

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

FLÁVIA ROBERTA BUSS MARENDÁ

**CITOTOXICIDADE DE PECTINAS DO ALBEDO DE MARACUJÁ
(*Passiflora edulis flavicarpa*) EM LINHAGENS TUMORAIS**

PONTA GROSSA
2015

Citotoxicidade de pectinas do albedo de maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*) em linhagens tumorais

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Helene Giovanetti Canteri;

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Cristine Kanunfre.

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M324 Marena, Flávia Roberta Buss
 Citotoxicidade de pectinas do albedo de
 maracujá (*passiflora edulis flavicarpa*) em
 linhagens tumorais/ Flávia Roberta Buss
 Marena. Ponta Grossa, 2015.
 67f.

 Dissertação (Mestrado em Ciência e
 Tecnologia de Alimentos - Área de
 Concentração: Ciências e Tecnologia de
 Alimentos), Universidade Estadual de Ponta
 Grossa.

 Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Helene
 Giovanetti Canteri.

 Coorientadora: Prof^a Dr^a Carla Cristine
 Kanunfre.

 1.Albedo de maracujá. 2.Pectina
 modificada. 3.Células Jurkat. I.Canteri,
 Maria Helene Giovanetti. II. Kanunfre,
 Carla Cristine. III. Universidade Estadual
 de Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e
 Tecnologia de Alimentos. IV. T.

CDD: 664.8

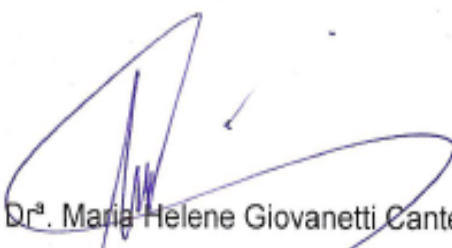
TERMO DE APROVAÇÃO

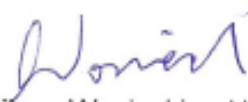
FLÁVIA ROBERTA BUSS MARENDÁ

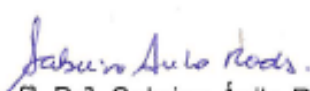
CITOTOXICIDADE DE PECTINAS DO ALBEDO DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis flavicarpa*) EM LINHAGENS TUMORAIS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:


Profª. Drª. Maria Helene Giovanetti Canteri – UEPG


Prof. Dr. Gilvan Wosiacki – UEPG


Profª. Drª. Sabrina Ávila Rodrigues - UTFPR

“Jamais considere seus estudos uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender e conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual o futuro pertence.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força de vontade para superar todas as dificuldades, iluminando meus passos nessa longa caminhada, com seus anjos da guarda.

Aos meus melhores amigos, João e Marinêz Buss Marenda, por ficarem do meu lado em todas as minhas decisões, pelo apoio incondicional a suas filhas, por nunca terem poupado esforços para minha formação e principalmente pelo amor, carinho e dedicação.

À minha irmã, Laura Maria Buss Marenda, pelo amor carinho, compreensão e por estar presente nessa fase importante de minha vida.

A todos os amigos e familiares que me incentivaram e me motivaram a seguir em frente e compreenderam a minha ausência, em especial: Jamila, Marcela, Tiago e Rafael.

As minhas queridas orientadoras Maria Helene Giovanetti Canteri e Carla Cristine Kanunfre pelos exemplos de dedicação a Ciência, pelos ensinamentos, pela confiança em me receber em seus laboratórios de pesquisa, por não medirem esforços para me ajudar e incentivar a evoluir, mostrando que é sempre possível alcançar nossos objetivos desde que tenhamos dedicação.

Aos mestres das instituições por onde passei: Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Ponta Grossa (UTFPR) e Institut National de la Recherche Agronomique - Avignon (INRA) por fazerem parte do alicerce de minha formação científica, pelos recursos e estrutura disponibilizados.

Às amigas que conquistei durante o Mestrado, em especial Suelen Ávila, Juliane Souza, Vivian Ito, Lívia Eidam e Camila Pereira, agradeço pelo companheirismo, trocas de experiências e apoio técnico, crucial na realização deste trabalho.

A todos da unidade Sécurité et qualité des produits d'origine végétaux (SQPOV) Unité Mixte de Recherche 08 (UMR-08) parceria entre Université d'Avignon e Institut National de la Recherche Agronomique - Avignon, que foram gentis e me acolheram nos laboratórios. Mas principalmente à Catherine Renard, Sylvie Bureau, Barbara Leboursicaud e Line Tichit.

As amigas que a França me apresentou, pelos momentos de descontração, Joseane Severo, Susana Pereira, Ivana Petrovic, Noémi Puskás e ao meu anjo da guarda na França Ana Paula do Espírito Santo, que tornaram meus dias mais alegres e são muito importantes na minha vida.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento), pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

RESUMO

O aproveitamento industrial do maracujá atinge apenas 25% do total do fruto e as cascas do maracujá, que representam 50% desse total, são descartadas, mas podem ser utilizadas na extração de pectina. Estudos recentes indicam que a pectina, tanto nativa quanto modificada, apresenta atividade antitumoral. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a citotoxicidade de pectinas do albedo do maracujá em linhagens tumorais. Foi feita a extração e a modificação química da pectina do albedo de maracujá, submetido a três diferentes tratamentos. Tanto a matéria-prima quanto a pectina foram caracterizadas por análises específicas. A citotoxicidade das pectinas sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada, foram avaliadas em linhagens tumorais Jurkat, HeLa e HRT-18. A casca do maracujá representou 54,7% do total do fruto. As farinhas do albedo do maracujá sem tratamento e branqueada mostraram-se ricas em fibras solúveis e insolúveis. A farinha e a pectina autoclavada apresentaram maior teor de compostos fenólicos; no entanto, a pectina branqueada reteve mais compostos fenólicos provenientes da matéria prima. As pectinas modificadas apresentaram menor grau de metoxilação e menor massa molar, comparada às pectinas nativas, confirmando o processo de modificação. O melhor efeito de citotoxicidade foi obtido em células Jurkat tratadas com pectina autoclavada modificada, com IC_{50} de $2,63 \text{ mg mL}^{-1}$. O cálculo do Índice de Seletividade (IS) indicou que a pectina autoclavada modificada apresenta baixa toxicidade para células saudáveis. Em conclusão, os resultados demonstram promissor potencial antitumoral para a pectina autoclavada modificada, que precisa ser melhor explorado.

Palavras-Chave: albedo de maracujá, pectina modificada, células Jurkat.

ABSTRACT

The passion fruit industrial use reach only 25% of the total fruit and passion fruit peel, representing 50% of the total, are discarded, but can be used in the extraction of pectin. Recent studies indicate that pectin, modified so as native, has antitumor activity. This study aimed to evaluate the cytotoxicity of pectin of passion fruit peel in tumor cell lines. Extraction has been made and the chemical modification of pectin of passion fruit peel, subjected to three different treatments. Both the raw material and pectin were characterized by specific analyzes. The cytotoxicity of untreated pectins, modified autoclaved and autoclaved were evaluated in tumor lines Jurkat, HeLa and HRT-18. The peel of passion fruit represented 54.7% of total fruit. The passion fruit peel flour bleached untreated and shown to be rich in soluble and insoluble fibers. The flour autoclaved pectin showed higher content of phenolic compounds; however, bleached pectin retained more phenolic compounds from the raw material. The modified pectins had a lower degree of methoxylation and lower molecular weight compared to native pectins, confirming the modification process. The best effect Cytotoxicity in Jurkat cells treated with autoclaved pectin modified with IC_{50} of 2.63 mg mL⁻¹. The calculation of the selectivity index indicated that the modified autoclaved pectin has a low toxicity to healthy cells. In conclusion, the results demonstrate a potential antitumor promising for autoclaved modified pectin, that needs to be further exploited.

Keywords: passion fruit peel, modified pectin, Jurkat cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo da representação estrutural de cadeia de pectina.....	17
Figura 2: Representações de possíveis estruturas químicas de pectinas modificadas	20
Figura 3: Farinhas do albedo do maracujá.....	34
Figura 4: Amostras de pectina extraídas do albedo do maracujá.....	36
Figura 5: Perfil de Massa Molar das pectinas nativas e modificadas do albedo do maracujá.....	43
Figura 6: Efeito das pectinas do albedo do maracujá sobre a viabilidade de células Jurkat, HeLa e HRT-18	44
Figura 7: Efeito da pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada sobre a viabilidade de linfócitos normais.....	47
Figura 8: Efeito da pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada sobre a viabilidade celular de células Jurkat	49
Figura 9: Microscopia de fluorescência de células Jurkat tratadas com pectina autoclavada modificada e coradas com laranja de acridina e brometo de etídio .	50
Figura 10: Indução de condensação da cromatina em células Jurkat tratadas com pectina autoclavada modificada	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Efeito benéfico à saúde de diferentes fontes vegetais de pectina.....	20
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Percentual das frações do maracujá	33
Tabela 2: Composição centesimal das farinhas do albedo do maracujá.....	34
Tabela 3: Determinação dos compostos fenólicos totais das farinhas do albedo do maracujá.....	35
Tabela 4: Determinação dos compostos fenólicos totais das pectinas do albedo do maracujá.....	37
Tabela 5: Determinação do teor de metanol para as pectinas do albedo do maracujá nativas e modificadas	38
Tabela 6: Determinação do teor de ácido anidrogacturônico das pectinas do albedo do maracujá nativas e modificadas.	38
Tabela 7: Determinação do grau de metoxilação de pectinas nativas e modificadas.	39
Tabela 8: Determinação do teor de açúcares neutros para as pectinas nativas e modificadas	40

Tabela 9: IC ₅₀ para as pectinas sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada, calculado para células tumorais em cultivo	46
Tabela 10: Índice de seletividade da pectina autoclavada modificada	48
Tabela 11: Distribuição do ciclo celular em diferentes fases (%) de células Jurkat tratadas com pectina autoclavada modificada.....	52

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Grau de Metoxilação	26
Equação 2: Viabilidade Celular	28
Equação 3: Índice de Seletividade dos Linfócitos e células Jurkat.....	30

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 MARACUJÁ	14
2.1.1 Produção e industrialização de maracujá	15
2.1.2 Farinha do albedo do maracujá	15
2.2 PECTINA	16
2.2.1 Estrutura química	16
2.2.2 Extração e aplicação industrial de pectina	18
2.2.3 Propriedades farmacológicas das pectinas nativas	19
2.3 PECTINA MODIFICADA	20
3. METODOLOGIA	23
3.1 FARINHA DO ALBEDO DO MARACUJÁ	23
3.2 CARACTERIZAÇÕES DAS MATÉRIAS-PRIMAS	23
3.3 EXTRAÇÃO DA PECTINA	24
3.4 MODIFICAÇÃO DA PECTINA	24
3.5 ANÁLISES ESPECÍFICAS PARA PECTINA	25
3.5.1 Teor de metanol	25
3.5.2 Teor de ácido galacturônico	25
3.5.3 Cálculo do grau de metoxilação	26
3.5.4 Teor de açúcares neutros	26
3.5.5 Perfil de massa molar	26
3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS	27
3.6.1 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito citotóxico	27
3.6.2 Determinação da citotoxicidade e cálculo da concentração Inibitória 50% (IC ₅₀) das células tumorais Jurkat, HeLa e HRT-18	27
3.6.3 Determinação da citotoxicidade da pectina autoclavada modificada sobre células normais (linfócitos isolados do sangue periférico humano)	29
3.6.4 Determinação do índice de seletividade (IS) para pectina autoclavada modificada	29
3.6.5 Avaliação do mecanismo de ação associado à citotoxicidade da pectina autoclavada modificada para células Jurkat	30
3.6.5.1 Ensaio de integridade de membrana	30
3.6.5.2 Avaliação do processo de morte celular	30
3.6.5.3 Avaliação da integridade e condensação de cromatina	31
3.6.5.4 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	31

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA-PRIMA.....	33
4.2 PECTINAS DO ALBEDO DO MARACUJÁ.....	36
4.3 ANÁLISES ESPECÍFICAS PARA PECTINA	37
4.3.1 Teor de metanol	37
4.3.2 Teor de ácido galacturônico	38
4.3.3 Grau de metoxilação	39
4.3.4 Teor de açúcares neutros.....	40
4.3.5 Perfil de massa molar	42
4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS	43
4.4.1 Determinação da citotoxicidade das pectinas sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada sobre células tumorais	43
4.4.2 Determinação da citotoxicidade e calculo da concentração Inibitória 50% (IC ₅₀) das células tumorais Jurkat, HeLa e HRT-18	46
4.4.3 Determinação da citotoxicidade da pectina autoclavada modificada sobre células normais(linfócitos isolados do sangue periférico humano).....	47
4.4.4 Determinação do índice de seletividade (IS) para Pectina Autoclavada Modificada.....	48
4.4.5 Avaliação do mecanismo de ação associado à citotoxicidade da pectina autoclavada modificada para células Jurkat.....	48
4.4.5.1 Ensaio de integridade de membrana.....	48
4.4.5.2 Avaliação do processo de morte celular	49
4.4.5.3 Avaliação da integridade e condensação de cromatina	51
4.4.5.4 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	52
5. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

Apesar do crescente aumento da produção e industrialização do maracujá no Brasil, o aproveitamento desse fruto atinge apenas 25% do total. Os resíduos, como cascas e sementes, são empregados em ração animal ou descartados.

As cascas podem ser utilizadas na produção de farinha, com benefícios à saúde dos consumidores em função de seu teor de fibras, como ações hipercolesterolêmica, contra a *Diabetes Mellitus* tipo 2 e auxiliando no emagrecimento.

A partir da farinha de albedo, uma das porções da casca, pode ser obtida a pectina, um complexo de polissacarídeos, com estrutura química ainda não elucidada. Devido a sua capacidade de geleificação, é utilizado como coloide estabilizador, que promove também o aumento da viscosidade de diversos produtos.

Estudos recentes indicam que a pectina, tanto a nativa quanto a modificada, apresenta atividade antitumoral, com efeitos comprovados para diversos tipos de câncer, além de ser eficiente na inibição do vírus HIV e auxiliar em tratamentos quimioterápicos.

Neste trabalho, buscou-se fornecer subsídios para melhor aproveitamento do albedo de maracujá, produzindo farinhas com diferentes tratamentos, como branqueamento e autoclavação, bem como sua caracterização centesimal aproximada. A partir dessas farinhas, incluindo a sem tratamento, foram extraídas pectinas, bem como a modificação química. Ao todo, foram obtidas seis amostras diferentes de pectina, com estruturas química caracterizadas. As pectinas sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada foram selecionadas para evidenciar o possível efeito citotóxico positivo em células cancerígenas em ensaios *in vitro*.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade de pectinas do albedo do maracujá em linhagens tumorais.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter farinha de albedo de maracujá sem tratamento, branqueada e autoclavada;
- ✓ Caracterizar a composição centesimal aproximada das farinhas, incluindo o teor de compostos fenólicos totais;
- ✓ Extrair pectinas das farinhas do albedo do maracujá com diferentes tratamentos;
- ✓ Modificar quimicamente as pectinas extraídas;
- ✓ Caracterizar seis amostras de pectina quanto ao teor de metanol, ácido galacturônico, grau de metoxilação, açúcares neutros, perfil espectral e massa molar;
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico, *in vitro*, das pectinas sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada sobre linhagens tumorais Jurkat (modelo de linfócito T de origem leucêmica), HeLa (adenocarcinoma de cérvix uterino) e HRT-18 (câncer do colón retal).
- ✓ Fornecer indícios do mecanismo de ação pelo qual a pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada exerce citotoxicidade em células Jurkat, referente à integridade de membrana, processo de morte celular, condensação da cromatina e ciclo celular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MARACUJÁ

Originado na América do Sul, o maracujá pertence à família *Passifloraceae*. Existem vários tipos do fruto, mas apenas alguns possuem potencial comercial, como maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*), roxo (*Passiflora edulis sims*) e doce (*Passiflora alata*). O maracujá amarelo apresenta qualidade superior, devido ao maior tamanho do fruto, resistência a pragas e longo período de safra. O período de produção varia de oito a doze meses, sendo encontrado em diversas regiões do Brasil (BRASIL, 2011).

Os frutos apresentam 5,5 cm de diâmetro, 11 g de açúcares totais, 32 mg 100g^{-1} de ácido ascórbico, 3885 mg 100g^{-1} de carotenoides e o pH da polpa geralmente é próximo a três, característico de frutos cítricos (KULKARNI; VIJAYANAND, 2010), são constituídos de cinco partes: flavedo, albedo, arilo, polpa e sementes. O flavedo (exocarpo) representa a parte externa do fruto, de coloração verde e amarelo ou laranja quando maduro; o albedo (mesocarpo) representa a parte interna do fruto, geralmente com coloração branca. O conjunto de flavedo e albedo é conhecido popularmente como casca. O arilo é uma película que protege a polpa (endocarpo) e as sementes (FAEP, 2014).

Até os anos 60, o maracujá era encontrado apenas em hortas familiares e após a descoberta de seu potencial ansiolítico, iniciou-se a exploração comercial (MELETTI, 2011). A importância comercial está voltada ao suco concentrado, mas também pode ser consumido *in natura* (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004) e utilizado na produção de doces, geleias, mousses e sorvetes (KLIEMANN, 2006).

Tanto o consumo *in natura* quanto o processo de concentração do suco gera grande quantidade de resíduos, como cascas e sementes (CANTERI et al., 2010a), geralmente direcionados à produção de ração animal ou descartados. As cascas do maracujá variam de 50 a 60% do peso total do fruto, as sementes variam entre 20 a 25%. Portanto, apenas de 20 e 25% do total apresenta valor comercial efetivo (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004; OLIVEIRA et al., 2002; CANTERI et al., 2012).

