

**MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA PECTINA DO MELÃO CAIPIRA (*Cucumis melo* VAR. ACIDULUS)**

**André L. N. de Sousa<sup>a,++</sup>, Ana C. B. Ribeiro<sup>a,++</sup>, Denilton G. Santos<sup>a,++</sup>, Nadja M. P. S. Ricardo<sup>a,++</sup>, Maria E. N. P. Ribeiro<sup>a,++\*</sup>, Eveline S. B. Cavalcanti<sup>a,++b</sup>, Arcelina P. Cunha<sup>a,++</sup> e Nágila M. P. S. Ricardo<sup>a,++#</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 60451-970 Fortaleza – CE, Brasil

<sup>b</sup>Universidade Estadual do Ceará, 60740-903 Fortaleza – CE, Brasil

Recebido em 06/07/2016; aceito em 14/02/2017; publicado na web em 05/04/2017

CHEMICAL MODIFICATION OF COMMON MELON PECTIN (*CUCUMIS MELO* VAR. ACIDULUS). Melon is one of the most widely consumed fruits in the world. In Brazil, 60% of the production is for domestic consumption, with these fruits deemed to be of lower commercial value. For the first time, pectin has been extracted from this species of melon. So the extraction of this polysaccharide can be used as an alternative to increase the value of the fruit, improving profits in the domestic market where it can be used in many industries. The goal of this study is to determine, quantify, characterize and chemically modify by sulfation pectin from common melon for eventual application as an antithrombotic agent. The acidic, basic and neutral extractions yielded an average of 11%, 14% and 8% respectively. The FTIR spectrum revealed that pectin has a low degree of esterification (DE). The bands which appeared at 833  $\text{cm}^{-1}$  and 1251  $\text{cm}^{-1}$  can be attributed to the vibrations of C-O-S and S=O respectively, showing that the material was sulfated. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum showed consistent carbon galacturonic acid peaks and agrees with the FTIR data and elemental analysis for the sulfation of pectin. The molecular weight (MW) determined by GPC was  $7.7 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ , consistent with pectin.

Keywords: common melon; pectin; sulfation; *Cucumis melo* var. Acidulus.

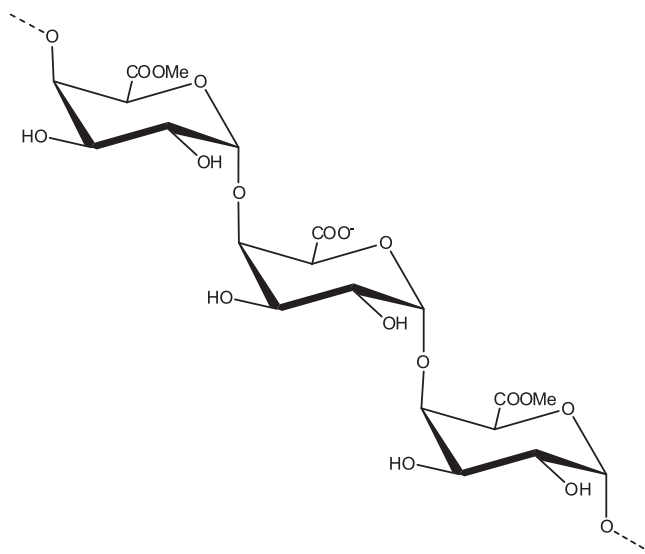
**INTRODUÇÃO**

O melão é uma fruta muito apreciada e de expressiva popularidade em diferentes países como Turquia, Irã, Estados Unidos, Espanha e China – o maior produtor mundial. Na América do Sul, o Brasil é o maior produtor, seguido da Venezuela, Argentina e Chile. As principais áreas produtoras de melão no Brasil localizam-se nas cidades de Mossoró e Assu no estado do Rio Grande do Norte - RN e Baixo Jaguaribe no estado do Ceará, que respondem por 100% das exportações do país.<sup>1</sup> Espécies como o melão caipira (*Cucumis melo* var. Acidulus), de boa aceitação local, possuem baixíssimo valor comercial devido ao fato de o fruto apresentar amadurecimento muito rápido após a colheita e por ter a casca muito fina, com risco de rompimento, exigindo, portanto, consumo imediato. O isolamento de substâncias específicas presentes no melão, como a pectina, e que apresentam relativa facilidade de extração, mostra-se como uma alternativa na valorização do fruto com consequente aumento dos lucros da comercialização.

Em sua essência, substâncias pécticas são constituídas quimicamente por heteropolissacarídeos ramificados contendo de algumas centenas a mil blocos por molécula, numa cadeia constituída de resíduos de ácidos galacturônicos metilesterificados, unidos por ligações  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ . Esta cadeia contém regiões com blocos de L-ramnose, constituídos principalmente de arabinose, galactose e xilose como cadeias laterais.<sup>2,3</sup> A Figura 1 ilustra a estrutura básica da pectina.

As principais matérias primas para a produção de pectina comercial são: resíduos cítricos, polpa de maçã, resíduos de beterraba, pele de manga, cabeças de girassol e cactus.<sup>3,4</sup> Ainda não existem relatos na literatura sobre a extração de pectinas de melões caipira.

As partículas poliméricas coloidais, como a pectina, têm ocupado posição de destaque no cenário mundial podendo ser usadas como



**Figura 1.** Representação esquemática da cadeia de ácido poligalacturônico variavelmente metilesterificado

aditivos alimentares, devido às suas propriedades espessantes, geleificantes e emulsificantes, na produção de geléias, ou em sorvetes, sucos de frutas, pães e bolos. A aplicação na indústria cosmética para uso em nanocosméticos tem igualmente assumido importante destaque, dentre outros fatores, por possuir baixa toxicidade em comparação com produtos inorgânicos ou de origem animal.<sup>5</sup>

Vários agentes antitrombóticos são utilizados na prevenção e tratamento de desordens tromboembolíticas, sendo a heparina, uma glicosaminoglicana altamente sulfatada, o agente mais comumente utilizado. Porém, diversos efeitos adversos da heparina têm sido descritos, como por exemplo: hemorragia, trombocitopenia, necrose quando aplicada por via subcutânea e osteoporose.<sup>6</sup> Somados aos efeitos adversos, a heparina apresenta uma diversidade estrutural,

\*e-mail: elenirnp@gmail.com

#e-mail alternativo: naricard@ufc.br

++ Laboratório de Polímeros e Inovação em Materiais (LABPIM)

problemas com contaminação por patógenos animais e poucas fontes de extração,<sup>7</sup> o que justifica a busca de novos compostos com atividades semelhantes, com menos efeitos adversos e que sejam provenientes de fontes não animais.

