

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Heloisa Cristina Ramos Fertoni

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE EXTRAÇÃO ÁCIDA
DE PECTINA DE BAGAÇO DE MAÇÃ.**

Dissertação apresentada como um dos requisitos
para a obtenção do título de mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Gilvan Wosiacki
Co-orientadora: Dra. Eliana Beleski Borba
Carneiro

PONTA GROSSA
2006

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gilvan Wosiacki, pelo incentivo, dedicação, confiança, apoio e aprendizado que não só contribuiu com a ciência, como também com o exemplo de respeito, ética e seriedade que conduz seus trabalhos.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Eliana Beleski Borba Carneiro, pela atenção, colaboração e pelas correções finais da dissertação.

Ao Prof. Dr. Ivo, pela amizade, confiança e concessão de seu laboratório e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Borba Carneiro pela disponibilidade do seu equipamento e suporte técnico com as análises de espectroscopia.

Ao Prof. Dr. Alessandro Nogueira, pela colaboração com o processamento das maçãs, orientação com a fabricação do suco e do vinho, e pela gentileza no empréstimo do material bibliográfico.

À Prof. Maria Helene Canteri Schemin, pela paciência, orientação, dedicação, pela grande amizade e aprendizado.

À minha tia e professora de metodologia de pesquisa, Maria Etelvina Madalozzo Ramos, pela orientação recebida na utilização das normas para apresentação de trabalho científico, pelo imenso apoio, entusiasmo, carinho, dedicação, amizade e paciência.

A Dianne, Denise e Rita pela paciência e ajuda com as análises físico-químicas e pelos momentos de descontração e harmonia.

À minhas amigas, Belinda, Krischina, Luciana e Maria Carolina, pela amizade, companheirismo, apoio e convivência sempre tão alegre e indispensável.

À Ardalla, pela colaboração com as análises de espectroscopia e titulometria e amizade.

À minha família, sem a qual não teria chegado até aqui e conquistado tantos objetivos, sempre me apoiaram e incentivaram em todas as minhas decisões com carinho, muito amor e paciência.

RESUMO

O processamento de suco concentrado de maçã pode acarretar a disponibilidade de 20 a 40% da matéria-prima sob a forma de resíduo agroindustrial, o bagaço, que pode ser usado como matéria-prima para a obtenção de compostos de alto valor. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um procedimento de extração ácida de pectina a partir do bagaço de maçã. O bagaço foi obtido em nível de laboratório e desidratado em estufa. Foram feitos ensaios com 7 ácidos em diferentes concentrações de 1 a 750 mM, temperatura 97° C por 10 min, para verificar o efeito sobre a reação de extração. Com o ácido mais adequado, foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 axial com repetições no ponto central para estabelecer o efeito da sua concentração e do tempo, a 97° C, sobre o rendimento e a esterificação da pectina. Os modelos foram analisados estatisticamente com relação à regressão e a falta de ajuste. A fração de pectina obtida no ensaio central do experimento foi comparada com amostras comerciais de pectina de alto e baixo grau de esterificação em termos titulométricos, espectroscópicos (FT-IR), cromatografia de exclusão em gel e em relação ao seu conteúdo de açúcares neutros por cromatografia gasosa. As reações de extração evidenciaram a diferença entre os ácidos nítrico, clorídrico, succínico e láctico, com rendimento crescente até 100 mM, e os ácidos tricloroacético, málico e cítrico, com rendimento crescente até 750 mM chegando a valores superiores aos teores existentes de pectina. O ácido nítrico foi o que apresentou resultados mais coerentes e a reação de extração com 10 g de bagaço de maçã apresentou maior praticidade em comparação com 5g ou 25g embora os rendimentos tenham sido todos iguais ($R^2 = 0,9978$). O modelo de extração ácida de pectina foi estatisticamente significativo ($R^2 = 0,9834$) e demonstra que a 126 mM durante 14 min deve haver um rendimento máximo de 20,07 g. O mesmo experimento definiu o modelo estatisticamente significativo ($R^2 = 0,9796$) que demonstrou o grau de esterificação mínimo de 43,73% de pectinas extraídas a 200 mM durante 10 min. A amostra de pectina experimental (10 min, 100mM, 97°C) foi similar à comercial de baixo grau de esterificação tanto por titulometria quanto por espectroscopia FTIR, apresentou semelhante perfil de exclusão estérica e grau de inserção de ramnose na cadeia principal. Os resultados sugerem o uso do modelo em condições ainda mais brandas que as do ensaio central para a obtenção de pectinas de baixo grau de esterificação com menores possibilidades de danos estruturais.

Palavras-chave: pectinas, bagaço de maçã, rendimento, grau de esterificação

ABSTRACT

Apple juice processing may produce around 20-40% of the raw material as a by-product known as pomace, which could be useful as natural source of many high value compounds. The objective of this work was to establish a procedure of acid extraction of pectin from such industrial by-product. Apple pomace, obtained in laboratory scale, was dried to decrease its chemical and microbiological instability. With essays at 97°C/10min seven acids were tested (1-750 mM) in what concerns their effects on pectin yield and best acid was identified. Pectin was extracted according to a experimental design factorial 22 axial with repetitions at the central essay considering the effects of HNO₃ concentration and time. The resulting model was analyzed in what concerns regression and lack of fit. The pectin fraction obtained at the central essay was compared to commercial samples of low and high methoxyl pectin with titrimetry and spectroscopic FTIR techniques as well as by size exclusion chromatography and neutral sugar composition. The extraction reactions showed the difference of the nitric, hydrochloric, succinic and lactic acids, which an increasing yield up to 100 mM from the trichloroacetic, malic and citric acids, with an increasing yield up to 750 mM, reaching higher levels than possible. Nitric acid was the selected and the reaction containing 10 g of apple pomace gave better results than that with 5 or 25 although he yields were all the same ($R^2=$). The model was statistically significant concerning gravimetric yield ($R^2=0.9834$) and predicts that at 126 mM and during 14 min it will be reached a maximum yield of 20.07 g/100g. The same experiment established the model statistically significant ($R^2=0.9888$) which predicts the minimum degree of esterification of 43,73% in extracted pectin at 200 mM during 10 min. The experimental sample of pectin (10 min, 100mM, 97°C) was similar to the commercial low methoxyl pectin both by titrimetric techniques as well as spectroscopic FTIR, and showed a similar HPSEC profile and rhamnose insertion frequency in main acid chain. The results suggest the utilization of the model in conditions even milder than that of the central essay for obtaining low methoxyl pectin with less possibility of structural damage.

Palavras-chave: pectin, apple pomace, yield, degree of esterification.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AUA	Ácido anidro galacturônico
Ara	Arabinose
Ca ⁺²	Cálcio
cv	Cultivar
CSDN	Carboidratos solúveis em detergente neutro
CIT	Ácido cítrico
DE	Grau de esterificação
DA	Grau de acetilação
FDA	Fibra por detergente ácido
FDN	Fibra por detergente neutro
FSDN	Fibra solúvel em detergente neutro
FID	Detector de ionização de chama
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformador de Fourier
Fuc	Fucose
GalA	Ácido galacturônico
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GLC	Cromatografia Líquido-gasosa
GTM	Grupo de trabalho sobre maçã
HCl	Ácido clorídrico
HG	Homogalacturonana
HMP	Pectina de alto grau de esterificação
HNO ₃	Ácido nítrico
HPSEC-MALLS	Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
IR	Índice de refração
LAC	Ácido láctico
LMP	Pectina de baixo grau de esterificação
LS	Espalhamento de luz
MAL	Ácido málico
MALLS	Espalhamento de luz em multiângulos
mM	Milimolar
mEq	Miliequivalente
MeO	Teor de Metoxilação
R ²	Coeficiente de regressão
RG-I	Ramnogalacturonana do tipo I
RG-II	Ramnogalacturonana do tipo II
SUC	Ácido succínico
Rha	Ramnose
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Maçãs cv Joaquina, ilustrando a diferença entre a fruta industrial, a menor, das comerciais.	16
Figura 2	Farinha de bagaço de maçã após secagem em estufa..	18
Figura 3	Ilustração sobre a composição das células vegetais.	19
Figura 4	Ilustração de uma célula vegetal.	20
Figura 5	Estrutura química da cadeia de pectina em forma de cadeira.	25
Figura 6	Estrutura dos dois dímeros formados por ácido galacturônico e ramnose, mostrando as ligações α -(1 à 2), α -(1 à 4) e α -(1 à 2) respectivamente.	26
Figura 7	Estrutura convencional de pectina (A), nova proposta dos autores (B).	28
Figura 8	Fluxograma do beneficiamento do bagaço de maçã.	37
Figura 9	Fluxograma de extração de pectinas de bagaço de maçã desidratado.	38
Figura 10	Bagaço de maçã desidratado em pó.	44
Figura 11	Rendimento gravimétrico de obtenção das substâncias pécicas com os ácidos nítrico, clorídrico, succínico e lático no gráfico A e com os ácidos tricloroacético, cítrico e málico no gráfico B, de 1 a 750 mM.	47
Figura 12	Rendimento gravimétrico de obtenção das substâncias pécicas com os ácidos diluídos nítrico, clorídrico, succínico e lático no gráfico A e com os ácidos tricloroacético, cítrico e málico no gráfico B, de 1 a 100 mM.	48

Figura 13	Linhas de tendência do rendimento gravimétrico de obtenção das substâncias pécnicas com os ácidos diluídos nítrico, clorídrico, succínico e láctico no gráfico A e com os ácidos tricloroacético, cítrico e málico no gráfico B, de 1 a 100 mM.	49
Figura 14	Quantidade de substâncias pécnicas extraídas com diferentes ácidos a 100 mM.	50
Figura 15	Relacionamento entre a matéria prima e as substâncias pécnicas extraída HNO ₃ 100 mM /10min, 97°C.	52
Figura 16	A influência da concentração de ácido e do tempo sobre o rendimento gravimétrico do processo de extração de substâncias pécnicas ilustradas (A) por superfície de resposta e (B) por curvas de nível.	54
Figura 17	A influência da concentração de ácido e do tempo sobre a qualidade do produto ilustrada (A) por superfície de resposta e (B) por curvas de nível.	57
Figura 18	Características de qualidade físico-química de pectinas.	61
Figura 19	Caracterização espectroscópicas FT-IR das substâncias pécnicas extraídas cc Ácido nítrico (100 mM; 10 min; 97°C) a partir de 5 g/200 g (A); 10 g/400g (B) e 25 g/1000g (C).	63
Figura 20	Espectroscopia de infravermelho das amostras experimental (A) e comerciais (B) e (C).	64
Figura 21	Cromatogramas em HPSEC-MALLS das amostras de pectina comercial (A) HMP e (B) LMP e (C) amostra experimental = HNO ₃ , 100 mM, 10 min, 97°C.	66
Figura 22	Proporção dos ácidos urônicos e da somatória dos açúcares galactose e arabinose por unidade de ramnose.	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Teor de pectinas em frutas	23
TABELA 2	Domínio do planejamento experimental	43
TABELA 3	Ensaio do planejamento experimental	43
TABELA 4	Qualidade físico-química de amostra de bagaço de maçã cv Joaquina	44
TABELA 5	Influência de ácidos no rendimento gravimétrico.	46
TABELA 6	Listagem das equações das curvas de tendências e seu coeficiente de correlação	49
TABELA 7	Influência da quantidade de matéria-prima no rendimento gravimétrico	51
TABELA 8	Resultados do modelo do rendimento gravimétrico	53
TABELA 9	Os coeficientes do modelo de extração ácida de pectina	53
TABELA 10	Análise da variância	54
TABELA 11	Resultados do modelo em grau de esterificação	55
TABELA 12	Os coeficientes do modelo em grau de esterificação	56
TABELA 13	Análise da variância do modelo em grau de esterificação	56
TABELA 14	Valores preditos em coordenadas específicas	58

TABELA 15	Característica titulométrica das pectinas experimental e comerciais	60
TABELA 16	Tempo de retenção de pectinas em minutos	65
TABELA 17	Identificação dos açúcares neutros pela mobilidade cromatográfica(GLC).	68
TABELA 18	Identificação dos açúcares neutros pela composição dos fragmentos obtidos em espectrógrafo de massa	69
TABELA 19	Proporção relativa de açúcares neutros identificados nas amostras	69
TABELA 20	Proporção relativa dos açúcares neutros e ácidos	70
TABELA 21	Relações entre os açúcares das cadeia principal e das cadeias laterais	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 A PRODUÇÃO DE MAÇÃS	14
2.2 PAREDE CELULAR EM TECIDOS VEGETAIS	19
2.3 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS	21
2.3.1 Estrutura da pectina	24
2.3.2 Extração	29
2.3.3 Aplicação	30
3 OBJETIVO	35
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 MATERIAL	36
4.2 MÉTODOS	36
4.2.1 Os processos	36
4.2.1.1 Obtenção do bagaço	36
4.2.1.2 Extração ácida	37
4.2.1.3 Isolamento da pectina	38
4.2.2 Análises	39
4.2.2.1 Análises Físico-químicas	39
4.2.2.2 Análises estatísticas	39
4.2.2.3 Análises Espectroscópicas	40
4.2.2.4 Análises Cromatográficas	40
4.2.2.5 Análises Titulométricas	41
4.2.3 Experimentos	42
4.2.3.1 Efeitos dos diferentes ácidos	42
4.2.3.2 Planejamento experimental	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 CARACTERÍSTICAS DO BAGAÇO DESIDRATADO DE MAÇÃ	44
5.2 EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA EXTRAÇÃO DE PECTINA	46
5.2.1 Estabelecimento da quantidade de matéria prima no sistema experimental	51
5.3 MODELO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E DA QUALIDADE DO PRODUTO	52
5.3.1 Rendimento gravimétrico do processo de extração	53
5.3.2 Grau de esterificação	55
5.4 CARACTERÍSTICAS DA QUALIDADE DA PECTINA EXPERIMENTAL E COMERCIAIS	59
5.4.1 Característica de qualidade titulométrica	59
5.4.2 Característica da qualidade de espectroscópica de infravermelho (FT-IR)	61
5.4.3 Característica de qualidade cromatográfica	65
5.4.3.1 Cromatografia de exclusão estérica (HPSEC MALLS)	65
5.4.3.2 Composição em monossacarídeos (GLC)	67

6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE	79

ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE EXTRAÇÃO ÁCIDA DE PECTINA DE BAGAÇO DE MAÇÃ.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de maçãs na Região Sul do País foi implantado no início da década de 1970, após tentativas de plantio em outras regiões, como no Sudeste e Centro-Oeste brasileiro. Foi notável o desenvolvimento da cultura nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, em algumas regiões com climas mais adequados, com características mais próximas das de zonas temperadas. Em cerca de 30 anos o Brasil tornou-se auto-suficiente na produção e abastecimento de maçã, dando início aos processos de exportação de fruta *in natura*. A evolução da cultura posicionou o país como 13º maior produtor mundial, com nível de 1000 toneladas métricas anuais.

Como a maçã produzida no Brasil foi programada para atender consumidores de frutas *in natura* isto acarretou o desenvolvimento de um processo de beneficiamento altamente rigoroso, com demanda de equipamentos automatizados, aumento de área de armazenagem com atmosfera controlada e profissionais especializados, criando empregos e impulsionando o desenvolvimento sócio-econômico.

As maçãs desqualificadas para o comércio passaram a ser industrializadas, com a produção de sucos concentrados e de fermentados, matéria-prima para o beneficiamento da sidra, bem como a obtenção de vinagres e aguardentes, em menor escala. Com a industrialização, apesar das vantagens relativas aos novos produtos, inclusive com atividades de exportação, surgiram os resíduos e sub-produtos, dentre os quais o economicamente mais importante é o bagaço de maçã, que pode representar de 30 a 40% da matéria-prima, dependendo do nível de tecnologia empregado.

De acordo com as informações divulgadas pelo Grupo de Trabalho sobre Maçã - GTM (www.pitangui.uepg.br/gtm) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, o bagaço contém todas as partes da fruta, como por exemplo, cascas, sementes, centro do fruto, polpa, incluindo células com parede celular intacta. Dentre os constituintes da maçã, são encontrados no bagaço açúcares solúveis, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, constituintes do aroma e fibras incluindo celulosas, hemicelulosas e pectinas.

A condição atual da produção de maçãs no Brasil faz com que seja necessário um avanço no processo de industrialização e é conhecido o fato de que as variedades Fuji e Gala não são especialmente adequadas para esta finalidade. Algumas das variedades que estão sendo desenvolvidas apresentam características que favorecem o seu processamento, como o cultivar (cv) Joaquina, da qual pode ser extraído o suco e feito o vinho, de boa qualidade, gerando o bagaço a ser valorizado.

O bagaço de maçã pode ser visto não como um resíduo ou um subproduto, mas sim como uma matéria-prima para a extração de pectina. As substâncias pécticas, presentes na maioria das frutas e vegetais, mas em maior proporção no albedo das frutas cítricas e no bagaço de maçã, podem ser extraídas por diferentes métodos com ácidos, álcalis ou enzimas, constituindo-se em um conhecimento de domínio industrial de difícil acesso. Portanto, a fim de colher subsídios para aproveitamento do bagaço de maçã no Brasil há necessidade de que sejam estabelecidas às condições de extração com tipos e concentrações de ácidos, de tempo e de temperatura levando em consideração a quantidade do rendimento e a qualidade da pectina comparativamente com amostras comerciais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A PRODUÇÃO DE MAÇÃS

Com o desenvolvimento da cultura no Sul do Estado do Paraná, na região central de Santa Catarina e na serra gaúcha (WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000), a produção passou de 543 mil toneladas métricas em 1990 para 978 toneladas métricas em 2004 (WORLD..., 2005). Em 1990, a área ocupada por pomares comerciais era de 22 938 mil hectares enquanto que em 2004, 32 931 mil hectares, representando um aumento de 43%. Estes resultados colocam o Brasil como um dos 15 maiores produtores de maçãs (WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000; WORLD..., 2005).

Os pomares comerciais brasileiros, mesmo os mais recentemente instalados, continuam com aspectos peculiares de produzir maçãs para consumo *in natura*, sendo que as principais cultivares são a Fuji (43%), Gala (46%) e a Golden delicious (6%); todas as demais variedades representam não mais do que 3% da produção total (WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000). Estes números refletem a exigência do consumidor altamente criterioso na aceitação de maçã de mesa evidenciando que a Golden delicious não apresenta qualidade que o satisfaça, principalmente em termos de aparência. A Gala e a Fuji, que no Brasil representam 89% da produção de maçãs, são classificadas em 3º e 4º lugar em termos quantitativos mundiais, perdendo apenas para Golden delicious e a Delicious (WORLD..., 2005).

Estas frutas produzidas para consumo *in natura* não necessariamente apresentam as qualidades requeridas para processamento industrial, em especial os altos teores de ácido málico. Outras variedades cultivadas podem, entretanto, em função de seus elevados teores de ácido málico e compostos fenólicos, ser usadas para corrigir os

produtos do processamento da Gala e da Fuji. (WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000).

A cultura de maçã no Brasil, praticamente bivarietal e fundamentada nos cv Fuji e Gala, atualmente supridas por muitos outros países produtores, não apresenta mais vantagens do ponto de vista econômico e novas variedades devem ser desenvolvidas no sentido de suprir o mercado com ofertas competitivas (WORLD..., 2006).

