



OBTENÇÃO DE EMULSIFICANTES NATURAIS A PARTIR DE PECTINA CÍTRICA

Daniel de Melo Martins dos Santos

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Professor Daniel Weingart Barreto, DSc

Professor Bernardo Dias Ribeiro, DSc

Fevereiro de 2018

OBTENÇÃO DE EMULSIFICANTES NATURAIS A PARTIR DE PECTINA CÍTRICA

Daniel de Melo Martins dos Santos

Projeto final de curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenharia Química.

Aprovado por:

Tatiana Félix Ferreira, DSc

Evelin Andrade Manoel, DSc

Felipe Valle do Nascimento, M.Sc.

Orientado por:

Daniel Weingart Barreto, DSc

Bernardo Dias Ribeiro, DSc

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Fevereiro de 2018

Santos, Daniel de Melo Martins

Obtenção de emulsificantes naturais a partir de pectina cítrica/ Daniel de Melo Martins dos Santos. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ. 2018.

ix, 41 p.; il.

(Projeto Final) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2018.

Orientadores: Daniel Weingart Barreto e Bernardo Dias Ribeiro.

1. Pectina 2. Surfactantes 3. Emulsificantes 4. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Daniel Weingart Barreto e Bernardo Dias Ribeiro. I. Surfactantes naturais de pectina

AGRADECIMENTOS

Embora esse trabalho contenha apenas um autor, ele não é fruto de um trabalho individual. Por isso, vão aqui os agradecimentos a todos que de alguma forma ajudaram de uma forma ou de outra que esse trabalho pudesse ser concluído.

Primeiramente, a minha família que permitiu que eu estudasse na UFRJ e me deu apoio nos momentos mais difíceis.

Aos professores Daniel Weingart Barreto e Bernardo Dias Ribeiro, que propuseram a ideia original do trabalho e forneceram apoio na forma de conselhos e correções.

A aluna Louise Sobral, por fornecer o óleo essencial de laranja, derivado da sua monografia, utilizado nos experimentos do presente trabalho.

Aos membros do Laboratório De Tecnologia De Produtos Naturais, que ajudaram na condução dos experimentos.

Aos laboratórios LADEBIO e Greentec, por disponibilizarem equipamentos necessários a condução de análises.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, todos os professores e funcionários, por sustentarem o ambiente que permitiu a realização deste trabalho.

Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenharia Química.

OBTENÇÃO DE EMULSIFICANTES NATURAIS A PARTIR DE PECTINA CÍTRICA

Daniel de Melo Martins dos Santos

Fevereiro, 2018

Orientadores: Professor Daniel Weingart Barreto, DSc

Professor Bernardo Dias Ribeiro, DSc

A produção de *Citrus* representa a maior colheita frutífera do mundo sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais. Essa produção gera enorme quantidade de resíduos com o potencial de produção de produtos de maior valor agregado. Um desses produtos é a pectina, agente geleificante utilizado na produção de geleias e conservas. A pectina, no entanto, é capaz de ainda ser posteriormente transformada em surfactante polimérico com a capacidade de estabilizar emulsões água-em-óleo. Este trabalho tem como objetivos o estudo dos métodos necessários para a realização da transformação de pectina de origem cítrica em um surfactante polimérico, a análise da capacidade deste surfactante polimérico de estabilizar emulsões de óleos de origem vegetal em água e propor processo industrial para a produção do mesmo. As etapas tomadas para cumprir esse objetivo consistiram em despolimerização em meio ácido de pectinas de origem cítrica, a caracterização das mesmas em relação a suas propriedades moleculares, o preparo de emulsões de óleos vegetais em água utilizando-se a pectina despolimerizada como surfactante e a análise da estabilidade dessas emulsões ao decorrer do tempo.

Palavras Chave: Pectina, Surfactantes, Emulsificantes, *Citrus*.

ÍNDICE

Capítulo 1	Introdução	1
Capítulo 2	Objetivos	3
2.1	Geral	3
2.2	Específicos	3
Capítulo 3	Revisão bibliográfica	4
3.1	Surfactantes	4
3.1.1	Estrutura Hidrofílica dos surfactantes	5
3.1.2	Estrutura hidrofóbica de surfactantes	6
3.1.3	Outras propriedades de surfactantes	6
o	Formação de espuma	7
o	Molhamento	7
o	Solubilização	7
o	Emulsificação	7
o	Dispersão	7
o	Detergência.....	7
3.2	Nomenclatura	7
3.2.1	Surfactantes, emulsificantes e surfactantes poliméricos.....	7
3.2.2	Biosurfactantes	7
3.3	Emulsões	7
3.4	Pectinas.....	8
3.4.1	Estrutura química de pectinas.....	8
3.4.2	Obtenção e produção comercial de pectinas.....	10
3.4.3	Formação de géis	10
3.4.4	Propriedades emulsificantes de pectinas	10

3.4.5	Despolimerização de pectinas	11
3.4.6	Hidrólise enzimática	12
Capítulo 4	Materiais e métodos	13
4.1	Materiais	13
4.2	Métodos	13
4.2.1	Desmetilação da Pectina Grinsted LA210	13
4.2.2	Determinação do grau de esterificação	14
4.2.3	Método de Miller para determinação da evolução da despolimerização	15
4.2.4	Medição da viscosidade relativa	15
4.2.5	Determinação da viscosidade intrínseca	17
4.2.6	Determinação da massa molar pela viscosidade intrínseca	18
4.2.7	Método de despolimerização	19
4.2.8	Preparo de emulsões óleo em água	20
4.2.9	Análise da estabilidade de emulsão	20
Capítulo 5	– Resultados e discussão	21
5.1	Desmetilação da pectina LA Grinsted	21
5.2	Despolimerização térmica das pectinas	21
5.3	Titulação das pectinas	22
5.4	Teste de Miller	23
5.5	Medição da viscosidade relativa	24
5.6	Determinação da viscosidade intrínseca	25
5.7	Determinação da massa molar	28
5.8	Preparo de emulsões óleo em água	28
5.9	Análise do grau de emulsificação	29
Capítulo 6	Proposta de processo	33

Capítulo 7	Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	36
7.1	Sugestões para trabalhos futuros	36
	Referências Bibliográficas.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Produção mundial de <i>Citrus</i> em 2016.	1
Figura 3-1 Estrutura simplificada de um surfactante.	4
Figura 3-2 Micela envolta por moléculas de água.....	5
Figura 3-3 Surfactante polimérico adsorvido em óleo	8
Figura 3-4 Estrutura da pectina.	9
Figura 3-5 Regiões <i>Smooth</i> e <i>Hairy</i> da pectina.	9
Figura 3-6 Decréscimo da viscosidade devido a despolimerização térmica.	12
Figura 4-1 Viscosímetro capilar	16
Figura 4-2 Exemplo de regressão linear para a Equação de Huggins.	18
Figura 5-1 Despolimerização	22
Figura 5-2 Viscosímetro utilizado para determinação das viscosidades	24
Figura 5-3 Regressão linear da alíquota 0 da pectina de alto GE.....	26
Figura 5-4 Regressão linear da alíquota 4 da pectina de alto GE.....	26
Figura 5-5 Regressão linear da alíquota 8 da pectina de alto GE.....	26
Figura 5-6 Regressão linear da alíquota 0 da pectina de baixo GE.....	27
Figura 5-7 Regressão linear da alíquota 4 da pectina de baixo GE.....	27
Figura 5-8 Regressão linear da alíquota 8 da pectina de baixo GE.....	27
Figura 5-9 Palmitato de sódio.....	29
Figura 5-10 Separação completa da mistura d-limoneno e Alíquota 0	29
Figura 5-11 Distribuição do tamanho das gotículas em pH 3-3,5.....	31
Figura 5-12 Distribuição do tamanho das gotículas em pH 7	31
Figura 6-1 Fluxograma de Processo	33

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4-1 Constantes de Mark-Houwink para diferentes soluções pectínicas	19
Tabela 5-1 Resultado das titulações pré-despolimerização	22
Tabela 5-2 Resultado das titulações pós-despolimerização	23
Tabela 5-3 Valores de absorbância das amostras analisadas por DNS	23
Tabela 5-4 Concentração das amostras analisadas por DNS.....	23
Tabela 5-5 Viscosidades relativas para cada concentração analisada	25
Tabela 5-6 Viscosidades intrínseca das alíquotas	28
Tabela 5-7 Massa molecular das alíquotas	28
Tabela 5-8 Tamanho de gotículas em emulsões.....	30