Uma alternativa para o aproveitamento dos subprodutos da produção do suco pode ser representada pela extração de pectina da casca e de óleos essenciais das sementes (CANTERI et al., 2012; WILLATS; KNOX ; MIKKELSEN, 2006). A casca

do maracujá apresenta substâncias importantes para a nutrição humana, como fibras solúveis e insolúveis, vitaminas, minerais, compostos fenólicos, flavonoides e outros antioxidantes (ESPÍRITO-SANTO et al., 2013; MATÍNEZ et al., 2012).

2.1.1 Produção e industrialização de maracujá

No Brasil, a produção de frutas tropicais aumentou 50%, comparando-se os períodos entre 2001 a 2011. O país representa 4,5% da produção mundial, que por sua vez, apresentou um crescimento de 28% no mesmo período (FAO, 2014a; FAO, 2014b; FAO, 2014c; FAO, 2014d).

O Brasil está emergindo como um grande produtor mundial de maracujá (MELETTI, 2011), segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2014), nos últimos três anos, a produção de maracujá foi de 870 mil toneladas, sendo o nordeste responsável por 70%.

As principais empresas brasileiras produtoras de suco de maracujá são: Maguary, Coca Cola, Brasil Kirin, Grupo Pão de Açúcar e General Brands (CANTERI et al., 2012).

2.1.2 Farinha de albedo de maracujá

As cascas do maracujá tem potencial benéfico à saúde e poderiam ser mais exploradas pelas indústrias, visando a complementação alimentar e também agregar valor ao subproduto (DE OLIVEIRA et al., 2002).

A partir da casca do maracujá, principalmente do albedo, é possível obter a farinha, através do processo de secagem e moagem (CANTERI et al., 2010b).

Devido ao alto teor de fibras solúveis, a farinha da casca do maracujá é benéfica à saúde, pois reduz o LDL colesterol, a glicemia e a colesterolemia (RAMOS et al., 2007; BARBALHO et al., 2012). A suplementação de uma alimentação balanceada com essa farinha, pode auxiliar no tratamento de obesidade e *Diabetes Mellitus* tipo 2, bem como reduzir o LDL colesterol e aumentar o HDL colesterol (JANEIRO et al., 2008).

A farinha da casca do maracujá pode ser aplicada no desenvolvimento de iogurtes probióticos com baixo teor de lipídeos, bem como reduzir o tempo de fermentação e tornar o produto mais consistente, em função da presença de pectina

(SANTO et al., 2012), também aplicada em embalagens comestíveis (NASCIMENTO; CALADO; CARVALHO, 2012) e utilizada como matéria-prima para produção de pectina (ELLENDERSEN et al., 2014).

Encontrada em farmácias, é indicada para redução de glicemia e colesterol (CANTERI, et al., 2010b). Existem diversas empresas que produzem farinha da casca do maracujá, como Phytomare, Fibra Mais, Natural Life, Mamagê, dentre outras (CANTERI et al., 2012).

2.2 PECTINA

As substâncias pécticas estão localizadas na parede celular dos vegetais, contribuindo para complexos processos fisiológicos, como crescimento celular, capacidade de retenção de água, rigidez e integridade do tecido das plantas, desempenhando papel importante no combate a pragas e patógenos (VORAGEN et al., 2009).

A pectina é conhecida há mais de 200 anos. Em 1790 foi descoberta pelo Químico *Vauquelin*; em 1824, o composto foi caracterizado pelo Químico *Braconot*, que a denominou de pectina e em 1923 *Smolenski* sugeriu que representava a estrutura de um polímero complexo (CANTERI et al., 2012 b; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Entretanto, sua estrutura química ainda não está elucidada (LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013).

2.2.1 Estrutura química

Caracterizada como um polímero, composto de α -D-ácido galacturônico unidos por ligações glicosídicas α (1-4), as pectinas formam uma molécula complexa (MAXWELL, et al., 2012).

Inúmeros monossacarídeos constituem a molécula de pectina, que podem apresentar conformação piranosídica ou furanosídica, apresentando mais de vinte ligações diferentes, formando estruturas químicas distintas (THIBAULT et al., 1991; VINCKEN et al., 2003; VORAGEN et al., 2009).

Um dos modelos aceitos da molécula de pectina, considera regiões homogalacturanas, rhamnogalacturonanas (I e II), xilogalacturanas e ácido galacturônico (YAPO, 2011; LECLERE; CUTSEM; MICHIELS, 2013). Nas cadeias

laterais, podem ser encontradas moléculas de açúcares neutros como a ramnose, a fucose, a arabinose, a xilose, a manose, a galactose e a glucose (WICKER et al., 2014), o mais complexo composto de origem natural (VORAGEN et al., 2009). Na Figura 1, pode-se observar uma das representações estruturais da cadeia de pectina.

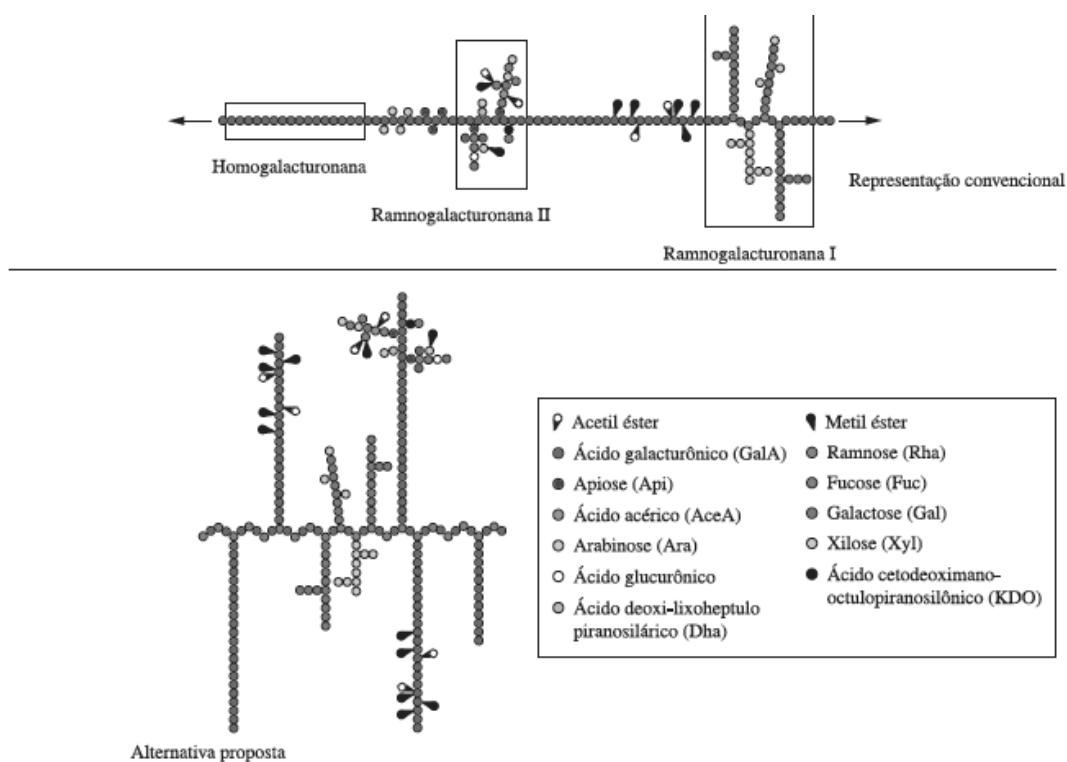


Figura 1: Modelo da representação estrutural de cadeia de pectina
Fonte: WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2012.

Extraída a partir de diversas matérias primas, a pectina apresenta estruturas químicas diversificadas, com modificações em suas propriedades (YAPO et al., 2007; YAPO, 2011), compostas principalmente de moléculas de ácido galacturônico, parte das estruturas químicas podem estar esterificadas, e podem ser substituídas por grupamentos metilas, denominadas de grau de metoxilação (SRIAMORNSAK, 2003).

O albedo cítrico (laranja e limão) e a polpa de maçã (bagaço de maçã) são as principais fontes utilizadas para extração de pectina. No entanto, algumas fontes permanecem desvalorizadas pela indústria, em função de propriedades estruturais e rendimentos indesejáveis (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Existem inúmeras fontes com potencial para extração de pectina, como *Aloe vera* (LIGNIG et al., 2014.), ambarela (KIOUBALA et al., 2008a.), banana (GOPI et al., 2014.), beterraba (FISSORE et al., 2013.), cenoura preta (ÜNAL ; BELLUR, 2009.), brócolis (HOUBEN et al., 2011.), cenoura (RIBAS-AGUSTI et al., 2013.), chicória (VRIESMANN ; PETKOWICZ, 2013.), cacau (SIEW-YIN; WEE-SIM, 2013.), colza (JEONG et al., 2014.), fruta do dragão (MUHAMMAD et al., 2014.), figo (RUI-HONG et al., 2012.), uva (MINJARES-FUENTES et al., 2014.), banana verde (GOPI et al., 2014.), ameixa japonesa (BASANTA et al., 2012.), manga (KIOUBALA et al., 2008b.), mamão (OTONI et al., 2014.), maracujá (YAPO et al., 2006;), pêssego (ZHOU et al., 2014.) abóbora (CUI; CHANG, 2014.), morango (POSE et al., 2012;), girassol (WANG; CHEN; LÜ, 2014.) e tomate (ANTHON; BARRET, 2012.).

2.2.2 Extração e aplicação industrial de pectina

A extração de pectina depende de vários fatores associados à matéria-prima, como clima, solo e maturidade do fruto. O ácido nítrico é tradicionalmente selecionado como extrator, devido a apresentar baixa corrosão em tubulações de aço inox. De fato, o tipo de extração, a matéria prima, o ácido e temperatura empregados no procedimento, influenciam na funcionalidade da pectina obtida (CANTERI et al., 2012).

A matéria prima seca e triturada é suspensa em água para hidratação, com adição de ácido nítrico, numa solução fracamente ácida, com aquecimento durante um tempo estabelecido para extração (CANTERI et al., 2010 b).

Os ácidos utilizados na extração podem ser cítrico, láctico e tartárico. As condições do processo podem diferir no pH, variando de 1,5 a 3,0, no tempo variando de 0,5 a 6,0 horas, em temperatura entre 60 a 100 °C e também na proporção sólido-líquido (SAKAI et al, 1993).

Em adição ao método tradicional de extração, pesquisadores testam novas metodologias para aumentar a produtividade e reduzir a degradação da matéria-prima. Tem sido propostas alternativas como a utilização de enzimas (PTICHKINAA; MARKINAA; RUMYANTSEVAB, 2008), micro-ondas (MARAN et al, 2014; MARAN et al, 2013), ultrassom (MINJARES- FUENTES et al, 2014), alta pressão (GUO et al, de 2012) e alta pressão hidrostática (GUO et al., 2014).

Em 1926, na Califórnia, foi inaugurada a primeira fábrica de pectina do mundo, a produção no Brasil iniciou somente 28 anos depois, em 1954, na cidade de Limeira, São Paulo. As principais indústrias mundiais de pectina são: Cargil, CP Kelco, Danisco, Degussa, Herbestreith & Fox, Obipectin, Pektowin Jaslo (CANTERI et al., 2012). O consumo mundial de pectina atingia, já há mais de cinco anos, 19.000 toneladas (KLIEMANN, 2006).

A pectina tem as propriedades geleificante, espessante, texturizante, emulsificante e estabilizante, devido ao comportamento coloidal em solução (ESPÍRITO-SANTO et al., 2013; MAXWELL et al., 2012). Pode ser aplicada em produtos como geleias, doces light, doce em calda (DE OLIVEIRA et al., 2002), iogurtes (ESPÍRITO-SANTO et al., 2013) e barra de cereal (SILVA et al., 2009).

2.2.3 Propriedades farmacológicas das pectinas nativas

Dentre as propriedades benéficas relacionadas ao consumo de pectina, além das propriedades das fibras dietéticas (MAXWELL et al., 2012), que favorecem a redução de peso corporal, por imobilização de nutrientes no intestino, bem como o aumento da sensação de saciedade (TUOPING et al., 2014), também atribui-se a pectina a função de impedir a absorção de metais pesados e toxinas, favorecendo ainda a biodisponibilidade de ferro no organismo (SERGUNCHENKO; KOLENCHENKO; KHOTIMCHENKO, 2007). Destaca-se no Quadro 1, mais alguns efeitos benéficos à saúde proporcionado pelas pectinas.

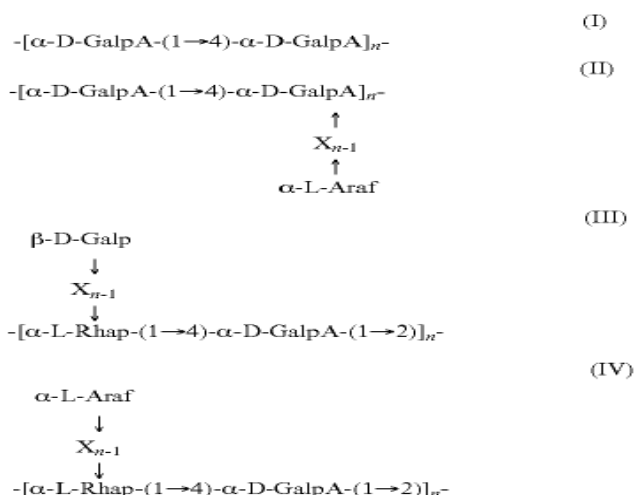
Cumprе ressaltar que a literatura ainda é escassa em relação aos estudos com a pectina do albedo do maracujá. Destacamos aqui o estudo de Silva e colaboradores (2012) que estudaram polissacarídeos isolados do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) e avaliaram suas propriedades antitumorais *in vivo* e afirmam que exibiu efeitos antitumorais.

Quadro 1: Efeito benéfico à saúde de diferentes fontes vegetais de pectina

Fonte	Efeito	Autoria
Pectina da Laranja	Redução dos níveis séricos do colesterol e triglicerídeos.	Fietz; Salgado, 1999.
Pectina da Maçã	Atividade antitumoral.	Waldecker et al., 2008.
Pectina cítrica	Inibição da replicação do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana).	Norren et al., 2009.
Pectina cítrica	Controle da colesterolemia.	Eufrásio et al. 2009.
Pectina cítrica	Atividade imunomoduladora.	Popov et al., 2013.
Pectina cítrica comercial	Redução da Síndrome do Comportamento induzido por endotoxinas.	Sherry et al., 2010.
Pectina cítrica comercial	Aumento da biodisponibilidade do ferro.	Miyada; Nakajima; Ebihara, 2011.

2.3 PECTINA MODIFICADA

A modificação química da pectina é produzida pela hidrólise da pectina nativa, resultando em uma mistura rica em ácido galacturônico, galactose e arabinose (COURTS, 2013). Esse processo consiste na saponificação, por ajuste de pH para 10 e posteriormente até pH 3 (PLATT, 2009). Em seguida, o produto pode ser neutralizado, ajustando-se o pH para 6 ou 7. É importante aguardar 30 minutos na reação de saponificação, bem como 15 minutos na neutralização do composto (STAPLES; ROLKE, 2013). Podem ser observados na Figura 2, exemplos de estrutura química de pectinas modificadas.



n- : Cadeia curta com resíduos de açúcares neutros, Gal: Galactose, Rha: Ramnose, GalA: ácido galacturônico, Ara: arabinose; X: qualquer um dos açúcares neutros (ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose e glucose); p: conformação piranosídica; f: conformação furanosídica

Figura 2: Representações de possíveis estruturas químicas de pectinas modificadas
Fonte: STAPLES; ROLKE, 2013.

Quanto aos benefícios a saúde, a pectina modificada pode inibir a metástase de tumores malignos, bem como a adesão celular (PLATT, 2009), apresenta atividade antitumoral e imunomoduladora, visto que estudos recentes indicam que esse composto inibe a proliferação de células cancerígenas, tais como: leucemia, colón, próstata, pulmão, entre outros. Adicionalmente, pode agir sinergicamente em vários tratamentos quimioterápicos (MAXWELL et al., 2012; MORRIS et al., 2013; BERGMAN et al., 2010; GLINSKI; RAZ, 2009).

Estudos demonstram que a pectina cítrica modificada atua no bloqueio da galectina-3 (marcador tumoral), como inibidor competitivo ao ligante natural dessa proteína, mecanismo ainda não elucidado. A galectina-3 desenvolve uma resistência do organismo a medicamentos utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer, regulando o crescimento, a adesão e a proliferação da célula cancerígena e também inibe a apoptose celular, induzida por agentes quimioterápicos, quando bloqueia a ação de proteínas pró-apoptóticas. No entanto, se essa proteína for bloqueada, não haverá interferência no tratamento (FUKUMORI; KANAYAMA; RAZ, 2007; GLINSKY; RAZ, 2009).

Yan; Katz, (2010) estudaram a pectina cítrica modificada (PectaSol) e verificaram que houve a indução de apoptose de células de câncer de próstata, tanto humana quanto de camundongos. Uma patente referente à pectina cítrica modificada foi registrada em 2009 nos Estados Unidos, com a descrição do efeito da pectina cítrica modificada tanto *in vitro* quanto *in vivo* para câncer de pulmão, portanto inibindo a metástase e também a adesão de células cancerígenas no organismo (PLATT, 2009).

Ramachandra et al. (2011) testaram o efeito de pectina cítrica modificada em células leucêmicas *in vitro* e observaram indução à apoptose celular, além de propriedades imunoestimulantes do composto.