Os pomares mais recentes já contêm novas variedades de maçãs escolhidas entre aquelas resistentes às doenças de verão causadas por sarna (*Venturia inaequalis*), oídio (*Podosphaera leucotricha*) e bitter pit (*Glomerella cingulata*) que, se não forem tratadas adequadamente, podem acarretar a perda total da produção (WOSIACKI et al.; 2002). Assim surgiram as variedades comerciais Baronesa, Catarina, Condessa, Daiane, Duquesa, Fred hough, Fuji suprema, Imperatriz, Lisgala, Primicia e Princesa, mais resistentes requerendo menos cuidados técnicos e gastos com defensivos agrícolas.

O cultivar Joaquina (Figura 1), lançado durante a Festa Nacional da Maçã em São Joaquim, em 2002, é uma nova espécie desenvolvida para atuar nos pomares como polinizadora de outra variedade, a Catarina. Essa variedade passou a estar disponível aos produtores a partir de 2003 integrando os pomares da região, sendo resistente geneticamente à sarna permitindo reduzir em 70% o uso dos fungicidas e diminuindo o custo de produção (PEREIRA, et al., 2002).

Sua avaliação tecnológica identificou que tem todas as características de uma fruta comercial doce-amarga como a Fuji e a Gala, sem diferenças em suas composições físico-químicas, podendo ser usada com parcimônia no processamento do suco e com segurança na produção de vinho (FERTONANI, et al., 2006).



Figura 1 - Maçãs cv Joaquina, ilustrando a diferença entre a fruta industrial, a menor, das comerciais.

A previsão da produção para o ano de 2006 era de 1.050 mil toneladas de maçãs, 735 mil ton (70%) destinadas ao abastecimento do mercado doméstico, 105 mil ton (10%), o processo de exportação com frutas de alta qualidade e 210 mil ton (20%), para frutas destinadas ao processamento industrial (WOSIACKI et al.; 2002).

Por outro lado, considera-se, que as frutas destinadas ao processamento industrial correspondem a 30% da produção, sendo que 10% constituem as frutas com problemas fitossanitários e 20% as frutas industriais propriamente ditas. As frutas com problemas fitossanitários estão sendo destinadas indevidamente para a fabricação de sidra, ou vinagre e destilados (PAGANINI et al., 2004), embora a toxina formada por

bolores seja eliminada pelas leveduras do gênero *Saccharomyces* durante o processo fermentativo.

As frutas denominadas industriais (20%) apresentam formato inadequado, tamanho pequeno, cicatrizes provenientes do ataque de insetos e de pássaros, ou de granizos, ferimentos resultantes de tratos culturais e transporte inadequado, com má distribuição de coloração, características que as tornam sem valor comercial. Mas, apresentam a mesma composição físico-química das frutas comerciais e, portanto, podem ser destinadas à produção de suco, agregando valor e possibilitando a oferta de um produto nobre ao longo do ano (PAGANINI et al., 2004; WOSIACKI, et al., 1992).

O processamento destas frutas leva também à produção do bagaço, que pode representar de 20 a 40% da quantidade total de maçã processada. É constituído de cascas e polpas (94,5%), sementes (4,4%) e centro do fruto (1%), contendo 80% de umidade, 5% de fibras (31% de celulose, 15% de lignina, 12% de hemicelulose e 9% de pectina insolúvel em água) e 14% de sólidos solúveis correspondendo a glucose, frutose e sacarose. Pode ser aproveitado para a extração de enzimas, de constituintes de aromas, de pectinas, além de ser útil na formação de meios de cultura para produção de cogumelos comestíveis, e de ácido cítrico em fermentação semi-sólida (ENDREß, 2000; HANG, 1987; KENNEDY, 1999; NOGUEIRA et al., 2005).

O bagaço de maçã, incluindo sementes, consiste em uma rica fonte de polifenóis, sendo que alguns destes constituintes, as prócianidinas e glicosídeos da quercitina, apresentam forte atividade antioxidante, e de pectinas (ENDREß, 2000), entretanto no Brasil é praticamente jogado fora, sendo usado como ração animal ou adubo orgânico.

A sua composição justifica o fato de ser altamente instável tanto química quanto microbiologicamente e por causa disto é importante que seja processado imediatamente, mas se isso não for possível, deve ser desidratado e armazenado em embalagens herméticas minimizando as atividades enzimáticas e aumentando sua estabilidade (ENDREß, 2000; KENNEDY, 1999; NOGUEIRA et al., 2005). O conteúdo de ácido galacturônico e grau de esterificação são influenciados pelas condições de processamento e, segundo Constenla; Ponce e Lozano (2002), a secagem do bagaço visa diminuir as atividades enzimáticas presentes e são raros os trabalhos que demonstram a perda da qualidade das pectinas de bagaço de maçã influenciadas pelas condições empregadas.

Na Figura 2 está sendo ilustrado o bagaço de maçã logo após seu processamento, desidratando em estufa, e armazenado em recipientes de vidro.



Foto: Alessandro Nogueira

Figura 2 – Farinha de bagaço de maçã após secagem em estufa.

2.2 PAREDE CELULAR EM TECIDOS VEGETAIS

Os carboidratos das plantas distribuem-se no interior das células e na formação da estrutura da parede celular (CARVALHO; FERNANDES; PIRES, 2006). No interior das células os autores incluem ácidos orgânicos, embora não seja um carboidrato, mono e oligossacarídeos, amidos e frutanas, enquanto na parede celular podem ser encontradas celulose, hemiceluloses e substâncias pécicas como galactanos e β -glucanos, conforme esquematizados na Figura 3.

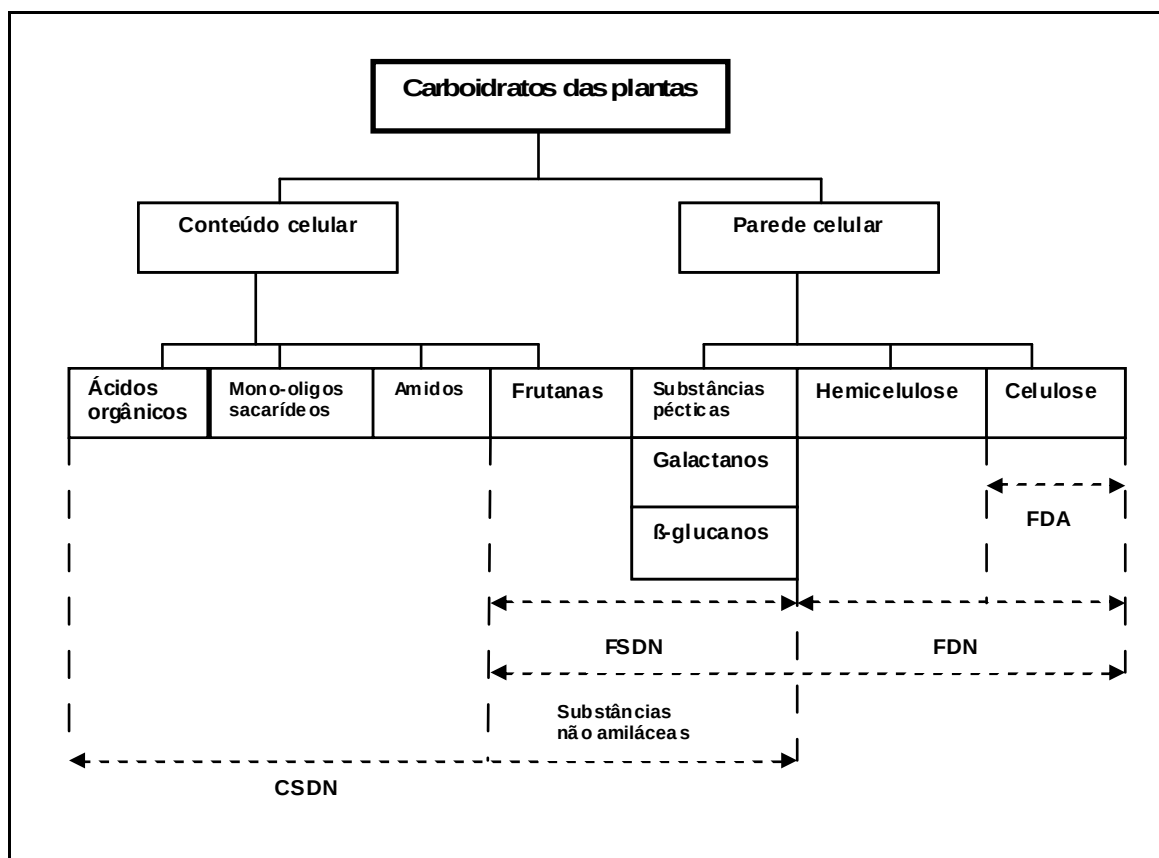


Figura 3 - Composição das células vegetais (FDA: fibra em detergente ácido; FDN: fibra em detergente neutro; FSDN: fibra solúvel em detergente neutro; CSDN: carboidrato solúvel em detergente neutro).

FONTE – CARVALHO; FERNANDES; PIRES, 2006 (adaptado)

Os compostos, apresentados de forma esquemática na Figura 3, representam, do ponto de vista prático, as frações FDA, FDN, FSDN. A primeira, Fibra em Detergente Ácido corresponde à celulose enquanto a segunda, Fibra em Detergente Neutro, à celulose e hemicelulose, e a última, Fibra Solúvel em Detergente Neutro, inclui as

substâncias pécicas e as frutanas. As três frações das fibras correspondem aos polissacarídeos e substâncias não amiláceas (CARVALHO; FERNANDES; PIRES, 2006).

Com exceção das frutanas, os constituintes das fibras, a celulose, a hemicelulose e as substâncias pécicas, com seus componentes ácidos e neutros, compõem a parte estrutural da parede celular dos vegetais.

A Figura 4 ilustra de uma forma simples uma célula vegetal e sua interligação com outras para formar um tecido vegetal.

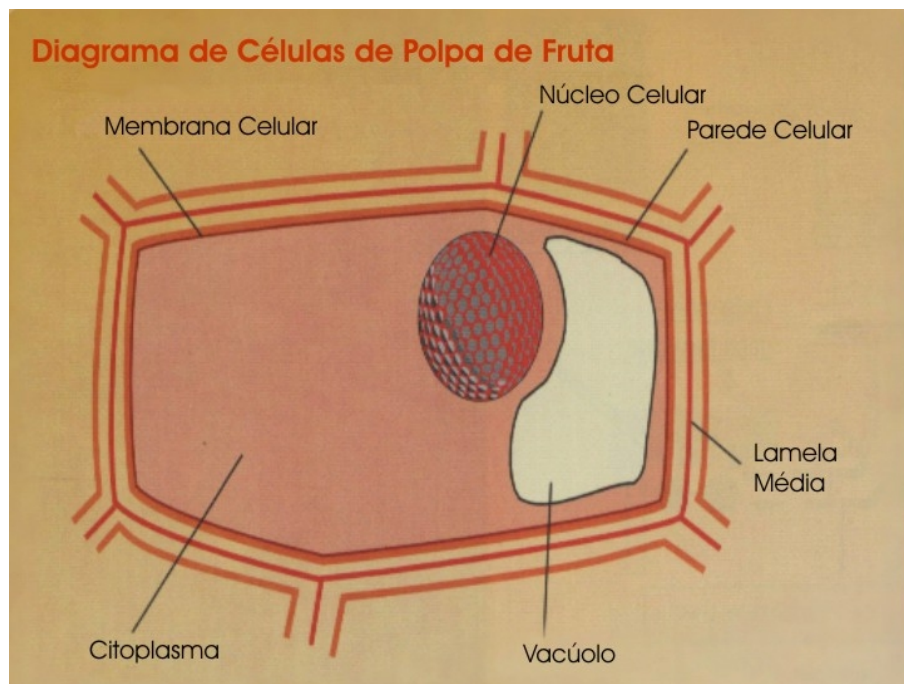


Figura 4 - Célula vegetal.
FONTE: BIRUS, 2003 (traduzido).

2.3 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

As substâncias pécticas encontram-se associadas com celulose e hemicelulose. A associação, entre pectina e hemicelulose, tem sido relatada como sendo covalente, embora nem todas as frações pécticas sejam mantidas desta maneira, pois certas quantidades podem ser removidas da parede celular com água fria, indicando que não estão ligadas covalentemente (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

As pectinas solúveis desempenham um importante papel na manutenção do equilíbrio hídrico e no movimento dos fluídos vegetais (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997). Em tecidos jovens, especialmente em frutas, as pectinas estão presentes em grandes quantidades, nos espaços intercelulares, com excelente capacidade de absorção de água, sendo importante para os estágios iniciais de desenvolvimento dos tecidos vegetais.

De acordo com Thakur; Singh e Handa (1997), as pectinas contribuem para firmeza e estrutura do tecido vegetal, tanto fazendo parte da estrutura da parede celular primária quanto sendo o principal componente da lamela média envolvido na coesão intercelular. A resistência da parede celular vegetal depende da orientação, das propriedades mecânicas e dos tipos de ligações existentes entre as substâncias pécticas e as fibras de celulose. Algumas moléculas de pectinas estão ligadas glicosidicamente às cadeias de xiloglucanas que podem se ligar covalentemente com a celulose.

Quando firmemente ligadas à estrutura destes polissacarídeos, são insolúveis em água e denominadas protopectinas que, por mecanismos enzimáticos ou hidrólise ácida tornam-se solúveis passando a ser chamadas de pectinas (BERK, 1976). A hidrólise enzimática, segundo Wang; Págan e Shi (2002), responsável pelo aumento da

solubilidade das pectinas, inclui as atividades das endo e exo-poligalacturonases e glicosidases e, na maioria das frutas, a enzima endo - poligalacturonase catalisa a conversão da protopectina em pectina.

As maiores concentrações de pectinas na parede celular são encontradas na lamela média com um decréscimo gradativo na parede celular primária até a membrana plasmática (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

Do ponto de vista industrial, (LEVIGNE; RALET; THIBAUT, 2002) as matérias-primas mais importantes são o albedo das frutas cítricas e o bagaço de maçã.

Além destas duas fontes, que são as principais (YAPO et al., 2006), outras têm sido estudadas como, por exemplo, a polpa de beterraba sacarina que anualmente gera mais do que 2 milhões de toneladas de bagaço para indústria de açúcar. Levigne; Ralet; Thibault, 2002 eYapo et al., 2006, relatam que esta matéria-prima pode conter teores elevados de pectina chegando a 25 e 30% respectivamente, baixo custo e um excelente potencial de extração de pectina. Entretanto, não é interessante do ponto de vista industrial por suas pobres propriedades geleificantes, atribuídas à sua pequena massa molar, altos conteúdos de grupos acetil e grandes quantidades de cadeias laterais. Estas características conferem à pectina boas propriedades emulsificantes (YAPO et al., 2006).

De acordo com Schieber et al. (2003), em muitas aplicações as pectinas de maçã são caracterizadas por propriedades geleificantes superiores se comparadas às das pectinas cítricas. Todavia sua cor marrom leva a limitação com respeito ao seu uso em produtos alimentícios de coloração clara. A cor do bagaço de maçã e das pectinas extraídas é causada pela oxidação dos compostos fenólicos, que são extraídos

simultaneamente do bagaço e apenas removida parcialmente na etapa de precipitação. Renard et al. (1996 *apud* SCHIEBER et al., 2003), demonstraram que tentativa de diminuir a coloração de bagaço de maçã com peróxidos alcalinos resulta na perda de compostos fenólicos e na degradação da maior parte das pectinas, e que um eficiente branqueamento apenas poderia ser obtido à custa de baixo rendimento.

A Tabela 1 apresenta o teor das substâncias pécticas em diversas frutas (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997), e estas pectinas de várias matérias-primas podem ser diferentes na estrutura molecular como, por exemplo, massa molecular, grau de esterificação, conteúdo de acetil, teor de açúcares neutros, distribuição dos grupos carboxi-metoxilados e, portanto apresentarem diferentes propriedades funcionais (SCHEMIN, 2003; ENDREß, et al., 1999; THIBAUT, 1980).

Tabela 1 - Teor de pectina em frutas.

Frutas	Substancias pécticas (base úmida)*	% Base seca**
Maçã	0,5 – 1,6	4 – 7
Bagaço de maçã	1,5 – 2,5	15 - 20
Polpa de beterraba	1,0	15 – 20
Polpa de cítricos	2,5 – 4,0	30 - 35
Cascas de laranjas	3,5 – 5,5	---
Tamarindo	1,71	---
Cenouras	0,2 – 0,5	10
Mamão papaia	0,66 – 1,0	---
Tomate	---	3
Girassol	---	25

FONTE: THAKUR; SINGH e HANDA, 1997 *; THIBAUT, 1980**(adaptado).

A aplicação das pectinas apresenta importância na indústria alimentícia sendo empregada como um aditivo de acordo com suas propriedades geleificante, estabilizante, espessante e, recentemente, vem sendo utilizada como substituintes de

açúcar e gordura em alimentos dietéticos (IGLESIAS; LOZANO, 2004; MOORHOUSE, 2004; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997).

As pectinas formam géis e estas propriedades podem ser utilizadas para produção de gomas, geléias e marmeladas, produtos lácteos e confeitados (INGLESIAS; LOZANO, 2004; MOORHOUSE, 2004).

2.3.1 Estrutura da pectina

Como a maioria de outros polissacarídeos, as pectinas são polimoleculares e polidispersas, o que significa que são heterogêneas com relação à estrutura química e à massa molecular. Sua composição varia com a fonte, condições de extração e fatores ambientais (IGLESIAS; LOZANO, 2004; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997; WANG; PAGÁN; SHI, 2002).

As pectinas são polissacarídeos complexos de vegetais, consistindo principalmente de ácido D-galacturônico e açúcares neutros, tais como L-ramnose, L-arabinose, e D-galactose (YAPO et al.; 2006). São organizadas sob forma de cadeia constituída principalmente por resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligação glicosídica α -(1 $\rightarrow$ 4) formando uma estrutura linear. Esta estrutura principal pode ser esporadicamente interrompida em locais com resíduos simples de α -L-ramnose, que pode carregar cadeias laterais de resíduos de açúcares neutros, primariamente arabinanas e ou arabinogalactanas (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997). Os resíduos de ácido galacturônico podem ser parcialmente esterificados na posição C-6 com metanol, assim como os grupos hidroxilas nas posições C-2 ou C-3 podem estar parcialmente esterificados com ácido acético (RENARD; THIBAUT, 1993; YAPO, et al., 2006).

A Figura 5 apresenta a estrutura esquematizada da molécula de pectina com a conformação cadeira.

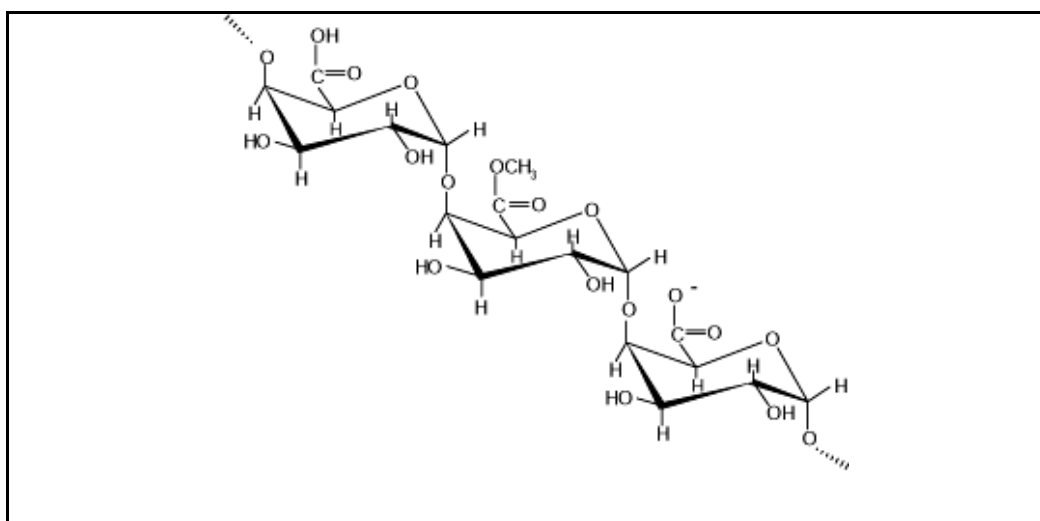


Figura 5 - Estrutura química da cadeia de pectina em conformação cadeira.
 FONTE: (BRANDÃO; ANDRADE, 1999).

