

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

JOSÉ CEZAR DE PAIVA

**ESTUDO QUÍMICO DE COMPOSTOS PÉCTICOS OBTIDOS DOS FRUTOS DE
GARCINIA BRASILIENSIS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS**

Alfenas / MG
2014

JOSÉ CEZAR DE PAIVA

**ESTUDO QUÍMICO DE COMPOSTOS PÉCTICOS OBTIDOS DOS FRUTOS DE
GARCINIA BRASILIENSIS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo programa de pós-graduação da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Marcelo Henrique dos Santos

Alfenas / MG
2014

Paiva, José Cezar de.

Estudo químico de compostos pécnicos obtidos dos frutos de *Garcinia brasiliensis* e avaliação de suas propriedades biológicas / José Cezar de Paiva. - 2014.

75 f. -

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Pectina. 2. *Garcinia*. 3. Polissacarídeo. 4. Anti-Inflamatórios. I. Santos, Marcelo Henrique dos. II. Título.

CDD: 583.624

JOSÉ CEZAR DE PAIVA

**ESTUDO QUÍMICO DE COMPOSTOS PÉCTICOS OBTIDOS DOS
FRUTOS DE *Garcinia brasiliensis* E AVALIAÇÃO DE SUAS
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

A banca examinadora abaixo - assinada
aprova a dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química pelo
programa de pós-graduação da
Universidade Federal de Alfenas. Área de
concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Marcelo Henrique dos
Santos

APROVADA EM: 30 /07/2014

Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos _____ Assinatura:

Profa. Dra. Lucienir Pains Duarte _____ Assinatura:

Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula _____ Assinatura:

AGRADECIMENTOS

- ✓ A todos que me ajudaram nessa etapa da minha vida, em especial:
- ✓ A Deus pela sua presença incontestável em minha vida.
- ✓ A minha família, pelo apoio e carinho em todos os momentos, em especial a minha esposa Dr^a Márcia L. de Roma Paiva pelo incentivo.
- ✓ Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos, pela orientação e amizade durante todos estes anos. Obrigado pela oportunidade.
- ✓ Ao Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza, pela Co-Orientação, pela confiança depositada na área científica, pelas correções e discussões deste trabalho e amizade.
- ✓ A Prof^a. Dr^a Danielle Ferreira Dias e Maria Eliza de Castro Moreira, pela parceria nos ensaios de avaliação da atividade antiinflamatória.
- ✓ Ao grupo do laboratório de Plantas Mediciniais da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), pelo auxílio e infraestrutura disponibilizada. Em especial ao Professor Dr. Geraldo Alves da Silva e Marcelo Aparecido da Silva.
- ✓ Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da UNIFAL-MG, pela amizade e momentos de alegria.
- ✓ A Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade do mestrado.
- ✓ Aos professores, funcionários e colegas do programa de Pós – Graduação em Química pela colaboração na realização do mestrado, em especial ao Leandro Neves de Paula pela amizade que surgiu.

*Dedico este trabalho minha esposa, **Márcia** sem a qual jamais teria
conseguido vencer mais esta luta.*

RESUMO

Pectinas são polímeros compostos principalmente por unidades de α -D-ácidos galacturônicos ligados por ligações α -1,4 presente na parede celular das plantas. De acordo com os compostos ramificados na cadeia principal pode-se dividir a pectina em vários tipos. Esses polissacarídeos possuem estruturas complexas, são solúveis em água e geralmente apresentam baixa toxicidade e possuem várias aplicações na indústria química, alimentícia e farmacêutica. Este trabalho teve como objetivo extrair, isolar e caracterizar os compostos pécticos presentes no epicarpo dos frutos de *Garcinia brasiliensis* (bacupari). Utilizou-se dois métodos de extração: água em meio neutro e água em meio ácido, ambos com aquecimento. Utilizou-se uma pectina comercial de citrus para comparação com as análises das pectinas do bacupari. A pectina foi obtida dos resíduos de epicarpo oriundos de extrações rotineiras e exaustivas com etanol, realizadas no laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM). O processo de extração de pectina em meio aquoso neutro, resultou em um rendimento de 7,48%, e o processo de extração em fase aquosa ácida resultou em um rendimento de 6,15%. A pectina dos frutos de *G. brasiliensis*, extraída com solução aquosa neutra, apresentou alto teor de metoxilação e esterificação e também apresentou maior teor de compostos fenólicos com maior capacidade sequestrante de radical livre DPPH do que as demais pectinas utilizadas. Além disso, foi avaliada a atividade antimicrobiana e antiinflamatória. As pectinas extraídas do bacupari e a comercial não apresentaram atividade antimicrobiana significativa quando avaliadas contra fungos e bactérias padrões *American Type Culture Collection* (ATCC), porém demonstraram atividade antiinflamatória considerável, quando comparadas ao padrão indometacina, testado no modelo de edema de pata de camundongos induzido por carragenina. Foram realizadas a caracterização estrutural, bem como a correlação com os dados de atividade biológica dos compostos naturais e semi-sintéticos (acetilados) conduzindo ao desenvolvimento de novos agentes antiinflamatórios a partir dos resíduos de extração dos frutos do bacupari.

PALAVRAS CHAVE: Atividade anti-inflamatória. Bacupari. Pectina. *Garcinia brasiliensis*. Polissacarídeo de parede.

ABSTRACT

Pectins are polymers mainly composed by unities of α -D galacturonic acids bonded by α - 1,4 links that are present in the plants cell wall. According to the branched composts in the main chain, a pectin can be divided in many kinds. Those polysaccharides have many complex structures, that are soluble in water and usually present low toxicity and have many uses in the chemical industry. This work aimed to extract, isolate and characterize the pectin composts present in the epicarps from the *Garcinia brasiliensis* fruits, also known as bacupari. Two extraction methods were performed: one with water in a neutral solution and other with water in an acid one, both of them were heated. A comercial pectin from citrus was used to compare the analysis from the bacupari's pectins. The pectin was obtained from residues of epicarp derived of routine and exhaustive extractions with ethanol, that were realized at the Medical Phytochemistry and Chemistry Laboratory (MFCL). The process of pectin extraction in neutral aqueous solution resulted in a yield of 7,48% and the extraction process in the aqueous acid solution resulted in a yield of 6,15%. The pectin extracted from the *g. brasiliensis* fruit presented a high level of methoxylation and esterification and also showed higher phenolic content with more sequestring capacity of the DPPH free radical. Besides that, the antimicrobial and anti-inflammatory activity were evaluated. The pectins extracted from the bacupari and the commercial one didn't show a meaningfully activity agaisnt fungi and *American Type Culture Collection* (ATCC) standard bacterias, however they showed a considerable anti-inflammatory activity when compared to the indomethacin standard, which was tested on the carrageenan-induced paw edema in mices. Structural characterization, as well as data correlation of biological activity of natural and semi-sinthetic (acetylated) composts were performed, conducing to the development of new anti-inflammatory agents from the residues of the extraction of bacupari's fruits.

KEYWORDS: Anti-inflammatory activity. Bacupari. Pectin. *Garcinia brasiliensis*.

Wall polysaccharide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da estrutura da pectina mostrando os quatro tipos de polímeros ligados entre si: Homogalacturonanos (HG), Ramnogalacturonanos I (RGI), Ramnogalacturonanos II (RGII) e Xilogalacturonanos (XGA)	19
Figura 2 -	A estrutura dos homogalacturonanos (HG)	20
Figura 3 -	Fotos ilustrativas das folhas e frutos de <i>G. brasiliensis</i> (a) e da semente e polpa de <i>G. brasiliensis</i> (b)	24
Figura 4 -	Esquema da metodologia para coleta e preparo das amostras, e do estudo de atividades biológicas.....	27
Figura 5 -	Software ChemDraw	48
Figura 6 -	Simulação de RMN de ^1H utilizando o software ChemDraw ultra 12.0.2.1076	49
Figura 7 -	Simulação de RMN de ^{13}C utilizando o software ChemDraw ultra 12.0.2.1076	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curva de calibração: ajuste polinomial grau 3 da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) de polissacarídeos P-400, P-200, P-100, P-50, P-20, P-10, P5 e glicose	37
Gráfico 2 -	Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) MIX1	39
Gráfico 3 -	Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) da mistura dos polissacarídeos P-400, P-200, P-100, P-50, P-20, P-10, P5 e glicose	40
Gráfico 4 -	Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) da pectina ácida (PA)(PEC1,5)	41
Gráfico 5 -	Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) da pectina comercial (PC)(PECc)	42
Gráfico 6 -	Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho)	42
Gráfico 7 -	Espectro na região do Infravermelho de PEC6,0 (pectina neutra) (KBr)	44
Gráfico 8 -	Espectro na região do Infravermelho de PEC1,5 (pectina ácida) (KBr)	45
Gráfico 9 -	Espectro na região do Infravermelho de PECc (pectina comercial) (KBr)	46
Gráfico 10 -	Sobreposição dos espectros na região do Infravermelho de PEC6,0 (em verde), PEC1,5 (em preto) e PECc (em vermelho) (KBr)	47
Gráfico 11 -	Espectro de RMN de ^1H de PEC 1,5 (D_2O , 300MHz)	50
Gráfico 12 -	Espectro de RMN de ^{13}C de PEC 1,5 (D_2O , 75 MHz)	51
Gráfico 13 -	Mapa de contornos COSY (H,H) de PEC 1,5 (D_2O , 300MHz)	52
Gráfico 14 -	Espectro de RMN de ^1H de PEC 6,0 (D_2O , 300MHz)	53
Gráfico 15 -	Espectro de RMN de ^{13}C de PEC 6,0 (D_2O , 75 MHz)	54
Gráfico 16 -	Mapa de contornos COSY (H,H) de PEC 6,0 (D_2O , 300MHz)	55
Gráfico 17 -	Espectro de RMN de ^1H PEC1,5-AC (D_2O , 300MHz)	56
Gráfico 18 -	Espectro de RMN de ^1H de PEC6,0-AC (D_2O , 300MHz)	57
Gráfico 19 -	Espectro de RMN de ^{13}C de PEC6,0-AC (D_2O , 75 MHz)	58
Gráfico 20 -	Mapa de contornos COSY (H,H) de PEC6,0-AC (D_2O , 300MHz)	59

- Gráfico 21 - Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH em compostos pécnicos extraídos do epicarpo de *G. brasiliensis* 60
- Gráfico 22 - Efeitos da administração da pectina ácida extraída do epicarpo de *G. brasiliensis* (10, 30 e 100 mg/kg, p.o.) ou indometacina (10 mg/kg, p.o.) no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (40 µL/pata; 2% p/v). Cada ponto representa a média ±E.P.M. de oito animais. Os asteriscos denotam o nível de significância, quando comparado com o grupo controle: ** P <0,01; *** P <0,001 63
- Gráfico 23 - Efeito da administração da pectina neutra extraída do epicarpo de *G. brasiliensis* (10, 30 e 300 mg/kg, p.o.) ou indometacina (10 mg/kg, p.o.) no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (40 µL/pata; 2% p/v). Cada ponto representa a média ±E.P.M. de oito animais. Os asteriscos denotam o nível de significância, quando comparado com o grupo controle: * P <0,05; ** P <0,01 64
- Gráfico 24 - Efeito da administração da Pectina comercial (10, 30 e 100 mg/kg, p.o.) ou indometacina (10 mg/kg, p.o.) no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (40 µL/pata; 2% p/v). Cada ponto representa a média ±E.P.M. de oito animais. Os asteriscos denotam o nível de significância, quando comparado com o grupo controle: *P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização dos compostos pécticos do epicarpo de <i>G. brasiliensis</i> (PEC6,0) e (PEC1,5) e de pectina comercial de citrus (PECc)	33
Tabela 2 -	Curva de calibração- padrões de PULLULAN (polissacarídeos) - Mix 1 e Mix2	36
Tabela 3 -	Peso molecular médio dos picos nos cromatogramas das amostras	38
Tabela 4 -	Determinação dos valores de concentrações inibitórias do Fluconazol e compostos pécticos em fungos	61
Tabela 5 -	Determinação dos valores de concentrações inibitórias do Clorofenicol e compostos pécticos em bactérias	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHT –	Butilidroxitolueno
δ –	Deslocamento químico
δ_C –	Deslocamento químico do carbono
δ_H –	Deslocamento químico do hidrogênio
cm –	Centímetros
DMF –	Dimetilformamida
D ₂ O –	Água deuterada
DPPH –	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
Hz –	Hertz
IC ₅₀ –	Concentração inibitória que causa 50% do efeito
IV –	Infravermelho
<i>J</i> –	Constantes de acoplamento
LFQM –	Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal
Mw –	Massa molar
nm –	Nanômetro
PEC6,0 –	Pectina resultante da extração em meio neutro
PEC1,5 –	Pectina resultante da extração em meio ácido
PECc –	Pectina comercial (de citrus)
ppm –	Partes por milhão
REA –	Relação Estrutura-Atividade (REA)
RMN de ¹³ C –	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹ H –	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SEC –	Cromatografia líquida de exclusão de tamanho
TFT –	Fenóis totais
TMS –	Tetrametilsilano
v/v –	Volume por volume
λ –	Comprimento de onda
RP –	Rendimento médio
AUX –	Teor de resíduos galacturônicos
Me –	Teor de metoxilas
DE –	Grau de esterificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	14
3	OBJETIVOS	16
3.1	Objetivo Geral	16
3.2	Objetivos Específicos	16
4	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	17
4.1	Parede celular	17
4.2	Pectina	18
4.3	Atividade biológica da pectina	22
4.4	Estrutura e atividade das pectinas	23
4.5	<i>Garcinia brasiliensis</i> Mart. (“Bacupari”)	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1	Coleta, secagem e preparo do material	26
5.2	Extração da pectina	27
5.3	Caracterização química da pectina	28
5.4	Caracterização espectroscópica	29
5.5	Determinação de peso molecular por cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SEC)	30
5.6	Derivatização da pectina: acetilação	30
5.7	Análise da atividade antimicrobiana	31
5.8	Análise da atividade anti-inflamatória	31
5.8.1	Animais	31
5.8.2	Ensaio de edema de pata de camundongos induzido por carragenina	32
5.8.3	Análise estatística	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1	Extração da pectina e caracterização	33
6.1.1	Caracterização espectroscópica: Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	43
6.2	Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH	59
6.3	Avaliação da atividade antimicrobiana	60
6.4	Avaliação da atividade anti-inflamatória	62
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os cientistas têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até pouco tempo difíceis de serem identificadas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Nos vegetais, a estrutura fundamental da parede celular é formada por microfibrilas de celulose, imersas em uma matriz contendo polissacarídeos não-celulósicos, como a hemicelulose e pectina. Em particular, a pectina é bem complexa e possui um papel vital para o vegetal como rigidez (estrutura integrante da parede celular), adesão e expansão celular, hidratação de sementes e outros. A pectina possui funções importantíssimas em diversas áreas como na formulação de novos polímeros complexos na indústria química, em condições patológicas na área da saúde, na formação de compostos geleificados e de fibras dietéticas na área da nutrição e absorção de alimentos na área da microbiologia.

2 JUSTIFICATIVA

Muitos estudos químicos apresentam o foco voltado para o estudo de moléculas simples e de baixo peso molecular, contudo, macromoléculas como os polissacarídeos também devem ser estudadas, pela possibilidade de apresentarem características e atividades de importância química e para outras áreas do conhecimento.

Estudos envolvendo pectina extraída do maracujá, do tomate, de frutas cítricas e da maçã vêm sendo relatadas ao redor do mundo. Contudo, outras espécies nativas do Brasil podem ser importantes fontes para a extração de pectina para fins diversos (indústria química, farmacêutica e alimentícia). Estas novas fontes de pectina são importantes para pesquisa, desenvolvimento e inovação, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, pela possibilidade de ampla utilização de compostos, que compreendem desde a formação de polímeros complexos, até novas fontes de alimentos e medicamentos. Contudo, devido à complexidade estrutural da pectina, ainda são poucos trabalhos que buscam aprimorar os métodos de extração e caracterização química inequívoca destes compostos.

Estudos de atividade biológica com moléculas solúveis em água e de baixa toxicidade como as pectinas são estratégicos para o país, pois favorecem à produção futura de produtos de baixo custo e risco para a saúde.

Como proposto nesta dissertação, um estudo da relação estrutura-atividade da pectina poderá fornecer mais resultados sobre qual (ou quais) segmento (s) da molécula apresenta a maior contribuição para a atividade biológica, pois os trabalhos relatados até então, são muitas vezes contraditórios.

Estudos que envolvam a utilização ou aproveitamento de resíduos em laboratórios são uma importante justificativa para realizações de pesquisas nesta área. Por exemplo, o aproveitamento de resíduos cítricos de indústrias para extração de pectina vem sendo realizado (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 2000; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Estudos com borra de café vêm mostrando grandes benefícios deste resíduo como antioxidantes alternativos (ROCHA et al., 2009).

Desta mesma forma propõe-se a reutilização dos resíduos de extração do epicarpo dos frutos de *G. brasiliensis*. A planta já vem sendo estudada por pesquisadores da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), o que resultou no isolamento de diferentes compostos, alguns com atividades biológicas promissoras. Estas substâncias vêm sendo extraídas do

epicarpo, utilizando-se etanol 95% como solvente, com a geração de resíduos que eram anteriormente descartados e que agora poderão fornecer pectina passível de aproveitamento diverso. A metodologia empregada no presente estudo poderá ser aplicada para outros vegetais, resultando em aumento da perspectiva para estudos futuros.

3 OBJETIVOS

Neste capítulo será abordado os objetivos deste trabalho.

3.1 Objetivo Geral

Aproveitar resíduos oriundos da extração dos constituintes do epicarpo de *G. brasiliensis*, obtendo-se compostos pécicos com potencial biológico.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Extrair, isolar e purificar os compostos polares, sobretudo as pectinas, do epicarpo dos frutos de *G. brasiliensis*;
- b) Caracterizar os compostos isolados através de métodos titulométricos;
- c) Caracterizar os compostos isolados por espectroscopia no Infravermelho (IV), de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C ;
- d) Avaliar a massa molar das pectinas isoladas do epicarpo dos frutos de *G. brasiliensis* por cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SEC);
- e) Avaliar a atividade antimicrobiana e antiinflamatória dos compostos pécicos;
- f) Estabelecer a Relação Estrutura-Atividade (REA) para os compostos em estudo.

4 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

O texto será tratado no referencial bibliográfico de acordo com os autores citados.

4.1 Parede celular

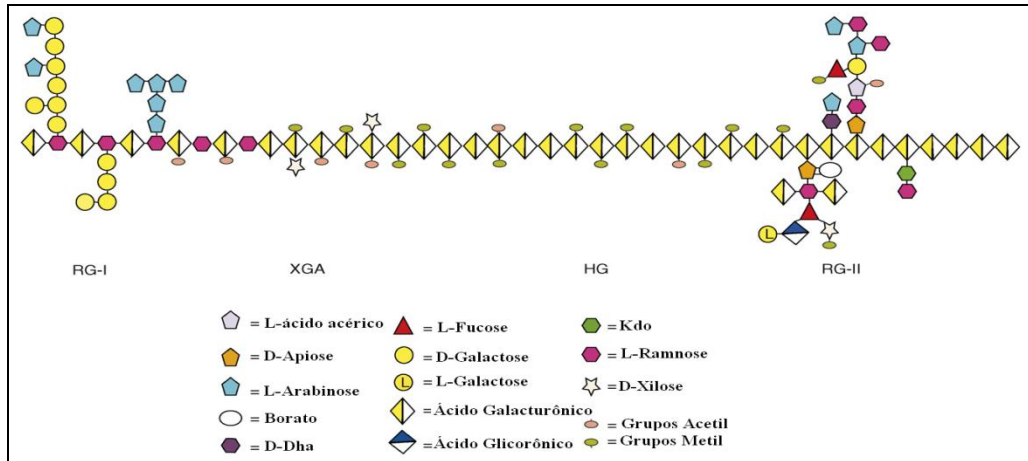
Durante muito tempo a parede celular foi considerada como uma estrutura morta e inerte com a única função de conter o protoplasto, conferindo rigidez à célula. Hoje, sabe-se que ela desempenha outras funções no vegetal, como prevenir a ruptura da membrana plasmática, atuar na defesa contra fungos e bactérias dentre outras (VORWERK; SOMERVILLE; SOMERVILLE, 2004). Assim, a parede celular é parte ativa da célula vegetal e passa por modificações durante o crescimento e desenvolvimento da mesma. Todas as células vegetais são envoltas pela parede celular que é constituída de polissacarídeos (componentes mais abundantes), proteínas e ligninas (SCHELLER et al., 2007). Esses polissacarídeos são normalmente divididos em celulose, hemicelulose e pectina. A celulose é formada por polímeros de glicose unidos por ligações β (1-4) que se organizam em microfibrilas sendo a celulase sintase a enzima principal na sua formação (CESA) (TAYLOR, 2008). A hemicelulose é um grupo heterogêneo constituída principalmente por xiloglucanos e xilanos (arabinoxilanos). Os xiloglucanos possuem uma cadeia principal igual à celulose, porém ramificada com xilose no carbono 3 do resíduo de glicose. Os arabinoxilanos consistem de polímeros de xilanos com ligações β (1-4), com ramificações de arabinose e resíduos dos ácidos glicorônico e ferúlico (COSGROVE, 2005). E, por último, a pectina um polissacarídeo complexo da parede celular formado por polímeros de ácido galacturônico (GalA) com ligações α (1-4) (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001). A parede celular forma-se externamente à membrana plasmática e as primeiras camadas constituem a parede primária. Entre duas paredes primárias de células contíguas encontra-se outra camada chamada de lamela média, ou mediana. Em muitas células a parede primária constitui-se a única camada e em outras podem ocorrer uma nova deposição formando a parede secundária (COSGROVE, 2005). As paredes celulares diferem em sua espessura, composição e propriedades físicas. A lamela mediana é responsável pela ligação entre uma célula e outra e é constituída de pectina. A parede primária é mais espessa que a lamela média e é mais fina que a parede secundária. A parede primária possui alta quantidade de água (65%) e o restante

correspondente a matéria seca, é composta de 95% de polissacarídeos (30% celulose, 30% hemicelulose e 35 % pectina) e 5% de proteínas (expansina, extensina e outras glicoproteínas). Já a parede secundária possui um teor de água reduzido devido à deposição de lignina. Sua matéria seca é constituída de 65% a 85% de polissacarídeos sendo sua maioria celulose e não há presença de pectina. Vale ressaltar que a composição da parede celular vegetal pode variar entre as espécies (CARPITA, 2011; VORWERK; SOMERVILLE; SOMERVILLE, 2004).