Fica claro que as propriedades antitumorais dos polissacarídeos estão sendo estudadas. Todavia, Zong; Cao; Wang (2012) afirmam que deve-se avaliar primeiramente a citotoxicidade do composto, em seguida, sua atividade

imunomoduladora e por fim o efeito sinérgico do composto estudado com os medicamentos já existentes para o combate a diversos tipos de câncer.

3 METODOLOGIA

3.1 FARINHA DO ALBEDO DO MARACUJÁ

Os frutos de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) foram adquiridos na cidade de Ponta Grossa (PR), proveniente da safra de 2013, maduros (amarelo casca-firme) e sem danos aparentes.

Os maracujás foram higienizados, sendo o flavedo removido em descascador mecânico e a polpa retirada manualmente, bem como sementes e arilo. Determinou-se o percentual de cada parte do fruto, polpa, sementes, arilo, albedo e flavedo por meio de pesagem das frações em balança analítica.

Foram produzidas três farinhas, sem tratamento, branqueada e autoclavada. Para a obtenção da farinha sem tratamento, o albedo foi submetido à desidratação em estufa de circulação de ar a 60 °C por 48 horas.

Com relação à obtenção da farinha branqueada, houve o contato direto com água em ebulição por 3 minutos, seguido da imersão em banho de gelo, até atingir a temperatura ambiente, os albedos foram centrifugados em sacos de tecido sintético para eliminar o excesso de água.

Quanto a farinha autoclavada, albedo foi submetida a desidratação em estufa de circulação de ar a 60 °C por 48 horas, seguido pelo tratamento em autoclave vertical Phoenix Equipamento Científico, AV75 n° 4726) por 30 minutos a 120 °C.

Todas as farinhas foram trituradas em moinho de facas, embaladas e armazenadas em recipientes herméticos a temperatura ambiente, utilizadas como matéria prima para a extração de pectinas.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

Foi determinado o rendimento das farinhas com relação ao peso inicial dos albedos para todas as farinhas. A composição centesimal aproximada das farinhas foi estimada pelo teor de umidade, por secagem direta a 105 °C; teor de cinzas, após calcinação por tratamento térmico a 550 °C a 5 horas; teor de proteínas, pelo método de Kjeldahl e fator de correção de 6,25 de acordo com a metodologia de IAL (2008); teor de fibras solúveis e insolúveis pelo método enzimático gravimétrico de acordo com Freitas et al. (2008).

Os compostos fenólicos das farinhas foram estimadas pelo método de Folin Ciocalteu, utilizando a metodologia de Singleton et al. (1999) com adaptações. Foi utilizada 1g de cada amostra, adicionou-se 50 mL de etanol 70%, mantido em refrigerador a 4 °C, centrifugou-se por 10 minutos a 12.000g, para a extração dos compostos fenólicos. Retirada uma alíquota de 100 µL de cada amostra, adicionou-se 8,4 mL de água destilada e 0,5 mL de Folin Ciocalteu, homogeneizou-se em vórtex, antes de completar 3 minutos de reação. Adicionado 1 mL de solução de carbonato de sódio saturada, recém preparada e filtrada. As amostras permaneceram em repouso durante uma hora em temperatura ambiente, com leitura em espectrofotômetro UV/VIS (FEMTO, modelo 800 XI) a 720 nm. Para expressar os resultados, ácido tânico e catequina foram utilizados para curva-padrão.

3.3 EXTRAÇÃO DA PECTINA

Para os efeitos de comparação entre as farinhas do albedo do maracujá utilizadas, extraiu-se pectina com 4 gramas de farinha, suspensa em solução de ácido nítrico a 50 mM, mantida por 1 hora para hidratação da amostras, posteriormente aquecida em Incubadora Shaker (Tecnal Te-420) a 55 °C por 12 horas a 100 rpm. Essa suspensão foi filtrada em tecido sintético e resfriada a 4 °C, sobre a qual se adicionou dois volumes de etanol para a precipitação da pectina. O sistema foi mantido em repouso por 30 minutos, filtrou-se para retirada do gel de pectina, mantido em contato com etanol P.A. por 1 minuto, com prensagem posterior e macerou-se em acetona, também por 1 minuto, seguida de nova prensagem.

As amostras de pectina foram mantidas em estufa de circulação de ar a 40 °C até massa constante, armazenadas em recipientes herméticos à temperatura ambiente (20-30 °C). Essas amostras foram denominadas de Pectina Sem Tratamento, Pectina Branqueada e Pectina Autoclavada. Calculou-se o rendimento das pectinas com relação as farinhas obtidas.

3.4 MODIFICAÇÃO DA PECTINA

As amostras de pectina foram modificadas de acordo com a metodologia proposta por Staples; Rolke (2013) com adaptações. Foram pesados 300 mg de

cada amostra, adicionadas de 30 mL de água Miliq, mantidas em estufa a 50 °C por 24 horas para a formação de um gel. O pH das amostras foi ajustado: para 10 com NaOH 3M, seguido de repouso por 30 minutos, para novo ajuste para pH 3 com HNO₃ 55 mM, seguido de novo repouso por 15 minutos e posterior neutralização para 7 com NaOH 3M. Foram adicionados dois volumes de etanol para precipitação das pectinas. Posteriormente a filtração em tecido sintético, as amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar a 50 °C, até massa constante e armazenadas em recipientes herméticos à temperatura ambiente (20-30 °C).

Essas amostras de pectina submetidas ao tratamento químico foram denominadas de Pectina Sem Tratamento Modificada, Pectina Branqueada Modificada e Pectina Autoclavada Modificada.

3.5. ANÁLISES ESPECÍFICAS PARA PECTINA

3.5.1 Teor de metanol

O metanol foi determinado após a saponificação das pectinas. Foram pesados 10 mg de cada amostra de pectina, em duplicata, adicionou-se 0,4 mL de CD₃OH – 99,8%, 3,8 mL de água ultra-pura e 0,8 mL de KOH 1M, com homogeneização em vórtex por 10 segundos. Em seguida, realizou-se a dosagem em cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CGMS- QP 2010-SHIMADZU/ AOAC 5000 AUTO INJECTOR Coluna UB-WAX LINEAR) com Programa GCMS- Real Time Analyse em modo *head space*. Cada amostra permaneceu em banho termostático a 50 °C por 8 minutos, com injeção posterior da substância volatilizada (RENARD et al., 2009; INRA, 2014a).

3.5.2 Teor de ácido galacturônico

Utilizaram-se as mesmas amostras da determinação do metanol previamente congeladas e descongeladas a temperatura ambiente, diluídas na proporção de 1:5. Utilizou-se 0,5 mL de cada amostra, em duplicata, adicionou-se 3 mL da NaBH₄ 0,0125M diluído em 1 L de H₂SO₄ concentrado e homogeneizou-se em vórtex.

As amostras foram mantidas em banho termostático a 80 °C por 10 minutos e resfriadas em banho de gelo até temperatura ambiente. Adicionou-se 50 µL de

MHDP e homogeneizou-se em vórtex. Nesta etapa, há produção da coloração rósea, determinada em espectrofotômetro a 520nm de absorbância (INRA, 2014b).

3.5.3 Cálculo do grau de metoxilação

O grau de metoxilação foi estimado pela razão molar entre a concentração de metanol e a concentração molar de ácido galacturônico, expressa pela equação 1.

$$DM (\%) = \frac{\text{massa molar do metanol}}{\text{massa molar do metanol} + \text{massa molar do ácido galacturônico}} \cdot 100 \quad (1)$$

3.5.4 Teor de açúcares neutros

A metodologia proposta por Sloneker (1972) foi utilizada com adaptações. Na cromatografia gasosa com derivatização em alditóis, foi utilizado 1 mL de amostra hidrolisada adicionada de solução padrão de inositol 1 mg mL^{-1} , neutralizada com NH_4 33%, até pH 9. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de solução NaBH_4 recém preparada (100 mg mL^{-1}), mantendo os tubos em repouso por 1 hora para redução dos alditóis. Posteriormente neutralizou-se com 3 mL de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$, adicionado a uma alíquota de 300 μL da amostra para promover acetilação por 30 minutos. Utilizou-se N-metil-imidazol como catalizador da reação.

Houve a separação dos acetatos de alditóis, solúveis na fase apolar, pela adição de 3 mL de CH_2Cl_2 e 5 mL de água na primeira lavagem e nas quatro lavagens posteriores, foi adicionado KHCO_3 . A fase polar ou aquosa foi eliminada com o auxílio de uma bomba a vácuo, até não haver resíduos de ácido acético. A fase apolar foi transferida para tubos próprios de injeção no cromatógrafo gasoso. A temperatura de injeção foi de $250\text{ }^\circ\text{C}$, com padrões de ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose, glucose e inositol, todos na concentração de 1 g L^{-1} (INRA, 2014c).

3.5.5 Perfil de massa molar

O perfil de massa molar das amostras foi obtido por cromatografia de exclusão estérica. As amostras foram dissolvidas em solução de NaNO_2 (0,1M) contendo NaN_3 $0,5 \text{ g L}^{-1}$, também utilizada como eluente. A análise foi realizada em equipamento de multidetecção com refratometro diferencial Waters 2410 e detector de multiângulo e espalhamento da luz a laser, foram acopladas ao equipamento de multidetecção quatro colunas para detecção Waters Ultrahydrogel 2000/ 500/ 250 e 120. As amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose ($0,22 \mu\text{m}$ de Milipore) e injetadas a $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Os resultados foram analisados pelo software Wyatt Techonoly ASTRA.

3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.6.1 Avaliação *in vitro* do efeito citotóxico

A avaliação *in vitro* do efeito citotóxico das pectinas foi realizada em células Jurkat, modelo de linfócito T, de origem leucêmica, em células HeLa derivadas de adenocarcinoma de cérvix uterino e na linhagem HRT-18 de origem tumoral colón retal.

Todas as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 pH 7,4 contendo 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), suplementado com 24 nmol L^{-1} de bicarbonato de sódio, 2 mmol L^{-1} de glutamina, 10 000 U de penicilina e $10 \text{ g de estreptomicina L}^{-1}$.

Para determinação da citotoxicidade foram empregadas apenas as pectinas sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada, com base no trabalho de Hao et al. (2013). As amostras de pectina foram preparadas na concentração de 16 mg mL^{-1} , como solução de estoque. Para tanto, foram pesadas e expostas por 20 minutos a luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar, para esterilização dos compostos. Após, foram dissolvidas em meio RPMI com 10% de SFB, mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas até completa solubilização. Posteriormente, foram mantidas em refrigerador a 4°C , até 30 minutos antes do uso.

3.6.2 Determinação da citotoxicidade e calculo da concentração Inibitória 50% (IC_{50}) das células tumorais Jurkat, HeLa e HRT-18

Avaliou-se a viabilidade celular das linhagens Jurkat, HeLa e HRT-18 tratadas com diferentes concentrações das pectinas, sendo 1 mg mL^{-1} , 2 mg mL^{-1} , 4 mg mL^{-1} e 8 mg mL^{-1} . Empregou-se a técnica de redução do MTT (4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo que apresentam a atividade das desidrogenases mitocondriais, por conseguinte, atividade metabólica celular, conforme descrito por Mosmann (1983).

As células Jurkat (1×10^5 células mL^{-1}) foram plaqueadas em 24 poços, devido ao desenvolvimento em suspensão, incubadas pelo período de 24 horas, posteriormente tratadas com as amostras de pectina nas diferentes concentrações e incubadas pelo período de 72 horas. A suspensão celular foi transferida para tubos de 1,5 mL e centrifugada por 1200 rpm por 5 minutos. Foram adicionados 200 μL da solução de MTT 5 mg mL^{-1} 1:10 volume. As células foram incubadas por 30 minutos e centrifugou-se por 2500 rpm por 5 minutos. Foram adicionados 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazam gerando a coloração púrpura, com a redução do MTT.

As células HeLa ($0,08 \times 10^5$ células mL^{-1}) e HRT-18 ($0,1 \times 10^5$ células mL^{-1}) foram plaqueadas em 96 poços, devido ao desenvolvimento em aderência (fixam-se na placa), incubadas pelo período de 24 horas, posteriormente tratadas com as amostras de pectina nas diferentes concentrações e incubadas pelo período de 72 horas. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 μL de MTT 5 mg mL^{-1} 1:10 volume. Essas células foram incubadas por 2 horas e 30 minutos e descartou-se o sobrenadante, com adição de 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para avaliar a redução do MTT.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 550 nm e a viabilidade celular foi determinada de acordo com a equação 2.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{média da abs da amostra}}{\text{média da abs do controle}} \cdot 100$$

Abs: absorbância

(2)

Os resultados da viabilidade celular obtidos no ensaio de redução do MTT foram utilizados para o cálculo do IC_{50} das células tratadas com as pectinas pelo

período de 72 horas. Os cálculos para a determinação das concentrações inibitórias (IC_{50}) foram realizados utilizando o Software Estatístico Graph Pad Prism versão 5. A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que induziu morte celular em 50% das células e calculada pela regressão de Probit com método de Finney, utilizando o Software Estatístico StatPlus versão 5.8.4.

3.6.3 Determinação da citotoxicidade da pectina autoclavada modificada sobre células normais (linfócitos isolados do sangue periférico humano)

Os linfócitos normais foram coletados de um único pesquisador do projeto (mulher jovem saudável, não fumante e sem uso de nenhum tipo de medicamento). A amostra de 40 mL de sangue foi acondicionada em tubos à vácuo contendo anticoagulante EDTA (Etilenodiamina Tetraacético).

Para separação dos linfócitos, utilizou-se o reagente Histopaque 1077. O sangue foi diluído em igual volume de tampão salina fosfatada (PBS), em um tubo contendo 6 mL de sangue diluído, adicionou-se 3 mL de Histopaque. Os tubos foram centrifugados a 2500 rpm por 30 minutos a 4 °C. Para obtenção das células mononucleares de interface foi utilizada pipeta de Pasteur previamente esterilizada. As células obtidas foram diluídas em 10 mL de tampão salina fosfatada (PBS) e centrifugou-se a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartou-se o sobrenadante.

As células foram suspensas em 20 mL com meio RPMI e incubadas a 37 °C com 5% de dióxido de carbono (CO_2) por 2 horas, para separação dos monócitos aderidos na garrafa de cultura. A cultura foi transferida para tubo de 50 mL, centrifugou-se a 1200 rpm por 5 minutos a 4 °C e os linfócitos foram suspensos em 5 mL de meio RPMI. Uma alíquota de 50 μ L foi retirada da cultura e adicionou-se 450 μ L de tampão salina fosfatada (PBS), sem antibiótico, da qual se retirou-se 100 μ L para a contagem de células em câmara de Neubauer.

Os linfócitos (8×10^5 células mL^{-1}) foram semeados em placas de 24 poços, devido ao desenvolvimento em suspensão, incubadas por 24 horas e posteriormente tratadas com pectina autoclavada modificada nas concentrações 1 mg mL^{-1} , 2 mg mL^{-1} , 4 mg mL^{-1} e 8 mg mL^{-1} pelo período de cultivo de 72 horas. Após realizou-se o ensaio de determinação de viabilidade celular, ou seja, o ensaio da redução do MTT, conforme procedimento descrito no item 3.6.1 para células Jurkat.

3.6.4 Determinação do índice de seletividade (IS) para pectina autoclavada modificada

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem tumoral (Jurkat) e uma linhagem saudável (Linfócitos), indicando o potencial dos compostos em testes clínicos, determinados pela equação 3.

$$\text{Índice de Seletividade} = \frac{IC_{50} \text{ dos linfócitos huamnos}}{IC_{50} \text{ das células tumorais}} \quad (3)$$

Para o cálculo do IS, foram utilizados o IC_{50} dos resultados obtidos do ensaio de redução do MTT pelo período de 72 horas, tanto para células tumorais quanto para células saudáveis, tratadas com pectina autoclavada modificada nas concentrações 1 mg mL^{-1} , 2 mg mL^{-1} , 4 mg mL^{-1} e 8 mg mL^{-1} .

3.6.5 Avaliação do mecanismo de ação associado à citotoxicidade da pectina autoclavada modificada para células Jurkat

3.6.5.1 Ensaio de integridade de membrana

Células Jurkat (1×10^5 células mL^{-1}) foram plaqueadas em 24 poços e incubadas a 37°C por 24 horas, tratadas com pectina autoclavada modificada nas concentrações de 1 mg mL^{-1} , 2 mg mL^{-1} , 4 mg mL^{-1} e 8 mg mL^{-1} incubadas pelo período de 72 horas. A viabilidade celular foi determinada pela contagem das células em câmara de Neubauer utilizando o método de exclusão do azul de Tripan 0,5% em tampão salina fosfatada (PBS), conforme descrito por Papazisis et al. (1997).

3.6.5.2 Avaliação do processo de morte celular

Utilizou-se a metodologia proposta por Ribble et al. (2005) com alaranjado de acridina e brometo de etídio, para elucidar o tipo de morte celular induzida pela pectina autoclavada modificada. Células Jurkat (1×10^5 células mL^{-1}) foram plaqueadas em 24 poços, incubadas por 24 horas e posteriormente tratadas com

pectina autoclavada modificada, nas concentração de 2 mg ml⁻¹ utilizando como controle positivo a Vincristina (Tecnocris®) na concentração de 40 nmol L⁻¹ e o Clorambucil (Sigma) na concentração de 20 nmol L⁻¹, pelo período de 48 horas.