A estrutura deste polissacarídeo contém 65% de ácido galacturônico e é bem diversificada, pois consiste de três tipos de frações conhecidas como a linear homogalacturonana (HG) e as ramificadas, ramnogalacturonanas (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

As homogalacturonanas formam géis rígidos e insolúveis na presença de cálcio, uma propriedade que irá determinar suas diversas funções na parede celular (MARCON, 2004; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; NOVOSEL'SKAYA, et al., 2000). São constituídas de longas cadeias de resíduos de ácido galacturônico, que podem estar parcialmente esterificados (até 70%), consistindo de resíduos de ácido galacturônico com ligações α -(1 $\rightarrow$ 4), que são mais resistentes a hidrólise (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEM, 2001; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). A resistência das ligações glicosídicas a hidrólise ácida não são iguais, sendo que GalA α -(1 $\rightarrow$ 4) GalA > GalA α -(1 $\rightarrow$ 2) Rha > Rha α -(1 $\rightarrow$ 4)GalA > açúcar neutro α -(1 $\rightarrow$ 4) açúcar

neutro. Isto permite que a região homogalacturônica seja purificada por hidrólise sob condições controladas e seu comprimento mínimo seja estimado (NOVOSEL'SKAYA et al., 2000).

Como resíduos de ramnose estão presentes na região linear da homogalacturonana, vários autores relataram proporções que variam de 25 a 200 resíduos de ácido galacturônico por resíduo de ramnose. No caso de pectina de citrus foi demonstrado que a razão era de 40 resíduos de ácido galacturônico por ramnose, mas apenas 15% de ramnose encontravam-se na cadeia principal enquanto 85% localizavam-se nas regiões ramificadas (ZHAN; HANSSEN; MORT, 1998 *apud* NOVOSEL'SKAYA et al.; 2000).

A hidrólise ácida das regiões ramificadas produz duas frações, uma rapidamente hidrolisável contendo açúcares neutros e outra, mais resistente, rica em ácido galacturônico e ramnose, cuja estrutura foi identificada como uma série de homólogos lineares [α -4) GalA α -(1 $\rightarrow$ 2) Rha α -(1 $\rightarrow$], podendo chegar a 10 dímeros (RENARD; CREPEAU; THIBAUT, 1995).

A Figura 6 apresenta a estrutura de dois dímeros GalA α -(1 $\rightarrow$ 2) Rha α -(1 $\rightarrow$ 4) GalA α -(1 $\rightarrow$ 2) Rha inseridos na cadeia linear do ácido poligalacturônico, característicos da região ramificada.

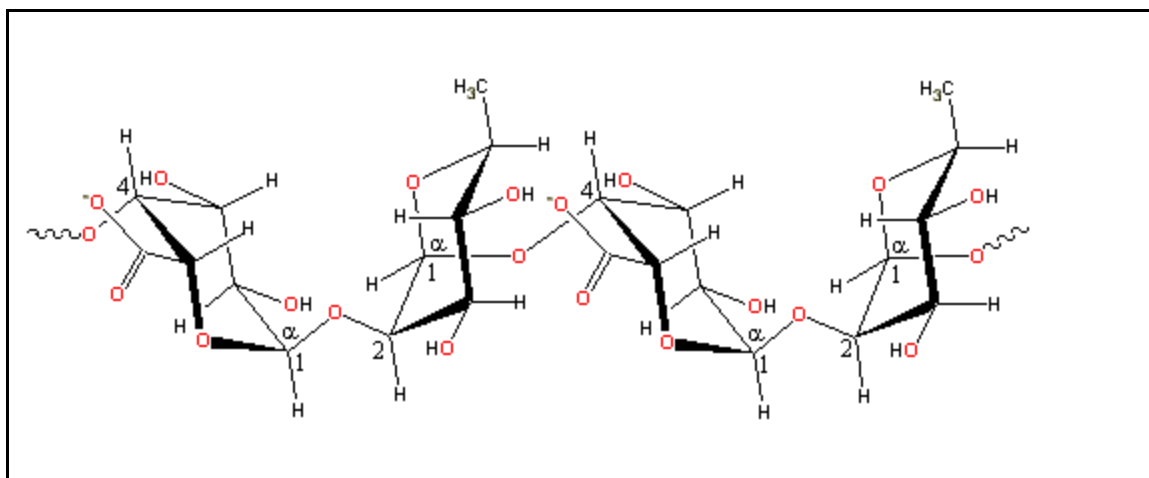


Figura 6 - Estrutura de dois dímeros formados por ácido galacturônico e ramnose, mostrando as ligações α -(1 $\rightarrow$ 2), α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 2) respectivamente.

FONTE: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hypec.html>, jul. de 2006.

A região ramificada apresenta-se sob duas formas, uma contendo a série de homólogos lineares (10 dímeros) inseridos na cadeia do ácido poligalacturônico (RG-I) e outra contendo uma sequência mínima de sete resíduos de ácido galacturônico aos quais se ligam quatro oligossacarídeos em cadeias laterais (RG-II) (NOVOSEL'SKAYA et al., 2000).

A ramnogalacturonana – I representa a maior parte das substâncias pécticas e constitui da repetição de unidades de dissacarídeos de ácido galacturônico e ramnose com cadeias laterais formadas por diferentes açúcares, principalmente arabinanas e galactanas, ligados diretamente aos resíduos de ramnose, em C-4. Segundo Renard, Crepeau e Thibault (1995), 78% de ramnose existente na pectina de maçã está ligada diretamente na cadeia principal sob a forma de oligômeros (NOVOSEL'SKAYA et al. 2000; PRADE et al., 1999; THAKUR; SING; HANDA, 1997).

As RG-II são regiões de ácidos galacturônicos aos quais se ligam diretamente, em C-2 ou C-3, alguns açúcares raros como fucose, xilose, apiose e ácido acérico, além dos açúcares comuns como arabinose, glucose, ácido galacturônico e glucurônico. Neste caso a ramnose, quando aparece, está nas cadeias laterais (MARCON, 2004; NOVOSEL'SKAYA et al. 2000; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006), correspondendo em pectina de maçã a 22% (RENARD; CREPEAU; THIBAUT, 1995).

Sob o ponto de vista dos autores Willats, Knox e Mikkelsen (2006) é possível observar que a estrutura principal da pectina foi considerada como homogalacturonanas, com ligações simples chamadas de regiões lisas (*smooth region*) e as

ramnogalacturonanas com ramificações contendo vários açúcares, chamadas de regiões em cabeleira (*hairy region*), como demonstrada pela Figura 7 identificada pela letra A. A letra B refere-se à recentes pesquisas onde os autores propõem um novo ponto de vista, demonstrando que a homogalacturonana pode ser considerada uma cadeia lateral das ramnogalacturonanas, o que causou grande impacto nos estudos da estrutura fina das pectinas (PRADE et al., 1999; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; VINCKEN et al., 2003).

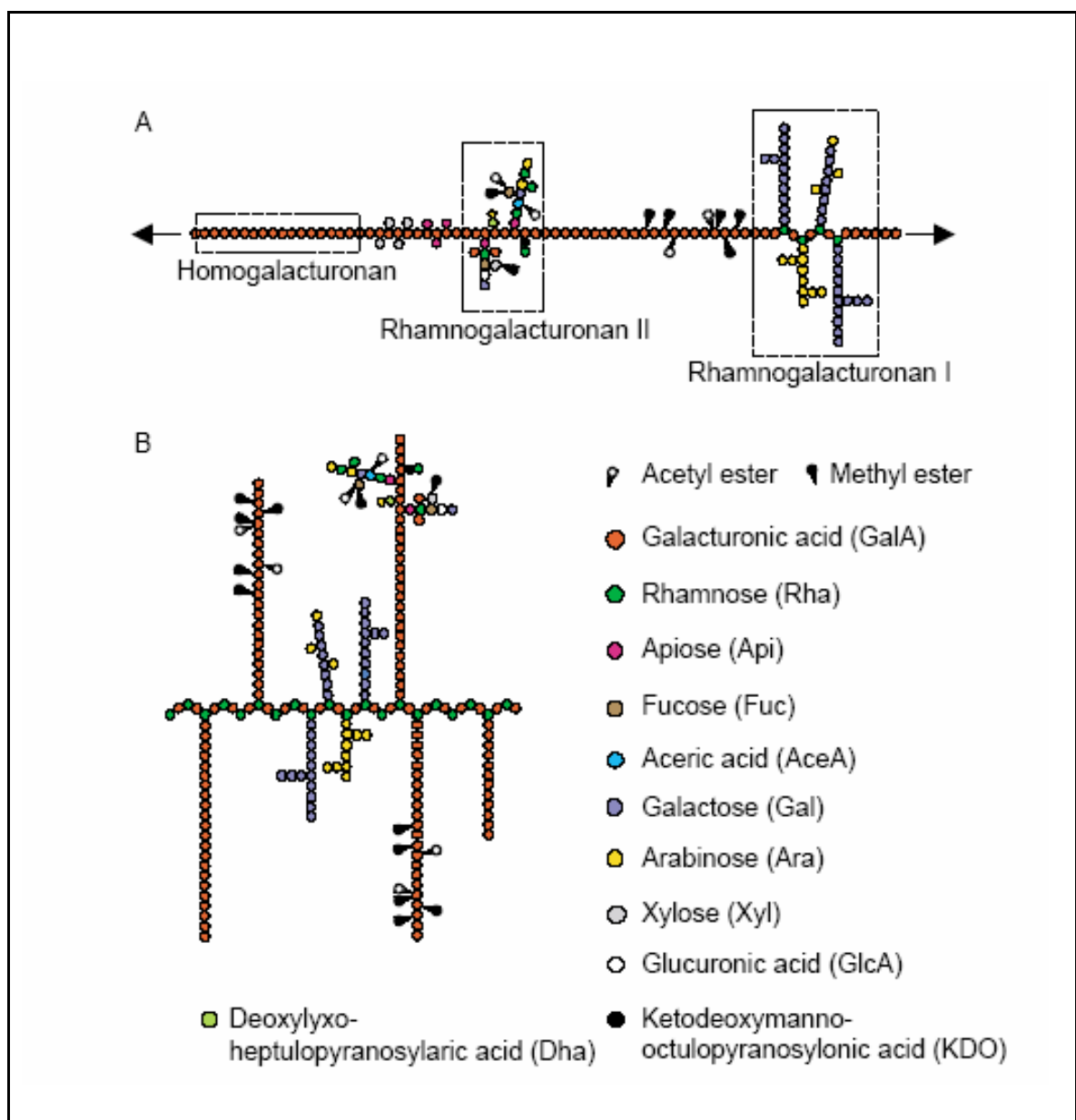


Figura 7 - Estrutura convencional (A), Nova proposta dos autores (B).
 FONTE: WILLATS; KNOX ; MIKKELSEN, 2006.

2.3.2 Extração

A presença de um ácido ou uma base em elevadas temperaturas ajudam no rompimento da parede celular, hidrolisando a protopectina e solubilizando as substâncias pécticas (WANG; PAGÁN; SHI, 2002). Os autores Joye e Luzio (2000) relataram em seus estudos que o processo de extração alcalino rende uma pectina de baixo grau de esterificação (DE) como resultado da saponificação dos grupos ésteres, enquanto que o processo de extração ácida, em geral, rende uma pectina com alto grau de esterificação, aproximadamente igual ao grau de esterificação de ocorrência natural.

A extração de pectina é, portanto, um processo físico-químico complexo no qual a solubilização, extração e despolimerização das macromoléculas ocorrem ao mesmo tempo, sendo extraídas com mais facilidade as pectinas de alto grau de esterificação (KERTESZ, 1951). Segundo os autores Wang; Pagán e Shi (2002), o processo industrial de extração emprega ácido sulfúrico, clorídrico ou nítrico, pH 2, com temperaturas de 60 a 100°C, durante 5 a 10 horas. O tratamento ácido aplicado no bagaço de maçã como relatado por Cho e Hwang (2000), usando HCl e pH 1,2 durante 15 a 240 min em temperaturas de 70 a 100°C, extrai polissacarídeos solúveis em água, mas causa degradação parcial em polímeros. O rendimento e a qualidade dos polissacarídeos são fortemente afetados pelas condições de extração, portanto para se obter um produto melhor, as condições de extração não podem ser muito drásticas.

Assim, Schemin et al. (2005), pesquisando a reação de extração ácida de pectina a partir de bagaço de maçã, confirmam que o ácido nítrico é um bom agente extrator, porém o ácido cítrico apresentou melhores resultados. Com um modelo matemático definiu que com 6,2 g/100 mL a 100° C durante 152 min obtinha um rendimento de 17,82 g/100g de uma pectina de 68,8% de grau de esterificação. Marcon (2004) obteve

resultado semelhante, com um rendimento de 16,8 g/100g quando extraiu pectina com 5 g/100 mL de ácido cítrico a 100°C durante 80 minutos, demonstrando que o tempo de reação poderia ser menor.

Scabio et al. (2006), estabeleceu um modelo de extração com ácido nítrico estatisticamente significativo ($R^2 = 0,9271$) e no ponto central com temperatura de 80°C, obteve um rendimento de 9,05 g/100g de uma pectina com grau de esterificação de 74,39% quando usou ácido a 50 mM, durante 20 minutos. A análise do efeito dos fatores sobre o processo de extração evidenciou que a temperatura é mais importante que a concentração de ácido e o tempo.

Uma das principais variações funcionais entre as pectinas de alto e baixo DE está na sensibilidade em presença de íons polivalentes, como o cálcio. A pectina sensível ao cálcio pode ser geleificada na sua presença e são, portanto, utilizadas para formulações de ingredientes alimentícios para produtos com baixo teor de gordura ou sem açúcar, para os quais existe uma grande aplicação no mercado (JOYE; LUZIO, 2000).

2.3.3 Aplicação

A solubilidade das pectinas é diretamente proporcional ao número de grupamentos carboxílicos esterificados e inversamente, ao tamanho da massa molecular, embora o pH da solução, a temperatura, a concentração e a natureza dos solutos presentes tenham efeitos marcantes. Por ser muito solúvel, sob a forma de pó em que se comercializa, ao se ligar com a água forma uma camada que funciona como uma

barreira que impede o resto da pectina interagir com a água (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997; WANG; PAGÁN; SHI, 2002).

A prática em laboratório consiste em dissolver a pectina com um solvente pelo qual tenha menos afinidade, como álcool, a fim de dispersar as moléculas e após isto pode ser adicionada água na proporção desejada. A prática na indústria de fabricação de geléias consiste em diluir a pectina sólida com 10% do açúcar a ser usado e após adequada mistura, adicionar aos poucos ao suco de frutas, deixando dissolver e somente após isto são adicionados os 90% restante do açúcar programado.

A principal propriedade das pectinas é a de formar gel na presença de açúcar e de íons cálcio em meio ácido, e isto depende da massa molecular e do grau de metoxilação, o que justifica que pectinas de diferentes fontes não apresentam a mesma capacidade de geleificação. As características físicas do gel são conseqüências da formação de contínuas redes tri-dimensionais com ligações cruzadas entre as moléculas (MOORHOUSE, 2004; THAKUR; SING; HANDA, 1997).

A formação do gel também é influenciada por vários fatores como temperatura, tipo de pectina, grau de esterificação, grau de acetilação, pH, açúcar e outros solutos e cálcio. (SCHEMIN, 2003; MARCON, 2004; MOORHOUSE, 2004; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

O grau de esterificação é um dos aspectos mais importantes da estrutura da pectina devido à excelente correlação com a propriedade de formar gel, que define a adequação de seu uso industrial. De acordo com Novosel'skaya et al. (2000) e Monsoor, Kalapathy, e Proctor (2001), o método mais comum para determinar o grau de esterificação de pectinas é a titulação clássica (FOOD..., 1981). Nesta metodologia, são

tituladas as carboxilas livres e as desesterificadas, com NaOH 0,1N e o cálculo do grau de esterificação corresponde à razão entre as carboxilas esterificadas e as carboxilas totais, em percentual. Os mesmos autores citam o método de determinação do teor de metanol por cromatografia gasosa após hidrólise química ou enzimática das carboxilas esterificadas. O grau de esterificação por espectroscopia de infravermelho, tanto por reflectância difusa (DRIFTS) quanto por transmissão (FT-IR) é recomendado por Monsoor, Kalapathy e Proctor (2001) pois apresenta correlação bastante alta com a metodologia da cromatografia gasosa utilizada para quantificar metanol. Na técnica FTIR, usando amostras no estado sólido como pastilhas de KBr, as áreas do picos referentes às faixas de 1760-1745 e 1640-1620 cm^{-1} correspondem às carboxilas esterificadas e livres, respectivamente. Por definição o grau de esterificação é a razão da área do pico da carboxila esterificada pela área da carboxila total (MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001).

As pectinas podem ser classificadas como de alta (HM) ou baixa (LM) metoxilação, quando apresentarem de 50 a 80% ou de 25 a 50%, respectivamente podendo assim formar dois tipos de géis. O mecanismo de formação do gel é diferente, sendo que as pectinas de alta esterificação formarão gel em pH próximo de 3,6 e na presença de co-solutos, açúcares com concentração maior do que 65%. A função do açúcar na formação dos géis das pectinas HM é estabilizar as zonas de junção promovendo interações hidrofóbicas entre os grupos metil ésteres. Nas pectinas de baixa metoxilação (LM) os géis são formados na presença do cálcio, o qual age como uma ponte entre pares de grupos carboxílicos de moléculas de pectinas. Estas são quimicamente mais estáveis com relação à umidade e aquecimento do que as pectinas HM, que apresentam tendência à desesterificação em umidade atmosférica (GILSENAM; RICHARDSON; MORRIS, 2000; THAKUR; SINGH; HANDA 1997).

As pectinas de alta metoxilação apresentam considerável poder de geleificação e são amplamente usadas na estruturação de sucos de frutas com a intenção de aumentar a consistência dando a aparência de polpa de fruta. A presença de cadeias laterais, principalmente com unidades de arabinose e galactose, afeta significativamente as propriedades funcionais das pectinas, tais como solubilidade, geleificação, formação de filme e propriedades reológicas, além de favorecer a agregação em soluções concentradas (BRANDÃO; ANDRADE, 1999).

O tamanho molecular, a ramificação natural de açúcares, os graus de acetilação e de amidação, e o teor de cinzas influenciam as propriedades geleificantes das pectinas sendo que as de baixo grau de esterificação são usadas para produtos com baixos teores de açúcar, mas na presença de cálcio. São, portanto, ingredientes para formulação de alimentos de baixos valores calóricos (SAHARI; AKBARIAN; HAMED, 2003).

As soluções de pectinas apresentam baixas viscosidades, mas sua importância comercial está mais relacionada com a sua capacidade de geleificação. De uma forma geral, são utilizadas no processamento de geléias, de produtos de confeitaria incluindo cremes, de molhos para churrasco e produtos de tomate, bebidas carbonatadas e sobremesas de frutas. Sua grande aplicação, em iogurtes com frutas, demonstra vantagem em relação às outras gomas ou hidrocolóides, pois estabiliza a textura da base de iogurtes permanecendo constante durante armazenagem, eliminando a flotação e a separação da fruta mesmo no manuseio da carga (MOORHOUSE, 2004).