4.2 Pectina

As pectinas ou compostos pécticos consistem de um grupo de polissacarídeos complexos ramificados constituídos de unidades de α -D- ácido galacturônico que constituem uma grande parte da parede celular e ocorrem em angiospermas e gimnospermas, mas também em pteridófitas, briófitas e até em algas clorofíceas (O'NEILL et al., 2004). As pectinas são sintetizadas nas vesículas do complexo de Golgi e na sua síntese estão envolvidas mais de 67 enzimas destacando-se as glicosiltransferases. Após sua síntese, a pectina é transportada, via vesículas, até a membrana plasmática, onde é inserida na parede celular. Alguns processos de síntese podem ocorrer também na membrana plasmática. A associação de pectina entre celulose e hemicelulose origina a protopectina nos tecidos vegetais. A protopectina, de natureza insolúvel, é facilmente hidrolisada por aquecimento, em meio ácido ou alcalino, liberando a pectina. Também podem ser utilizadas enzimas para extração e estudo dos compostos pécticos (SCHELLER et al., 2007; THAKUR; SINGH; HANDA, 1997). Com a extração da pectina podem ser identificados, de acordo com a estrutura, os seguintes polímeros: homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonanos I (RGI), ramnogalacturonanos II (RGII) e xilogalacturonanos (XGA) (MOHNEN, 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema da estrutura da pectina mostrando os quatro tipos de polímeros ligados entre si: Homogalacturonanos (HG), Ramnogalacturonanos I (RGI), Ramnogalacturonanos II (RGII) e Xilogalacturonanos (XGA).

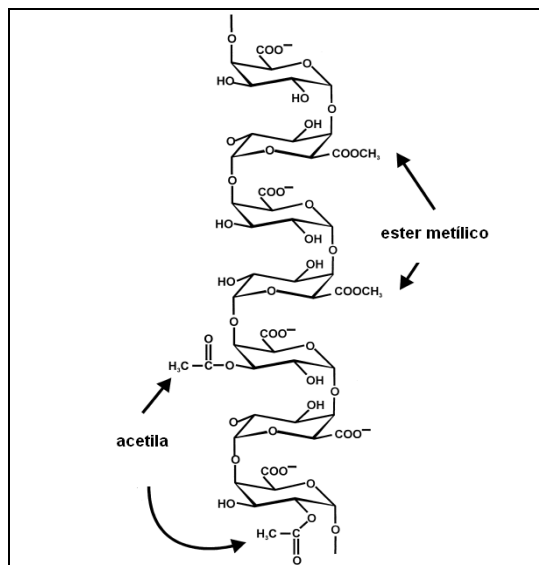


Fonte: MOHNEN, 2008.

Aparentemente estes polímeros são ligados covalentemente entre si. Contudo, não está muito claro como diferentes polissacarídeos pécnicos se interconectam, existindo vários modelos para explicar suas estruturas complexas (SCHELLER et al., 2007; YAPO, 2009).

Os homogalacturonanos (HG), também conhecidos como homogalacturonanos não substituídos, galacturonanos, e ácidos poligalacturônicos são homopolímeros de resíduos de ácido galacturônicos (GalA) com ligações α (1-4) que possuem frequentemente um grupamento éster metílico no carbono C-6. Os resíduos de GalA dos HG também podem ser acetilados em C2 e/ou C3 por acetiltransferases (Figura 2).

Figura 2 - A estrutura dos homogalacturonanos (HG)



Polímeros de ácidos galacturônicos que podem conter grupos éster metílico em C6 e/ou grupos acetila em C2 e C3.

Fonte: RIDLEY, O' NEILL, MOHNEN, 2001.

Quando os homogalacturonanos apresentam ramificações idênticas de homogalacturonanos são chamados de galacturonanos-galacturônicos (GaGA) (YAPO, 2009) e vem sendo purificados de diversas paredes celulares (OVODOVA, 2006; ROUND et al., 2010).

Os HG são sintetizados e esterificados no complexo de Golgi por metiltransferases. Na parede celular, então ocorre uma desesterificação enzimática que pode ser alta ou baixa dependendo da espécie (PETERSEN et al., 2008). Quando mais de 50% dos resíduos de ácidos galacturônicos estão esterificados com grupos metila no C6, ou seja, com um grau de esterificação metílica (DM) > 50 eles são chamados de homogalacturonanos de alta esterificação metílica ou de alta metoxilação e abaixo de 50% (DM<50) são chamados de HG de baixa esterificação ou baixa metoxilação. Tanto a esterificação metílica (metoxilação) quanto a acetílica (acetilação) são responsáveis pelo comportamento gélico das pectinas (YAPO; KOFFI, 2006). Assim uma pectina de alta metoxilação, geralmente, forma géis quando aquecida em soluções ácidas e as de baixa metoxilação apenas formam géis em presença de cálcio (MATIA-MERINO; LAU; DICKINSON, 2004; MIGLIORI et al., 2010). De acordo com Fraeye et al. (2009), a metoxilação é um dos principais fatores que determinam a função das pectinas. Além da geleificação, a metoxilação também influencia a viscosidade da pectina dissolvida em água. A viscosidade dos polissacarídeos (incluindo a

pectina) em solução aquosa depende também de outras características intrínsecas tais como massa molecular, volume, grau de esterificação, conteúdo de ácido galacturônico além de fatores ambientais (MASUELLI, 2011). Na cadeia de homogalacturonanos além de metoxilação (alta e baixa) podem ocorrer reações de amidação formando as pectinas amidadas ou pectinamidas e o grau de amidação (DA) também pode ser avaliado (NGUYEN et al., 2011).

Estudos de imunolocalização têm descrito a presença de HG de baixa esterificação metílica na lamela média e nos espaços angulares entre as células e HG de alta esterificação metílica em toda parede celular. (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001; SOMERVILLE et al., 2004).

Os ramnogalacturonanos I (RGI) consistem de uma cadeia principal com dissacarídeos repetidos constituídos de ácido galacturônico (GalA) e L-ramnose (Rha) (Figura 2). Os GalA se ligam nas Rha por ligações α (1-2) e as Rha se ligam nos GalA por ligações α (1-4). Os resíduos de ramnoses também podem ser substituídos (ramificados) por cadeias de galactanos, arabinanos ou arabinogalactanos I na posição O-2 e O-4. Os galactanos são cadeias de resíduos de galactose unidas por ligações β (1-4), enquanto que arabinanos são cadeias de resíduos de arabinofuranose interconectados por ligações α (1-5). Esta cadeia de arabinofuranose é frequentemente ramificada em C-3 e, às vezes, em C-2 do resíduo. Os arabinogalactanos I são cadeias de galactanos com ramificações de arabinanos (Figura 2). Em algumas espécies os resíduos de arabinose e de galactose na cadeia de RGI podem ser substituídos por ésteres de ácido ferúlico. Os resíduos de ácidos galacturônicos dos RGI também podem ser acetilados como nos homogalacturonanos (HG) (SCHELLER et al., 2007; YAPO, 2009).

Os ramnogalacturonanos II (RGII) são os tipos mais complexos de pectinas. O nome ramnogalacturonanos (RG) pode levar a equívocos, pois sua cadeia principal não é constituída de RG, mas de curtas unidades de homogalacturonanos (HG) substituídas com quatro cadeias de diferentes tamanhos. Os resíduos de RGII incluem monossacarídeos que são raros em outros polissacarídeos como D-apiose, 2-O-metil- L-fucose, 3-carboxi-5-desoxi-L-xilose (L-ácido acérico), L-galactose, 3-desoxi-D-lixo-2-ácido heptulosárico (Dha) e 2-ceto-deoxi-D-mano ácido octoloso (Kdo) (Figura 2). RGII existem predominantemente como dímeros que são covalentemente ligados por diésteres borato (SCHELLER et al., 2007).

Os xilogalacturonanos (XGA) são parecidos com os homogalacturonanos (HG) sendo que a diferença está na presença de xilose ligada nos ácidos galacturônicos (Figura 2). Em

toda a cadeia podem ter várias xiloses ligadas por ligações β (1-3) ou β (1-4), porém apenas um resíduo por ácido galacturônico (SCHELLER et al., 2007).

4.3 Atividade biológica da pectina

Na indústria de alimentos e medicamentos, as pectinas têm sido alvo de investigação por ser considerado um componente das fibras dietéticas (juntamente com as hemicelulose, celulose, gomas, mucilagens, oligossacarídeos, ligninas, etc.) e por apresentarem atividades biológicas e farmacológicas de grande interesse (MORRIS, 2009; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2012). Além disso, as moléculas de pectinas são solúveis em água e têm apresentado baixa toxicidade (RAMBERG; NELSON; SINNOTT, 2010; SILVA et al., 2012).

Estudos recentes apontam para a descoberta de polissacarídeos pécticos com atividade antitumoral (LI et al., 2012). Nesta condição, as pectinas parecem ativar direta ou indiretamente diferentes componentes do sistema imunológico como macrófagos, linfócitos T e B (LEUNG et al., 2006). Pectinas extraídas de maracujá (*Passiflora edulis*) reduziram significativamente o peso de tumores (SILVA et al., 2012).

Estudos da atividade antiinflamatória da pectina têm sido bem relatados, utilizando-se de vários modelos. Na indução de colites, Popov et al. (2007a) verificaram uma redução da inflamação quando eram administradas 50-110 mg/Kg (v.o) de pectina de *Rauvolfia callus* em camundongos. A capacidade da pectina da graviola (*Apium graveolens*) em prevenir a inflamação foi positiva em modelo de choque séptico (OVODOVA et al., 2009; POPOV et al., 2007b). Similarmente à indometacina, a pectina do maracujá reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina em ratos diabéticos, com redução da migração de neutrófilos e maior preservação do tecido (SILVA et al., 2011).

A importância da pectina em alimentos vem sendo atribuída à formação de géis, sendo muito utilizadas na produção de gomas e geléias e produtos lácteos (THAKUR; SINGH; HANDA, 1997; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Nos últimos anos a pectina vem sendo empregada também como fibra dietética solúvel por apresentar efeitos fisiológicos benéficos ao organismo humano. Estudos com dietas de pectina de *Crataegus pinnatifida* (LIU et al., 2010), de maçã (SÁNCHEZ et al., 2008) e de *Citrus sp* (PIEIDADE; CANNIATTI-BRAZACA, 2003) em ratos mostraram uma redução significativa dos níveis séricos, colesterol total e LDL, triglicerídeos e acumulação de corpos lipídicos confirmando o potente efeito dessa molécula como protetora das doenças cardiovasculares. Pectinas de alho

(*Allium cepa* L.) possuem um importante papel no favorecimento da absorção intestinal e são benéficas para prevenir alergias alimentares (GOLOVCHENKO et al., 2012).

Homogalacturonanos isolados das folhas de *Plantago major* (tanchagem) mostraram eficácia contra infecção por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos (HETLAND et al., 2000). Atividades antioxidantes também têm sido relatadas para a pectina. A adição de oligossacarídeos oriundos de pectina na dieta de camundongos obesos levou uma maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), além da diminuição da peroxidação lipídica (LIU et al., 2010). Gan e Latiff (2011) e Patra et al. (2012) observaram uma significativa capacidade sequestrante do radical DPPH pelas pectinas.

Os compostos pécticos também possuem atividade cicatrizante (SAMUELSEN et al., 2007). A pectina associada à gelatina e carboximetilcelulose (formando os hidrocolóides) vem sendo muito utilizada nas feridas secas, com pouco ou médio exsudato e em lesões em fase de granulação. Além disso, a pectina na forma de hidrocolóide vem sendo usada como protetora cutânea da pele nas áreas periostomais e regiões adjacentes a feridas exsudativas e fístulas ou nos processos de dermatite de contato por extravasamento de líquidos (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Pectinas de beterraba foram responsáveis por uma alta regeneração da superfície de feridas e de úlceras tróficas, com redução do uso de antisépticos, devido sua ação bactericida, não apresentando efeitos colaterais (não tóxica) (BRISKIN; DEMIDOV; PROSHIN, 2005; KHATKO et al., 2010).

Cladódeos de *Ficus indica* (Cactaceae) são utilizados como cicatrizantes na medicina popular. Trombetta et al. (2006) estudaram esses cladódeos e observaram que sua composição química majoritariamente é constituída de mucilagens e pectinas e que eles possuíam alta atividade cicatrizante em experimentos com feridas dérmicas, em ratos. Pectinas hidrossolúveis extraídas da casca de durião (*Durio zibethinus* Murr) também apresentaram significativas propriedades cicatrizantes (HOKPUTSA et al., 2004).

4.4 Estrutura e atividade das pectinas

A estrutura da pectina influencia a sua atividade biológica. Por exemplo, os efeitos na inflamação parecem serem determinados pelas características de sua estrutura, não pelo tipo de pectina (HG, RGI, etc), mas pela posição das ramificações na cadeia principal e pelo tamanho da pectina (MARKOV et al., 2011). Popov et al. (2011) relatam que a cadeia linear de ácido galacturônico das pectinas é que são responsáveis pela atividade biológica anti-inflamatória. Diferentemente, para atividade cicatrizante, resultados de Samuelsen et al.

(2007) mostram que a menor quantidade de ligações α (1-4) (cadeia principal de ácidos galacturônicos) leva a maior atividade. Outros autores verificaram ainda que as unidades de pectinas hidrolisadas enzimaticamente (LIU et al., 2010) ou quimicamente (POPOV et al., 2011) é que apresentaram atividade biológica significativa.

O grau de metoxilação (ou metilação) e de amidação também tem diferenciado os efeitos biológicos. Pectinas com alto teor de metoxilação em relação às de baixo teor têm demonstrado melhor efeito contra os fatores de riscos cardiovasculares e maior efeito na absorção intestinal de lipídeos (DONGOWSKIA; LORENZ, 2004; KIM, 2005; SÁNCHEZ et al., 2008). Ratos alimentados com pectinamidas apresentaram uma maior diminuição do colesterol e da gordura do fígado do que ratos alimentados com pectinas metoxiladas (MAROUNEK et al., 2007).

Na fabricação de medicamentos, as pectinas têm sido utilizadas para revestir carreadores (ex. lipossomos) de compostos ativos e assim aumentar a biodisponibilidade oral da droga. As pectinas com alto grau de metoxilação apresentaram maior revestimento do que as pectinamidas e pectinas de baixa metoxilação (NGUYEN et al., 2011).

4.5 *Garcinia brasiliensis* Mart. (“Bacupari”)

Figura 3 - Fotos ilustrativas das folhas e frutos de *G. brasiliensis* (a) e da semente e polpa de *G. brasiliensis* (b).



Fonte: CECÍLIA, 2000.

A espécie *G. brasiliensis* (Mart.) ou *Rheedia brasiliensis* (Planch & Triana), é nativa da região Amazônica e é cultivada em todo o território brasileiro. É conhecida popularmente como bacuri, bacupari, porocó e bacuripari no Brasil, e como guapomo na Bolívia. É uma

espécie nativa do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (PEREIRA et al., 2010) e pertence a família Guttiferae, também conhecida como Clusiaceae. Esta família é caracterizada pela presença significativa de látex na maioria de suas espécies possuindo 47 gêneros, dentre os quais, podemos citar, por exemplo: *Vismia*, *Garcinia*, *Clusia*, *Cratoxylum*, *Harungana*, *Mesua*, *Hypericum*, *Kielmeyera*, com mais de 1000 espécies que se agrupam em seis subfamílias que estão distribuídas amplamente por todo o Brasil (DEROGIS et al., 2008).

Os frutos são comestíveis, ovais com a casca elástica e amarela que pode ser facilmente removida. A polpa é branca, suave, saborosa e possui 2 a 3 sementes (MORTON; MOMBIN, 1987). A infusão da polpa possui ação narcótica semelhante à nicotina (MORTON; MOMBIN, 1987). Os frutos são ainda utilizados no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite como analgésico. Habitantes da Tailândia, Srilanka, Malásia, Filipinas e Índia, usam o epicarpo ou o fruto maduro como opção em medicina tradicional para o tratamento de dor abdominal, diarreia, disenteria, infecção de feridas, supuração e úlcera crônica (CUI et al., 2010). Vários constituintes químicos com ampla atividade biológica foram isolados do epicarpo dos frutos de *G. brasiliensis*, como benzofenonas polipreniladas, flavonoides, xantonas e óleo essencial (DEROGIS et al., 2008; GONTIJO et al., 2012; MARTINS et al., 2008).

Com relação á pectina, no gênero *Garcinia* poucos estudos tem sido realizados e nenhum estudo foi localizado com a espécie *Garcinia brasiliensis*. Baliga et al. (2011) em suas revisões sobre o uso medicinal de *Garcinia indica* Choisy relataram a presença de 0,9 % de pectina nas cascas dos frutos. Na *Garcinia mangostana* foram isolados polissacarídeos pécticos com atividade antioxidante (GAN; LATIFF, 2011).

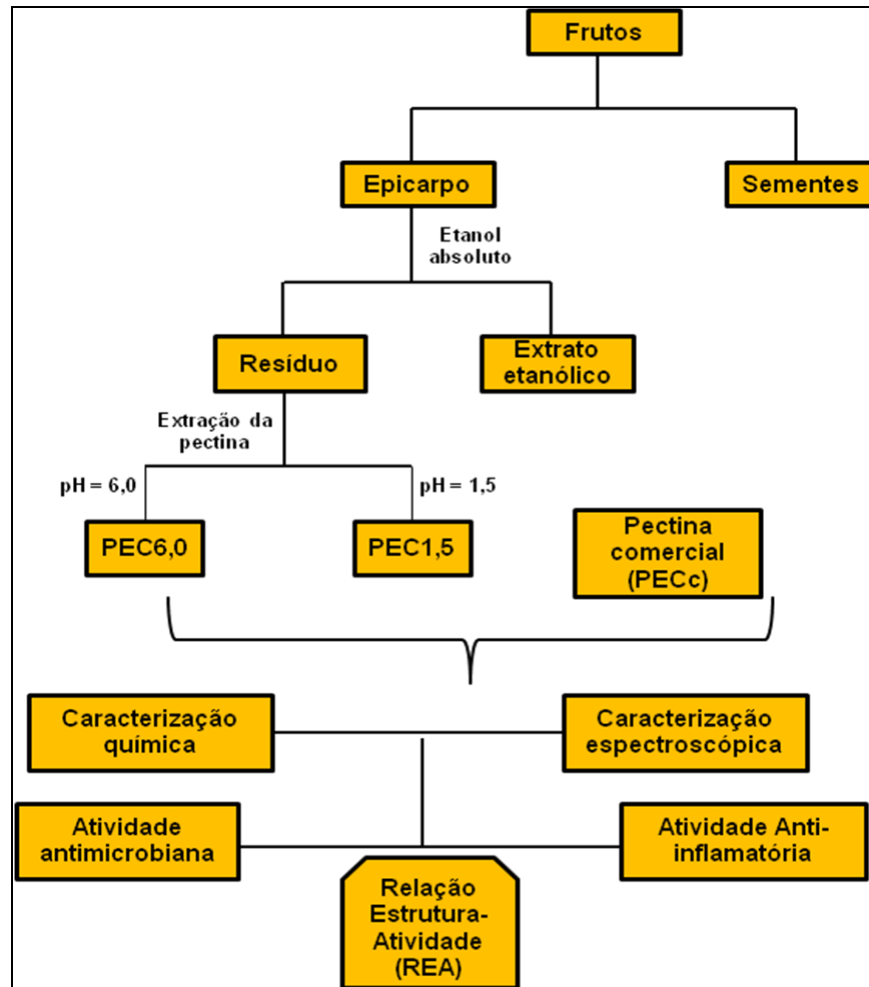
5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados nos experimentos foram descritos no capítulo abaixo.