Capítulo 1 Introdução

Frutos do gênero *Citrus* representam mundialmente a mais importante colheita arbórea em termos econômicos. (SELLI *et al.*, 2016) Apenas em 2016 mais de 124 milhões de toneladas de frutas cítricas foram produzidas, grande parte dessa produção ocorrendo no Brasil que é um dos maiores produtores de frutos do gênero *Citrus* e o maior produtor de laranjas (*Citrus x sinensis*) do mundo. (FAO, 2016)

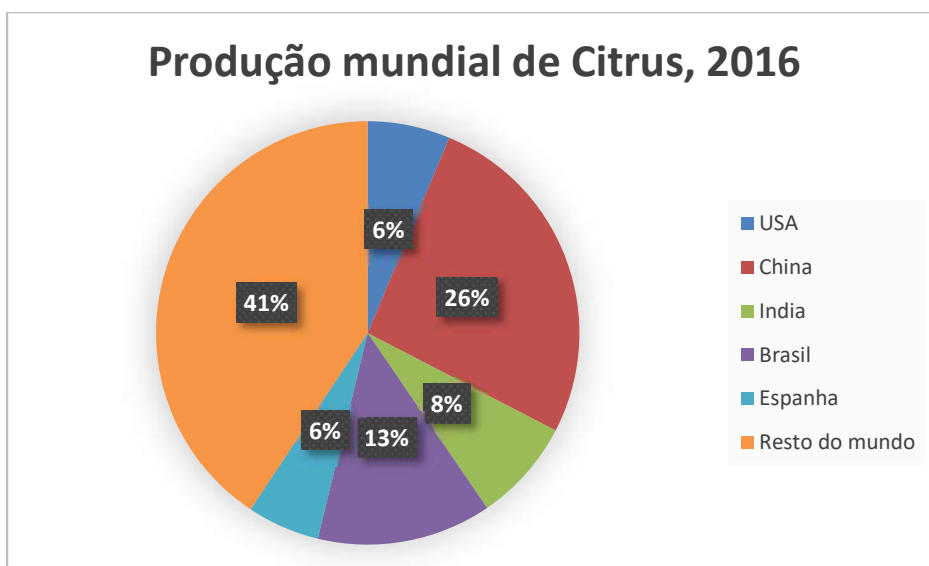


Figura 1-1 Produção mundial de *Citrus* em 2016.
Elaborado pelo autor a partir de dados de FAO, 2016.

A maior parte dessa produção é destinada ao processamento para a produção de sucos e concentrados, gerando grande quantidade de resíduos, especialmente na forma de cascas. Esse resíduo pode então ser processado para a produção de óleos essenciais, pectina ou desidratado e transformado em *pellets* destinados ao consumo animal. (VAN BOEKEL, 2012 e SELLI *et al.*, 2016)

No Brasil, a maior dos resíduos é aproveitada. No entanto, devido à enorme quantidade de resíduos cítricos gerados, o alto teor de umidade que torna difícil a desidratação em equipamentos não especializados e a comparativa baixa demanda por pectina e outros produtos gerados pelo pós-tratamento dos resíduos cítricos, em outros lugares do mundo, uma grande parte dos resíduos cítricos ainda é despejada em aterros sanitários todos os anos. Esses resíduos contêm grande quantidade de matéria orgânica e apresentam risco ambiental devido a sua alta fermentabilidade. (TRIPODO *et al.*, 2004; KAPARAJU *et al.*, 2006; POURBAFRANI *et al.*; 2010 e VAN BOEKEL, 2012)

Uma maneira de aumentar o estímulo para que esses resíduos sejam devidamente tratados é o desenvolvimento de subprodutos de maior valor agregado a partir dos resíduos da indústria de processamento de *citrus*.

Por motivos econômicos e ambientais, o uso de fontes naturais para a produção de surfactantes e outros agentes que ajudem a estabilização de emulsões, vem atraindo considerável interesse. No presente momento a maioria dos surfactantes e emulsificantes ainda são produzidos a partir de petroquímicos ou derivados de fontes naturais escassas como a goma arábica, que é produzida apenas em alguns poucos países africanos (com o Sudão dominando 80% do mercado produtor da goma). Existem, porém, referências na literatura científica de surfactantes poliméricos de polissacarídeos, como por exemplo, surfactantes baseados em alginato e emulsificantes derivados de pectina. (HOLMBERG, 2001; KUKHETPITAKWONG *et al.*, 2009 e ARIS *et al.*, 2017).

A pectina é um subproduto da produção de sucos cítricos e atualmente seu maior uso se dá como agente geleificante em produtos como geleias e conservas. (STEPHEN, 2006) No entanto, o uso de pectinas como emulsificante, tanto em sua forma polimérica de alta massa molar como é normalmente encontrada após os processos de extração comerciais mais comuns, como na forma de oligômeros produzidos pela despolimerização controlada de pectinas, é conhecido, embora não seja altamente difundido. No caso das formas despolimerizadas há relatos de que esses oligômeros são capazes não só de estabilizar emulsões água-em-óleo, como também apresentam características surfactantes tradicionais como a diminuição da tensão interfacial. (LOTZKAR *et al.*, 1945 e MAZOYER *et al.*, 2002)

Em vista disso, propõe-se desenvolver um processo para a obtenção de pectinas que demonstrem propriedades emulsificantes e surfactantes e utilizar essa ação para manter a estabilidade de emulsões óleo-em-água. Utilizando-se de métodos que adiram aos princípios da química e engenharia verde.

Capítulo 2 Objetivos

2.1 Geral

Desenvolver processo para a transformação de pectinas de origem cítrica em surfactante capaz de emulsionar e estabilizar emulsões água-em-óleo de óleos de origem vegetal.

2.2 Específicos

- Desmetilar pectina de origem comercial, obtendo pectina de grau de esterificação mais baixo do que as encontradas comercialmente.
- Despolimerizar pectinas (comerciais e desmetiladas), obtendo diferentes oligômeros que diferem em sua massa molecular e grau de esterificação. Descrevendo as condições e materiais necessários para tal.
- Quantificar a massa molar e grau de esterificação das pectinas produzidas.
- Preparar emulsões óleo-em-água com tais pectinas e aferir sua estabilidade.
- Relacionar as diferentes propriedades das pectinas, como sua massa molar e grau de esterificação com sua capacidade emulsificante e estabilizante.

Capítulo 3 Revisão bibliográfica

3.1 Surfactantes

Surfactantes, do inglês, surfactant (contração de **surface-active agent**, agente ativo em superfície) são substâncias, que quando presentes em baixas concentrações em um sistema composto principalmente por um solvente, tem a habilidade de adsorverem nas interfaces (limite entre duas fases imiscíveis) ou superfícies (interface onde uma das fases é gasosa) do dito sistema e alterarem as energias livres dessas superfícies ou interfaces. (ROSEN *et al.*, 2012)

Essas substâncias, surfactantes, são compostos orgânicos cuja estrutura é anfipática, ou seja, composta por uma parte liofóbica, que possui pouca atração pelo solvente, e outra parte liofílica, que possui grande atração pelo solvente. (FARN, 2006)

A capacidade de um grupo químico ser liofóbico ou liofílico depende do solvente em que se encontra, em solventes apolares, como por exemplo o heptano, um grupo iônico ou polar, pode atuar como a parte liofóbica do composto. (ROSEN *et al.*, 2012)

Porém, no caso mais comum e foco do trabalho, em que o solvente onde o surfactante está disperso é a água, as partes liofílicas costumam ser compostas por grupos polares ou iônicos e a parte liofóbica da molécula costuma ser composta por hidrocarbonetos, perfluorohidrocarbonetos, siloxanos ou polioxipropileno (ou butileno). Quando o solvente é a água, essas partes, liofóbica e liofílica, são conhecidas, respectivamente, como hidrofóbicas e hidrofílicas. (ROSEN *et al.* 2012 e RIBEIRO, 2012)

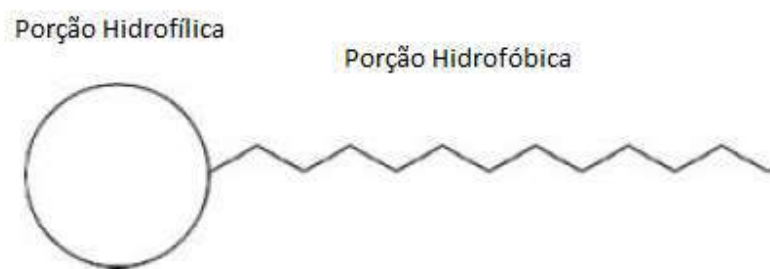


Figura 3-1 Estrutura simplificada de um surfactante.
Adaptado de FARN, 2006, página 2.