A seleção de uma pectina apropriada é dependente da temperatura de geleificação, da textura e do processamento. Por exemplo, para um gel tradicional com partículas de frutas suspensas torna-se necessária uma rápida geleificação e assim usa-se pectina de alto grau de metoxilação (HM). Para gomas ou geléias com calorias

reduzidas ou sem açúcar, entretanto, são indicadas as pectinas de baixo grau de metoxilação (LM), pelo baixo nível de sólidos solúveis requeridos para a geleificação (menor que 25%). Estas pectinas, HMP e LMP, são utilizadas em conjunto com outros hidrocóloides sendo capazes de promover o gel desejado para cada tipo de produto (MOORHOUSE, 2004).

As pectinas comerciais são regulamentadas em alguns países como aditivo alimentício, e não apresentam problemas do ponto de vista toxicológicos. No Brasil, o Ministério da Saúde aprova a inclusão da pectina como aditivo com funções de estabilizante, espessante, geleificante e também para gelados comestíveis, em quantidade suficiente para obter o efeito desejado. Portanto, a pectina ocorrendo naturalmente em frutas, especialmente em frutas cítricas e maçãs, tem seu uso permitido pela legislação nacional com a função de coadjuvante de tecnologia para diversos tipos de produtos (AGÊNCIA..., 2006).

3 OBJETIVO

Estabelecer um procedimento de extração ácida de pectina a partir do bagaço desidratado de maçã.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Estabelecer as características de qualidade físico-química de bagaço de maçã obtido em nível de laboratório, após desidratação, moagem e tamisação;

Identificar a influência de ácidos nítrico, clorídrico, succínico, láctico, tricloroacético, málico e cítrico, em diferentes concentrações e com o binômio tempo: temperatura sobre o rendimento gravimétrico;

Determinar as tendências do processo de extração de pectinas do bagaço desidratado de maçã com ácidos diluídos, de 1 a 100 mM,;

Estabelecer e validar o modelo de extração de pectina com ácido nítrico, mediante um planejamento composto 2^2 , axial e com repetições no ponto central.

Caracterizar a pectina experimental por metodologia titulométrica (DE), espectroscópico (FT-IR) e cromatográfico (GLC – HPSEC-MALLS) comparando-a com amostras de pectinas comercial de maçã de alto (HMP) e baixo (LMP) grau de esterificação (DE).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Amostras de maçãs comerciais da variedade da Joaquina cedida pela Estação Experimental de São Joaquim (EPAGRI). Amostras de pectinas comerciais de maçã do tipo HMP e LMP cedidas pelo fabricante (Herbstreith & Fox). Produtos químicos e solventes orgânicos de qualidade pró análise.

4.2 MÉTODOS

Os procedimentos metodológicos compreendem os processos, as análises e os experimentos, que estão apresentados a seguir.

4.2.1 Os Processos

A seguir são apresentadas as formas de obtenção do bagaço, de extração ácida e de isolamento de pectina.

4.2.1.1 Obtenção do bagaço

O bagaço, obtido do processamento do suco de maçã, foi lavado com água corrente por três vezes para retirada dos açúcares e ácidos orgânicos, centrifugado e desidratado em estufa de circulação à 60°C de 5 a 8 horas. Foi então triturado em moinho de facas, tamisado a 60 MESH e armazenado à temperatura ambiente em frascos fechados (Figura 8).

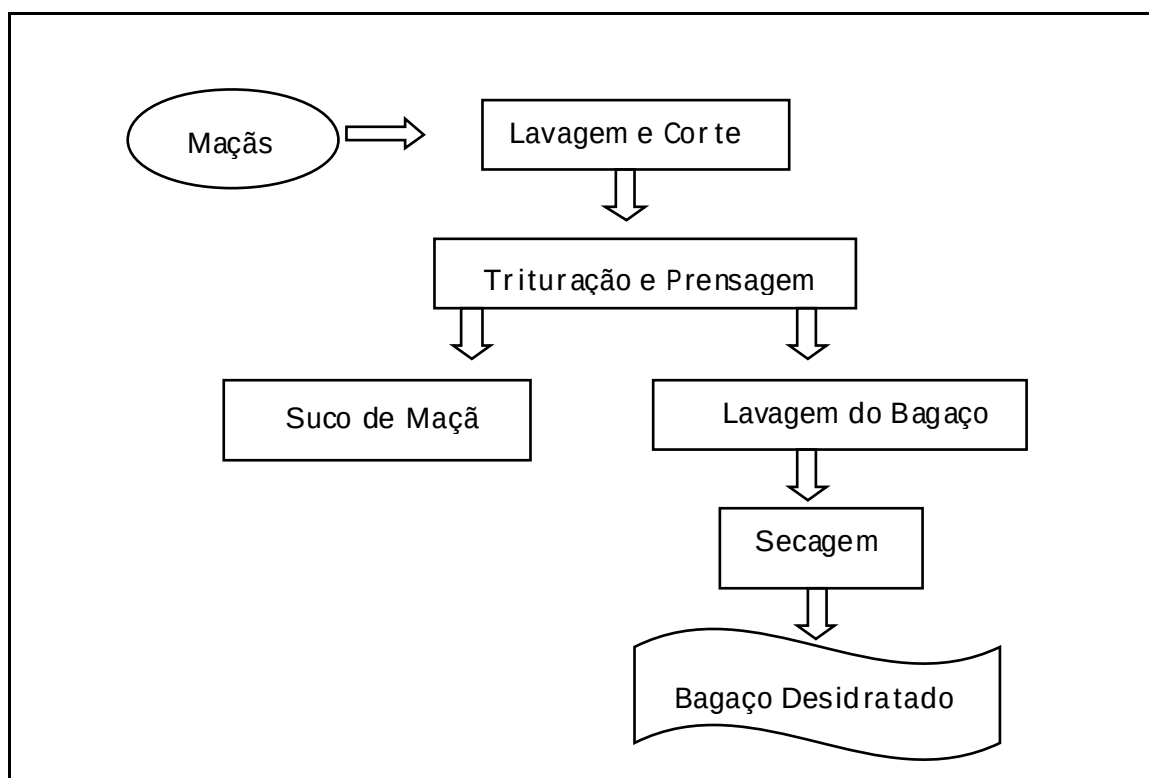


Figura 8: Fluxograma do beneficiamento do bagaço de maçã.

4.2.1.2 Extração ácida.

O sistema de reação foi composto por 5g de bagaço desidratado e em pó, acrescido a 400 mL de ácido com uma concentração e um tempo escolhidos de acordo com o modelo experimental. O procedimento para extração foi o seguinte: em um béquer de 500 mL foram pesados 5g de bagaço de maçã em pó e adicionado 5 mL de álcool e deixado em repouso por aproximadamente 5 minutos. A seguir, com agitação, foram adicionados 200 mL de água deionizada, misturando bem e levando para aquecimento até a fervura. Simultaneamente foram preparados 200 mL de uma solução de ácido, levado para aquecimento até a fervura. Atingido o ponto de ebulição, a solução ácida foi adicionada à suspensão, levando a um volume total de 400mL. A

concentração final do ácido e o tempo foram estabelecidos pelo planejamento. A reação foi minimizada com o abaixamento da temperatura em banho-maria gelado. Após o resfriamento, o extrato da reação foi filtrado em morim, e lavado com 200 mL de água deionizada sendo o resíduo desprezado e o filtrado reservado para isolamento das substâncias pécicas (Figura 9).

4.2.1.3 Isolamento de pectina

As substâncias pécicas que ficaram solúveis no filtrado da extração ácida foram precipitadas, sob agitação constante, com etanol 2:1 (v:v) e, após repouso mínimo de duas horas, foram desidratadas por tratamento com etanol a 70%, acetona e finalmente éter etílico, ao ar e à temperatura ambiente. O material seco foi pulverizado manualmente em gral de vidro e armazenado em frascos de plástico em dessecador. Para serem analisadas, as frações obtidas foram previamente mantidas em dessecador de vidro contendo pentóxido de fósforo durante, no mínimo, 24 horas (Figura 9).

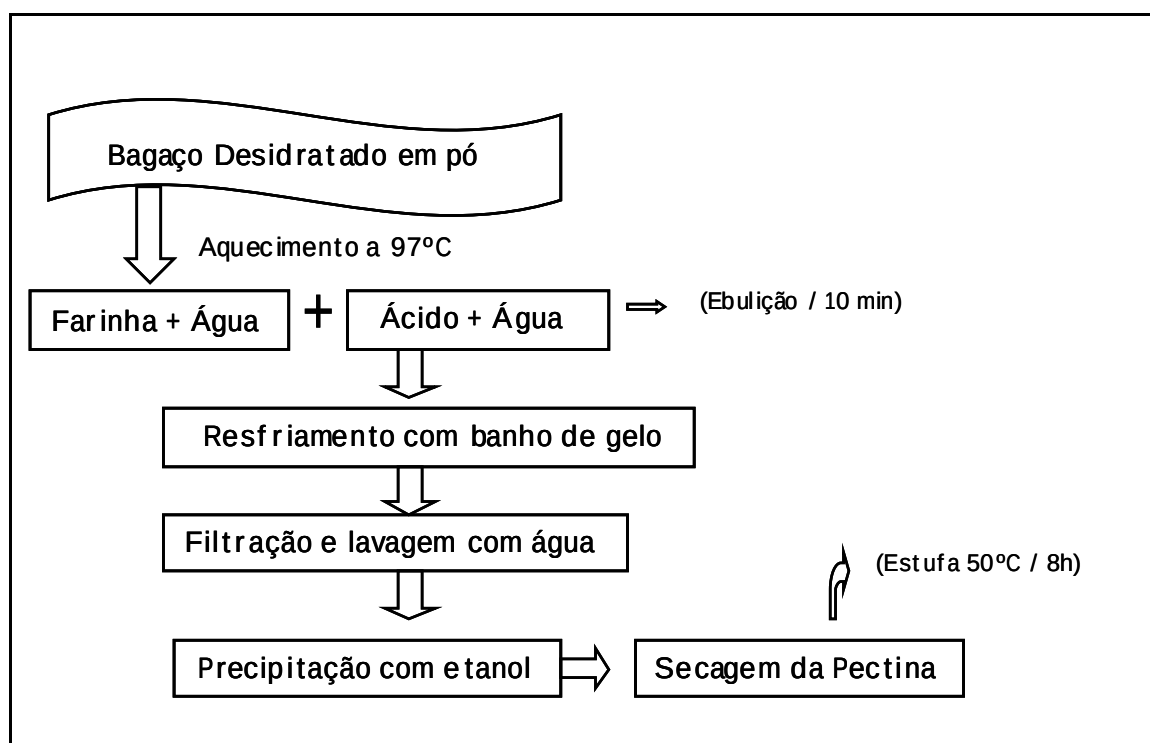


Figura 9: Fluxograma de extração de pectinas de bagaço de maçã desidratado

4.2.2 Análises

A seguir as análises são apresentadas como Análises Físico-químicas, Estatísticas, Espectrofotométricas, Cromatográficas, e Titulométricas.

4.2.2.1 Análises Físico-químicas.

O teor de umidade foi determinado em estufa a 105°C e o de cinzas em mufla a 505°C até peso constante.

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método colorimétrico de Somogyi-Nelson assim como os açúcares redutores totais após a hidrólise da sacarose com HCl 2,25 N (67°C/5 min.). As absorbâncias foram medidas em 520 nm (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944). A glucose foi quantificada pelo método enzimático da glucose oxidase, sendo que a sacarose e a frutose foram calculadas por diferença e todos os carboidratos foram expressos como monossacarídeos em g/100 mL.

A acidez titulável total foi determinada por neutralização com NaOH 0,1 N fatorado até pH 8,33 indicado por fenolftaleína e calculada como ácido málico, sendo expresso em g/100 mL. O extrato etéreo foi efetuado em Soxhlet durante 5 horas com éter etílico e os lipídeos determinados por diferença gravimétrica. Os teores de proteínas foram determinados pelo método de Kjeldahl, utilizando fator de conversão de 6,25. As fibras foram analisadas pelo método de fibra alimentar e os resultados foram calculados por diferença. (IAL, 1975; RSK, 1987; TANNER;BRUNNER, 1985).

4.2.2.2 Análises estatísticas.

Os resultados do delineamento experimental foram analisados pela regressão múltipla da metodologia de superfície de resposta pelo software STATISTICA®.

4.2.2.3 Análises espectroscópicas.

Para análises de espectroscopia de infravermelho foram feitas pastilhas contendo 100 mg de KBr com 1 a 2 mg de amostras desidratadas de pectinas que foram prensadas (50N/sqin) e analisadas em espectrofotômetro Shimadzu 8400 FTIR com 4 cm^{-1} de resolução e os espectrogramas foram registrados na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} . O cálculo dos graus de esterificação foram feitos considerando a razão entre a área relativa à banda 1740 cm^{-1} (grupos carboxílicos esterificados) e as áreas relativas às bandas 1740 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} (esterificados e livres, respectivamente).

4.2.2.4 Análises cromatográficas

A) Cromatografia Líquido-Gasosa (GLC)

A identificação e determinação dos teores relativos de açúcares neutros das amostras de pectina foram feitas após derivatização a alditóis, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

As pectinas foram hidrolisadas com ácido trifluoroacético 1M ($100^{\circ}\text{C}/5\text{ h}$) (ADAMS, 1965; ASPINALL, 1982) e o hidrolisado foi evaporado em capela. Os açúcares livres foram reduzidos com NaBH_4 (WOLFRON ; THOMPSON, 1963), após o que os cátions Na^+ foram retirados com resina Lewatit na forma ácida. A seguir o filtrado reduzido foi seco em rota-evaporador e lavado com metanol, para eliminação do boro na forma de borato de trimetila. O material foi acetilado com anidrido acético e piridina 1:1 (v:v) levando à obtenção de acetatos de alditóis que foram extraídos com clorofórmio e lavados com solução de sulfato de cobre (5%) para remoção da piridina. A amostra contendo os acetatos de alditóis resultantes foi analisada por cromatografia gás-líquido (GLC) em equipamento modelo HP 5890 SII, com detector de ionização de chama (FID) e nitrogênio como gás de arraste, com fluxo 2 mL/min , a 220°C ,

temperatura do detector e do injetor de 250°C. Foi utilizada uma coluna capilar (0,25 m d.i. x 30 m), modelo DB-210, com espessura de filme de 0,25 mm.

B) Cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS)

O perfil de massas moleculares das frações foi determinado por cromatografia de exclusão estérica. As amostras na concentração de 2 mg. mL⁻¹ foram solubilizadas em água e filtradas sob pressão através de membranas de acetato de celulose (Milipore), com tamanho do poro de 0,2 µm. A seguir foram injetadas em cromatógrafo de exclusão estérica modelo 150 C ALC/GPC Waters, com detector de índice de refração diferencial modelo Waters 2410, e detector de espalhamento laser em multiângulos.

4.2.2.5 Análise titulométrica.

As amostras de pectinas foram quantificadas por titulometria (BOCHEK; ZABIVALOVA; PETROPAVLOVSKII, 2001; WOSIACKI, 1977). Quantidade de amostra conhecida, de aproximadamente 250 mg, foi umedecida com 2 mL de álcool e solubilizada em 25 mL de água deionizada sob agitação constante por 30 minutos com agitador magnético, sendo então determinado o pH da solução. As carboxilas livres dos ácidos anidrogacturônicos foram neutralizadas com NaOH 0,1N e as carboxilas esterificadas igualmente, após saponificação (10 mL NaOH 0,25 N, 30 min a temperatura ambiente e neutralização com 10 mL HCl 0,25 N), obtendo-se assim os valores de mEq de NaOH referentes aos dois tipos, livres e esterificados, respectivamente representados por mEq' e mEq". Com estes dados foram feitos os cálculos segundo as fórmulas:

$Z = \text{massa} / \text{mEq totais}$	1
$\text{AUA} = 17600/Z$	2
$\text{MeO} = (\text{mEq}'' \times 31 \times 100) / \text{massa}$	3
$\text{DE} = (176/31) \times (\text{MeO}/\text{AUA}) = \text{mEq}'' / (\text{mEq}' + \text{mEq}'')$	4
$\text{Pectina} = \text{AUA}\% + \text{MeO}\%$	5
$\text{Fração neutra} = 100 - \text{pectina}$	6

4.2.3 Experimentos

Foram feitos experimentos com a finalidade de estabelecer os efeitos de diferentes ácidos sobre o processo de extração, e com o ácido mais adequado foi feito um delineamento experimental para escolha das melhores condições de sua aplicação, sendo determinado o rendimento do processo e a qualidade do produto, comparando com padrões comerciais.

4.2.3.1 Efeitos do diferentes ácidos

Para este processo 5g de bagaço em pó de maçã dispersos em 200 mL de água deionizada, foram tratados com ácidos nítrico, clorídrico, succínico, láctico, tricloroacético, cítrico ou málico, em concentrações que variaram de 1 a 750 mM durante o tempo de 10 min à temperatura 97°C.

4.2.3.2 Planejamento experimental

Com a finalidade de estabelecer a influência do tempo e da concentração do HNO_3 , variáveis de entrada, sobre a quantidade (rendimento) e qualidade da pectina solubilizada (grau de esterificação), variáveis de saída, foi seguido um delineamento composto central (BARROS NETO et al., 2002). Foram respeitados os domínios de abrangência do experimento definidos na Tabela 2 e a seqüência dos ensaios descritos na Tabela 3.

Tabela 2 - Domínio do planejamento experimental

Variável	$-\sqrt{2}$	-1	0	+1	$+\sqrt{2}$
Ácido, mM	8	35	100	165	192
Tempo, min	2,93	5	10	15	17,07

Tabela - 3 Ensaios do planejamento experimental

Ensaios	Fatores codificados		Fatores decodificados	
	X_1	X_2	Ácido, mM	Tempo, min
1	-1	-1	35	5
2	-1	+1	35	15
3	+1	-1	165	5
4	+1	+1	165	15
5	0	0	100	10
6	0	0	100	10
7	0	0	100	10
8	$-\sqrt{2}$	0	8	10
9	$+\sqrt{2}$	0	192	10
10	0	$-\sqrt{2}$	100	2,93
11	0	$+\sqrt{2}$	100	17,07

A regressão polinomial de segunda ordem é representada a seguir

$$Y_n = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

Onde Y_n representa a variável de resposta, b_0 , o intercepto, b_n , o coeficiente de regressão e X_n , a variável independente. Tal modelo pode ser ajustado cancelando o componente o qual o erro padrão é alto e a probabilidade (p) é maior do que 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DO BAGAÇO DESIDRATADO DE MAÇÃ

O bagaço obtido no processamento de maçã, por ser altamente instável tanto química quanto microbiologicamente, foi desidratado (Endreß, 2000), levando em consideração as características do produto final influenciadas pelo processo de obtenção, mas também pelo cultivar e pela rapidez do processo de desidratação, entre outros fatores. O seu beneficiamento, reduzido às fases principais, desidratação e moagem, levou a obtenção do bagaço em pó (Figura 10).



Figura 10 - Bagaço de maçã desidratado em pó.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas deste bagaço em pó, que se constituiu na matéria-prima para obtenção de pectinas.