As células foram homogeneizadas e transferiu-se 1 mL para tubos de 1,5 mL. Centrifugou-se a suspensão de células a 1200 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Lavou-se as células com 0,5 mL de tampão salina fosfatada (PBS) gelado e centrifugou-se novamente. Adicionando sobre o *pellet* 25 µL de tampão salina fosfatada (PBS) e acrescentou-se 2 µL da solução de alaranjado de acridina e brometo de etídio.

Foram pipetados 10 µL das células marcadas e adicionou-se sobre uma lâmina previamente limpa e cobriu-se com lamínula. A coloração foi visualizada em microscópio ótico de fluorescência, com excitação de 430/30 nm e emissão de 535/40 nm. A análise de detecção de células apoptótica e necróticas foram avaliadas pelo formato morfológico do núcleo, coloração das células e cromatina.

3.6.5.3 Avaliação da integridade e condensação de cromatina

De acordo com Ribble et al. (2005) para detectar a condensação da cromatina, as células Jurkat tiveram seus núcleos corados com corante fluorescente Hoescht 33342 (Molecular Probe). Esse corante liga-se ao DNA revelando se a cromatina está frouxa ou condensada (sinais de apoptose). O protocolo utilizado foi o mesmo descrito no item 3.6.5.2.com a exceção de que após lavadas as células com tampão salina fosfatada (PBS), adicionou-se 20 µL da solução de Hoescht 0,5 µg µL⁻¹ em solução salina. Decorrido o tempo de 10 minutos, transferiu-se 10 µL das células marcadas para lâmina previamente limpa sobreposta com lamínula. Visualizou-se a coloração em microscópio ótico de fluorescência com aumento de 400x sob feixe de luz UV utilizando filtro tipo DAPI, sendo as amostras fotografadas em quatro diferentes campos.

3.6.5.4 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Para analisar se houve alteração do ciclo celular, foi executado o protocolo descrito por Crissman e Steinkamp (1973) e por Krishan (1975) com adaptações. Resumidamente as células, em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino

(SFB), foram semeadas em placas de 24 poços ($2,5 \times 10^5$ células mL^{-1}) e mantidas sob essas condições de cultura por 24 horas. Posteriormente, foram adicionadas a cultura o extrato de pectina autoclavada modificada ($2\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e 2 antitumorais a vincristina (40 nM) e o clorambucil ($20 \text{ }\mu\text{M}$). Após 72 horas de cultivo, o conteúdo de cada poço foi centrifugado, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* celular foi lavado com tampão salina fosfato (PBS) gelado, seguindo procedimento de preparo

As células foram transferidas para tubo de 1,5 mL, centrifugou-se a 1800 rpm por 7 minutos e descartou-se o sobrenadante, o *pellet* celular foi lavado com com tampão salina fosfato (PBS) gelado. Após homogeneização, as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi desprezado. As células foram suspensas em 150 μL de tampão salina fosfato (PBS) e fixadas utilizando 1350 μL de etanol 70% em tampão salina fosfato (PBS), gotejando-o enquanto as células foram homogeneizadas em vortex.

As células foram fixadas *overnight* a 4°C e centrifugadas a 1800 rpm por 7 minutos, desprezando-se o sobrenadante e suspendendo o *pellet* em 1mL de tampão salina fosfato (PBS). Centrifugou-se novamente e suspendeu em 200 μL de PSSI. As amostras foram incubadas por 15 minutos em estufa de 37°C com 5% de CO_2 .

As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur da Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA) utilizando-se o canal FL2-H. Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa CellQuest (Becton & Dickinson) avaliando 10.000 eventos por amostra, avaliando-se a porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Utilizou-se a ANOVA, com nível de significância de 95% e teste de Tukey, quando necessário, para identificar as diferenças entre as amostras nos ensaios químicos, com o software SASM-AGRI (CANTERI et al., 2001).

Para a avaliação dos ensaios biológicos, utilizou-se o Software estatístico Graph Pad Prism version 5,00. A comparação entre os tratamentos foi obtida pelo teste de variância ANOVA one way e a discriminação entre as amostras de pectina foi obtida pelo teste de Tukey, com valores de p menor ou igual que 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MATÉRIA-PRIMA

O percentual das frações dos componentes do maracujá *in natura* podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Percentual das frações do maracujá.

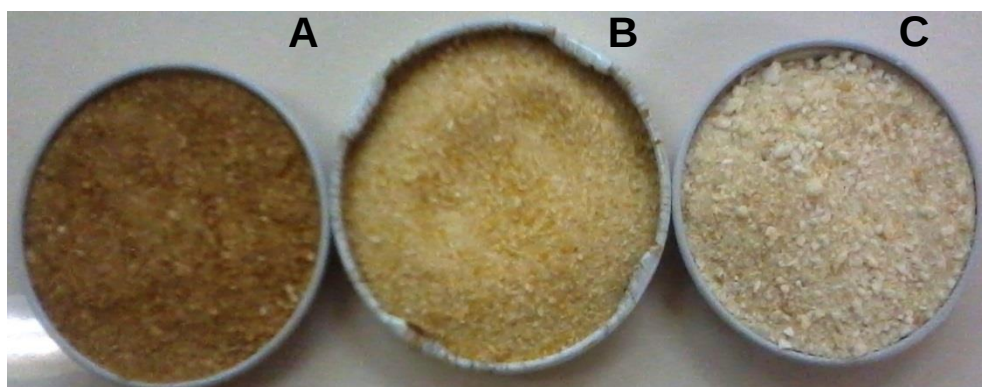
Maracujá	Peso (g)	Porcentagem (%)
Fruto inteiro	225	100
Flavedo	50	22,23
Albedo	70	31,11
Arilo	5	2,22
Polpa	60	26,67
Semente	40	17,77

O albedo e o flavedo do maracujá apresentaram 54,7% do total do fruto, o que demonstra o elevado desperdício de material na indústria de sucos desse fruto. Esse resultado é similar ao resultado obtido por Ferrari; Colussi; Ayub, (2004), no qual encontraram 50,3% de casca, 23,2% de suco (polpa) e 26,2% de sementes. Oliveira et al. (2002) evidenciaram 53% de cascas, 20,9% sementes e 26,1% de suco (polpa).

O rendimento das farinhas do albedo do maracujá foi de 12,7% para o albedo branqueado, 9,5% para farinha autoclavada e 9,0% para o albedo sem tratamento. Pita (2012) encontrou rendimento de 17,74% e Yapó; Koffi (2006) de 11,13% para farinha da casca do maracujá.

A farinha autoclavada apresentou-se mais escura que as demais. Isso pode ser devido ao escurecimento não enzimático, acelerado pelo processo de autoclavação. O escurecimento é uma das características da Reação de Maillard, ou seja, reação entre amino-carbonila de natureza não enzimática, provocando interações complexas nos alimentos e influenciando em suas características organolépticas (NUNES; BAPTISTA, 2001). A farinha sem tratamento apresentou coloração intermediária e farinha branqueada, apresentou a coloração mais clara, devido ao processo de branqueamento, com consequente inativação enzimática que poderia promover outro tipo de escurecimento (NUNES; BAPTISTA, 2001).

Constatou-se diferença na coloração entre farinhas produzidas, visualizadas na Figura 3.



A: autoclavada, B: sem tratamento e C: branqueada.

Figura 3: Farinhas do albedo do maracujá.

Na Tabela 2, pode-se observar o resultado da composição centesimal das farinhas do albedo do maracujá, utilizadas como matéria-prima para obtenção das pectinas.

Tabela 2: Composição centesimal das farinhas do albedo do maracujá. Em base seca (média $\pm$ desvio-padrão) %.

Amostras	Umidade	Cinzas	Proteínas	Fibras Solúveis	Fibras Insolúveis
STR	4,6 $\pm$ 0,1 ^c	13,1 $\pm$ 6,7 ^a	8,1 $\pm$ 3,0 ^a	16,7 $\pm$ 4,69 ^b	59,5 $\pm$ 4,52 ^a
BRA	8,6 $\pm$ 0,1 ^a	5,4 $\pm$ 0,1 ^b	6,3 $\pm$ 3,0 ^a	25,6 $\pm$ 7,06 ^a	55,9 $\pm$ 4,49 ^b
AUT	6,9 $\pm$ 0,6 ^b	5,4 $\pm$ 3,4 ^b	7,3 $\pm$ 2,8 ^a	25,3 $\pm$ 1,72 ^{ab}	47,5 $\pm$ 2,17 ^c

STR: Farinha do albedo do maracujá sem tratamento; BRA: Farinha do albedo do maracujá branqueada; AUT: Farinha do albedo do maracujá autoclavada. Letras iguais na mesma coluna indicam similaridade estatística ao nível de 5% pela ANOVA e teste de Tukey (n=3)

Pode-se observar que farinha branqueada apresentou maior teor de umidade, com diferença estatística significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Ferreira; Pena (2010) encontraram 6,0 % e Canteri et al. (2010) registraram 6,1% de umidade para farinha do albedo do maracujá.

A farinha sem tratamento apresentou o maior teor de cinzas, com diferença estatística entre as demais amostras ($p < 0,05$). Pita (2012) encontrou 7,5% de minerais totais na farinha da casca de maracujá, próximo ao evidenciado por Canteri et al. (2010) de 7,1% de cinzas na farinha do albedo do maracujá.

A farinha sem tratamento apresentou o maior teor de proteínas, no entanto, não houve diferença estatística significativa entre as amostras. Ferreira; Pena (2010)

encontraram 6,0% de proteína na farinha da casca do maracujá e Canteri et al. (2010) obtiveram 3,1% de proteína na farinha do albedo do maracujá, valor inferior aos encontrados neste trabalho.

A farinha branqueada apresentou o maior teor de fibras solúveis e a sem tratamento, o menor teor, com diferença estatística significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Isso pode ser justificado em função de que a falta de tratamento térmico na matéria-prima pode favorecer a degradação da pectina, visto que atividade enzimática pectinolítica foi detectada em mesocarpo fresco liofilizado por meio da liberação de metanol (CANTERI et al., 2010 c).

No entanto, a farinha sem tratamento apresentou o maior valor de fibras insolúveis, seguido das farinhas branqueada e autoclavada. Ferreira; Pena (2010) encontraram valores entre 61,9 a 62,9 % de fibra alimentar total enquanto que Pita (2012) encontrou 50,64% de fibra alimentar e Canteri et al. (2010), 66,1% de fibra alimentar total para a farinha da casca de maracujá. Neste trabalho, os resultados indicaram 76,2% de fibra alimentar total na farinha sem tratamento, 81,4% de fibra alimentar total na farinha branqueada e 72,8% de fibra alimentar total na farinha autoclavada.

A farinha do albedo do maracujá pode ser explorada pela Indústria de Alimentos, para o desenvolvimento de novos produtos, pois pode favorecer a saúde dos consumidores, devido ao alto teor de fibras solúveis, essas farinhas podem reduzir o LDL colesterol, a glicemia e a colesterolemia, além de auxiliar no tratamento de Diabetes e obesidade (BARBALHO et al., 2012).

Com relação aos compostos fenólicos das farinhas do albedo do maracujá, os resultados estão discriminados na Tabela 3.

Tabela 3: Determinação dos compostos fenólicos totais das farinhas do albedo do maracujá. Expressos em ácido tânico (mg Kg^{-1}) e catequina (mg Kg^{-1}) (média $\pm$ desvio-padrão).

Amostra	Expresso em ácido tânico	Expresso em catequina
STR	$1730 \pm 0,281^b$	$69 \pm 17,70^b$
BRA	$870 \pm 0,104^b$	$44 \pm 3,329^b$
AUT	$2470 \pm 0,131^a$	$95 \pm 4,190^a$

STR: Farinha do albedo do maracujá sem tratamento; BRA: Farinha do albedo do maracujá branqueada; AUT: Farinha do albedo do maracujá autoclavada. Letras iguais na mesma coluna indicam similaridade estatística ao nível de 5% pela ANOVA e teste de Tukey.

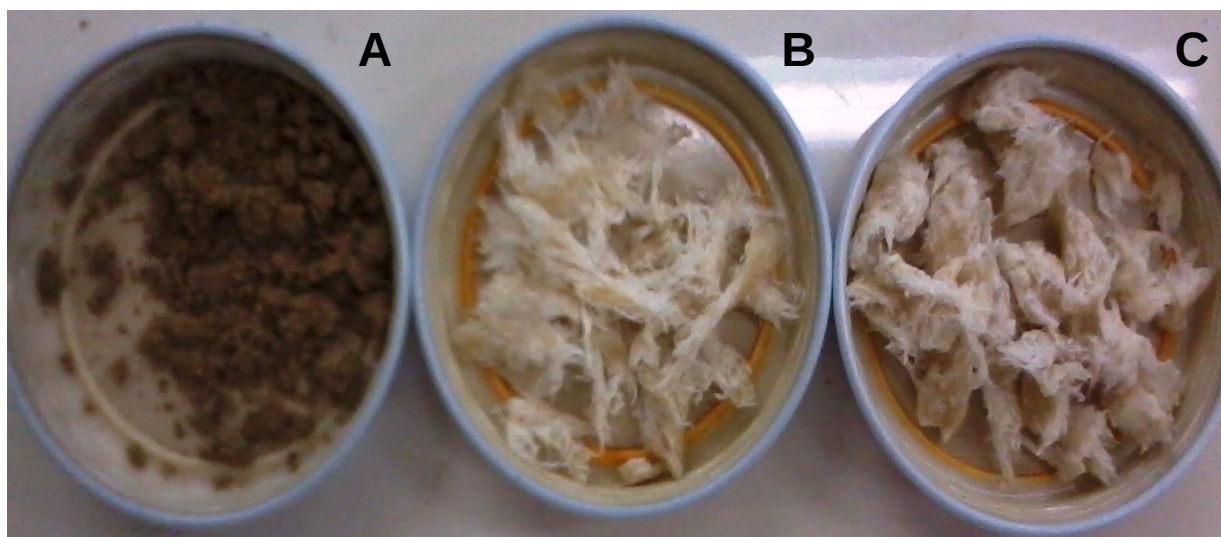
Os resultados tanto expressos em ácido tânico, quanto em catequina, indicam que a farinha autoclavada, apresentou maior teor de compostos fenólicos totais com

diferença estatística significativa. Canteri et al., (2010) utilizando o método de Folin-Ciocalteu com adaptações estimaram $1,3 \text{ g kg}^{-1}$ de compostos fenólicos totais na farinha do albedo do maracujá, expressos em catequina. Zeraik et al. (2011) afirmam que as cascas do maracujá são uma fonte de flavanoides naturais.

4.2 PECTINAS DO ALBEDO DO MARACUJÁ

O rendimento das pectinas do albedo do maracujá com relação as farinhas produzidas, foi de 13,2% para a pectina sem tratamento, 14,5% para a pectina branqueada e 13,6% para a pectina autoclavada. Seixas et al., (2014) obtiveram um rendimento extração da pectina do albedo do maracujá de 13% utilizando extração com micro-ondas e Yapó; Koffi (2006) obtiveram 13,4% de pectina do albedo do maracujá, rendimento aproximado da pectina sem tratamento. Kulkarni; Vijayanand (2010) encontraram 15,1%, próximo ao da pectina branqueada.

Observou-se diferença na coloração das amostras de pectina obtidas. A pectina da farinha sem tratamento e branqueada apresentaram coloração creme e a da autoclavada, marrom (Figura 4).



A: Pectina autoclavada; B: Pectina branqueada e C: Pectina sem tratamento.

Figura 4: Amostras de pectina extraídas do albedo do maracujá.

Os tratamentos térmicos são utilizados para evitar a deterioração de alimentos. No entanto, o uso de vapor e pressão pode modificar a estrutura química

da pectina, afetando no poder de formar soluções, na redução da viscosidade bem como na massa molecular (MUNARIN et al., 2013).

A quantificação de compostos fenólicos das pectinas obtidas pode ser visualizada na Tabela 4.

Tabela 4: Determinação dos compostos fenólicos totais das pectinas do albedo do maracujá. Resultados expressos em ácido tânico (mg Kg^{-1}) e catequina (mg Kg^{-1}) média $\pm$ desvio-padrão

Amostra	Expresso em ácido tânico	Expresso em catequina
STR	$250 \pm 0,041^b$	$24,0 \pm 1,323^b$
BRA	$360 \pm 0,024^b$	$24,2 \pm 0,764^b$
AUT	$390 \pm 0,033^a$	$28,3 \pm 1,041^a$

STR: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento; BRA: Pectina do albedo do maracujá branqueada; AUT: Pectina do albedo do maracujá autoclavada. Letras iguais na mesma coluna indicam similaridade estatística ao nível de 5% ANOVA e Teste de Tukey $p < 0,05$ em um $n=3$.

Os resultados expressos em ácido tânico e catequina sugerem que a pectina autoclavada apresenta elevado teor de compostos fenólicos totais, com diferença estatística significativa comparada a todas as amostras. Canteri et al. (2010) encontraram 200 mg Kg^{-1} de compostos fenólicos para a pectina do albedo do maracujá, valor aproximado das pectinas sem tratamento e branqueada.

Comparando-se o teor de compostos fenólicos presentes nas matérias primas e nas pectinas, pode-se afirmar que na pectina sem tratamento permaneceram 14,5% expressos em ácido tânico e 34,9%, em catequina. Na pectina branqueada, permaneceram 29,9% em ácido tânico e 55,1% em catequina e para a pectina autoclavada, 15,8% para ácido tânico e 29,8% para catequina. Portanto, a pectina branqueada apresentou maior retenção de compostos fenólicos totais provenientes da matéria prima.

