



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ELAINE CRISTINA PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PECTINA
DO NONI (*Morinda citrifolia* L.) NATIVA E SULFATADA

FORTALEZA

2015

ELAINE CRISTINA PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PECTINA
DO NONI (*Morinda citrifolia* L.) NATIVA E SULFATADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Evânia Altina
Teixeira de Figueiredo.

Coorientadora: Profa. Dra. Nágila Maria
Pontes Silva Ricardo.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P49c Pereira, Elaine Cristina.
Caracterização química e atividade antibacteriana da pectina do noni (*Morinda citrifolia* L.) nativa e sulfatada / Elaine Cristina Pereira. – 2015.
82 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2015.
Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.
Coorientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.
1. Pectina. 2. Modificação de polissacarídeos. 3. Sulfatação. 4. Bactérias patogênicas. I. Título.
CDD 664
-

ELAINE CRISTINA PEREIRA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PECTINA
DO NONI (*Morinda citrifolia* L.) NATIVA E SULFATADA

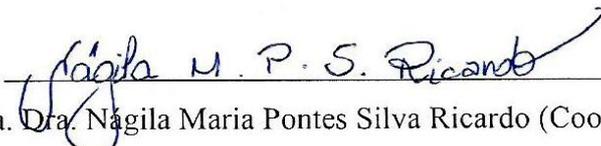
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: 21/08/2015.

BANCA EXAMINADORA



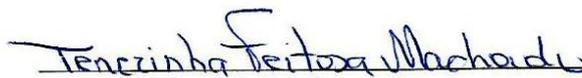
Profª. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



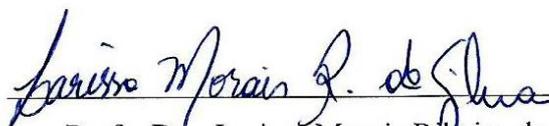
Profª. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Pesquisadora Dra. Ana Paula Dionísio
Embrapa Agroindústria Tropical



Pesquisadora Dra. Terezinha Feitosa Machado
Embrapa Agroindústria Tropical



Profª. Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva
Universidade Estácio de Sá (FIC)

A Deus, minha fonte inesgotável de força e sabedoria.

Aos meus pais, Maria Osimar Pereira e Pedro Pereira (*in memoriam*), que sempre me apoiaram e incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por conceder-me essa oportunidade de concretizar mais um sonho e por fortalecer-me nos momentos difíceis, não deixando eu desistir;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de auxílio, viabilizando essa pesquisa;

À Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, pela orientação, amizade e confiança em meu trabalho, sempre me recebendo com suas palavras de apoio e de esperança;

À Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo, pela coorientação e ajuda neste desafio. Agradeço também por receber-me com muito carinho em sua equipe de pesquisa, sinto-me como parte integrante da família LabPIM (Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais)/UFC;

Aos membros participantes da banca examinadora, Dra. Ana Paula Dionísio, Dra. Terezinha Feitosa Machado e Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições;

À Profa. Dra. Sílvia Maria de Freitas, do Departamento de Estatística e Matemática Aplicada (DEMA)/UFC, por sua preciosa ajuda na análise estatística. Muito obrigada, pois mesmo estando muito ocupada não me negou o seu apoio;

À minha família, meu alicerce, por todo apoio que sempre me concederam. Sem a ajuda de vocês, eu não teria chegado até aqui. Em especial, aos meus pais, Maria Osimar Pereira e Pedro Pereira (*in memoriam*), e à minha irmã, Celi Pereira, pois sei o quanto lutaram e o que enfrentaram para que hoje eu pudesse desfrutar de mais uma vitória, fruto de tantos esforços;

Ao meu querido namorado, Ronnier Bezerra da Silva, pelo seu amor e paciência. Obrigada por compreender-me e estar ao meu lado em todos os momentos;

Aos professores que compõem o corpo docente do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DETAL)/UFC, pelos ensinamentos concedidos e por contribuírem com minha formação profissional. Agradeço também a todos os funcionários que fazem parte do Departamento, pela amizade e ajuda em vários momentos;

À equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA), do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DETAL)/UFC: Gisani Souza, Danielly Bandeira, Ana Célia, Kátia Aragão, Carolline Brito e Anne Brito, por tudo o que fizeram por mim e por estarem sempre dispostas a ajudar-me. Em especial, à Flayanna Dias, por todo auxílio prestado e conhecimento transmitido;

Aos membros do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC, por receberem-me com tanto afeto e amizade, especialmente, à equipe de polímeros: Denilton Garcia, Arcelina Pacheco, Carolina Barbosa e André Sousa;

À Arcelina Pacheco, pela ajuda na realização da análise de reologia e por todas as sugestões concedidas;

Ao Igor Marques, pelo auxílio na análise de cromatografia de permeação em gel;

Às técnicas Terezinha (Laboratório de Análise Térmica) e Elis (Laboratório de Bioinorgânica), do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC, por possibilitarem a realização das análises térmicas e de espectroscopia de absorção na região do infravermelho;

Aos professores Dr. Rinaldo Araújo e Dr. Danilo Queiroz, do Laboratório de Tecnologia Química do Instituto Federal do Ceará (IFCE), por possibilitarem a realização da análise do potencial zeta;

Ao Laboratório de Processamento de Frutos, do Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFC, por viabilizar a liofilização do meu material e a análise de proteína;

À Cristina Lima e ao Bruno Sousa, do Laboratório de Processamento de Frutos, pelo auxílio que me forneceram em vários momentos;

Aos integrantes do Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica/UFC, por diversas vezes concederem um espaço para que eu pudesse liofilizar meu material de estudo;

Aos meus queridos amigos, companheiros de tantos momentos, por fazerem parte da minha vida e por acreditarem em mim. Em especial, à Priscilla Gois, Priscila Duarte, Alice Ramos, Yana Albuquerque, Jailson Rodrigues, Aírís Melo e Camila Peixoto, pela amizade e pelo apoio fornecido;

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta com a realização deste trabalho, mesmo que apenas com palavras de apoio e de esperança, muito obrigada!

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.” (Carl Sagan)

RESUMO

O noni (*Morinda citrifolia* L.) é um arbusto nativo do sudeste da Ásia, adaptado a ambientes secos e adversos, cujo fruto demonstra ser uma fonte de pectina em potencial. A pectina é um heteropolissacarídeo presente nos vegetais, muito utilizada pelas indústrias de alimentos como agente gelificante, emulsificante, estabilizante e espessante. Apresenta diversas propriedades biológicas, como ação antibacteriana, que pode ser potencializada pela sulfatação. A sulfatação caracteriza-se pela introdução do grupo sulfato à molécula orgânica, com o propósito de potencializar ou desenvolver novas propriedades funcionais. Diante disto, a fim de fornecer mais uma opção em fonte de pectina e explorar mais das potencialidades do noni, esta pesquisa objetivou realizar a caracterização química e avaliar a atividade antibacteriana da pectina do noni antes e após o processo de sulfatação. O polímero foi extraído a pH 4,0, a partir da polpa do noni maduro, com oxalato de amônio 0,25%/ácido oxálico. O derivado sulfatado foi produzido pelo método do ácido clorossulfônico-piridina. As pectinas nativa e sulfatada foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho, análises térmicas, análise elementar, cromatografia de permeação em gel, quantificação de proteínas e quanto ao comportamento reológico e potencial zeta. A atividade antibacteriana foi avaliada contra bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Enteritidis*), através de um teste de microdiluição em caldo (2 a 10 mg/mL). A pectina do noni apresentou coloração levemente amarelada, baixo grau de esterificação (38,34%) e alta massa molar (222,82 kg/mol). A sulfatação foi satisfatória, sendo confirmada por espectroscopia no infravermelho (bandas em 829 e 1247 cm^{-1} associadas aos grupos sulfato) e análise elementar (%Enxofre: 12,51). Essa modificação ocasionou alterações nas propriedades da pectina, como: aumento da estabilidade térmica e do caráter eletronegativo; redução da massa molar e da viscosidade. As pectinas nativa e sulfatada exibiram ação antibacteriana, sendo o polímero nativo mais efetivo, produzindo inibições em torno de 80 e 83% frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*, respectivamente, a 10 mg/mL. A pectina sulfatada demonstrou menor ação, com os maiores índices de inibição obtidos, a 10 mg/mL, para *L. monocytogenes* (26,45%), *S. aureus* (26,25%) e *P. aeruginosa* (28,39%). Conclui-se que o fruto do noni é uma fonte potencial de pectina, apresentando rendimentos compatíveis a fontes industriais (~15%). A sulfatação afetou negativamente a ação antibacteriana da pectina, ocasionando perdas em sua atividade inibitória.

Palavras-chave: Pectina. Modificação de polissacarídeos. Sulfatação. Bactérias patogênicas.

ABSTRACT

The noni (*Morinda citrifolia* L.) is a native shrub Southeast Asia, adapted to dry and harsh environments. Its fruit proves to be a potential source of pectin. Pectin is a heteropolysaccharide present in vegetables, widely used by the food industry as a gelling agent, emulsifier, stabilizer and thickener. It has several biological properties, such as antibacterial activity, which can be enhanced by sulfation. The sulfation is characterized by the introduction of the sulfate group to the organic molecule, in order to enhance or develop new functional properties. In view of this, in order to provide another option in source of pectin and explore more the noni's potential, this research aimed to carry out the chemical characterization and evaluate the antibacterial activity noni pectin before and after the sulfation process. The polymer was extracted at pH 4.0 from pulp of mature noni with 0.25% ammonium oxalate/oxalic acid. The sulphated derivative was produced by the method of pyridine-chlorosulfonic acid. The native and sulfated pectins were characterized by infrared spectroscopy, thermal analysis, elemental analysis, gel permeation chromatography, quantification of protein and as to the rheological behavior and zeta potential. The antibacterial activity was evaluated against Gram positive bacteria (*Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Enteritidis) by a microdilution broth assay (2 to 10 mg/mL). Pectin noni showed slightly yellowish color, low degree of esterification (38.34%) and high molar mass (222.82 kg/mol). The sulfation was satisfactory, being confirmed by infrared spectroscopy (bands at 829 and 1247 cm^{-1} associated with the sulfate groups) and elemental analysis (%Sulphur: 12.51). This modification resulted in changes in the properties of pectin, such as increase of thermal stability and electronegative character; reduction of the molecular weight and viscosity. The native and sulfated pectins exhibited antibacterial action. The native polymer was more effective and produced inhibitions around 80 and 83% compared to *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively, to 10 mg/mL. The sulfated pectin showed lowest activity, with higher inhibition rates obtained at 10 mg/mL for *L. monocytogenes* (26.45%), *S. aureus* (26.25%) and *P. aeruginosa* (28.39%). We conclude that the fruit of noni is a potential source of pectin, with yields similar to industrial sources (~15%). The sulfation negatively affected the antibacterial action of pectin, causing losses in its inhibitory activity.

Keywords: Pectin. Modification of polysaccharides. Sulfation. Pathogenics bacterias.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Planta de noni: arbusto jovem (A); folhas, flores e frutos (B)	17
Figura 2 – Frutos do noni: verde (A); “de vez”, ponto de colheita (B); e maduro (C) ..	17
Figura 3 – Estrutura química do ácido poligalacturônico (a) e estrutura química representativa da pectina com seus grupos de repetição típicos (b)	23
Figura 4 – Representação da estrutura química de pectinas com alto teor de metoxilação – HM (a) e baixo teor de metoxilação – LM (b)	24
Figura 5 – Mecanismo da reação de sulfatação da pectina pelo método do ácido clorossulfônico-piridina	29
Figura 6 – Fluxograma do processo de obtenção da pectina do noni	38
Figura 7 – Precipitação da pectina extraída da polpa do noni pela adição de etanol (A) e pectina do noni liofilizada após purificação (B)	47
Figura 8 – Espectros no infravermelho das amostras PN e PC	49
Figura 9 – Espectros no infravermelho das amostras PN e PN-s, em destaque, a localização das principais bandas características de grupos sulfato	51
Figura 10 – Curvas TG das amostras PN e PN-s	53
Figura 11 – Curvas TG/DTG da amostra PN	55
Figura 12 – Curvas TG/DTG da amostra PN-s	55
Figura 13 – Curvas de DSC das amostras PN e PC	56
Figura 14 – Distribuição do potencial zeta das amostras PN e PN-s	57
Figura 15 – Perfis de eluição das amostras PN e PN-s obtidos por GPC	60
Figura 16 – Comportamento reológico das soluções aquosas das pectinas PN e PN-s, nas concentrações de 0,5 e 1,0%, a 25 °C	59
Figura 17 – Atividade antibacteriana das amostras PN e PN-s contra <i>L. monocytogenes</i> (A) e <i>S. aureus</i> (B)	65
Figura 18 – Atividade antibacteriana das amostras PN e PN-s contra <i>S. Enteritidis</i> (A), <i>E. coli</i> (B) e <i>P. aeruginosa</i> (C)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor de substâncias pécticas em alguns tecidos vegetais	22
Tabela 2 – Meios de cultura e condições de incubação empregados no cultivo seletivo/diferencial das bactérias em estudo	43
Tabela 3 – Análise elementar e grau de sulfatação (GS) das pectinas PN e PN-s	52
Tabela 4 – Etapas de degradação térmica das amostras PN e PN-s e suas respectivas perdas de massa (%)	54
Tabela 5 – Efeito inibitório (%) das amostras PN e PN-s contra cinco cepas bacterianas	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	16
3.2	Polissacarídeos	21
3.2.1	<i>Pectina</i>	21
3.2.1.1	<i>Métodos de extração da pectina</i>	26
3.2.1.2	<i>Processo de sulfatação</i>	27
3.3	Segurança alimentar e as doenças transmitidas por alimentos (DTA)	30
3.4	Uso de agentes antimicrobianos na preservação dos alimentos	32
3.5	Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de novas substâncias	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Obtenção e preparo dos frutos do noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) para extração da pectina	37
4.2	Extração, isolamento e purificação da pectina do noni	37
4.3	Modificação química da pectina do noni pelo processo de sulfatação	39
4.4	Caracterização da pectina do noni nativa (PN) e sulfatada (PN-s)	39
4.4.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	39
4.4.2	<i>Análise elementar</i>	40
4.4.3	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	40
4.4.4	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	40
4.4.5	<i>Estudo do potencial zeta</i>	41
4.4.6	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	41
4.4.7	<i>Comportamento reológico</i>	41
4.4.8	<i>Quantificação de proteínas</i>	42
4.5	Avaliação da atividade antibacteriana da pectina do noni nativa (PN) e sulfatada (PN-s)	42

4.5.1	<i>Cepas bacterianas</i>	42
4.5.2	<i>Preparo e manutenção das culturas de trabalho</i>	43
4.5.3	<i>Preparo e padronização do inóculo para uso nos ensaios de microdiluição</i>	44
4.5.4	<i>Estudo in vitro da atividade antibacteriana das pectinas do noni (PN e PN-s)</i>	44
4.6	Análise estatística	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	Extração e rendimento	47
5.2	Caracterização da pectina do noni nativa (PN) e sulfatada (PN-s)	49
5.2.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	49
5.2.2	<i>Análise elementar</i>	52
5.2.3	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	53
5.2.4	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	56
5.2.5	<i>Estudo do potencial zeta</i>	57
5.2.6	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>	58
5.2.7	<i>Comportamento reológico</i>	60
5.2.8	<i>Quantificação de proteínas</i>	61
5.3	Estudo in vitro da atividade antibacteriana da pectina do noni nativa (PN) e sulfatada (PN-s)	62
6	CONCLUSÕES	70
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	71
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Grandes desafios têm surgido, nas últimas décadas, para os setores produtores de alimentos e autoridades mundiais de segurança alimentar, devido à globalização do comércio e à descentralização da produção de alimentos. Estes dois fatos têm contribuído para o aumento dos riscos de disseminação de patógenos por todo o mundo e, conseqüentemente, com o crescente número de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; FAO; WHO, 2013).

Para prolongar a vida útil e garantir a qualidade e segurança microbiológica dos alimentos produzidos, o emprego de tecnologias de conservação torna-se indispensável. Porém, existem produtos sensíveis aos tratamentos físicos, como a aplicação do calor (uma das tecnologias mais empregadas), que podem sofrer alterações indesejáveis, comprometendo sua aceitabilidade. Devido a isto, em alguns alimentos, faz-se necessária a utilização de agentes antimicrobianos, isoladamente ou em associação com outros métodos menos drásticos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; LEISTNER, 2000).

Nesse contexto, tem-se buscado e cada vez mais estudado substâncias antimicrobianas naturais alternativas às sintéticas, que sejam seguras, renováveis e de fácil obtenção, visando manter as características naturais dos alimentos, além de proporcionar uma vida útil aceitável (JUNEJA; DWIVEDI; YAN, 2012).

Morinda citrifolia L., popularmente conhecida como noni, é um arbusto nativo do sudeste da Ásia, que se desenvolve em regiões tropicais e subtropicais, estando presente em diversas partes do mundo. No Brasil, o seu cultivo ainda é recente e realizado de forma empírica por pessoas que trouxeram sementes do Caribe e da Polinésia (SILVA *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2010). Essa frutífera está associada a muitos benefícios à saúde, sendo utilizada há mais de 2.000 anos pelos polinésios como uma planta medicinal, por apresentar propriedades biológicas como ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antiviral, antiparasitária e antibacteriana, dentre outras (BROWN, 2012; DENG; WEST; JENSEN, 2010).

O fruto do noni é composto, principalmente, por água (90%), sólidos solúveis, fibras alimentares e proteínas, sendo os carboidratos o maior componente da matéria seca (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2011). De acordo com Bui, Bacic e Pettolino (2006), o conteúdo de carboidratos do fruto é composto por 67% de substâncias pecticas, constituindo-se, portanto, em uma fonte de pectina em potencial.

A pectina é um heteropolissacarídeo presente na parede celular dos vegetais superiores, sendo abundante na natureza. Trata-se de uma matéria-prima renovável e amplamente utilizada pelas indústrias de alimentos como um aditivo alimentar natural (YEOH; SHI; LANGRISH, 2008). Alguns estudos têm demonstrado suas propriedades biológicas, como o seu efeito antibacteriano (BAE *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012; JINDAL *et al.*, 2013a), sendo esta propriedade da pectina ainda pouco investigada.

A extração desse polímero pode ser realizada empregando agentes químicos, como água e tampões, agentes quelantes de íons cálcio, ácidos ou bases. Cada tipo de extração poderá produzir alterações estruturais diferentes no polissacarídeo, sendo a extração ácida a mais empregada pelas indústrias, por fornecer maior rendimento e preservar a cadeia principal de ácidos galacturônicos (YAPO, 2009a).

Uma forma de alterar as propriedades do polímero péctico é realizando o processo de sulfatação, que se caracteriza pela adição de grupos sulfato à molécula, carregando-a negativamente. Essa modificação química tem despertado crescente interesse em pesquisas com polissacarídeos devido à possibilidade de aprimorar suas propriedades biológicas (BAE *et al.*, 2009).

Embora exista um grande número de pesquisas publicadas envolvendo a extração e caracterização de pectinas provenientes de diversas fontes alternativas, além de vários dados sobre a sulfatação de polissacarídeos, ainda não há relatos, na literatura, sobre estudos com a extração e sulfatação de pectina do noni. Neste sentido, a fim de contribuir com mais informações acerca das potencialidades do noni e fornecer mais uma opção em fonte de pectina, esta pesquisa objetivou realizar a caracterização química e avaliar a atividade antibacteriana da pectina do noni antes e após o processo de sulfatação.

Os resultados deste estudo podem vir a possibilitar uma nova forma de exploração do fruto noni no Brasil, além do seu emprego em alimentos, embalagens antimicrobianas ou comestíveis e na área farmacêutica, após comprovação efetiva de sua segurança de uso. A vantagem de se utilizar o noni como fonte de pectina é que este fruto é facilmente cultivado no Brasil, sendo adaptado a ambientes secos e adversos como no Nordeste Brasileiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização química e avaliar a atividade antibacteriana da pectina do noni antes e após o processo de sulfatação.

2.2 Objetivos específicos

- a) Extrair, isolar e purificar a pectina da polpa do noni;
- b) Realizar a modificação química da pectina pelo processo de sulfatação;
- c) Caracterizar a pectina do noni nativa e sulfatada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, análises térmicas, cromatografia de permeação em gel, análise elementar, quantificação de proteínas e quanto ao comportamento reológico e potencial zeta;
- d) Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da pectina do noni nativa e sulfatada contra bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* Enteritidis).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Noni (*Morinda citrifolia* L.)

A espécie *Morinda citrifolia* L., popularmente conhecida por noni, é um arbusto perene nativo do sudeste da Ásia que se difundiu para a Austrália, Havaí, Ilhas da Polinésia Francesa e outras áreas tropicais, possivelmente, através da dispersão das sementes em água ou sendo transportado pelos primeiros imigrantes ou *voyagers* (DENG; WEST; JENSEN, 2010).

Atualmente, o noni é encontrado em várias partes do mundo: regiões tropicais da África, Caribe, Austrália, China, Malásia, Indonésia e Índia (LÜBECK; HANNES, 2001). No Brasil, a tentativa de cultivo ainda é recente e realizada de forma empírica por pessoas que trouxeram sementes do Caribe e da Polinésia, sendo relatada nos estados do Acre, São Paulo, Minas Gerais, Pará, Sergipe, Ceará, dentre outros (SILVA *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2010).

A classificação botânica do noni é a seguinte (MÜLLER, 2007):

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Gentianales
- Família: Rubiaceae
- Gênero: *Morinda*
- Espécie: *Morinda citrifolia*
- Nome científico: *Morinda citrifolia* L.

Essa frutífera pertence à família Rubiaceae e seu gênero consiste de 80 espécies que crescem em áreas tropicais e subtropicais de diversos países, principalmente, nas regiões costeiras até 400 m de altitude (BROWN, 2012; WANG *et al.*, 2002). É tolerante a solos salinos e condições de seca, desenvolve-se em terras arenosas e em solos pouco profundos e rochosos, caracterizando-se por ser um arbusto bastante resistente a estresses bióticos e abióticos (NUNES *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2010).