Tabela 4 - Qualidade físico-química de amostra de bagaço desidratado de maçã cv. Joaquina.

g/ 100 g							
Amostra	Umidade	Cinzas	Proteína	Lipídeos	Açúcares	Acidez	Fibras
Joaquina	11,94	1,51	3,88	2,82	29,43	1,00	36,00
Base seca	0	1,72	4,41	3,20	33,44	0,235	40,91

Para facilitar tanto o processo de secagem do bagaço quanto o processo de extração de pectina há necessidade de que sejam diminuídos os teores de sólidos solúveis totais (SCHIEBER et al., 2003; SCHEMIN, 2003). Isto pode ser feito com água corrente respeitando-se a proporção de massa de bagaço: água de extração igual a 1:1 (v/v), uma vez que, com três extrações, os teores de sólidos solúveis totais diminuem de 6° Brix para 2° Brix (PAGANINI et al., 2004). Como o objetivo é de aproveitamento das estruturas presentes no bagaço, e não nos sólidos solúveis, esta proporção pode ser aumentada sendo feita apenas uma extração, e sendo desprezados os açúcares e outros componentes.

Segundo Krokida et al. (2000), o bagaço deve ser desidratado por ventilação com ar a temperatura ambiente e em seguida à temperatura de 60°, 70° até atingir umidade de 10 – 12%. Porém a prática em laboratório demonstrou que após uma desidratação parcial à temperatura ambiente o bagaço pode ser colocado diretamente para secar em estufa com ar forçado à 70°C, e após 10 horas estará com peso constante. O processo industrial, bem mais efetivo, parte de uma matéria-prima com 30% de umidade, sendo desidratado em forno de três estágios durante 5 - 8 minutos com ar superaquecido (300 - 700° C), embora a temperatura no bagaço não seja superior a 50-60° C (SCHIEBER et al., 2003).

Com a umidade de 12 g/100g é possível considerar que este produto tem boa estabilidade físico-química, desde que seja estocado adequadamente em embalagens herméticas. Este teor de umidade pode ser comparado aos obtidos por Cho e Hwang (2000), 11,4 g/100g, por Marcon et al. (2005) com 10,02 g/100g para o cultivar gala, e

por Joshi e Kaushal (1995) com 8,2 g/100g. O teor de cinzas de 1,51 g/100g está compatível aos valores encontrados por Cho e Hwang (2000), de 1,8g/100g, por Marcon et al. (2005), de 1,62 g/100g e por Kennedy, (1999), de 2,6 g/100g. O teor de proteínas de 3,88g/100g apresenta-se compatível com os resultados encontrados por Cho e Hwang (2000), de 3,7 g/100g, por Marcon et al., em 2005, de 3,03 g/100g, mas não aos valores encontrados por Kennedy, (1999), de 4,5 g/100g.

O teor de açúcares totais é elevado, mas compatíveis com o relato de Marcon et al. (2005) com o valor de 35,9 g/100g, de Schemin (2003), com o de 31,78 g/100g, e de Cho e Hwang (2000), de 27,4 g/100g.

5.2 EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA EXTRAÇÃO DE PECTINA

Na Tabela 5 são apresentadas as quantidades de substâncias pécticas que foram precipitadas com etanol a 70% a partir do bagaço tratado com diferentes ácidos à 97°C, de 1 a 750 mM, durante 10 minutos.

Tabela 5 – Influência dos ácidos no rendimento gravimétrico.

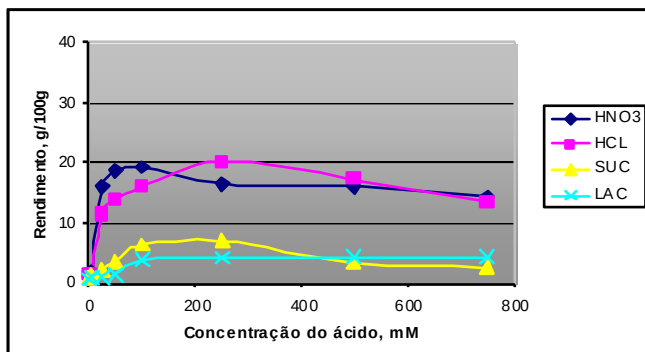
Concentrações dos ácidos	Rendimento, g/100 g							
	1mM	5mM	25mM	50mM	100mM	250mM	500mM	750mM
HNO₃	1,00	2,10	16,09	18,63	19,26	16,39	15,95	14,26
HCl	1,53	1,65	11,45	13,74	16,00	20,23	17,19	13,67
Succínico	0,80	1,60	2,29	3,56	6,44	7,00	3,47	2,70
Láctico	0,69	0,90	0,99	1,49	4,03	4,15	4,33	4,32
TCA	1,33	1,73	9,66	10,44	15,36	17,31	28,64	30,16
Málico	1,25	2,27	3,30	4,91	5,62	10,47	16,52	19,41
Cítrico	1,00	4,00	9,55	12,78	16,73	20,86	28,33	36,67

As análises destes resultados levam à constatação de que existem pelo menos dois comportamentos distintos, manifestados pela atuação de dois grupos de ácidos.

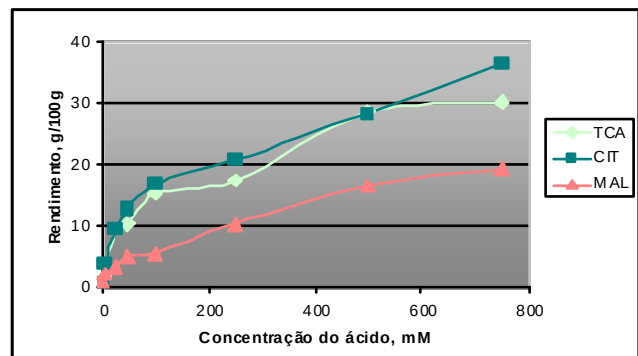
O primeiro conjunto, que compreende os ácidos nítrico, clorídrico, succínico e láctico, apresentou como resultados um rendimento crescente até a concentração de 100 mM, mantendo o padrão ou diminuindo a quantidade extraída a partir desta concentração até a de 750 mM. Este comportamento é compatível com uma reação de hidrólise da protopectina liberando pectinas em baixas concentrações de ácidos e a sua degradação quando em concentrações mais elevadas. Esta característica é observada apenas com os ácidos minerais diluídos (HNO_3 e HCl). Os ácidos orgânicos (succínico e láctico) apesar de apresentarem um perfil semelhante de diminuição do rendimento acima da concentração de 100 mM, são bem menos eficientes.

O segundo conjunto, representado pelos ácidos tricloroacético, cítrico e málico, apresentou um rendimento crescente mas com valores que ultrapassaram, em muito, o teor da pectina existente no bagaço de maçã, estimado ser da ordem de 10 a 15 g/100g (ENDREß, 2000). Este comportamento, que ocorre com estes ácidos orgânicos, pode corresponder a uma extração de pectina semelhante a aquela que ocorre com concentrações de ácidos minerais, mas com a incorporação de grupamentos ácidos esterificando as hidroxilas C-2 ou C-3 do ácido poligalacturônico ou nas hidroxilas livres dos açúcares neutros acompanhantes.

A Figura 11 ilustra estes dois tipos de comportamento, sendo que na Figura 11-A o gráfico indica uma extração seguida de uma degradação e na Figura 11- B, indica uma extração seguida de uma incorporação de grupamentos ácidos na estrutura péctica.



(A)



(B)

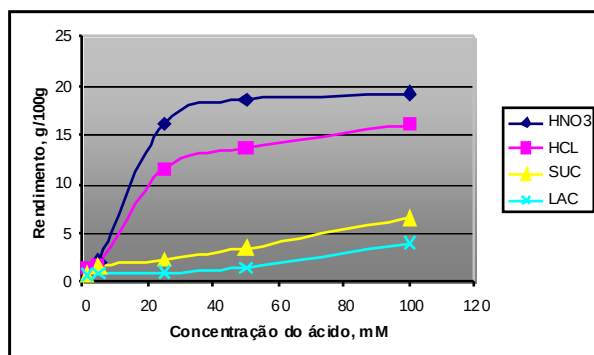
Figura 11 - Rendimento gravimétrico de obtenção das substâncias pécicas com os ácidos nítrico, clorídrico, succínico

e láctico no gráfico A e com os ácidos tricloroacético, cítrico e málico no gráfico B, de 1 a 750 mM. (HNO₃: ácido nítrico; HCL: ácido clorídrico; SUC: ácido succínico; LAC: ácido láctico; TCA: ácido Tricloroacético; CIT: ácido cítrico; MAL: ácido málico)

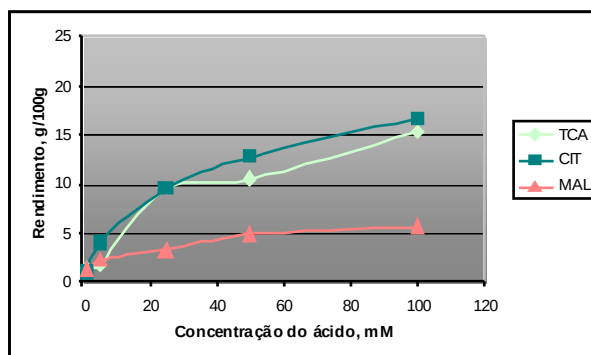
Marcon (2004), utilizando um planejamento experimental com os fatores tempo (20 – 80 min.) e temperatura (50-100°C), extraiu pectina de farinha de maçã do cv Gala com ácido cítrico à 5g/100g, obtendo rendimentos de 5,7 a 16,8%. Estes resultados foram compatíveis com os de SCHEMIN (2003), que extraiu 20% de pectina de uma mistura de variedades de maçã com ácido cítrico (5g/100g) a 100° C durante 110 minutos. Com os resultados encontrados neste trabalho, de 36% de rendimento, é possível observar que a pectina que se extrai com altas concentrações de ácido cítrico à temperatura de ebulição do sistema, contenha também outros compostos ou mesmo que o ácido cítrico tenha sido incorporado, de alguma forma, à estrutura pécica.

Conforme os resultados dos processos de extração com os mesmos sete ácidos, mas com a concentração máxima de 100 mM, foi possível observar que no primeiro conjunto, a tendência da reação é logarítmica para os ácidos minerais e linear para os

ácidos orgânicos, enquanto que no segundo conjunto, a tendência é logarítmica para os três ácidos orgânicos testados (Figura 12).



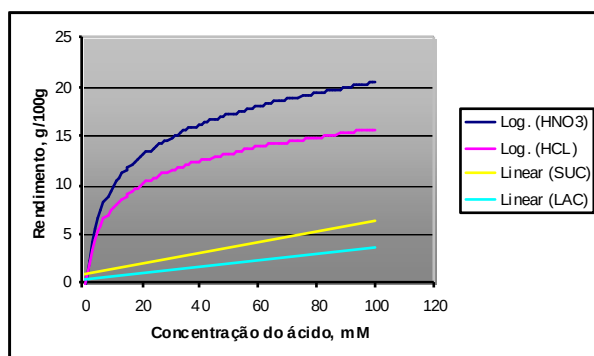
(A)



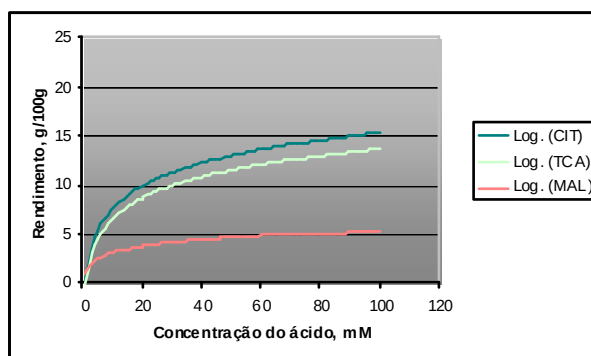
(B)

Figura 12 - Rendimento gravimétrico de obtenção das substâncias pécicas com os ácidos diluídos nítrico, clorídrico, succínico e láctico no gráfico A e com os ácidos tricloroacético, cítrico e málico no gráfico B, de 1 a 100 mM.

As linhas de tendência estão sendo ilustradas na Figura 13 para demonstrar com mais clareza os dois tipos de comportamento, sem os pontos experimentais.



(A)



(B)

Figura 13 - Linhas de tendência dos rendimento gravimétrico de obtenção das substâncias pécicas com os ácidos diluídos nítrico, clorídrico, succínico e láctico no gráfico A e com os ácidos tricloroacético, cítrico e málico no gráfico B, de 1 a 100 mM.

Estas tendências estão expressas em equações logarítmicas e lineares e seus coeficientes encontram-se apresentados na Tabela 6 com os respectivos coeficientes de

correlação. De uma forma simples estas equações expressam os mesmos resultados já apresentados anteriormente, demonstrando um destaque ao ácido nítrico, com semelhança aparente entre os ácidos clorídrico, cítrico, tricloroacético, e uma baixa eficiência do ácido málico, desconsiderando-se os coeficientes lineares das equações dos ácidos succínico e lático porque são muito baixos.

Tabela 6 - Listagem das equações das curvas de tendências e seu coeficiente de correlação.

Ácido	Equação preditiva	R ²
HNO ₃	$Y = 4,652 \ln(x) - 1,008$	90,59
HCl	$Y = 3,5108 \ln(x) - 0,5026$	90,92
Succínico	$Y = 0,054x + 0,9835$	98,99
Lático	$Y = 0,0324x + 0,4485$	91,35
Cítrico	$Y = 3,3677 \ln(x) - 0,1768$	96,22
TCA	$Y = 3,0805 \ln(x) - 0,5182$	89,82
Málico	$Y = 0,9436 \ln(x) + 0,9535$	94,15

Os rendimentos obtidos a 100 mM com um tempo de reação de 10 min à temperatura de ebulição(97°C) do sistema encontram-se ilustrados na Figura 14, com perfeita semelhanças em relação aos coeficientes de X apresentados anteriormente.

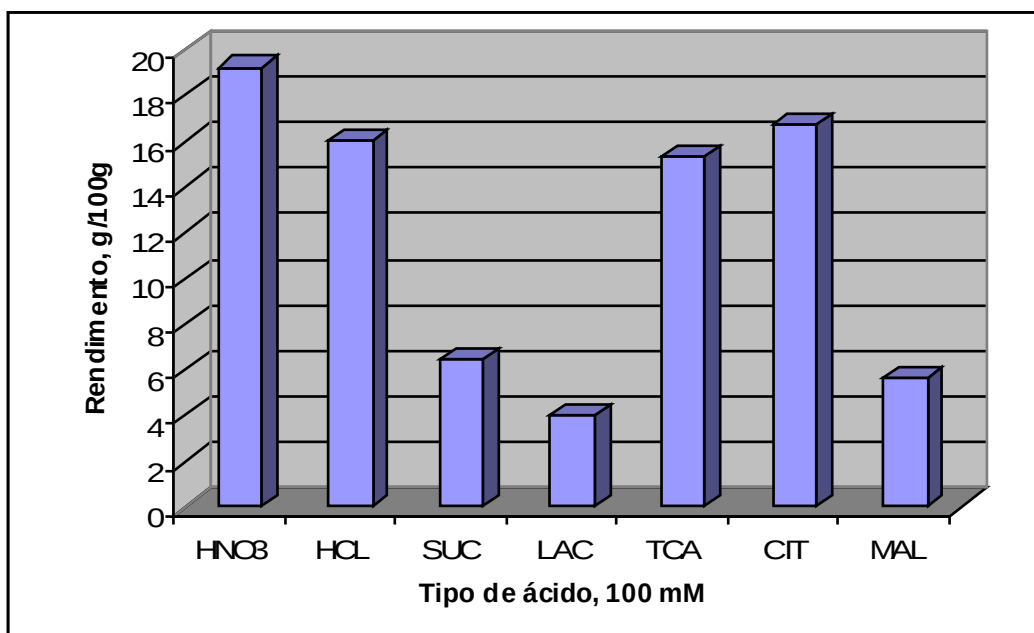


Figura 14 - Quantidade de substâncias pécticas extraídas com diferentes ácidos a 100 mM

O rendimento e a qualidade destes polissacarídeos solúveis em água são afetados por condições de extração como pH, temperatura, e o tempo de extração. Portanto condições severas de extração aumentaram o rendimento, mas também a degradação dos polímeros. Um modelo de estudo pode ser um método muito efetivo para pesquisar as condições ótimas de extração (CHO; HWANG, 2000).

Ao se levar em conta o comportamento de reação do ácido nítrico em condições diluídas e observando-se que a concentração de 100 mM representa um equilíbrio em termos do binômio extração : degradação, e também considerando-se o poder de corrosão do ácido clorídrico e a duvidosa extração das pectinas com os ácidos tricloroacético e cítrico, foi selecionado o sistema de ácido nítrico, 100 mM por 10 min mantendo-se a temperatura de ebulição do solvente como constante para direcionar os experimentos seguintes.

5.2.1 Estabelecimento da quantidade de matéria-prima no sistema experimental.

Foram testadas 5 gramas de farinha de bagaço com 200 mL de solução ácida, 10g com 400 mL e 25g com 100 mL, a fim de verificar as influências sobre o rendimento gravimétrico das substâncias pécticas, com concentração de 100 mM, 10 min, 97°C, e na Tabela 7 são apresentados os resultados destes ensaios.

Tabela 7 – Influência da quantidade de matéria-prima no rendimento gravimétrico.

Matéria-prima (g)	Substâncias pécticas (g)	Rendimento (%)
5,206	0,838	16,09
10,006	1,418	14,17
25,017	3,559	14,22

Embora o sistema com 5g/200 mL tenha levado a um rendimento de 16,09 g/100g de substâncias pécticas, rendeu apenas 0,838g quantidade considerada pequena para a continuidade dos experimentos. Por outro lado com 25g levou ao rendimento pouco menor 14,22 g/100g, mas por causa do volume houve a necessidade de dividir em duas porções o que correspondia na prática a uma fração de 12,5g de matéria-prima, valor não muito diferente do ensaio com 10 g. No ensaio de 10g que se mostrou mais satisfatório, o rendimento foi de 14,17 g/100g e a quantidade de substâncias pécticas obtidas de 1,418g foram suficientes para continuidade dos experimentos.

A relação entre as substâncias pécticas extraídas e a matéria-prima confirma que aumentando a quantidade de matéria-prima será obtida uma quantidade maior de pectina, embora possa não ser interessante quanto ao rendimento gravimétrico e aos procedimentos práticos em laboratório.

Na Figura 15 está demonstrado a influência da quantidade de substâncias pécticas extraídas com o aumento da quantidade de matéria-prima, mostrando que na realidade os valores são muito próximos.

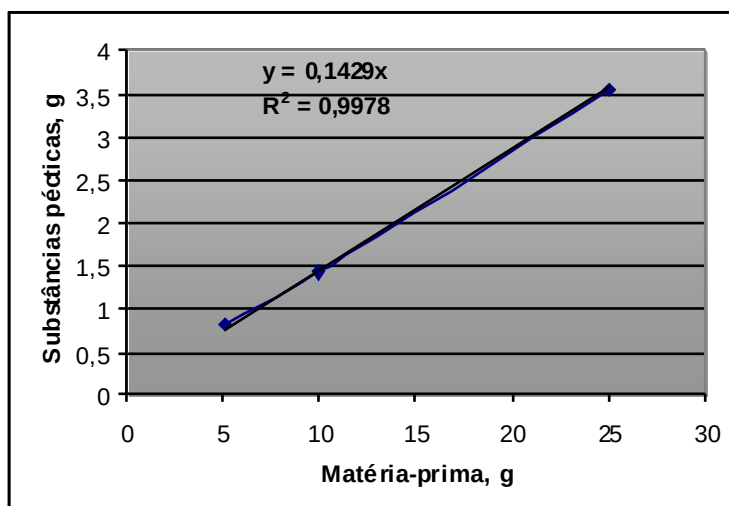


Figura 15 - Relacionamento entre a matéria prima e as substâncias pécticas extraídas com HNO_3 100 mM /10min, 97°C

Com estes resultados chegou-se a conclusão que 10g de matéria-prima era a quantidade necessária suficiente para o sistema experimental.