A presença de propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas concomitantemente em surfactantes dá origem a características peculiares. Quando uma molécula surfactante é dissolvida em água, por exemplo, sua região hidrofóbica distorce a conformação da água quebrando ligações de

hidrogênio e reestruturando as moléculas de água em torno da região hidrofílica, o que causa um aumento da energia livre do sistema. O sistema pode responder a esse aumento de energia livre de duas maneiras, adsorção e agregação (também conhecida como micelização). (ROSEN *et al.*, 2012)

Na adsorção as moléculas surfactantes irão migrar para a superfície (interface com o ar) e nas interfaces com a fase sólida (paredes de um recipiente, por exemplo), orientadas de forma que se minimize o contato das partes hidrofóbicas com a água. Já na agregação as moléculas surfactantes formam estruturas nas quais as partes hidrofílicas se mantêm em contato com a água enquanto as hidrofóbicas ficam no interior de micelas. Esse processo de micelização dá origem a diversas estruturas que podem variar desde formas esféricas e cilíndricas até a formas planares. Essas estruturas dão origem a diversos núcleos hidrofóbicos, com a capacidade de atrair moléculas apolares, insolúveis em água, estabilizando-as em solução na forma de gotículas. (FARN, 2006)

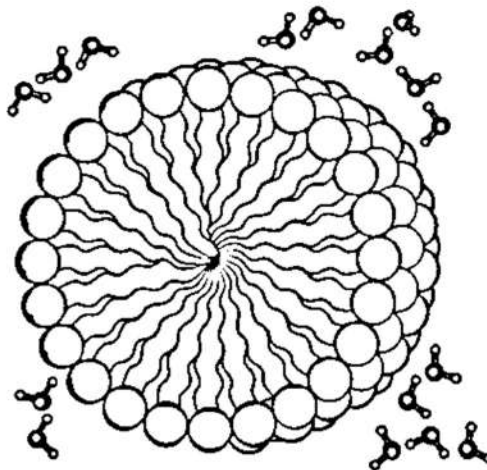


Figura 3-2 Micela envolta por moléculas de água.
Adaptado pelo autor de COX *et al.*, 2005, página 53.

3.1.1 Estrutura Hidrofílica dos surfactantes

A porção hidrofílica do surfactante afeta de maneira crucial como ele interage com as outras moléculas em um sistema e por essa razão os surfactantes são normalmente classificados pela natureza da sua porção hidrofílica da seguinte maneira: (ROSEN *et al.*, 2012)

- Aniônicos
- Catiônicos
- Anfóteros

- Não-iônicos

Uma maneira de ilustrar como os diferentes tipos de porções hidrofílicas alteram o efeito que um surfactante causa ao ser adicionado em um determinado sistema é observar o que ocorre quando um surfactante catiônico (carga positiva em sua porção hidrofílica) é adicionado a uma superfície. A maior parte das superfícies naturais é negativamente carregada, e conseqüentemente caso um surfactante catiônico seja aplicado sobre a mesma esse terá a porção catiônica atraída para a superfície e a porção oposta, hidrofóbica, formará uma camada repelente a água sobre a superfície. Caso a superfície fosse positivamente carregada, no entanto, para se obter o mesmo efeito deveria ser utilizado um surfactante aniônico. (ROSEN *et al.*, 2012)

3.1.2 Estrutura hidrofóbica de surfactantes

A estrutura da porção hidrofóbica também afeta a performance de surfactantes. De maneira geral podemos destacar:

- **Tamanho do grupo hidrofóbico:** Cadeias hidrofóbicas mais longas conferem menor solubilidade ao surfactante em meio aquoso e maior solubilidade em solventes apolares, aumenta a formação de micelas, aumenta a probabilidade de surfactantes iônicos precipitarem e causa empacotamento mais denso das moléculas surfactantes nas interfaces. (ROSEN *et al.*, 2012)
- **Ramificação e insaturações:** A presença de ramificações e insaturações causa aumento de solubilidade do surfactante tanto em água como em solventes orgânicos, diminui o ponto de fusão do surfactante, pode causar maior instabilidade térmica, causa menor densidade de empacotamento nas interfaces e no caso de compostos insaturados pode tornar o surfactante mais susceptível a oxidação. (ROSEN *et al.*, 2012)
- **Núcleos aromáticos:** A presença de núcleos aromáticos costuma diminuir a biodegradabilidade de um surfactante, aumenta a sua adsorção em superfícies polares e causa empacotamento menos denso das moléculas surfactantes nas interfaces. (ROSEN *et al.* 2012)

3.1.3 Outras propriedades de surfactantes

Além da micelização e adsorção descritas anteriormente, a adição de surfactantes a um sistema e sua interação a nível molecular com os outros componentes do sistema causa outros efeitos macroscópicos, como: (lista de FARN, 2006)

○ **Formação de espuma**

○ **Molhamento**

○ **Solubilização**

○ **Emulsificação**

○ **Dispersão**

○ **Detergência**

3.2 Nomenclatura

3.2.1 Surfactantes, emulsificantes e surfactantes poliméricos

A diferença entre surfactantes e emulsificantes nem sempre é clara. Diversos surfactantes tradicionais, com alta atividade superficial atuam como emulsificantes, porém, polímeros naturais como pectinas e alginatos, embora sejam capazes de emulsificar óleos em água, apresentam baixa atividade superficial (medida pela redução de tensão superficial em solução aquosa). Segundo Porter, (1991), no entanto, pode-se considerar essa classe de compostos como surfactantes poliméricos, e essa definição é a utilizada no presente texto.

3.2.2 Biosurfactantes

Estritamente falando, biosurfactantes são aqueles surfactantes obtidos diretamente de uma fonte biológica, como uma planta, animal ou microrganismo, sem modificações, como por exemplo, os rhamnolipídeos produzidos pela *Pseudomonas aeruginosa*, o surfactin um lipopeptídeo produzido pelo *Bacillus subtilis* ou a lecitina de soja, uma mistura contendo até 75% de fosfolipídeos, além de triglicerídeos extraída dos grãos de soja (*Glycine max*). No entanto, em um sentido mais amplo pode se referir a surfactantes sintetizados a partir de fontes biológicas. (SCHOLFIELD, 1981; MULLIGAN, 2005; XU *et al.*, 2011)

3.3 Emulsões

Uma emulsão é um sistema constituído por duas fases líquidas imiscíveis, em que uma está dispersa na outra na forma de gotículas. A fase presente na forma de gotículas é conhecida como fase dispersa e a fase em que as gotículas se encontram suspensa é conhecida como fase contínua. Comumente encontramos dois tipos de emulsão, água-em-óleo e óleo-em-água, embora sistemas mais complexos como água-em-óleo-em-água também existam. (AULTON *et al.*, 2013)

Emulsões, principalmente na forma água-em-óleo, são frequentemente usadas em fármacos, cosméticos, alimentos, pesticidas, produtos de higiene pessoal e outras inúmeras aplicações. (ROSEN *et al.* 2012).

Emulsões podem ser classificadas como macroemulsões, sistemas inerentemente instáveis contendo partículas maiores que $0.1\mu\text{m}$, normalmente entre $0.1\mu\text{m}$ e $100\mu\text{m}$, ou microemulsões sistemas termodinamicamente estáveis contendo partículas menores que $0.1\mu\text{m}$. (ROSEN *et al.* 2012 e AULTON *et al.*, 2013)

Em ambos os casos a estabilidade prolongada de uma emulsão depende da presença de moléculas auxiliares, conhecidas como emulsificantes, normalmente surfactantes. Esses emulsificantes estabilizam emulsões ao adsorverem na superfície de uma gotícula e reduzirem a tensão interfacial entre as duas fases (dispersa e contínua), além de tornarem mais infrequente a coalescência entre gotículas por razões de bloqueio estérico. (AULTON *et al.*, 2012)

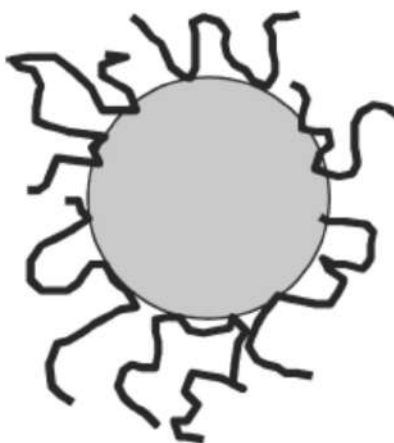


Figura 3-3 Surfactante polimérico adsorvido em óleo

Fonte: MYERS, 2006

3.4 Pectinas

Pectinas são um grupo complexo de heteropolissacarídeos estruturais compostos principalmente por unidades de ácido galacturônico. Elas podem ser encontradas em diversos tecidos de plantas, porém são especialmente abundantes nas paredes celulares de frutas e tecidos jovens. (VAN BUREN, 1991)