Dentre os compostos que podem ser utilizados como agentes anticoagulantes, destacam-se os polissacarídeos sulfatados. Estes polímeros compreendem um complexo grupo de macromoléculas, naturalmente ou quimicamente sulfatadas, com uma ampla faixa de propriedades biológicas.<sup>8</sup> Polissacarídeos naturalmente sulfatados que apresentam atividade anticoagulante e antitrombótica são, em geral, isolados de algas e invertebrados, os quais também podem apresentar uma grande diversidade estrutural.<sup>9</sup>

Dentre os polissacarídeos quimicamente sulfatados que podem atuar como anticoagulantes pode-se citar a quitina e quitosana, glucanas, galactomananas, galactanas, que podem ser obtidos de diversas fontes, como por exemplo, de líquens, fungos e plantas.<sup>10</sup> Além das atividades anticoagulantes, polissacarídeos sulfatados também podem apresentar atividades antiarterioescleróticas, antiproliferativas, antiangiogênicas, antivirais, anti-inflamatórias e anti-metastáticas.<sup>11</sup> Estudos apontaram que camundongos infectados com vírus da febre amarela e dengue tipo 1, quando tratados com galactomanana sulfatada, apresentaram resistência à morte em mais de 87%.<sup>12</sup>

Nesse sentido, propõe-se nesse trabalho a extração e caracterização da pectina do melão caipira, bem como sua sulfatação, a fim de que, em estudos posteriores, seja testada quanto à sua capacidade anticoagulante.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimentos gerais

#### *Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

As análises de FTIR das amostras PCM-a, PCM-b, PCM-n e PCM-as foram realizadas em um espectrômetro Perkin Elmer Modelo 16 PC. Preparou-se as amostras em pastilhas de KBr (1:80) a dez toneladas.

#### *Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)*

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H foram obtidos em um equipamento Bruker Avance-DRX 500 (USA, Califórnia), com transformada de Fourier, equipado com uma sonda de detecção inversa, operando em 499,9 MHz (<sup>1</sup>H), numa janela espectral de 20 ppm. Preparou-se soluções das amostras PCM-a e PCM-as em concentrações de 34 mg mL<sup>-1</sup> em D<sub>2</sub>O (99,8%), permanecendo em repouso por 24 horas para completa solubilização. A análise foi realizada em tubos de 5 mm, sob aquecimento de 80 °C, com sinal da água residual em 4,2 ppm e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm.

#### *Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C)*

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C foram obtidos num equipamento Bruker Avance-DRX 500 (USA, Califórnia), com transformada de Fourier, equipado com uma sonda de detecção inversa, operando em 125 MHz (<sup>13</sup>C), numa janela espectral de 200 ppm. Para obtenção dos espectros de RMN <sup>13</sup>C, preparou-se soluções das amostras PCM-a e PCM-as em concentrações de 34 mg mL<sup>-1</sup> em D<sub>2</sub>O (99,8%), permanecendo em repouso por 24 horas para completa solubilização. A análise foi realizada em tubos de 5 mm, sob aquecimento de 80 °C e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm.

#### *Análise Termogravimétrica (TGA)*

As curvas de TGA foram obtidas em um módulo termogravimétrico DTG – 600 Hz, modelo Q50 da TA Instrument. As medidas

termogravimétricas foram efetuadas usando suporte de amostra de platina, valores médios de massas das amostras de 8 mg, razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> em um intervalo de temperatura de 25 °C a 800 °C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio, com vazão de 30 mL min<sup>-1</sup>.

#### *Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)*

As análises de GPC das amostras PCM-a, PCM-b, PCM-as e PC foram realizadas em um cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-10A a 40 °C. A coluna utilizada possui como características: Ultrahydrogel linear 7,8 x 300 mm, fase móvel de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> a temperatura ambiente, fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e o volume de amostra injetada foi de 20  $\mu$ L. Na determinação das massas molares utilizou-se de padrões de pululanas (ShodexDenko<sup>®</sup>) (MM de 5,9 x 10<sup>3</sup> a 7,88 x 10<sup>5</sup> g mol<sup>-1</sup>).

Todas as amostras foram preparadas na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> (0,1 % m/v) e filtradas em membrana Millipore<sup>®</sup> 0,45  $\mu$ m.

### Obtenção dos frutos e preparação da polpa para extração da pectina

Melões maduros foram colhidos em uma horta na cidade de Fortaleza/CE. A higienização dos frutos foi feita por meio de lavagem com água potável, seguida por imersão em solução diluída de hipoclorito de sódio por 30 minutos. A partir de dois melões maduros obteve-se 1 kg de polpa, a qual foi liofilizada, pesada e armazenada, à temperatura ambiente, em um dessecador.

### Extração da pectina do *Cucumis melo* var. *acidulus*

Os procedimentos de extração adotados estão de acordo com o proposto em trabalhos encontrados na literatura para extração de pectina.<sup>13</sup>

Três diferentes condições de extração foram aplicadas usando distintas soluções extratoras: em meio ácido utilizou-se o ácido oxálico/oxalato de amônio (0,25% - pH 4,6), em meio básico utilizou-se de hidróxido de sódio (0,25%) e água destilada para extração em meio neutro. Todas as extrações foram realizadas a 75 °C por 1 hora.