5.3 MODELO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E DA QUALIDADE DO PRODUTO

Quando uma solução de ácido nítrico é adicionada a uma mistura aquosa contendo bagaço de maçã em pó, muitas reações hidrolíticas ocorrem, rompendo a parede celular vegetal com liberação de pectinas solúveis com cadeias laterais contendo açúcares neutros.

A concentração do ácido, a temperatura e o tempo são fatores que podem promover também a destruição dos próprios polissacarídeos (CHO; HWANG, 2000). Segundo estes autores, é preciso lembrar que as condições dos ensaios devem direcionar o equilíbrio das reações positivas, que liberam os polímeros solúveis em ácido, com as reações negativas, que hidrolisam as ligações glicosídicas e ésteres.

Um modelo matemático para a extração ácida de pectina a partir de bagaço de maçã e a determinação de seus graus de esterificação, numa abordagem quantitativa e

Os resultados mostrados na tabela incluem os efeitos significativos da concentração do HNO_3 e do tempo, e não significativo da interação entre os dois. Os coeficientes negativos para os termos quadráticos indicam que a superfície apresenta um ponto estacionário máximo.

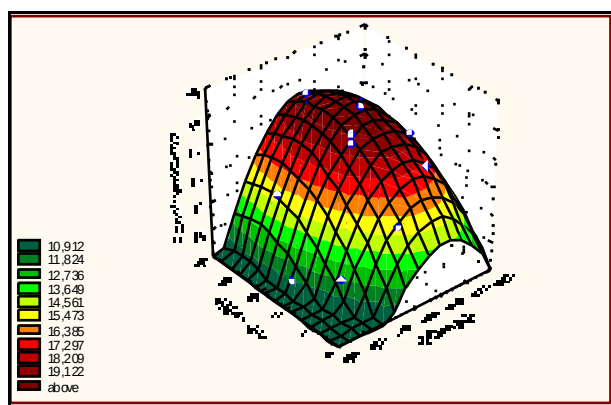
Na Tabela 10 são apresentados os resultados da análise de variância do modelo de rendimento gravimétrico.

Tabela 10 - Análise da variância

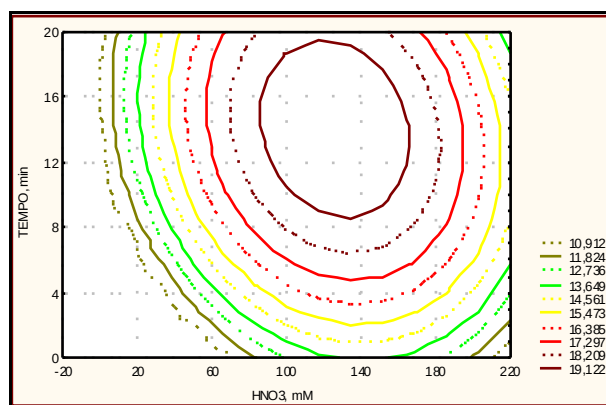
Fatores	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F_{cal}	$F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}}$	
Regressão	96,25	5	19,25	59,55	11,79	Significativo
Resíduos	1,61	5	0,32			
Falta de ajuste	1,26	3	0,45	3,53	0,18	Não Sign.
Erro puro	0,26	2	0,12			
Total	97,86	10				
% variância explicada = 0,983485		% máxima de variância explicável = 0,997382				

Estes resultados confirmaram a significância estatística da regressão tendo em vista que o F crítico é $F(5/5) = 5,05$ e a falta de ajuste não é significativa $F(3/2) = 19,16$. O modelo é eficaz com um coeficiente de determinação de 98,35% e um ajuste de 96,70%, tendo uma variância explicável de 98,35% e um máximo explicável de 99,74%.

A Figura 16 (A) ilustra a superfície de resposta do modelo em três dimensões (3D) e a Figura 16 (B), a sua projeção em curvas de níveis em duas dimensões (2D).



(A)



(B)

Figura 16 - A influência da concentração de ácido e do tempo sobre o rendimento gravimétrico do processo de extração de substâncias pécicas ilustradas (A) por superfície de resposta e (B) por curvas de nível.

O elevado efeito da concentração do ácido e o menor efeito do tempo pode ser observado nesta figura, embora ambos fatores tenham influencia positivas e negativas (CHO; HWANG, 2000). Pode ser enfatizado que aumentando a concentração e o tempo ocorre mais extração do que destruição da pectina e que no ponto máximo ambas as reações estão em equilíbrio. Com a continuidade do aumento da concentração e do tempo ocorre um predomínio das reações de degradação, com decréscimo do rendimento. A Figura 16 (B) é útil para identificar as coordenadas do ponto estacionário, que na realidade encontra-se na região que apresentam altos valores de rendimento gravimétrico.

As coordenadas do ponto estacionário foram calculadas derivando-se a equação preditiva em relação a X1 e a X2, e resolvendo as duas equações com as duas incógnitas, levando aos valores das coordenadas (0,400; 0,814) que decodificadas representa as condições 126 mM e 14,07 min com um valor máximo de 20,07 g.

$$Y = 19,01004 + 2,32350 \cdot X_1 - 2,47928 \cdot X_1^2 + 1,48502 \cdot X_2 - 0,81627 \cdot X_2^2 - 0,41250 \cdot X_1 \cdot X_2$$

5.3.2 Grau de esterificação

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados do planejamento experimental assim como os previstos pelo modelo e os resíduos, que são as diferença dos dois conjuntos.

Tabela 11 - Resultados da modelo em grau de esterificação

Ensaio	Grau de esterificação, %		
	Visto	Previsto	Resíduo
1	67,5700	67,0904	0,47956
2	64,3600	63,7978	0,56222
3	49,5500	48,3342	1,21581
4	47,7300	46,4315	1,29847
5	48,6100	50,7863	-2,17630
6	52,4800	50,7863	1,69370

7	51.2700	50,7863	0,48370
8	69,0100	69,3786	-0,36859
9	42,4300	43,8400	-1,40998
10	57,2200	58,0508	-0,83083
11	53,4300	54,3777	-0,94774

O ensaio feito em triplicata foi usado para determinar o desvio padrão de 1,979508. O gráfico de dispersão entre os valores visto e o previsto mostrou uma tendência linear com o R^2 de 97,96%

Na Tabela 12 está apresentado o modelo para o grau de esterificação das pectinas extraídas.

Tabela 12 – Os coeficientes do modelo em grau de esterificação

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	t(5)	P	Limite de confiança 95%	Limite de confiança 95%
Média.	50,78	1,00	50,33	0,00	48,19	53,37
X1(L)	-9,03	0,61	-14,61	0,00	-10,61	-7,44
X1(Q)	2,91	0,73	3,96	0,01	1,02	4,80
X2 (L)	-1,30	0,61	-2,10	0,09	-2,88	0,30
X2(Q)	2,71	0,73	3,70	0,01	0,82	4,60
1L by 2L	0,34	0,87	0,40	0,71	-1,90	2,60
$R^2 = 0,97966$; Ajuste = 0,95932; MS Resíduo = 3,054288						

Na Tabela 12 são apresentados os coeficientes do modelo para o grau de esterificação das pectinas extraídas e os principais efeitos são negativos e quanto à concentração de ácido em primeiro lugar e o tempo em seguida, com menor influência, mas sem explicação estatística. Os coeficientes positivos para ambos os termos quadráticos indicam que a superfície de resposta apresenta um ponto estacionário mínimo.

Na Tabela 13 são apresentados os resultados da análise de variância do modelo de grau de esterificação.

Tabela 13 – Análise da variância do modelo em grau de esterificação

Fatores	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F_{cal}	F_{cal}/F_{tab}	
Regressão	735,51	5	147,10	48,16	9,53	Significativo

Resíduos	15,27	5	3,05			
Falta de ajuste	7,43	3	2,47	0,63	0,03	Não Sign.
Erro puro	7,83	2	3,92			
Total	750,78	10				
% variância explicada = 0,979658			% variância máxima explicável = 0,989559			

Estes resultados confirmam a significância estatística da regressão tendo em vista que o $F(5/5)$ crítico é 5,05 e a falta de ajuste não é significativa $F(3/2) = 19,16$. O modelo é eficaz com um coeficiente de determinação de 97,96% e um ajuste de 95,93%, tendo uma variância explicável de 97,96% e uma máxima variância explicável de 98,95%.

A Figura 17 (A) ilustra a superfície de resposta do modelo em 3D e a Figura 17 (B), a sua projeção em curvas de níveis em 2D.

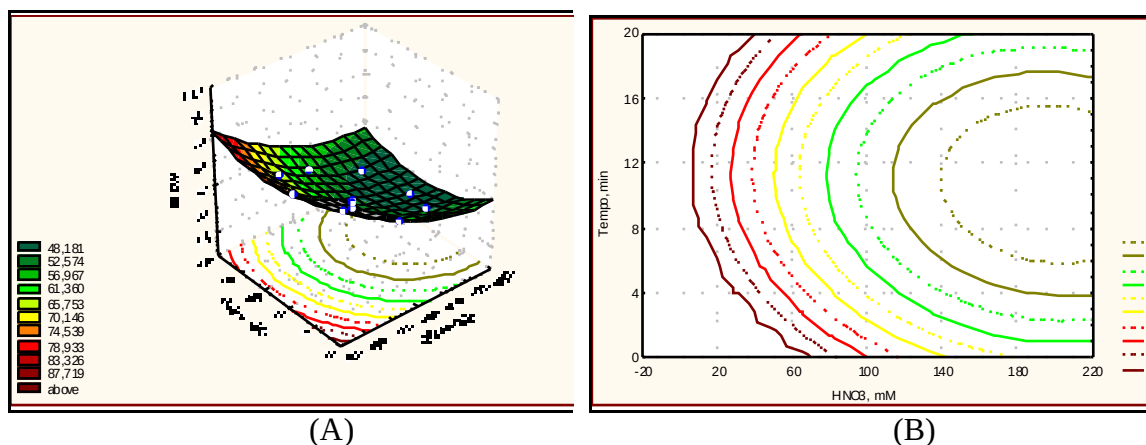


Figura 17 - A influência da concentração de ácido e do tempo sobre a qualidade do produto ilustrada (A) por superfície de resposta e (B) por curvas de nível.

Os elevados efeitos negativos da concentração de ácido e do tempo sobre o grau de esterificação são visíveis, como esperado, pois as condições favoreceram a reação de desmetoxilação, que transformou HMP em LMP (CONSTENLA; LOZANO, 2003). A Figura 17 (B) é útil para ter uma idéia das coordenadas para os valores mais baixos do grau de esterificação da pectina extraída, que aparentemente está nos limites do domínio do delineamento experimental. A qualidade das pectinas está diretamente relacionada à

concentração e ao tipo do ácido, à temperatura e ao tempo de reação (SCHEMIN, 2003) e o modelo aqui apresentado dá suporte à predição da quantidade e da qualidade dos produtos.

As coordenadas do ponto estacionário foram calculadas derivando-se a equação preditiva em relação a X1 e a X2, e resolvendo as duas equações com as duas incógnitas, levando aos valores das coordenadas (1,546; 0,140) que decodificadas representam as condições 200 mM e 10,07 min com um valor máximo de 43,73 g.

$$Y = 50,78548 - 9,03123 \cdot X_1 + 2,91368 \cdot X_1^2 - 1,29713 \cdot X_2 + 2,71461 \cdot X_2^2 + 0,34565 \cdot X_1 \cdot X_2$$

Na Tabela 14 são mostrados os valores das coordenadas do ponto estacionário de cada modelo.

Tabela14 – Valores preditos em coordenadas específicas

Variável codificada		Variável decodificada		Rendimento	DE %
X1	X2	HNO3 mM	Tempo, min	g/100 g	
0	0	100	10	19,01	50,78
0,400	0,814	126	14,07	20,07	48,49
1,546	0,140	200	10,07	16,77	43,73

O modelo relacionado ao rendimento gravimétrico da extração de pectina foi utilizado para encontrar as coordenadas do ponto estacionário que representa um valor máximo uma vez que os dois coeficientes dos termos quadráticos são negativos. A aplicação da fórmula mostra o valor máximo de pectina, de 20,07 g/100 g quando a concentração de HNO₃ é 126 mM com um tempo de reação de 14, 07 min. Nestas condições, o grau de esterificação, calculado pelo modelo adequado, deve ser 48,49%.

Estas coordenadas não estão muito distantes das coordenadas do ponto central do planejamento experimental.

O modelo apresentado com relação ao grau de esterificação foi utilizado para encontrar as coordenadas do ponto estacionário que representa o valor mínimo uma vez que ambos os coeficientes quadráticos são positivos. O mais baixo grau de esterificação foi 44,3 % quando a concentração de HNO_3 foi 200 mM e o tempo de reação é de 10,07 min. Nestas coordenadas o modelo para o rendimento gravimétrico prevê o valor de 16,77 g/100 g.

Nas coordenadas do ponto central do planejamento de experimentos (100 mM; 10 min) o valor esperado é de 19,01 g/100 g se aproxima do previsto máximo de 20,07 g/100 g uma vez que representa um diferencial menor que 5% sendo ainda que ambos os valores estão categorizadas em dois níveis contíguos na projeção 2D da superfície de resposta. Deve ser lembrado que a sensibilidade dos procedimentos práticos de obtenção de pectina está muito aquém dos cálculos teóricos o que pode ser observado pelo desvio padrão dos ensaios do ponto central feito em triplicata.

Existe uma grande diferença entre ambos os conjuntos de coordenadas que representam os pontos estacionários dos dois modelos. Os melhores resultados são encontrados nas coordenadas escolhidas como o ponto central do desenho experimental por que há um elevado rendimento gravimétrico 19,01 g/100 g de uma LMP (50,78%). Deve ser mencionado ainda que tais condições devem proporcionar uma pectina menos despolimerizada com um grau de esterificação mais próximo de 50%.

5.4 CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DAS PECTINAS EXPERIMENTAL E COMERCIAIS.

A amostra de pectina experimental, extraída com HNO_3 , 100 mM a 97° C por 10 minutos, foi comparada com as amostras de pectinas comerciais de alto e baixo grau de esterificação de acordo com suas características titulométricas, espectroscópicas FT-IR, cromatográficas incluindo exclusão estérica e composição em açúcares neutros.

5.4.1 Características de qualidade titulométricas

Pelo método titulométrico foram determinadas as características de qualidade que compreendem os teores de ácidos anidrogacturônico (AUA) e de metoxilas (MeO), cuja soma representa o percentual de ácido poligacturônico (fração ácida), sendo o restante o percentual acompanhante de açúcares neutros (fração neutra) da pectina (100%). O grau de esterificação (DE) independe da quantidade de massa uma vez que pela fórmula utilizada trata-se de uma razão entre a fração ácido anidrogacturônico metoxilado e a fração ácido anidrogacturônico total.

Os resultados da comparação estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Característica titulométrica das pectinas experimental e comerciais.

Amostra	AUA	MEO	DE	Fração ácida	Fração neutra
HNO_3^*	53,75± 2,90	4,81±0,81	50,78±6,74	58,57±3,62	41,43±3,62
HMP	61,41± 0,42	8,45±0,075	75,7±0,17	69,83±0,49	30,17±0,49
LMP	55,99 ± 0,24	5,02±0,035	49,34±0,42	60,98±0,25	39,02±0,25

(* amostra experimental = ácido HNO_3 , 100 mM, 10 min, 97°C)

HMP: pectina de alta esterificação;

LMP: pectina de baixa esterificação

Existe uma semelhança entre a amostra experimental e a amostra LMP comercial em termos de conteúdo de ácido poligacturônico, com valor médio de 55,99%, o que difere dos 61,41% da amostra HMP comercial. Este fato se repete quanto

ao teor de metoxila, com valor médio de 4,81% e que difere em muito do valor 8,45% da amostras HMP comercial. Portanto a amostra experimental se assemelha mais à amostra comercial LMP do que à HMP, em termos de teores de ácido poligalacturônico e metoxilas. Os valores encontrados para ácido poligalacturônico totais são inferiores aos 65% preconizados pela FAO (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006), portanto a fração neutra será superior aos 35% uma vez que a soma das frações representa o total das substâncias pécticas.

A determinação do grau de esterificação leva à mesma conclusão, pois a amostra experimental (50,78%) tem um valor mais próximo da LMP (49,34%) do que da HMP (75,7%).

A Figura 18 foi elaborada com os resultados das análises titulométricas para ilustrar as semelhanças e diferenças entre as três amostras de pectina.

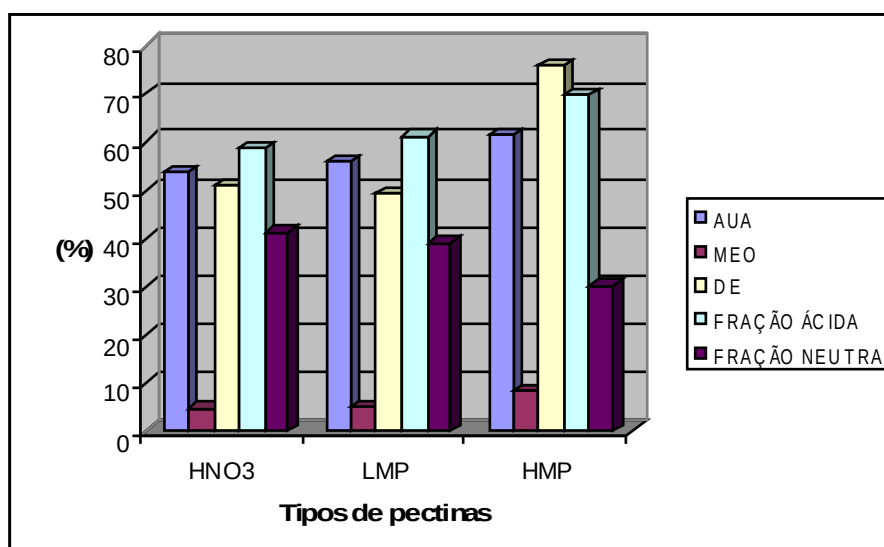


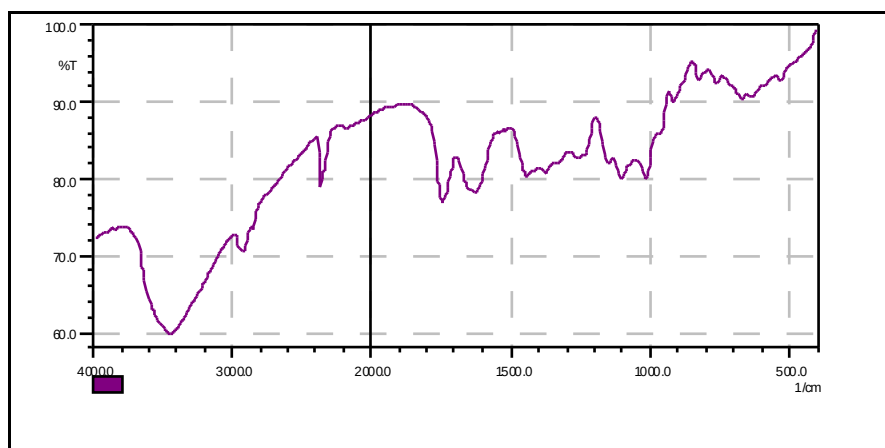
Figura 18 - Características de qualidade físico-química de pectinas (AUA: ácido Anidrogálaturônico, MEO: teor de metoxilas, DE: grau de esterificação).