3.4.1 Estrutura química de pectinas

Não é possível definir uma estrutura fixa para pectinas, porém de maneira geral, sua estrutura é dominada por uma cadeia linear de unidades de ácido α -D-galacturônico ligadas com ligações glicosídicas 1-4, aleatoriamente combinadas, com interrupções periódicas por resíduos de α -L-ramnose em ligações 1-2. (BEMILLER, 1986)

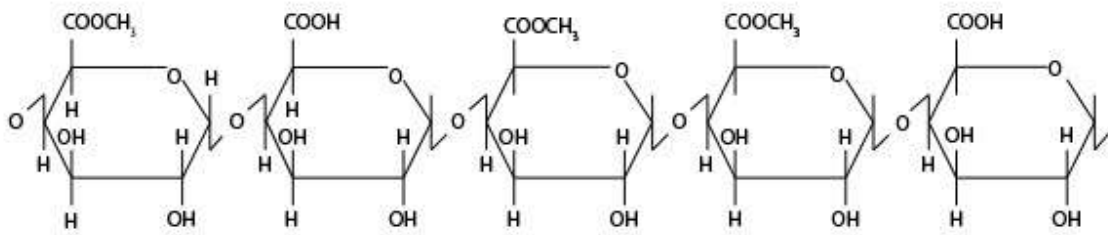


Figura 3-4 Estrutura da pectina.
 Adaptado de PAWAR *et al.*, 2015.

Os grupos carboxila das unidades de ácido galacturônico são parcialmente esterificados por metanol, dependendo da origem da pectina e do seu modo de extração. Essa propriedade é conhecida como o grau de esterificação da pectina (GE), que é definido como a proporção de unidades de ácido galacturônico esterificado em relação com a quantidade total de unidades de ácido galacturônico presentes na pectina analisada. (STEPHEN, 2006)

A maioria das pectinas é composta por longas regiões, conhecidas em inglês como *Smooth*, formadas unicamente por ácido galacturônico (70-100 unidades) interrompidos por unidades de ramnose. A essas unidades de ramnose são ligados açúcares neutros formando regiões ramificadas conhecidas como *Hairy*. Esses açúcares neutros normalmente são constituídos de galactose e arabinose, formando cadeias de galactano e arabinano respectivamente. A quantidade e localização de unidades de ramnose é dependente da fonte da pectina. (COLQUHOUN *et al.*, 1990; HWANG *et al.*, 1993 e STEPHEN, 2006)

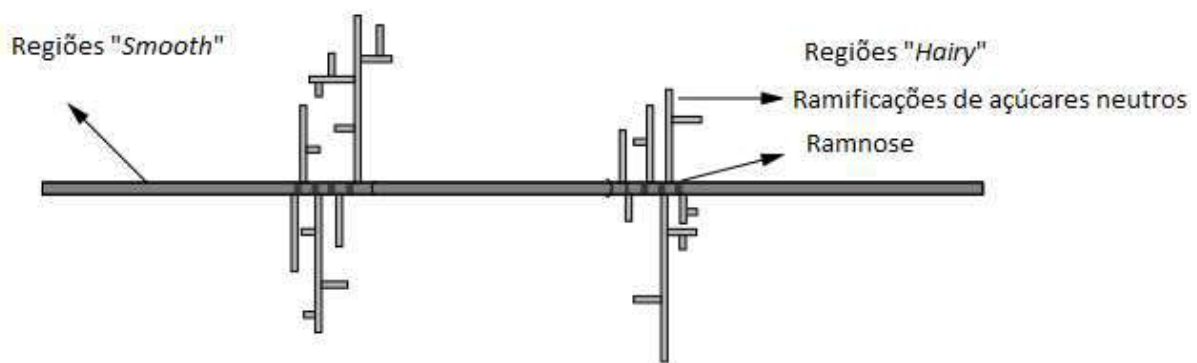


Figura 3-5 Regiões *Smooth* e *Hairy* da pectina.
 Adaptado de RALET, 2002.

No entanto, como a maioria das pectinas são extraídas comercialmente em condições ácidas e de elevada temperatura, muitas das regiões *Hairy* são hidrolisadas. (STEPHEN, 2006)

Há também, principalmente em pectinas de fontes menos convencionais, como as extraídas de beterraba, uma presença considerável de grupos acetil esterificando grupos hidroxila secundários dos ácidos galacturônicos. Como a maioria dos polissacarídeos naturais, pectinas apresentam heterogeneidade estrutural e em relação a massa molar, não sendo então, possível oferecer uma estrutura precisa para cada tipo de pectina. (HWANG *et al.*, 1993)

Também deve-se notar que embora tratada como um polissacarídeo, como as paredes celulares de onde pectinas são extraídas são ricas em proteínas do tipo hidroxiprolina, pectinas são encontradas naturalmente complexadas a esse tipo de proteína, mesmo após sua extração ácida. Essas proteínas hidroxiprolina, possivelmente influenciam a interação entre pectinas e substratos, como proteínas lácticas, que podem ser estabilizadas em pH baixos pela adição de pectina. (KRAVTCHENKO *et al.*, 1992 e PARKER *et al.*, 1994)

3.4.2 Obtenção e produção comercial de pectinas

Resíduos da indústria de sucos, tanto de maçã como de frutas cítricas, são as maiores fontes de pectina industrialmente, podendo conter no caso da casca de certas frutas cítricas, como a laranja, até 35% em massa seca de pectina. Esses resíduos costumam serem limpos, fervidos e secos, com o objetivo de remover impurezas e principalmente desativar enzimas presentes nos tecidos frutíferos que poderiam hidrolisar as pectinas após a extração. Após esse pré-tratamento, os resíduos são extraídos em solução aquosa de baixo pH (1,5 a 3, pela adição de ácido clorídrico, nítrico ou sulfúrico), o que causa a solubilização das substâncias pécticas. Sob essas condições algum grau de despolimerização e desesterificação invariavelmente ocorre. Essa solução é então filtrada para a remoção de material sólido remanescente e precipitada pela adição de álcool (álcool isopropílico, etanol ou metanol). (NELSON *et al.*, 1977)

3.4.3 Formação de géis

A capacidade de pectinas formarem géis em determinadas condições é responsável pela maior parte de suas aplicações industriais, principalmente na indústria alimentícia. Dois tipos clássicos de géis de pectina são os de alto GE obtidos em pHs baixos (em torno de 3) e sob a presença de co-solutos, normalmente sacarose, e os de baixo GE obtidos pela adição de íons de cálcio, com ou sem a presença de açúcares, sob vários pHs. (NELSON *et al.*, 1977)

3.4.4 Propriedades emulsificantes de pectinas

Sendo um polissacarídeo, pectinas não são tradicionalmente consideradas como surfactantes, porém as propriedades emulsificantes da pectina vem sendo estudadas há muitas décadas, sendo

utilizada como alternativa a gomas emulsificantes tradicionais como a Acacia ou a goma arábica, com resultados medíocres, com exceção das pectinas acetiladas derivadas da beterraba que demonstraram alta atividade de superfície e capacidade de produzir e estabilizar emulsões de óleos vegetais em água. As propriedades surfactantes e emulsificantes desse tipo de pectina foram atribuídas a presença dos grupos acetil que demonstram caráter hidrofóbico. (LOTZKAR *et al.*, 1945)

No entanto, nos últimos 15 anos, as propriedades emulsificantes da pectina despertaram maior interesse após estudos demonstrarem que processos de despolimerização concedem maior poder surfactante e emulsificante a pectina cítrica que possui menos de 0.8% de grupos acetil em comparação aos 2-9% encontrados nas pectinas da beterraba. (MAZOYER *et al.*, 2002)

A razão dessa propriedade emulsificante ainda é desconhecida, com MAZOYER *et al.* (2013), sugerindo como possíveis causas a presença de proteínas ligadas a pectina em um mecanismo similar ao que ocorre na goma arábica ou a mecanismos de estabilização estéricos e mecânicos similares aos que ocorrem em celulose microcristalina.

3.4.5 Despolimerização de pectinas

Para a despolimerização da pectina diversas técnicas são descritas na literatura científica, dentre elas pode-se destacar os métodos de hidrólise em meio ácido, básico ou a hidrólise enzimática.