A planta do noni possui folhas grandes, perenes, elípticas e de coloração verde escura, e pode atingir uma altura de 3 a 6 m (FIGURA 1A, 1B). Suas flores são pequenas e brancas, e seus frutos são ovais (3-10 cm de comprimento e 3-6 cm de largura), apresentando superfície irregular, grumosa e coberta de secções com formatos poligonais castanhos (FIGURA 1B, 2). Os frutos começam a ser produzidos, aproximadamente, com um ano de

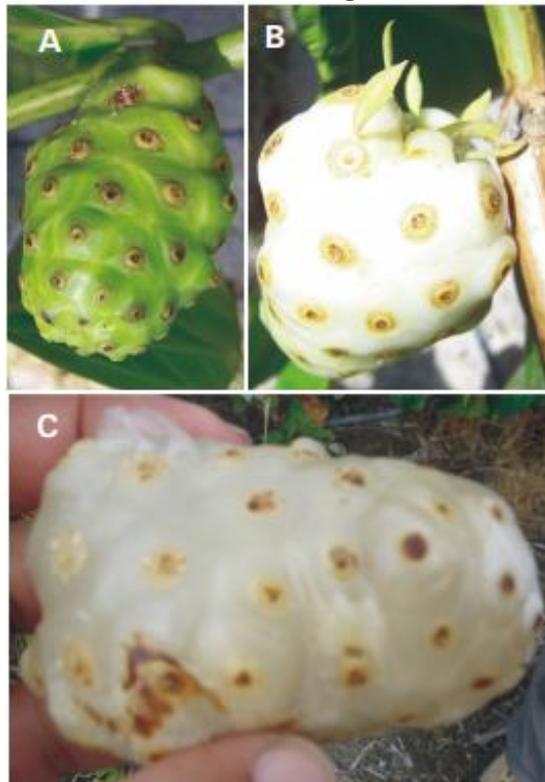
cultivo (considerada uma espécie precoce), sendo a produção constante e durante todo o ano. Podem pesar até 800 g e sua cor varia de verde a amarelo ou branco opalescente, quando maduros (FIGURA 2). O odor e o sabor do fruto translúcido – excessivamente maduro – não são agradáveis, lembrando o sabor de queijo maturado (BROWN, 2012; CORREIA *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2010; XANGAI, 2006).

Figura 1 – Planta de noni: arbusto jovem (A); folhas, flores e frutos (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2 – Frutos do noni: verde (A); “de vez”, ponto de colheita (B); e maduro (C).



Fonte: Sousa *et al.* (2010).

Há mais de 2.000 anos, o noni tem sido usado pelos habitantes da Polinésia para a melhoria de vários problemas de saúde, tais como câncer, infecção, artrite, diabetes, asma e dores (WANG *et al.*, 2002). É considerado uma planta medicinal popular e, praticamente, todas as suas partes são utilizadas, sendo atribuídas a cada uma delas propriedades medicinais distintas, como descrito a seguir: a casca, com propriedade adstringente, é utilizada no tratamento da malária; as folhas são empregadas como analgésico e para inflamações externas; as flores são usadas no tratamento de inflamações oculares; o extrato das raízes diminui a pressão sanguínea; as sementes atuam como laxante; e os frutos, que possuem ampla utilização, são empregados como antibacteriano, analgésico, anticongestivo, antioxidante, expectorante, anti-inflamatório, adstringente, emoliente, emenagogo, laxativo, hipotensor, purificador do sangue, imunoestimulante e tônico (ELKINS, 1997).

Pesquisas científicas têm verificado e relatado diversas propriedades biológicas atribuídas ao noni, como: atividade antioxidante (CANUTO *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013; DUSSOSSOY *et al.*, 2011; WANG, M. *et al.*, 2009) e anti-inflamatória (BASAR *et al.*, 2010; DUSSOSSOY *et al.*, 2011; NITTERANON *et al.*, 2011); protetor do fígado (WANG *et al.*, 2008) e imunomodulador (PALU *et al.*, 2008); além de ação antibacteriana (BHARDWAJ; BALLAL; VELMURUGAN, 2012; TINTINO *et al.*, 2015; WEST *et al.*, 2012), antiviral (KAMATA *et al.*, 2006), antiparasitária (BRITO *et al.*, 2009) e antifúngica (JAINKITTIVONG; BUTSARAKAMRUHA; LANGLAIS, 2009; WEST *et al.*, 2012). Uma pequena atividade anticâncer também foi observada em estudos anteriores, como verificado por Brown (2012) em seu artigo de revisão, mas necessita de maiores investigações a fim de determinar o potencial e o componente ativo responsável por essa propriedade.

Já foram identificados mais de 100 metabólitos (primários e secundários) nos frutos do noni, com destaque para os flavonoides, lignanas, iridoides, cumarinas, antraquinonas, polissacarídeos, terpenoides, alcaloides, esterol e ácidos graxos. Acredita-se que os efeitos sinérgicos entre esses componentes podem ser os responsáveis pelos diversos benefícios do fruto à saúde, o que têm contribuído para a comercialização do suco de noni como suplemento dietético e impulsionado o seu uso como produto medicinal (DENG *et al.*, 2007; DENG; WEST; JENSEN, 2010).

O fruto do noni contém cerca de 90% de água e os principais componentes da matéria seca são sólidos solúveis, fibras alimentares e proteínas, predominando os carboidratos (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006; CORREIA *et al.*, 2011). Os principais aminoácidos encontrados nesse fruto são o ácido aspártico, ácido glutâmico e isoleucina

(CHUNHIENG, 2003). Também possui um elevado teor de minerais, destacando-se o potássio, enxofre, cálcio e fósforo, além de vitaminas como o ácido ascórbico e provitamina A. Estudos têm verificado a presença de aproximadamente 50 compostos voláteis no fruto maduro, incluindo ácidos orgânicos, álcoois, ésteres, cetonas e lactonas (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006). Os ácidos orgânicos, principalmente, os ácidos hexanoico e octanoico, representam mais de 70% dos componentes voláteis já identificados, sendo os responsáveis pelo aroma característico do noni (CHAN-BLANCO *et al.*, 2007; PINO *et al.*, 2010).

O primeiro produto do noni, o Suco *Tahitian Noni*®, foi lançado em 1996 pela empresa norte-americana *Tahitian Noni International*® (TNI) e, desde então, o seu comércio tem-se estendido e alcançado diversos países. A qualidade dos produtos do noni pode ser bastante variável, sofrendo influência das diferentes condições geográficas em que o fruto é produzido (solo, luz solar, chuva e ar) e de fatores pós-desenvolvimento (colheita, armazenamento, transporte, processos de fabricação, etc.), o que traz dúvidas sobre a consistência dos seus perfis fitoquímicos, quando provenientes de diferentes áreas (DENG; WEST; JENSEN, 2010). Além disso, existem muitas marcas ilegais no mercado, dificultando o controle de qualidade desses produtos (WESTENDORF *et al.*, 2007).

Apesar da ausência de dados recentes, algumas informações sobre o consumo e o comércio de produtos do noni foram obtidas na literatura disponível. De acordo com os dados reportados na literatura, o suco de noni é muito utilizado em países tropicais, como Taiti, Haváí e ilhas do Caribe, e tornou-se um suplemento alimentar bastante consumido nos EUA, Japão e parte da Europa (SU *et al.*, 2005). A indústria do noni cresceu consideravelmente nas últimas décadas, principalmente, após aprovação e registro do suco de noni como um “novo alimento”, atóxico e saudável, pela União Europeia em 2003. Os maiores mercados de produtos do noni são América do Norte, Europa, Japão, México, Ásia e Austrália, estando o mercado mundial estimado em US\$ 400 milhões (MACPHERSON *et al.*, 2007).

O produto do noni fornecido pela empresa TNI é uma mistura de sucos de frutas, composto por 89% de suco de noni (*Morinda citrifolia* L.) e 11% de suco concentrado de uva e mirtilo. Os aspectos de segurança desse produto para a saúde do consumidor foram avaliados pelo *Scientific Committee on Food* (SCF), da Comissão Europeia, o qual concluiu que o suco é aceitável na quantidade sugerida de 30 mL/dia. Esta conclusão teve como base os resultados de estudos laboratoriais em animais, de toxicidade subaguda e subcrônica, genotoxicidade e alergenicidade, que demonstraram não haver indícios de efeitos nocivos decorrentes do consumo do suco de noni. O SCF também levou em consideração o fato de

que o noni tem sido comercializado por vários anos em diversos países, com poucos relatos de reações adversas, como efeitos hepatotóxicos em um número limitado de indivíduos (SCF, 2002). Com isso, em 2003, o produto foi aprovado para uso como novo ingrediente alimentar pela União Europeia.

Em 2005, a Comissão Europeia foi informada pela Autoridade Competente Austríaca sobre novos casos de efeitos adversos relacionados ao consumo do suco de noni. Como essas informações poderiam impactar na decisão sobre a segurança desse produto, a Comissão decidiu solicitar o parecer da *European Food Safety Authority* (EFSA). A EFSA concordou com o parecer emitido, anteriormente, pelo SCF (2002), e concluiu, de acordo com as informações toxicológicas disponíveis e com o histórico de consumo, ser improvável que o consumo do suco de noni, nos níveis observados, produza efeitos adversos ao fígado humano. De acordo com a EFSA, não há evidências convincentes que relacionem os casos de hepatite aguda ao consumo do suco de noni (EFSA, 2006).

No Brasil, o mercado do noni apresentava-se em expansão, movimentando cerca de US\$ 1,3 milhões/mês (MELAMET, 2005). Encontrava-se entre os maiores mercados da *Tahitian Noni Int.*® no mundo, porém, o comércio de seus produtos foi proibido, pois o suco de noni estava entrando no país como suplemento alimentar, sem qualquer controle ou registro nos órgãos competentes, chegando a ser comercializado com fins terapêuticos (CORREIA, 2010).

Por não haver histórico de consumo desse fruto no Brasil e por existir controvérsias acerca de sua segurança, havendo alguns relatos de hepatotoxicidade associados ao seu consumo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a comercialização de produtos contendo o suco de noni, alegando a falta de estudos toxicológicos sistemáticos em humanos. Então, desde 2007, está proibida a comercialização de tais produtos até que os requisitos legais de segurança de uso e registro sejam atendidos (ANVISA, 2007), o que levou a empresa norte-americana a encerrar suas atividades no país em 2009.

Apesar da proibição no Brasil, há um mercado de produtos do noni já consolidado em outros países. O que também não se pode negar é o potencial desse fruto que é rico em diversos nutrientes e apresenta propriedades benéficas já comprovadas cientificamente.

A polpa do noni cultivado no estado do Ceará tem demonstrado um baixo teor de proteína e lipídeo, com predomínio dos carboidratos (6,32%), sendo a pectina o polissacarídeo presente em maior quantidade (CORREIA *et al.*, 2011). Segundo Bui, Bacic e Pettolino

(2006), o fruto possui 67% de substâncias pécnicas no conteúdo de carboidratos totais, portanto, demonstra ser uma potencial fonte alternativa de pectina, o que desperta o interesse nessa espécie, a fim de explorar suas potencialidades. Além disso, é uma frutífera bastante resistente, sobrevivendo em ambientes secos e adversos, adaptando-se facilmente ao clima do Nordeste Brasileiro. Outro fator que contribui para o interesse no desenvolvimento de novos estudos com o noni é a existência de poucas informações disponíveis e pesquisas realizadas no Brasil envolvendo esse fruto.

3.2 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são os carboidratos mais abundantes na natureza. São polímeros de média a alta massa molecular, que diferem entre si nas unidades monoméricas e no tipo de ligação que os unem, no comprimento e grau de ramificação das cadeias (NELSON; COX, 2008). Dependendo das fontes de obtenção, suas cadeias podem ser neutras ou carregadas (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Essas macromoléculas desempenham muitas funções, como o armazenamento energético em bactérias, animais (glicogênio) e em plantas (amido), propriedades estruturais, sendo constituintes das paredes celulares dos vegetais (celulose, pectina) ou do exoesqueleto de animais (quitina), entre outras (NELSON; COX, 2008).

Dentre os polissacarídeos disponíveis na natureza, destacam-se os sulfatados, que têm atraído bastante interesse em pesquisas, devido a suas diversas propriedades biológicas benéficas, como anticoagulante, anti-inflamatória, antitumoral e antiviral (ZOU *et al.*, 2008). As algas são as principais fontes naturais desses polímeros, mas a maioria é obtido por modificação química (JINDAL *et al.*, 2013b; WIJESINGHE; JEON, 2012). Estudos revelam que os polissacarídeos que exibem atividades biológicas, quando sulfatados, podem ter suas ações potencializadas (XIAOFANG *et al.*, 2010).

3.2.1 Pectina

O nome pectina tem origem do grego *pectos* que significa gelatinizado ou solidificado. Esse polímero foi descoberto por Nicolas Louis Vauquelin em 1790, mas só, em 1824, foi pela primeira vez caracterizado como composto de frutas com propriedades

gelificantes, pelo químico e farmacêutico francês Henri Braconnot (CANTERI *et al.*, 2012; DOSSIÊ GELIFICANTES, 2013).

A pectina é um heteropolissacarídeo presente na parede celular primária e nas camadas intercelulares dos vegetais (lamela média). Encontra-se associada a polissacarídeos estruturais, como a celulose, contribuindo para a integridade dos tecidos e rigidez da parede celular (ESPITIA *et al.*, 2014; ORDÓÑEZ *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2010). Os resíduos cítricos (polpa e casca), o bagaço da maçã e a polpa da beterraba açucareira (*Beta vulgaris* L.) são as principais fontes de obtenção industrial desse polímero, pois apresentam elevado teor de substâncias pécticas, como pode ser visto na Tabela 1 (ESPITIA *et al.*, 2014; JINDAL *et al.*, 2013a; MAY, 1990; PECTINAS..., 2014).

Tabela 1 – Teor de substâncias pécticas em alguns tecidos vegetais.

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

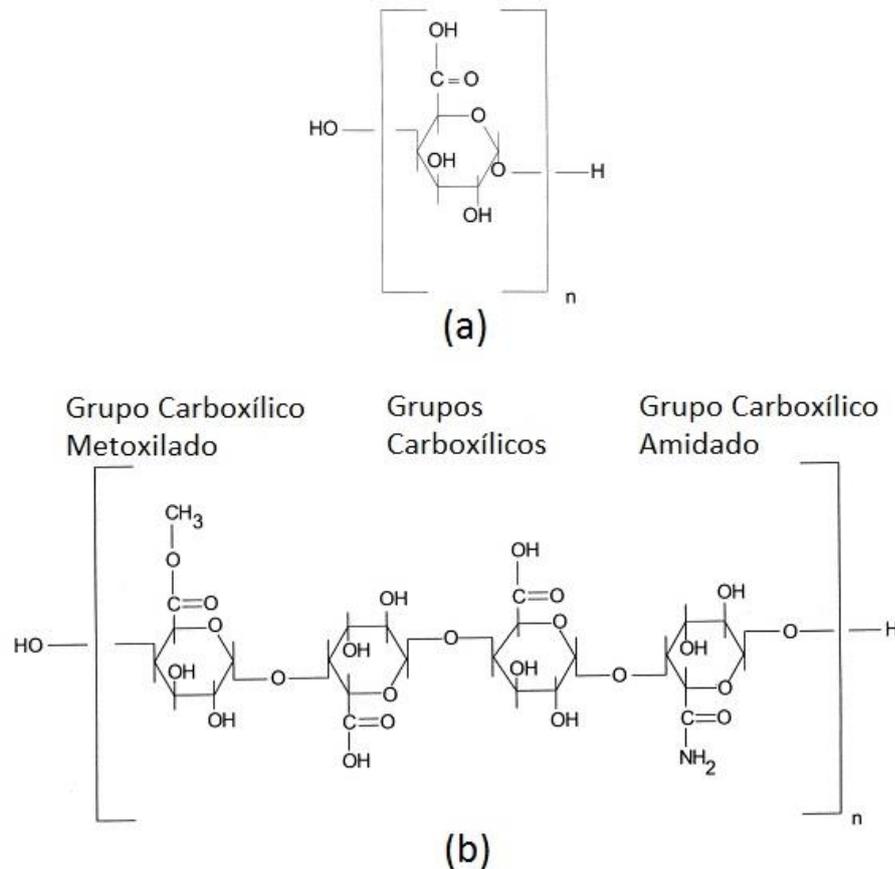
Fonte: Adaptado de Pectinas..(2014).

O polímero péctico é constituído por uma cadeia principal linear de ácidos D-galacturônicos (300-1.000 unidades) unidos, covalentemente, por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4), possuindo a fórmula geral $(C_6H_8O_6)_nH_2O$. Pode apresentar-se com variáveis graus de metoxilação dos resíduos de ácidos carboxílicos e/ou ácidos poligalacturônicos amidados (FIGURA 3) (ESPITIA *et al.*, 2014; ROSENBOHM *et al.*, 2003; WHITE; KATONA; ZODDA, 1999; YEOH; SHI; LANGRISH, 2008).

A cadeia principal da pectina pode ser intercalada por unidades de α (1 \rightarrow 2)-L-ramnose, que servem de pontos de ligação para as cadeias laterais formadas por açúcares neutros, principalmente, D-galactose, L-arabinose e L-ramnose (SANTOS *et al.*, 2010). De

acordo com Yadav *et al.* (2009), a sua estrutura divide-se em duas regiões, linear (*smooth region*) e ramificada (*hairy region*), sendo constituída por três polissacarídeos estruturalmente bem caracterizados: Homogalacturonano (HGA), Ramnogalacturonano I e Ramnogalacturonano II (RG I e RG II).

Figura 3 – Estrutura química do ácido poligalacturônico (a) e estrutura química representativa da pectina com seus grupos de repetição típicos (b).



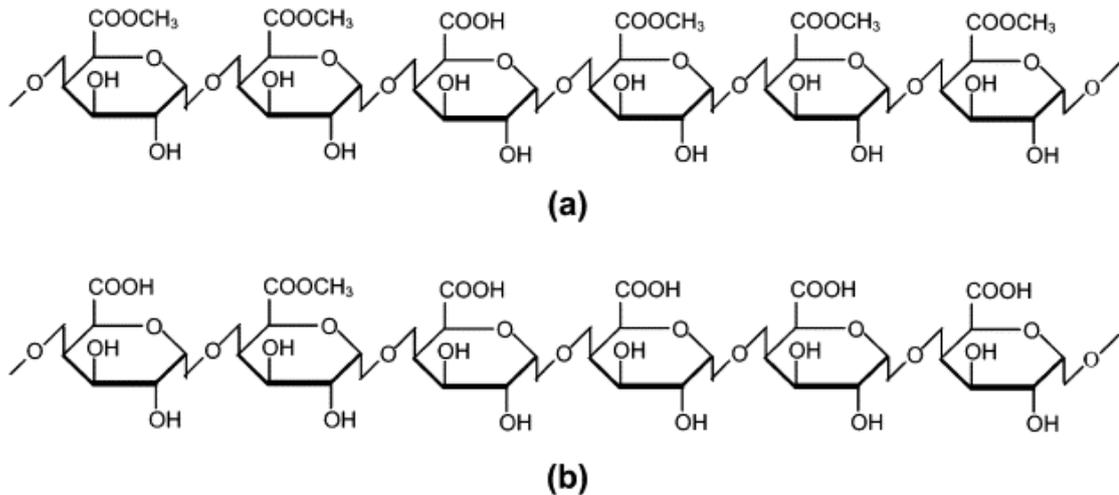
Fonte: Adaptado de White, Katona e Zodda (1999).

Baseado no grau de esterificação dos ácidos galacturônicos com metanol, a pectina é classificada como de alta metoxilação (*High Methoxyl Pectin* – HM) ou de baixa metoxilação (*Low Methoxyl Pectin* – LM), como demonstrado na Figura 4 (ESPITIA *et al.*, 2014; JINDAL *et al.*, 2013a; ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). O grau de esterificação varia com a fonte de obtenção, idade e localização no tecido da planta, com o método de extração e o teor de açúcares neutros (BARRERA *et al.*, 2002).

As pectinas HM têm 50% ou mais dos seus grupos carboxílicos esterificados e formam géis em meio ácido (pH 2,0-3,5), na presença de altas concentrações de sólidos solúveis, geralmente, acima de 55% (SANTOS *et al.*, 2010; YAPO *et al.*, 2007a). Enquanto

que as LM possuem menos de 50% dos seus grupos carboxílicos esterificados e gelificam em uma ampla faixa de pH (2,0-6,0), na presença de íons bivalentes, tais como o Cálcio (Ca^{+2}) (YAPO *et al.*, 2007a).

Figura 4 – Representação da estrutura química de pectinas com alto teor de metoxilação – HM (a) e baixo teor de metoxilação – LM (b).



Fonte: Tharanathan (2003).

Amplamente utilizada pelas indústrias de alimentos, a pectina é um aditivo alimentar natural com diversas propriedades funcionais, como capacidade gelificante, emulsionante, espessante e estabilizante (KOUBALA *et al.*, 2008b; YEOH; SHI; LANGRISH, 2008). É autorizada para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF), apresentando ingestão diária aceitável (IDA) não especificada e recebendo a designação de geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2013).

Esse polímero é empregado a fim de melhorar a aparência e a textura dos alimentos, bem como contribuir para a liberação de *flavor* (BARRERA *et al.*, 2002; BASANTA *et al.*, 2012; KOUBALA *et al.*, 2008b; PARTOS, 2005). Participa da formulação de diversos produtos, tais como: compotas e geléias, sucos de frutas, bebidas de frutas concentradas, sobremesas, laticínios, peixes, produtos cárneos, produtos de *delicatessen* e produtos com baixo teor de açúcar (JINDAL *et al.*, 2013a; MAY, 1990; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Também é possível a sua aplicação em formulações de cosméticos e produtos farmacêuticos (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006), na imobilização de

enzimas (GÓMEZ *et al.*, 2006) e na constituição de filmes comestíveis (ESPITIA *et al.*, 2014), recebendo grande interesse como fonte de fibras dietéticas solúveis.