5.4.2 Características de qualidade espectroscópica de infravermelho (FT-IR)

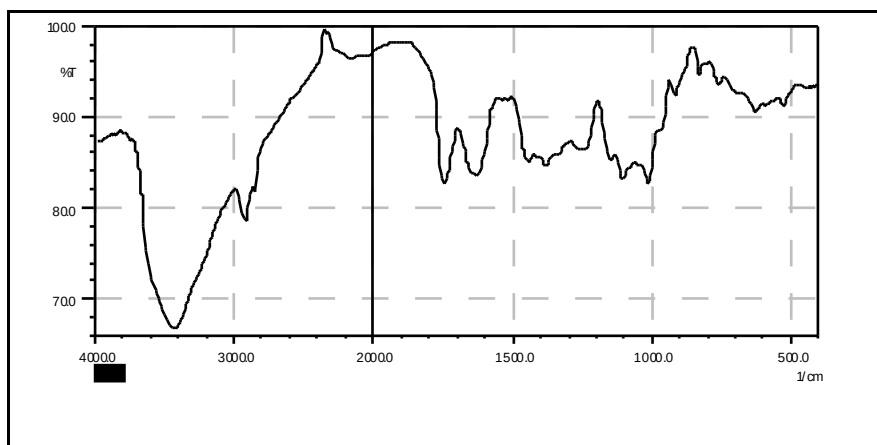
As pectinas extraídas sob aumento da quantidade de matéria-prima foram analisadas quanto ao grau de esterificação, utilizando espectroscopia de infravermelho (FT-IR), que permite identificar grupos funcionais em diferentes regiões do espectro.

Os autores Monsoor, Kalapathy e Proctor (2001) demonstraram que a faixa entre 1000 e 2000 cm^{-1} é a região importante para identificação de grupos funcionais do ácido galacturônico, uma vez que as carboxilas livres absorvem em aproximadamente 1620 cm^{-1} e as esterificadas em 1750 cm^{-1} . A ampla e forte faixa de absorção entre 2400 e 3600 cm^{-1} corresponde aos estiramentos dos grupos hidroxilas relativos à umidade das amostras de pectina. Os picos na faixa entre 3000 e 2800 estão relacionados às ligações C-H e CH_3 dos grupamentos metil éster. A região mais importante para a determinação do grau de esterificação das pectinas é aquela relacionada diretamente aos grupos carboxílicos apesar da influência das demais.

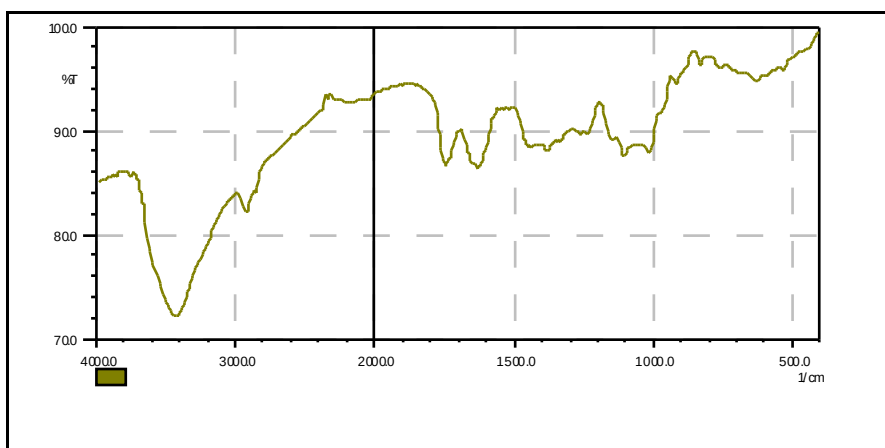
Na Figura 19(A, B e C) estão apresentados os espectros de infravermelho, em transmitância, das pectinas isoladas sob idênticas condições, porém com maior quantidade de matéria-prima. A média dos valores do grau de esterificação encontrado, de $42,7\% \pm 0,814\%$, está coerente com valor convencional de pectinas de baixos teores de esterificação (LMP) e demonstram espectros com perfis característicos. O valor médio encontrado é todavia relativamente mais baixo do que os 51% calculados por titulometria e apresentado na Tabela 15, sugerindo a importância da contribuição de outras bandas na determinação do valor correto (MONSOOR, KALAPATHY; PROCTOR, 2001). Marcon (2004), entretanto, apresentou os espectros FT-IR de duas amostras padrões de pectinas de alto (89 % e 67%) e uma de baixo (22 %) grau de esterificação, evidenciando as diferenças precisamente nas frequências anteriormente citadas, especificamente dos picos referentes às carboxilas livres e esterificadas.



A) 5g/ 200 mL, 100 mM, 10 min., 97 °C. DE = 43,1%



B) 10 g / 400 mL, 100 mM, 10 min., 97 °C. DE = 43,3 %

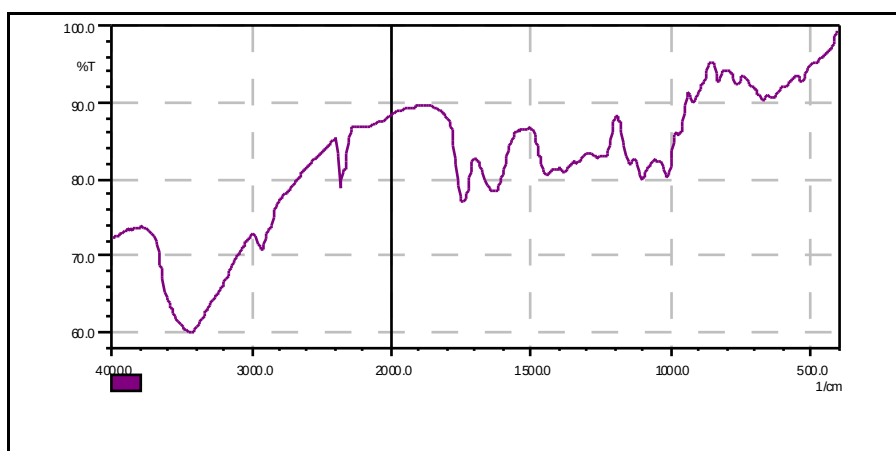


C) 25g / 1000 mL, 100 mM, 10 min., 97 °C. DE = 41,8 %

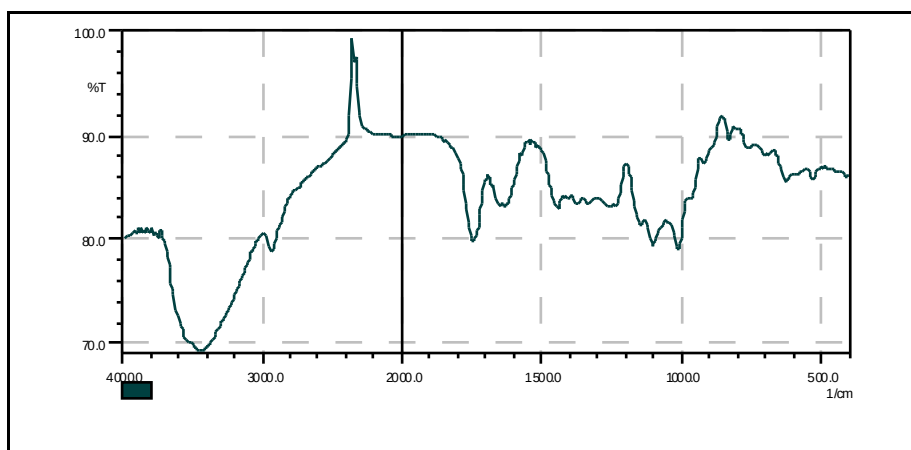
Figura 19 - Caracterização espectroscópicas FT-IR das substâncias pécnicas extraídas com ácido nítrico (100 mM; 10 min; 97°C) a partir de 5 g/200 g (A); 10 g/400g (B) e 25 g/1000g (C).

Os espectros de transmissão por FT-IR da amostra experimental e comerciais de pectinas são apresentados na Figura 20 para comparação do perfil espectroscópico. Com esta análise é possível avaliar a qualidade da pectina extraída experimentalmente e compará-las com a literatura disponível, pois a amostra experimental apresentou o mesmo perfil comprovando a sua semelhança com as pectinas extraídas industrialmente. A amostra experimental demonstrou maior semelhança à amostra comercial de baixa esterificação (LMP) tanto ao perfil espectroscópico quanto ao grau de esterificação

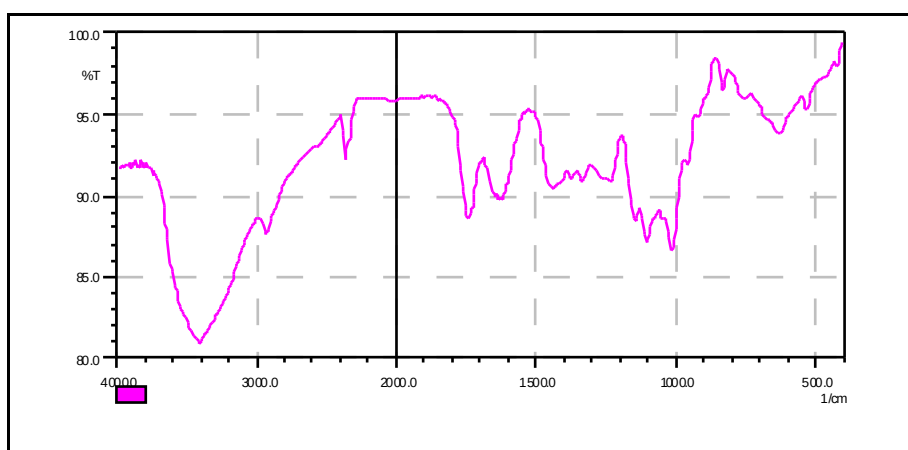
calculado pela razão das áreas dos picos relativos aos grupamentos carboxílicos esterificados e pela área total dos picos relativos aos grupamentos carboxílicos totais.



A) HNO₃ ponto central 100 mM 10 min/97°C; DE =44%



B) FT-IR da amostra HMP comercial; DE = 62%



C) FT-IR da amostra LMP comercial; DE = 49%

Figura 20 - Espectroscopia de infravermelho das amostras experimental (A) e comerciais (B) e

(C).

5.4.3 Características de qualidade cromatográfica

Com o emprego de técnicas cromatográficas foram qualificadas as amostras de pectina quanto à sua dispersão em tamanho molecular com permeação em gel, tendo sido detectados por espalhamento de luz em multiângulos (LS) - cor vermelha, e pelo índice de refração (IR) - cor azul. Também foram caracterizadas as pectinas por cromatografia gasosa com relação aos seus conteúdos em açúcares neutros, reduzindo-os à alditóis e confirmando sua estrutura por espectroscopia de massa.

5.4.3.1 Cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS)

Na Tabela 16 são mostrados os resultados da cromatografia em HPSEC-MALLS das três amostras de pectina em termos e tempos de retenção considerando o detector de espalhamento de luz (LS- 90°) e índice de refração.

Tabela 16 - Tempo de retenção de pectinas em minutos.

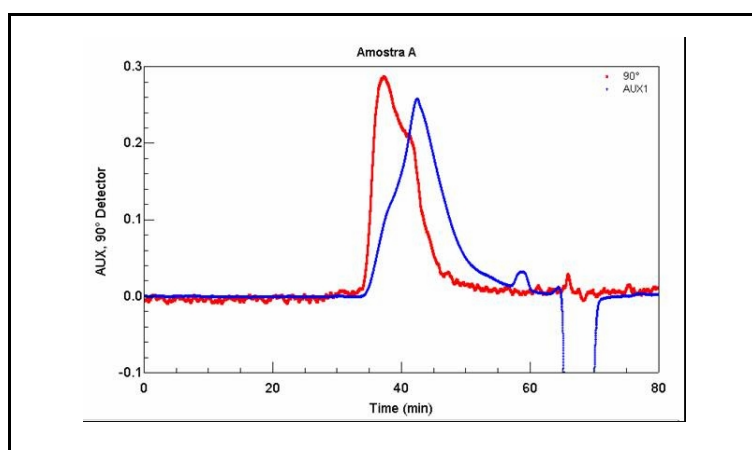
Amostra	Tempo inicial	Tempo do pico	Tempo final	Amplitude
HNO ₃ *	33,56	37,29	44,07	10,51
HMP	34,00	38,00	46,67	12,67
LMP	34,24	38,64	47,80	13,56

(* amostra experimental = ácido HNO₃, 100 mM, 10 min, 97°C)

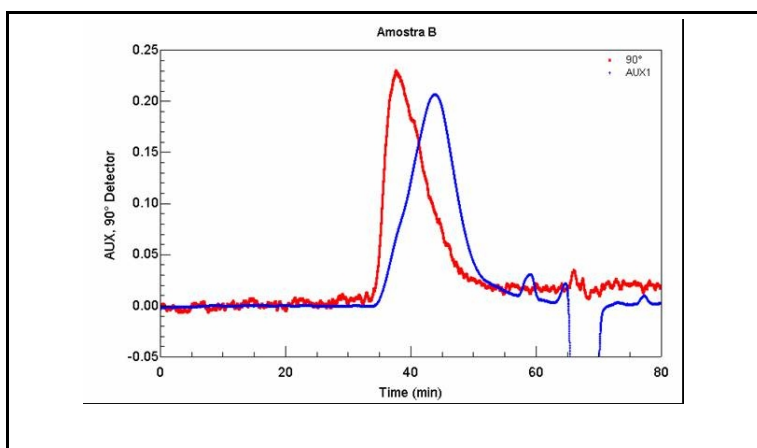
A análise dos tempos iniciais de retenção ao valor médio de 33,56 min indica que se trata de polímeros de elevada massa molecular, enquanto a amplitude dá uma idéia da distribuição das moléculas.

A amostra de pectina experimental apresentou menor tempo de retenção mesmo assim semelhante às amostras comerciais eluindo moléculas maiores primeiro como sugere a técnica cromatográfica, entretanto o índice de refração representa uma distribuição heterogênea com moléculas de tamanhos variados.

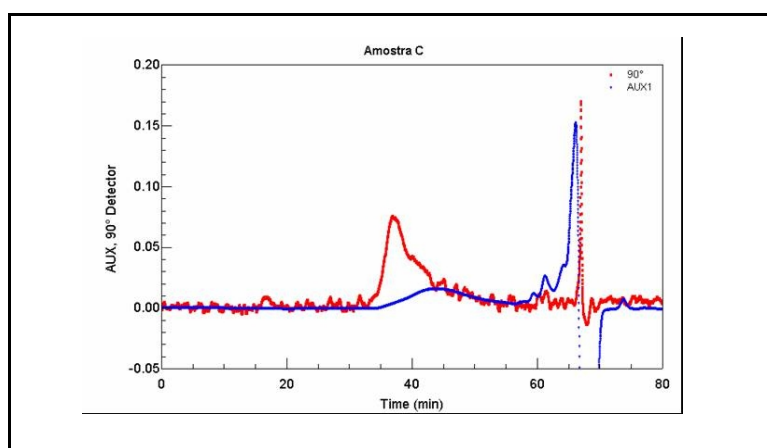
A Figura 21 ilustra com os cromatogramas das amostras de pectina.



(A)



(B)



(C)

Figura 21 - Cromatogramas em HPSEC-MALLS das amostras de pectina comercial (A) HMP e (B) LMP e (C) amostra experimental = HNO_3 , 100 mM, 10 min, 97°C, (Gráfico vermelho: espalhamento de luz (LS); em azul: índice de refração (IR)).

Os perfis das três amostras se apresentam semelhantes com o tempo de eluição das moléculas de alta massa molar em aproximadamente 34 min, representado pelo gráfico em vermelho referindo-se ao espalhamento de luz. O índice de refração, representado pelo gráfico em azul, confirma a distribuição da maior quantidade de moléculas de pectina com tempo de eluição por volta de 45 min.

As frações extraídas de bagaço desidratado de maçã por Marcon (2004) segundo um planejamento fatorial 2^2 e triplicata do ponto central, com ácido cítrico a 5g% apresentaram perfis com tempos de eluição variando de 34 a 38 min o que revela uma massa molar semelhante à encontrada neste trabalho, com eluição em 34 min, embora as condições de extração tenham sido diferentes.

5.4.3.2 Composição em monossacarídeos (GLC)

Na Tabela 17 são apresentados os tempos de retenção em cromatografia líquido-gasosa dos padrões de açúcares e os dos açúcares presentes nas amostras, mediante os quais estes podem ser identificados por comparação.

Tabela 17 - Identificação dos açúcares neutros pela mobilidade cromatográfica (GLC).

	Velocidade de eluição, min.						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Padrões	7,902	8,137	9,592	11,284	15,967	17,236	18,902
Amostra*	7,904	8,150	9,596	11,297	16,099	17,256	18,943
	± 4,84		± 5,17	± 8,41	± 118,26	± 10,28	± 24,75

(* amostra experimental, ácido HNO₃, 100 mM, 10 min, 97°C)

Além de terem sido identificados os açúcares que são considerados como parte da estrutura, nominalmente a ramnose, arabinose, galactose, xilose e manose, foi constatada a presença de fucose, um açúcar considerado raro em pectinas, na amostra extraída experimentalmente de bagaço de maçã.

De acordo com Kravitchenko, Voragen e Pilnik (1991), os açúcares arabinose, galactose, xilose e glucose estão ligados ao carbono 4 da ramnose, embora os três primeiros já tenham sido encontrados ligados aos resíduos de ácido galacturônico e a fucose, embora considerada um açúcar raro, já foi encontrado em certas substâncias pécicas sem que se tenha determinado o local de sua ligação.

Na Tabela 18 são apresentados os resultados da análise por espectroscopia de massa dos eluatos da cromatografia gasosa, sendo indicados os fragmentos moleculares considerando a sua intensidade relativa por ordem decrescente.

Tabela 18 - Identificação dos açúcares neutros pela composição dos fragmentos obtidos em espectrógrafo de massa

Fração	Rha %	Fuc %	Ara %	Xyl %	Man %	Gal %	Glc %
Padrões	128 115 85 99 187	128 115 187 85 99 155	115 85 187 127 145 217	115 85 145 127 103 217 187	139 115 187 97 127 85 145	139 115 187 127 85 97	115 139 187 127 85 97 145
HNO₃ *	128 115 85 99 187	128 115 85 100 187 155	115 85 187 127 145 217	115 85 145 127 103 217 187	139 115 97 187 127 85 145	139 187 115 127 85 97	139 115 187 127 85 97 145
HMP	128 115 85 99		115 85 127 187 145 217	115 85 145 103 127 217	139 115 127 97 85 187	139 115 187 127 85 97	115 139 127 187 85 97 145
LMP	115 128 85		115 85 145 127 217	115 85 145 127 103 217	139 115 97 127 85 187	139 187 115 127 85 97	115 139 187 127 85 97 145

(* amostra experimental, ácido HNO₃, 100 mM, 10 min, 97°C)

Na Tabela 19 são apresentados os teores relativos de açúcares neutros presentes nas frações experimental e comerciais de pectina como parte agregada à estrutura do polissacarídeo ácido.

Tabela 19 - Proporção relativa de açúcares neutros identificados nas amostras

Fração	Rha %	Fuc %	Ara %	Xyl %	Man %	Gal %	Glc %
HNO ₃ *	3,44	0,72	8,01	11,93	3,65	40,51	31,70
HMP	2,16	-	19,58	7,55	1,31	49,70	19,70
LMP	3,65	-	4,34	12,40	2,87	56,23	20,47

(* amostra experimental = ácido HNO₃, 100 mM, 10 min, 97°C)

É possível observar que as proporções dos componentes monossacarídicos neutros da fração experimental são intermediárias se comparados com as frações comerciais no que diz respeito à ramnose, arabinose e xilose, mas são mais elevadas quanto à manose e glucose. Na amostra experimental foi encontrada a menor proporção

de galactose e também de fucose, uma metil-pentose, usualmente não presente em amostras de pectinas.