5.1 Coleta, secagem e preparo do material

Os frutos de *G. brasiliensis* foram coletados na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'55" oeste) e levados para o Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápico de Alfenas. Os epicarpós dos frutos de *G. brasiliensis* foram separados das sementes e secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura de 40 °C até peso constante. Após a secagem completa, o material foi pulverizado em moinho de facas. O mesmo foi submetido à extração exaustiva por maceração com etanol absoluto à temperatura ambiente, filtrado e evaporado o solvente, reservando o extrato para outros estudos. O resíduo gerado (epicarpo após a extração) foi utilizado para a extração da pectina neste trabalho. A Figura 4 resume a metodologia utilizada neste estudo, desde a coleta e preparo das amostras até as atividades biológicas.

Figura 4 - Esquema da metodologia para coleta e preparo das amostras, e do estudo de atividades biológicas



Fonte: Do autor.

5.2 Extração da pectina

A extração da pectina foi realizada de acordo com Silva et al. (2012) e Jiang et al. (2012), com algumas modificações. Em 600 mL de água destilada foram adicionados 50 g de epicarpo, seguido de aquecimento a 90-100°C por 2 horas. Durante a extração o pH do meio foi mantido em aproximadamente 6. O extrato foi filtrado para a eliminação dos resíduos sólidos com um pano fino com posterior centrifugação a 17000 g por 20 minutos, a 20 °C. Posteriormente, as pectinas no sobrenadante foram precipitadas com etanol 95% (duas vezes o volume). Após uma hora da adição de etanol a pectina foi filtrada a vácuo e lavadas novamente em etanol absoluto. A pectina resultante (PEC6,0) foi liofilizada e armazenada em frascos de vidro (3,74g). Uma extração ácida (PEC1,5) também foi realizada preparou-se 2,0 (L) de uma solução ácida de ácido clorídrico 0,03 mol/L (pH 1,5), usando-se o HCl

(comercial) 6 mol/L, foram utilizados 10 mL de HCl (6 mol/L), em seguida completou-se o volume a 2,0 (L) com água destilada. Em 600 mL de solução ácida foram adicionados 50 g de epicarpo, seguido de aquecimento a 90-100 °C por 2 horas. Em seguida o material foi filtrado usando a bomba a vácuo com funil de Buckner. Após a filtragem foram adicionados 1,5 (L) de etanol absoluto, deixando precipitar a pectina. Após uma hora da adição do etanol a pectina foi filtrada a vácuo, liofilizada e armazenada em frascos de vidro (3,08g). (LIANG et al., 2012) (Tabela 1). O rendimento da pectina foi expresso em porcentagem de acordo com Torralbo et al. (2012) onde o rendimento final (%) é igual ao peso da pectina extraída/peso do epicarpo utilizado para extração multiplicado por 100.

5.3 Caracterização química da pectina

As amostras de pectinas obtidas do epicarpo foram quantificadas por titulometria ácido-base (FERTONANI, 2006). Aproximadamente 250 mg de pectina foi umedecida com 2 mL de álcool etílico e solubilizada em 25 mL de água deionizada sob agitação constante por 30 minutos em agitador magnético, sendo em seguida determinado o pH da solução. As carboxilas livres dos ácidos anidrogacturônicos foram neutralizadas com solução de NaOH 0,1 N. As carboxilas esterificadas, após saponificação com 10 mL de solução de NaOH 0,25 N por 30 minutos em temperatura ambiente, foram neutralizadas com 10 mL de solução de HCl 0,25 N e novamente neutralizadas com solução de NaOH 0,1 N, obtendo-se então os valores de mEq de NaOH referentes aos dois tipos de carboxilas, livres e esterificadas, respectivamente representados por mEq' e mEq''. Com os dados obtidos foram realizados os cálculos para determinação da quantidade de massa por mEq ($Z = \text{massapectina}/\text{mEq}_{\text{totais}}$), teor de resíduos galacturônicos ($\text{AUX}\% = 17600/Z$), teor de metoxilas [$\text{MeO}\% = (\text{mEq}'' \times 31 \times 100)/\text{massapectina}$], e grau de esterificação ($\text{DE} = (176/31) \times (\text{MeO}\%/\text{AUX}\%)$).

A determinação do teor de fenóis totais (TFT) foi feita em espectrofotômetro Shimadzu TCC 240 A no comprimento de onda de 750 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, de acordo com Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999).

Alíquotas das amostras foram diluídas em água para se obter uma concentração de 500µg/mL. A 0,5 mL de cada amostra foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e em seguida, foram acrescentados aos tubos 2,0 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 4% (m/v). Os tubos foram agitados para homogeneização e mantidos em repouso. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 750 nm (correspondente ao pico de absorção dos

óxidos de molibdênio e tungstênio), ajustando o zero de absorvância com a solução do branco, constituída dos reagentes e 0,5 mL de água, que substitui a solução da amostra.

Os mesmos procedimentos foram realizados com o ácido gálico em solução etanólica, nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 100 µg/mL, a fim de se obter a curva analítica: $C = 75,25 \cdot A + 0,933$, onde C é a concentração de ácido gálico, A é a absorvância a 750 nm, e o coeficiente de correlação $R = 0,999$. A quantidade de fenóis foi determinada por interpolação da absorvância das amostras na curva de calibração, e os valores foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de amostra). As análises foram realizadas em triplicata.

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) dos compostos pécicos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen, Chang e Duh (2005), com modificações, monitorando-se o consumo do radical DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações. Foram preparadas soluções das amostras em etanol nas concentrações 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, utilizaram-se como padrões ácido ascórbico e BHT nas mesmas concentrações das amostras. Adicionaram-se 2,0 mL da solução das amostras a serem testadas a 0,5 mL de solução do radical DPPH (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção de luz, por 30 minutos. Logo após, foram feitas as leituras das absorvâncias a 517 nm em espectrofotômetro UV/Vis ajustando o zero de absorvância com a solução do branco, constituída de todos os reagentes e 2 mL de etanol absoluto, que substitui a solução das amostras.

O teor de cinzas totais foi calculado de acordo com a 5ª edição da farmacopéia brasileira. O conteúdo de cinzas foi determinado por incineração a 600°C por 4 horas (RANGANNA, 1977).

Os teores de proteína foram determinados pelo método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como proteína padrão.

Para efeitos comparativos, toda caracterização química e física foi também feita com uma pectina de citrus (Sigma) de estrutura conhecida.

5.4 Caracterização espectroscópica

A caracterização dos compostos pécicos e da pectina comercial de citrus foi realizada pela análise dos espectros de absorção na região do infravermelho (aparelho Perkin Elmer FTIR 1000) (TORRALBO et al., 2012), espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

de ^1H e ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC (POPOV et al., 2011; PATRA et al., 2012), utilizando aparelhos da UNIFAL ou de outros centros de pesquisas e ensino (UFV, UFMG). Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro, modelo Prestig-21, no Laboratório de Química Inorgânica da UNIFAL-MG. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr e as absorções expressas em número de ondas (cm^{-1}).

Os experimentos de RMN foram realizados em aparelho Bruker da UNIFAL-MG a 300 MHz para RMN de- ^1H e a 75 MHz para RMN de- ^{13}C .

5.5 Determinação de peso molecular por cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SEC)

A massa molecular das pectinas foi estimada através da análise por Cromatografia Líquida de Exclusão de Tamanho: O Cromatógrafo líquido usado consistiu de uma bomba ProStar (Varian), detector por Índice de Refração RID-410 (Waters), válvula de injeção Rheodyne e sistema de aquisição de dados PC/Chrom (S&A Scientific). As amostras e padrões foram analisados em 2 colunas em série: Shodex OHPak SB-804 HQ (300mm x 8,0mm (SHODEX)). A fase móvel utilizada foi água MilliQ em temperatura ambiente e fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 20 μL . As amostras (PN, PC e PA) e padrões de polissacarídeos Pullulan (Showa Denko) foram diluídas em água MilliQ (MOREIRA et al., 2008a,b).

5.6 Derivatização da pectina: acetilação

Com o objetivo de modificar estruturalmente os compostos pécicos obtidos dos frutos de bacupar e verificar as atividades antioxidante e anti-inflamatória, estes foram submetidos ao processo de esterificação com anidrido acético e piridina utilizando o procedimento descrito por Yuan et al. (2005). À pectina seca (2 g) foram adicionados a 20 mL de dimetilformamida (DMF) e agitou-se à temperatura ambiente durante 30 min, em seguida, foram adicionados 20 mL de uma mistura de 50% de piridina e 50% de anidrido acético (Ac_2O). A mistura reacional foi mantida durante 24 h, sob agitação contínua à temperatura ambiente. Água destilada (250 mL) foi adicionada para reagir com o excesso de Ac_2O , e a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. EtOH anidro foi adicionado à solução concentrada, e a mistura foi mantida durante a noite a 0-5 $^{\circ}\text{C}$. O precipitado foi filtrado e

lavado três vezes com EtOH. O precipitado resultante foi dissolvido em água destilada e liofilizada.

O produto obtido está em fase de caracterização e será avaliado o seu potencial biológico.

5.7 Análise da atividade antimicrobiana

Foram avaliadas as concentrações inibitórias de 50% do crescimento (IC50) e 90% (IC90) de leveduras e bactérias. As avaliações/determinações dos valores de concentrações inibitórias foram realizadas segundo a metodologia de microdiluição para leveduras conforme documento M27A3 (CLSI, 2008) e microdiluição para bactérias conforme documento M7A6 (CLSI, 2003), com algumas modificações. O meio de cultura utilizado foi caldo Mueller Hinton e os extratos pécticos foram avaliados em 10 concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 1000; 500; 250, 125, 100, 80, 40, 20, 10 e 5. Os compostos foram solubilizados em água para preparo de solução estoque a 5000 $\mu\text{g/mL}$.

Os ensaios foram realizados com fungos e bactérias padrões *American Type Culture Collection* (ATCC). Os microrganismos escolhidos são oportunistas e ou patogênicos e foram os fungos: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* ATCC 750; e as bactérias Gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

O meio de cultura caldo Mueller Hinton foi utilizado como controle negativo. Os fármacos padrão utilizados como controles positivos nos ensaios foram o antifúngico fungistático fluconazol (concentrações em $\mu\text{g/mL}$: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125) e o antibiótico bacteriostático cloranfenicol (concentrações em $\mu\text{g/mL}$: 125; 62,5; 31,2; 15,6; 3,9; 1,95; 0,975; 0,487; 0,122; 0,06).

5.8 Análise da atividade anti-inflamatória

Os ensaios realizados foram descritos no texto abaixo.

5.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos ($25 \pm 5\text{g}$) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL MG. Os animais foram mantidos em

gaiolas plásticas com ração e água em temperatura ambiente e em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção. Foram privados de comida durante cerca de 12 horas antes do experimento e ao término, os animais foram sacrificados com inalação de halotano. Os animais foram subdivididos e mantidos separadamente em grupos. Antes de iniciar os ensaios, o projeto foi aprovado pelo comitê de ética da instituição, protocolo nº496/2013.

5.8.2 Ensaio de edema de pata de camundongos induzido por carragenina

O edema de pata foi induzido pela injeção de 40 µL de carragenina (2% p/v) em salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita de camundongos swiss machos (n = 8). Uma hora antes da injeção de carragenina os animais receberam tratamento (v.o.) com as pectinas (comercial, ácida ou neutra) nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg ou indometacina (10mg/kg, v.o.) ou veículo (10 mL/kg NaCl). Antes da administração da carragenina, após uma, duas, três e quatro horas da administração da carragenina, a pata direita do animal foi imersa até a região tíbio-társica com o uso de um pletismômetro.

5.8.3 Análise estatística

Os resultados foram demonstrados através da média erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls, que foi utilizado para medir o grau de significância ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos foram demonstrados neste capítulo.

6.1 Extração da pectina e caracterização

Com relação à extração da pectina, observou-se um maior rendimento na extração aquosa neutra (PEC 6,0) do que a extração aquosa ácida (PEC1,5), contudo esta diferença entre as extrações foi menor que 1% (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização dos compostos pécicos do epicarpo de *G. brasiliensis* (PEC 6,0) e (PEC1,5) e de pectina comercial de citrus (PECc)

Pectina	RP	AUX	MeO	DE	Mw	TFT	Cinzas	Proteína
	%	%	%	%	(10 ⁵) g mol ⁻¹	mg/g	%	µg/g
PEC6,0	7,48	40,30	65,0%	55,97	7,6	24,04	09,50	4,04
PEC1,5	6,15	43,40	25,0%	44,03	3,8	14,92	10,45	3,96
PECc	---	40,24	37,9%	53,46	19	01,67	04,70	4,61

Os dados correspondem a média de três repetições (n = 3). RP, rendimento médio; AUX, teor de resíduos galacturônicos; MeO, teor de metoxilas; DE, grau de esterificação; Mw, massa molar; TFT, teor de fenólicos totais.

Fonte: Dados da pesquisa

O rendimento da pectina do bacupari foi semelhante aos relatados para outras plantas, como maçã (6%) (LOYOLA; PAVÉZ; LILLO, 2011) e sementes de figueira (6%) (LIANG et al., 2012) contudo alguns autores utilizaram metodologias similares e relataram ter maiores rendimentos com albedo da casca de maracujá (20%) (CANTERI et al., 2010), com a casca desidratada da goiaba (12%) (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDOÑA; SOARES JÚNIOR, 2010) e pytaia ou “fruta do dragão” (*Hylocereus polyrhizus*) (12%) (MOHD et al., 2012).

As pectinas oriundas da extração neutra e ácida (PEC 6,0 e PEC 1,5) e a pectina comercial (PECc) apresentaram teor de resíduos galacturônicos (AUX) semelhantes com valores de 40,3%, 43,4% e 40,24 respectivamente (Tabela 1). Já para o teor de metoxilas (MeO) a PEC6,0 apresentou maior valor (65%) e a PEC1,5 o menor (25%). A pectina ácida

(PEC 1,5) apresentou menor grau de esterificação (DE) (44,03%) e a comercial e neutra (PECc e PEC6,0) mostraram-se com maior grau (Tabela 1).

A obtenção de pectinas com diferentes padrões estruturais podem ser via mudanças das condições de extração, por ação de enzimas e via modificação estrutural. Dependendo do solvente extrator (água e soluções ácidas e/ou básicas aquecidas ou não) compostos pécticos com diferentes padrões estruturais podem ser obtidos com diferentes propriedades físico-químicas e biológicas (LAI; LIANG, 2012; LIANG et al., 2012; MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDONA; SOARES-JÚNIOR, 2010).

As pectinas podem ser extraídas com água acidificada oriunda de diversos ácidos como fosfórico, acético, sulfúrico, nítrico ou clorídrico em pH variando de 1 a 3, em temperatura entre 80 e 100°C. Diversos trabalhos têm reportado que fatores como temperatura, pH, tempo e tipo de ácido podem influenciar não somente o rendimento de pectina, mas também a estrutura química do produto final (FERTONANI et al., 2006; RECHKINA; GUBANENKO; RUBCHEVSKAYA, 2011; TORRALBO et al., 2012).

As pectinas são polissacarídeos complexos com estruturas não completamente elucidados e por isso vários modelos têm sido utilizados para explicar a sua composição química (SCHELLER et al., 2007; YAPO, 2009). Ou ainda métodos mais simples como o titulométrico tem sido utilizado devido à dificuldade de se trabalhar com os modelos.

Normalmente as pectinas comerciais apresentam um teor de resíduos galacturônicos (AUX) acima de 65% (MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDONA; SOARES-JÚNIOR, 2010). Contudo nenhuma das pectinas deste estudo (incluindo a comercial de citrus) resultaram em AUX maior 65%.

De acordo com Fraeye et al. (2009) e Migliori et al. (2010), o teor de metoxilas (MeO) ou grau de metoxilação e o grau de esterificação (DE) determinam a função da pectina, pois compostos pécticos com alto teor de metoxilas e alto grau de esterificação, geralmente formam géis quando aquecida em soluções ácidas e as de baixo MeO e DE apenas formam géis na presença de cálcio. Pelos resultados encontrados, a pectina dos frutos de *G. brasiliensis* extraída com solução aquosa neutra apresentou alto teor de metoxilação e esterificação, pois possuem um grau de esterificação e metoxilação maior que 50% (DM>50%; MeO>50%) (YAPO; KOFFI, 2006). Portanto, com a extração aquosa neutra da pectina dos frutos *G. brasiliensis* pode-se obter um composto péctico com maior capacidade de geleificação podendo assim ser utilizado como fibra dietética solúvel, espessante e estabilizante de emulsões em alimentos, já que este tratamento apresentou maior teor de metoxilas (MeO) e maior grau de esterificação (DE) (Tabela 1). Em estudos com frutos de

Pytaia (MOHD et al., 2012); cajueiro (*Anacardium occidentale*) (BESSON; YAPO; AVIT, 2014) e lobeira (*Solanum lycocarpum*) (TORRALBO et al., 2012) foram isoladas pectinas de baixo teor de metoxilação e grau de esterificação e com percentagens bem inferiores em relação a pectina de *G. brasiliensis*.

Em relação a teores de compostos fenólicos, Canteri (2010) trabalhando com extração de pectina de pericarpo de maracujá amarelo encontrou teores entre 3-7 g/kg. Em cascas frescas de maçã e pêra foram encontrados valores entre 0,5-1,0 g/kg (ESCARPA; GONZALEZ, 2001). A extração exaustiva com etanol antes da extração da pectina dos frutos de bacupari parece não ter retirado todos os compostos fenólicos do pericarpo, órgão este constituído de grande quantidade destes compostos (GONTIJO et al., 2012). A extração ácida da pectina do bacupari eliminou pela metade os compostos fenólicos da pectina. Devido as propriedades dos compostos fenólicos, compostos pécticos acrescidos dessas moléculas podem ser interessantes para o aumento da atividade biológica.

Os compostos fenólicos podem estar interligados nas pectinas (RIDLEY; O'NEIL; MOHNEN, 2001); e/ou podem ser oriundos das paredes celulares e do conteúdo da célula e assim podem ser extraídos juntamente com a pectina e posteriormente tornam-se associados aos compostos pécticos (LE BOURVELLEC; GUYOT; RENARD, 2009).

O teor de cinzas totais foi menor na pectina comercial (PECc) seguida das pectinas neutra e ácida do bacupari (Tabela 1). Tanto na pectina comercial quanto nas pectinas do bacupari, os teores de proteína foram baixos ficando entre 3,96-4,61 (Tabela 1).

Pectina de maracujá extraída com ácido cítrico em estudos relatado por Pinheiro (2007) gerou 5,7% de cinzas totais. Outros trabalhos relatam um percentual menor de cinzas como em pectina de bagaço de maracujá (2%) (D'ADDOSIO et al., 2005) e em maçã (1,51%) (FERTONANI et al., 2006).

Os valores de conteúdo de cinzas diferenciados encontrados no bacupari em relação a literatura, podem ser explicados pelas diferenças na composição, estágio de maturação dos frutos, características da matéria-prima inicial e pela utilização de diferentes métodos de extração (MESBAHI; JAMALIAN; FARAHNAKY, 2005).

A formação de complexo proteína-pectina altera as propriedades de geleificação. Estudos recentes mostram que a utilização de proteínas aumenta a geleificação (ZHANG; HSIEH; VARDHANABHUTI, 2014). Vários autores também encontraram baixa quantidade de proteína em pectinas (FERTONANI et al., 2006; LIANG et al., 2012).