A polpa e as soluções extratoras, na proporção de 1:40 (m/v), foram aquecidas a 75 °C sob agitação magnética, mantendo-se essa temperatura por 1 hora. Após esse tempo foi feita uma filtração, a vácuo, do material com determinação do volume filtrado e descarte da parte sólida. A pectina foi precipitada pela adição, ao filtrado, de três volumes de etanol 96%, e a solução obtida foi mantida em repouso a 4 °C por 5 horas. Após esse período realizou-se a centrifugação a 7500 rpm durante 10 minutos para precipitação da pectina. A pectina obtida foi solubilizada em uma quantidade mínima de água deionizada, liofilizada, pesada e armazenada à temperatura ambiente em um dessecador.

Conforme a condição de extração adotada, as amostras obtidas foram denominadas: PCM-a, PCM-b e PCM-n para as extrações em solução ácida, básica e neutra, respectivamente.

### Sulfatação da pectina

Para esta reação utilizou-se a amostra extraída sob condições ácidas (PCM-a), devido o maior grau de esterificação, além de ser o método de extração escolhido para obtenção de pectinas comerciais.<sup>13</sup>

Para realização da sulfatação, adotou-se o procedimento experimental adaptado de outros autores encontrados na literatura.<sup>12,14</sup> Dessa forma, 300 mg de PCM-a liofilizada foram adicionados a 80 mL de uma solução de piridina e N,N-dimetilformamida (50:30 v/v), com agitação magnética, a 25 °C por 12 h, seguido por resfriamento a

4 °C por mais 12 h. Após este período, a mistura reacional foi aquecida, sob agitação magnética, até que a temperatura atingisse 80 °C. Adicionou-se lentamente à mistura 7 mL de ácido clorossulfônico nesta temperatura. A solução obtida foi então resfriada à temperatura ambiente e neutralizada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A amostra foi dialisada em membrana de corte 12.000 g mol<sup>-1</sup> por 120 h, seguida de liofilização e nomeada de PCM-as.

## Caracterização Química

### Análise elementar

Realizou-se a caracterização por meio da técnica de análise elementar com o objetivo de quantificar o percentual e qualificar os elementos químicos presentes nas amostras PCM-a e PCM-as. A quantificação dos elementos químicos carbono, hidrogênio e enxofre nas amostras PCM-a e PCM-as foi realizada por meio do equipamento Perkin-Elmer CHNS 2400 analyzer.

### Determinação do Grau de Sulfatação (GS)

O cálculo do GS foi obtido por meio da Equação 1, conforme dados da literatura.<sup>15,16</sup>

$$GS = \frac{162 \times S\%/32}{100 - (80/32 \times S\%)} \quad (1)$$

onde: GS = Grau de Sulfatação da pectina; 162 = massa molar da unidade monomérica de ácido galacturônico (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>); 80 = massa molar do grupo SO<sub>3</sub>; 32 = massa molar do átomo enxofre (S)

### Determinação do Grau de Esterificação (GE)

FTIR foi o método utilizado para determinação do GE das amostras PCM-a, PCM-b, PCM-n e PCM-as<sup>17</sup> como pode ser verificado no Material Suplementar (Figura 1S).

No espectro do infravermelho, a área sob as bandas correspondentes aos Grupos Carboxílicos Esterificados (-COO-R), que aparece no comprimento de onda em 1750 cm<sup>-1</sup>, e a área sob a banda correspondente aos grupos carboxilatos (-COO<sup>-</sup>) em 1600 cm<sup>-1</sup> foram calculadas com o uso do *software* Origin 8 e usadas para o cálculo do GE, segundo a Equação 2:

$$\%GE = \frac{GCE}{TGC} \times 100 \quad (2)$$

em que GCE se refere aos Grupos Carboxílicos Esterificados e TGC ao Total de Grupos Carboxílicos esterificados e Grupos Carboxilatos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Extração da pectina e sua caracterização química

Os rendimentos das extrações da pectina foram: 11%, 14% e 8% sob condições ácida, básica e neutra, respectivamente. Soluções extratoras preparadas com ácidos fracos, como o ácido oxálico, que apresentam pH entre 3,5-4,6 têm sido preferidas em relação àquelas obtidas de ácidos fortes como HCl e HNO<sub>3</sub> com faixas de pH de 1,5-2,0 por apresentarem melhores rendimentos e fornecerem pectinas com grau de esterificação mais elevados. Apesar do rendimento ter sido mais elevado que nos demais, o meio básico não é de interesse comercial por saponificar os grupos ésteres, resultando em pectinas não esterificadas. O rendimento obtido na extração neutra corrobora com dados da literatura em que extrações de pectina de manga forneceram menores rendimentos em água pura do que em soluções de HCl (pH 1,5) e de oxalato de amônio.<sup>4,13,17</sup>

Dessa forma, neste trabalho, a amostra de pectina escolhida para o procedimento de sulfatação foi aquela extraída com ácido fraco por mostrar-se mais vantajosa sob vários aspectos como: maior rendimento de extração em relação a meios mais ácidos e neutros, grau de esterificação mais elevado em relação ao meio básico e maior confiabilidade de aplicação na indústria de alimentos.

A sulfatação constitui-se como uma das modificações na estrutura química das pectinas, que consiste na substituição de grupos hidroxílicos por grupos sulfato. A sulfatação é importante, pois existe uma estreita relação entre as propriedades estruturais de pectinas e suas atividades biológicas. Tal modificação potencializa as diversas atividades desse polissacarídeo tais como anticoagulante, antitrombótica e antimicrobiana.<sup>12,18</sup>

A sulfatação da pectina foi confirmada pelo teor de enxofre de 1,82% obtido por meio da análise elementar, conforme expresso na Tabela 1.