Além das inúmeras aplicações, esse polímero natural demonstra ter diversas atividades biológicas, como: redução dos níveis de colesterol hepático em cobaias (FERNANDEZ *et al.*, 1994; YAMADA, 1996 *apud* WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006), retardo no esvaziamento gástrico (SCHWARTZ *et al.*, 1988), indução da apoptose de células do câncer de cólon (OLANO-MARTIN *et al.*, 2003 *apud* BAE *et al.*, 2009) e efeito antibacteriano (BAE *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2012; JINDAL *et al.*, 2013a).

As pesquisas já realizadas com pectina, que estudaram seu efeito antibacteriano, revelam sua ação contra importantes bactérias patogênicas de interesse para a saúde pública. Mas, as informações sobre o potencial dessa propriedade e o seu mecanismo de ação ainda são escassas. Embora existam inúmeras pesquisas envolvendo esse polímero, não há muitos relatos sobre a avaliação dessa atividade biológica das pectinas.

Alguns autores têm verificado, em seus estudos, o efeito inibitório de pectinas frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, através de ensaios *in vitro*. Jindal *et al.* (2013a) relataram que a pectina de baixa metoxilação extraída do fruto de *Aegle marmelos* apresentou efeito inibitório frente a *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* próximo a 20 e 40%, respectivamente, em uma concentração de 2 mg/mL. Bae *et al.* (2009) verificaram que a pectina de alta metoxilação extraída de citrus e seu respectivo derivado sulfatado inibiram o crescimento de *B. cereus* KACC 10001 e *Vibrio fischeris* KACC 11254, sendo a amostra sulfatada mais eficaz, inibindo até 20 e 58% das bactérias citadas, respectivamente, a 2 mg/mL. Fan *et al.* (2012) observaram que a pectina comercial de alta metoxilação e seu derivado de quaternário de amônio inibiram *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *B. subtilis*, com a pectina quaternizada apresentando maior halo de inibição.

Os dados reportados na literatura demonstram que essa substância apresenta um efeito inibitório mais expressivo contra bactérias Gram negativas. Anteriormente, Park, Choi e Chang (1995 *apud* BAE *et al.*, 2009) verificaram que a propriedade antibacteriana do hidrolisado de pectina foi mais expressivo contra bactérias Gram negativas (*E. coli* ATCC 11229 e *Acetobacter aceti*) do que contra bactérias Gram positivas (*S. aureus* ATCC 6538 e *B. subtilis* ATCC 6633).

Devido a essa versatilidade de aplicações e propriedades funcionais, a demanda mundial por pectina tem apresentado um significativo aumento. De acordo com Partos (2005) e Willats, Knox e Mikkelsen (2006), a demanda do mercado mundial é superior a 30 mil

toneladas por ano e vem crescendo em torno de 4-5% ao ano, o que tem contribuído para a procura por novas fontes de extração.

3.2.1.1 Métodos de extração da pectina

A extração da pectina é estudada devido a sua importância comercial para a indústria de alimentos e fármacos, como também em cosméticos e revestimentos biodegradáveis. O processo de extração ocorre em três etapas básicas: extração aquosa, precipitação e isolamento (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009).

Os métodos empregados para extrair esse polissacarídeo podem ser químicos e/ou enzimáticos. Os agentes químicos geralmente utilizados são: água e tampões, agentes quelantes de íon cálcio, ácidos e bases. Diferentes agentes podem extrair, a partir do mesmo material vegetal, pectinas com estruturas químicas diversificadas, diferindo na solubilidade e facilidade de isolamento (YAPO, 2009a). As condições da extração (razão matéria-prima:solvente, temperatura, tempo e pH) afetam a extração em si, bem como o rendimento e a estrutura química do material (KOUBALA *et al.*, 2008a; PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009).

Os ácidos são os extratores mais fortes com relação ao rendimento, sendo frequentemente utilizados os ácidos acético, cítrico, láctico, málico, tartárico (orgânicos) e os ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico (inorgânicos) (YAPO, 2009a). A extração ácida é vantajosa e conveniente para a indústria, sendo preferível pelos pesquisadores, pois oferece maiores rendimentos de pectina rica em ácidos galacturônicos (principal componente) e de alta metoxilação, além de não promover mudanças abruptas na estrutura do polissacarídeo (KOUBALA *et al.*, 2008a; MAY, 1990; PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009; YAPO *et al.*, 2007a). Isto é justificado pelo fato das ligações entre as moléculas de ácidos galacturônicos serem mais estáveis à hidrólise ácida do que as ligações destes com ramnose e entre açúcares neutros (YEOH; SHI; LANGRISH, 2008).

Quanto menor o pH, maior o rendimento em pectina, o que pode ser explicado pela quebra das ligações da protopectina insolúvel em celulose e pectina, tornando-a solúvel. Mas, deve-se ter cuidado com a redução extrema do pH, que pode acelerar a degradação do polímero e levar a sua desesterificação (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009; YAPO *et al.*, 2007a; YEOH; SHI; LANGRISH, 2008).

O processo de extração em meio básico rompe as ligações da pectina com a parede celular semelhante ao ácido, mas pode causar instabilidade na cadeia principal da

molécula e esta tende a despolimerizar-se, reduzindo o comprimento da cadeia por beta eliminação (MAY, 1990). Esta extração produz pectinas com baixo grau de metoxilação devido à saponificação dos grupos éster, o que dificulta ou mesmo impossibilita a precipitação com o álcool. Logo, o rendimento pode vir a ser baixo (PAIVA; LIMA; PAIXÃO, 2009; YEOH; SHI; LANGRISH, 2008).

Na extração em meio neutro, utilizando a água como extrator, as pectinas obtidas são ricas em açúcares neutros, em regiões ramnogalacturonano, e possuem alto grau de metoxilação e alta massa molar. Como a água não é um agente extrator forte, o rendimento da extração pode vir a ser reduzido (KOUBALA *et al.*, 2008a).

Sabe-se que existem relações entre a fina estrutura da pectina e suas propriedades funcionais. Então, o método empregado na extração pode modificar a estrutura da molécula e afetar suas propriedades, sendo importante definir qual o método mais conveniente e vantajoso para determinada aplicação (BARRERA *et al.*, 2002; KOUBALA *et al.*, 2008a).

3.2.1.2 Processo de sulfatação

A sulfatação é um processo que consiste na introdução do grupo sulfato a um determinado composto orgânico. Nesta reação, os grupos hidroxila do polímero são substituídos por grupos sulfato, podendo envolver todas as hidroxilas primárias e secundárias presentes na molécula (BAE *et al.*, 2009; JINDAL *et al.*, 2013b).

Essa modificação química tem sido realizada em vários polissacarídeos, a fim de aprimorar suas propriedades biológicas ou desenvolver novas propriedades funcionais (BAE *et al.*, 2009). Os polissacarídeos sulfatados contêm quantidades elevadas de grupos sulfato e maior solubilidade em meio aquoso. Suas atividades biológicas variam com o grau de sulfatação, o peso molecular, a posição do grupo sulfatado, os tipos de açúcares presentes e as estruturas das cadeias principais e das ramificações (WANG, L. *et al.*, 2009).

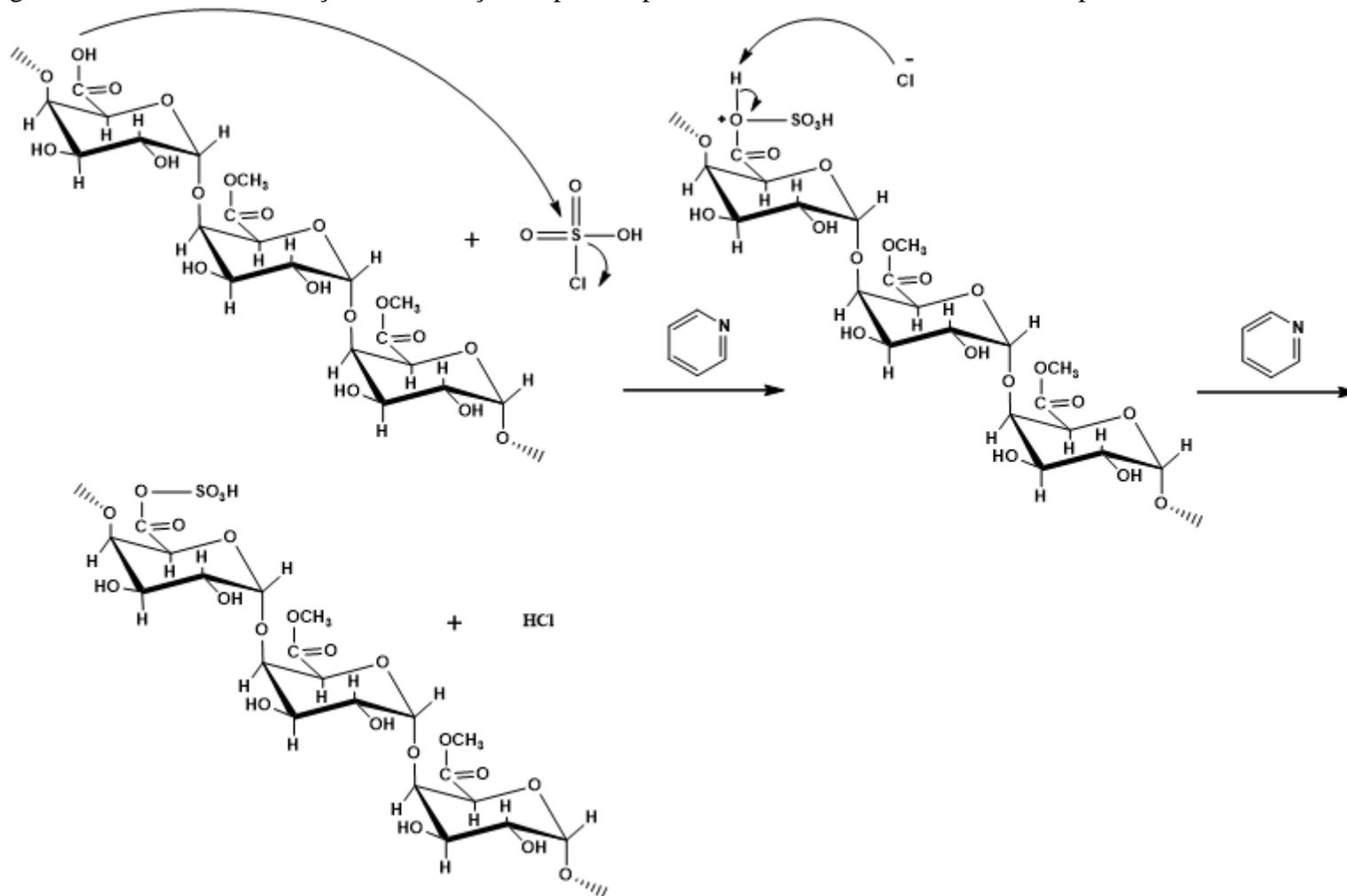
Várias pesquisas científicas avaliaram as propriedades biológicas de polissacarídeos sulfatados e verificaram os efeitos positivos da sulfatação, como: melhoria da atividade anticoagulante e antitrombótica de pectina cítrica (MAAS *et al.*, 2012); desenvolvimento da atividade antiviral de galactomananas contra o vírus da febre amarela e da dengue 1 (ONO *et al.*, 2003); potencialização da propriedade anti-tumoral do heteropolissacarídeo derivado do farelo de arroz contra células de tumor mamário em ratos (WANG, L. *et al.*, 2009); desenvolvimento da atividade anti-tumoral do derivado de β -

glucano de *Poria cocos* (WANG *et al.*, 2004); melhoria da ação antimicrobiana de pectina cítrica e de goma de *Aegles marmelos* contra bactérias patogênicas (BAE *et al.*, 2009; JINDAL *et al.*, 2013c).

Apesar dos efeitos positivos observados, alguns estudos com polissacarídeos sulfatados têm relatado resultados contrários aos esperados. Pires *et al.* (2013) verificaram que o derivado sulfatado de quitosana (9,03% de enxofre e sulfatação de 0,67) não conseguiu inibir o crescimento das bactérias de teste (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*). Chen, Liao e Tsai (1998 *apud* PIRES *et al.*, 2013) observaram que um derivado de quitosana, com baixo teor de enxofre (0,63%), apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) contra as bactérias *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella Typhimurium* e *Bacillus cereus* menor do que a obtida para a quitosana desacetilada (69% de desacetilação). Porém, um alto teor de enxofre (13,03%) influenciou negativamente o seu efeito antibacteriano.

Dentre os diversos agentes de sulfatação empregados, destacam-se os seguintes: ácido sulfúrico concentrado ou a sua mistura com solventes orgânicos, complexos de trióxido de enxofre com piridina ou trietilamina, dióxido de enxofre líquido e ácido clorossulfônico em formamida ou piridina (MIHAI; MOCANU; CARPOV, 2001; YOSHIDA *et al.*, 1995). O método do ácido clorossulfônico-piridina é um dos mais utilizados e apresenta as vantagens de alto rendimento, alto grau de substituição e manipulação conveniente (LU *et al.*, 2012). Neste método, a piridina atua como catalisador orientando e acelerando a reação de sulfatação. O grupo sulfato é introduzido na molécula através da formação da ligação carbono-oxigênio-enxofre, com conseqüente produção de ácido clorídrico, o que exige uma posterior etapa de neutralização, como exemplificado na Figura 5.

Figura 5 – Mecanismo da reação de sulfatação da pectina pelo método do ácido clorossulfônico-piridina.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Segurança alimentar e a incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA)

A segurança alimentar é uma questão complexa, que sob a ótica da inocuidade, visa garantir que um alimento não causará danos ao consumidor, quando ingerido. Produz impacto em todos os segmentos da sociedade, do público ao governo, englobando as indústrias alimentícias (FAO; WHO, 2007; FDA, 2012).

Nas últimas décadas, novos desafios têm surgido para as autoridades mundiais de segurança alimentar decorrentes do comércio internacional de alimentos. A globalização do comércio de alimentos proporciona benefícios aos consumidores e contribui para o desenvolvimento econômico dos países, em contrapartida, aumenta os riscos de disseminação de patógenos e de contaminantes através das fronteiras nacionais (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; FAO; WHO, 2013). Devido a isto, têm-se intensificado as políticas de conscientização sobre a importância da produção de alimentos seguros, além de uma maior fiscalização e exigência por parte dos países importadores referentes a padrões sanitários e de qualidade dos alimentos.

Mesmo com essas mudanças verificadas em âmbito mundial, associadas a melhorias nos sistemas de vigilância de diversos países, ainda observa-se a ocorrência de um elevado número de casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).

As DTA são definidas como uma síndrome, geralmente, constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, atribuída à ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes biológicos, suas toxinas ou outras substâncias químicas ou físicas, em níveis capazes de causar danos à saúde do consumidor. Vários fatores têm contribuído para o aumento da ocorrência de DTA, como: o aumento da população; o crescimento desordenado das cidades; a existência de grupos populacionais vulneráveis; a necessidade de se produzir alimentos em grande escala; além da ineficiência do controle de qualidade realizado pelas autoridades públicas e privadas na produção dos alimentos (BRASIL, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, anualmente, mais de um terço da população mundial adoeçam devido a surtos de DTA, mas somente uma pequena proporção desses casos é notificada. As DTA têm sido consideradas como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (BRASIL, 2014).

Nos Estados Unidos (EUA), a cada ano, 48 milhões de pessoas ficam doentes, 128 mil são hospitalizadas e 3 mil morrem de doenças de origem alimentar, mesmo possuindo um

dos fornecimentos de alimentos mais seguros do mundo. As DTA são consideradas um importante problema de saúde pública neste país (CDC, 2013; USDA; FDA, 2011).

Em 2012, foram notificados 19.531 casos de infecções, 4.563 hospitalizações e 68 mortes nos EUA. O número de infecções e a incidência por 100.000 habitantes, para os principais micro-organismos monitorados, foram os seguintes: *Salmonella* (7.800; 16,42), *Campylobacter* (6.793; 14,30), *Shigella* (2.138; 4,50), *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga non-O157 (551; 1,16), *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga O157 (531; 1,12), *Vibrio* (193; 0,41), *Yersinia* (155; 0,33) e *Listeria* (121; 0,25) (CDC, 2013).

Na União Europeia (UE), em 2011, foram registrados 5.648 surtos, o que resultou em 69.553 casos de DTA confirmados em humanos, 7.125 hospitalizações (10,2%) e 93 mortes (0,13% dos casos relatados). Os principais agentes foram *Salmonella* (26,6%), toxinas bacterianas (12,9%), *Campylobacter* (10,6%) e vírus (9,3%). Os alimentos mais envolvidos foram ovos e produtos à base de ovos, alimentos mistos, peixe e seus derivados (EFSA; ECDC, 2013).

No Brasil, as DTA são responsáveis por cerca de 670 surtos com 13 mil doentes a cada ano (BRITO, 2010). Acredita-se que o número real dessas ocorrências seja muito superior ao registrado, visto que os casos de DTA, no país, ainda são subnotificados.

Os dados da Vigilância Epidemiológica das DTA no Brasil, referentes ao período de 2000 a agosto de 2014, demonstram uma grande variação no número de casos registrados. Em 2013, foram notificados 800 surtos com 16.720 doentes. Até agosto do ano passado (2014), já foram registrados 209 surtos com 2.950 pessoas doentes, o que representa 26,13% do total relatado em 2013 (BRASIL, 2014).

Os alimentos mais envolvidos em surtos de DTA no Brasil são alimentos mistos (1.570), ovos e produtos à base de ovos (816), água (563), doces e sobremesas (443). As causas ignoradas ainda superam o número de surtos (4.308), sendo responsáveis por 43% do total registrado. Quanto aos principais agentes etiológicos associados aos surtos de DTA, destacam-se: *Salmonella* spp. (18,09% dos casos registrados), *Staphylococcus aureus* (9,23%), *E. coli* (6,33%) e *Bacillus cereus* (3,70%). Assim como verificado para os alimentos envolvidos, o número de surtos em que não se consegue identificar o agente etiológico é muito elevado, representando 51,34% do total notificado (BRASIL, 2014). Nesse levantamento, não foram divulgados dados atuais sobre as regiões do Brasil com os maiores índices de surtos, mas até 2013, as regiões Sul e Sudeste eram as detentoras dos maiores índices, com 38,9% e 39,8% do total, respectivamente (BRASIL, 2013). Os locais com maior

número de ocorrência continuam sendo residências (3.773), restaurantes/padaria (1.492) e creche/escola (835) (BRASIL, 2014).

Os dados apresentados enfatizam a necessidade de um controle eficaz durante toda a cadeia produtiva dos alimentos. A aplicação de técnicas de produção e de conservação adequadas, além de melhorias no sistema de segurança dos alimentos, permite o controle da disseminação desses patógenos. O emprego de antimicrobianos naturais e de embalagens ativas antimicrobianas, aliado às boas práticas de fabricação (BPF), garante a produção e possibilita a disponibilização de alimentos seguros, de qualidade e saudáveis.

3.4 Uso de agentes antimicrobianos na preservação dos alimentos

Os alimentos possuem composição complexa e rica em diversos nutrientes, o que torna estes produtos, de origem vegetal ou animal, propícios a várias alterações, após a colheita ou abate. Consequentemente, deterioram-se facilmente, perdendo a qualidade e apresentando uma vida útil curta (ORDÓNEZ *et al.*, 2005). A perda de qualidade depende de vários fatores, como tipo e composição do alimento, embalagem e condições de estocagem, e apresenta diferentes causas, que podem ser de ordem biológica, química ou física (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; GOULD, 1996; MELO; SOARES; GONÇALVES, 2005).

A principal causa de alteração dos alimentos constitui-se a de origem microbiológica, ocasionada por micro-organismos presentes, principalmente, na superfície dos produtos. De acordo com Araújo (2008), cerca de 20% dos alimentos produzidos no mundo são perdidos devido à ação de micro-organismos. Estes agentes biológicos não só podem modificar as características sensoriais dos alimentos, deteriorando-os, como também podem provocar danos à saúde do consumidor, através das doenças transmitidas por alimentos (DTA) (AZEREDO *et al.*, 2004; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; ORDÓNEZ *et al.*, 2005). Diante disto, com o intuito de prevenir tais problemas, empregam-se técnicas de conservação.

Os conservantes são aditivos alimentares, substâncias adicionadas intencionalmente aos alimentos, com o propósito de impedir ou retardar as alterações provocadas por micro-organismos (BRASIL, 1997; CODEX ALIMENTARIUS, 1995). Apresentam efeitos similares aos demais processos de preservação (ARAÚJO, 2008), podendo ser utilizados individualmente, nos alimentos sensíveis aos tratamentos físicos, ou em associação a outros fatores de preservação, como descrito pela teoria dos obstáculos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; LEISTNER, 2000). Desempenham papel importante do

ponto de vista econômico e de saúde pública, pois agem sobre os micro-organismos patogênicos, sendo indispensáveis para a produção e comercialização de diversas classes de alimentos (MIDIO; MARTINS, 2000).

O emprego de agentes antimicrobianos, como método de conservação, possibilita a obtenção de alimentos seguros, diversificados e com menor custo para os consumidores. Alimentos processados sem a utilização de conservantes necessitam de uma maior efetividade em tratamentos térmicos e melhorias no sistema de embalagem, tendo, portanto, um custo mais elevado (MIDIO; MARTINS, 2000).

Com a globalização do comércio de alimentos e as mudanças no comportamento do consumidor concernentes à alimentação, verifica-se uma demanda crescente por produtos frescos, minimamente processados, de fácil preparo ou prontos para o consumo e que mantenham as características semelhantes ao *in natura*. Além disso, há uma preocupação crescente pelos consumidores e autoridades mundiais de segurança alimentar quanto à qualidade e segurança dos produtos (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; BECERRIL *et al.*, 2013; DOSSIÊ CONSERVANTES, 2011; QUESTED *et al.*, 2010; VIEIRA, 2008).