Em relação ao peso molecular, foi utilizada a cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SEC). De acordo com as análises por SEC pode-se determinar os pesos moleculares

das pectinas nos seus diferentes processos de extração. Primeiramente, para a construção da curva de calibração, foram utilizados os padrões de polissacarídeos P-400, P-200, P-100, P-50, P-20, P-10, P5 e glicose com suas respectivas massas moleculares de acordo com a Tabela 2 o que possibilitou a construção da curva polinomial de grau 3 mostrada na Figura 4.

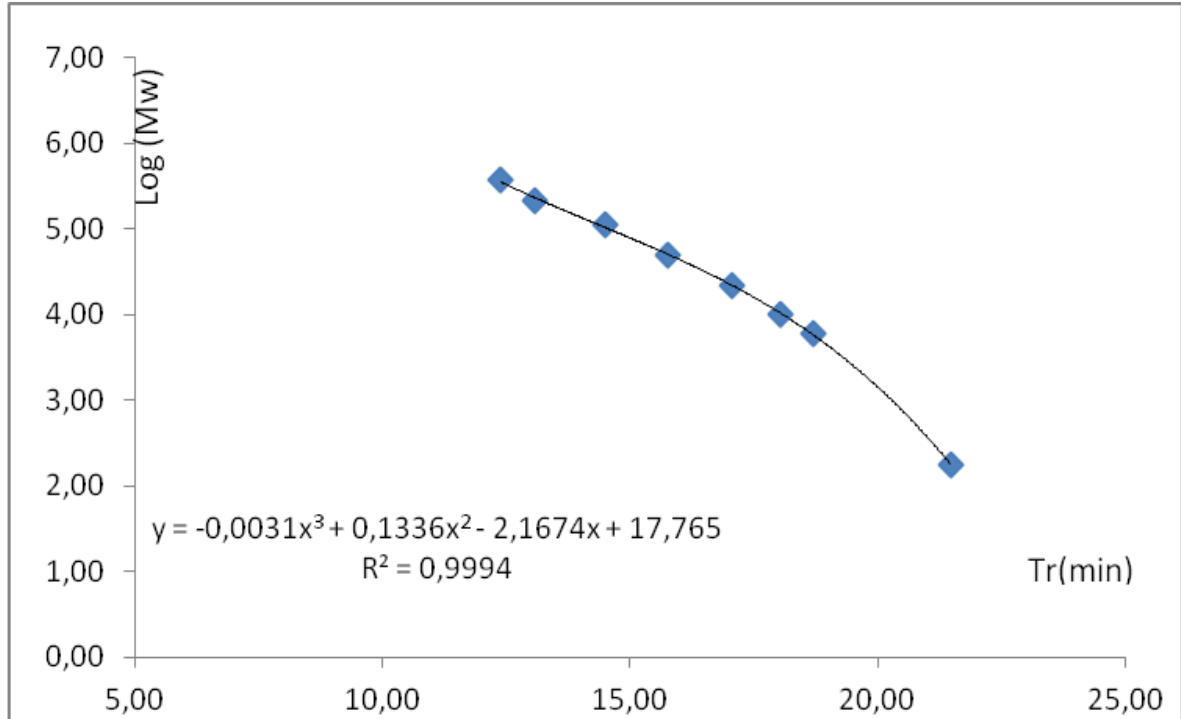
Tabela 2 - Curva de calibração- padrões de PULLULAN (polissacarídeos) - Mix 1 e Mix2

Padrão	Peso molecular médio (Mw)	Número molecular médio (Mn)	TR (min)*
P-400	366000	318000	12,40
P-200	210000	189000	13,08
P-100	113000	100000	14,50
P-50	48800	45500	15,76
P-20	21700	20000	17,05
P-10	10000	9200	18,04
P5	6000	5500	18,70
Glicose	180	165	21,46

* Cromatogramas MIX1 E MIX2.

Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 1 - Curva de calibração: ajuste polinomial grau 3 da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) de polissacarídeos P-400, P-200, P-100, P-50, P-20, P-10, P5 e glicose



Fonte: Dados da pesquisa

Após a análise cromatográfica das amostras PA (PEC1,5), PN (PEC6,0) e PC (PECc) (Gráficos 2-6) suas massas foram estimadas pela utilização da equação da curva, podendo ser determinada os teores dos respectivos componentes presentes em cada tipo de pectina (Tabela 3).

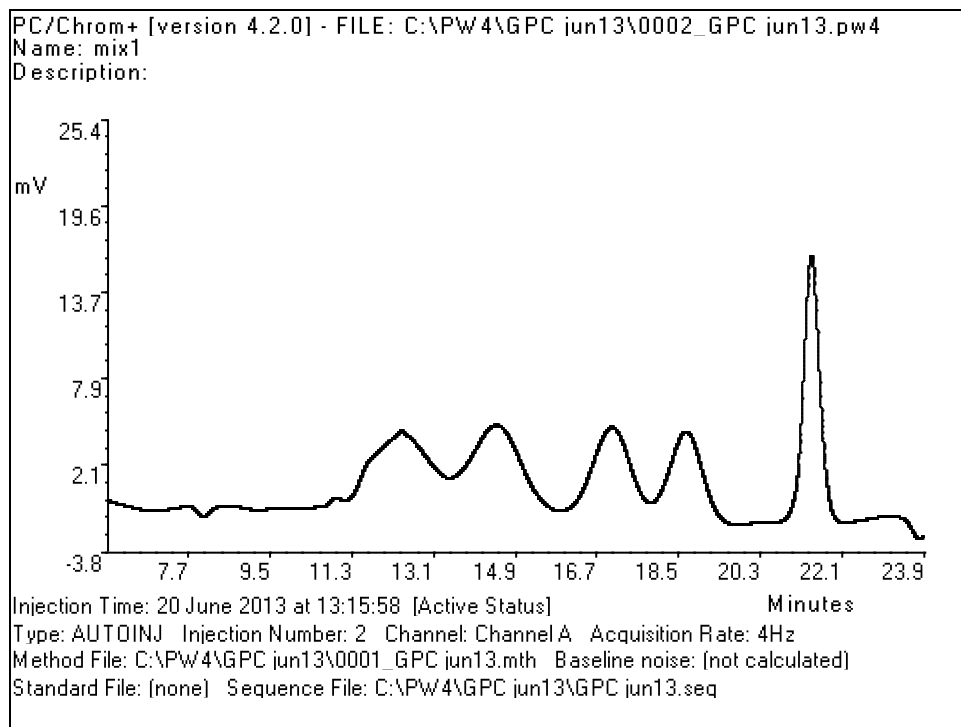
Tabela 3 - Peso molecular médio dos picos nos cromatogramas das amostras

PA					
Peak	RT	Area	%Ar	Log(Mw)	Mw
1	12,17	1213,96	84,55	5,59	386450
2	13,36	147,57	10,28	5,26	183205
3	14,39	74,21	5,17	5,00	100733
PN					
Peak	RT	Area	%Ar	Log(Mw)	Mw
1	11,23	2182,34	96,33	5,89	767559
2	12,80	83,14	3,67	5,41	257118
PC					
Peak	RT	Area	%Ar	Log(Mw)	Mw
1	10,14	63769,62	97,89	6,29	1956154
2	12,76	1362,07	2,09	5,42	263960

Fonte: Dados da pesquisa

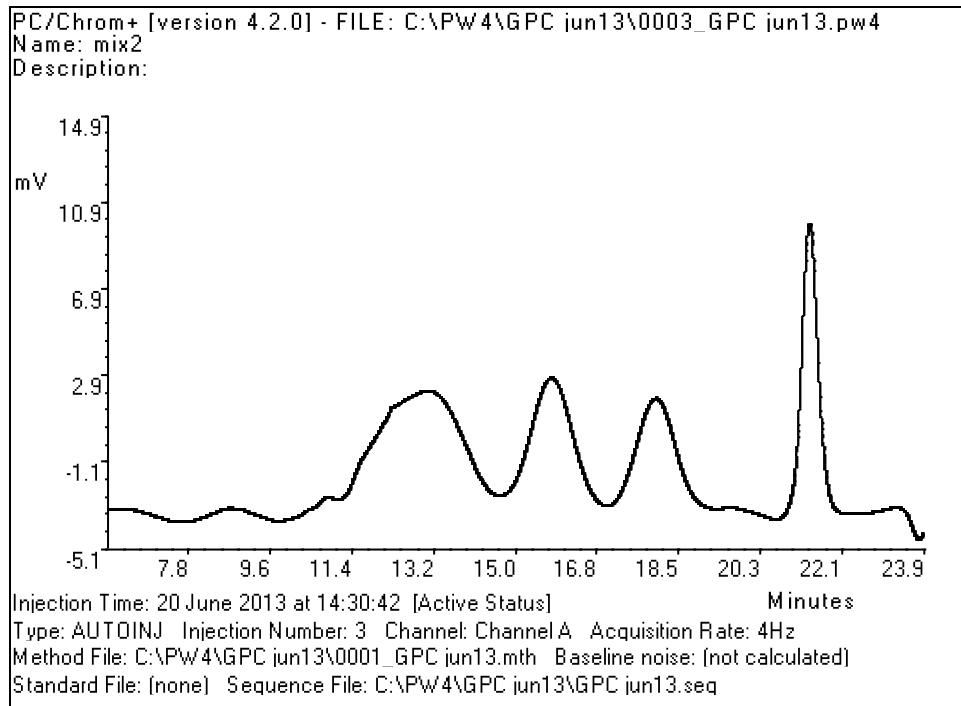
Cromatogramas:

Gráfico 2 - Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) MIX1



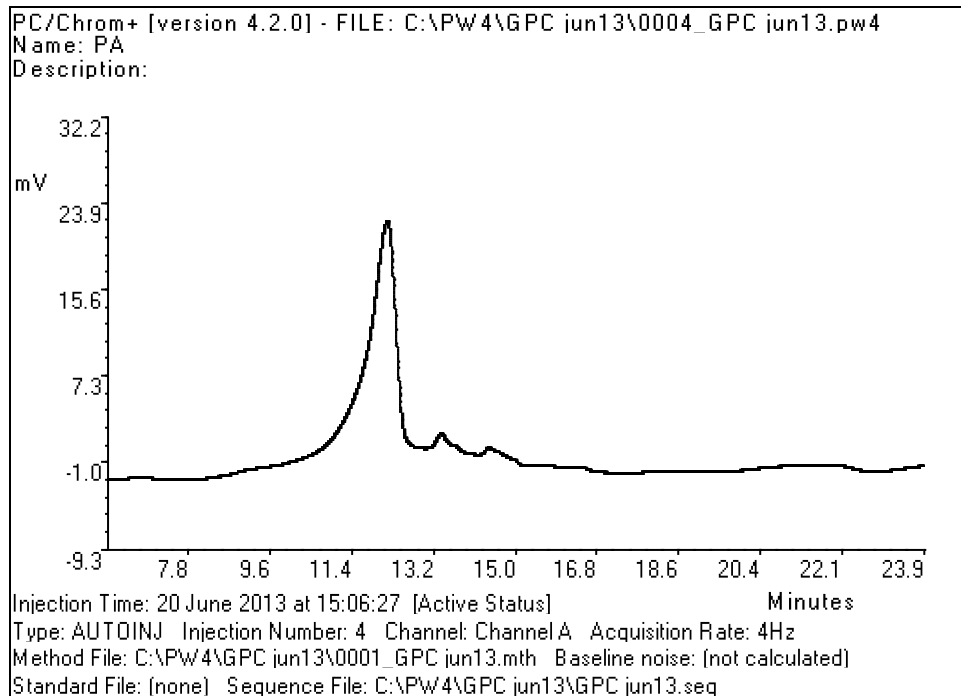
Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 3 - Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) da mistura dos polissacarídeos P-400, P-200, P-100, P-50, P-20, P-10, P5 e glicose.



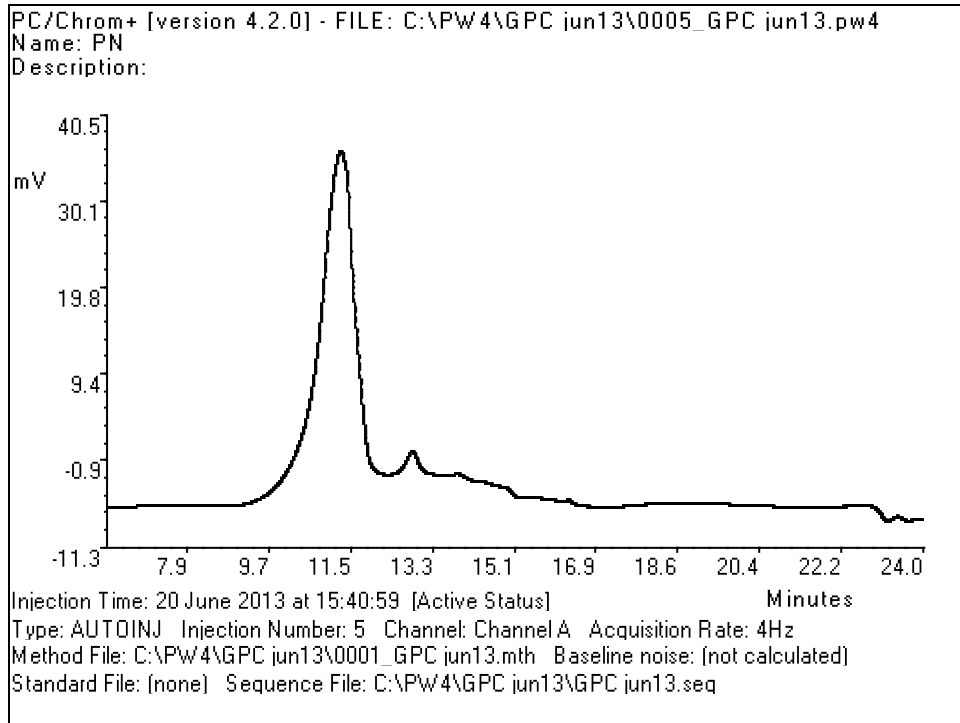
Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 4 - Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) da pectina ácida (PA)(PEC1,5)



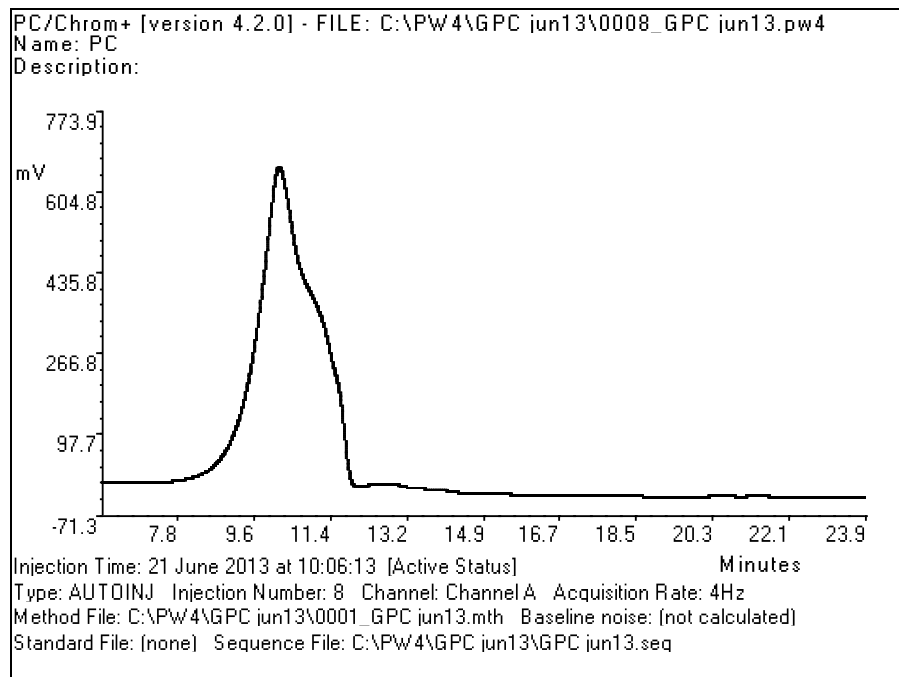
Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 5 - Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho) da pectina comercial (PC)(PECc)



Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 6 - Cromatograma da análise por SEC (cromatografia líquida de exclusão de tamanho)



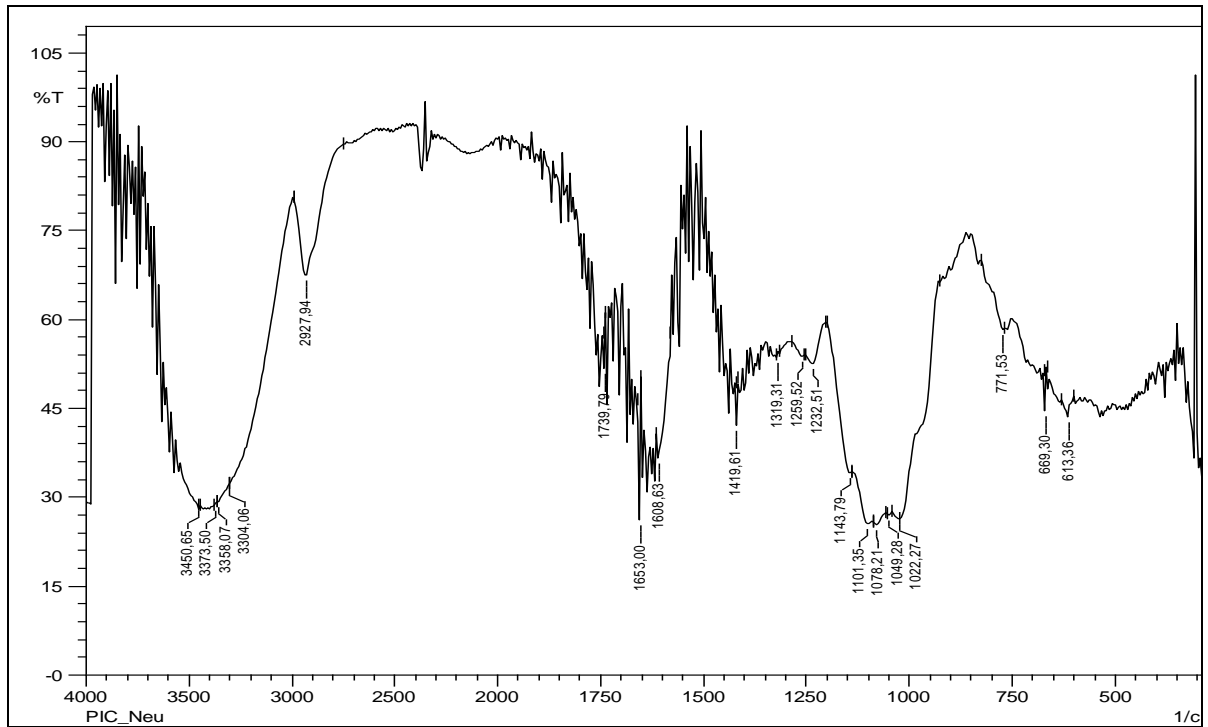
Fonte: Dados da pesquisa

A pectina comercial (PECc) possui a maior massa ou peso molar (M_w) (19×10^5) em relação a pectina neutra (PEC6,0) ($7,6 \times 10^5$) e ácida (PEC1,5) ($3,8 \times 10^5$). Referente ao teor de fenólicos totais (TFT), a Pectina neutra (PEC 6,0) apresentou maior teor (24,04 mg/g) (Tabela 1). Quanto maior a massa molar (M_w), maior será a viscosidade da pectina dissolvida em água, alterando assim as propriedades e aplicações da pectina (KAR; ARSLAN, 1999; MASUELLI, 2011).