**Tabela 1.** Análise Elementar da pectina do melão caipira

Amostras	Carbono (%)	Enxofre (%)	Hidrogênio (%)
PCM-a	36,73	-	5,69
PCM-as	34,63	1,82	6,62

O Grau de Sulfatação (GS), obtido de acordo com a Equação 1, foi de 9,6% e comprova que o derivado sulfatado da amostra PCM-a foi obtido. Em trabalhos anteriores<sup>18</sup> foi obtida pectina com GS de 15%, com atividades antimicrobiana e anticoagulante. Tal valor de GS é próximo ao encontrado neste trabalho, sugerindo que a pectina sulfatada neste trabalho poderá apresentar as mesmas atividades.

### Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

A Tabela 2 mostra as principais bandas observadas nos espectros de FTIR da pectina obtida do melão caipira em diferentes condições de extração e para a pectina sulfatada, com base na literatura,<sup>2,17,18</sup> entre os comprimentos de onda de 4000 cm<sup>-1</sup> a 300 cm<sup>-1</sup>, e seus respectivos grupos funcionais.

Uma análise comparativa do espectro de infravermelho da pectina

**Tabela 2.** Grupos atribuídos às bandas do infravermelho conforme a literatura<sup>2,17,18</sup> e os valores encontrados neste trabalho para pectina e para a pectina sulfatada

Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuições	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
Literatura		
3600-2500 <sup>a</sup>	v (O-H) – forte, extensa	3400
3000-2800 <sup>a</sup>	v (C-H) – curta, ocasional	2900
1744 <sup>a</sup>	v (C=O éster), forte	1736
1617 <sup>a</sup>	v <sub>as</sub> (COO <sup>-</sup> ), forte	1637
1441 <sup>a</sup>	v (COO <sup>-</sup> ), fraca	1426
1210 <sup>c</sup>	v <sub>as</sub> (S=O)	1251
1200-1100 <sup>b</sup>	v (COC) éter do anel glicosídico; C–C	1147
956 <sup>b</sup>	δ C-H em configuração α	966
906 <sup>b</sup>	δ C-H em configuração β	921
810 <sup>c</sup>	v (C-O-S)	833

a) Monfregola *et al.*;<sup>2</sup> b) Kalapathy e Proctor;<sup>17</sup> c) Bae *et al.*;<sup>18</sup> d) Valores encontrados neste trabalho.

cítrica comercial (PC), da *Sigma Aldrich*, com o da pectina do melão caipira extraída em meio ácido, alcalino e neutro, mostra regiões particularmente relacionadas como estruturas e composições típicas de pectinas,<sup>17</sup> como pode ser verificado no Material Suplementar (Figura 1S).

A região característica de grupos carboxílicos ( $1750\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ ) aparece claramente. Para pectinas é muito importante atentar para a banda esterificada  $\text{C}=\text{O}$  ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ) e o grupo carboxilato  $\text{COO}^-$  ( $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ ), as quais estão relacionadas à determinação do Grau de Esterificação (GE) desses compostos. Tais grupamentos são responsáveis por definir muitas de suas propriedades, como força e velocidade de formação de géis a partir de suas soluções.<sup>19</sup>

Para caracterizar os demais grupos existentes na estrutura das pectinas, destaca-se a região de  $2960\text{-}2940\text{ cm}^{-1}$ , que apresenta bandas típicas de grupos  $\text{C-H}$ ,<sup>2</sup> e, ainda, as bandas de absorção fortes e largas entre  $3600$  e  $2500\text{ cm}^{-1}$ , que são características de estiramentos de grupos  $\text{O-H}$ . No caso da pectina, as ligações  $\text{O-H}$  se dão devido às ligações de hidrogênio inter e intramolecular da cadeia de ácido galacturônico.<sup>17</sup>

A presença de grupos sulfato na estrutura da amostra PCM-as, obtidos pela modificação por sulfatação da amostra PCM-a, pode ser confirmada por meio de duas novas bandas que aparecem no espectro de FTIR da amostra sulfatada em  $833\text{ cm}^{-1}$  e  $1251\text{ cm}^{-1}$ , apresentadas na Figura 2, correspondendo ao estiramento de vibrações características de ligação  $\text{C-O-S}$  e  $\text{S}=\text{O}$ , respectivamente. Os valores dessas bandas e suas intensidades são muito semelhantes aos encontrados na literatura.<sup>17</sup>

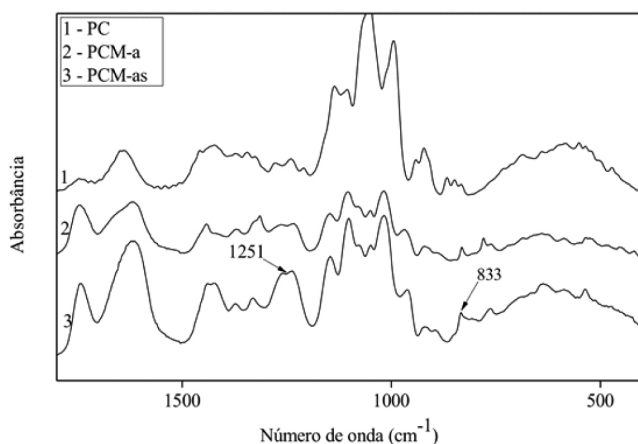


Figura 2. FTIR das amostras: (1) PC, (2) PCM-a e (3) PCM-as

Além das evidências citadas, percebe-se que as bandas correspondentes aos grupos carboxílicos metilesterificados na amostra PCM-a têm sua intensidade reduzida quando comparada à pectina modificada (PCM-as). Isto ocorre porque grupos sulfato alteram o modo de vibração de determinados grupos, como os metílicos.<sup>20</sup>

Portanto, os espectros FTIR, assim como a Análise Elemental, confirmam que o derivado sulfatado da pectina foi obtido com sucesso.

#### Determinação do Grau de Esterificação (GE)

A determinação do GE das amostras PCM-a, PCM-b, PCM-n e PCM-as foi realizado por meio da integração das bandas características dos grupos carboxílicos esterificados ( $-\text{COOR}$ ) e grupos carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) presentes nos espectros de FTIR, exibidos na Figura 2S, de acordo com a metodologia proposta por Fellah *et al.*,<sup>19</sup> utilizando-se da Equação 2 descrita no procedimento experimental.