4.3 ANÁLISES ESPECÍFICAS PARA PECTINA

4.3.1 Teor do metanol

As pectinas sem tratamento e autoclavada não apresentaram diferença estatística significativa com $p < 0,05$, a pectina sem tratamento apresentou o maior teor de metanol, seguido das pectinas autoclavada e branqueada. A pectina

autoclavada modificada apresentou diferença estatística significativa comparada às outras amostras com $p < 0,05$.

O resultado da determinação do teor de metanol das amostras de pectina do albedo do maracujá nativo e modificado pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5: Determinação do teor de metanol para as pectinas do albedo do maracujá nativas e modificadas. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol mg}^{-1}$, média $\pm$ desvio padrão

Amostra	$\mu\text{mol mg}^{-1}$	Amostra	$\mu\text{mol mg}^{-1}$
STR	$1,03 \pm 0,07^a$	STR*	$0,30 \pm 0,05^b$
BRA	$0,56 \pm 0,12^b$	BRA*	$0,33 \pm 0,04^b$
AUT	$0,97 \pm 0,03^a$	AUT*	$0,52 \pm 0,05^a$

STR: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento; BRA: Pectina do albedo do maracujá branqueada; AUT: Pectina do albedo do maracujá autoclavada. STR*: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento modificada; BRA*: Pectina do albedo do maracujá branqueada modificada; AUT*: Pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada. Letras iguais na mesma coluna indicam similaridade estatística ao nível de 5%. Utilizando ANOVA e Teste de Tukey $p < 0,05$ em um $n=3$.

Comparadas às pectinas nativas, as pectinas modificadas, apresentaram redução no teor de metanol, o que já era esperado. A pectina sem tratamento modificada apresentou 71% de redução, a pectina branqueada modificada apresentou 41% de redução e a pectina autoclavada modificada apresentou 47% de redução. Portanto, a pectina sem tratamento modificada apresentou maior redução do teor de metanol. Isso pode ser explicado, devido ao processo de modificação reduzir o grau de esterificação, visto que o tratamento com NaOH causa desesterificação e substitui o grupo metil pelo grupo OH (FAJARDO et al., 2012).

4.3.2 Teor de ácido galacturônico

A determinação do teor de ácido galacturônico para as pectinas nativas e modificadas do albedo do maracujá pode ser visualizada na Tabela 6.

Tabela 6: Determinação do teor de ácido anidrogacturônico de pectinas do albedo do maracujá nativas e modificadas. Expressos em mg g^{-1} (média $\pm$ desvio padrão).

Amostras	mg g^{-1}	Amostras	mg g^{-1}
STR	$520,96 \pm 0,68$	STR*	$499,84 \pm 0,91$
BRA	$466,40 \pm 1,27$	BRA*	$545,60 \pm 0,80$
AUT	$564,96 \pm 0,91$	AUT*	$1122,88 \pm 1,24$

STR: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento; BRA: Pectina do albedo do maracujá branqueada; AUT: Pectina do albedo do maracujá autoclavada. STR*: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento modificada; BRA*: Pectina do albedo do maracujá branqueada modificada; AUT*: Pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada.

Os valores de ácido anidrogacturônico que estiverem acima do limite de 65% (650 mg g^{-1}) são considerados pectina, de acordo com a legislação dos Estados Unidos e da União Européia (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). As amostras extraídas apresentam-se abaixo desse limite, exceto para a pectina autoclavada modificada, a qual pode ter tido seu valor superestimado por interferência da cor escura no método colorimétrico de determinação.

Ao estudar pectinas da casca do maracujá, alguns autores analisaram o teor de ácido galacturônico e obtiveram: 88,2 % (KULKARNI; VIJAYANAND, 2010), de 64 a 78% (YAPO, 2009), 68,7% (KLIEMANN et al., 2009), 44,2% (SILVA et al., 2012) e 23,2 % (YAPO; KOFFI, 2006).

Em pectinas extraídas de outras matérias primas, pode-se observar o teor de ácido galacturônico encontrado por diversos autores: Lira-Ortiz et al. (2014) encontraram 65% de ácido galacturônico para a pectina do pêssego; Galant et al. (2014), de 58,69 a 80,49% em amostras de pectina do suco da laranja congelado, avaliado em diferentes períodos. Jing-en et al. (2014) isolaram a pectina da jiangxiangru e determinaram 68,63% e Lin et al. (2010) estudaram a casca da árvore de amora branqueada e obtiveram 85,46% de ácido galacturônico.

4.3.3 Grau de metoxilação

A determinação do grau de metoxilação das pectinas nativas e modificada do albedo do maracujá pode ser verificada na Tabela 7.

Tabela 7: Determinação do grau de metoxilação de pectinas nativas e modificadas. Expressos em % (média $\pm$ desvio padrão).

Amostras	%	Amostras	%
STR	$33,3 \pm 1,73^a$	STR*	$8,7 \pm 5,52^b$
BRA	$22,8 \pm 5,00^b$	BRA*	$8,9 \pm 2,51^b$
AUT	$30,8 \pm 8,36^a$	AUT*	$8,3 \pm 3,05^b$

STR: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento; BRA: Pectina do albedo do maracujá branqueada; AUT: Pectina do albedo do maracujá autoclavada. STR*: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento modificada; BRA*: Pectina do albedo do maracujá branqueada modificada; AUT*: Pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada. Letras iguais na mesma coluna indicam similaridade estatística ao nível de 5%. Utilizando ANOVA e Teste de Tukey $p < 0,05$ em um $n=3$.

As amostras de pectina do albedo do maracujá sem modificação apresentaram diferença significativa com $p < 0,05$, sendo que a pectina branqueada

apresentou o menor grau de metoxilação. Dentre as pectinas modificadas, a pectina branqueada modificada apresentou o maior grau de metoxilação.

Lima et al. (2010) obtiveram 69,2% de grau de metoxilação para pectina do albedo do maracujá, valor superior aos obtido neste trabalho. Kulkarni; Vijayanand (2010) obtiveram para pectina do albedo do maracujá branqueada de 9,3 a 9,7 % de grau de metoxilação, valor inferior a todas as amostras deste trabalho. Kliemann et al., (2009) encontrou 45,9% de grau de metoxilação para pectina do albedo do maracujá extraída com ácido cítrico. Yapo; Koffi (2006) encontraram 31,8 % de grau de metoxilação para pectina da casca do maracujá, valor próximo as pectinas branqueada e autoclavada modificada. Canteri et al. (2012b) também estudaram a pectina do albedo do maracujá e encontram um grau de metoxilação entre 84 e 64%, valores superiores aos obtidos neste trabalho.

Alguns autores estudaram pectinas provenientes de outras fontes vegetais, Rubio-Senet et al. (2015) estudaram a pectina de bioprodutos do azeite de oliva e encontraram de 4,8 a 18,7% de grau de metoxilação e Galant et al. (2014) encontraram de 19,7% de grau de metoxilação para pectinas extraídas do suco de laranja congelado, avaliados em diferentes períodos de armazenamentos, valores próximos das pectinas sem tratamento modificada e branqueada modificada.

4.3.4 Teor de açúcares neutros

A determinação do teor de açúcares neutros das pectinas nativas e modificadas do albedo do maracujá pode ser observada na Tabela 8.

Tabela 8: Determinação do teor de açúcares neutros para as pectinas nativas e modificadas. Expressos em mol % (média $\pm$ desvio padrão).

Amostras	Ram (mol %)	Fuc (mol %)	Ara (mol %)	Xil (mol %)	Man (mol %)	Gal (mol %)	Gli (mol %)
STR	12,8 $\pm$ 0,6 ^a	4,0 $\pm$ 0,6 ^a	20,7 $\pm$ 0,8 ^a	19,0 $\pm$ 0,9 ^a	5,4 $\pm$ 0,6 ^a	21 $\pm$ 0,7 ^{ab}	17,1 $\pm$ 0,8 ^{ab}
BRA	24 $\pm$ 0,9 ^a	3,0 $\pm$ 0,4 ^a	7,1 $\pm$ 0,1 ^a	5,8 $\pm$ 0,3 ^a	6,1 $\pm$ 2,4 ^a	30 $\pm$ 2,2 ^a	24 $\pm$ 5,3 ^a
AUT	12,7 $\pm$ 3,8 ^a	2,9 $\pm$ 0,2 ^{ab}	21,5 $\pm$ 3,5 ^a	16,4 $\pm$ 2,6 ^a	5,6 $\pm$ 0,1 ^a	22 $\pm$ 1,4 ^b	18,9 $\pm$ 1,8 ^{ab}
STR*	17,6 $\pm$ 1,6 ^a	3,6 $\pm$ 0,2 ^a	13 $\pm$ 0,7 ^a	22,3 $\pm$ 1,8 ^a	2,8 $\pm$ 2,6 ^b	24 $\pm$ 1,4 ^{ab}	16,7 $\pm$ 1,1 ^{ab}
BRA*	21,9 $\pm$ 1,7 ^a	3,1 $\pm$ 0,1 ^a	14,3 $\pm$ 1,7 ^a	19,8 $\pm$ 2,8 ^a	5,3 $\pm$ 0,5 ^a	20,9 $\pm$ 0,5 ^{ab}	14,7 $\pm$ 0,5 ^{ab}
AUT*	25,3 $\pm$ 0,4 ^a	1,6 $\pm$ 0,5 ^b	6,6 $\pm$ 0,2 ^a	31,6 $\pm$ 0,3 ^a	nd*	22,1 $\pm$ 05 ^b	12,8 $\pm$ 0,5 ^b

Ram: Ramnose, Fuc: Fucose, Ara: Arabinose, Xil: Xilose, Man: Manose, Gal: Galactose, Gli: Glicose. STR: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento; BRA: Pectina do albedo do maracujá branqueada; AUT: Pectina do albedo do maracujá autoclavada. STR*: Pectina do albedo do maracujá sem tratamento modificada; BRA*: Pectina do albedo do maracujá branqueada modificada; AUT*: Pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada. Letras iguais na mesma coluna indicam similaridade estatística ao nível de 5%, utilizando ANOVA e Teste de Tukey p <0,05 em um n=3. *nd: Não Determinado.

A pectina sem tratamento apresentou o maior teor de fucose, a pectina branqueada apresentou o maior teor de manose, galactose e glicose, a pectina autoclavada apresentou o maior teor de arabinose. A pectina autoclavada modificada apresentou o maior teor de ramnose e xilose. Não houve diferença estatística entre as amostras de ramnose, arabinose e xilose, mas para os outros açúcares neutros, houve diferença estatística significativa com $p < 0,05$.

Estudando a pectina do albedo do maracujá sem tratamento, Seixas et al. (2014) obtiveram 2,6% de ramnose, 0,3% de fucose, 4,1% de arabinose, 1,6% de xilose, 0,7% de manose, 3,6% de galactose e 4,8% de glucose, já Yapo; Koffi (2006) encontraram 1,9 g 100g⁻¹ de ramnose, 0,7 g 100g⁻¹ de fucose, 3,2 g 100g⁻¹ de arabinose, 12,3 g 100g⁻¹ de xilose, 3,5 g 100g⁻¹ de manose, 4,3 g 100g⁻¹ de galactose e 30,8 g 100g⁻¹ e Silva et al. (2012) obtiveram 11,8% de arabinose, 10,6% de ramnose, 11,8% de glucose, 9% de manose 6,1% de galactose, 3,6% de xilose, 1,3% de ribose e 1,6% de fucose. Esses autores apresentaram valores de açúcares neutros inferiores aos encontrados neste trabalho para a pectina sem tratamento, exceto para glicose estudada por Yapo; Koffi (2006) que se apresentou maior e também para ramnose estudada por Silva et al. (2012) que apresentou valor próximo a pectina sem tratamento. Isso pode ser explicado pelos diferentes métodos de extrações utilizadas pelos autores citados.

Em outras fontes de pectina, alguns autores também analisaram o teor de açúcares neutros. Morris; Ralet (2012) obtiveram 9 mol% de ramnose, 6 mol% de arabinose e 15 mol% de galactose na pectina da beterraba, valor de galactose próximo a pectina branqueada.

Galant et al. (2014) evidenciaram de 0,76 a 2,38% de ramnose, de 5,40 a 12,43% de arabinose, de 11,82 a 21,53% de galactose, de 0,85 a 3,39% de glucose, de 0,50 a 0,97% de xilose e de 0,13 a 0,42% de frutose nas pectinas do suco de laranja congelado, avaliado em diferentes períodos de armazenamento. Esses valores foram diferentes do obtido nesse trabalho para todas as amostras.

Rubio-Senet et al. (2015) encontraram de 1,8 a 7,5% de ramnose, de 0,1 a 0,3% de fucose, de 10,5 a 42,7% de arabinose, de 3,8 a 40,4 de xilose, de 4,7 a 75,2% de manose, de 3,0 a 25,0% de galactose e de 3,6 a 12,1% de glucose para pectina de bioprodutos do azeite de oliva. Esses autores obtiveram valores maiores

de arabinose, xilose e manose e valor de galactose próximo as pectinas sem tratamento e autoclavada.

Jing-en et al. (2014) determinaram 4,94% de arabinose, 3,07% de galactose, 2,13% de ramnose, 1,62 de manose e 1,29% de glucose na pectina da Jiangxiangru. Valores inferiores aos encontrados nesse trabalho. Lin et al. (2010) obtiveram 9,74% de galactose, 15,59% de glucose, 16,62% de manose e 17,20% de ramnose na pectina da casca da árvore da amora. O valor de manose somente, está superior ao encontrado neste trabalho. Lira-Ortiz et al. (2014) obtiveram 1,20 mg g⁻¹ de glucose, 195 mg g⁻¹ de galactose, 21,6 de ramnose e 1,20 de arabinose e não detectaram xilose em pectina da pera; o valor de ramnose aproxima-se da pectina branqueada.

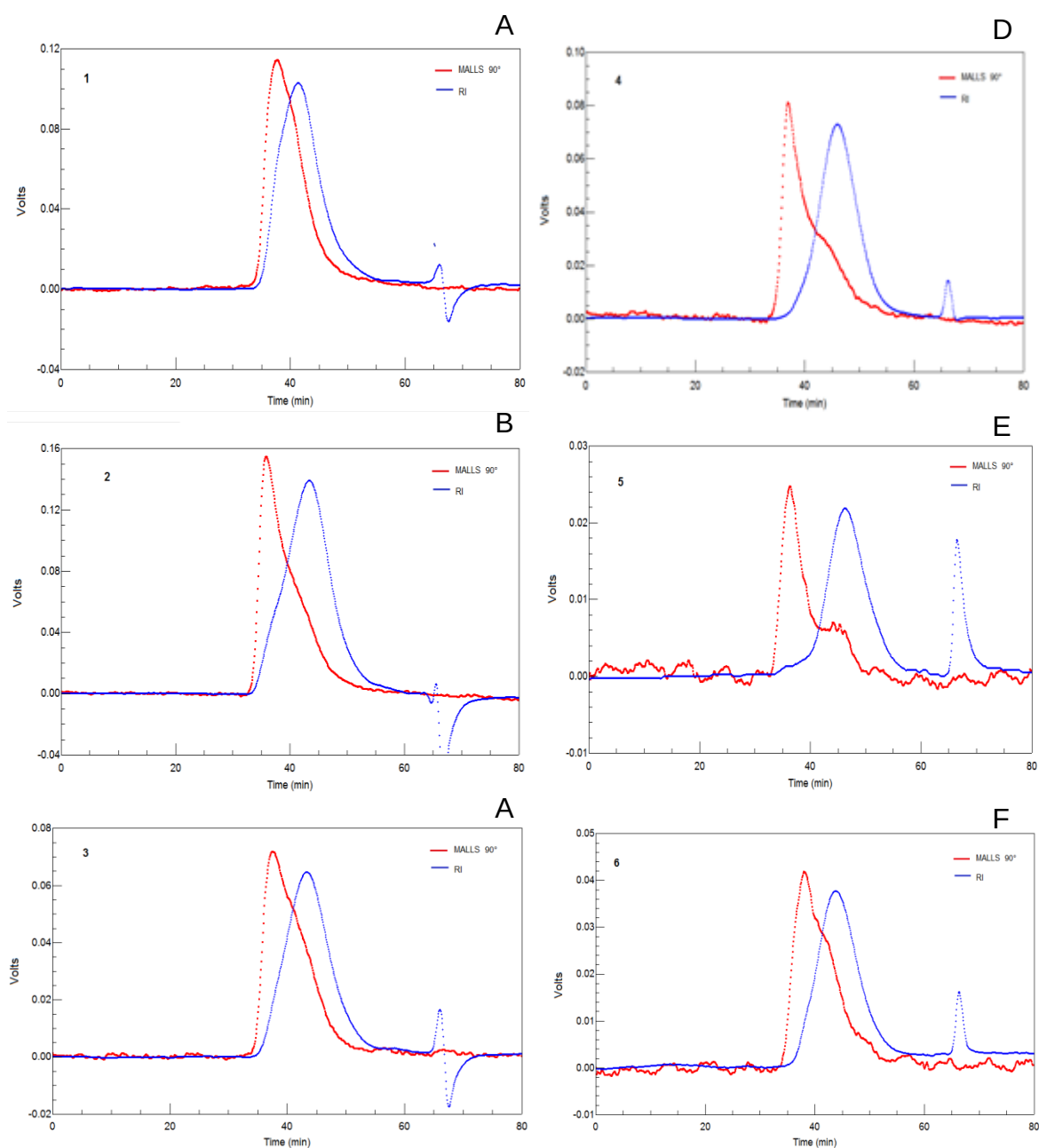
Estudando a pectina cítrica modificada, Einhorn-Stool, Kunzek, Dongowski (2007) encontraram de 0,95 a 1,15% de ramnose, de 2,51 a 3,71% de arabinose, de 0,25 a 0,35% de xilose, de 4,25 a 4,45% de galactose e 0,9% de glicose. Esses valores foram inferiores aos encontrados nas pectinas do albedo do maracujá modificadas com diferentes tratamentos.