Essas mudanças incentivam os pesquisadores a buscar por substâncias naturais, alternativas aos antimicrobianos sintéticos comumente empregados, que tenham ação antimicrobiana efetiva e que sejam seguras e renováveis (AGENTES..., 2010; JUNEJA; DWIVEDI; YAN, 2012). Isto é evidenciado pelo grande número de publicações envolvendo antimicrobianos naturais.

Diversos compostos estão disponíveis a partir de várias fontes naturais (plantas, animais e micro-organismos) e vêm sendo estudados a fim de ser aplicados em alimentos com a finalidade de preservá-los. Podem-se destacar os estudos realizados com: enzimas, glicoproteínas, lipídios, bacteriocinas, óleos essenciais, surfactantes e os polissacarídeos como a quitosana (AGENTES..., 2010; APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; BECERRIL *et al.*, 2013; JUNEJA; DWIVEDI; YAN, 2012; MELLEGÅRD *et al.*, 2011). Muitas destas substâncias podem ser adicionadas diretamente aos alimentos ou fazer parte da constituição dos promissores filmes antimicrobianos, como os polissacarídeos, possibilitando a produção de alimentos seguros e saudáveis.

3.5 Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de novas substâncias

Existem vários métodos *in vitro* disponíveis para avaliar a atividade antimicrobiana de novas substâncias. No entanto, não há testes padronizados para verificar o potencial antimicrobiano de possíveis conservantes de alimentos, o que dificulta a comparação dos dados publicados (BURT, 2004).

Os métodos descritos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), para testes de suscetibilidade antibacteriana a antibióticos, têm sido modificados para testar antimicrobianos naturais. Os pesquisadores, geralmente, adaptam esses métodos, a fim de possibilitar a aplicação em seus estudos (BURT, 2004; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

Segundo Burt (2004), os métodos de ensaio são classificados, de acordo com o objetivo desejado, em:

- a) triagem da atividade antibacteriana: métodos de difusão em ágar (teste de difusão em disco e poços em ágar);
- b) determinação do poder das propriedades antimicrobianas: método de diluição em ágar e de diluição em caldo;
- c) determinação da rapidez e duração da atividade antibacteriana: análise da cinética de morte/curvas de sobrevivência;
- d) observação dos efeitos físicos da atividade antibacteriana: microscopia eletrônica de varredura (MEV).

No teste de difusão em disco, um disco de papel é impregnado com a substância antimicrobiana e aplicado na superfície de um ágar inoculado. O composto difunde-se através do ágar e forma uma zona de inibição (BURT; REINDERS, 2003). A sensibilidade do micro-organismo é verificada pela medida do diâmetro do halo de inibição. Quanto maior o diâmetro do halo de inibição produzido pela substância, maior a sua ação inibitória e mais sensível o micro-organismo a ação desse composto (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

Esse procedimento geralmente é empregado como uma verificação preliminar da atividade antibacteriana, antes de estudos mais detalhados. Possibilita a seleção entre compostos, mas a comparação entre dados publicados não é viável, devido a fatores que afetam os resultados, como: volume do composto colocado sobre os discos, espessura da camada de ágar e os solventes utilizados para solubilizar a substância (BURT, 2004).

Já no método de poços em ágar, são realizados cortes ou furos no ágar (poços), nos quais a substância a ser testada é depositada. Assim como no teste de difusão em disco, o composto sofre difusão e forma um halo de inibição. Pode ser usado quando um grande número de compostos e/ou um grande número de isolados de bactérias devem ser rastreados (DORMAN; DEANS, 2000).

Os métodos de diluição em ágar ou em caldo fornecem um importante dado sobre o poder de inibição da substância, conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM é citada por muitos autores e sua definição varia entre as publicações, sendo outro obstáculo para a comparação entre os estudos (BURT, 2004). Uma das definições comumente empregada é que a CIM é a menor concentração que inibe o crescimento visível do micro-organismo testado (CLSI, 2006; DELAQUIS *et al.*, 2002; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

De acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – antigo NCCLS), a diluição em ágar consiste em incorporar o antimicrobiano ao ágar fundido (45-50°C), nas concentrações a serem testadas. Após a solidificação do ágar, adiciona-se o inóculo e incuba-se (CLSI, 2006). Apesar das variações nos solventes, às vezes empregados na solubilização das substâncias, e no volume do inóculo (1-100 µL), os valores da CIM publicados parecem ter a mesma ordem de magnitude (BURT, 2004).

Em estudos com diluição em caldo, o procedimento é realizado em tubos (macrodiluição) ou em placas de microdiluição. A substância antimicrobiana é adicionada ao caldo nutriente na concentração adequada, seguida da adição do inóculo e incubação (CLSI, 2006). O ponto final pode ser obtido através de várias técnicas: medição da densidade óptica (DO) (turbidez), enumeração de colônias por contagem de viáveis, medição da condutância/condutividade e monitoramento visual (BURT, 2004).

A determinação do efeito bactericida ou a duração do efeito bacteriostático é realizada através da análise da cinética de morte/curva de sobrevivência. Isto é possível representando, graficamente, o número de células sobreviventes no caldo após a adição do composto antimicrobiano em função do tempo. Podem-se empregar os métodos de medição da DO ou contagem de viáveis, após o plaqueamento em ágar (BECERRIL *et al.*, 2013; BURT; REINDERS, 2003).

Para avaliar os danos às células bacterianas decorrentes da atividade antimicrobiana, emprega-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras devem ser preparadas cuidadosamente para não danificar as células e assim permitir a

comparação com o controle. Através das imagens obtidas pelo MEV, podem-se verificar as alterações na morfologia da célula e assim inferir um suposto mecanismo de ação da substância em estudo (BECERRIL *et al.*, 2013; BURT; REINDERS, 2003).

Os resultados obtidos, a partir da avaliação antimicrobiana, podem ser afetados por diferentes fatores, tais como: o método de extração da substância em estudo, o volume do inóculo, a fase de crescimento do micro-organismo, a composição do meio de cultura utilizado, o pH do meio, e o tempo e temperatura de incubação (BURT, 2004; RIOS; RECIO; VILLAR, 1988). Vale ressaltar que todos os métodos possuem vantagens e desvantagens que devem ser levadas em consideração na escolha do método mais conveniente para um determinado estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e preparo dos frutos do noni (*Morinda citrifolia* L.) para extração da pectina

Os frutos do noni foram coletados em um cultivo doméstico localizado na cidade de Fortaleza, CE, em fevereiro de 2014. Foram selecionados para o estudo, os frutos maduros com textura macia, mas ainda firme, sendo descartados os danificados e em senescência.

Após a seleção, realizou-se a higienização dos frutos, através da lavagem em água corrente e posterior imersão em solução diluída de hipoclorito de sódio (200 ppm) por 15 min. Em seguida, com o auxílio de uma espátula, a polpa dos frutos foi separada manualmente da película externa e das sementes, sendo imediatamente congelada (-20 °C). A polpa foi liofilizada e armazenada em recipiente plástico, sob refrigeração (4 °C), até o momento da extração da pectina.

4.2 Extração, isolamento e purificação da pectina do noni

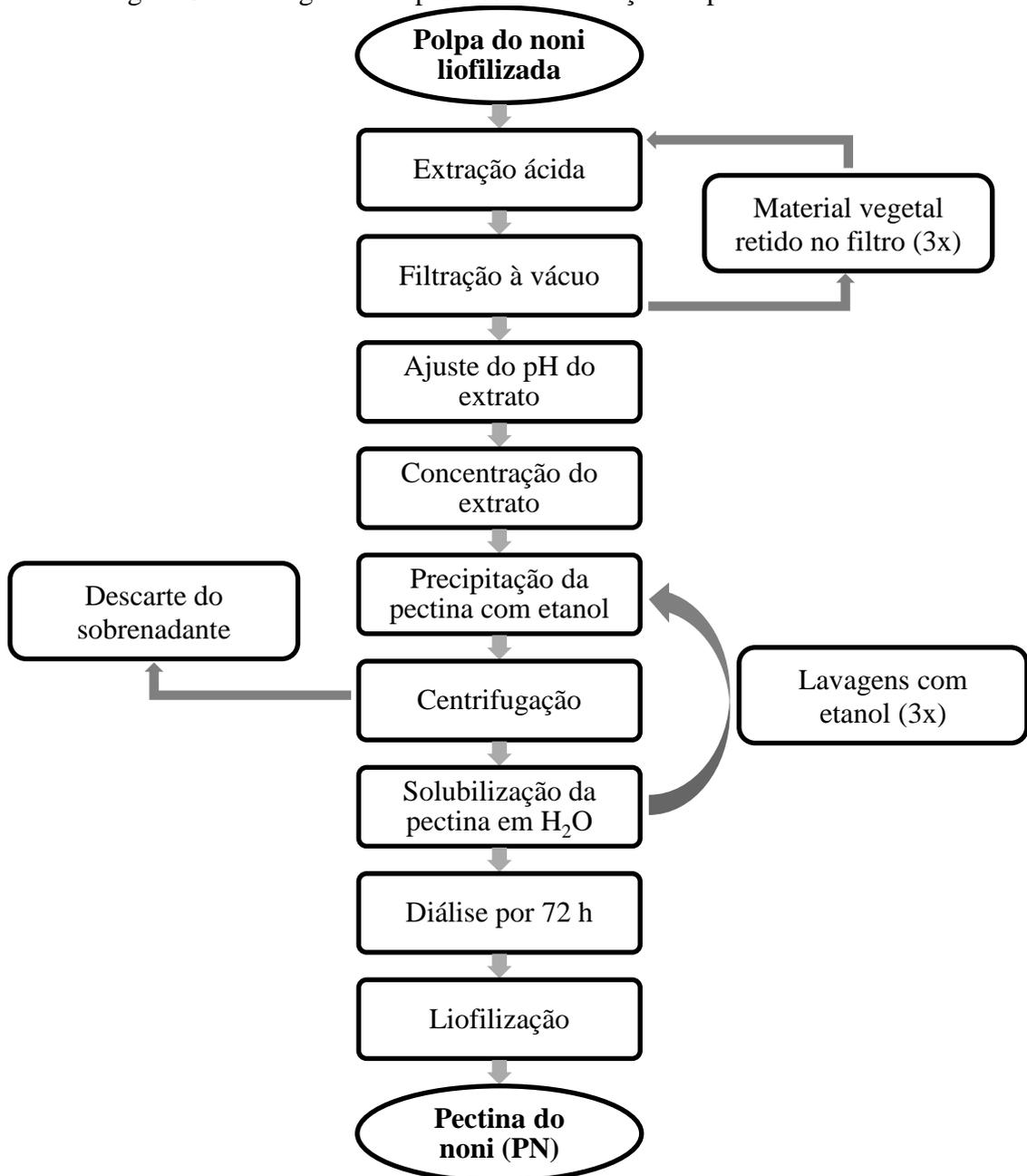
A pectina do noni foi extraída conforme o método químico proposto por Koubala *et al.* (2008a), com algumas modificações no pH e temperatura (FIGURA 6). O processo de extração foi realizado utilizando solução de oxalato de amônio 0,25% com pH 4,0 (ajustado com ácido oxálico), a 80 °C por 1 h, sob constante agitação.

Na primeira etapa (extração ácida), a polpa do noni liofilizada foi pesada e colocada em um béquer, em seguida, adicionou-se a solução extratora na proporção 1:45 (m/v). O sistema foi conduzido a um agitador magnético com aquecimento, no qual foram mantidas as condições da extração. Realizaram-se três extrações consecutivas, a partir da mesma amostra vegetal, sendo que, após cada extração, o material foi filtrado à vácuo e teve o seu pH ajustado (7,0) com solução de NaOH. Concentrou-se o extrato por rotaevaporação e precipitou-se a pectina por meio da adição de três volumes de etanol 96%. O material precipitado foi mantido em repouso a 4 °C por 24 h.

Decorrido o período de 24 h, a mistura foi centrifugada a 7500 rpm por 10 min. Descartou-se o sobrenadante (etanol) e reservou-se o precipitado (pectina) que foi, posteriormente, solubilizado em água deionizada. O polímero solubilizado foi reprecipitado e aplicou-se o procedimento descrito anteriormente. Ao todo, foram realizadas três lavagens

com etanol. Após a terceira lavagem, a pectina foi solubilizada em uma quantidade mínima de água deionizada, transferida para membranas celulósicas (Peso molecular de corte: 12 kDa) e submetida à diálise por 72 h, com duas trocas de água por dia. Em seguida, foi liofilizada e armazenada em recipiente plástico à temperatura ambiente (25 °C), sendo denominada de PN. O rendimento da extração foi determinado pela razão entre o peso da pectina liofilizada e o peso da polpa do noni utilizada (% , m/m), sendo expresso como média \pm desvio-padrão.

Figura 6 – Fluxograma do processo de obtenção da pectina do noni.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Modificação química da pectina do noni pelo processo de sulfatação

A modificação química da pectina do noni (PN) por sulfatação foi realizada utilizando o método do ácido clorossulfônico-piridina, adaptado das metodologias descritas por Jung *et al.* (2011) e Ono *et al.* (2003). A amostra PN (500 mg) foi suspensa em N,N-dimetilformamida (30 mL), sob agitação, a 25 °C por 12 h. Adicionou-se a piridina (30 mL) e o sistema foi aquecido a 80 °C por 30 min. Em seguida, o ácido clorossulfônico (10 mL) foi adicionado e o sistema foi mantido a 80 °C por 1 h. Após o término da reação, o material foi resfriado a 4 °C por 24 h. Procedeu-se a neutralização com solução saturada de bicarbonato de sódio, seguida da diálise por 120 h – com duas trocas de água por dia – a fim de remover os sais, a piridina e os resíduos da reação. O material dialisado foi concentrado por rotaevaporação, precipitado pela adição de três volumes de etanol 96% e mantido em repouso a 4 °C por 24 h. Realizou-se uma centrifugação a 7500 rpm por 10 min, sendo o precipitado ressolubilizado em água deionizada, liofilizado e designado como PN-s (pectina do noni sulfatada). A amostra PN-s foi armazenada em recipiente plástico à temperatura ambiente (25°C).

4.4 Caracterização da pectina do noni nativa (PN) e sulfatada (PN-s)

4.4.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros no infravermelho das pectinas foram registrados em um espectrômetro Perkin-Elmer FT-IR modelo 16 PC. As amostras foram maceradas, com o auxílio de um pistilo e almofariz, misturadas com KBr (1:80) e prensadas com 10 t em forma de pastilhas. As pastilhas foram analisadas e os espectros foram obtidos entre os números de onda 4000 e 400 cm^{-1} . A pectina cítrica comercial (Vetec) foi utilizada como padrão para fins comparativos.

Essa análise também foi empregada na determinação do grau de esterificação (GE) das pectinas. A partir dos espectros obtidos, as principais bandas correspondentes aos grupos carboxílicos esterificados (1750 cm^{-1}) e grupos carboxílicos livres (1650 cm^{-1}) foram localizadas. Utilizando o software Origin 8 (OriginLab Corporation, USA), calculou-se a área

sob as respectivas bandas e o GE foi determinado através da Equação 1 (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 2000; LIMA *et al.*, 2010):

$$GE = [A_{1750 \text{ cm}^{-1}} / (A_{1650 \text{ cm}^{-1}} + A_{1750 \text{ cm}^{-1}})] \times 100 \quad (1)$$

4.4.2 Análise elementar

Através do equipamento analisador elementar Perkin-Elmer CHNS 2400, quantificou-se o percentual dos elementos químicos presentes nas amostras de pectina. Foram determinados, os teores de carbono, hidrogênio, enxofre e nitrogênio.

A partir do teor de enxofre da amostra sulfatada, calculou-se o grau de sulfatação (GS) de acordo com a seguinte equação (BAE *et al.*, 2009; JINDAL *et al.*, 2013c; LIN *et al.*, 2004):

$$GS = \frac{162 \times S \% / 32}{100 - (80 / 32 \times S \%)} \quad (2)$$

4.4.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento TGA Q50 V20.13 Build 39 (TA Instruments, USA), sob atmosfera de nitrogênio. As medidas foram efetuadas em um intervalo de temperatura de 25-800 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, em média de 5,0 mg da amostra dispostos em um suporte de platina.

4.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas em um equipamento DSC Q20 V24.9 Build 121 (TA Instruments, USA). As amostras (5,0 mg) foram dispostas em recipientes de alumínio, hermeticamente fechados, e aquecidas na faixa de temperatura de 25-300 °C, sob atmosfera de nitrogênio, a uma taxa de aquecimento constante de 10 °C/min. A alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) foi utilizada como referência. Antes dos ensaios, a célula DSC foi calibrada no eixo de temperatura, utilizando padrão de índio metálico ($T_{\text{fusão}} = 156,6 \text{ °C}$) com pureza de 99,99%.

4.4.5 Estudo do potencial zeta

A análise do potencial zeta foi realizada no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd.). A fim de possibilitar a medida desse potencial, preparou-se uma solução a 0,1% (m/v) de cada amostra de pectina, utilizando água deionizada como meio dispersante. As soluções das pectinas (1 mL) foram colocadas em células capilares específicas do equipamento (DTS1070) e foram submetidas à análise, em triplicata, à temperatura de 25°C e pH 7,0. Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio-padrão.

4.4.6 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar ponderada média (M_w) das pectinas e sua distribuição foram determinadas por cromatografia de permeação em gel (GPC). Essa análise foi conduzida a 40°C em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Shimadzu) equipado com injetor manual LC-20AD, detector de índice de refração RID-10A e coluna Ultrahydrogel PolySep™-GFC-P Linear 300 mm x 7,8 mm (Phenomenex, USA). O volume da amostra injetado foi de 20 μ L, sendo o fluxo de 1 mL/min e a fase móvel a solução de NaNO_3 0,1 M. A curva de calibração foi construída utilizando padrões de pululana (Shodex Denko®) de massa molar de $5,9 \times 10^3$ a $7,88 \times 10^5$ g/mol.

As soluções das pectinas foram preparadas na concentração de 0,5% (m/v), sendo solubilizadas por 24 h. Antes de serem injetadas no equipamento, as amostras foram dispostas em um banho ultrassônico por 2 min e, em seguida, filtradas em filtros de membrana de ésteres de celulose 0,45 μ m (Merk Millipore®).

4.4.7 Comportamento reológico

As propriedades reológicas de fluxo contínuo das pectinas foram determinadas em um reômetro de tensão controlada Advanced Rheometer AR2000 (TA Instruments, USA). A viscosidade (Pa.s) foi medida em função da taxa de cisalhamento ($0-1000 \text{ s}^{-1}$), a 25 °C, utilizando uma geometria do tipo cone-placa com 20 mm de diâmetro, ângulo de 2°00'40" e truncamento de 53 μ m.

Foram preparadas soluções das pectinas em água deionizada nas concentrações de 0,5 e 1,0% (m/v). Em seguida, alíquotas de 0,3 mL dessas soluções foram adicionadas ao

recipiente do equipamento no estado fluido, mantendo-se o solvente através de atmosfera saturada ao redor da cela. O volume do solvente evaporado não foi significativo nas escalas de tempo e temperatura utilizadas. Antes de cada experimento, equilibraram-se as amostras por 2 min.

4.4.8 Quantificação de proteínas

A determinação do teor de proteínas das amostras de pectina do noni (PN e PN-s) foi realizada de acordo com Bradford (1976). O reagente de Bradford foi obtido dissolvendo “Coomassie Brilliant Blue G-250” (100 mg) em 50 mL de etanol 95%, com posterior adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução produzida foi diluída para 1 L com água deionizada, seguida de filtração em papel de filtro qualitativo (Whatman nº1). Como padrão para a construção da curva de calibração, utilizou-se a albumina sérica bovina – BSA (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL.

A fim de quantificar as proteínas, foram produzidos extratos das pectinas através da solubilização de 100 mg da amostra em 10 mL de tampão EDTA/fosfato. Utilizaram-se alíquotas de 0,1 mL de cada extrato, sendo a estas adicionado 1 mL do reagente de Bradford, seguida de homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex. Após 30 min de reação, realizaram-se as leituras das absorbâncias em um espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultrospec 2000) a 595 nm. As análises foram conduzidas em triplicata, e os resultados foram expressos em % (m/m), sendo apresentados como média ± desvio padrão.

4.5 Avaliação da atividade antibacteriana da pectina do noni nativa (PN) e sulfatada (PN-s)

4.5.1 Cepas bacterianas

As cepas de bactérias utilizadas neste estudo foram: Gram positivas, *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); Gram negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (IAL 1026) e *Salmonella Enteritidis* (IAL 1132).

4.5.2 Preparo e manutenção das culturas de trabalho

A partir dos tubos contendo as cepas padrão já ativadas (cultura estoque), realizou-se o subcultivo das bactérias de teste (cultura de trabalho). Primeiramente, removeu-se uma alçada de cada cultura estoque, retirando a massa celular da superfície do ágar com o auxílio de alças descartáveis, e inoculou-se em tubos contendo 5 mL de caldo de enriquecimento estéril, sendo utilizado o Caldo Trypticase de Soja (TSB/DIFCO) para *L. monocytogenes* e *E. coli*, e o Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI/BACTO™) para os demais micro-organismos. Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 h.

Decorrido o período de incubação, removeu-se uma alçada de cada cultura de células e realizaram-se estrias de esgotamento em meios sólidos, empregando-se placas com Ágar Trypticase de Soja (TSA/OXOID) para todos os micro-organismos, exceto para *L. monocytogenes*, que foi utilizado o TSA enriquecido com Extrato de Levedura (YE/BACTO™). As placas foram incubadas a 35 °C por 24h. O mesmo procedimento foi realizado em meios de cultura seletivos/diferenciais, como descrito na Tabela 2. Em seguida, observou-se a morfologia das colônias (aspecto e tamanho), a fim de verificar a pureza das cepas e o crescimento de colônias típicas das bactérias em estudo. Com a alça descartável, removeu-se uma colônia de cada micro-organismo, a partir do cultivo em meio não seletivo, e inoculou-se, realizando estrias na superfície, tubos contendo ágar de manutenção inclinado (TSA/TSA-YE). Os tubos foram incubados como descrito anteriormente e, em seguida, mantidos sob refrigeração a 4 °C.