O GE para a amostra comercial (PC) foi de 34,15%. A amostra PCM-a apresentou o maior GE dentre as analisadas, com 40,9%,

seguida da PCM-n e PCM-as, com 36% e 29%, respectivamente. Estes dados estão de acordo com resultados prévios em que ácidos orgânicos apresentaram pectinas com maior grau de esterificação que as obtidas de soluções extratoras de ácidos fortes com pHs entre 1 e 3.<sup>13</sup>

Quando extraída com água (amostra PCM-n), o GE ficou próximo do obtido para a amostra PCM-a, sugerindo que a extração com o ácido oxálico, um ácido orgânico, apresenta pouco efeito de hidrólise parcial na estrutura da pectina, mantendo sua estrutura próxima à obtida por extração em meio neutro, com a vantagem de apresentar um maior rendimento de extração. Estes resultados corroboram com os encontrados por Koubala *et al.*,<sup>13</sup> ao compararem o efeito de diferentes agentes extratores no GE de pectinas.

A pectina extraída em meio básico (amostra PCM-b) não apresentou a banda dos grupos carboxílicos esterificados, sugerindo, conforme Ralet e Thibault,<sup>4</sup> que houve saponificação destes grupos.

A amostra sulfatada apresentou uma redução do Grau de Esterificação em relação ao valor original, o que está relacionado aos efeitos na cadeia polimérica devido à modificação química.

#### Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

##### Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)

A Figura 3 mostra uma representação química da cadeia de ácido poligalacturônico com destaque para os hidrogênios H-1 e hidrogênios H-5 adjacentes a grupos carboxílicos metil esterificados e grupos carboxilatos, respectivamente, e que estão de acordo com os dados dos espectros obtidos neste trabalho (Figura 4).

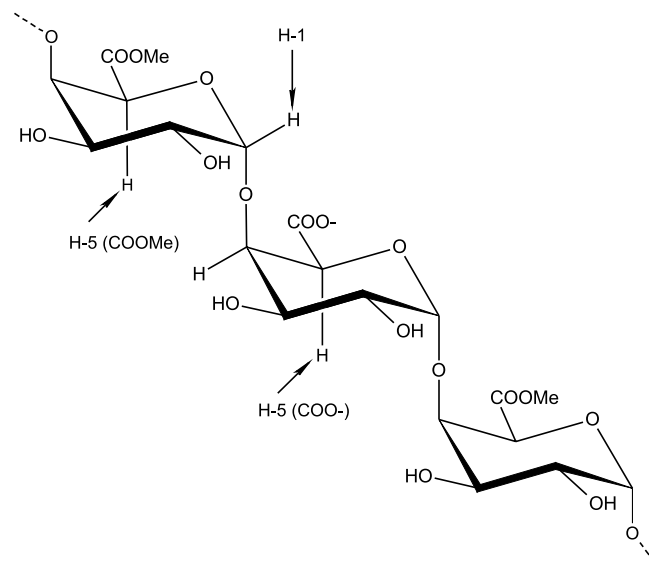


Figura 3. Representação esquemática da cadeia de ácido poligalacturônico com destaque para H-1 e H-5 adjacentes a grupos carboxílicos metilados e carboxilatos

Nos espectros de RMN <sup>1</sup>H, os sinais relativos ao hidrogênio anômérico, H-1, e ao hidrogênio do carbono 5, H-5, de ésteres metílicos ( $-\text{COOCH}_3$ ) dos monômeros de ácidos galacturônicos, localizam-se na região de  $\delta$  5 (5,03 e 4,94 respectivamente), enquanto que os prótons H-1 e H-5 de grupos carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ) estão representados pelos sinais com deslocamentos químicos em  $\delta$  5,1 e 4,7, respectivamente.<sup>21</sup> Em  $\delta$  4,44 aparece o sinal específico do hidrogênio do C-4 da cadeia polimérica.<sup>22</sup> Os sinais em  $\delta$  3,61 e  $\delta$  3,81 correspondem aos prótons H-2 e H-3 de grupos metílicos dos ácidos galacturônicos esterificados, respectivamente.<sup>23,24</sup> Observa-se, ainda, em  $\delta$  4,1 o sinal do próton H-4 relativo a resíduo de arabinose<sup>25</sup> (Figura 4a), que não é observado no espectro da amostra sulfatada (Figura 4b).

De um modo geral, verificou-se uma redução de todos os sinais dos prótons no espectro da pectina sulfatada (Figura 4b) em comparação ao espectro da pectina ácida (Figura 4a), devido à diminuição dos hidrogênios dos grupos hidroxílicos que sofreram sulfatação.

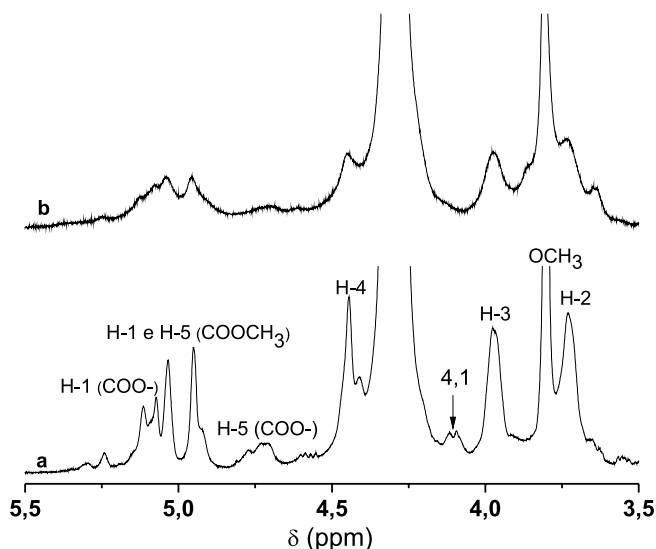


Figura 4. Espectros de RMN  $^1\text{H}$ : (a) pectina ácida e (b) pectina sulfatada

#### Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN $^{13}\text{C}$ )

A Figura 5 corresponde aos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  da pectina ácida (a) e da pectina sulfatada (b). No espectro da pectina ácida aparecem os deslocamentos químicos correspondentes à região anomérica do ácido  $\alpha$ -D-galacturônico, evidenciado pelos sinais em  $\delta$  100,8 e  $\delta$  100,5 equivalentes ao carbono C-1 de unidades esterificadas e não esterificadas, e dois sinais em campo muito baixo a  $\delta$  172,3 e  $\delta$  171,2 correspondentes ao C-6 de grupos carboxílicos metil-esterificados e grupos carboxilatos, respectivamente.<sup>21</sup> O pico em  $\delta$  53,3 pode ser atribuído ao carbono oximetílico do grupo éster.<sup>26</sup> Os deslocamentos químicos em  $\delta$  68,5;  $\delta$  71,0;  $\delta$  71,3 e  $\delta$  79,2 são relativos aos carbonos C-2, C-3, C-5 e C-4 do ácido galacturônico, respectivamente.<sup>27</sup> No espectro da pectina sulfatada (Figura 5b) observa-se a ausência do deslocamento químico em  $\delta$  172,3, devido, possivelmente, à hidrólise do éster metílico durante o processo de sulfatação.

#### Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Foram submetidas à análise de GPC uma amostra de pectina cítrica comercial, da marca SIGMA ALDRICH, e a amostra PCM-a, a fim de se comparar suas características.

As pectinas são reconhecidas como cadeias lineares de ácido galacturônico, mas podem apresentar diversas ramificações de polissacarídeos formados por dezessete diferentes monossacarídeos. A homogalacturonana, formada por unidades de ácido galacturônico, é o principal polissacarídeo da parede celular sendo responsável por até 65% do total de pectina. Ligados a essa cadeia principal encontram-se diversos outros polissacarídeos com diferentes tamanhos de cadeia, como a ramnogalacturonana I e II que apresentam de 20-35% e 10% da constituição da pectina, respectivamente. Canteri *et al.*<sup>28</sup> observaram que cada um desses polissacarídeos aparece como ramificações existentes em cadeias lineares de oito ou mais unidades de ácido galacturônico. Tais ramificações apresentam até 12 diferentes tipos de açúcares.

Toda essa complexidade na constituição das pectinas influencia diretamente o valor de sua massa molecular e a diversidade dos

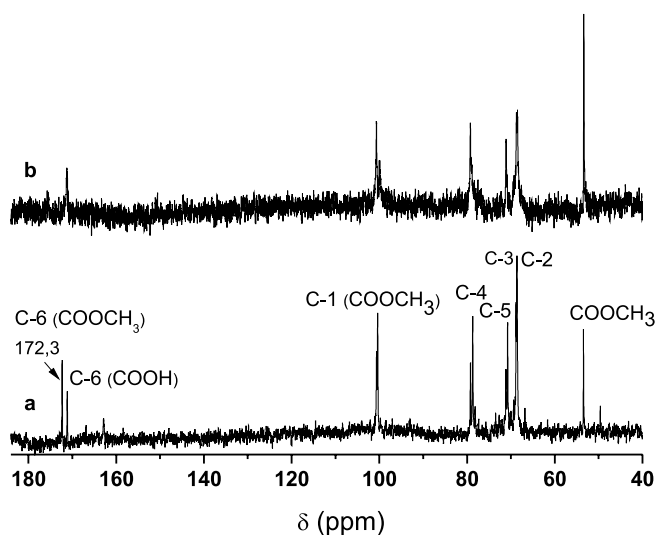


Figura 5. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ : (a) pectina ácida e (b) pectina sulfatada

monômeros e seus respectivos polímeros que constituem a cadeia lateral dão a justificativa para seu caráter polidisperso.

Na Figura 3S pode-se observar o caráter polidisperso da pectina extraída em diferentes condições. Essa polidispersividade é característica de materiais poliméricos, os quais não apresentam um valor único de massa molecular.

A maior polidispersividade da amostra PCM-a em relação às demais, conforme se observa na Tabela 3, pode ter relação com as condições de extração adotadas.

Tabela 3. Valores de polidispersividade e massas moleculares calculados pela análise de GPC das amostras PC, PCM-a, PCM-as e PCM-b

Amostra	$M_n^*$ (g mol $^{-1}$ )	$M_w^{**}$ (g mol $^{-1}$ )	Polidispersividade ( $M_w/M_n$ )
PC	$9,0 \times 10^4$	$4,9 \times 10^5$	5,5
PCM-a	$8,1 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$	5,6
PCM-as	$3,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	4,1
PCM-b	$6,8 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5$	4,1

\* $M_n$  - Massa molecular numérica média; \*\* $M_w$  - Massa molecular ponderal média.

Um meio mais ácido e/ou com temperaturas mais elevadas pode ser responsável pela degradação da cadeia lateral da pectina comercial (PC), restando uma porção estrutural mais homogênea pela redução da quantidade de estruturas com diferentes massas moleculares. A condição de extração em pH mais elevado (4,6), bem como temperaturas mais amenas (75 °C) adotadas para a extração da amostra PCM-a pode ter permitido uma menor alteração das cadeias laterais desse polímero, justificando sua maior polidispersividade.

Apesar da diferença na polidispersividade entre as duas amostras, os resultados apresentaram valores de massas molares bem semelhantes entre as duas. A massa molar ponderal média para a pectina cítrica comercial (PC) foi de  $M_w = 4,9 \times 10^5$  g mol $^{-1}$ , enquanto que para a pectina do melão caipira (PCM-a) o valor de  $M_w$  foi de  $4,5 \times 10^5$  g mol $^{-1}$ . Os valores são condizentes com os encontrados para pectinas cítricas comerciais.<sup>28-30</sup>

A massa molecular da pectina sulfatada mostrou-se menor que as demais (Tabela 3), devido ao processo de modificação química realizado em condições severas com o uso de ácido clorossulfônico e temperaturas elevadas, os quais causaram uma quebra mais intensa do material polimérico.<sup>17</sup>

### Análise Termogravimétrica (TGA)

A perda de massa da amostra em atmosfera de nitrogênio foi estudada com o objetivo de investigar possíveis alterações nas principais etapas de degradação térmica da pectina do melão obtida nas três diferentes condições de extração, bem como da pectina modificada por sulfatação (PCM-as).