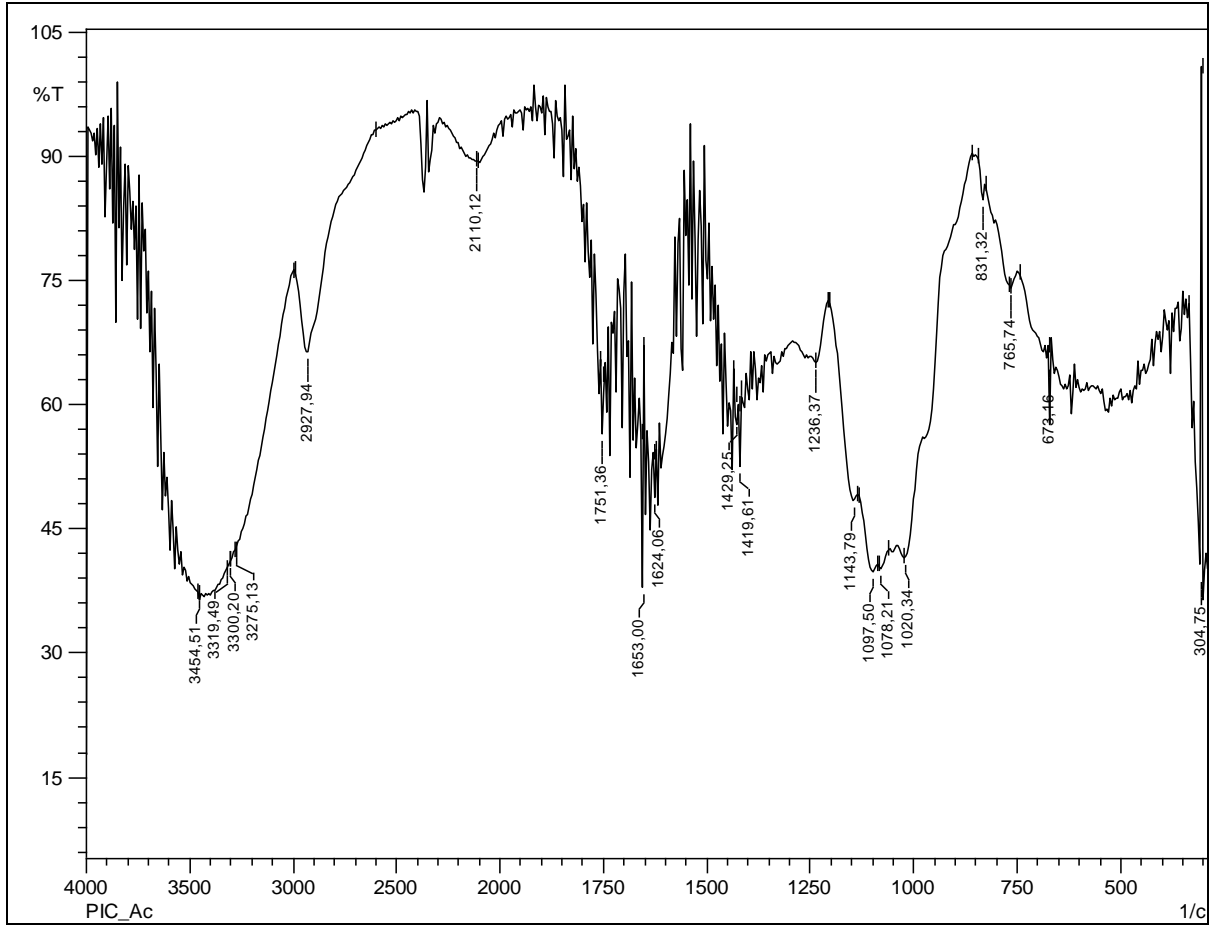
Os resultados obtidos estão de acordo com as massas médias de pectinas descritos na literatura.

6.1.1 Caracterização espectroscópica: Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

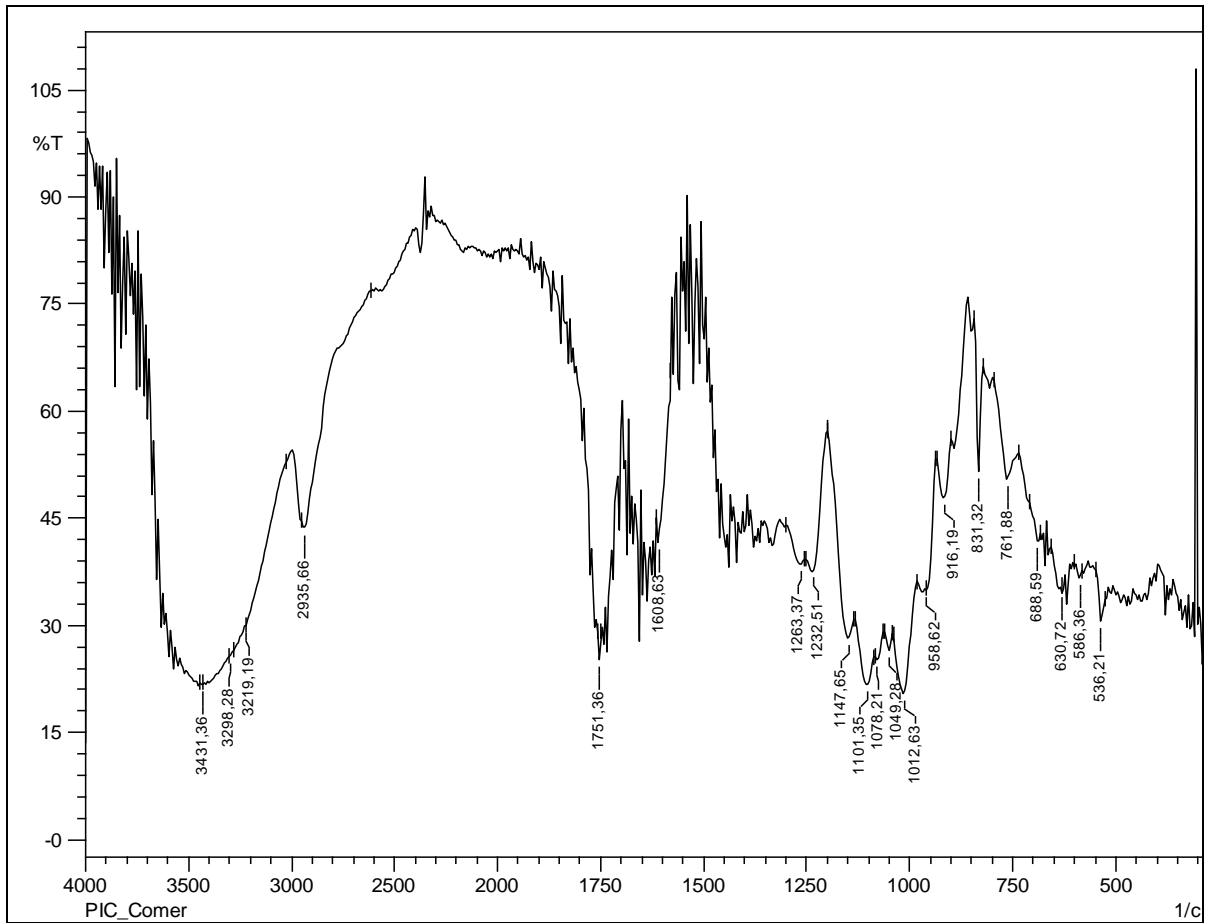
Na caracterização da estrutura das amostras obtida pelo espectro na região do infravermelho (IV), as pectinas apresentaram bandas de absorção fortes entre nas regiões de 3600-3100 (ν O-H), 1750 (ν C=O de éster), 1650 (ν C=O de ácido) e 1300-1000 cm^{-1} (ν C-O), sugerindo presença de um componente de ésteres e ácidos carboxílicos poliidroxilados, além de bandas fracas de absorção em 2950-2880 (ν C-H), 1470 e 1390 cm^{-1} (δ_s C-H), que caracterizam a natureza alifática dessa substância. Estes dados estão de acordo com de outros compostos pécticos descritos na literatura (TORRALBO et al., 2012).

Gráfico 7 - Espectro na região do Infravermelho de PEC6,0 (pectina neutra) (KBr)

Fonte: Dados da pesquisa

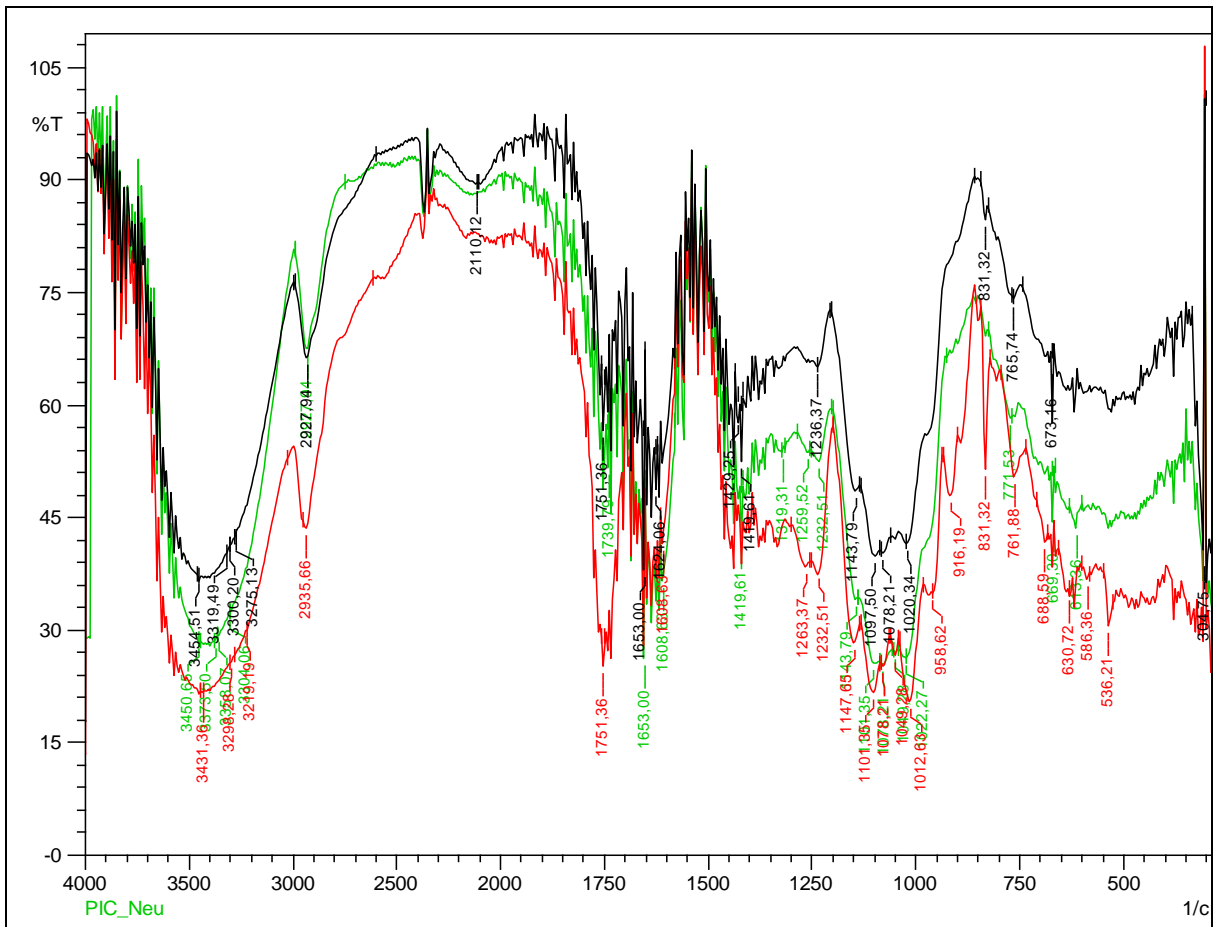
Gráfico 8 - Espectro na região do Infravermelho de PEC1,5 (pectina ácida) (KBr)

Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 9 - Espectro na região do Infravermelho de PECc (pectina comercial) (KBr)

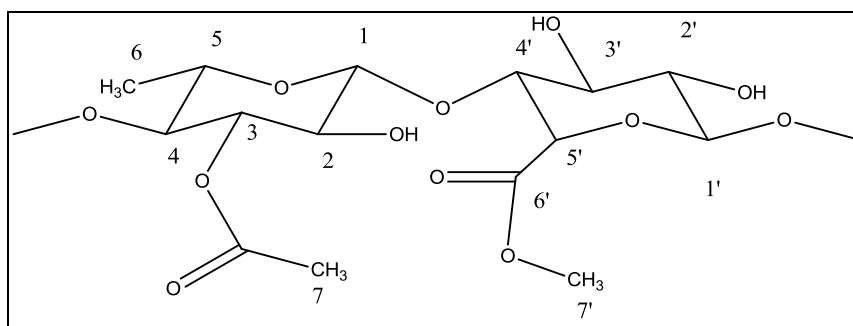
Fonte: Dados da pesquisa

Gráfico 10 - Sobreposição dops espectro na região do Infravermelho de PEC6,0 (em verde), PEC1,5 (em preto) e PECc (em vermelho) (KBr)



Fonte: Dados da pesquisa

Os espectros obtidos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) a 300 MHz quando foi utilizado D₂O, foram muito semelhantes aos descritos na literatura para compostos pécnicos (PATRA et al., 2012). Além disto, foram utilizados dados de simulação para efeito de atribuição parcial dos sinais de carbonos e hidrogênios. Como pode ser ilustrado nos Gráficos 10 e 13 os espectro de RMN de ¹H das pectinas PEC 1,5 (pectina ácida) e PEC 6,0 (pectina neutra) foram observados sinais, dentre os quais, um sinal indicativo do principal composto identificado, um polissacarídeo, de acordo com a observação do hidrogênio e carbonos anoméricos H-1 e H-1' (δ_H 5,1 e 5,0). Verificaram-se também os sinais dos hidrogênios ligados aos outros carbonos oxigenados entre δ_H 4,2-3,2 (H-2, H-3, H-4 e H-5; H-2', H-3', H-4' e H-5'). Além disto, um duplete ($J = 6,0$ Hz) em δ_H 1,16 relativo a um resíduo de raminose (C-6, H₃C-).

Figura 5 - Software ChemDraw

Fonte: Do autor

Como pode ser ilustrado nos Gráficos 12 e 15 os espectros de RMN de ^{13}C das pectinas PEC 1,5 (pectina ácida) e PEC 6,0 (pectina neutra) foram observados sinais de carbonos anoméricos C-1 e C-1' (δ_{C} 110-110). Verificou-se também os sinais dos outros carbonos oxigenados ligados entre δ_{C} 83,0-68,0 (C-2, C-3, C-4 e C-5; C-2', C-3', C-4' e C-5'), um sinal em δ_{C} 61,0 relativo ao resíduo $\text{H}_3\text{C}-\text{O}$ (C-7')(de éster), um sinal em δ_{C} 52,0 do grupo acetila (C-7)($\text{H}_3\text{C}-\text{COO}$) e um sinal em δ_{C} 16,0 relativo a um resíduo de $\text{H}_3\text{C}-$ de rhaminose.

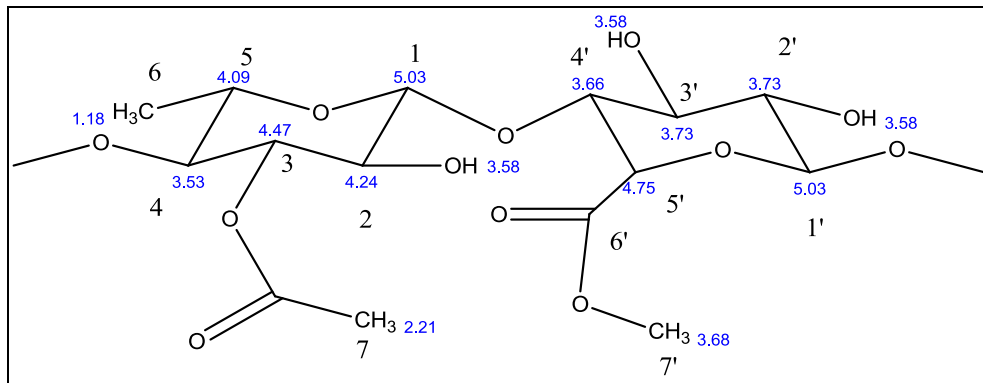
Estas observações puderam ser verificadas pelos mapas de correlações COSY (HxH) (Gráficos 13 e 16) onde foram observadas as correlações H-1/H-2, H1'/H-2', H-4/H-3, H-3/H-4, H-2'/H-3' e H-5/H-6.

Para os derivados acetilados, além dos sinais característicos da cadeia principal do polissacarídeo, foram observados os sinais em δ_{H} 2,7 e 2,9 dos grupos acetila nos espectros de RMN de ^1H (Gráficos 17 e 18) e em δ_{C} 21,0 no espectro de RMN de ^{13}C (Gráfico 19), além das correlações no mapa de contornos COSY (Gráfico 20).

Outros experimentos de RMN deverão ser realizados para que se tenha uma melhor caracterização estrutural das pectinas.

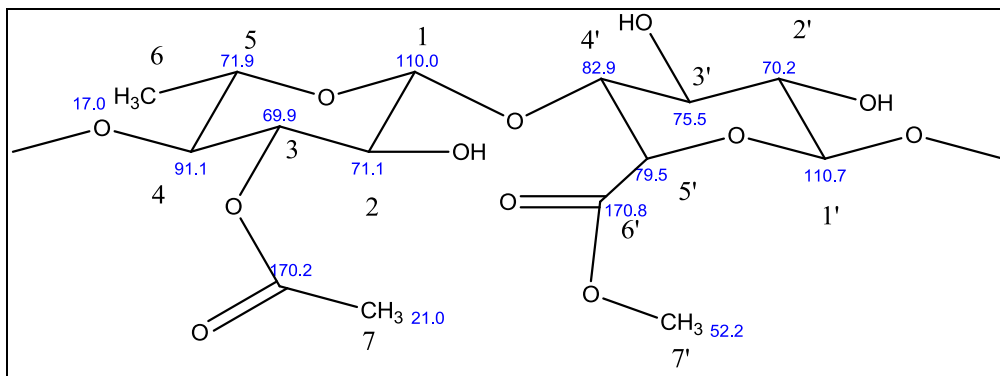
Simulações:

Figura 6 - Simulação de RMN de ^1H utilizando o software ChemDraw ultra 12.0.2.1076



Fonte: Do autor

Figura 7 - Simulação de RMN de ^{13}C utilizando o software ChemDraw ultra 12.0.2.1076

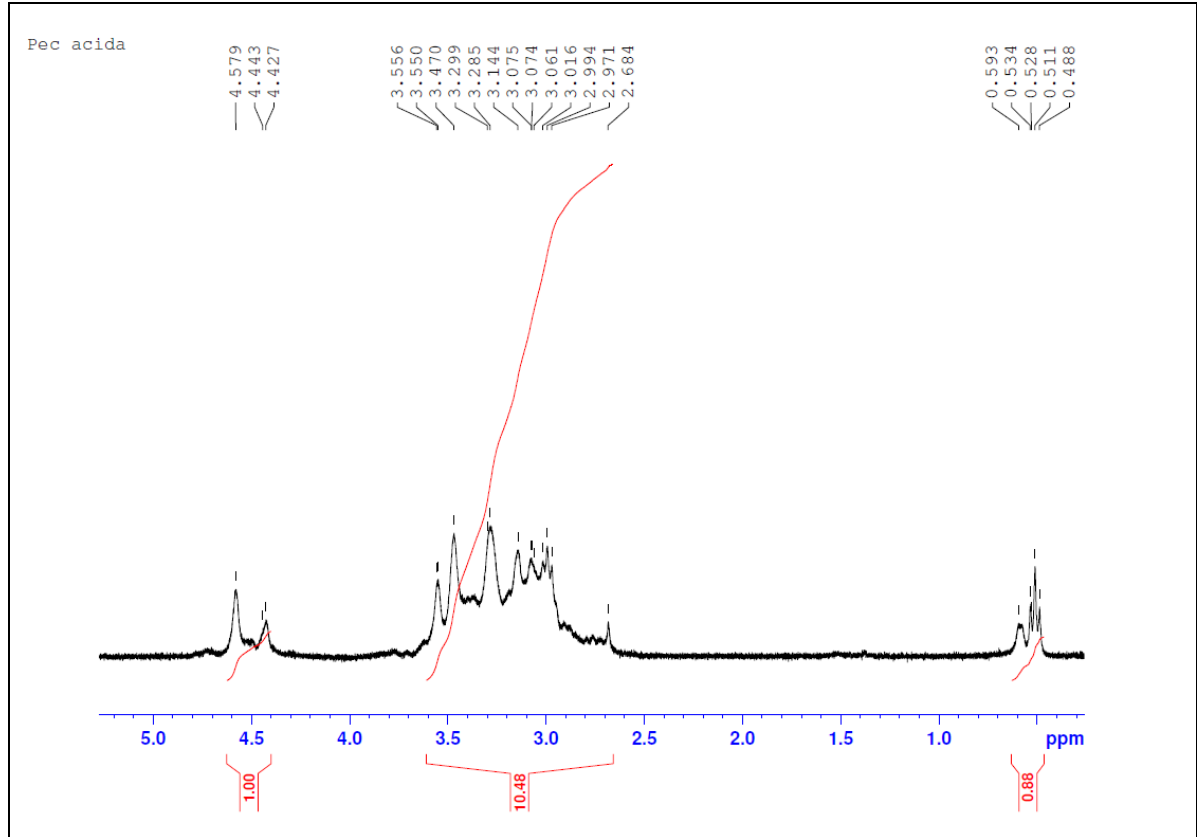


Fonte: Do autor

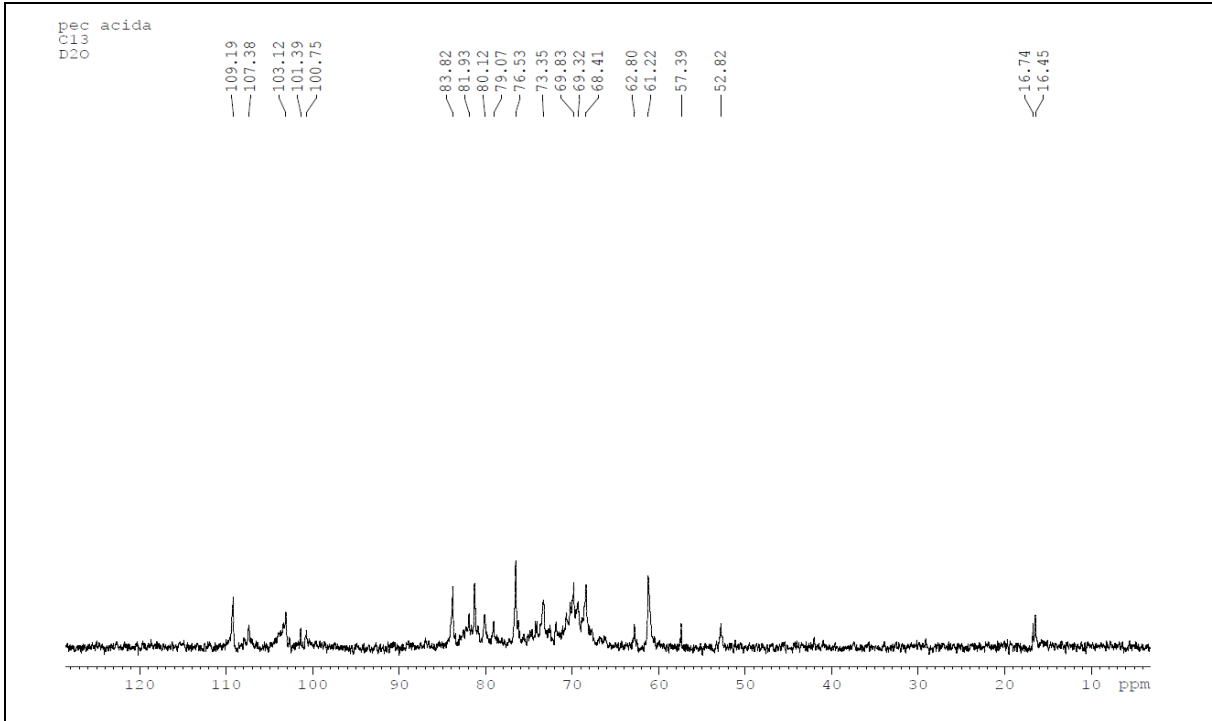
Experimentos de ressonância magnética nuclear (rmn):