Tabela 2 – Meios de cultura e condições de incubação empregados no cultivo seletivo/diferencial das bactérias em estudo.

Micro-organismo	Meio de cultura seletivo/diferencial	Condições de incubação	Referência
<i>Escherichia coli</i>	MAC	35 °C/24 h	
<i>Listeria monocytogenes</i>	PAL	35 °C/24-48 h	Silva <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAB	25 °C/24-48 h	
<i>Staphylococcus aureus</i>	BP	35 °C/48 h	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	HE	35 °C/24 h	

Fonte: Elaborada pela autora.

MAC, Ágar MacConkey (HIMEDIA); PAL, Ágar Palcam (DIFCO™); PAB, *Pseudomonas* Ágar Base (OXOID); BP, Ágar Baird-Parker (DIFCO); HE, Ágar Entérico de Hektoen (OXOID).

4.5.3 Preparo e padronização do inóculo para uso nos ensaios de microdiluição

No preparo do inóculo para o teste de microdiluição, adotou-se a metodologia de crescimento da cultura em caldo, padronizada em ensaios preliminares (CLSI, 2006). A partir das culturas de trabalho, removeu-se uma alçada de cada micro-organismo e realizaram-se estrias de esgotamento em placas com meios não seletivos e seletivos/diferenciais, conforme o *Item 4.5.2*.

Decorrido o período de incubação, selecionou-se uma colônia bem isolada e de mesmo tipo morfológico que as demais (aspecto e tamanho). Com o auxílio de uma alça de inoculação, cada colônia foi transferida para um tubo contendo 5 mL de caldo de enriquecimento estéril. Os caldos de enriquecimento e as condições de incubação foram os mesmos descritos no *Item 4.5.2*. Realizou-se o controle dos caldos, a fim de verificar a sua esterilidade.

O inóculo obtido, com 24 h, foi ajustado para ser empregado nos ensaios de microdiluição. O ajuste foi feito através de diluições seriadas de 1 mL do inóculo em 9 mL de caldo nutriente, até a obtenção de uma concentração final de aproximadamente 10^5 UFC/mL (BECERRIL *et al.*, 2013; BRANDT *et al.*, 2010; CLSI, 2006). A concentração do inóculo padronizado foi verificada a cada ensaio. Para isso, 7 diluições decimais em série, de cada tubo, foram realizadas em água peptonada estéril (0,1%), seguida da remoção de alíquotas de 100 μ L de cada diluição e plaqueamento, em duplicata, em meios sólidos específicos (TABELA 2). Após o período de incubação, realizou-se a contagem das colônias, confirmando a concentração de bactérias do inóculo padronizado ($\sim 10^5$ UFC/mL).

4.5.4 Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana das pectinas do noni (PN e PN-s)

O estudo *in vitro* da atividade antibacteriana das pectinas do noni (PN e PN-s) foi realizado através de um método de microdiluição em caldo (BRANDT *et al.*, 2010). Para cada amostra de pectina, foram testadas as concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL. As soluções das amostras PN e PN-s foram preparadas através da solubilização do polímero em água deionizada estéril.

De acordo com o procedimento adotado, volumes equivalentes da solução de pectina, na concentração a ser testada, e do inóculo ajustado em caldo nutriente (100 μ L) foram adicionados aos poços da microplaca (96 poços, capacidade de 300 μ L/poço). Após o

preparo da placa, fez-se a leitura da densidade óptica a 630 nm (DO_{630}) usando um leitor de absorvância ELx808IU (BioTek Instruments, Inc., USA). Em seguida, a microplaca foi incubada a 35 °C por 24 h, sob agitação, sendo realizada uma nova leitura da DO_{630} após o período de incubação.

Em todos os ensaios realizados, foram incluídos os seguintes controles para ajuste da densidade óptica: controle positivo, contendo apenas água estéril e inóculo em caldo nutriente; controle negativo, constituído por solução antibacteriana (em cada concentração testada) e caldo nutriente estéril; e, controle do caldo nutriente (sem inóculo). Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Os resultados foram avaliados da seguinte forma:

- a) os poços que produziram uma diferença $< 0,05$ na DO_{630} , de 0 a 24 h, foram definidos como inibitórios e a menor concentração do antibacteriano, como concentração inibitória mínima (CIM) (BRANDT *et al.*, 2010). A partir desses poços, avaliou-se a ação bactericida, por meio do plaqueamento de 100 μ L em meios sólidos específicos (TABELA 2). A menor concentração do antibacteriano capaz de reduzir 3 log no número de células sobreviventes foi definida como concentração bactericida mínima (CBM) (BECERRIL *et al.*, 2013; BRANDT *et al.*, 2010);
- b) os poços que produziram uma diferença $> 0,05$ na DO_{630} , de 0 a 24 h, tiveram a sua ação antibacteriana mensurada pela determinação do efeito inibitório (EI), através da seguinte equação (BAE *et al.*, 2009; JINDAL *et al.*, 2013a):

$$EI (\%) = \left[\frac{DO_{630} \text{ Controle Positivo} - DO_{630} \text{ Amostra}}{DO_{630} \text{ Controle Positivo}} \right] \times 100 \quad (3)$$

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi utilizada para estudar e comparar o efeito inibitório (%) obtido nos ensaios de atividade antibacteriana, para os diferentes micro-organismos testados, na presença dos fatores tipo de pectina e sua concentração.

Realizou-se uma análise descritiva dos dados, determinando média e desvio-padrão. Em seguida, aplicou-se a análise de variância (ANOVA), empregando um delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2x5, com 10 tratamentos e

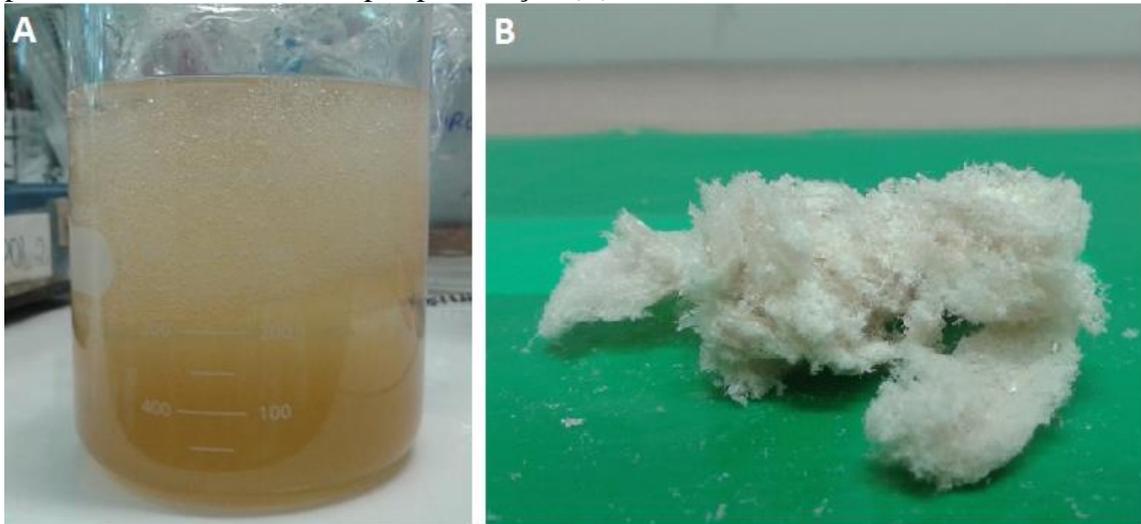
três repetições. Utilizou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas a um nível de 5% de significância ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo software livre R versão 3.2.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, AT).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e rendimento

O método empregado na obtenção da pectina possibilitou a sua extração e o seu isolamento a partir da polpa do noni. Durante a primeira extração, o pH – ajustado inicialmente em 4,0 – não sofreu variação. Porém, durante a segunda e a terceira extração consecutiva, verificaram-se alterações no valor desse parâmetro, que se estabilizou em torno de 5,0. Com a adição do etanol ao extrato, observou-se a precipitação imediata da pectina na forma de um discreto gel visível (FIGURA 7A). Após 24 h em repouso a 4 °C, houve a formação de uma rede polimérica mais firme e de maior volume. O polímero obtido apresentou coloração amarela, sendo clarificado após as etapas de purificação, o que resultou em uma coloração levemente amarelada (FIGURA 7B). O rendimento final em pectina, após a liofilização, foi de $15,01 \pm 0,22\%$ (m/m).

Figura 7 – Precipitação da pectina extraída da polpa do noni pela adição de etanol (A) e pectina do noni liofilizada após purificação (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

A pectina comercial produzida a partir das principais fontes industriais (resíduos cítricos, bagaço da maçã e polpa da beterraba açucareira), geralmente, apresenta coloração branca ou amarelada à levemente marrom (PECTINAS..., 2014). Os rendimentos verificados nos processos de extração desse polímero são muito variáveis e sofrem influência de diversos parâmetros da extração, como pH, tempo e temperatura de extração, concentração do agente

extrator, dentre outros. Além disso, a matéria-prima utilizada como fonte de pectina trata-se de um fator determinante do rendimento a ser alcançado (YAPO, 2009b).

Yuliarti *et al.* (2015) realizaram um estudo com pectina de frutos kiwi gold, obtida por três métodos de extração (ácido, água e enzima), a partir do purê de frutos colhidos em dois estágios de maturação diferentes. Os rendimentos alcançados por esses autores variaram de 1,01-4,39%, sendo os valores mais elevados verificados com o uso da enzima para os frutos com maturação mais avançada. Yapo (2009b), ao extrair pectina de diferentes fontes vegetais com ácido cítrico aquecido (pH 1,8), obteve para a polpa do abacaxi (*Ananas comosus*) um rendimento de 2,8%. Em sua pesquisa com pectina de ameixas japonesas (*Prunus salicina*), Basanta *et al.* (2012) realizaram a extração com água, em diferentes condições de tempo (0,5, 2, 8 e 24 h) e temperatura (ambiente e 95 °C), e verificaram rendimentos variando de 9,2-38,3%. Esses autores observaram que o aumento do tempo de agitação não alterou o rendimento da extração, mas diminuiu ligeiramente o peso molecular das pectinas. Já a utilização de água aquecida aumentou os rendimentos, porém produziu pectinas com menor viscosidade. Ao extrair pectina da polpa do fruto gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg) com ácido cítrico, variando a concentração do ácido (0,5 e 5%) e a temperatura de extração (50 e 100 °C), Santos *et al.* (2010) obtiveram rendimentos de 2,11-5,89%.

Com base nos dados apresentados, pode-se inferir que o fruto do noni representa uma potencial fonte alternativa de pectina. Os parâmetros coloração da pectina e rendimento da extração, verificados nesta pesquisa, estão em concordância com os observados para pectinas de outras fontes alternativas e industriais. Acredita-se que maiores rendimentos em pectina do noni possam ainda ser alcançados através de estudos de otimização, definindo-se a melhor condição dos parâmetros de extração como pH, tempo e temperatura. Vale ressaltar que o agente extrator utilizado também pode afetar o rendimento e as propriedades do polissacarídeo, sendo interessante uma futura aplicação de extratores diversificados e a investigação de suas implicações no processo de extração e nas características do polímero. Esses resultados sugerem uma nova maneira de explorar o potencial do noni, incentivando novos estudos e aplicações desse fruto.

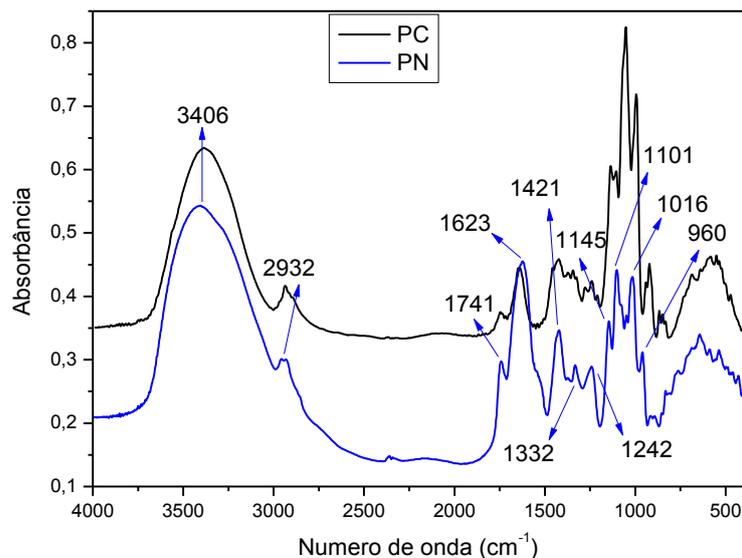
5.2 Caracterização da pectina do noni nativa (PN) e sulfatada (PN-s)

5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

Os espectros no infravermelho das amostras PN e PN-s, assim como o da pectina cítrica comercial (Vetec), são apresentados nas Figuras 8 e 9.

De acordo com a análise da Figura 8, verifica-se que o perfil do espectro e a posição das bandas de absorção da amostra PN se aproximam dos resultados observados para a pectina comercial (PC), o que indica a presença de grupos químicos semelhantes e característicos da molécula de pectina.

Figura 8 – Espectros no infravermelho das amostras PN e PC.



Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PC, pectina cítrica comercial (Vetec).

A partir do espectro da amostra PN (FIGURA 8), foram identificadas as seguintes bandas de absorção: 3406 cm^{-1} (banda larga e forte) correspondente à vibração de estiramento dos grupos O-H; 2932 cm^{-1} referente ao estiramento C-H; 1741 cm^{-1} representando a zona de estiramento da ligação C=O dos grupos carboxílicos esterificados; 1623 e 1421 cm^{-1} correspondentes, respectivamente, ao estiramento assimétrico e simétrico do grupo COO^- ; além das bandas em 1145 , 1101 , 1016 e 960 cm^{-1} referentes às vibrações das ligações glicosídicas C-O e C-C do esqueleto e do anel piranosídico da molécula de pectina

(GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 2000; JINDAL *et al.*, 2013a; MONFREGOLA *et al.*, 2011a). Outras duas bandas observadas em 1332 e 1242 cm^{-1} , de acordo com Jindal *et al.* (2013a), estão relacionadas, respectivamente, à vibração de dobramento O-H e a resíduos de radicais carboxílicos das unidades de ácido urônico.

Acredita-se que, para as pectinas, a absorção na região O-H (3600-2500 cm^{-1}) é devido a hidrogênios inter e intramoleculares ligados ao polímero de ácido galacturônico. Já as bandas ao redor de 2950 cm^{-1} , referentes à absorção C-H, compreendem as vibrações de estiramento e dobramento dos grupos CH, CH₂ e CH₃ que geralmente se sobrepõem à banda O-H (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 2000).

Segundo Cui *et al.* (2007), a região do espectro localizada entre os números de onda 800 e 1200 cm^{-1} é designada como a “impressão digital” dos polissacarídeos. O mesmo é citado por Gnanasambandam e Proctor (2000) que consideram os padrões de absorção entre 1300 e 800 cm^{-1} como a “impressão digital” desses compostos e afirmam que as bandas localizadas nessa região são de difícil interpretação. Para Manrique e Lajolo (2002), a região que identifica e difere os espectros de polissacarídeos estaria entre 950 e 1200 cm^{-1} . Em sua pesquisa, Monfregola *et al.* (2011a) enfatizam que a região de “impressão digital” para pectinas se encontra abaixo de 2000 cm^{-1} e reflete a composição dos monossacarídeos.

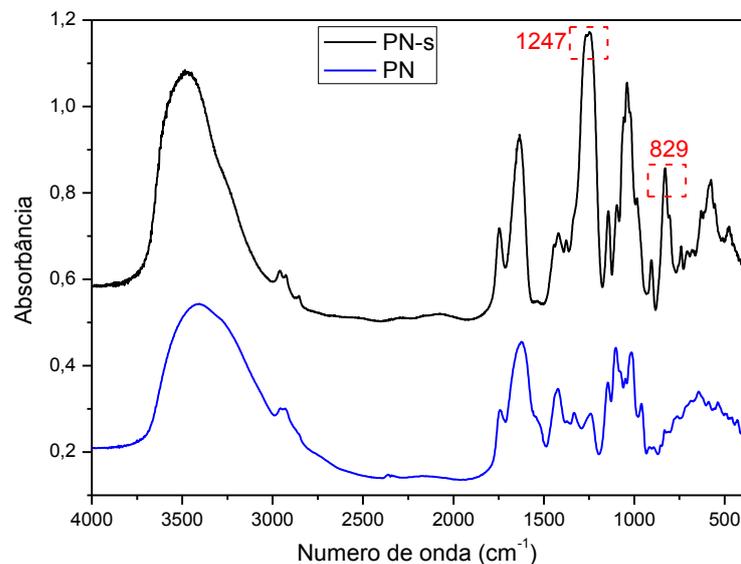
Diante dos dados apresentados, pode-se afirmar que a amostra PN apresenta em sua estrutura a “impressão digital” da pectina, sendo essa região correspondente aos valores encontrados para a amostra PC e aos revelados pelos estudos anteriormente citados. Esses resultados estão de acordo com os alcançados para outras pectinas por diversos autores, o que reforça a natureza e a identidade química do polímero PN.

A análise de FT-IR é uma ferramenta útil para determinar de forma rápida e prática o grau de esterificação (GE) das pectinas em estudo. A região do espectro que compreende o estado dos grupos carboxílicos (1750-1350 cm^{-1}) é a mais interessante e permite essa determinação, identificando esses polímeros (LIMA *et al.*, 2010; MONFREGOLA *et al.*, 2011b). Gnanasambandam e Proctor (2000) verificaram, em seus estudos, que a intensidade e a área da banda do éster carboxílico aumentaram com um maior GE, enquanto que a banda do íon carboxilato diminuiu. Diante destas observações, esses autores chegaram à conclusão que é possível correlacionar as intensidades relativas das bandas localizadas próximo a 1750 cm^{-1} (grupo carboxílico esterificado) e a 1650 cm^{-1} (grupo carboxílico não esterificado ou desprotonado) com o GE da molécula. A partir dessa

correlação, verificou-se que a PN é uma pectina de baixo grau de esterificação ($GE < 50\%$), apresentando 38,34% dos seus grupos carboxílicos esterificados.

Essa análise também foi empregada para verificar a presença do grupo sulfato na estrutura da pectina modificada (FIGURA 9).

Figura 9 – Espectros no infravermelho das amostras PN e PN-s, em destaque, a localização das principais bandas características de grupos sulfato.



Fonte: Elaborada pela autora.
PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

Avaliando os espectros das amostras PN e PN-s, na Figura 9, foi possível identificar cinco novas bandas de absorção na molécula sulfatada, com as principais bandas localizadas em 1247 e 829 cm^{-1} , sendo estes resultados correspondentes aos encontrados por Bae *et al.* (2009) (bandas em 1250 e 810 cm^{-1}). Essas vibrações são características dos modos de estiramento simétrico das ligações C-O-S, associada ao grupo C-O-SO₃ (829 cm^{-1}), e assimétrico do grupo S=O (1247 cm^{-1}), o que evidencia a existência do grupo sulfato na estrutura do polímero e, portanto, que o processo de sulfatação foi satisfatório (BAE *et al.*, 2009; JINDAL *et al.*, 2013b; JUNG *et al.*, 2011; WANG, L. *et al.*, 2009).

As bandas localizadas em 1144 e 1039 cm^{-1} são decorrentes, provavelmente, das vibrações de estiramento assimétrico C-O-S e simétrico S=O. Já as bandas por volta de 575 cm^{-1} , geralmente, aparecem nos espectros de polissacarídeos sulfatados (WANG, L. *et al.*, 2009).

5.2.2 Análise elementar

Os resultados da análise elementar das amostras PN e PN-s são apresentados na Tabela 3. Foi possível verificar a presença de enxofre na amostra PN-s, o que confirma a introdução do grupo sulfato na molécula de pectina e reforça as observações feitas, anteriormente, através da análise dos espectros no infravermelho.

Tabela 3 – Análise elementar e grau de sulfatação (GS) das pectinas PN e PN-s.

Amostra	Composição elementar (%)				GS
	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Enxofre	
PN	35,72	6,29	2,47	nd	-
PN-s	18,69	3,15	0,72	12,51	0,92

Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada; nd, não determinado (< 0,3%).

Como pode ser visto na Tabela 3, a pectina do noni nativa (PN) não apresentou quantidade significativa de enxofre, impossibilitando a determinação do seu teor, pois este elemento encontrava-se abaixo do limite de quantificação (< 0,3%). Já para a amostra sulfatada (PN-s), o conteúdo de enxofre foi de 12,51%. Desta forma, o grau de sulfatação (GS) da PN-s, que designa o número médio de grupos enxofre em cada resíduo de açúcar (LIN *et al.*, 2004), pôde ser calculado (GS = 0,92). Esses resultados evidenciam o sucesso na síntese do derivado sulfatado da pectina do noni.

Os valores do %S e GS encontrados para a pectina derivada (PN-s) superaram os alcançados por Bae *et al.* (2009), no estudo da sulfatação de pectina cítrica, que foram de 2,68% e 0,15, respectivamente. Estudos anteriores com polissacarídeos sulfatados revelaram resultados próximos dos obtidos neste trabalho: Wang, L. *et al.* (2009) obtiveram um GS de 1,29 ao sulfatar o polissacarídeo extraído do farelo de arroz desengordurado; Jindal *et al.* (2013b), ao produzirem derivados sulfatados da goma de *Aegles marmelos*, alcançaram sulfatações que variaram de 0,15-1,94; e Jung *et al.* (2011), que ao produzirem derivados sulfatados de polissacarídeos do cogumelo *Pleurotus eryngii*, relataram teores de enxofre e GS variando de 3,04-12,90% e 0,17-0,98, respectivamente.