A análise térmica da pectina extraída em meio ácido foi comparada com a da pectina comercial (PC) com base nos dados da Figura 4S.

Pela análise do termograma, percebe-se a clara semelhança na degradação da amostra comercial (PC) e da pectina do melão caipira extraída em meio ácido (PCM-a). A perda de massa em três etapas é evidente para ambas as amostras. O primeiro estágio de perda de massa da amostra PC começa por volta de 60 °C e corresponde a cerca de 10% de perda de massa de água presente na amostra. O segundo passo de perda de massa inicia-se em cerca de 140 °C e corresponde à principal perda de massa, num total de 5% da amostra; nessa etapa ocorre a perda de grupos ácidos da cadeia lateral e carbonos do anel piranosídico. O terceiro passo corresponde à etapa oxidativa e pode ser avaliado em 22% do total da amostra. O teor de cinzas pode ser estimado em aproximadamente 17%.

Com base nos resultados de TGA, mostrada na Figura 5S, as características de degradação térmica da amostra PCM-a foi comparada às extraídas em meio básico (PCM-b) e neutro (PCM-n), bem como a pectina sulfatada (PCM-as).

As amostras apresentaram características de degradação térmica em três etapas, próprio de pectinas, como relatado por Einhorn-Stoll e Kunzek.<sup>31</sup>

O primeiro passo da degradação da amostra PCM-a ocorre em torno de 70 °C, equivalente à perda de água e pode ser avaliado em 15% da massa inicial; o segundo passo ocorre entre 176 °C e 375 °C. Neste intervalo de temperatura, a degradação da amostra ocorreu com 57% de perda de massa. Tem sido relatado que nessa etapa ocorre a decomposição pirólítica que consiste em descarboxilação primária e secundária envolvendo o grupo ácido lateral e um carbono do anel.<sup>6</sup> A terceira etapa acontece entre 410 °C e 664 °C. O teor de cinzas calculado para essa amostra foi de 7% da massa total analisada.

A amostra de pectina modificada por sulfatação (PCM-as) sofreu um aumento significativo de sua capacidade hidrofílica, com 17% de perda de massa na primeira etapa de degradação, quando comparada à amostra sem modificação (PCM-a), que foi de 15%, o que pode ser atribuído à presença dos grupos sulfatos na cadeia de pectina modificada. Em seu segundo estágio de degradação, a perda de massa foi menor que nas demais amostras, 49%, comparado a 57%, 50% e 62%, relativos às amostras PCM-a, PCM-b e PCM-n, respectivamente. Tal resultado pode ser atribuído a uma maior quebra na estrutura da cadeia lateral de ácido galacturônico, durante o processo de sulfatação. Além disso, observa-se uma redução na temperatura de degradação da amostra modificada (PCM-as). Tal observação já foi relatada por Monfregola *et al.*<sup>2</sup> para pectinas modificadas quimicamente.

Para a amostra PCM-b a primeira perda de massa devido a água absorvida é maior que as demais. Não foram encontrados dados na literatura que atribuam à extração em meio básico um incremento na capacidade de absorção de água de pectinas. Para o segundo estágio de degradação é importante observar que houve uma significativa redução na perda de massa da amostra PCM-b em relação às outras, devido à saponificação dos grupos carboxílicos.<sup>4</sup> O terceiro estágio apresenta importante alteração na temperatura inicial de degradação da amostra PCM-b, em que, enquanto a essa temperatura as outras amostras já encerraram esse estágio, a PCM-b ainda persiste, evidenciando uma maior estabilidade térmica dessa amostra com relação à

etapa de degradação do anel piranosídico.<sup>2</sup>

Observou-se ainda que a amostra PCM-n apresentou comportamento muito similar à PCM-a em suas etapas de degradação, indicando similaridade estrutural das amostras.

### CONCLUSÃO

A pectina extraída foi caracterizada como de baixo Grau de Esterificação (GE), cujo valor, determinado por FTIR, foi de 40,9%, enquanto a análise elementar confirmou a sulfatação da pectina ácida, com um teor de enxofre de 1,82% e Grau de Sulfatação (GS) de 9,6%.

De um modo geral, por meio dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, verificou-se uma redução de todos os sinais dos prótons do espectro da pectina sulfatada em comparação ao espectro da pectina ácida, devido à diminuição dos hidrogênios dos grupos hidroxílicos que sofreram sulfatação.

No espectro de RMN <sup>13</sup>C da pectina ácida aparecem os deslocamentos químicos correspondentes à região anomérica do ácido  $\alpha$ -D-galacturônico, evidenciados pelos sinais em  $\delta$  100,8 e  $\delta$  100,5 equivalentes, respectivamente, ao carbono C-1 de unidades esterificadas e não esterificadas, e dois sinais em campo muito baixo a  $\delta$  172,3 e  $\delta$  171,2 correspondentes ao C-6 de grupos carboxílicos metil-esterificados e grupos carboxilatos, respectivamente. O espectro de RMN <sup>13</sup>C da pectina sulfatada evidencia a ausência do deslocamento químico em  $\delta$  172,3 devido ao processo de sulfatação. O valor da massa molecular da amostra PCM-a obtida da análise de GPC foi de  $4,5 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup>, compatível com pectinas comerciais.

A análise térmica, obtida por TGA, mostrou que a pectina do melão extraída em meio ácido se degrada em três etapas, semelhante ao perfil de degradação de pectinas comerciais.