PEC 1,5 – Pectina ácida. RMN de ^1H

Gráfico 11 - Espectro de RMN de ^1H de PEC 1,5 (D₂O, 300MHz)

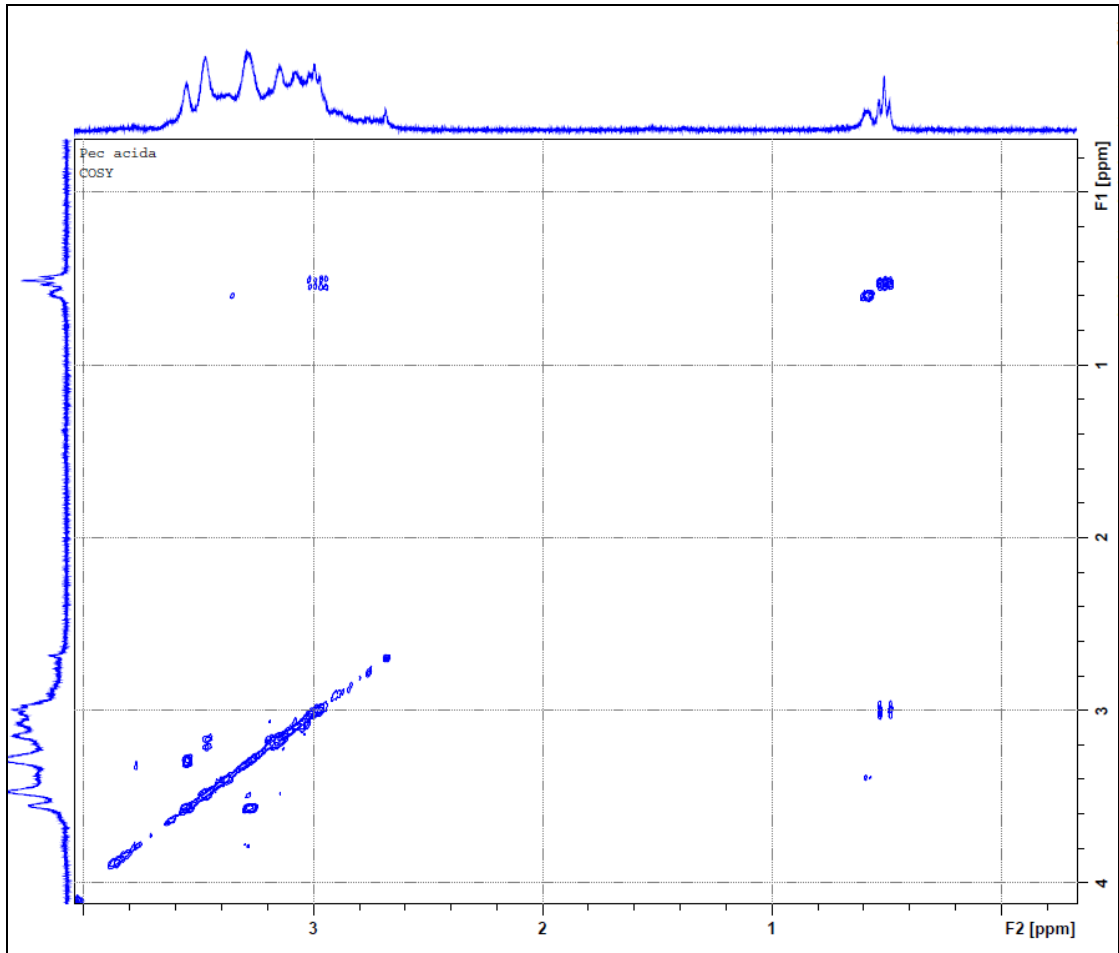


Fonte: Dados da pesquisa

RMN de ^{13}C **Gráfico 12 - Espectro de RMN de ^{13}C de PEC 1,5 (D₂O, 75 MHz)**

Fonte: Dados da pesquisa

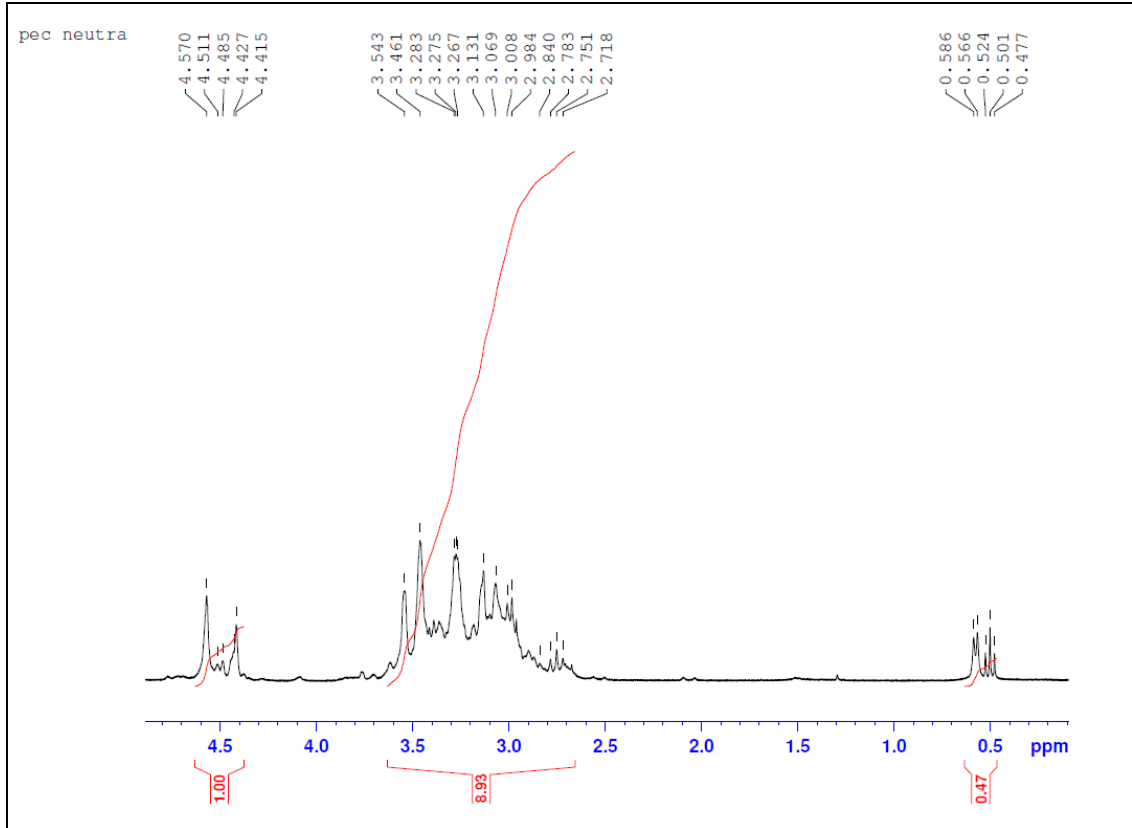
COSY (H,H)

Gráfico 13 - Mapa de contornos COSY (H,H) de PEC 1,5 (D₂O, 300MHz)

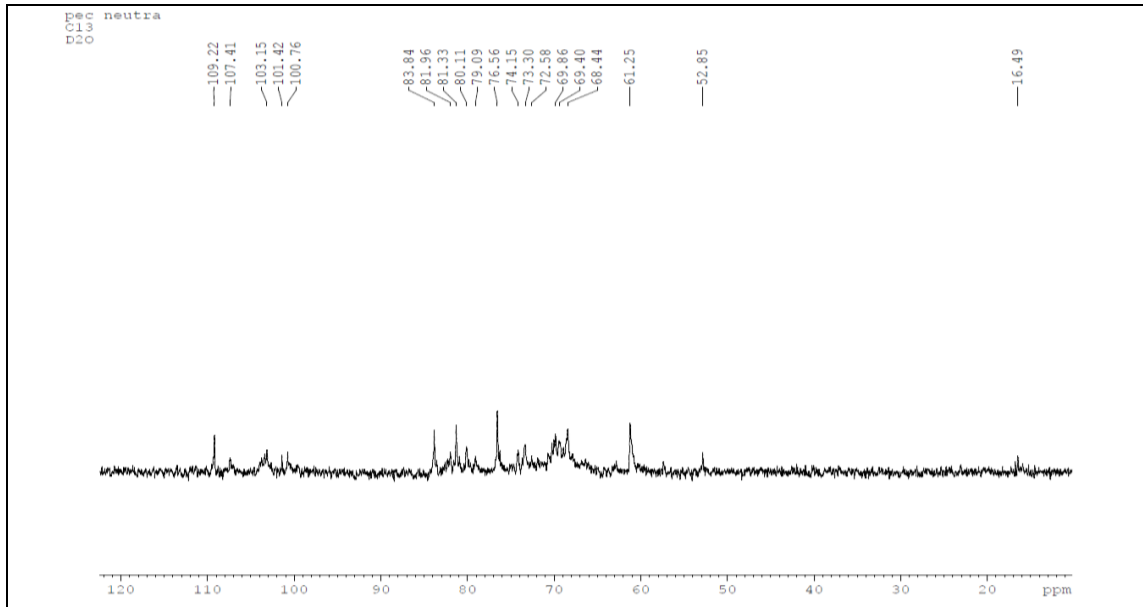
Fonte: Dados da pesquisa

PEC 6,0 – Pectina neutra. RMN de ^1H

Gráfico 14 - Espectro de RMN de ^1H de PEC 6,0 (D_2O , 300MHz)

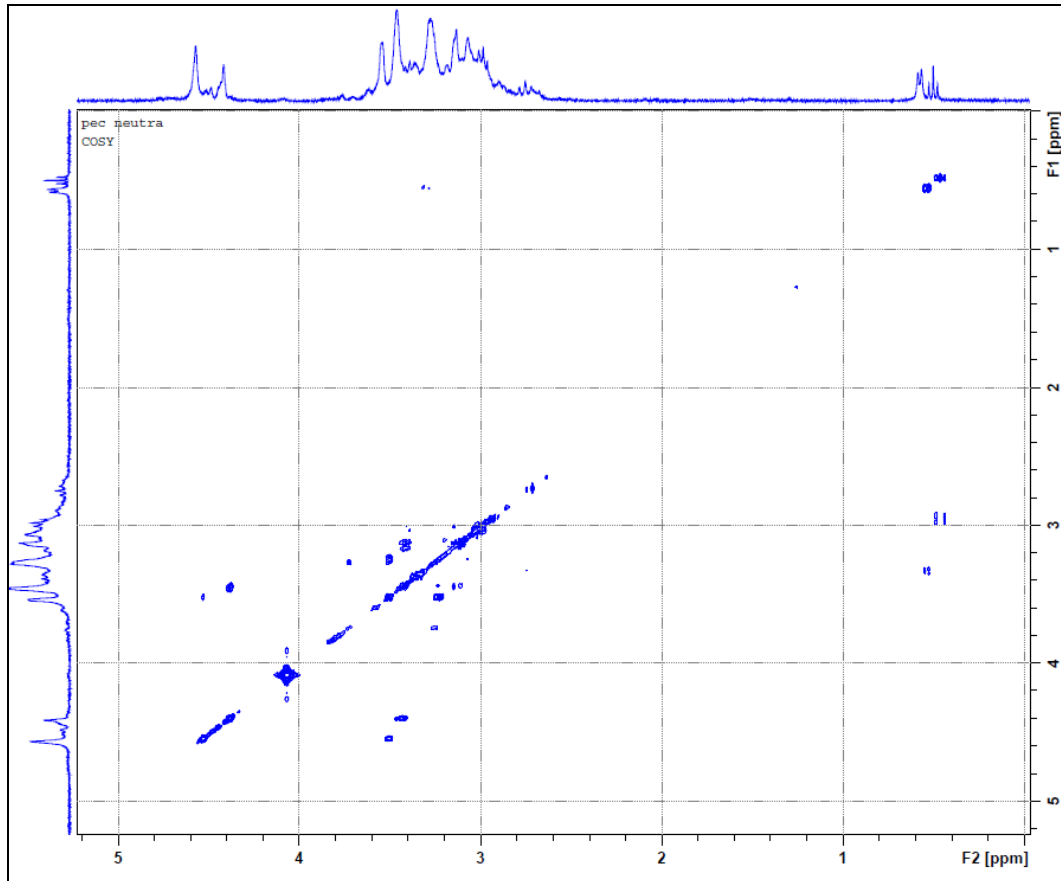


Fonte: Dados da pesquisa

RMN de ^{13}C **Gráfico 15 - Espectro de RMN de ^{13}C de PEC 6,0 (D₂O, 75 MHz)**

Fonte: Dados da pesquisa

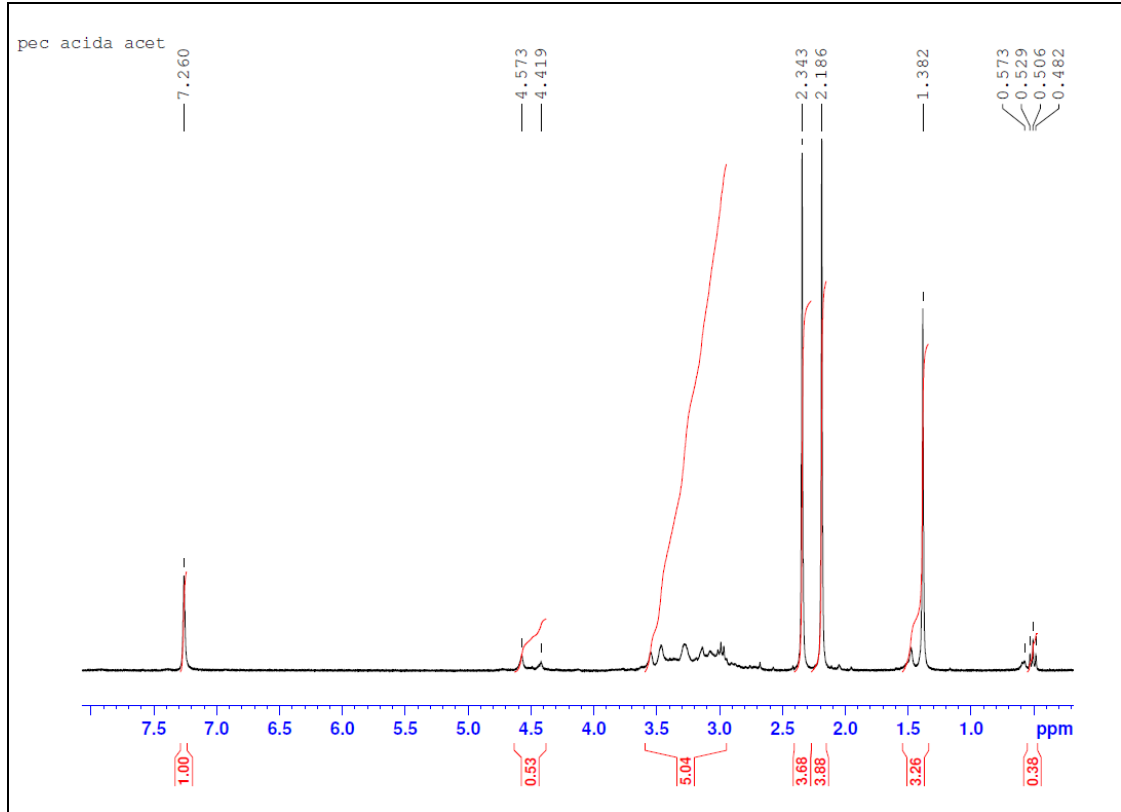
COSY (H,H)

Gráfico 16 - Mapa de contornos COSY (H,H) de PEC 6,0 (D₂O, 300MHz)

Fonte: Dados da pesquisa

PEC1,5-AC – Pectina ácida acetilada. RMN de ^1H

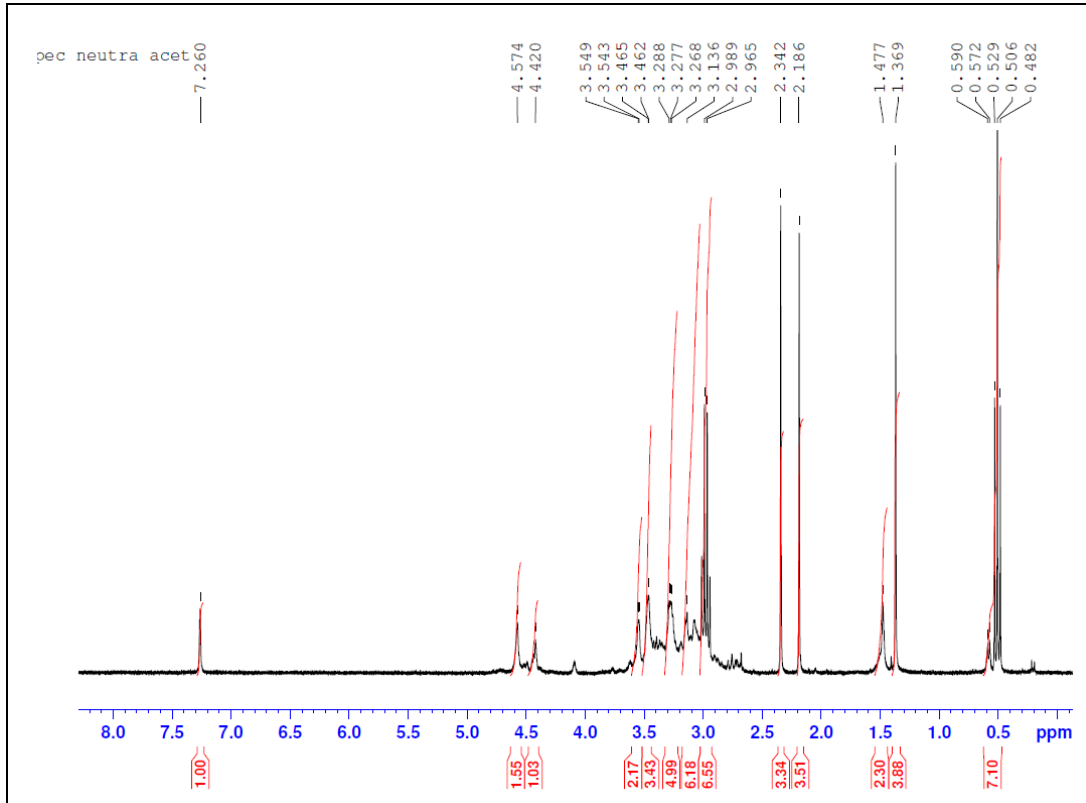
Gráfico 17 - Espectro de RMN de ^1H PEC1,5-AC (D₂O, 300MHz)