4.3.5 Perfil de massa molar

O perfil de massa molar determinado pode ser observado na Figura 5. As amostras analisadas apresentaram um perfil de eluição polimodal sugerindo a presença de uma mistura de polissacarídeos.

Nas amostras submetidas à modificação (Figura 5: B, D e E), a mais alta intensidade detectada pelo RI não coincidiu com o sinal de MALLS, indicando que material com alta massa molar nessas amostras está presente em baixas concentrações. Os componentes de maior massa molar são detectados simultaneamente pelo índice de refração e espalhamento de luz. Adicionalmente, apresentam principalmente componentes de menor massa molar, detectados somente pelo índice de refração.

As pectinas nativas apresentaram massa molar mais alta que as pectinas modificadas, isso comprova sua modificação, pois as pectinas modificadas precisam ter menor massa molar e menor grau de esterificação com relação a pectina nativa. Dessa maneira, a análise HPSEC corrobora a hipótese de que a modificação química promove a degradação e redução do tamanho da cadeia de pectina.



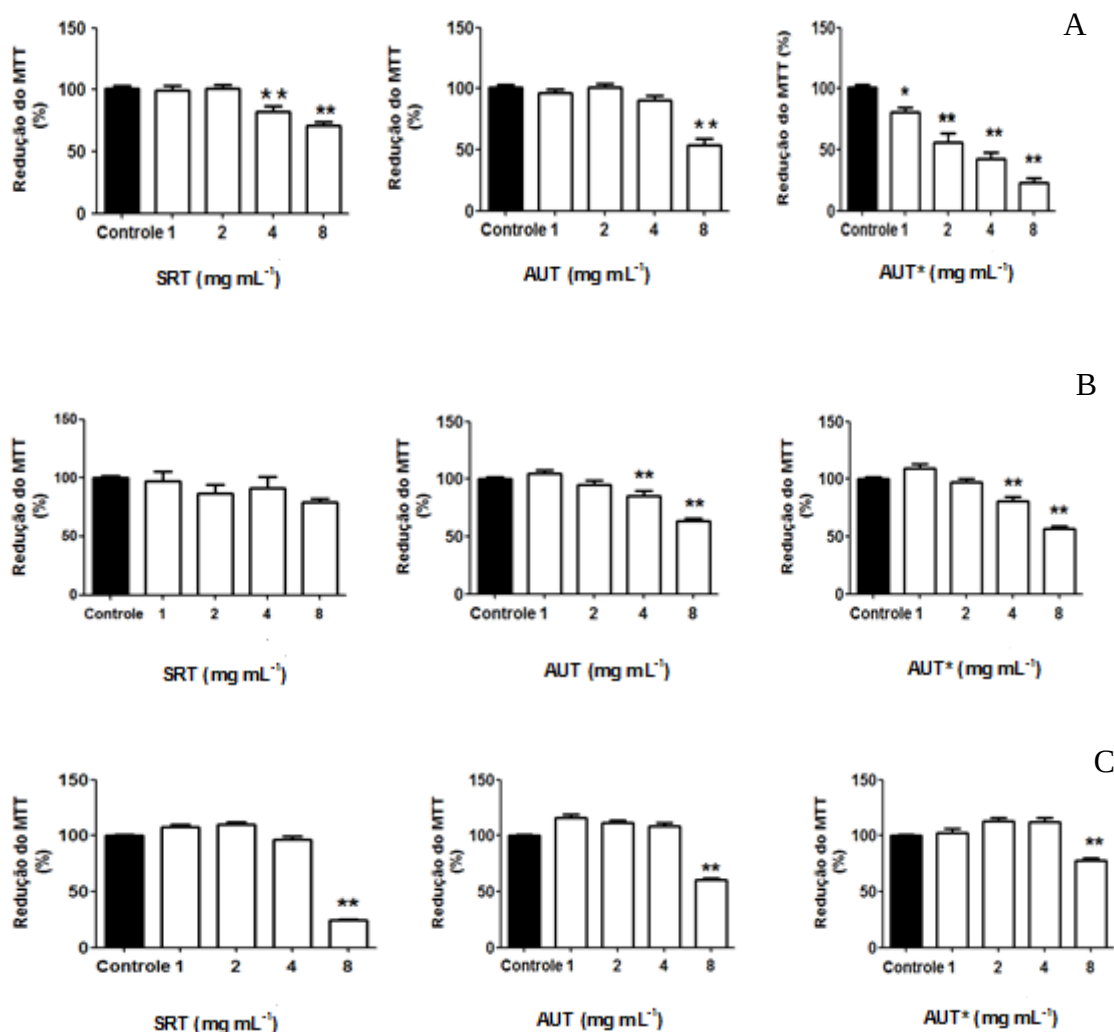
A: Pectina do Albedo do Maracujá Sem Tratamento, B: Pectina do Albedo do Maracujá Branqueada, C: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada, D: Pectina do Albedo do Maracujá Sem Tratamento Modificada, E: Pectina do Albedo do Maracujá Branqueada Modificada e F: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada Modificada.

Figura 5: Perfil de Massa Molar das pectinas nativas e modificadas do albedo do maracujá.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 Determinação da citotoxicidade das pectinas sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada sobre células tumorais

Os resultados da determinação da citotoxicidade em células Jurkat, HeLa e HRT-18, tratadas com diferentes concentrações de pectina do albedo do maracujá sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada em experimento tipo dose-resposta estão apresentados na Figura 6.



STR: Pectina do Albedo do Maracujá Sem Tratamento; AUT: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada ; AUT*: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada Modificada.

Figura 6: Efeito das pectinas do albedo do maracujá sobre a viabilidade de células Jurkat (A), HeLa (B) e HRT-18 (C) Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de um n=18 de 3 (A), n = 24 de 3 (B e C) experimentos independentes. *p = < 0,010 e **p = < 0,001.

Observou-se que a redução do MTT, que expressa a diminuição da viabilidade celular, ocorreu de maneira dose-dependente, sendo que a fração da pectina autoclavada modificada apresentou o melhor resultado em relação às demais, portanto sendo a mais citotóxica para as células Jurkat, seguida das

pectinas autoclavada e sem tratamento. A porcentagem de perda da viabilidade foi de $29,3 \pm 11,07\%$ para a pectina sem tratamento, de $45,9 \pm 16,26\%$ para a pectina autoclavada e $76,7 \pm 11,01\%$ para a pectina autoclavada modificada.

A comparação entre as frações revelou que a pectina autoclavada modificada foi a mais citotóxica para células HeLa, seguida das pectinas autoclavada e sem tratamento. A porcentagem de perda de viabilidade foi de $28,8 \pm 10,60\%$ para a pectina sem tratamento, $39,1 \pm 12,29\%$ para a pectina autoclavada e $43,7 \pm 7,98\%$ para a pectina autoclavada modificada.

A comparação entre as frações revelou que a pectina sem tratamento foi a mais citotóxica para células HRT-18, seguida das pectinas autoclavada e autoclavada modificada. A porcentagem de perda de viabilidade das células tratadas com 8 mg mL^{-1} de pectina foi de $75,2 \pm 2,80\%$ para a pectina sem tratamento, de $39,28 \pm 5,49\%$ para a pectina autoclavada e de $22,53 \pm 11,31\%$ para a pectina autoclavada modificada.

Bergman et al. (2010) também evidenciaram redução da viabilidade de células leucêmicas *in vitro*, quando estudaram a pectina cítrica. Os pesquisadores utilizaram concentrações de 0,25 a 2 mg mL^{-1} para tratamento de células K562 derivada de leucemia humana (24 horas) e observaram efeito dose-dependente.

Jing-en et al. (2014) isolaram a pectina da Jiangxiangru e afirmaram que o composto apresentou clara atividade antitumoral *in vitro*, quando o estudaram em linhagem celular K562 derivada de leucemia humana. Todavia, sugeriram que mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação desse composto.

Hossein et al. (2013) estudaram a pectina cítrica modificada e evidenciaram que o composto pode bloquear a Galectina 3, proteína de ligação a hidratos de carbono que pode estar envolvida na progressão do câncer de ovário. Em linhas gerais, os pesquisadores utilizaram células SKOV-3 na concentração de 8×10^3 células poço⁻¹ e as trataram com pectina cítrica modificada nas concentrações de 0,025, 0,050 e 0,1% pelos períodos de 24 e 48 horas. Por meio do ensaio de redução do MTT concluíram que a maior concentração, 0,1% de pectina cítrica modificada, apresentou o melhor resultado em ambos os tempos de tratamento.

Hao et al. (2013) também evidenciaram as propriedades antitumorais da pectina cítrica autoclavada quando trataram células HeLa (1×10^4 células mL^{-1}) com concentrações de 1 a 5 mg mL^{-1} pelo período de 48 horas. Os resultados indicaram

que os compostos exibiram efeito moderado de redução da viabilidade celular, avaliado pelo emprego do ensaio de redução do MTT.

Bergman et al. (2010) estudaram a pectina cítrica e encontraram que essa inibe o câncer de colón *in vitro*. Os pesquisadores utilizaram concentrações de 0,25 a 2 mg mL⁻¹ e empregaram células HuCC e HT29, ambas células de carcinoma do colón humano. Com tratamentos de 24 horas foi possível constatar que a pectina reduz a proliferação celular.

Silva et al. (2012) também encontraram propriedades antitumorais para pectina do maracujá *in vivo*, mas não em estudo *in vitro*. Os pesquisadores observaram a redução do Sarcoma S-180 (câncer de mesoderme) com administração oral e intraperitoneal da pectina do maracujá.

4.4.2 Determinação da citotoxicidade e calculo da concentração Inibitória 50% (IC₅₀) das células tumorais Jurkat, HeLa e HRT-18

A concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC₅₀) das pectinas foi calculada para as três linhagens estudadas, Jurkat, HeLa e HRT-18 e o resultado pode ser visualizado na Tabela 9.

Tabela 9: IC₅₀ para as pectinas sem tratamento, autoclavada e autoclavada modificada, calculado para células tumorais em cultivo.

Pectinas	Jurkat	HeLa	HRT-18
STR	12,81 ± 4,40	67,97 ± nd**	6,66 ± 0,22
AUT	9,82 ± 4,50	8,80 ± 0,96	8,37 ± 0,71
AUT*	2,63 ± 0,25	8,37 ± 1,31	9,14 ± 2,77

STR: Pectina do Albedo do Maracujá Sem Tratamento; AUT: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada ; AUT*: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada Modificada. ** não determinado

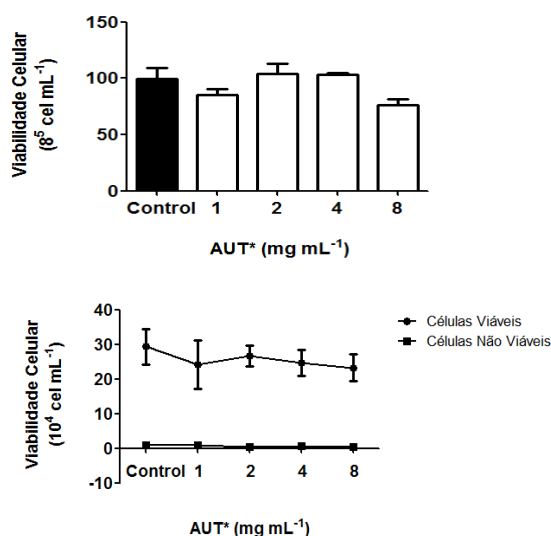
Pode-se observar na tabela 9 que o menor IC₅₀ foi obtido para a pectina autoclavada modificada empregando células Jurkat, seguido da pectina sem tratamento para células HRT-18 e da pectina autoclavada modificada para células HeLa. Portanto o melhor IC₅₀ obtido foi para a pectina autoclavada modificada em células Jurkat.

Almeida et al. (2015) obtiveram um IC₅₀ de 500 ug mL⁻¹ para pectina comercial Pec-Ma em células Caco-2. Hao et al. (2013) avaliando a pectina cítrica autoclavada sobre células HeLa, encontraram um IC₅₀ de 1,86 mg mL⁻¹. Bergman et al. (2010), estudaram a pectina cítrica em células HuCC e HT29 e concluíram que o IC₅₀ foi de 4,25 mg mL⁻¹.

Cumprе ressaltar que o IC₅₀ pode variar de acordo com a responsividade do tipo celular, tempo e metodologia empregada. Percebe-se que a pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada apresentou efeito citotóxico promissor. No entanto, para estudos futuros, esse composto necessita ser isolado para comprovar esse efeito.

4.4.3 Determinação da citotoxicidade da pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada sobre células normais, linfócitos de sangue periférico humano.

Compostos antitumorais podem ser citotóxicos também para células normais. Neste estudo, foi avaliado o efeito citotóxico da pectina autoclavada modificada em linfócitos do sangue periférico humano para posterior cálculo do índice de seletividade (IS). A citotoxicidade foi avaliada por duas metodologias: ensaio de redução do MTT e ensaio de integridade de membrana. Os resultados podem ser visualizados na Figura 7.



AUT*: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada Modificada.

Figura 7: Efeito da pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada sobre a viabilidade de Linfócitos Humanos. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de um n= 4 de 1 experimento independente.

Os resultados indicam que a pectina autoclavada modificada apresenta baixa toxicidade para células saudáveis

Ramachandran et al., (2011) também estudaram o efeito de pectina modificada, todavia de origem cítrica, sobre linfócitos humanos *in vitro*. Esses autores afirmaram que a pectina cítrica modificada não apresentou efeito significativo para células humanas saudáveis quando empregada as concentrações de 10 a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.4.4 Determinação do índice de seletividade (IS) da pectina autoclavada modificada

Para determinação do índice de seletividade (IS), foram utilizados os resultados obtidos de viabilidade para as células Jurkat (tumoral) e para Linfócitos do sangue periférico humano (normal) tratados com pectina autoclavada modificada por 72 horas, visualizados na Tabela 10.

Tabela 10: Índice de seletividade da pectina autoclavada modificada.

Tipo celular	IC50% (mg mL^{-1})	IS
Jurkat	$2,63 \pm 0,25$	1,90
Linfócitos	$4,93 \pm 1,68$	

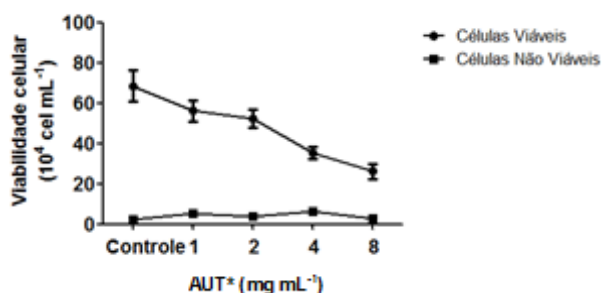
Quando o IS apresenta valor igual ou maior que 2,0 é considerado significativo, indicando que o composto teste é duas vezes mais ativo na linhagem tumoral que nas células saudáveis (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991). Portanto, os resultados deste trabalho indicam que a pectina autoclavada modificada apresenta baixa citotoxicidade para células normais.

4.4.5 Avaliação do mecanismo de ação associado à citotoxicidade da pectina autoclavada modificada para células Jurkat

Visando entender o mecanismo que gera a citotoxicidade da pectina autoclavada modificada nas células Jurkat foram realizados quatro ensaios.

4.4.5.1 Ensaio de integridade de membrana

O ensaio de integridade de membrana foi determinado pela contagem das células em câmara de Neubauer, utilizando o Azul de Tripán. Para tanto, células Jurkat foram tratadas com pectina autoclavada modificada em diferentes concentrações pelo período de 72 horas e os resultados das contagens estão demonstrados na Figura 8.



AUT*: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada Modificada.

Figura 8: Efeito da pectina do albedo do maracujá autoclavada modificada sobre a viabilidade celular de células Jurkat. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média de um $n = 16$ de 4 experimentos independentes.

Observa-se que a viabilidade das células Jurkat reduz, à medida em que a concentração da pectina autoclavada modificada aumenta, evidência de efeito dose-resposta que corrobora os resultados obtidos pelo ensaio de redução do MTT.

4.4.5.2 Avaliação do processo de morte celular

Avaliou-se o processo de morte celular induzida pela pectina autoclavada modificada empregando a concentração próxima ao IC_{50} 2 mg mL^{-1} e em cultivos de 48 horas.

A análise de detecção de células apoptóticas e necróticas foi realizada por avaliação da cor e formato morfológico do núcleo, bem como a avaliação da cromatina. O corante alaranjado de acridina penetra nas células vivas e mortas, emitindo fluorescência, permitindo discriminá-las através das cores: células viáveis apresentam núcleo normal e coloração verde, células apoptóticas em fase inicial apresentam núcleo verde brilhante, porém com perda parcial da integridade de membrana, com áreas laranja no núcleo e células necróticas apresentam núcleo laranja uniforme, pois há perda total da integridade de membrana.

Na Figura 9, é possível visualizar as células coradas com alaranjado de acridina e com brometo de etídio.