O grupo sulfato desempenha um papel importante na bioatividade do polissacarídeo, portanto, o GS é um parâmetro que se faz necessário determinar, pois terá impacto no comportamento e na atividade do polímero. Os diversos valores de GS relatados

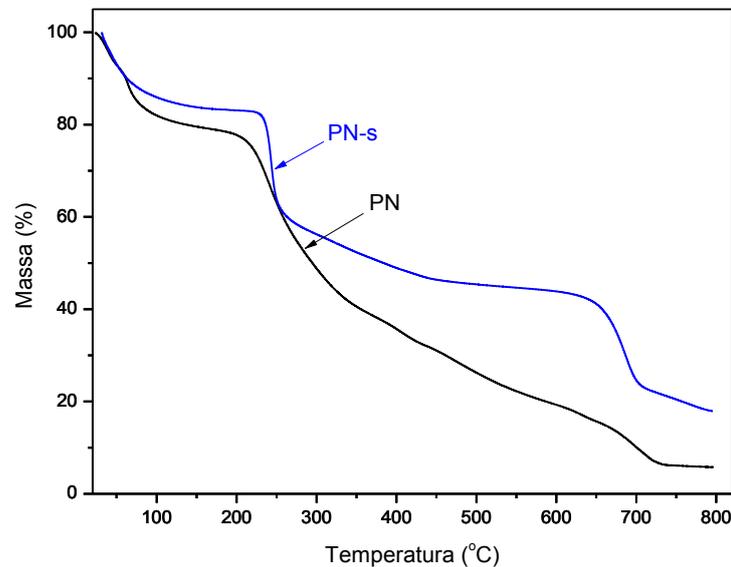
na literatura são determinados por variações nos fatores do processo de sulfatação, como o agente de sulfatação e sua concentração, a razão entre polímero e agente de sulfatação, o tempo e a temperatura da reação (JINDAL *et al.*, 2013b; JUNG *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2003).

Mediante os resultados dessa análise (TABELA 3), observou-se uma redução dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio na amostra PN-s quando comparada à PN. Este resultado pode estar associado a possíveis degradações ocasionadas à molécula de pectina pelo ácido utilizado no processo de sulfatação (WANG, L. *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2003).

5.2.3 Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas (TG) das amostras PN e PN-s são apresentadas na Figura 10, possibilitando avaliar o comportamento térmico das pectinas produzidas e verificar as possíveis alterações, nas etapas de degradação térmica, decorrentes do processo de sulfatação.

Figura 10 – Curvas TG das amostras PN e PN-s.



Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

Condições da análise: aquecimento de 25-800°C a uma taxa de 10°C/min sob atmosfera de N₂.

Através da análise das curvas TG (FIGURA 10), verifica-se que os eventos de perda de massa das pectinas ocorreram em três etapas, sendo os intervalos de temperatura

diferentes entre as amostras. Essa divisão da degradação térmica em etapas já tem sido relatada em trabalhos anteriores e parece ser característica das pectinas (COMBO *et al.*, 2013; EINHORN-STOLL; KUNZEK; DONGOWSKI, 2007; MONFREGOLA *et al.*, 2011b).

Na Tabela 4, são apresentados os intervalos de temperatura em que ocorreram os eventos de degradação térmica das pectinas e suas respectivas perdas de massa (%).

Tabela 4 – Etapas de degradação térmica das amostras PN e PN-s e suas respectivas perdas de massa (%).

Etapas	Faixa de		Perda de massa		Massa resultante	
	temperatura (°C)		(%)		(%)	
	PN	PN-s	PN	PN-s	PN	PN-s
1	25-163	31-187	20,82	16,79	-	-
2	163-593	187-532	59,53	38,31	-	-
3	593-780	532-791	13,80	26,86	-	-
Resíduos	-	-	-	-	5,85	18,04

Fonte: Elaborada pela autora.

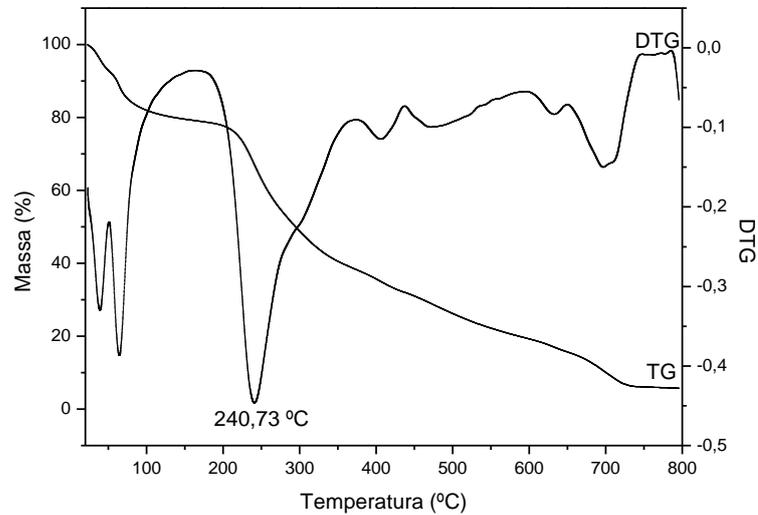
PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

Condições da análise: aquecimento de 25-800 °C a uma taxa de 10 °C/min sob atmosfera de N₂.

Para PN (TABELA 4), a primeira etapa de perda de massa ocorreu de 23-163 °C, relativa à perda de água presente na amostra. A partir dessa região, foi possível determinar o teor de umidade, que foi avaliado em 20,82%. A segunda etapa foi verificada entre 163 e 593°C, sendo a principal região de degradação térmica do polímero, correspondente a uma perda de 59,53% da massa inicial. Esta perda está associada à decomposição pirolítica do polissacarídeo, quando as cadeias de ácido galacturônico começam a sofrer uma forte descarboxilação (primária e secundária), envolvendo o grupo lateral do ácido e um carbono do anel, com a formação de vários produtos gasosos (COMBO *et al.*, 2013; MONFREGOLA *et al.*, 2011b). A terceira etapa, 593-780 °C, corresponde à região de perda de massa lenta, associada à oxidação do resíduo sólido (MONFREGOLA *et al.*, 2011b). O teor de cinzas foi de 5,85% para essa amostra.

Comparando-se os termogramas das amostras PN e PN-s e suas respectivas derivadas (DTG) (FIGURA 11, 12), pode-se perceber algumas mudanças no perfil de degradação térmica da pectina, devido à modificação química.

Figura 11 – Curvas TG/DTG da amostra PN.

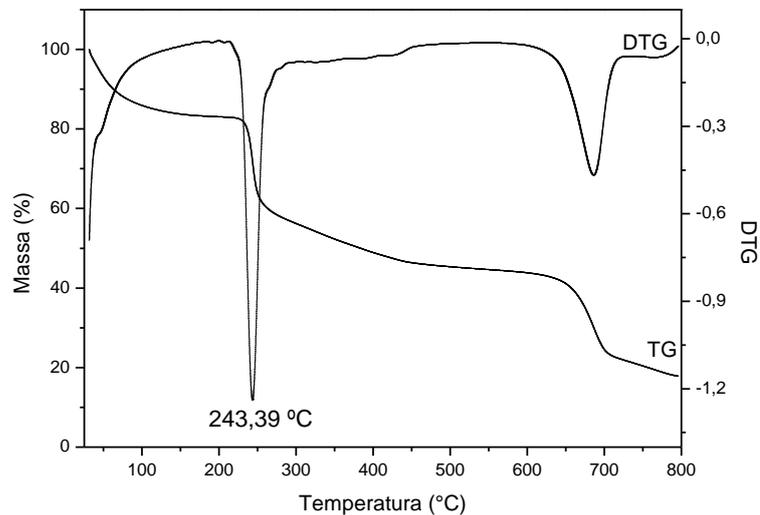


Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa.

Condições da análise: aquecimento de 25-800 °C a uma taxa de 10 °C/min sob atmosfera de N₂.

Figura 12 – Curvas TG/DTG da amostra PN-s.



Fonte: Elaborada pela autora.

PN-s, pectina do noni sulfatada.

Condições da análise: aquecimento de 25-800 °C a uma taxa de 10 °C/min sob atmosfera de N₂.

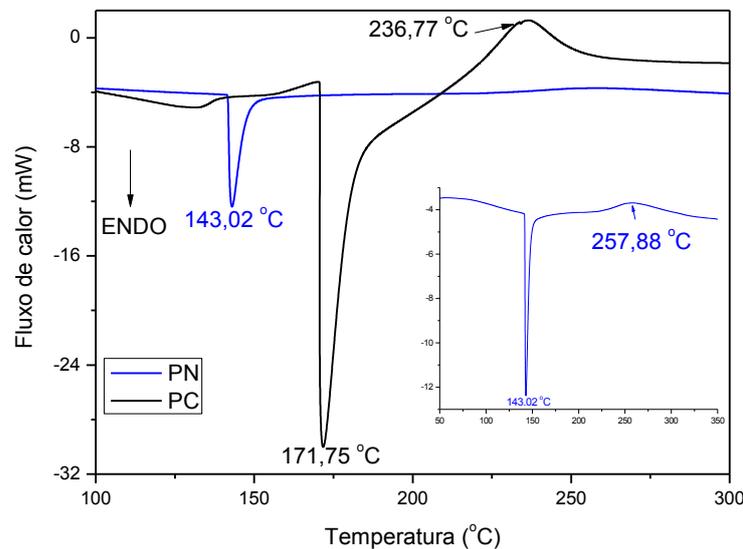
A primeira perda de massa da amostra PN-s, correspondente à perda de água absorvida, ocorreu de 31-187 °C e foi de 16,79% (TABELA 4). No segundo e principal

estágio de degradação, observou-se uma menor perda de massa para essa amostra (38,31%), o que é evidenciado pela presença de um pico mais estreito na DTG (FIGURA 12). Essa etapa iniciou e atingiu o seu máximo de perda em uma temperatura mais elevada do que a verificada para PN (FIGURA 11), demonstrando uma maior estabilidade térmica da pectina derivada. Este resultado pode estar associado à substituição dos grupos carboxílicos por ésteres de sulfato, reduzindo assim a perda desses grupos. Quanto à terceira etapa, uma maior perda de massa foi observada para o polímero modificado, visto que a amostra conseguiu suportar maiores temperaturas, fato já relatado na etapa anterior. Houve um aumento expressivo do teor de cinzas, que passou de 5,85% para 18,05% na amostra sulfatada. Isto deve-se a um maior teor de enxofre na amostra PN-s, decorrente da introdução desse elemento químico pelo processo de sulfatação, como evidenciado pela análise elementar.

5.2.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Na Figura 13, são apresentados os termogramas das amostras PN e PC.

Figura 13 – Curvas de DSC das amostras PN e PC.



Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PC, pectina cítrica comercial (Vetec).

Condições da análise: aquecimento de 25-300 °C a uma taxa de 10°C/min, sob atmosfera de N₂, utilizando alumina como referência.

De acordo com a Figura 13, verifica-se para PN um pico endotérmico a 143,02 °C, devido à remoção de água ligada à amostra, o que já foi apresentado também por TGA

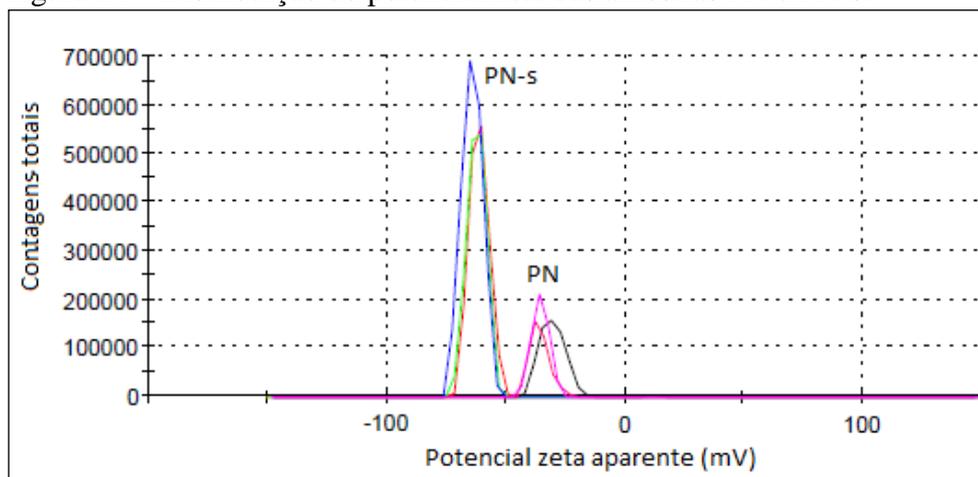
(MONFREGOLA *et al.*, 2011b; WANG *et al.*, 2010). A 257,88 °C, pode-se notar um discreto pico exotérmico, que é referente à principal etapa de decomposição do polissacarídeo (MONFREGOLA *et al.*, 2011b). Os mesmos eventos são observados no termograma da PC, embora os picos encontrem-se com intensidades e temperaturas diferentes, ocorrendo a 171,75 °C e 236,77 °C, respectivamente.

Essas diferenças visíveis entre os termogramas das amostras de pectina do noni nativa e pectina cítrica comercial são esperadas, visto que diferenças na estrutura e grupos funcionais dos polissacarídeos afetam seu comportamento térmico. O surgimento do pico endotérmico a uma temperatura mais elevada para PC sugere uma maior organização entre as unidades que constituem esse polímero (JINDAL *et al.*, 2013a).

5.2.5 Estudo do potencial zeta

Os resultados da análise do potencial zeta das amostras PN e PN-s são apresentados na Figura 14. Por meio desta análise, foi possível medir a magnitude da repulsão ou da atração entre as partículas das pectinas em suspensão, determinando a estabilidade das soluções produzidas com esses polímeros. Verificaram-se também as alterações na carga da molécula decorrentes da modificação química pelo processo de sulfatação.

Figura 14 – Distribuição do potencial zeta das amostras PN e PN-s.



Fonte: Adaptado do gráfico gerado pelo software do equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd).

PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

Em todas as mensurações (FIGURA 14), as pectinas PN e PN-s exibiram potencial zeta negativo, cujos valores médios foram de $-33,60 \pm 3,29$ mV e $-62,40 \pm 1,47$ mV,

respectivamente. Esses resultados revelam a presença de grupos aniônicos nas moléculas, como os grupos carboxilatos (COO^-) e os grupos sulfato, estando em concordância com o observado pelo FT-IR.

Um alto potencial zeta ($> \pm 30$ mV) indica estabilidade elétrica das dispersões coloidais produzidas com esses polissacarídeos, pois há uma repulsão entre as partículas carregadas com conseqüente resistência à agregação e floculação por parte da dispersão (SALES, 2005). O elevado potencial zeta da PN-s pode ser atribuído ao maior caráter eletronegativo dos grupos sulfato adicionados à molécula de pectina, o que leva ao aumento da solubilidade e estabilidade desse polímero em solução (JINDAL *et al.*, 2013c).

A presença de grupos carregados sugere a aplicação desses polímeros em interações do tipo pectina-polímero e pectina-íon (JINDAL *et al.*, 2013a). Isto pode ser verificado na indústria farmacêutica, a fim de modular a liberação de drogas, e na indústria de alimentos, como na produção de geleias de baixo valor calórico e/ou na obtenção de embalagens ativas antimicrobianas, possibilitando a liberação gradativa do composto ativo no alimento e prolongando sua ação conservadora (CANTERI *et al.*, 2012).

5.2.6 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

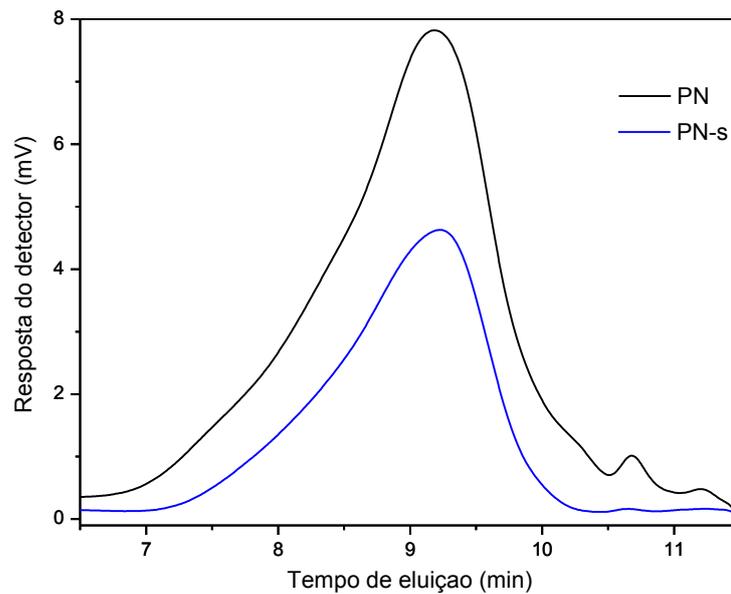
Os perfis de eluição das amostras PN e PN-s, obtidos por GPC, são apresentados na Figura 15, sendo a intensidade do sinal do detector proporcional à concentração das moléculas. Com base nesses perfis, pôde-se determinar a massa molar média das pectinas e sua distribuição.

A amostra PN apresentou um perfil de eluição do tipo polidisperso bimodal, com o primeiro pico, predominante e de alta intensidade, sendo observado em um intervalo de tempo de 6,6-10,5 min (FIGURA 15). Esse pico corresponde ao polímero péctico e representa uma massa molar ponderada média (M_w) de 222,82 kg/mol. A dispersidade determinada para essa amostra foi de 6,54, indicando uma heterogeneidade na distribuição da massa molar das moléculas que constituem o polímero. O segundo pico foi verificado em um tempo de eluição maior ($> 10,5$ min), com menor intensidade e um intervalo mais estreito, indicando baixa concentração e baixa massa molar, estando, provavelmente, associado a açúcares neutros (MASMOUDI *et al.*, 2012).

A massa molar dos polissacarídeos é um parâmetro relevante que tem influência sobre suas atividades biológicas e propriedades funcionais (WANG, L. *et al.*, 2009). Um

polímero é composto por moléculas com diferentes tamanhos, sendo importante determinar a massa molar média e sua distribuição. Resultados próximos aos encontrados nesta pesquisa para a massa molar de pectinas foram obtidos em estudos anteriores (IGLESIAS; LOZANO, 2004; MAAS *et al.*, 2012; MASMOUDI *et al.*, 2012; YAPO *et al.*, 2007b; YAPO, 2009a).

Figura 15 – Perfis de eluição das amostras PN e PN-s obtidos por GPC.



Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

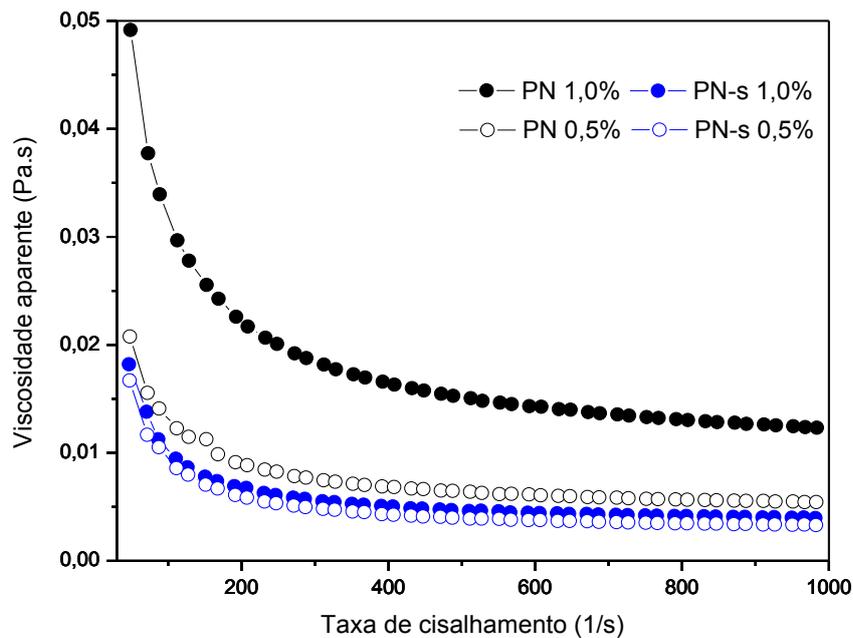
Observando-se os padrões de eluição das pectinas do noni nativa e sulfatada (FIGURA 15), verifica-se que para PN-s há predominância de apenas um pico, cuja eluição ocorreu em um intervalo de 7,0-10,4 min. Essa amostra também apresentou um perfil de eluição do tipo polidisperso, sendo sua M_w de 184,41 kg/mol. Verifica-se uma pequena redução na massa molar da pectina após a modificação química, evento já relatado em pesquisas anteriores, sendo relacionada, possivelmente, à degradação parcial do polímero que acompanha o processo de sulfatação (WANG, L. *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2003). Isto deve-se à forte capacidade de desidratação do ácido, que ocasiona a degradação hidrolítica do polímero, podendo afetar suas cadeias laterais ou até mesmo sua cadeia principal. Dentre os fatores que influenciam a taxa de degradação do polissacarídeo, destacam-se a razão molar entre o agente de sulfatação e o polímero, o tempo de reação e a temperatura empregada (YANG *et al.*, 2003). Para essa amostra, a dispersidade observada foi de 3,85, indicando uma

menor heterogeneidade na distribuição de tamanho das cadeias que constituem a pectina sulfatada.

5.2.7 Comportamento reológico

O comportamento de fluxo das soluções aquosas das pectinas PN e PN-s, nas concentrações de 0,5 e 1,0%, é apresentado na Figura 16. A partir dos resultados desta análise, verificou-se que as diferenças observadas na estrutura química e na massa molar das pectinas influenciaram suas propriedades reológicas.

Figura 16 – Comportamento reológico das soluções aquosas das pectinas PN e PN-s, nas concentrações de 0,5 e 1,0%, a 25 °C.



Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

De acordo com a Figura 16, observa-se que o aumento da concentração do polímero produziu um acréscimo na viscosidade das soluções de pectina, sendo mais expressivo para a amostra nativa, pois o polissacarídeo sulfatado demonstrou resultados próximos em ambas as concentrações, diferenciando-se apenas em baixas taxas de cisalhamento.