3.4.5.1 Hidrólise Alcalina

Sob condições alcalinas, especialmente em altas temperaturas, ocorre uma rápida degradação de pectinas, envolvendo tanto de-esterificação (saponificação) como quebra das ligações glicosídicas, despolimerização. (RENARD *et al.*, 1996)

3.4.5.2 Hidrólise ácida

O aquecimento de soluções contendo pectinas a temperaturas acima de 70°C, no pH naturalmente ácido das soluções de pectina leva a uma marcada despolimerização após espaços curtos de tempo, com decréscimos suaves (2 a 7%) no grau de esterificação, como medido por viscosidade intrínseca. (MERRILL *et al.*, 1945)

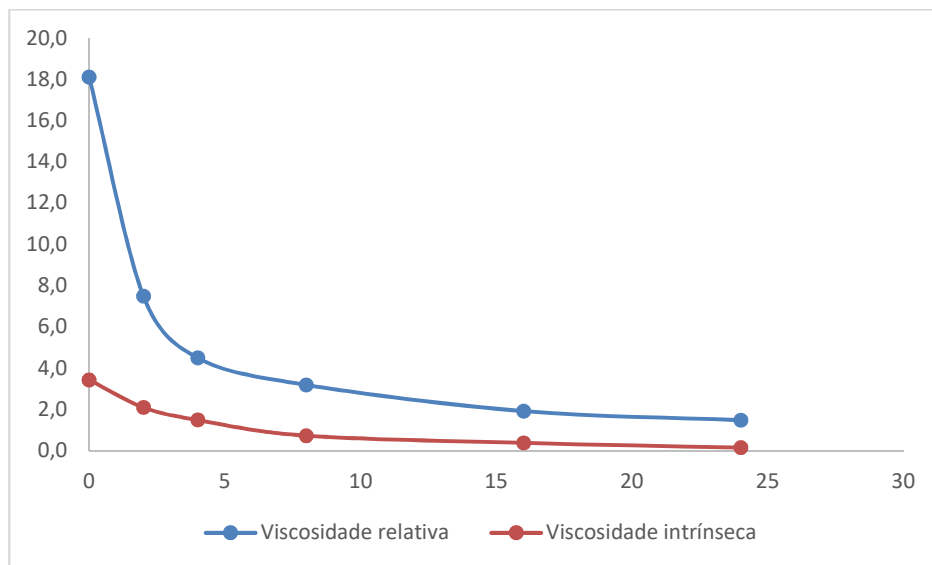


Figura 3-6 Decréscimo da viscosidade devido a despolimerização térmica.
Solução de 2% de pectina cítrica, aquecida a 90°C, diluída para 1% para aferição da viscosidade.

Adaptado pelo autor de Merrill, 1945.

Porém, é importante notar que essa despolimerização não é completa a despeito da queda de viscosidade. Mesmo com a adição de ácidos minerais e condições drásticas (100°C) esse processo se mostrou insuficiente para a despolimerização completa de pectinas. Gerando apenas oligômeros compostos por cadeias de ácido galacturônico, de massa molecular muito superior ao monômero de ácido galacturônico, além de subprodutos como lactonas. (GARNA *et al.*, 2005).

3.4.6 Hidrólise enzimática

Outra opção para a hidrólise das cadeias de ácido galacturônico é a utilização de enzimas que hidrolisam as ligações 1-4 entre ácidos galacturônicos. Esse tipo de hidrólise causa grande despolimerização das cadeias de ácido poligalacturônico e alta recuperação do ácido monomérico, mostrando que é capaz de realizar a hidrólise sem degradar posteriormente o ácido galacturônico. (GARNA *et al.*, 2005)

Capítulo 4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

Dois tipos de pectina cítrica comerciais foram utilizados durante os experimentos, uma de alto grau de esterificação e outra de baixo. Como pectina de alto grau de esterificação foi utilizada a pectina da marca Exôdo Química, com valor nominal de 68% de esterificação. A pectina Grindsted Pectin LA210 de grau de esterificação nominal 34% foi escolhida como a pectina de baixo grau de esterificação. Como padrão de ácido galacturônico utilizou-se ácido D-(+)-Galacturônico da Sigma-Aldrich.

Como óleos foram utilizados óleo essencial de laranja extraído no Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais da UFRJ de composição conhecida como sendo 96% d-limoneno (SOBRAL, 2015) e óleo de girassol.

A enzima utilizada foi Pectinex® Yieldmash da Novozymes.

Equipamentos:

- Microscópio óptico NIKON Eclipse Ti-E
- Viscosímetro de Ubbelohde
- Agitador mecânico IKA RW-20
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1800

A desmetilação, despolimerização e preparo de emulsões foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais da UFRJ, do professor Daniel Weingart Barreto. A titulação, determinação da viscosidade e análise com microscópio foi realizada nos laboratórios da Greentec, do professor Donato Aranda, também localizados na UFRJ. A análise espectrofotométrica com DNS foi realizada no LADEBIO-UFRJ, do professor Nei Pereira.

4.2 Métodos

4.2.1 Desmetilação da Pectina Grinsted LA210

Para a desmetilação da Pectina Grinsted LA210, preparou-se 500mL de solução contendo 20,0 g de pectina. Para se obter total solubilização da pectina e evitar a formação de aglomerados umectou-se previamente a pectina sólida com 5mL de álcool isopropílico. O sólido umedecido com álcool foi lentamente vertido sobre recipiente contendo água com 0.1M de NaCl sobre agitação mecânica de 300 RPM.

A solução foi mantida sobre agitação por 30 minutos para garantir a dissolução completa da pectina.

Após isso acrescentou-se 1mL da enzima Pectinex® YieldMash e a solução foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24h.

Decorridas as 24h precipitou-se a pectina da solução por adição de igual volume de álcool isopropílico e refrigeração da mesma.

A solução foi centrifugada a 4.000 RPM por 20 minutos para se obter maior rendimento.

4.2.2 Determinação do grau de esterificação

Pode-se encontrar na literatura diversos métodos para a quantificação do grau de esterificação de pectinas. LUZIO *et al.*, 2013, descreve, por exemplo, como técnicas de cromatografia podem ser utilizadas para determinação do GE após hidrólise alcalina e digestão dos resíduos por enzima pectinase.

No entanto, o método padrão, conforme descrito no Food Chemical Codex, ainda é o da titulação ácido-base com fenolftaleína como indicador. (NAS, 1972)

Dessa maneira, para se determinar o grau de esterificação das pectinas utilizou-se o método da titulação ácido-base. Nesse processo, inicialmente a quantidade de radicais carboxila livres é medida ao se titular com uma base forte como o hidróxido de sódio e fenolftaleína como indicador. O hidróxido de sódio reage com os grupos carboxil, formando ésteres de sódio. A quantidade de hidróxido de sódio pode ser relacionada diretamente a quantidade de grupos carboxil não metilados. Após essa fase inicial, a pectina é saponificada com uma quantidade em excesso de hidróxido de sódio para se remover os grupos metila(saponificação), a base excedente é neutralizada com um ácido forte e a solução é novamente titulada com fenolftaleína. A diferença indicando a quantidade de grupos metila. (HILLS *et al.*, 1945; NAS,1972 e LIN *et al.*, 1990).

No presente trabalho a titulação foi realizada da seguinte maneira:

250mg de pectina foi dissolvido em 25mL de água destilada. 2 gotas de fenolftaleína foram adicionadas. A titulação para neutralização dos ácidos carboxílicos livre foi realizada com NaOH 0.25M, o valor foi anotado como V1. 10mL de NaOH 0.25M foi adicionado, a mistura foi deixada em repouso por 2 horas para que ocorra a total saponificação dos grupos metila e 10mL de HCl 0.25M foi adicionado, o que causa o desaparecimento da cor rosa do indicador. A solução foi então titulada novamente com NaOH 0.25M e o valor foi anotado como V2. O grau de esterificação foi calculado pela fórmula:

$$GE\% = \frac{V_2}{V_2 + V_1} * 100$$

4.2.3 Método de Miller para determinação da evolução da despolimerização

Pectinas são compostas principalmente por unidades de ácido galacturônico polimerizadas. Quando esse polímero é hidrolisado, temos em solução o ácido galacturônico, um açúcar redutor, devido a presença de um grupo cetona. (BIZ *et al.*, 2014)

Sendo assim, o método baseado no uso do ácido 3,5-dinitrosalicílico, poderia ser utilizado para a determinação da quantidade de oligômeros com terminações em açúcares redutores.

O método basicamente consiste no preparo de uma solução contendo ácido 3,5-dinitrosalicílico, bissulfito de sódio, tartarato de sódio e potássio, fenol e hidróxido de sódio. Essa solução é então adicionada a amostra que se deseja analisar. A amostra é aquecida a temperaturas superiores a 90°C por pelo menos 5 minutos e tem sua absorvância mensurada em espectrofotômetro a 540nm. (MILLER, 1959)

No presente trabalho, a análise com DNS se baseou primeiramente em analisar soluções de ácido galacturônico com concentrações variando de 0,2g/L a 1g/L, e comparar as absorvâncias medidas durante o experimento.