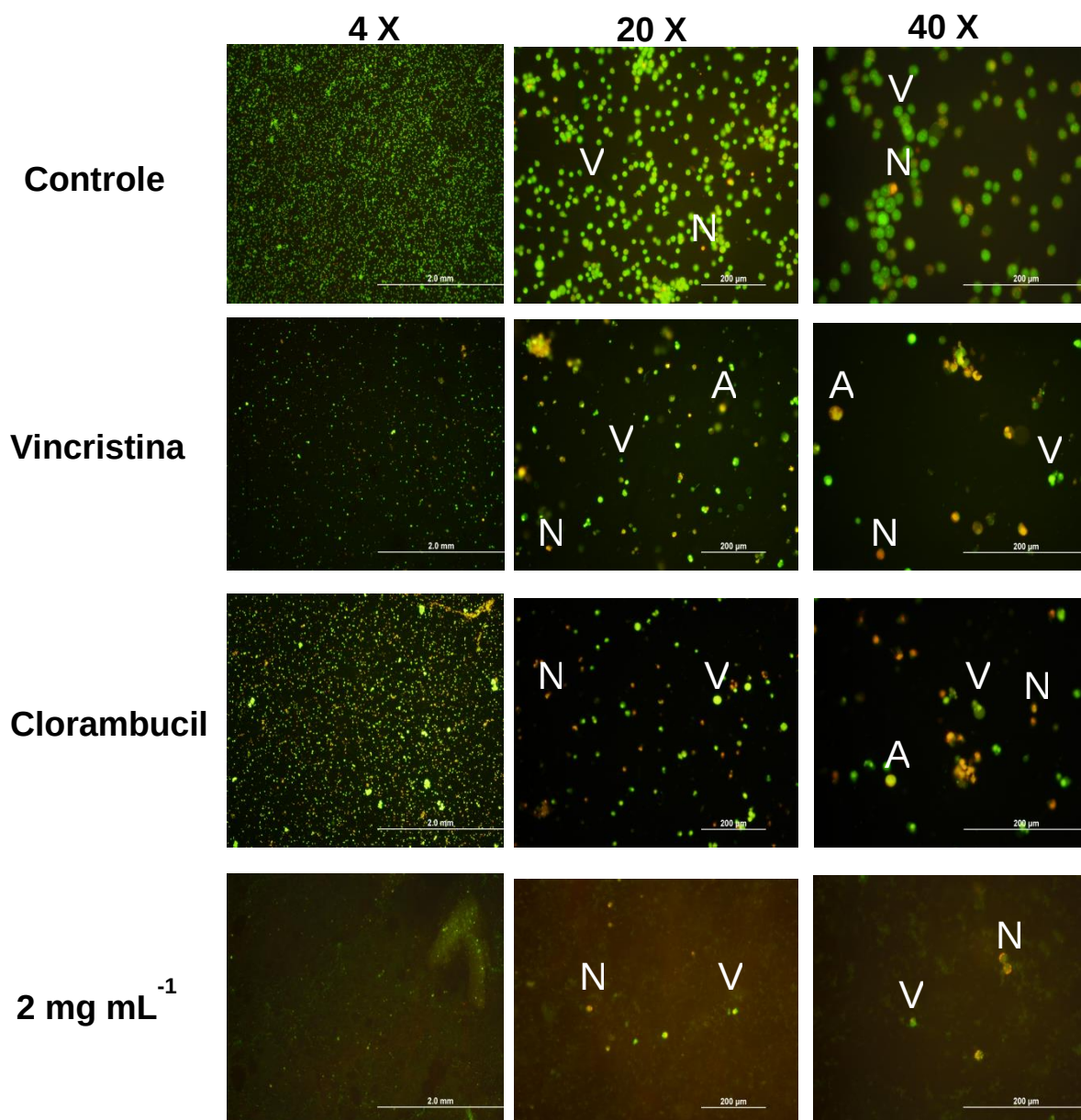


Figura 9: Microscopia de fluorescência de células Jurkat tratadas com pectina autoclavada modificada e coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. A viabilidade celular da linhagem em cultura foi também avaliada utilizando 40 nM de Vincristina e 20 uM de Clorambucil. As células foram classificadas de acordo com os seguintes parâmetros A: Apoptóticas, N: Necróticas e V: Viáveis.

O corante alaranjado de acridina penetra nas células vivas e mortas e emite uma fluorescência verde por intercalar com o DNA, laranja quando intercala com o RNA, o brometo de etídio penetra apenas em células com alteração em sua membrana, ou seja, apoptose ou necrose e emite a fluorescência laranja ao intercalar com o DNA. Portanto o critério de classificação de células apoptóticas:

podem estar em fase inicial (membrana ainda intacta) e apresentam núcleo verde brilhante, porém não uniforme e com condensação ou fragmentação de cromatina ou fase tardia (perda de integridade de membrana) na qual se observa condensação de cromatina e áreas laranjadas no núcleo. As células necróticas apresentam núcleo laranja uniforme, pois já perderam toda a integridade de membrana e as células viáveis: apresentam núcleo normal e fluorescência verde. O ensaio de microscopia de fluorescência indicou que o controle apresentou maior número de células viáveis; o tratamento com pectina autoclavada modificada apresentou células necróticas e viáveis, diferindo das culturas tratadas com Vincristina e Clorambucil que apresentaram maior proporção de células apoptóticas e necróticas. Contudo, ainda são necessários maiores estudos para elucidar o processo de morte celular.

4.4.5.3 Avaliação da integridade e condensação de cromatina

A presença de cromatina condensada, representa um parâmetro de indução de morte por apoptose a qual foi avaliada sobre células Jurkat tratados com pectina autoclavada modificada pelo período de 48 horas com a concentração de IC_{50} 2 mg mL^{-1} e está demonstrada na Figura 10.

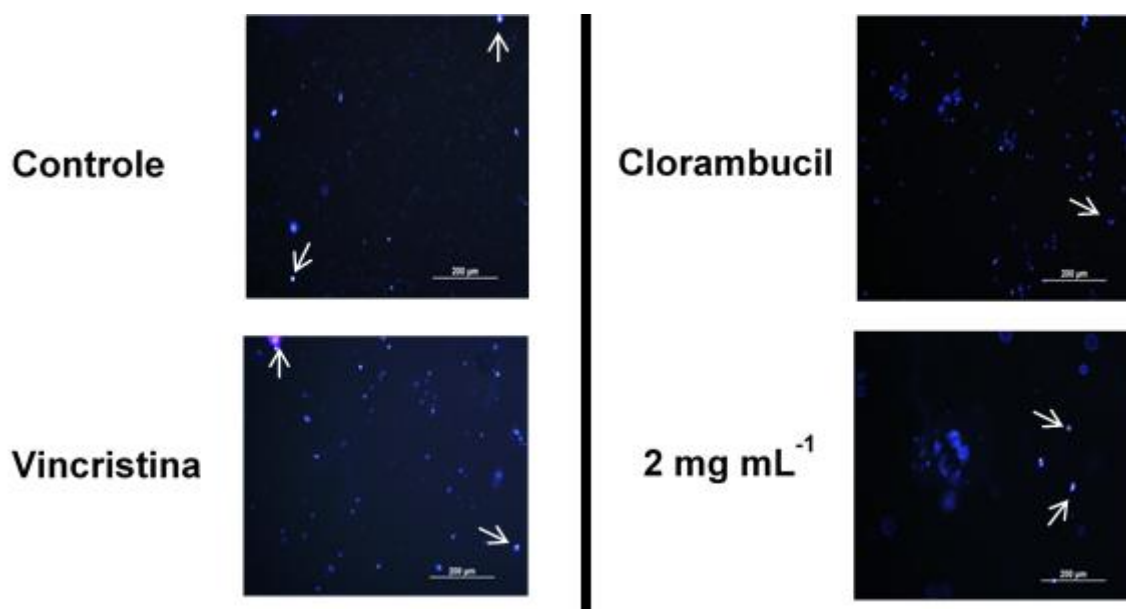


Figura 10: Indução de condensação da cromatina em células Jurkat tratadas com pectina autoclavada modificada. Avaliada utilizando o corante fluorescente Hoescht 33342 por microscopia de fluorescência. A seta indica condensação de cromatina (sinais de apoptose).

Observando-se a figura 10, pode-se afirmar que 2 mg mL^{-1} da pectina autoclavada modificada pode gerar condensação da cromatina, porém em mesma proporção que o controle, fenômeno que fica claramente evidenciado em cultura tratada com Vincristina.

4.4.5.4 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica rápida capaz de quantificar o DNA celular, desde que empregados fluoróforos, que se ligam a este. Tal ligação permite a emissão de fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA presente nas fases do ciclo celular das células em análises.

Pode-se dividir e classificar o ciclo celular em fase sub G0/G1 (que representa DNA fragmentado), G0/G1, S e G2/M, representando estado de repouso (ausência de proliferação celular), síntese de componentes; síntese de DNA; pré-divisão e divisão respectivamente, conforme demonstrado na tabela 11, para células tratadas com pectina autoclavada modificada.

Tabela 11: Distribuição do ciclo celular em diferentes fases (%) de células Jurkat tratadas com pectina autoclavada modificada. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão.

Tratamento	Sub G0/G1	G0/G1	S	G2/M
Controle	14,36±1,51	52,10±0,96	8,04±0,50	21,80±2,13
AUT* (2mg.mL ⁻¹)	13,58±0,49	48,23±0,99	9,25±0,53	22,73±1,02
Clorambucil (20 µM)	51,85±1,78	14,83±0,99	12,88±0,95	13,60 ±0,70
Vincristina (40 ηM)	14,08±2,58	46,17±1,19	13,88±1,33	22,00 ± 1,84

AUT*: Pectina do Albedo do Maracujá Autoclavada Modificada.

Não houve diferença estatística significativa entre as células tratadas e controle, utilizando ANOVA e Teste de Tukey.

Amostras de pectina com mudança no pH ou que passaram por tratamento térmico, tem demonstrado potencial como quimiopreventivo, apresentando propriedades antitumorais, inclusive para cânceres agressivos e recorrentes (LECLERE; CUSTEM; MICHIELS, 2013).

Hao et al. (2013) propõe que o mecanismo de ação esteja associado a apoptose e a para de ciclo celular. Desta forma, avaliaram o ciclo celular de células tratadas com para as pectinas cítricas autoclavada e modificada, utilizando 2 mg mL^{-1} e constataram que no tratamento com pectina cítrica autoclavada, houve redução

da população celular na fase G0/G1 e aumento considerável da população celular nas fase G2/M e um pequeno aumento na fase S. Contudo, a pectina cítrica modificada não alterou a distribuição do ciclo celular.

Glisnki; Raz (2009), pesquisando a pectina cítrica modificada, identificaram a parada de ciclo na fase G0/G1. Assim, indicaram ser provável que essa pectina gere uma regulação negativa na fase G2/M e subsequente indução apoptose.

Hosseini et al. (2013) estudaram a pectina cítrica modificada utilizando 0,1%. A análise de ciclo celular de células de câncer de ovário que demonstrou a parada de ciclo na fase G1, bem como demonstrou redução da população celular na fase G2/M com relação ao controle.

Este trabalho concorda com os autores citados, que relatam que pectinas modificadas apresentam aplicações farmacológicas, demonstrando efeitos significativos contra células tumorais.

Cabe ressaltar que as farinhas e as pectinas do albedo do maracujá podem ser empregadas no desenvolvimento de novos produtos, como biscoitos, cereais, geleias, iogurtes e doces. A farinha do albedo do maracujá autoclavada, além de apresentar alto teor de compostos fenólicos, utilizada como matéria-prima para extração de pectina, aliada a modificação química da molécula, pode ser utilizada como fonte potencial de compostos com atividade antitumoral.

Em geral, busca-se a extração de pectina com elevada massa molar e alto grau de esterificação com consequente capacidade de geleificação mais adequada para a indústria. Para tanto, a matéria-prima deveria ser cuidadosamente armazenada e tratada termicamente, para evitar degradação enzimática ou química.

Entretanto, com este trabalho, pode-se inferir que a pectina modificada, com menor massa molar e mais baixo grau de esterificação apresenta outro tipo de aplicação funcional farmacológica, mostrando-se efetiva contra células tumorais. A produção desse tipo de pectina pode ser feita com matéria-prima em degradação parcial, com menor custo. O investimento deverá ser direcionado para a aquisição dos reagentes para a modificação química.

Ou seja, se a indústria souber aproveitar seus subprodutos, por meio da minimização de resíduos, além de obter lucratividade pode contribuir para melhorar a qualidade de vida da população.

Como sugestões para estudos posteriores, além da extração e da modificação das pectinas, é necessário isolar o composto em frações com diferentes massas moleculares, a fim de determinar com especificidade a parte da pectina que apresenta maior ação antitumoral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

A forma de obtenção das farinhas influencia na composição e aparecia dos mesmos. A extração das pectinas a partir das farinhas apresenta um rendimento entre 13,2 e 14,5%.

A modificação química influenciou na composição das pectinas obtidas, que apresentaram redução no teor de metanol e aumento no teor de ácido galacturônico, grau de metoxilação (8,95 a 8,34%) e redução na massa molar.

Quanto ao efeito citotóxico, *in vitro*, a concentração de 2,63 mg mL⁻¹ da pectina autoclavada modificada apresentou melhor efeito citotóxico sobre as células Jurkat, de origem leucêmica, demonstrando um potencial antitumoral promissor para células leucêmicas.

REFERÊNCIAS

1. ANTHON, G.E.; BARRET, D.M. Pectin methylesterase activity and other factors affecting pH and titratable acidity in processing tomates. **Food Chemistry**, v.13, p. 915-920, 2012.
2. BARBALHO, S. M.; SOUZA, M. da S. S. de; SILVA, J. C. de P. e; MENDES, C. G.; OLIVEIRA, G. A. de; COSTA, T.; FARINAZZI-MACHADO, F. M. V. Yellow passion fruit rind (*Passiflora edulis*): an industrial waste or an adjuvant in the maintenance of glycemia and prevention of dislipidemia. **Journal of Diabetes Research & Clinical Metabolism**, article in press, 2012. Disponível em: <<http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2050-0866-1-5.pdf>>. Acesso em: 22-01-2015.
3. BASANTA, M. F.; PONCE, N. M. A.; ROJAS, A. M.; STORZS, C. A. Effect of extraction time and temperature on the characteristics of loosely bound pectins from Japanese plum. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 230- 235, 2012.
4. BERGMAN, M.; DJALDETTI, M.; SALMAN, H.; BESSLER, H. Effect of citrus pectin on malign cell proliferation. **Journal of Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 44-47, 2010.
5. CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.
6. CANTERI, M. H.; SCHEER, A.; PETKOWICZ, C.; GINIES, C.; RENARD, C.; WOSIACKI, G. Physicochemical composition of the yellow passion fruit pericarp fractions and respective pectic substances. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 49, n. 3, p.113-122, 2010 a.
7. CANTERI, M. H. G.; SCHEER, A. P.; WOSIACKI, G.; GINIES, C.; REICH, M.; RENARD, C, M. C. G. A Comparative Study of Pectin Extracted from Passion Fruit Rind Flours. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 18, n. 4, 593-599, 2010 b.
8. CANTERI, M. H. G.; SCHEER, A. P.; GINIES, C.; REICH, M.; RENARD, C. M. G. C.; WOSIACKI, G. Rheological and macromolecular quality of pectin extracted with nitric acid from passion fruit rind. **Journal of Food Process Engineering**, v. 35, p. 800-809, 2012 a.

9. CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACK; SHEER, A. de P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Revista Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012 b.
10. CANTERI, M. H. G.; SCHEER, A. P.; GINIES, C.; RENARD, C. M. G. C.; WOSIACKI, G. Importância do tratamento térmico na casca do maracujá para extração de pectin. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, p. 109-120, 2010 c.
11. COURTS, F. L. Profiling of modified citrus pectin oligosaccharide transport across Caco- 2 cell monolayers. **Journal Pharma Nutrition**, v. 1, p. 22-31, 2013.
12. CUI, S.W.; CHANG, Y.H. Emulsifying and structural properties of pectin enzymatically extracted from pumpkin. **LWT- Food Science and Technology**, article in press, 2014. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814002059>>. Acesso em: 13-01-2015.
13. DE OLIVEIRA, L. F.; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. L. do N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá – amarelo (*Passiflora edulis F. Flavicarpa*) para a produção de doce em calda. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259-262. Campinas, 2002.
14. EINHORN-STOOL, U.; KUNZEK, H.; DONGOWSKI, G. Thermal Analysis of Chemically and Mechanically Modified Pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1101—112, 2007.
15. ESPÍRITO-SANTO, A. P.; LAGAZZO, A.; SOUZA, A. L. O. P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. N. Rheology, spontaneous whey separation, microstructure and sensorial characteristics of probiotic yoghurt enriched with passion fruit fiber. **Journal Food Research International**, v. 50 p. 224- 231, 2013.
16. ELLENDERSEN, L.N.; CANTERI, M.H.G.; MARENDIA, F.R.B.; MLYNAECZUCK, B.B.; MASSON, M.L. Brazilian yellow passion fruit juice- characterization and byproducts the fruit ripening. In: ELDER, K. E. **Fruit Juices: Types, Nutricional Composition and Health Benefits**. Nova Science Publishers Inc., p. 143-157, 2014.
17. EUFRÁSIO, M.R.; BARCELOS, M. de F. P.; SOUZA, V. de; ABREU, W. C. de; LIMA, M. A. C.; PEREIRA, M. C. de A. Efeito de diferentes tipos de fibra sobre

- frações lipídicas do sangue e fígado de ratos wistar. **Revista Brasileira de Ciências Agrotecnológicas**, v. 33, n. 6, p. 1608-1614. Lavras, 2009.
18. FAEP - Federação da Agricultura do Estado do Paraná. **Cartilha de Classificação do Maracujá. Comissão Técnica de Agricultura**. Disponível em: <<http://www.faep.com.br/comissoes/frutas/cartilhas/frutas/maracuja.htm>>. Acesso em: 11 de Novembro de 2014.
 19. FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES NATION. Fao Stat Database- Production tonnes World and Prdouctions Quantié. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: 22 de Julho de 2014 a.
 20. FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES NATION. Fao Stat Database- Production tonnes World and Prdouctions Quantité 2011 Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: 22 de Julho de 2014 b.
 21. FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES NATION. Fao Stat Database- Production tonnes Brasil and Prdouctions Quantité 2000. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: 22 de Julho de 2014 c.
 22. FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Fao Stat Database- Production tonnes Brasil and Productions Quantité 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: 22 de Julho de 2014 d.
 23. FAJARDO, A. R.; LOPES, L. C.; PEREIRA, A. G. B.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Polyelectrolyte complexes based on pectin NH₂ and chondroitin sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1950-1955, 2012.
 24. FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do suco de maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101-102, São Paulo, 2004.
 25. FERREIRA, M. de F. P.; PENA R. da S. Estudo da secagem da casca do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 15-28, 2010.
 26. FIETZ, V. R.; SALGADO, J. M. Efeitos da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, Campinas, 1999.