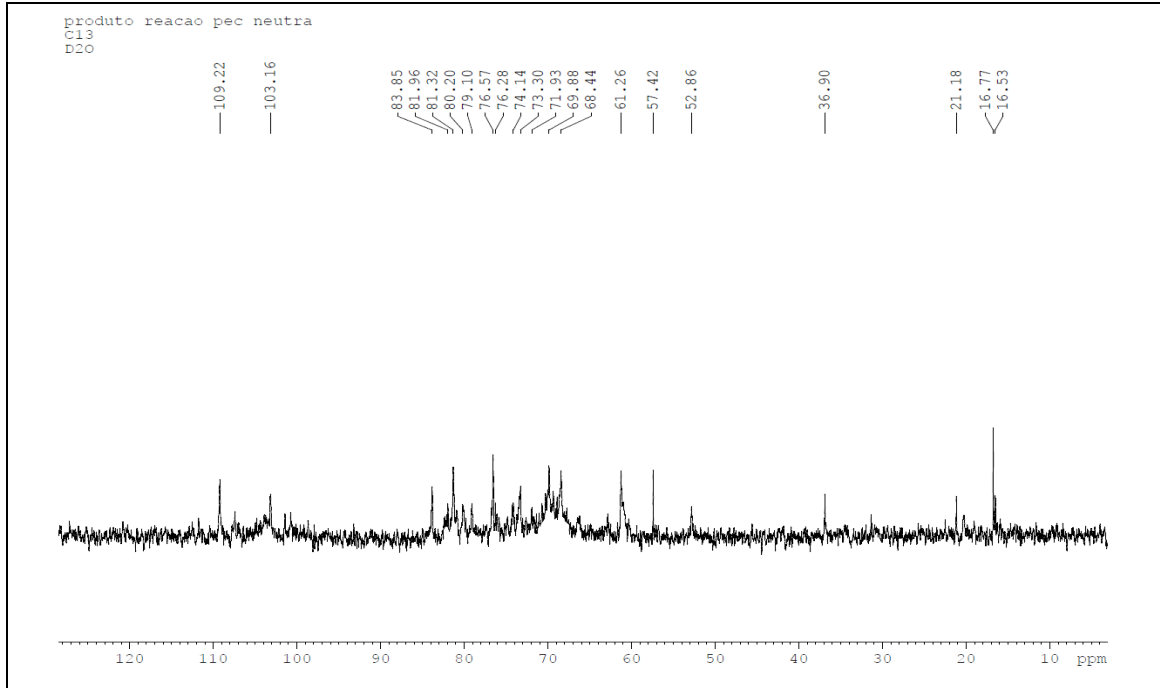
Fonte: Dados da pesquisa

PEC6,0-AC – Pectina neutra acetilada. RMN de ^1H

Gráfico 18 - Espectro de RMN de ^1H de PEC6,0-AC (D_2O , 300MHz)



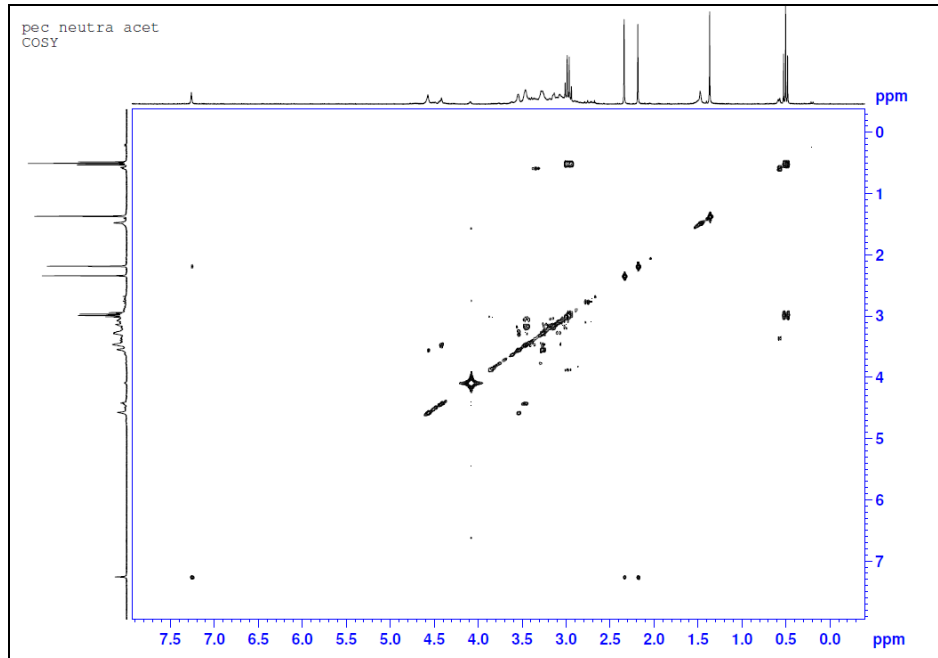
Fonte: Dados da pesquisa

RMN de ^{13}C **Gráfico 19 - Espectro de RMN de ^{13}C de PEC6,0-AC (D₂O, 75 MHz)**

Fonte: Dados da pesquisa

COSY (H,H)

Gráfico 20 - Mapa de contornos COSY (H,H) de PEC6,0-AC (D₂O, 300MHz)

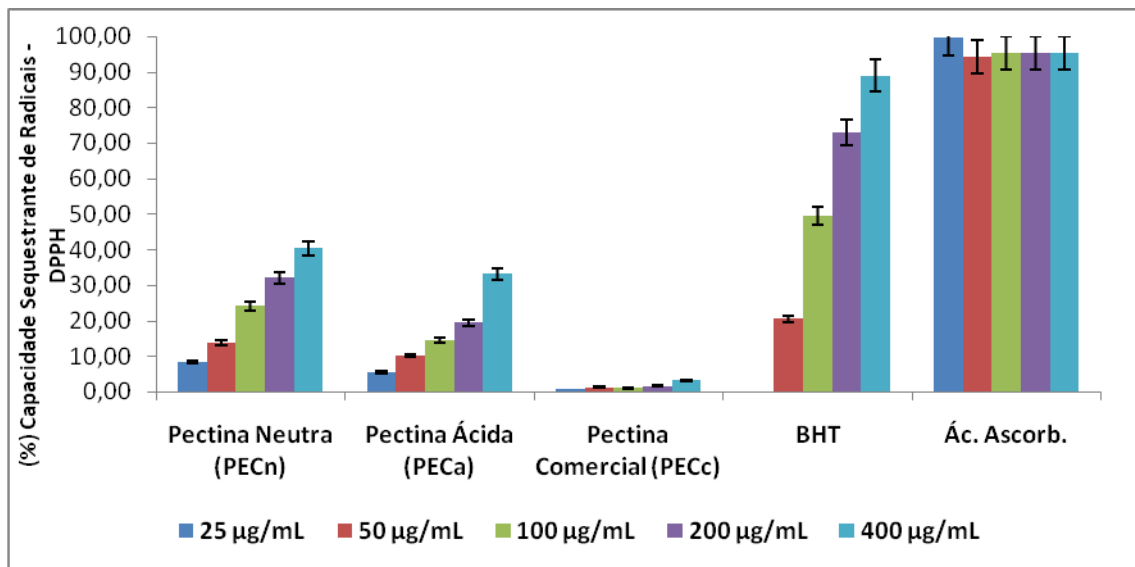


Fonte: Dados da pesquisa

6.2 Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH

Foi observado que a pectina extraída em meio aquoso neutro (PEC 6,0) apresentou uma capacidade sequestrante de DPPH maior na concentração de 400 μ g/mL com valor de 40,47% (Gráfico 20). Já a pectina extraída em meio aquoso ácido (PEC 1,5) também apresentou maior capacidade sequestrante de DPPH na concentração de 400 μ g/mL, porém com um valor menor (33,23%) do que (PEC6,0). Com relação a pectina comercial de citrus, esta não apresentou capacidade sequestrante significativa (Gráfico 20). O padrão BHT apresentou maior capacidade na concentração de 400 μ g/mL com valor de 89,3% e o ácido ascórbico resultou em capacidade próxima dos 99% em todas as concentrações (Gráfico 20).

Gráfico 21 - Avaliação da capacidade sequestrante de radicais DPPH em compostos pécticos extraídos do epicarpo de *G. brasiliensis*



Fonte: Dados da pesquisa

Apesar dos compostos pécticos do epicarpo de *G. brasiliensis* apresentarem baixa capacidade sequestrante de DPPH em comparação com os padrões BHT e Àc. Ascorbico, têm sido evidenciado atividades antioxidantes para a pectina na literatura. A adição de oligossacarídeos oriundos de pectina na dieta de camundongos obesos levou uma maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), além da diminuição da peroxidação lipídica (LIU et al., 2010). Gan e Latiff (2011) e Patra et al. (2012) observaram uma significativa capacidade sequestrante do radical DPPH pelas pectinas de mangostão (*Garcinia mangostana*) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) respectivamente.

6.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

A pectina ácida (PEC 1,5) inibiu 50% do fungo *C. albicans* quando na concentração de 1000 µg/mL. Os demais compostos não apresentaram atividade antimicrobiana para nenhuns fungos testados (Tabela 4).

Tabela 4 - Determinação dos valores de concentrações inibitórias do Fluconazol e compostos pécnicos em fungos

Fungos/ Substância		<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
(µg/mL)		ATCC10231	ATCC750	ATCC 6258
Fluconazol	IC50	1	1	32
PEC6,0	IC50	NC	NC	NC
	IC90	NC	NC	NC
PEC1,5	IC50	1000	NC	NC
	IC90	NC	NC	NC
PECc	IC50	NC	NC	NC
	IC90	NC	NC	NC

IC50: inibição de 50% do crescimento; IC90: inibição de 90% do crescimento; NC: nenhuma das concentrações avaliadas

Fonte: Dados da pesquisa

Na avaliação da atividade inibitória de crescimento de bactérias, observou-se que a pectina neutra e comercial (PEC 6,0; PECc) apresentaram uma inibição de 50% de crescimento na concentração de 500 µg/ml. A pectina ácida apresentou também uma atividade de inibição de 50%, porém em uma concentração maior (1000 µg/mL) (Tabela 5).

Vale ressaltar que tanto para fungos, quanto para bactérias as concentrações de inibição de crescimento encontradas, foram bem superiores ao antifúngico Fluconazol e ao antibiótico Cloranfenicol (Tabela 4 e 5).

Tabela 5 - Determinação dos valores de concentrações inibitórias do Clorofenicol e compostos pécicos em bactérias

Bactérias/Substância		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
(µg/mL)		ATCC 6538	ATCC 25922	ATCC 27853
Cloranfenicol	IC50	0,975	0,975	31,2
PEC6,0	IC50	500	NC	NC
	IC90	NC	NC	NC
PEC1,5	IC50	1000	NC	NC
	IC90	NC	NC	NC
PECc	IC50	500	NC	NC
	IC90	NC	NC	NC

IC50: inibição de 50% do crescimento; IC90: inibição de 90% do crescimento; NC: nenhuma das concentrações avaliadas

Fonte: Dados da pesquisa

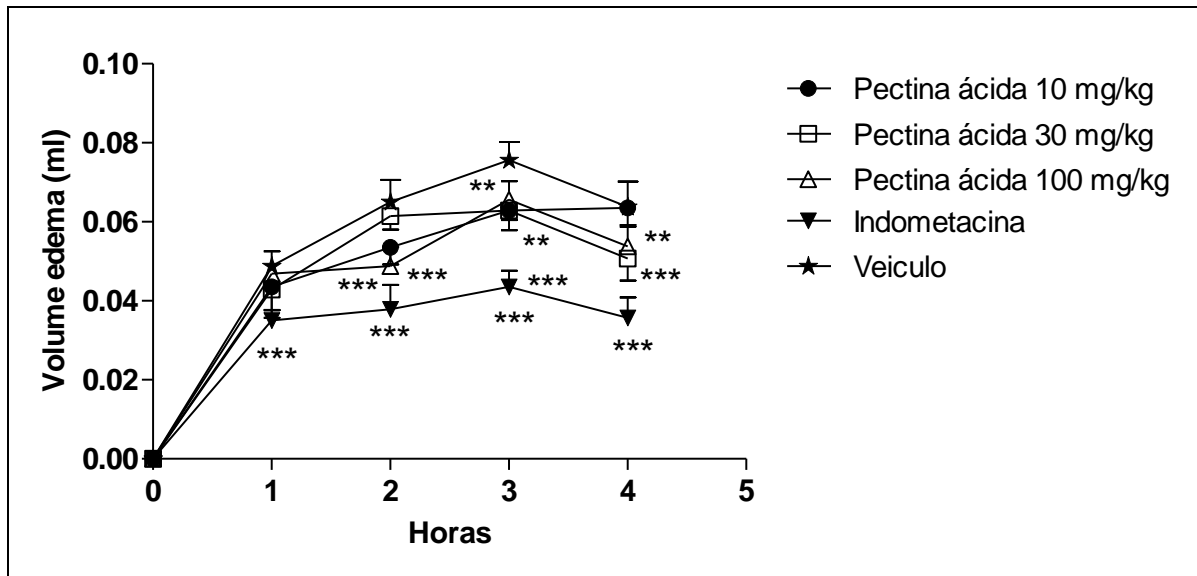
Apesar de não ocorrer uma atividade antimicrobiana marcante entre os compostos pécicos de *G. brasiliensis* e a pectina comercial de citrus, tem-se verificado na literatura a utilização de pectinas e seus oligossacarídeos em produtos de preservação de alimento com intuito de aumentar a capacidade bactericida contra a *E. coli* (LI et al., 2013). Homogalacturonanos isolados de folhas de *Plantago major* (tanchagem) mostraram eficácia contra infecção por *Streptococcus pneumoniae* em ratos (HETLAND et al., 2000).

Poucos estudos envolvendo atividade antimicrobiana e pectina vem sendo desenvolvidos, porém outros carboidratos como quitina e quitosana tem-se mostrado como potentes antimicrobianos (ALBUQUENQUE et al., 2010; JAYAKUMAR; et al., 2007).

6.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

O Gráfico 22 apresenta o resultado do teste de edema de pata induzido por carragenina. Nele pode-se observar que a pectina ácida nas doses de 10 e 30 mg/kg inibiu em 32 e 27% respectivamente o edema da pata na segunda hora em relação ao grupo controle negativo. Na terceira hora o edema foi reduzido em 23, 22 e 18% para as doses de 10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente ($p < 0,0001$, Newman-Keuls). A indometacina (controle positivo) foi capaz de inibir o processo inflamatório em 43% na terceira hora ($p < 0,0005$, Newman-Keuls), mantendo-se distinta em todas as horas analisadas.

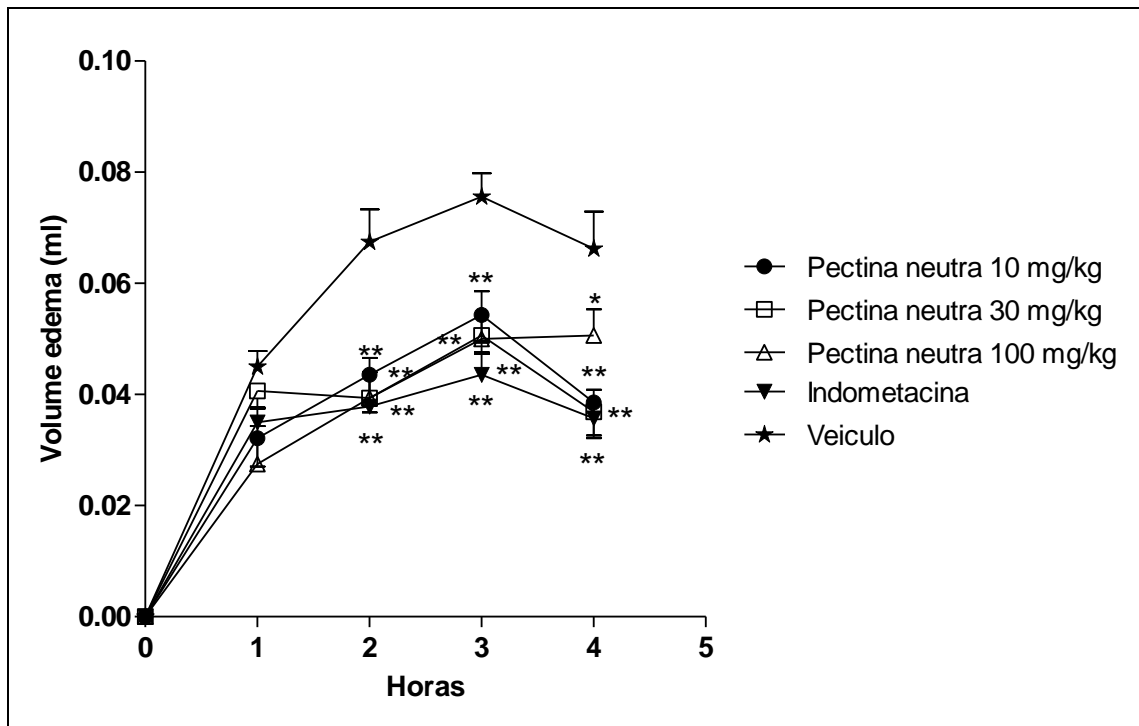
Gráfico 22 - Efeitos da administração da pectina ácida extraída do epicarpo de *G. brasiliensis* (10, 30 e 100 mg/kg, p.o.) ou indometacina (10 mg/kg, p.o.) no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (40 μ L/pata; 2% p/v). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de oito animais. Os asteriscos denotam o nível de significância, quando comparado com o grupo controle: ** P <0,01; * P <0,001**



Fonte: Dados da pesquisa

O Gráfico 23 mostra que a pectina neutra foi capaz de inibir o processo inflamatório no edema de pata induzido por carragenina na segunda hora em 43% nas doses de 10 e 100 mg/kg e a dose de 10 mg/kg inibiu em 35% o edema ($p < 0,0001$, Newman Keuls), na terceira hora a pectina neutra foi capaz de inibir 29, 33 e 34% o processo inflamatório (10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente; $p < 0,002$; Newman Keuls) em relação ao grupo controle negativo, mantendo-se distinta na quarta hora analisada. O controle positivo (indometacina) apresentou redução significativa em 22, 48, 40 e 45% na primeira, segunda, terceira e quarta horas, respectivamente do experimento.