A extração e sulfatação da pectina do melão caipira foram obtidas e apresentam-se como alternativas viáveis para valorização desse fruto, de baixo valor comercial, e com potencial aplicação como agente antitrombótico.

### MATERIAL SUPLEMENTAR

Algumas figuras relacionadas às análises de FTIR, GPC e TGA da pectina do melão caipira estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

### AGRADECIMENTOS

CNPq (NMPSR-304392/2013-8), CAPES, CENAUREMN e Central Analítica da Universidade Federal do Ceará (UFC/CT-INFRA/ MCTI-SISNANO/Pro-Equipamentos CAPES).

### REFERÊNCIAS

1. [https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducaoI6\\_1galceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=4103&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoId=4241](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaoI6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=4103&p_r_p_-996514994_topicoId=4241), acessada em março de 2017.
2. Monfregola, L.; Bugatti, V.; Amodeo, P.; Luca, E. de; Vittoria, V.; *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2311.
3. Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J.; Serra, J. L.; *Process Biochem.* **1998**, *33*, 21.
4. Ralet, M. C.; Thibault, J. F.; *Carbohydr. Res.* **1994**, *260*, 283.
5. Lupi, F. R.; Shakeel, A.; Greco, V.; Rossi, C. O.; Baldino, N.; Gabriele, D.; *Mater. Sci. Eng., C* **2016**, *69*, 358.
6. de Kort, M.; Buijsman, R. C.; van Boeckel, C. A. A.; *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 769.

7. Perrinaud, A.; Jacobi, D.; Machet, M. C.; Grodet, C.; Gruel, Y.; Machet, L.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *54*, S5.
8. Chaidedgumjorn, A.; Toyada, H.; Woo, E. R.; Lee, K. B.; Kim, Y. S.; Toida, T.; Imanari, T.; *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 925.
9. Mulloy, B.; Mourão, P. A. S.; Gray, E.; *J. Biotechnol.* **2000**, *77*, 123.
10. Vikhoreva, G.; Bannikova, G.; Stolbushkina, P.; Panov, A.; Drozd, N.; Makarov, V.; Varlamov, V.; Gal'braikh, L.; *Carbohydr. Polym.* **2005**, *62*, 327.
11. Yoshida, T.; Yasuda, Y.; Mimura, T.; Kaneko, Y.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Uryu, T.; *Carbohydr. Res.* **1995**, *276*, 425.
12. Ono, L.; Wollinger, W.; Rocco, I. M.; Coimbra, T. L. M.; Gorin, P. A. J.; Sierakowski, M. R.; *Antiviral Res.* **2003**, *60*, 201.
13. Koubala, B. B.; Kansci, G.; Mbome, L. I.; Crépeau, M.-J.; Thibault, J.-F.; Ralet, M.-C.; *Food Hydrocolloids* **2008**, *22*, 1345.
14. O'Neill, A. N.; *Can. J. Chem.* **1955**, *33*, 1097.
15. Lin, Y.; Zhang, L.; Chen, L.; Jin, Y.; Zeng, F.; Jin, J.; Wan, B.; Cheung, P. C. K.; *Biol. Macromol.* **2004**, *34*, 231.
16. Zhang, M.; Zhang, L.; Wang, Y.; Cheung, P. C. K.; *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2863.
17. Singthong, J.; Cui, S. W.; Ningsanond, S.; Goff, H. D.; *Carbohydr. Polym.* **2004**, *58*, 391; Kalapathy, U.; Proctor, A.; *Food Chem.* **2001**, *73*, 393; Gnanasambandam, R.; Proctor, A.; *Food Chem.* **1999**, *65*, 461; Methacanon, P.; Krongsin, J.; Gamonpilas, C.; *Food Hydrocolloids* **2014**, *35*, 383.
18. Bae, I. Y.; Joe, Y. N.; Rha, H. J.; Lee, S.; Yoo, S. -H.; Lee, H.; *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 1980.
19. Fellah, A.; Anjukandi, P.; Waterland, M. R.; Williams, M. A. K.; *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 847.
20. Pires, N. R.; Cunha, P. L. R.; Maciel, J. S.; Angelim, A. L.; Melo, V. M. M.; Paula, R. C. M. de; Feitosa, J. P. A.; *Carbohydr. Polym.* **2013**, *91*, 92.
21. Rosenbohm, C.; Lundt, I.; Christensen, T. M. I. E.; Young, N. W. G.; *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 637; Taboada, E.; Fisher, P.; Jara, R.; Zúñiga, E.; Gidekel, M.; Cabrera, J. C.; Pereira, E.; Moraga, A. G.; Villalonga, R.; Cabrera, G.; *Food Chem.* **2010**, *123*, 669.
22. Tamaki, Y.; Konishi, T.; Fukuta, M.; Tako, M.; *Food Chem.* **2008**, *107*, 352.
23. Bédouet, L.; Courtois, B.; Courtois, J.; *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 379.
24. Alba, K.; Laws, A.P.; Kontogiorgos, V.; *Food Hydrocolloids* **2015**, *43*, 726.
25. Wang, W.; Ma, X.; Jiang, P.; Hu, L.; Zhi, Z.; Chen, J.; Ding, T.; Ye, X.; Liu, D.; *Food Hydrocolloids* **2016**, *61*, 730.
26. Qian, K. Y.; Cui, S. W.; Nikiforuk, J.; Goff, H. D.; *Carbohydr. Res.* **2012**, *362*, 47.
27. Makarova, E. N.; Patova, O. A.; Shakhmatov, E. G.; Kuznetsov, S. P.; Ovodov, Y. S.; *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1817.
28. Canteri, M. H. G.; Moreno, L.; Wosiacki, G.; Scheer, A. de P.; *Polímeros* **2012**, *22*, 149.
29. Kar, F.; Arslan, N.; *Carbohydr. Polym.* **1999**, *40*, 277.
30. Corredig, M.; Wicker, L.; *Food Hydrocolloids* **2001**, *15*, 17.
31. Einhorn-Stoll, U.; Kunzek, H.; *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 40.