O procedimento experimental consistiu em adicionar em um tubo de microcentrífuga 100µL de solução a ser analisada, seguido de 300µL de DNS. A amostra foi aquecida por 5 minutos, a 100°C em banho de água fervente e posteriormente resfriada em banho de gelo. 1500µL de água deionizada foram então adicionados e a amostra analisada em espectrofotômetro a 540nm e seus valores de absorvância anotados.

4.2.4 Medição da viscosidade relativa

A viscosidade relativa é a relação entre a viscosidade de uma solução e do seu solvente puro, como indicada na fórmula:

$$\eta_r = \eta / \eta_0$$

Para se calcular a viscosidade relativa pode-se usar um viscosímetro capilar como o representado na figura IV-1.

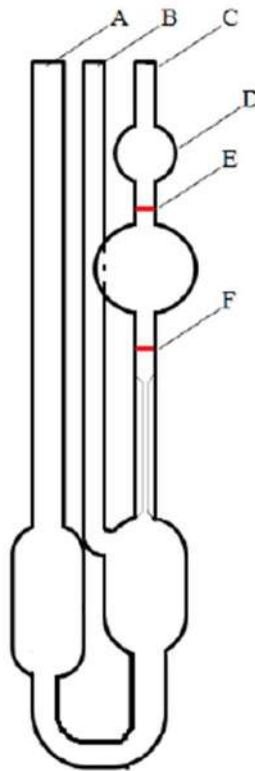


Figura 4-1 Viscosímetro capilar
Adaptado de HWANG, 2014.

O princípio de funcionamento desse tipo de viscosímetro pode ser compreendido através da equação de Poiseuille: (HIEMENZ *et al.*, 2007)

$$\eta = \frac{\pi R^4 h g \rho t}{8LV}$$

Onde η é a viscosidade dinâmica, t é o tempo que a amostra leva para o seu menisco descer de E para F na figura. V é o volume da amostra, R o diâmetro do capilar, L o seu comprimento, g a aceleração gravitacional, ρ a densidade do fluido e h a carga de pressão média do fluido.

Como para um mesmo viscosímetro as dimensões físicas são iguais, a viscosidade relativa de um solvente e sua solução com um soluto pode ser medida por um mesmo viscosímetro sabendo-se apenas o tempo necessário para cada uma das amostras percorrer o percurso de E para F da figura 4-1.

Pois,

$$\eta_r = \eta/\eta_0 = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0}$$

Trabalhando-se com soluções diluídas temos que $\rho \approx \rho_0$ e $\eta_r = t/t_0$.

No caso das soluções pectínicas, como seu solvente é água destilada, basta calibrar o viscosímetro em relação a água destilada e calcular para cada amostra que se deseja obter a viscosidade relativa e intrínseca o tempo que se leva para percorrer o viscosímetro.

É importante notar que a viscosidade é altamente dependente da temperatura, por isso os experimentos devem ser sempre realizados na mesma temperatura e deve-se garantir que os fluidos e equipamentos envolvidos estejam na mesma temperatura. (PERRY *et al.*, 2007)

No presente trabalho os experimentos foram realizados a 25°C.

Para se determinar o grau de hidrólise das pectinas despolimerizadas, soluções contendo 0,05; 0,01; 0,02 e 0,03 g/L de pectina em água destilada contendo 0,1M de NaCl foram preparadas.

Determinou-se inicialmente o tempo, t_0 , que o solvente (água com 0.1M de NaCl) necessitou para fluir através do viscosímetro.

A seguir mediu-se o tempo para que cada uma das alíquotas, em cada uma das concentrações indicadas na tabela, em triplicata, levou para fluir através do viscosímetro. Dividindo-se esse tempo pelo tempo que a água temos a viscosidade relativa.

4.2.5 Determinação da viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca é uma medida da habilidade de um determinado soluto de aumentar a viscosidade de uma solução em relação ao solvente puro, negligenciando efeitos associativos entre moléculas, e é definida pela equação (HIEMENZ *et al.*, 2007):

$$[\eta] \equiv \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta - \eta_0}{c\eta_0} \right)$$

Sendo η a viscosidade da solução contendo solvente e soluto e η_0 a viscosidade do solvente puro.

É uma propriedade única para cada sistema soluto-solvente, diferentemente da viscosidade relativa e específica que devido a efeitos não-ideais são dependentes da concentração do soluto. A viscosidade intrínseca é uma propriedade importante no estudo de macromoléculas, porém não pode ser medida diretamente pois sua definição considera que a concentração do soluto se aproxima de 0. (HIEMENZ *et al.*, 2007)

Uma das maneiras de se calcular a viscosidade intrínseca é a partir da viscosidade relativa. Primeiramente, definimos a viscosidade específica:

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

Com a viscosidade específica podemos calcular a viscosidade intrínseca através das equações de Schulz-Blaschke, Huggins, Kraemer ou Martin. No caso de soluções contendo pectinas a equação de Huggins é considerada a mais apropriada por apresentar resultados lineares. (ZHOU *et al.*, 2008)

Equação de Huggins: (HUGGINS, 1943)

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = [\eta] + K[\eta]\eta_{sp}$$

Considerando que para um dado sistema de soluto-solvente, viscosidade intrínseca e K (constante de Huggins) são constantes, e que em baixas concentrações a relação de η_{sp}/c versus η_{sp} apresenta resultados lineares, pode-se através de uma regressão linear de mínimos quadrados, achar a equação da reta que descreve o sistema na Equação de Huggins. Onde a viscosidade intrínseca e a constante de Huggins são representados pelo ponto em que a reta intercepta o eixo y e pela inclinação da reta respectivamente.

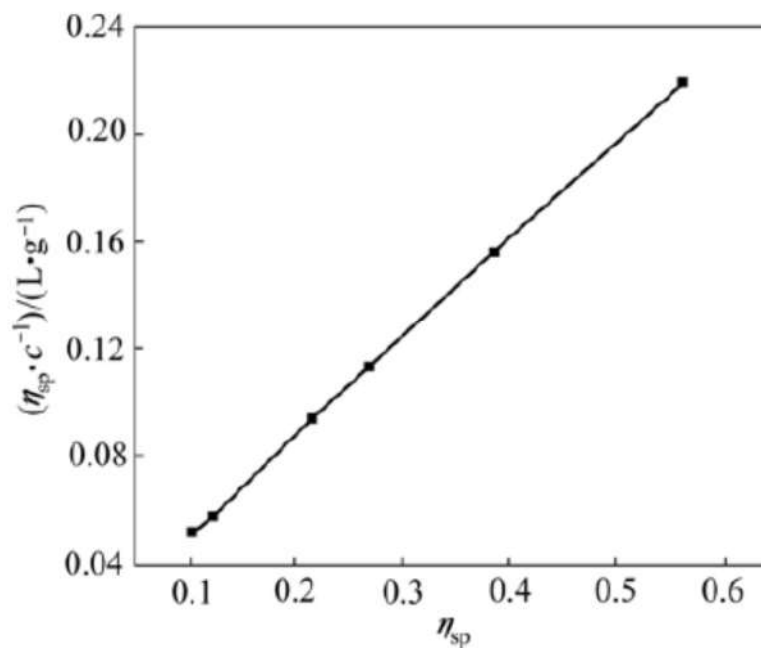


Figura 4-2 Exemplo de regressão linear para a Equação de Huggins.
De Zhou *et al.*, 2008.

No presente trabalho, os resultados para as amostras pectínicas foram obtidos a partir dos valores de viscosidade relativa obtidos como descritos na seção 4.2.4.

4.2.6 Determinação da massa molar pela viscosidade intrínseca

Uma das características que torna a viscosidade intrínseca uma propriedade tão importante no estudo de polímeros é que esta pode ser relacionada a massa molar de um polímero em solução através da equação de Mark–Houwink. (HIEMENZ *et al.*, 2007)

$$[\eta] = kM^a$$

As constantes k e a são conhecidas como parâmetros Mark-Houwink de um sistema e são dependentes do polímero e do solvente, além da temperatura.

Embora diversos valores sejam encontrados na literatura científica para essas constantes, no caso da pectina, assim como de outros biopolímeros, nem sempre esses valores são coerentes ao se comparar dados de autores diferentes. Como pode ser visto na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 Constantes de Mark-Houwink para diferentes soluções pectínicas (STEPHEN, 2006)

Pectina/solvente	A	K
Pectinas de citrus e maçã em 0.155M NaCl (pH 6,0)	1,34	1,4 x 10 ⁻⁶
Pectina de maçã (DE 73%) em 0.44M CH ₃ COOH+0.06M CH ₃ COONa + 0.1 M Na ₂ SO ₄ (pH 3.7)	0,79	0,049
Pectinas de citrus (DE 28-73%) em 0.1M NaCl (pH 7.0)	0,78	0,0436
Pectina de casca de laranja, 0,1M tampão de fosfato (pH 7,0)	0.82	0,023

Decidiu-se utilizar os valores de a=1,34 e K=1,4x10⁻⁶, por demonstrarem os valores mais próximos aos encontrados na literatura. (MAZOYER *et al.*, 2002 e ZHOU *et al.*, 2008)

4.2.7 Método de despolimerização

Para a hidrólise das pectinas foram preparadas soluções idênticas com a pectina Exôdo Química e a pectina Grinsted LA. Ambas as soluções contendo 500mL de água 0,1M de NaCl e 20,0g de pectina.