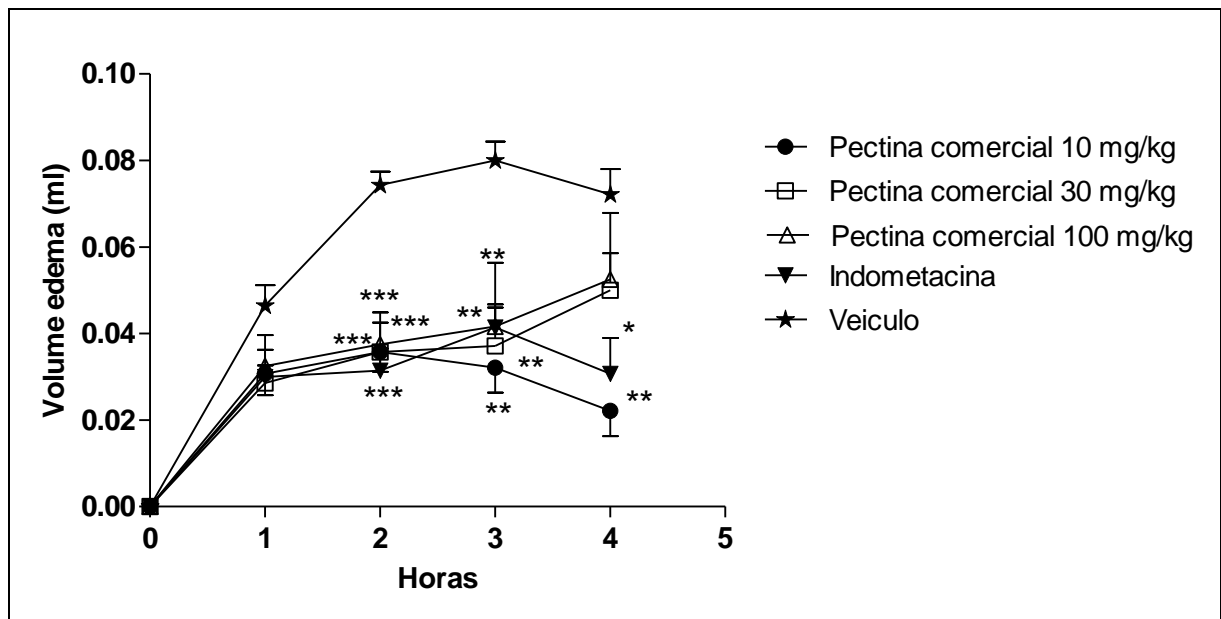
Gráfico 23 - Efeito da administração da pectina neutra extraída do epicarpo de *G. brasiliensis* (10, 30 e 300 mg/kg, p.o.) ou indometacina (10 mg/kg, p.o.) no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (40 µL/pata; 2% p/v). Cada ponto representa a média ±E.P.M. de oito animais. Os asteriscos denotam o nível de significância, quando comparado com o grupo controle: * P<0,05; ** P <0,01



Fonte: Dados da pesquisa

O Gráfico 24 mostra que a pectina comercial foi capaz de inibir o processo inflamatório no edema de pata induzido por carragenina em 51% nas doses de 10 e 30 mg/kg (respectivamente) e 47% na dose de 100 mg/kg na segunda hora ($p < 0,0001$, Newman Keuls). Na terceira hora a pectina comercial foi capaz de inibir 60, 54 e 47% o processo inflamatório (10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente; $p < 0,002$, Newman Keuls) em relação ao grupo controle negativo. O controle positivo (indometacina) apresentou redução significativa em 58, 49 e 57% na segunda, terceira e quarta horas (respectivamente) do experimento.

Gráfico 24 - Efeito da administração da Pectina comercial (10, 30 e 100 mg/kg, p.o.) ou indometacina (10 mg/kg, p.o.) no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (40 µL/pata; 2% p/v). Cada ponto representa a média ±E.P.M. de oito animais. Os asteriscos denotam o nível de significância, quando comparado com o grupo controle: *P<0,05; ** P <0,01; * P <0,001**



Fonte: Dados da pesquisa

A resposta edematogênica é um dos sinais da resposta inflamatória decorrente do aumento da permeabilidade vascular, que ocorre na microcirculação, devido a ação dos mediadores liberados (MOREIRA et al., 2008a). A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas que induz resposta inflamatória local mensurável. É o modelo de edema de pata mais utilizado para avaliar efeito antiinflamatório de drogas, geralmente quantificado por plestimômetro (SANTA-CECÍLIA et al., 2011). Apresenta duas fases inflamatórias e uma terceira não característica. Na primeira hora, logo após injeção da carragenina, há aumento da permeabilidade vascular mediada por histamina e serotonina. Na segunda hora o aumento da permeabilidade é ocasionado por cininas. Na terceira hora o aumento da permeabilidade vascular ocorre devido ação das prostaglandinas (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971).

A administração de carragenina (0,4µL a 2%) nas patas dos camundongos induziu edema de forma gradual, mensurável a partir da primeira hora após sua indução. O tratamento com a pectina (ácida, neutra e comercial) inibiu o edema na terceira hora, sendo similar à do

grupo tratado com indometacina, o que sugere um mecanismo de ação baseado no envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971).

Estudos da atividade antiinflamatória da pectina têm sido bem relatados utilizando-se vários modelos. Corroborando com nossos dados, Popov et al. (2007a) verificaram uma redução da inflamação quando foi administrado (via oral) a pectina de *Rauvolfia callus*. A capacidade da pectina da graviola (*Apium graveolens*) em prevenir a inflamação foi positiva em modelo choque séptico (OVODOVA et al., 2009; POPOV et al., 2007b). Similarmente à indometacina, a pectina do maracujá reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina em camundongos diabéticos, com redução da migração de neutrófilos e subsequente maior preservação do tecido (SILVA et al., 2011).

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram empregados dois métodos para a extração da pectina da *G. brasiliensis*, sendo um em meio neutro e outro em meio ácido. Observou-se que o processo de extração influenciou nas propriedades químicas e biológicas das pectinas do bacupari, sendo ainda mais vantajoso o método onde se emprega o meio neutro. Neste sentido, a pectina neutra (PEC 6,0) apresentou alto teor de metoxilação (MEO) e alto grau de esterificação (DE), além de maior massa molecular (Mw) em relação a pectina ácida (PEC 1,5). Estes fatores levam a uma maior viscosidade da pectina dissolvida em água, alterando assim as propriedades e aplicações da pectina. As pectinas extraídas do bacupari e a comercial não apresentaram uma atividade antimicrobiana significativa contra os microrganismos avaliados, entretanto, novos derivados contendo grupos substituintes diferentes poderão conduzir a compostos com tal atividade.

As pectinas extraídas demonstraram atividade antiinflamatória significativa, quando testados em *in vivo* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, o que sugere sua utilização como antiinflamatório, abrindo novas perspectivas na aplicação de novos agentes antiinflamatórios oriundos de compostos pécicos.

Os espectros na região do infravermelho e RMN são similares aos descritos na literatura, porém, uma análise mais minuciosa está sendo feita a fim de se detectar possíveis variações estruturais que expliquem as diferenças nas atividades antiinflamatórias e características químicas analisadas. Entretanto, nota-se que, a extração exaustiva com etanol antes da extração da pectina dos frutos de bacupari não retirou todos os compostos fenólicos do pericarpo, levando a uma pectina com maior teor de compostos fenólicos (TFT) e apresentou maior capacidade sequestrante de radical livre DPPH.

Este estudo abre perspectivas para a busca de novas pectinas naturais e desenvolvimento de novos fármacos com potencial para controle de processos inflamatórios.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUENQUE, C. et al. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. **Medical Mycology**, Orford, v. 48, n. 8 , p. 1018-1023, Dec. 2010.
- ANGER, H.; BERTH, G. Gel permeation chromatography and the MarkeHouwink relation for pectins with different degrees of methoxylation. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 6, p. 193-202, 1986.
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. Maryland: AOAC International, 1997.
- BALIGA, M. S. et al. The chemistry and medicinal uses of the underutilized Indian fruit tree *garcinia indica choisy* (kokum): a review. **Food Research International**, Ottawa, v. 44, n. 7, p. 1790–1799, Aug. 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.
- BESSION, V.; YAPO, B. M.; AVIT, G. Macromolecular and viscoelastic properties of low methoxy pectin from cashew apple pomace. **Universal Journal of Food and Nutrition Science**, Alhambra, v. 2, n. 1, p. 1–6, Feb. 2014.
- BRISKIN, B. S.; DEMIDOV, D. A.; PROSHIN, A. V. **Method for treating purulent wounds involves applying a pectin-containing preparation as beet powder prepared by applying sublimation, and if wound drying off a beet powder-fixing bandage should be used with sterile solution**. Processo n. 2005-250285, 2005.
- CANTERI, M. H. G. **Caracterização comparativa entre pectinas extraídas do pericarpo de maracujá-amarelo (*passiflora edulis f. flavicarpa*)**. 2010. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná e Université D’Avignon et Pays de Vaucluse, Curitiba, 2010.
- CANTERI, M. H. G. et al. Importância do tratamento térmico na casca de maracujá para extração de pectina. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. Ponta Grossa, v. 4, n. 1, p. 109-121, 2010.

CARPITA, N. C. Progress in the biological synthesis of the plant cell wall: new ideas for improving biomass for bioenergy. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, n. 3, p. 1-8, Jun. 2011.

CECÍLIA, F. V. S. **Efeito antinocepcivo e anti-inflamatório do extrato etanólico e da benzofenona 7 – epiclusianona isolada de folhas de garcinia brasiliensis mart (clusiaceae)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved standard – Sixth edition. M7-A6**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003. (verificar)

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **Approved Standard - Third Edition. M27-A3**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008. (verificar)

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 5, p. 850–861, Nov. 2005.

CUI, J. et al. New medicinal properties of mangostins: Analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 95, n. 2, p. 166–172, Apr. 2010.

D'ADDOSIO, R. et al. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). **Revista de la Facultad de Agronomía**, Caracas, v. 22, n. 3, p. 240-249, jul. 2005.

DEROGIS, P. B. M. C. et al. Complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of garciniaphenone and keto-enol equilibrium statements for prenylated benzophenones. **Magnetic Resonance Chemistry**, Chichester, v. 46, n. 3, p. 278-282, Mar. 2008.

DI ROSA M., GIROUD J. P., WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol.**, London, v. 104, n. 1, p. 15-28, May 1971.

DONGOWSKIA, G.; LORENZ, A. Intestinal steroids in rats are influenced by the structural parameters of pectin. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 15, n. 4, p. 196–205, Apr. 2004.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 427, n. 1, p. 119–127, Jan. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 2 v. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 4 de maio de 2012.

FERTONANI et al. Influência da concentração de ácidos no processo de extração e na qualidade de pectina de bagaço de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 599-612, out./dez. 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. Estratégias para Obtenção de Compostos Farmocologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais: Conceitos sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, jan./fev. 1998.

FRAEYE, I. et al. Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 2069–2077, Dec. 2009.

GAN, C-Y.; LATIFF, A. A. Extraction of antioxidant pectic-polysaccharide from mangosteen (*garcinia mangostana*) rind: optimization using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 83, n. 2, p. 600–607, Jan. 2011.

GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, Barking, v. 68, n. 3, p. 327–332, Feb. 2000.

GOLOVCHENKO, V. V. et al. Structure of pectic polysaccharides isolated from onion *Allium cepa* L. using a simulated gastric medium and their effect on intestinal absorption. **Food Chemistry**, Barking, v. 134, n. 4, p. 1813-1822, Oct. 2012.

GONTIJO, V. S. et al. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *garcinia brasiliensis* epicarp. **Food Chemistry**, Barking, v. 132, n. 3, p. 1230-1235, Jun. 2012.

HETLAND, G. et al. Protective effect of plantago major L. pectin polysaccharide against systemic streptococcus pneumoniae Infection in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 52, n. 4, p. 348–355, Oct. 2000.

HOKPUTSA, S. et al. Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from Durian Rinds (*durio zibethinus* Murr.): Isolation, fractionation, characterisation and bioactivity. **Carbohydrate Polymer**, London, v. 56, n. 4, p. 471–481, Jul. 2004.

JAYAKUMAR, R. et al. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 40, n. n. 3, p. 175–181, Feb. 2007.

JIANG, Y. et al. Physicochemical and comparative properties of pectins extracted from *akebia trifoliata* var. *australis* peel. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 87, n. 2, p. 1663–1669, Jan. 2012.

KAR, F.; ARSLAN, N. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity-molecular weight relationship. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 40, n. 4, p. 277–284, Dec. 1999.

KHATKO, Z. N. et al. **Composition for healing septic wounds and trophic ulcers, contains preset amount of antiseptic, high-purity beet pectin and water**. Processo n. 2010-D62520, 2010.

KIM, M. High-methoxyl pectin has a greater enhancing effect on glucose uptake in intestinal perfused rats. **Nutrition, Burbank**, v. 21, n. 3, p. 372–377, Mar. 2005.

LAI, L-S.; LIANG, H-Y. Chemical compositions and some physical properties of the water and alkali-extracted mucilage from the young fronds of *asplenium australasicum* (J. Sm.) Hook. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 344–349, Mar. 2012.

LE BOURVELLEC, C.; GUYOT, S.; RENARD, C. M. G. C. Interactions between apple (*malus x domestica* borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 75, n. 2, p. 251–261, Jan. 2009.

LEUNG, M. Y. K. et al. Polysaccharide biological response modifiers. **Immunology Letters**, Amsterdam, v.105, , n. 2, p. 101–114, Jun. 2006.

LIANG, R-H. et al. Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*ficus pumila* linn.) seeds. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 87, n. 1, p. 76–83, Jan. 2012.

LI, J. et al. Analysis of herba asari polysaccharides and their immunological activity. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 87, n. 1, p. 551–556, Jan. 2012.

LI, S. et al. Antibacterial Action of Haw Pectic Oligosaccharides. *International Journal of Food Properties*, New York, v. 16, n. 3, p. 706-712, 2013.

LIU, L. et al. Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. *Bioresource Technology*, Barking, v. 101, n. 9, p. 3268–3273, May 2010.

LOYOLA, N.; PAVÉZ, P.; LILLO, S. Pectin extraction from cv. pink lady (malus pumila) apples. *Cien. Inv. Agr.*, Santiago, v. 38, n. 3, p. 425-434, dic. 2011.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - parte II. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, v. 78, n. 5, p. 525–542, set./out. 2003.

MASUELLI, M. A. Viscometric study of pectin. Effect of temperature on the hydrodynamic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, Guildford, v. 48, n. 2, p. 286–291, Mar. 2011.

MARKOV, P. A. et al. Anti-inflammatory activity of pectins and their galacturonan backbone. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, Moscow, v. 37, n. 7, p. 817–821, Dec. 2011.

MAROUNEK, M. et al. Effect of pectin and amidated pectin on cholesterol homeostasis and cecal metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiology Research*, Praha, v. 56, n. 4, p. 433–442, Aug. 2007.

MARTINS, F. T. et al. Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *garcinia brasiliensis*. *Chemistry & Biodiversity*, Zürich, v. 5, n. 2, p. 251–258, Feb. 2008.

MATIA-MERINO, L.; LAU, K.; DICKINSON, E. Effects of low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acid-induced sodium caseinate gels. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 18, n. 2, p. 271–281, Mar. 2004.

MESBAHI, G.; JAMALIAN, J.; FARAHNAKY, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in foods systems. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 19, n. 4, p. 731-738, Jul. 2005.

MIGLIORI, M. et al. Compatibility analysis of pectin at different esterification degree from intrinsic viscosity data of diluted solutions. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 70, n. 10, p. 863–867, Oct. 2010.

MOHD, N. S. et al. Extraction and characterization of pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) using various extraction conditions. **Sains Malaysiana**, Bang, v. 41, n. 1, p. 41–45, 2012.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, n. 3, p. 266–277, Jun. 2008.

MORRIS, V. J. Pectin galactans, galectins and health bioactive roles for pectin. **Agro Food industry hi-tech**, v. 20, p. 37–40, 2009.

MOREIRA, M.E.C et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 11, n. 2, p. 356-361, Jun. 2008a.

MOREIRA, M. E. C. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1738-1742, 2008b.

MORTON, J.; MOMBIN, P. **Fruits of Warm Climate**. Miami: Echo Point Books & Media, 1987. p. 309-310, 1987.

MUNHOZ, C.L.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; SOARES-JÚNIOR, M.S. Extração de pectin de goiaba desidratada. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 119-125, jan./mar. 2010.

NGUYEN, S. et al. Studies on pectin coating of liposomes for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 88, n. 2, p. 664-673, Dec. 2011.

OVODOVA, R. G. et al. Branching of the galacturonan backbone of comaruman, a pectin from the marsh cinquefoil *Comarum palustre* L. **Biochemistry**, Moskow, v.71, n. 5, p. 538–542, May 2006.

OVODOVA, R. G. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pecticopolysaccharide isolated from celery stalks. **Food Chemistry**, Barking, v. 114, n. 2, p. 610–615, May 2009.

O'NEILL, M. A. et al. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 109–139, 2004.

PATRA, P. et al. Structure elucidation of an immunoenhancing pectic polysaccharide isolated from aqueous extract of pods of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Carbohydrate Polymers**, London, v. 87, n. 3, p. 2169–2175, Feb. 2012.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 5, p. 339–345, Apr. 2010.

PETERSEN, O. B. et al. Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy-Assignment of reference compounds. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 343, n. 16, p. 283–2830, Nov. 2008.

PIEIDADE, J.; CANNIATI-BRAZACA, S. G. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e da pectina cítrica de alta metoxilação no nível de colesterol sanguíneo em ratos. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, v.23, n. 2, p. 149–156, maio/ago. 2003.

PINHEIRO, E. R. **Pectina da casca do maracujá amarelo (*passiflora edulis flavicarpa*): otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC.

POPOV, S. V. et al. Chemical characterization and anti-inflammatory effect of rauwolfian, a pectic polysaccharide of *Rauwolfia callus*. **Biochemistry**, Moscow, v. 72, n. 7, p.778–784, Jul. 2007a.

POPOV, S. V. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, Barking, v. 124, n. 1, p. 309–315, Jan. 2011.

POPOV, S. V. et al. Preventative antiinflammatory effect of potamogetonan, a pectin from the common pondweed *Potamogeton natans* L. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 7, p. 609–614, Jul. 2007b.

RAMBERG, J. E.; NELSON, E. D.; SINNOTT, R. A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. **Nutrition Journal**, v.9, n. 54, p. 1–22, Nov. 2010.

RANGANNA, S. Pectin. **Manual of analysis of fruit and vegetable products**. New Delhi: Tata McGraw Hill, 1977. p. 21-54

RECHKINA, E. A.; GUBANENKO, G. A.; RUBCHEVSKAYA, L. P. Isolation of pectin substances from arboreal greenery of scotch pine. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, Moscow, v. 37, n. 7, p. 840–841, Dec. 2011.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, London, v. 57, n. 6, p. 929-967, Jul. 2001.

ROCHA, B. A. et al. Comparison between the antioxidant properties of slurry of the coffee (*Coffea arabica*) and coffee beverage. **Pharmacognosy Research**, v. 1, n. 5, p. 245-249, 2009.

ROUND, A. N. et al. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 345, n. 4, p. 487-497, Feb. 2010.

SAMUELSEN, A. B. et al. Structural features and complement-fixing activity of pectin from three brassica oleracea varieties: white cabbage, kale, and red kale. **Biomacromolecules**, Washington, v.8, n. 2, p. 644–649, Feb. 2007.

SANCHEZ, D. et al. Highly methoxylated pectin improves insulin resistance and other cardiometabolic risk factors in Zucker Fatty rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 10, p. 3574-3581, May 2008.

SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Dietary fibre and cardiovascular health. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 27, n. 1, p. 31-45, Jan./Feb. 2012.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of garcinia brasiliensis. **J. Ethnopharmacol.**, Lausanne, v.133, n. 2, p. 467-73, Jan. 2011.

SCHELLER, H. V. et al. Biosynthesis of pectin. **Physiologia Plantarum**, v. 129, p. 283–295, 2007.

SILVA, D. C. et al. Pectin from *Passiflora edulis* shows anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypotriglyceridemic properties in diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 14, n. 10, p. 1118-1126, Oct. 2011.

SILVA, D. C. et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carbohydrate Polymers**, London, v. 87, n. 1, p. 139-145, Jan. 2012.

SOMERVILLE, C., et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. **Science**, Washington, v. 306, n. 5705, p. 2206-2211, Dec. 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, Jan. 1999.

TAYLOR, N. G.; Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. **New Phytologist**, Lancaster, v. 178, n. 2, p. 239-252, Feb. 2008

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 37, n. 1, p. 47-73, Feb. 1997.

TORRALBO, D. F. et al. Extraction and partial characterization of *Solanum lycocarpum* pectin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 378-383, Jun 2012.

TROMBETTA, D. et al. Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.13, n. 5, p. 352-358, May 2006.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 4, p. 203-209, Apr. 2004.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into and old polymers are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 97-104, Mar. 2006.

YAPO, B. M. Pineapple and banana pectins comprise fewer homogalacturonan building blocks with a smaller degree of polymerization as compared with yellow passion fruit and lemon pectins: Implication for gelling properties. **Biomacromolecules**, Washington, v. 10, n. 4, p. 717-721, Apr. 2009.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow passion fruit rind-A potential source of low-methoxyl pectin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 7, p. 2738-2744, Mar. 2006.

YEN, W. J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Sci Technol.**, Campinas, v. 38, n. 1, p. 193-200, May 2005.

YUAN, H. et al. Preparation and in vitro antioxidant activity of j-carrageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 340, n. 4, p. 685-692, Mar. 2005.

ZHANG, S.; HSIEH, F. H.; VARDHANABHUTI, B. Acid-induced gelation properties of heated whey protein-pectin soluble complex. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 36, p. 76-84, May 2014.