkin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 396–403. 2014.
- DOMINIAK, M., et al. Application of enzymes for efficient extraction, modification, and development of functional properties of lime pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 273–282. 2014.
- ESPINAL-RUIZ, M. et al. Impact of dietary fibers [methyl cellulose, chitosan, and pectin] on digestion of lipids under simulated gastrointestinal conditions. **Food and Function**, v. 5, p. 3083–3095. 2014.
- FERREIRA-LEITÃO, V. et al. Research an approach to the utilization of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–8. 2010.
- GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Preparation of soy hull pectin. **Food Chemistry**, v. 65, p. 461–467. 1999.
- GÓMEZ, B. et al. Purification, Characterization, and Prebiotic Properties of Pectic Oligosaccharides from Orange Peel Wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 9769–9782. 2014.
- GULLÓN, B. et al. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, p. 153–161. 2013.
- GUNNESS, P.; GIDLEY, M. J. Mechanisms underlying the cholesterol-lowering properties of soluble dietary fibre polysaccharides. **Food and Function**, v. 1, p. 149–155. 2010.
- HOLCK, J., et al. Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after *in vitro* fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1039–1049. 2011.
- MARTÍNEZ, M., et al. Kinetic assessment on the autohydrolysis of pectin-rich by-products. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 480–486. 2010.
- MONSOOR, M. A. Effect of drying methods on the functional properties of soy hull pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 362–367. 2005.
- OLANO-MARTIN, E.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 505–511. 2002.

ROUND, A. N. et al. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 487–497. (2010).

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

WIKIERA, A. et al. Development of complete hydrolysis of pectins from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 172, p. 675–680. 2015.

YAPO, B. M. Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1572–1578. 2009.

ZHANG, L. et al. Effect of degradation methods on the structural properties of citrus pectin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 630-637. 2015.