Na Tabela 20 estão apresentados os resultados combinados do método titulométrico, que fornece as proporções da fração ácida, com os do cromatográfico, que possibilita estabelecer as proporções de cada um dos açúcares neutros. Nesta tabela constam os valores relativos às metoxilas apenas para completar os valores em 100%.

Tabela 20 - Proporção relativa dos açúcares neutros e ácidos

Fração	Cadeia principal			Cadeias laterais					
	AUA	MeO	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
	%								
HNO ₃ *	53,75	4,81	1,42	0,29	3,31	4,95	1,51	16,78	13,31
HMP	61,41	8,45	0,65	0	5,90	2,27	0,40	14,99	5,94
LMP	60,00	5,02	1,27	0	1,51	4,33	1,00	19,66	7,16

(* amostra experimental = ácido HNO₃, 100 mM, 10 min, 97°C)

Os teores de ácido galacturônico e de metoxilas já caracterizaram a amostra experimental como de baixo grau de esterificação, e nesta tabela pode ser observado que os teores de ramnose são semelhantes nas duas amostras. Na amostra experimental foram encontrados resíduos de fucose, açúcar considerado raro em pectina de maçã mas já relatado por Renard, Crepeau e Thibault (1995) e por Marcon (2004).

Na Tabela 21 estão apresentadas as razões entre os percentuais dos açúcares que fazem parte da cadeia principal e parte das cadeias laterais.

Tabela 21 - Relações entre os açúcares da cadeia principal e os das cadeias laterais

Fração	Acido galacturônico por ramnose	Galactose + arabinose por ramnose	Galactose + arabinose por ácido galacturônico
HNO ₃ *	37,85	14,17	0,37
HMP	94,48	32,14	0,34
LMP	47,24	16,67	0,35

(* amostra experimental = ácido HNO₃, 100 mM, 10 min, 97°C)

A relação entre ácidos galacturônicos e ramnose indicam quantas moléculas do ácido fazem parte da cadeia por unidade de ramnose. Os valores encontrados para as pectinas de baixa metoxilação foram de 47, 24:1 e 37, 85:1 para as frações comercial e experimental, respectivamente; no caso de HMP a relação é 94, 48:1. De acordo com Wang; Pagán e Shi, (2002) as razões encontradas foram de 25:1 a 35:1, o que significa que existe um resíduo de ramnose a cada 25-35 resíduos de ácido galacturônico. Entretanto, segundo Renard, Crépeau e Thibault (1995) a ramnose está presente na pectina de maçã em uma proporção de 22% na fração ácida e o restante na fração ramificada, o que acarreta um número muito maior de resíduos de ácido galacturônico por unidade de ramnose.

As proporções da somatória dos dois principais açúcares neutros das pectinas, arabinose e galactose com a ramnose indicam as possibilidades de tamanho de cadeia lateral. Neste estudo as pectinas de baixo teor de metoxilas apresentaram valores de 14, 17:1 e 16, 67:1, muito diferentes do valor encontrado para a HMP, que foi de 32:1. Como há possibilidade de ligações da galactose e da arabinose diretamente no ácido urônico (KRAVTCHENKO; VORAGEN; PILNIK, 1991), foi calculada a proporção da somatória dos dois açúcares e os valores encontrados são baixos e da mesma ordem de grandeza para todas as amostras.

A Figura 22 ilustra a proporção dos ácidos urônicos e da somatória dos açúcares galactose e arabinose por unidade de ramnose.

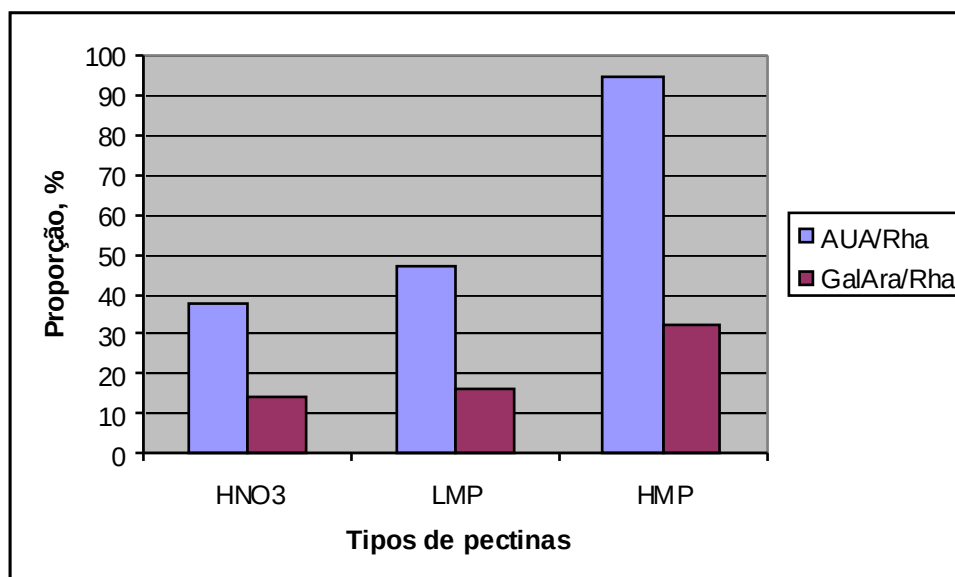


Figura 22 - Proporção dos ácidos urônicos e da somatória dos açúcares galactose e arabinose por unidade de ramnose.

6 CONCLUSÕES

O teor de umidade de 11% é adequado para o armazenamento do bagaço em pó, sendo que a composição físico-química apresentou 29% de açúcares redutores totais e 36% de fibras, incluindo as pectinas, em base seca.

O processo de solubilização da protopectina de bagaço de maçã com diferentes ácidos de 1 a 750 mM (10 min/100°C), definiu o ácido nítrico como melhor agente extrator.

Com ácidos diluídos até 100 mM o processo de extração seguiu tendências logarítmicas ou lineares com $R^2 > 95\%$.

O ensaio mais adequado para extração de pectina em laboratório foi com 10 g de bagaço em pó em 400 mL de volume total.

O planejamento experimental foi eficiente para o rendimento com resultados significativos ao nível de 98%.

O grau de esterificação apresentou resultados significativos e confirmou a extração de uma pectina de baixo grau de esterificação (LMP).

A amostra experimental apresentou proporções distintas de monossacarídeos assim como as amostras comerciais.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. A Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydrate Chemistry**, New York, n.5, p.269, 1965.
- ASPINALL, G. O. Isolation and fractionation of polysaccharides, In: ASPINALL, G.O. **The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1982.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução n. 386, de 5 de agosto de 1999**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/leisref/public.html>. Acesso em: 17 jan.2006
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2002
- BERK, Z. **Braverman's Introduction to the biochemistry of foods**. Amsterdam: Elsevier, 1976. Cap.9, p.131-147.
- BIRUS, T. **Moderne Apfelsaft-Technologie**. Schonborn: Flüssiges Obst GmbH, 2003
- BOCHEK, A.M.; ZABIVALOVA, N.M.; PETROPAVLOVSKII, G.A. Determination of the esterification degree of poly galacturonic acid. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v.74, n.5, p.775-777, 2001.
- BRANDÃO, E.M.; ANDRADE, C.T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n.2, jul./set. 1999.
- CARVALHO, G.G.P.; FERNANDES, F.E.P.; PIRES, A.J.V. Métodos de determinação dos teores de amido e pectina em alimentos para animais. **Revista Eletrônica de Veterinária-REDVET**, v.7, n.1, Enero, 2006
- CHO, Y.-J. ; HWANG, J.-K. Modeling the yield and intrinsic viscosity of pectin in acidic solubilization of apple pomace. **Journal of Food Engineering**, v. 44, p. 85-89, 2000
- CONSTENLA, D.; LOZANO, J.E.; Kinetic model of pectin demethylation. **Latin American Applied Research**, v.33, p. 91-96, 2003.
- CONSTENLA, D.; PONCE, A.G. LOZANO, J.E. Effect of pomace drying on apple pectin, **Lebensm.-Wiss. U-technol**, v. 35, p. 216-221, 2002
- ENDREß, H.U. High quality resulting from product integrated environment protection –PIUS. **Fruit Processing**, v.7, p. 273-276, 2000.
- ENDREß, H.U.; RENTSCHLER, C.; HERBSTREITH-FOX, K.G.; NEUENBURG, P.F.; Chances and limits for the use of pectin as emulsifier – Part 1. **Ingredients & Products**.

The European food review , summer, p.49-53, 1999

FERTONANI, H.C.R, SIMÕES, D.; NOGUEIRA, A ; WOSIACKI G. Potencial da variedade joaquina para processamento de suco clarificado e vinho seco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006.(no prelo)

FOOD CHEMICAL CODEX. 3. ed. Washington: National Academy of Science, 1981. p.215-17

GILSENAM, P.M.; RICHARDSON,R.K.; MORRIS,E.R. Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin. **Carbohydrate Polymers**, n.41, p.339-349, 2000

HANG, Y.D. Production of fuels and chemicals from apple pomace. **Food Technology**, v.41, n. 3, p. 115-117, 1987.

IGLESIAS, M.T.; LOZANO, J.E.; Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, n. 62, p. 215-223, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. Normas analíticas. 3 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

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

JOSHI, V.K.; KAUSHAL, N.K. Composition of apple pomace, standardization of pulp making, preparation and evaluation of apple pomace jam. **Research and Industry**, v. 40, p. 203-207, 1995

KENNEDY, M. LIST, D. LU, Y.; FOO, L.Y.; NEWMAN, R.H.; SIMS, I.M.; BAIN, P.J.S.; HAMILTON, B.;FENTON, G. Apple pomace and products derived from apple pomace: uses, composition and analysis. **Modern methods of plant analysis**, v. 20, p. 75-119,1999

KERTESZ, Z.I. **The pectic substances**. New York: Interscience, 1951.

KRAVTCHENKO, T.P.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 17- 25, 1991

KROKIDA, M.K.; KIRANOUDIS, C.T.; MAROULIS, Z.B.; MARINOS-KOURIS, D. Drying related properties of apple. **Drying Technology**, v. 18, n.6, p. 1251-1267, 2000.

LEVIGNE, S.; RALET, M.C.; THIBAUT, J.F. characterisation of pectins extracted from Fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. **Carbohydrate Polymers**, n. 49, p. 145-153, 2002

MARCON, M.V. PETKOWICZ, C.L.O.; CARNEIRO, P.I.B.; WOSIACKI, G.; CARNEIRO, E.B.B.; Pectins from apple pomace. **Polímeros – Ciência e Tecnologia**, v.15, n.2, p.114-115, 2005.

MARCON, M.V. **Extração e caracterização de pectinas obtidas de farinha de bagaço de maçã**. 2004, 123f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa

MONSOOR, M.A.; KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 74, p. 233-238, 2001

MOORHOUSE, R. Ubiquitous hydrocolloid. **The World of Food Ingredients**, p. 24-30, Set., 2004

NELSON, N. A photometric adaptation of the somogyi method for determination of glucose. **Journal Biology Chemistry**, v.165, 1944, p.375

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L.D.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G. Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. **SEMINA**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 179-186, abr./jun., 2005

NOVOSEL' SKAYA, I.L.; VOROPAEVA, N.L.; SEMENOVA, L.N.; RASHIDOVA, S. SH. Trends in the science and applications of pectins. **Chemistry of Natural Compounds**, v.36, n. 1, 2000

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F. WOSIACKI, G. Análise de aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando suas avaliações físico-químicas (dados das safras de 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.6, p. 1336 -1343, nov./dez., 2004.

PEREIRA, A. J.; BONETI, J.I.S.; BRIGHENTI, E.; DENARDI, F.; CAMILO, A.P. **Joaquina**: nova cultivar de macieira resistente à sarna e de maturação precoce. Florianópolis: Epagri, 2002. 1 Folder.

PRADE, R.A.; ZHAN, D.; AYOUBI, P.; MORT, A.J. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.16, p. 361- 381, apr., 1999

RENARD, C. M. G. C.; ROHOU, Y.; DELLA VALLE, G.; THIBAUT, J.-F.; HUBERT, C.; SAVINA, J.-P. Bleaching of apple pomace by hydrogen peroxide in alkaline conditions: Optimisation and characterisation of the products. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 398-405., 1997.

RENARD, C.M.G.C.; CRÉPEAU, M.J.; THIBAUT, J.F. Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins, **Carbohydrate research**, v. 275, p.155-165, 1995.

RENARD, C.M.G.C.; THIBAUT, J.F. Structure and properties of apple and sugar-beet pectins extracted by chelating agents. **Carbohydrate Research**, n.224, p. 99-114, 1993.
RIDLEY, B.L.; O'NEILL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and Oligogalacturonide - related signaling **Phytochemistry**, n.57, p. 929-967, 2001.

RSK-Wert. Die Gesamtdarstellung. Bonn: Flüssiges Obst GmbH., 1987.

SACILIK, K.; ELICIN, A.K. The thin layer drying characteristics of organic apple slices. **Journal of Food Engineering**, v.73, p. 281-289, 2006.

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

SCABIO, A.; FERTONANI, H.C.R; BELESKI-CARNEIRO, E.; CARNEIRO, P.I.B.; NAGATA, N.; CANTERI-SCHEMIN, M.H.; PETKOWICZ, C.L.O; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. An extraction model of pectin from apple pomace. Effect of time, temperature and hno₃ concentration. Part 2 – An practical approach. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XX. Curitiba, 2006 **Anais...SBCTA**, Curitiba, 2006.

SCHEMIN, M.H. **Obtenção de pectina alimentícia a partir de bagaço de maçã**. 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SCHEMIN, M.H.; FERTONANI, H.C.R.; WASZCZYNSKYJ, N. WOSIACKI, G. Extraction of pectin from apple pomace. **Brazilian archives of Biology and Technology**. Curitiba, v.48, n.2, p. 259-266, mar. 2005.

SCHIEBER, A. HILT, P.; STREKER, P.; ENDREß, H.U.; RENTSCHLER, C.; CARLE, R. A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 99 - 107, 2003.

SCHOBINGER, U. **Früchte - und Gemüsesäfte**. Schwäbische Hall: Ulmer Verlag, 1987

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, 1945

TANNER, H.; BRUNNER, H.R. **Getränke Analytik – Untersuchungsmethode für die labor –und Betriebspraxis**. Wädenswill: Helles. 1985

THIBAUT, J. F. Les substances pectiques. In: MONTIES B. **Les polymers vegetaux**. Paris: Gauthier-vilars, 1980. p. 233-251.

THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.V. Chemistry and uses of pectin – A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n.1, p.47-73, 1997.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA. **Manual de normalização bibliográfica para trabalhos científicos**. Ponta Grossa, 2005. 131p.

VINCKEN, J.P.; SCHOLS, H.A.; OOMEN, R.J.F.J; MCCANN, M.C.; ULVSKOV, P.; VORAGEN, G.J.A.; VISSER, R.G.F. If homogalacturonan were a side chain of

rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant physiology**, v. 132, p. 1781 – 1789, 2003.

WANG, Q.; PAGÁN, J.; SHI, J. **Pectin from fruits**. [S.l.]: CRC, 2002. p. 1-47.

WILLATS, W.G.T.; KNOX, J.P.; MIKKELSEN, J.D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, n.17, p. 97-104, 2006.

WORLD APPLE REVIEW - 2005. Pullman: A publication of Belrose, 2005. p. 14 -128.

WORLD APPLE REVIEW - 2006. Pullman: A publication of Belrose, 2006, 1v.

WOLFRON, M.L.; THOMPSON, A Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydrate Chemistry**, v.2, p.65, 1963.

WOSIACKI, G.; KAMIKOGA, A.T.M.; SATAQUE, E.Y.; CÉSAR, E.O. Características de qualidade de sucos despectinizados de maçãs (safra 1988/1989). **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v.13, n.1, p. 7-14, mar., 1992.

WOSIACKI, G. "**Enzimas pectinolíticas de *Fusarium oxysporum* Schlecht ex Fr. isolados de frutos de café**". 1977, 99f. (Tese de doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C.; Brazilian apple production – a few years later. **Fruit processing**, Schönborn, v.10, n.12, p. 472-475, dez., 2000.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N.C.C.; DENARDI, F.; CAMILO, A.P. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation in *Santa Catarina* – Brazil. **Fruit Processing**, Schönborn, v.12, n. 1, p.19-28, jan., 2002.

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. C. ; NOGUEIRA, A. Características de qualidade de maçãs. Avaliação físico-química e sensorial de 15 variedades. **Ciência Tecnologia de Alimentos** Campinas, v.24, n. 3, p. 347-352, jul./set, 2004.

YAPO, B.N.; ROBERT, C.; ETIENNE, I.; WATHELET, B. PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, de 2006. Disponível em: <www.elsevier.com>.

APÊNDICE 1

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

CANTERI-SCHEMIN, M.H.; FERTONANI, H.C.R.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Extraction of pectin from apple pomace. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.48, n.2, Curitiba-PR, mar. 2005.

FERTONANI, H.C.R.; SCABIO, A.; CANTERI-SCHEMIN, M. H.; BELESKI-CARNEIRO, E. B.; NOGUEIRA, A. WOSIACKI, G. Influência da concentração de ácidos no processo de extração e na qualidade de pectina de bagaço de maçã. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XX, 2006, **Anais...** SBCTA, Curitiba, 2006.

FERTONANI, H.C.R.; SCABIO, A.; BELESKI-CARNEIRO, E. B.; NAGATA, N.; NOGUEIRA, A. WOSIACKI, G. An extraction model of low methoxyl pectin from apple pomace – Effects of acid concentration and time on the process and product. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XX, 2006, **Anais...** SBCTA, Curitiba, 2006.

SCABIO, A.; FERTONANI, H.C.R.; BELESKI-CARNEIRO, E.; NAGATA, N.; CANTERI-SCHEMIN, M.H.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. An extraction model of pectin from apple pomace. Effect of time, temperature and hno_3 concentration. Part 1 – Na statistical approach. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XX. Curitiba, 2006 **Anais...**SBCTA, Curitiba, 2006.

SCABIO, A.; FERTONANI, H.C.R.; BELESKI-CARNEIRO, E.; CARNEIRO, P.I.B.; NAGATA, N.; CANTERI-SCHEMIN, M.H.; PETKOWICZ, C.L.O; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. An extraction model of pectin from apple pomace. Effect of time, temperature and hno_3 concentration. Part 2 – An practical approach. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, XX. Curitiba, 2006 **Anais...**SBCTA, Curitiba, 2006.

SCABIO, A.; FERTONANI, H.C.R.; BELESKI-CARNEIRO, E.; CARNEIRO, P.I.B.; NAGATA, N.; CANTERI-SCHEMIN, M.H.; PETKOWICZ, C.L.O; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. An extraction model of pectin from apple pomace. Effect of time, temperature and hno_3 concentration on the process and on the product. **Journal of Food Engineering**, 2006 (em processo de análise).

SIMÕES, D.R.S.; NOGUEIRA, A; FERTONANI, H.C. R; ALBERTI, A.; WOSIACKI, G.; WASZCZYNSKYJ, N. Potencial da maçã variedade Joaquina como matéria-prima para processamento agroindustrial. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, (aceito para publicação em 18/05/2006).

MARCON, M.V.; FERTONANI, H.C.R.; WOSIACKI, G.; PETROWICZ, C. L. O.; BELESKI-CARNEIRO, E. B. Farinha de bagaço de maçã. In: **SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS** – Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Inovação na Indústria de Alimentos, 5, 2003, Campinas.