Uma alíquota de 50 mL foi retirada para servir como padrão para análises subsequentes, e foi chamada nos dois casos de alíquota 0.

Após seu preparo as duas soluções foram colocadas em frascos de fundo redondo acoplados a um condensador por onde foi circulado água, com o objetivo de evitar perdas de água e consequente mudança na concentração das soluções.

Os frascos foram então imersos em banho de água a 100°C e deixados sobre aquecimento por 12h e alíquotas de 50mL seriam posteriormente removidas após 4, 8 e 12 horas e nomeadas como alíquota 4, 8 e 12 respectivamente.

4.2.8 Preparo de emulsões óleo em água

Para o de emulsões água em óleo decidiu-se utilizar 5% v/v de dois tipos de óleo diferentes. Óleo essencial de laranja (formado principalmente por d-limoneno) e óleo de girassol.

Em cada caso foram adicionados 1mL do referido óleo em 19mL de solução 4% de pectina sobre forte agitação mecânica (2.000 RPM) para se obter o menor tamanho possível das gotículas de óleo na emulsão. As misturas foram deixadas sobre agitação por 5 minutos para garantir total homogeneização.

Esse procedimento foi feito para cada uma das alíquotas retiradas durante o experimento anterior.

Após esse procedimento cada amostra de 20mL foi separada em duas amostras idênticas de 10mL sendo uma delas neutralizada com aminometil propanol para pH 7, para se investigar o efeito dos níveis de pH na estabilidade das emulsões.

4.2.9 Análise da estabilidade de emulsão

As amostras foram analisadas em microscópio óptico para se determinar o tamanho das micelas de óleos formadas em diferentes períodos de tempos, logo após o preparo e após 1 semana de repouso, para se avaliar o poder estabilizante de emulsão de diferentes formas de pectina.

Para tal, cada amostra teve uma gota de amostra posta em uma lâmina de microscópio e uma gota de água foi adicionada para se diluir e aumentar a visibilidade. O tamanho médio das gotículas foi determinado através de média simples. Devido à baixa precisão do método os resultados foram quantificados com a resolução de 1 μ L.

Capítulo 5 – Resultados e discussão

5.1 Desmetilação da pectina LA Grinsted

Durante a dissolução inicial da pectina, o pH foi anotado como sendo 3.51.

Após a adição de 1mL de Pectinex® YieldMash e 24h de reação, o pH foi novamente aferido e teve queda para 3.08, demonstrando possivelmente a presença de mais grupos carboxila livres.

A adição de igual volume de álcool isopropílico causou a formação de turbidez e precipitado fino, de aparência similar a pectina original, porém em volume reduzido.

Os sólidos foram então coletados e secos em estufa a 35°C por 24h. O peso de material seco recuperado foi de apenas 2,47g, o que equivale a um rendimento de 12,35%. Devido ao baixo rendimento do procedimento decidiu-se não levar adiante os experimentos com esse tipo de pectina altamente desmetoxilada. Considerou-se a redução do volume para aumentar a recuperação de precipitado, porém, como discutido anteriormente, a aplicação de temperaturas acima de 40°C causa degradação irreversível da estrutura pectínica, o que comprometeria as análises subsequentes.

Possíveis causas do baixo rendimento incluem elevada solubilidade do ácido poligalacturônico desmetoxilado ou possível degradação da pectina por enzimas não declaradas, como diversos tipos de carboidrases, na formulação da Pectinex® YieldMash. Já que em outros estudos foi notado que esse preparo enzimático apresenta atividade de pectina liase, enzima essa que quebra as ligações 1-4 presentes no ácido poligalacturônico. (MATA-GÓMEZ *et al.*, 2015)

5.2 Despolimerização térmica das pectinas

Durante o processo, pode-se perceber visualmente a diminuição da viscosidade e formação de ligeira cor marrom. As alíquotas referentes a 4 e 8 horas foram recolhidas sem maiores incidentes.



Figura 5-1 Despolimerização

No entanto, após 10h ocorreu grande mudança de cor e viscosidade da solução além da presença de aglomerados de cor escura, representando possivelmente caramelização dos sacarídeos liberados durante a reação. Embora cuidado tenha sido mantido para se evitar esse tipo de degradação a natureza complexa da pectina, envolvendo diversos tipos de açúcares, pH ácido e alta viscosidade que diminui a transferência efetiva de calor pode ter sido responsável pela formação desse tipo de composto.

5.3 Titulação das pectinas

A titulação foi realizada tanto com as pectinas originais como com as pectinas despolimerizadas para se detectar possíveis mudanças no grau de esterificação devido as condições de despolimerização.

Tabela 5-1 Resultado das titulações pré-despolimerização

Pectina	%GE
Pectina Exôdo Química	70,0%
Pectina Grinsted LA	34,5%
Pectina desmetoxilada	4,3%

De acordo com o método da titulação, mesmo a reação de 24h com enzima não foi capaz de eliminar todos os grupos metila tituláveis. Esse resultado não é diferente dos encontrados por HILLS *et al.*, 1945, onde pectina contendo 10% em massa de metila foi desesterificada por enzimas causando inicialmente uma queda rápida desse valor após 18 horas para 0.85%. Porém, mesmo

após 20 dias o preparo enzimático, com quantidade de metilas analisada através de titulação similar a empregada no presente trabalho, não conseguiu remover os 0.5% restantes de metila.

KAUSS *et al.*, 1967 sugere que o motivo da enzima metilesterase liberar ligeiramente menos metanol do que a saponificação (que é utilizada no método titrimétrico) se deve ao fato de uma possível presença de ésteres de metila ocorrendo em outros ácidos orgânicos na estrutura pectínica.

Tabela 5-2 Resultado das titulações pós-despolimerização

Pectina	%GE	
	Alíquotas	
	4	8
Pectina Exôdo Química	67,5%	66,3%
Pectina Grinsted LA	34,0%	33,1%

Nota-se a ocorrência de uma leve diminuição no grau de esterificação das pectinas despolimerizadas, porém essa mudança é pequena e não muda a categorização das pectinas, já que são consideradas pectinas de alto grau de esterificação aquelas que possuem mais de 50% dos seus ácidos carboxílicos esterificados por grupos metila. (STEPHEN, 2006)

5.4 Teste de Miller

A curva padrão produzida a partir da análise de ácido galacturônico foi calculada como:

$$ABS_{(540nm)} = 0,8143 * c - 0.1178$$

Os valores de absorvância se encontram na Tabela 5-3:

Tabela 5-3 Valores de absorvância das amostras analisadas por DNS

Pectina	Absorvância		
	Alíquotas		
	0	4	8
Pectina de alto GE	0,355	0,723	0,888
Pectina de baixo GE	0,404	0,710	0,871

Através da curva padrão os valores de concentração em g/L foram calculados, como indicados na Tabela 5-4.

Tabela 5-4 Concentração das amostras analisadas por DNS

Pectina	Concentração em g/L		
	Alíquotas		
	0	4	8
Pectina de alto GE	0,667	1,032	1,235

Pectina de baixo GE	0,641	1,017	1,214
---------------------	-------	-------	-------

As amostras não precisaram ser diluídas.

Nota-se claramente a grande presença de açúcares redutores já na primeira alíquota, antes da despolimerização ter sido iniciada. Embora esse dado pudesse sugerir que a pectina estava previamente degradada, como discutido anteriormente na seção 3.4.5.1, pectinas degradam rapidamente ao serem aquecidas em ambientes alcalinos, liberando oligômeros com terminações em açúcares redutores, o que causa uma sobre estimação dos reais valores. (GUSAKOV, 2011)

5.5 Medição da viscosidade relativa

Como descrito na seção 4.2.4 primeiramente determinou-se o tempo que o solvente (água com 0.1M de NaCl) necessitou para fluir através do viscosímetro. Esse tempo foi medido em triplicata e determinado como 316s.



Figura 5-2 Viscosímetro utilizado para determinação das viscosidades

A seguir o tempo foi medido para cada uma das alíquotas, em cada uma das concentrações indicadas na tabela, em triplicata, dividindo-se esse tempo por 316s temos a viscosidade relativa, como indicada na tabela V-3.