A sulfatação da pectina promoveu uma diminuição de sua viscosidade, sendo mais evidente ao se comparar o comportamento reológico das soluções a 1,0% (FIGURA 16). Isto pode ser atribuído à adição de grupos sulfato ao polímero, os quais alteraram a estrutura da molécula e aumentaram a densidade de cargas negativas – aumento do caráter eletronegativo – como já verificado pelo potencial zeta, o que, possivelmente, ocasionou uma maior repulsão entre as moléculas de pectina em solução e, conseqüentemente, promoveu a redução de sua viscosidade. Além disso, a diferença de viscosidade entre as amostras PN e PN-s foi também influenciada pela massa molar, que foi observada ser menor para a pectina sulfatada, alterando suas propriedades e aplicações (BAE *et al.*, 2009; JINDAL *et al.*, 2013a).

As pectinas são moléculas que sofrem intumescimento na presença de água e apresentam elevada viscosidade. A viscosidade das soluções desses polímeros é influenciada por sua concentração, densidade de cargas e massa molar, assim como pôde ser visto anteriormente (CANTERI *et al.*, 2012).

Em todos os perfis reológicos apresentados (FIGURA 16), percebe-se a diminuição da viscosidade das soluções de pectina em decorrência do aumento da taxa de cisalhamento. Esse perfil é característico de comportamento do tipo pseudoplástico. A diminuição da viscosidade a altas taxas de cisalhamento pode ser atribuída à redução do número de interações entre as macromoléculas hidratadas, ou seja, o aumento da taxa do movimento empregado supera a taxa de formação de interações entre as cadeias do polímero (BASANTA *et al.*, 2012; NEP; CONWAY, 2010).

5.2.8 Quantificação de proteínas

O teor de proteínas determinado para as amostras PN e PN-s foi de $0,16 \pm 0,03\%$ e $0,06 \pm 0,02\%$ (m/m), respectivamente. Tendo em vista que o fruto do noni cultivado no estado do Ceará tem apresentado, em sua composição, uma média de 1,06% de proteínas (CORREIA *et al.*, 2011) e comparando os valores obtidos aos relatados para pectinas de diferentes fontes de extração, pode-se considerar baixo o percentual de proteínas observado nas amostras de pectina do noni.

Resultados superiores aos encontrados neste estudo são reportados na literatura. Teores de proteínas variando de 1,8-3,8% (m/m) foram relatados para pectina extraída da casca do maracujá amarelo (YAPO, 2009a), enquanto que, na pectina obtida da polpa da beterraba açucareira, esses teores variaram de 0,9-8,6% (YAPO *et al.*, 2007a). A pectina

extraída da casca do cacau, por processo otimizado com ácido nítrico, apresentou um percentual de proteínas de $3,6 \pm 1,8\%$ (VRIESMANN; TEÓFILO; PETKOWISCZ, 2011), sendo verificado, para as pectinas extraídas de subprodutos do processamento de limão, valores variando de 1,2-8,7% (m/m) (MASMOUDI *et al.*, 2012). No estudo com pectina cítrica comercial, Mesbahi, Jamalian e Farahnaky (2005) relataram um teor de proteínas de 1,1%.

A quantificação de proteínas é um parâmetro importante na caracterização de pectinas, pois as moléculas proteicas, de acordo com Kravtchenko *et al.* (1992) e Garna *et al.* (2007), podem estar ligadas ao polissacarídeo ou na forma livre. Em seus estudos, Masmoudi *et al.* (2012) verificaram que os menores teores de proteínas foram obtidos para as pectinas extraídas em condições extremas, demonstrando uma pureza mais elevada para essas amostras. Portanto, o baixo teor de proteínas encontrado nas pectinas do noni pode ser relacionado à pureza dessas macromoléculas, demonstrando que os procedimentos de extração, recuperação e purificação empregados foram seletivos.

O processo de sulfatação reduziu a quantidade de proteínas presentes na amostra de pectina do noni. Esse resultado pode estar relacionado à degradação promovida pelo ácido clorossulfônico, que afetou não só o polímero péctico, mas também a matéria proteica, cujos resíduos foram eliminados, posteriormente, na etapa de purificação.

5.3 Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana da pectina do noni nativa (PN) e sulfatada (PN-s)

Na Tabela 5, são apresentados os percentuais do efeito inibitório produzido por cada amostra de pectina (PN e PN-s), nas diferentes concentrações avaliadas (variando de 2 a 10 mg/mL), frente às cepas bacterianas de teste escolhidas: Gram positivas, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*; Gram negativas, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Os valores de inibição alcançados revelam que ambas as pectinas do noni não conseguiram inibir totalmente o crescimento das bactérias em estudo (TABELA 5). Porém, deve-se levar em consideração que, para alguns micro-organismos testados, foram obtidas inibições acima de 80%, como verificado para *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 5 – Efeito inibitório (%) das amostras PN e PN-s contra cinco cepas bacterianas.

Amostra	Concentração (mg/mL)	Efeito inibitório (%) ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾				
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		ATCC 19115	ATCC 25923	IAL 1132	ATCC 25922	IAL 1026
PN	2	20,77 ± 0,20 ^{bA}	4,27 ± 0,57 ^{aA}	6,00 ± 1,48 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}
	4	12,42 ± 1,92 ^{aA}	20,55 ± 1,14 ^{bA}	27,85 ± 1,39 ^{bA}	9,67 ± 1,08 ^{bA}	30,48 ± 1,35 ^{bA}
	6	37,83 ± 1,60 ^{cA}	41,33 ± 1,30 ^{cA}	34,86 ± 2,06 ^{cA}	25,34 ± 1,39 ^{cA}	41,57 ± 1,81 ^{cA}
	8	54,42 ± 1,13 ^{dA}	66,11 ± 0,82 ^{dA}	47,90 ± 0,95 ^{dA}	60,15 ± 0,34 ^{dA}	53,59 ± 2,35 ^{dA}
	10	73,63 ± 1,78 ^{eA}	77,08 ± 3,12 ^{eA}	63,84 ± 1,26 ^{eA}	80,60 ± 0,91 ^{eA}	82,97 ± 1,84 ^{eA}
PN-s	2	11,66 ± 1,08 ^{aB}	0,00 ± 0,00 ^{aB}	0,57 ± 0,03 ^{aB}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	5,50 ± 0,62 ^{aB}
	4	12,26 ± 1,92 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aB}	6,35 ± 0,08 ^{bB}	0,00 ± 0,00 ^{aB}	15,06 ± 0,99 ^{cB}
	6	18,51 ± 0,91 ^{bB}	5,07 ± 0,31 ^{bB}	15,01 ± 1,23 ^{cB}	1,64 ± 0,15 ^{aB}	10,94 ± 0,27 ^{bB}
	8	25,69 ± 1,91 ^{cB}	10,70 ± 1,82 ^{cB}	19,70 ± 0,57 ^{dB}	8,80 ± 0,52 ^{bB}	29,29 ± 0,87 ^{dB}
	10	26,45 ± 0,85 ^{cB}	26,25 ± 1,95 ^{dB}	18,99 ± 1,35 ^{dB}	10,99 ± 0,64 ^{cB}	28,39 ± 1,02 ^{dB}

Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

Nota: ⁽¹⁾ Os valores representam médias ± desvio padrão (n = 3);

⁽²⁾ Em cada coluna, pelo Teste de Tukey, letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as concentrações (p < 0,05) fixando o tipo de pectina;

⁽³⁾ Em cada coluna, pelo Teste de Tukey, letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as pectinas (p < 0,05) fixando a concentração.

Os resultados do teste de microdiluição em caldo demonstraram que nenhuma das pectinas, nas concentrações avaliadas, produziu uma diferença na densidade óptica (DO_{630}), de 0 a 24 h, menor do que 0,05, valor este recomendado por Brandt *et al.* (2010). Portanto, não foi possível determinar as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) das amostras PN e PN-s, sendo talvez necessária uma concentração mais elevada desses polímeros. Concentrações superiores a 10 mg/mL não foram testadas devido ao comportamento viscoso característico das soluções de pectinas.

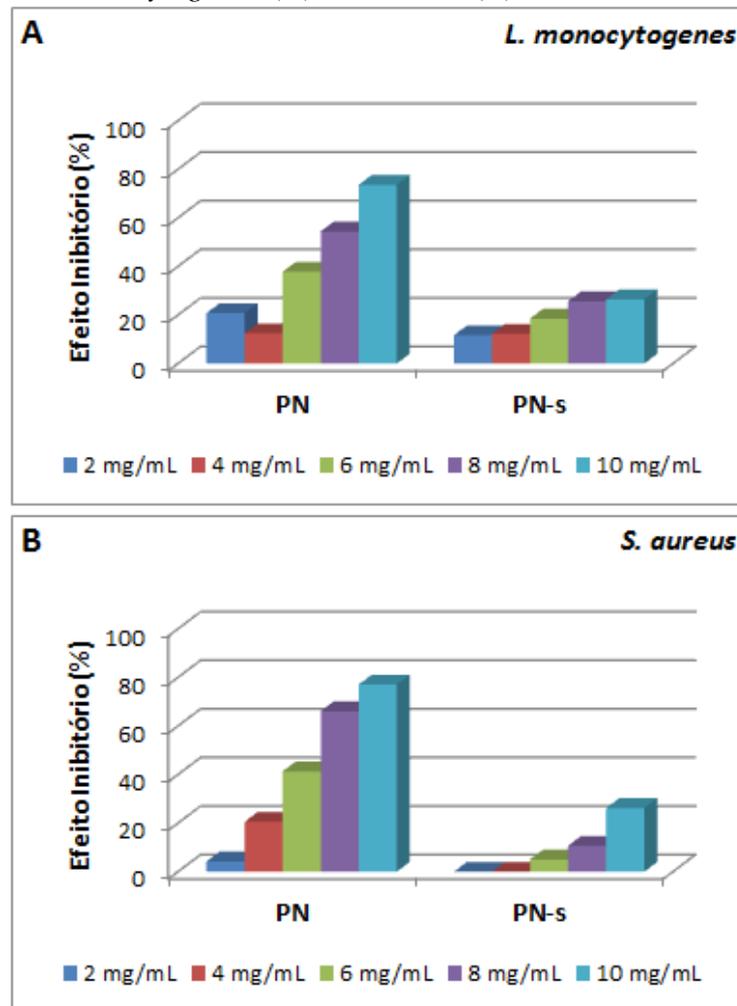
Com base nos dados contidos na Tabela 5, elaboraram-se as Figuras 17 e 18, que relacionam graficamente o efeito inibitório das amostras de pectina (PN e PN-s) frente aos dois grupos de bactérias de teste: Gram positivas e Gram negativas.

No geral (FIGURA 17, 18), verifica-se que a amostra PN exibiu um efeito antibacteriano significativamente superior a PN-s ($p < 0,05$) em todas as concentrações e para todos os patógenos testados, exceto a: 4 mg/mL para *L. monocytogenes*, cujos valores de inibição produzidos pelos dois tipos de pectina não apresentaram diferença significativa (~12%); 2 mg/mL para *P. aeruginosa*, concentração na qual a PN-s desempenhou melhor efeito inibitório; e 2 mg/mL para *E. coli*, concentração em que ambas as pectinas não inibiram o seu crescimento.

A ação antibacteriana das pectinas apresentou uma tendência a aumentar com o aumento da concentração do polímero em solução, demonstrando ser dose-dependente, exceto em alguns casos, como a 4 mg/mL da amostra PN para *L. monocytogenes* e a 6 mg/mL da amostra PN-s para *P. aeruginosa*, situações em que houve uma redução da inibição quando comparada à concentração imediatamente anterior (FIGURA 17, 18).

Em relação às bactérias Gram positivas (FIGURA 17), a amostra PN exibiu maior atividade inibitória a 10 mg/mL ($p < 0,05$), sendo de 73,63% para *L. monocytogenes* e de 77,08% para *S. aureus*. Na menor concentração testada (2 mg/mL), a *L. monocytogenes* demonstrou-se mais sensível à ação da PN do que *S. aureus*. Quanto à amostra PN-s, esta foi mais efetiva contra *L. monocytogenes*. Nas duas menores concentrações avaliadas (2 e 4 mg/mL), a PN-s não conseguiu inibir o crescimento do *S. aureus*, enquanto que os percentuais de inibição alcançados contra *L. monocytogenes* não diferiram entre si a um nível de 5% de significância (~12%). Além disso, essa pectina apresentou ação significativamente superior a 10 mg/mL ($p < 0,05$), assim como observado para PN, com inibições de 26,45% e 26,25% para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente.

Figura 17 – Atividade antibacteriana das amostras PN e PN-s contra *L. monocytogenes* (A) e *S. aureus* (B).



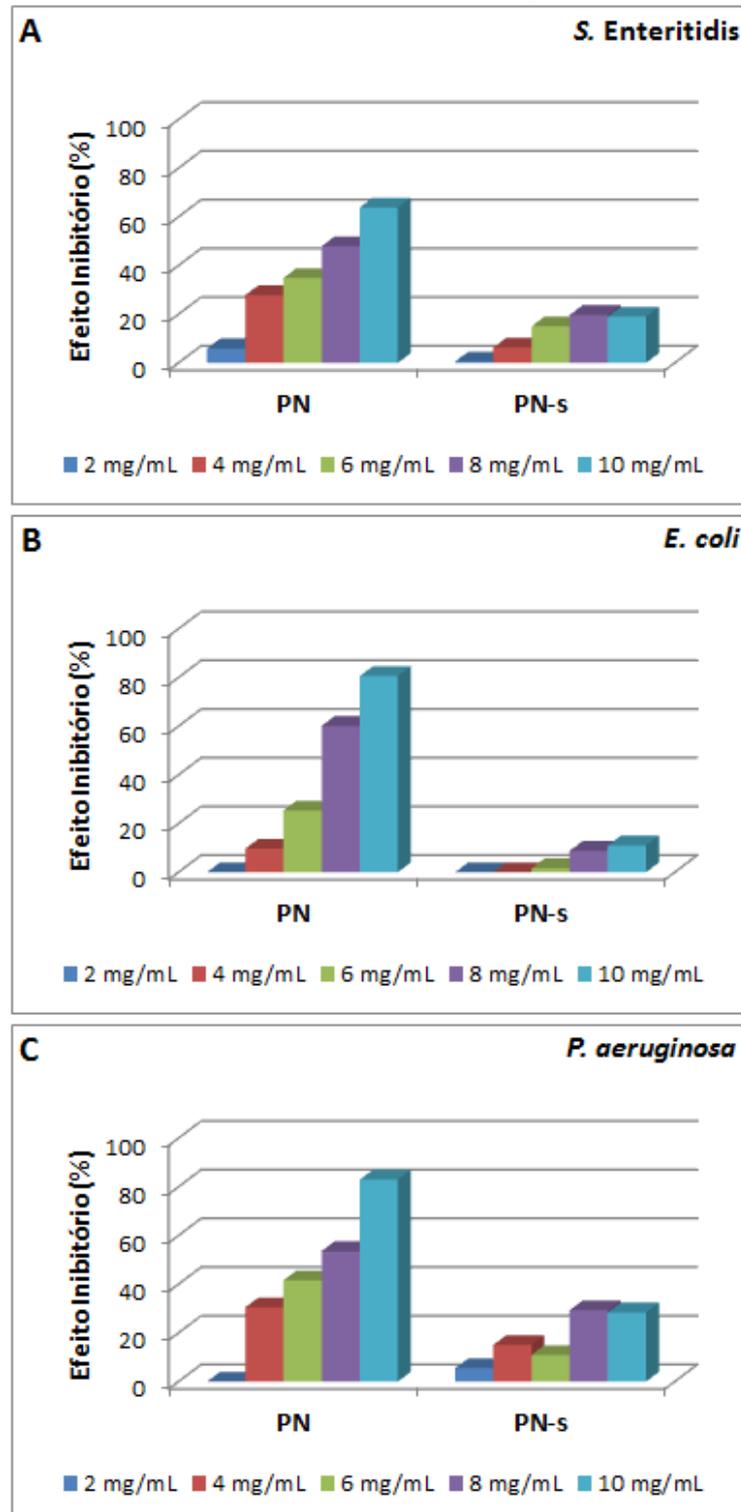
Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

Para as bactérias Gram negativas (FIGURA 18), a PN também foi mais efetiva na concentração de 10 mg/mL ($p < 0,05$). A maior atividade foi verificada contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo as inibições de 80,60% e 82,97%, respectivamente, superando os valores observados para as bactérias Gram positivas e para *S. Enteritidis* (63,84%). A solução de 2 mg/mL da PN não demonstrou nenhuma ação sobre *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo que para *S. Enteritidis* foi alcançada uma inibição de 6,00%. Em relação à PN-s, os maiores percentuais de inibição foram obtidos nas concentrações de 8 e 10 mg/mL contra *S. Enteritidis* (19,70% e 18,99%) e *P. aeruginosa* (29,29% e 28,39%). Nestas concentrações, os valores de inibição estão bem próximos e estatisticamente não diferiram entre si ($p < 0,05$). Assim como foi verificado para *S. aureus*, as concentrações de 2 e 4 mg/mL da PN-s não apresentaram efeito inibitório contra *E. coli*, enquanto que a solução de 2 mg/mL produziu uma inibição muito

baixa contra *S. Enteritidis* (0,57%). A *E. coli* foi a bactéria que demonstrou menor sensibilidade a PN-s em todas as concentrações testadas.

Figura 18 – Atividade antibacteriana das amostras PN e PN-s contra *S. Enteritidis* (A), *E. coli* (B) e *P. aeruginosa* (C).



Fonte: Elaborada pela autora.

PN, pectina do noni nativa; PN-s, pectina do noni sulfatada.

A pectina extraída do fruto de *Aegle marmelos* (BFP), de baixa esterificação (47,20%) e peso equivalente de $1,209 \times 10^3$, exibiu atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* e *E. coli*, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, e teve sua ação comparada à pectina cítrica comercial (HiMedia Laboratories Ltda., Mumbai, Índia). As maiores inibições foram produzidas pela BFP, que demonstrou ser mais efetiva contra *E. coli* em todas as concentrações testadas. Inibições em torno de 20 e 40% foram alcançadas contra *B. cereus* e *E. coli*, respectivamente, a 2 mg/mL de BFP, enquanto que a pectina cítrica comercial produziu inibições próximas a 15 e 25% nas mesmas condições (JINDAL *et al.*, 2013a). Comparando esses dados com os resultados obtidos nesta pesquisa, verifica-se que a PN a 2 mg/mL, ao contrário do que foi observado por Jindal *et al.* (2013a), não teve ação contra *E. coli*, mas produziu inibição de 20,77% contra *L. monocytogenes*, além de agir também contra *S. Enteritidis* (6,00%) e *S. aureus* (4,27%).

Em um estudo anterior, Bae *et al.* (2009) realizaram a sulfatação da pectina cítrica comercial (CPKelco, Alemanha) de alta metoxilação (70%) e avaliaram o efeito dessa modificação química na atividade antibacteriana do polímero. Foram testadas as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL das pectinas nativa e sulfatada. A pectina sulfatada, com 2,68% de enxofre e grau de sulfatação (GS) de 0,15, apresentou melhor atividade inibitória do que a nativa, exceto a 0,5 mg/mL para *B. cereus*. Foram alcançadas inibições de 20 e 58% contra *B. cereus* KACC 10001 e *Vibrio fischeri* KACC 11254, respectivamente, a 2,0 mg/mL da pectina modificada. Verificou-se que a sulfatação aumentou a capacidade da pectina cítrica em inibir o crescimento dos micro-organismos de teste, sendo esta ação mais efetiva contra *V. fischeri*.

Na presente pesquisa, o processo de sulfatação da pectina do noni reduziu a sua ação antibacteriana, resultado oposto ao encontrado por Bae *et al.* (2009). É importante ressaltar que o teor de enxofre e o GS da pectina do noni derivada foram superiores aos relatados por esses autores, sendo de 12,51% e 0,92, respectivamente. Estas características têm impacto no comportamento e atividade do polímero (JUNG *et al.*, 2011) e podem ter sido as responsáveis pela menor ação da PN-s. A maior densidade de cargas negativas da amostra PN-s pode ter causado a redução de sua interação com a superfície da parede celular bacteriana. Além disto, foram testadas cepas de micro-organismos distintas das utilizadas nos estudos anteriormente citados, o que também têm influência sobre o resultado, visto que cada organismo apresenta uma sensibilidade diferente aos agentes antibacterianos.

A modificação por sulfatação tem sido também realizada em outros polissacarídeos. Quitosana de alta massa molar ($4,6 \times 10^5$ g/mol) e 82% de desacetilação foi sulfatada, apresentando 9,03% de enxofre e GS de 0,67 (PIRES *et al.*, 2013). O seu efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano foi avaliado contra *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 9027. A quitosana modificada, na maior concentração testada (0,3%, m/v), não foi capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos, quando comparado ao controle. De acordo com os autores, o peso molecular e o grau de sulfatação podem ter afetado a ação do polímero, sendo necessária, provavelmente, uma redução dos valores desses parâmetros para conferir ação à quitosana.

Chen, Liao e Tsai (1998 *apud* PIRES *et al.*, 2013) verificaram o efeito do aumento do teor de enxofre no derivado de quitosana. Com baixo teor de enxofre (0,63%), a quitosana modificada apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) contra as bactérias *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella Typhimurium* e *Bacillus cereus* menor do que a obtida para a quitosana desacetilada (69% de desacetilação). Quando o percentual de enxofre, presente na molécula, sofreu um aumento (13,03%), afetou negativamente o seu efeito antibacteriano.

Com base no que foi exposto, demonstra-se que a pectina, polímero naturalmente encontrado nos vegetais superiores, apresenta ação inibitória contra diversas bactérias de relevância para a saúde pública e segurança de alimentos. O efeito inibitório produzido por esse polímero é variável, diferenciando-se entre as várias pectinas disponíveis, estando ligado às características particulares de cada molécula.