27. FISSORE, E. N.; ROJAS, A. M.; GERSCHENSON, L. N.; WILLIAMS, P. A. Butternut and beetroot pectins: Characterization and functional properties. **Food Hydrocolloids**, v. 31, p. 172- 182, 2013.
28. FREITAS, S. C.; SILVA, T. dos S.; CARVALHO, P. G. B. de; TUPINAMBÁ, D. D.; KOAKUZU, S. N.; CARVALHO, V. A. MOURA, H. F. C. **Procedimento Operacional Padrão para Determinação de Fibras Solúveis e Insolúveis**. EMBRAPA. Documentos 94. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasil, 2008.
29. FUKUMORI, T.; KANAYAMA, H.; RAZ, A. The role of galectin-3 in cancer drug resistance. **Journal Drug Resistance Updates**, v. 10, p. 101-108, 2007.
30. GALANT, A. L.; WIDMER, W. W.; LUZIO, G. A.; CAMERON, R. G. Characterization of molecular structural changes in pectin during juice cloud destabilization in frozen concentrated orange juice. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 10-18, 2014.
31. GLINSKI, V. V.; RAZ, A. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. **Journal Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1788-1791, 2009.
32. GOPI, D.; KANIMOZHI, K.; BHUVANESHWARI, N.; INDIRA, J.; KAVITHA, L. Novel banana peel pectin mediated green route for the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles and their spectral characterization. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 589-597, 2014.
33. GUO, X.; HAN, D.; XI, H.; RAO, L.; LIAO, X.; HU, X.; WU, J. Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 441-448, 2012.
34. GUO, X.; ZHAO, W.; PANG, X.; LIAO, X.; HU, X. Emulsion stabilizing properties of pectin extracted by high hydrostatic pressure, high-speed shearing homogenization and traditional thermal methods: A comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 217-225, 2014.
35. HAO, M.; YUAN, X.; CHENG, H.; ZHANG, T.; ZHOU, Y.; TAI, G. Comparative studies on the anti-tumor activities of high temperature and pH modified citrus pectins. **Food & Function**. v. 4, p. 960-971, 2013.
36. HOUBEN, K.; JOLIE, R. H.; FRAEYE, I.; LOEY, A. M. V.; HENDRICKX, M. E. Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato:

- Structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 1105- 1111, 2011.
37. HOSSEIN, G.; KESHAVERZ, M.; AHMADI, S.; NADERI, N. Synergistic effects of pectasol-C modified citrus pectin an inhibitor of galectin-3 and paclitaxel on apoptosis human SKOV-3 ovarian cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v 24, p. 7561-7568, 2013.
 38. IAL (Instituto Adolfo Lutz). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Edição IV, 2008.
 39. INRA-INSTITUTE NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. UMR 408. **Dosage du méthanol par GC/MS**. Avignon: Protocolo de atividade prática fornecido em 15 de Abril de 2014a.
 40. INRA-INSTITUTE NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. UMR 408. **Dosage acide galacturonique par colorimétrie-01**. Avignon: Protocolo de atividade prática fornecido em 14 de Abril de 2014b.
 41. INRA-INSTITUTE NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. UMR 408. **Dosage des oses neutres par la méthode des acétates d'alditols**. Avignon: Protocolo de atividade prática fornecido em 28 de Maio de 2014c.
 42. JANEIRO, D. I.; QUEIROZ, M. do S. R. de; RAMOS, A. T.; SABAA-SRUR, A. U. O.; CUNHA, M. A. L da; DINIZ, M. F. F. M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 18, p. 724-732, 2008.
 43. JEONG, H-S.; KIM, H-Y.; AHN, S.H.; HEE, S.; OH, S.C.; YANG, I.; CHOI, I-G. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for extraction of pectin from rapeseed cake (*Brassica napus* L.) using commercial enzymes. **Food Chemistry**. v.157, p. 332–338, 2014.
 44. JING-EN, L.; STEVE, W. C.; SHAO-PING, N.; MING.-YONG, X. Structure and biological activities of a pectin polysaccharides from *Mosla chinensis* Maxim. cv. Jiangxiangru. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 276-284, 2014.
 45. JUNG, J.; ARNOLD, R. D.; WICKER, L. Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon targeted drug delivery carrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 116-121, 2013.
 46. KLIEMANN, E. **Extração e caracterização da pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*)**. Dissertação do Programa de Pós

Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

47. KLIEMANN, E.; SIMAS, K. N. de; AMANTE, E. R.; PRUDÊNCIO, E. S.; TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; AMBONI, R. D. M. C. Optimization of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology. **International Journal of Food Science Technology**, v. 44, p. 476-483, 2009.
48. KOUBALA, B.B.; MBONE, L. I.; KANSCI, G.; MBIAPO, F. T.; CREPEAU, M.-J.; THIBAUT, J.-F.; RALET, M.-C. Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondia cytherea*) obtained using different extraction conditions. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1202-1207, 2008 a.
49. KOUBALA, B.B.; KANSCI, G.; MBONE, L.I.; CRÉPEAU, M.-J.; THIBAUT, J. -M; RALET, M.-C. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectin from “Améliorée” and “Mango” mango peels. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1345-1351, 2008 b.
50. KULKARNI, S. G.; VIJAYANAND, P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa L.*). **Journal LWT Food Science and Technology**, v. 43, p. 1026-1031, 2010.
51. LECLERE, L.; CUTSEM, P.V.; MICHIELS, C. Anticancer activities of pH- or heat modified pectin, **Frontiers Pharmacology**, v.4, n. 128, p 1- 8, 2013.
52. LIMA, M.S.; PAIVA, E. P.; ANDRADE, S. A. C.; PAIXÃO, J. A. Fruit pectins – A suitable tool for screening gelling properties using infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 1-7, 2010.
53. LIN I.; CAO, J.; HUANG, J.; CAI, Y.; YAO, J. Extraction of pectins with different degree of esterification from mulberry branch bark. **Bioreosource Technology**, v. 101, p. 3268-3273, 2010.
54. LIRA-ORTIZ, A. L.; RESENDIS-VEJA, F.; RÍOZ-LEAL, E.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; VARGAS-TORRES, A; RODRIGUES-HERNÁNDEZ, A. I. Pectins from waste of prickly pear fruit (*Opuntia albicarpa* Scheinvar ‘Reyna’): Chemical and reological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 93-99, 2014.
55. MA, S.; WANG, Z. – H. Pulsed electric field-assisted modification of pectin from sugar beet pulp. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1700-1704, 2013.

56. MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, p. 703- 709, 2013.
57. MARAN, J.P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p. 786– 791, 2014.
58. MAXWELL, E. G.; BELSHAW, N.J.; WALDRON, K. W. MORRIS, V. J. Pectin- An emerging new bioactive food polysaccharide. **Journal Trends in Food Science & Technology**, v. 24, p. 64-73, 2012.
59. MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, p. 83-91, 2011.
60. MINJARES-FUENTES, R.; FEMENIA, A.; GARAU, M. C.; MEZA-VELÁZQUEZ, J. A.; SIMAL, S.; ROSSELLÓ, C. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 179-189, 2014.
61. MIYADA, T.; NAKAJIMA, A.; EBIHARA, K. Iron bound to pectin is utilized by rats. **British Journal Nutrition**, n. 103, p. 73-78, 2011.
62. MORRIS, V.J.; BELSHAW, N.J.; WALDRON, K. N.; MAXWELLE, E. G. The bioactive of modified pectin fragments. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibers**, v. I p. 21-37, 2013.
63. MORRIS, G. A.; RALET, M.-C. A copolymer analysis approach to estimate of neutral sugar distribution of sugar beet pectin using of size exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1139-1143, 2012.
64. MOSMMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
65. MUHAMMAD, K.; ZAHARI N. I. M.; GANNASIN, S. P.; ADZAHAN, N. M.; BAKAR, J. High metoxyl pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel. **Food Hydrocolloids**, p. 1-9, 2014.
66. NASCIMENTO, T. A.; CALADO, V.; CARVALHO, C. W. P. Development and characterization of flexible film based on starch and passion fruit mesocarp flour with nanoparticles. **Journal Food Research International**, v. 49, p. 588-595, 2012.

67. NORREN, K.; DIJK, F. J.; LAND, B.; GARSSSEN, J.; VRIESEMA, A.; BERKHOUT, B.; JEENINGA, R. E. Pectin derived acid oligosaccharides inhibit NF κ B – mediated HIV-1 production *in vitro*. **Journal Nutricional and Chronic Diseases II**, outstanding abstract, n. P272, p. 139, 2009.
68. NUNES, C. S.; BAPTISTA, A. O. Implicações da reação de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 53-59, 2001.
69. OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P. C. do N.; RUBACK, V.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259-262, 2002.
70. OTONI, C.G; MOURA, M. R. de; AOUDA, F. A.; CAMILLOTO, G. P.; CRUZ, R. S.; LOREVICE, M.V.; SOARES, N. F.F. de; MATTOSO, L.H.C. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/ cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 188-194, 2014.
71. PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K. A.; KORTSARIS, H. A. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, n.208, p. 151-158, 1997.
72. PLATT, D. Modified pectin. **United States Patent** (US) 02459. Estados Unidos, 2009.
73. PITA, J. da S. L. **Caracterização físico-química e nutricional da polpa e farinha da casca do maracujazeiro do mato e amarelo**. Dissertação do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012.
74. POPOV, S. V.; MARCOV, P. A.; POPOVA, G. Y.; NIKITINA, I. R.; EFIMOVA, L.; OVODOVI, Y. S. Anti-inflammatory activity of low and hightmethoxylated citrus pectins. **Journal Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, p. 59-63, 2013.
75. PTICHKINAA, N. M.; MARKINAA, O. A.; RUMYANTSEVAB, G. N. Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 192-195 2008.
76. POSE, S.; KIRBY, A. R.; MERCADO, J. A.; MORRIS, V. J.; QUESADA, M. A. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 882- 890, 2012.

77. RAMACHANDAN, C.; WILK, B. J.; HOTCHKISS, A.; CHAU, H.; ELIAZ, I.; MELNICK, S. J. Activation of human T-helper/ inducer cell T-cytotoxic cell, B-cell, and natural killer (NK) – cell and induction of natural killer cell activity against K562 chronic myeloid leukemia cells with modified citrus pectin. **Journal BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 11, n. 59, p. 1-9, 2011.
78. RAMOS, A. T.; CUNHA, M. A. L.; SABAA-SRUR, A. U. O.; PIRES, V. C. F.; CARDOSO, M. A. A.; DINIZ, M. de F. M.; MEDEIROS, C. C. M. Uso da *Passiflora edulis f. flavicarpa* na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 17, n. 4, p. 592-597, 2007.
79. RIBAS-AGUSTÍ, A.; BUGGENHOUT, S. V.; PALMERO, P.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Investigating the role of pectin in carrot cell wall changes during thermal processing: A microscopic approach. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, article in press, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856413001434>>. Acesso em: 15-01-2015.
80. RIBBLE, D. et al. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**, v. 5, n.12, p. 1-7, 2005.
81. RUBIO-SENET, F.; RODRÍGUES-GUTIÉRREZ, G.; LAMA-MUÑOZ, A.; FERNANDES-BOLAÑOS, J. Pectin extract from thermally treated olive oil by-products: Characterization, physico-chemical properties, *in vitro* bile acid and glucose binding. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 311-321, 2015.
82. RUI-HONG, L.; JUN, C.; WEI, L. CHENG-ME, L. WEN, Y.; MIN, Y.; XIAO-QING, Z. Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*Ficus pumila* Linn.) seeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 76-83, 2012.
83. SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, Pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in applied microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.
84. SANTO, A. P. DO E.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. N. Influence of milk type in addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. **LWT- Food Science and Technology**, v. 47, 393 – 399, 2012.
85. SEIXAS, F. L.; FUKUDA, D. L.; TURBIANI, F. R.B.; GARCIA, P. S.; PETKOWICZ, C. L. de O.; JAGADEVAN, S.; GIMENES, M. L. Extraction of pectin from passion

- fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 186-192, 2014.
86. SERGUNCHENKO, I.; KOLENCHENKO, E.; KHOTIMCHENKO, M. Low esterified pectin accelerates removal of lead ions in rats. **Nutricional Research**, v. 27, p. 633-637, 2007.
 87. SHERRY, L.C.; KIM, S. S.; DILGER, R. N.; BAUER, L. L.; MOON, M. L.; TAPPING, R. I.; FAHEY JR., G. C.; TAPPEDEN, K. A.; FREUND, G. C. Sickness behavior induced by endotoxin can be mitigated by the dietary soluble fiber, pectin, through up-relations of IL-4 and Th2 polarization. **Journal Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, p. 631-640, 2010.
 88. SIEW-YIN, C.; WEE-SIM, C. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3152- 3758, 2013.
 89. SILVA, D. C.; FREITAS, A. L. P.; BARROS, F. C. N.; LINS, K. O. A. L.; ALVES, A. P. P. N.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. de; COSTA-LOTUFO, L. V.; FEITOSA, J. P.A.; MACIEL, J. S.; PAULA, R. C. M. de. Polyssacharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Journal Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 139-145, 2012.
 90. SILVA, I.Q. da; OLIVEIRA, B. C. F. de; LOPES, A. S.; PENA, R. da S. Obtenção de barra de cereais adicionada do resíduo industrial de maracujá. **Revista Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 2, p. 321- 329. Araraquara, 2009.
 91. SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. S.; Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Journal Methods in Enzimology**, v.299, p.152-178, 1999.
 92. SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 20-24, 1972.
 93. SRIAMORNSAK, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. **Silpakorn University International Journal**, v. 3, p. 206-228, 2003.
 94. STAPLES, M.; ROLKE, J. Modified pectins, composition and methods related thereto. **United States Patent (US)** 8,420,133 B2, 2013.
 95. SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. **Assay for Bioactivity in Methods in Plant Biochemistry**. HOSTETTMANN, K. London Academic Press, 1991.

96. THIBAULT, J. F., SAULNIER, L., AXELOS, M. A. V; RENARD, C. M. G. C. Difficultés expérimentales de l'étude des macromolécules pectiques. **Bulletin de la Société Botanique Française**, n. 314, p. 319-337, 1991.
97. TUOPING, L. SUHONG, L.; YINPING, D.; RUGANG, Z.; YONGHUI, L. Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglycerides synthesis in mice fed with a high-fat-diet. **Food Chemistry**, v. 145, p. 335-341, 2014.
98. ÜNAL, M.U.; BELLUR, E. Extraction and characterization of pectin methylesterase from black carrot (*Daucus carota L.*). **Food Chemistry**, v. 116, p. 836-840, 2009.
99. VINCKEN, J.-P., SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J. F. J.; MCCANN, M. C.; ULVSKOV, P., VORAGEN, A. G. J.; VISSER, R. G. S. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1781-1789, 2003.
100. VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G.-J.; VERHORF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263- 275, 2009.
101. VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Highly acetylated pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao L.*) forms gel. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p.58-65, 2013.
102. YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow passion fruit rind- a potencial source of low-methoxyl pectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2738-2744, 2006.
103. YAPO, B. M.; LEROUGE, P.; THIBAULT, J. F.; RALET, M. C. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonas homogeneous with respect to molar mass rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. **Journal Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 426-435, 2007.
104. YAPO, B. M. Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-products as compared with commercial citric acid extractant. **Journal Bioresource Technology**, v. 100, p. 3147-3151, 2009.
105. YAPO, M. B. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectin – A new hypothetical model. **Journal Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 373-385, 2011.

106. WALDEKER, M.; KAUTENBURGER, T.; DAUMMAN, H.; VEERIAH, S.; WILL, F.; DIETRICH, H.; POOL-ZOBEL, B. L.; SCHRENK, D. **Journal Nutrition**, v. 24, p. 366- 374, 2008.
107. 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.
108. WICKER, L.; KIM, Y.; KIM, M.-J.; THIRKIELD, B.; LIN, Z.; JUNG, J. Pectin as a bioactive polysaccharides – Extracting tailored function from less. **Food Hydrocolloids**, article in press, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1400006X>>. Acesso em: 18-01-2015.
109. WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Journal Trend in Food Science & Technology** v. 17, p. 97-104, 2006.
110. ZHOU, L.; WANG, Y.; LIU, F.; BI, X.; LIAO, X. Effect of high pressure carbon dioxide on the properties of water soluble pectin in peach juice. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 173-181, 2014.
111. ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources; A review of recent research. **Journal Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1395-1410, 2012.