As modificações químicas dos polissacarídeos surgem como alternativa para aprimorar suas atividades biológicas. A sulfatação da pectina, modificação abordada neste estudo, pode aumentar a sua ação antibacteriana, como foi verificado por Bae *et al.* (2009). Mas não se sabe até que nível de GS essa ação será potencializada, pois, como foi visto através desta pesquisa, um maior GS produziu efeito negativo, resultado contrário ao verificado por outros autores, de acordo com a literatura consultada. Segundo Bae *et al.* (2009), além das modificações produzidas na estrutura química do polímero pela sulfatação, outros fatores podem, possivelmente, afetar a atividade antibacteriana, como o tipo de organismo alvo e o peso molecular. Vale ressaltar que a densidade de cargas presente no polímero, a distribuição e a localização dos grupos funcionais também têm impacto sobre suas propriedades biológicas.

O mecanismo de ação dos polissacarídeos é complexo e ainda não está bem esclarecido (FAN *et al.*, 2012). Acredita-se que a ação antibacteriana esteja relacionada com os receptores do peptídeoglicano e os ligantes das células alvo, havendo uma interação entre os grupos funcionais do polímero e os constituintes da parede celular das bactérias (lipopolissacarídeos, peptídeoglicano e proteínas citoplasmáticas). Isto pode ocasionar uma alteração na permeabilidade da célula bacteriana, acarretando a perda de constituintes citoplasmáticos e a consequente morte celular (ANDERSON *et al.*, 2002; FAN *et al.*, 2012). Além disso, o comportamento fisiológico do organismo alvo tem grande contribuição na suscetibilidade ao antimicrobiano, pois como foi observado, tanto as bactérias Gram positivas quanto as Gram negativas apresentaram sensibilidades diferentes.

Mais estudos envolvendo a aplicação das pectinas como agentes antibacterianos são necessários, a fim de elucidar os seus mecanismos de ação e determinar os possíveis fatores que podem interferir na eficácia dessa atividade biológica.

6 CONCLUSÕES

- O fruto do noni apresenta potencial para ser utilizado como fonte de pectina, pois através do método de extração empregado nesta pesquisa, pôde-se obter pectina de baixa esterificação ($GE = 38,34\%$) e de alta massa molar ($222,82 \text{ kg/mol}$), com rendimento médio (15%) compatível a fontes industriais, como bagaço da maçã e polpa da beterraba açucareira;
- A sulfatação da pectina do noni promoveu alterações em sua estrutura e composição, as quais afetaram suas características químicas e reológicas. O polímero sulfatado exibiu maior caráter eletronegativo e menor massa molar, o que contribuiu para o aumento da solubilidade em meio aquoso e para a produção de dispersões coloidais mais estáveis. Conseqüentemente, houve redução da viscosidade, com ambos os polímeros apresentando comportamento pseudoplástico. Além disso, verificou-se um aumento da estabilidade térmica da pectina após a sulfatação;
- As pectinas do noni, nativa (PN) e sulfatada (PN-s), apresentaram atividade antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* Enteritidis. No entanto, não foi possível observar a ação bactericida dos polímeros frente a esses micro-organismos;
- A pectina do noni nativa demonstrou-se mais efetiva do que a sulfatada, em todas as concentrações testadas (2 a 10 mg/mL), apresentando efeitos inibitórios mais expressivos, a 10 mg/mL, frente a *E. coli* ($80,60\%$) e *P. aeruginosa* ($82,97\%$);
- O processo de sulfatação afetou negativamente a ação antibacteriana da pectina do noni, ocasionando perdas em sua atividade. Os maiores percentuais de inibição produzidos pelo polímero sulfatado foram observados para *L. monocytogenes* ($26,45\%$), *S. aureus* ($26,25\%$) e *P. aeruginosa* ($28,39\%$), a 10 mg/mL.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Diante da crescente demanda por pectina, o noni surge como uma fonte alternativa de obtenção desse polímero, podendo ser alcançados maiores rendimentos, acima do verificado nesta pesquisa, através de estudos de otimização do processo de extração. Alguns fatores podem ser trabalhados na otimização desse processo, a fim de maximizar o rendimento em pectina, como variações no pH, tempo e temperatura de extração, e força do agente extrator (concentração);
- O grau de sulfatação (GS) do polímero derivado pode influenciar a sua ação antibacteriana, intensificando-a ou até mesmo reduzindo-a. Neste sentido, pesquisas podem ser conduzidas com o intuito de produzir e avaliar a atividade antibacteriana de derivados da pectina do noni com diferentes valores de GS, e assim possibilitar uma correlação da atividade biológica do polímero com essa característica química;
- Embora não tenha sido verificada uma potencialização da ação antibacteriana da pectina do noni pelo processo de sulfatação, o polímero demonstrou-se facilmente modificável. Outras modificações químicas, como a quaternização e a funcionalização com ácidos graxos naturais, surgem como possibilidade para a melhoria dessa propriedade biológica da pectina, podendo ser aplicadas e investigados os seus efeitos;
- O mecanismo de ação antibacteriana da pectina parece ser complexo e sua atividade variável, sendo os estudos dessa propriedade ainda escassos, necessitando de maiores investigações. Acredita-se que a massa molar, as características fisiológicas do organismo alvo, a densidade de cargas e sua distribuição são possíveis fatores capazes de afetar a sua eficácia contra os micro-organismos, podendo ser investigadas diferentes variações desses parâmetros;
- Pesquisas podem ser desenvolvidas a fim de avaliar o potencial de toxicidade da pectina do noni sobre organismos vivos e sistemas biológicos, através de testes toxicológicos *in vitro* e/ou *in vivo*. Os resultados desses ensaios poderão possibilitar a aplicação do polímero pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos, caso seja comprovada a sua segurança de uso.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Informe Técnico nº 25, de 29 de maio de 2007**. Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança realizadas de produtos contendo *Morinda citrifolia*, também conhecida como Noni. 2007. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/bjU>>. Acesso em: 09 abr. 2015.
- AGENTES antimicrobianos. **Food Ingredients Brasil**, v. 12, n. 15, 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2014.
- ANDERSON, R. A. *et al.* Preclinical evaluation of sodium cellulose sulfate (ushercell) as a contraceptive antimicrobial agent. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 3, 2002.
- APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, n. 2, p. 113-126, 2002.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4. ed. atual. e ampl. Viçosa, MG: UFV, 2008. 596 p.
- AZEREDO, H. M. C. *et al.* (ed.). **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 195 p.
- BAE, I. Y. *et al.* Effect of sulfation on the physicochemical and biological properties of citrus pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1980-1983, 2009.
- BARRERA, A. M. *et al.* Effect of pectins on the gelling properties of surimi from silver carp. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 5, p. 441-447, 2002.
- BASANTA, M. F. *et al.* Effect of extraction time and temperature on the characteristics of loosely bound pectins from Japanese plum. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 230-235, 2012.
- BASAR, S. *et al.* Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 38-42, 2010.
- BECERRIL, R. *et al.* Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 404-408, 2013.
- BHARDWAJ, A.; BALLAL, S.; VELMURUGAN, N. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of natural extracts of *Morinda citrifolia*, papain and aloe vera (all in gel formulation), 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide, against *Enterococcus faecalis*: an *in vitro* study. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 15, n. 3, p. 293-297, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados Epidemiológicos: DTA período de 2000 a 2013**. 2013. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_perodo_2000_2011_site.pdf>. Acesso em: 15 maio 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de**

doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 28 out. 1997. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/mh>>. Acesso em: 07 dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA.** Agosto de 2014. Disponível em: <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDT, A. L. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* by food antimicrobials applied singly and in combination. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. M557-M563, 2010.

BRITO, D. R. B. *et al.* Atividade anti-helmíntica dos extratos aquoso e etanólico do fruto da *Morinda citrifolia* sobre *Ascaridia galli*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 32-36, 2009.

BRITO, M. C. **Contaminação de alimentos: o perigo mora em casa.** 2010. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/bFtL>>. Acesso em: 05 fev. 2015.

BROWN, A. C. Anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit: a review. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 10, p. 1427-1440, 2012.

BUI, A. K. T.; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1271-1275, 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 162-167, 2003.

CANTERI, M. H. G. *et al.* Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – Foodborne Diseases

Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 62, n. 15, p. 283-287, 2013.

CHAN-BLANCO, Y. *et al.* The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 645-654, 2006.

CHAN-BLANCO, Y. *et al.* The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.): Microbiological flora and antioxidant compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 9, p. 1710-1716, 2007.

CHUNHIENG, T. **Développement de nouveaux nutraceutiques à partir de graines et fruits d'origine tropicale**: application a la noix du Brésil *Bertholettia excelsa* et au fruit de Cambodge *Morinda citrifolia*. 2003. 181 f. Thèse (Docteur es Procédés biotechnologiques et alimentaires) – Centro de Sciences, Université de Nancy, France, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Seventh Edition. CLSI document M7-A7 [ISBN 1-56238-587-9]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex general standard for food additives**. Codex stan 192-1995. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/gsfonline/docs/CXS_192e.pdf>. Acesso em: 07 out. 2014.

COMBO, A. M. M. *et al.* Characterization of sugar beet pectic-derived oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 52, p. 148-156, 2013.

CORREIA, A. A. S. **Maceração enzimática da polpa de noni (*Morinda citrifolia* L.)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

CORREIA, A. A. S. *et al.* Caracterização química e físico-química da polpa do noni (*Morinda citrifolia*) cultivado no estado do Ceará. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 4, p. 609-615, 2011.

COSTA, A. B. *et al.* Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do noni (*Morinda citrifolia* Linn). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 345-354, 2013.

CUI, S. W. *et al.* Characterisation and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. *senegal* with enhanced properties (*Acacia (sen) SUPERGUM™*): Part 4. Spectroscopic characterisation of *Acacia senegal* var. *senegal* and *Acacia (sen) SUPERGUM™* arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 3, p. 347-352, 2007.

DELAQUIS, P. J. *et al.* Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 101-109, 2002.

DENG, S. *et al.* Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of Noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 5, p. 859-862, 2007.

DENG, S.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 267-270, 2010.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DOSSIÊ conservantes. **Food Ingredients Brasil**, v. 13, n. 18, 2011. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/186.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

DOSSIÊ gelificantes. **Food Ingredients Brasil**, n. 27, 2013. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/349.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2015.

DUSSOSSOY, E. *et al.* Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Rican noni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 108-115, 2011.

EINHORN-STOLL, U.; KUNZEK, H.; DONGOWSKI, G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1101-1112, 2007.

ELKINS, R. **Noni (*Morinda citrifolia*): la hierba preciada del pacífico sur**. Pleasant Grove: Woodland Publishing, 1997. 31 p.

ESPITIA, P. J. P. *et al.* Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 287-296, 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. **The EFSA Journal**, v. 11, n. 4, 2013. 250p.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion on a request from the Commission related to the safety of noni juice (juice of the fruits from *Morinda citrifolia*). **The EFSA Journal**, v. 376, p. 1-12, 2006.

FAN, L. *et al.* Preparation and characterization of a quaternary ammonium derivative of pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 707-712, 2012.

FERNANDEZ, M. L. *et al.* Citrus pectin and cholesterol interact to regulate hepatic cholesterol homeostasis and lipoprotein metabolism: a dose-response study in guinea pigs. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 59, n. 4, p. 869-878, 1994.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Framework for the Provision of Scientific Advice on Food Safety and Nutrition**. Roma: FAO/WHO, 2007. 39p. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1296e/a1296e00.pdf>>. Acesso em: 25 dez. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **INFOSAN activity report 2011-2012**.

Geneva: WHO, 2013. 39p. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85360/1/9789241505505_eng.pdf>. Acesso em: 25 dez. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook**. Second Edition. 2012. 264 p. Disponível em:<<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Part 184 – Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. Subpart B – Listing of specific substances affirmed as GRAS, 184.1588-pectin-sAvailable**. 2013. Disponível em:

<<http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c¼ecfr&sid¼4786bafc6f6343634fbf79 fcdca7061e1&rgn¼div5&view¼text&node¼21:3.0.1.1.14&idno¼2>>. Acesso em: 26 jan. 2015.

GARNA, H. *et al.* Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. C001-C009, 2007.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 2008. 511 p.

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

GÓMEZ, L. *et al.* Polyelectrolyte complex formation mediated immobilization of chitosan-invertase neoglycoconjugate on pectin-coated chitin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 28, n. 6, p. 387-395, 2006.

GOULD, G. W. Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 51-64, 1996.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

IGLESIAS, M. T.; LOZANO, J. E. Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, v. 62, n. 3, p. 215-223, 2004.

JAINKITTIVONG, A.; BUTSARAKAMRUHA, T.; LANGLAIS, R. P. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 108, n. 3, p. 394-398, 2009.

JINDAL, M. *et al.* *Aegle marmelos* fruit pectin for food and pharmaceuticals: physico-chemical, rheological and functional performance. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 386-394, 2013a.

JINDAL, M. *et al.* Synthesis, physico-chemical and biomedical applications of sulfated *Aegle marmelos* gum: Green chemistry approach. **Arabian Journal of Chemistry**, 2013b.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.048>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

JINDAL, M. *et al.* Sulfation of *Aegle marmelos* gum: Synthesis, physico-chemical and functional characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1660-1668, 2013c.

JUNEJA, V. K.; DWIVEDI, H. P.; YAN, X. Novel Natural Food Antimicrobials. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 381-403, 2012.

JUNG, H. Y. *et al.* Effect of the degree of sulfation on the physicochemical and biological properties of *Pleurotus eryngii* polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1291-1295, 2011.

KAMATA, M. *et al.* Cell-based chemical genetic screen identifies damnacanthol as a inhibitor of HIV-1 Vpr induced cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 3, p. 1101-1106, 2006.

KOUBALA, B. B. *et al.* Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 7, p. 1345-1351, 2008a.

KOUBALA, B. B. *et al.* Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1202-1207, 2008b.

KRAVTCHEKOV, T. P. *et al.* Studies on the intermolecular distribution of industrial pectins by means of preparative size exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, n. 4, p. 253-263, 1992.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology – Review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1-3, p. 181-186, 2000.

LIMA, M. S. *et al.* Fruit pectins – A suitable tool for screening gelling properties using infrared spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2010.

LIN, Y. *et al.* Molecular mass and antitumor activities of sulfated derivatives of α -glucan from *Poria cocos* mycelia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 5, p. 231-236, 2004.

LU, X. *et al.* Sulfation modification and anticoagulant activity of the polysaccharides obtained from persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1189-1195, 2012.

LÜBECK, W.; HANNES, H. **Noni**: El valioso tesoro curativo de los Mares del Sur. Madrid: EDAF, 2001. 173p.

MAAS, N. C. *et al.* Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1081-1087, 2012.

MACPHERSON, H. *et al.* **The potential for a new value adding industry for noni tropical fruit producers**. Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, 2007. 55 p. ISBN 1-4151-529-7.

SALES, E. A. **Potencial zeta como ajuda para formulações de suspensões y emulsões**. 2005. Disponível em: <<https://www.brainshark.com/malvern/vu?pi=126557&b=1&tx=212906&c1=22>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, n. 1, p. 99-107, 2002.

MASMOUDI, M. *et al.* Pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice: effect of extraction conditions on chemical composition of pectins. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 687-695, 2012.

MAY, C. D. Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, n. 1, p. 79-99, 1990.

MELAMET, R. **Noni promete saúde e bons negócios no país**. 2005. Disponível em: <<http://www.sebrae-sc.com.br/leis/default.asp?vcdtexto=3766&^^>>. Acesso em: 05 jun. 2014.

MELLEGÅRD, H. *et al.* Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 48-54, 2011.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.

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

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 295 p.

MIHAI, D.; MOCANU, G.; CARPOV, A. Chemical reactions on polysaccharides: I. Pullulan sulfation. **European Polymer Journal**, v. 37, n. 3, p. 541-546, 2001.

MONFREGOLA, L. *et al.* Chemical modification of pectin: environmental friendly process for new potential material development. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 800-804, 2011a.

MONFREGOLA, L. *et al.* Physical and water sorption properties of chemically modified pectin with an environmentally friendly process. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 6, p. 2311-2318, 2011b.

MÜLLER, J. C. **Toxicidade reprodutiva da *Morinda citrifolia* Linn**. 2007. 88 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger**: principles of biochemistry. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.

NEP, E. I.; CONWAY, B. R. Characterization of grewia gum, a potential pharmaceutical excipient. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 1, n. 1, p. 30-40, 2010.

NITTERANON, V. *et al.* Isolation and synergism of *in vitro* anti-inflammatory and quinone reductase (QR) inducing agents from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2271-2277, 2011.

NUNES, J. C. *et al.* Formação de mudas de noni sob irrigação com águas salinas e biofertilizantes no solo. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p. 451-463, 2009.

ONO, L. *et al.* In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, v. 60, n. 3, p. 201-208, 2003.

ORDÓÑEZ, J. A. *et al.* (org.). **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p. 1 v.

PAIVA, E. P.; LIMA, M. S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v. 10, n. 4, p. 196-211, 2009.

PALU, A. K. *et al.* The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 3, p. 502-506, 2008.

PARTOS, L. **A first, pectin ingredient enters Cargill's portfolio**. 2005. Disponível em: <<http://www.dairyreporter.com/Ingredients/A-first-pectin-ingredient-enters-Cargill-s-portfolio>>. Acesso em: 26 set. 2013.

PECTINAS – Propriedades e aplicações. **Food Ingredients Brasil**, n. 29, p. 46-53, 2014. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/380.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

PINHEIRO, A. C. *et al.* Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, n. 85, p. 18-28, out. 2010.

PINO, J. A. *et al.* Volatile compounds in noni (*Morinda citrifolia* L.) at two ripening stages. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 183-187, 2010.

PIRES, N. R. *et al.* Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 92-99, 2013.

QUESTED, T. E. *et al.* Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S29-S42, 2010.

R CORE TEAM (2015). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 01 maio 2015.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

ROSENBOHM, C. *et al.* Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 7, p. 637-649, 2003.

SANTOS, M. S. *et al.* Polissacarídeos extraídos da gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): propriedades químicas e perfil reológico. **Polímeros**, v. 20, n. especial, p. 352-358, 2010.

SCHWARTZ, S. E. *et al.* Sustained pectin ingestion: effect on gastric emptying and glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetic patients. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 48, n. 6, p. 1413-1417, 1988.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD (SCF). **Opinion of the Scientific Committee on Food on Tahitian Noni® juice**. 2002. 13p. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out151_en.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2015.

SILVA, L. R. *et al.* Caracterização do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.). **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. S267-S271, 2009.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. 632p.

SOUSA, J. A. *et al.* Comunicado Técnico: Produção de Mudanças de Noni (*Morinda citrifolia* L.). 1. ed. (on line). **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 157, 2010.

SU, B. *et al.* Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 592-595, 2005.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

TINTINO, S. R. *et al.* Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morinda citrifolia* L. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 3, p. 193-200, 2015.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA); FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Food Safety for Transplant Recipients**. 2006. Slightly revised. 2011. 19 p. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM312793.pdf>>. Acesso em: 25 dez. 2014.

- VIEIRA, A. C. P. A importância do comportamento do consumidor e a segurança dos alimentos. In: **Âmbito Jurídico**, Rio Grande, XI, n. 57, set 2008. Disponível em: <http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=3102>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- VRIESMANN, L. C.; TEÓFILO, R. F.; PETKOWICZ, C. L. O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 4, p. 1230-1236, 2011.
- WANG, L. *et al.* Characterization and anti-tumor activities of sulfated polysaccharide SRBPS2a obtained from defatted rice bran. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n.4, p. 427-431, 2009.
- WANG, M. Y. *et al.* Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers. **Chemistry Central Journal**, v. 3, n. 13, 2009.
- WANG, M. Y. *et al.* Hepatic protection by noni fruit juice against CCl₄-induced chronic liver damage in female SD rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, n. 3, p. 141-145, 2008.
- WANG, M. Y. *et al.* *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 12, p. 1127-1141, 2002.
- WANG, X. *et al.* Structure–antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 59-66, 2010.
- WANG, Y. *et al.* Correlation of structure to antitumor activities of five derivatives of a β -glucan from *Poria cocos* sclerotium. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 15, p. 2567-2574, 2004.
- WEST, J. B. *et al.* Antimicrobial activity of an iridoid rich extract from *Morinda citrifolia* fruit. **Current Research Journal of Biological Science**, v. 4, n. 1, p. 52-54, 2012.
- WESTENDORF, J. *et al.* Toxicological and analytical investigations of noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 2, p. 529-537, 2007.
- WHITE, G. W.; KATONA, T.; ZODDA, J. P. The use of high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) as a molecular weight screening technique for polygalacturonic acid for use in pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 20, n. 6, p. 905-912, 1999.
- WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 13-20, 2012.
- WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

XANGAI, J. **Noni o fruto de mil e uma utilidades**. 2006. Disponível em: <http://pagina20.uol.com.br/29072006/c_0229072006.htm>. Acesso em: 02 out. 2014.

XIAOFANG, W. *et al.* Structure–antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 59-66, 2010.

YADAV, S. *et al.* Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2009.

YANG, J. *et al.* Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 4, p. 397-403, 2003.

YAPO, B. M. Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1572-1578, 2009a.

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**, v. 10, n. 4, p. 717-721, 2009b.

YAPO, B. M. *et al.* Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1356-1364, 2007a.

YAPO, B. M. *et al.* Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 426-435, 2007b.

YEOH, S.; SHI, J.; LANGRISH, T. A. G. Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. **Desalination**, v. 218, n. 1-3, p. 229-237, 2008.

YOSHIDA, T. *et al.* Synthesis of curdlan sulfates having inhibitory effects in vitro against AIDS viruses HIV-1 and HIV-2. **Carbohydrate Research**, v. 276, n. 2, p. 425-436, 1995.

YULIARTI, O. *et al.* Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods. **Food Chemistry**, v. 166, p. 479-485, 2015.

ZOU, C. *et al.* Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 2, p. 322-331, 2008.