Tabela 5-5 Viscosidades relativas para cada concentração analisada

Pectina	Viscosidade relativa para cada concentração (g/L) analisada			
	0,05	0,1	0,2	0,3
Pectina alto grau de esterificação, alíquota 0	1,522	2,343	4,225	6,298
Pectina alto grau de esterificação, alíquota 4	1,265	1,808	3,403	5,098
Pectina alto grau de esterificação, alíquota 8	1,201	1,643	3,003	4,582
Pectina de baixo grau de esterificação, alíquota 0	1,354	1,851	3,355	5,719
Pectina de baixo grau de esterificação, alíquota 4	1,253	1,711	3,250	4,789
Pectina de baixo grau de esterificação, alíquota 8	1,198	1,627	3,004	4,511

5.6 Determinação da viscosidade intrínseca

A seguir estão os gráficos demonstrando a regressão linear que foi feita para se determinar a viscosidade intrínseca, que corresponde ao coeficiente linear da equação da reta encontrado junto ao gráfico.

Para as pectinas de alto GE:

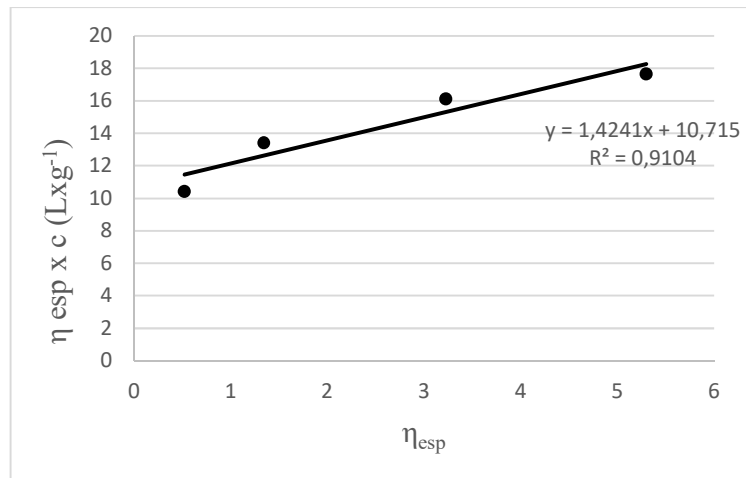


Figura 5-3 Regressão linear da alíquota 0 da pectina de alto GE

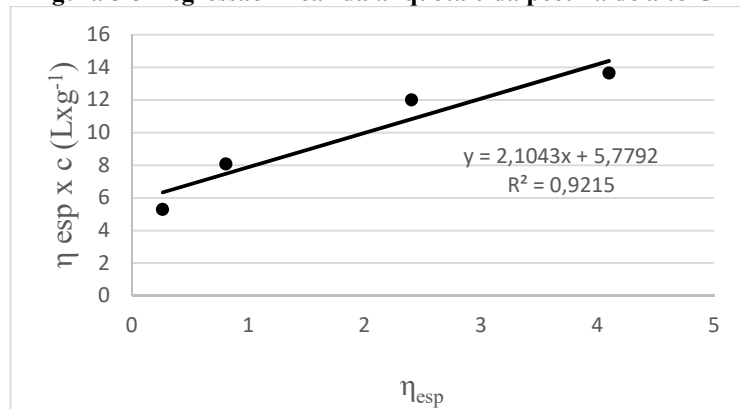


Figura 5-4 Regressão linear da alíquota 4 da pectina de alto GE

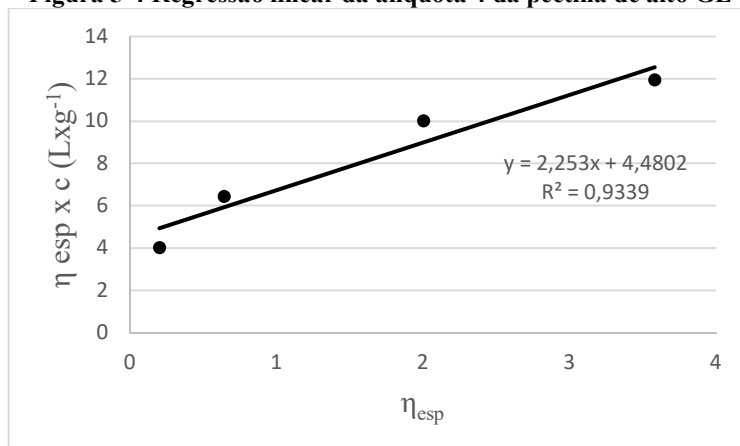


Figura 5-5 Regressão linear da alíquota 8 da pectina de alto GE

Para as pectinas de baixo GE:

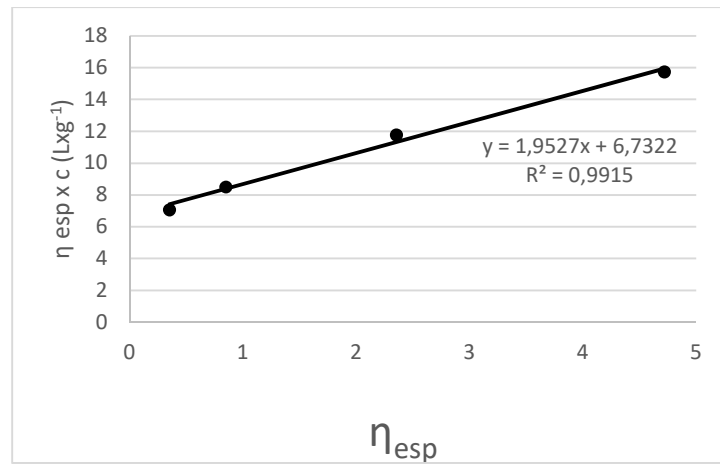


Figura 5-6 Regressão linear da alíquota 0 da pectina de baixo GE

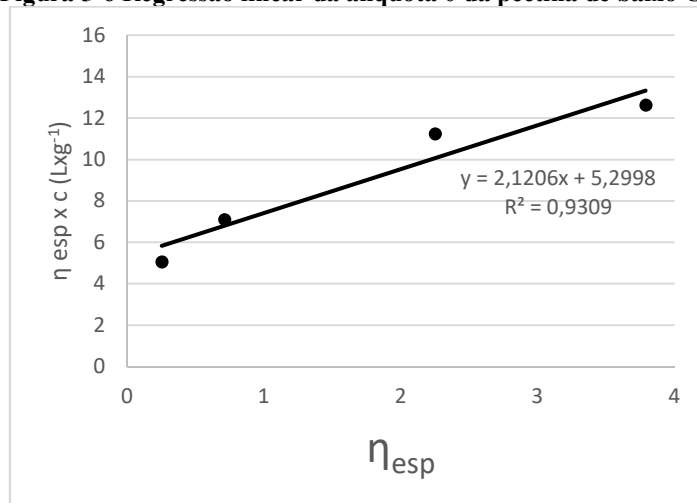


Figura 5-7 Regressão linear da alíquota 4 da pectina de baixo GE

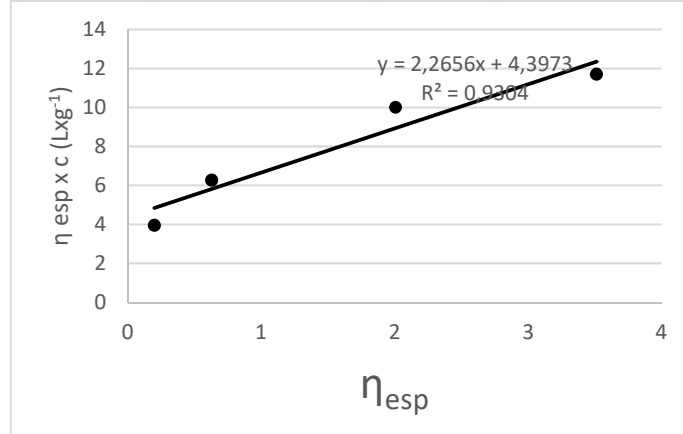


Figura 5-8 Regressão linear da alíquota 8 da pectina de baixo GE

E finalmente a tabela com todas as viscosidades intrínsecas:

Tabela 5-6 Viscosidades intrínseca das alíquotas

Pectina	Viscosidade intrínseca(L/g)		
Pectina alto grau de esterificação	0	4	8
	10,715	5,779	4,480
Pectina baixo grau de esterificação	6,732	5,300	4,397

A menor viscosidade intrínseca inicial das pectinas de baixo grau de esterificação foi atribuída a possíveis tratamentos que esta recebeu para a remoção dos grupos metilas durante a sua produção. (STEPHEN, 2006) Nota-se, no entanto, que com tempo similar de aquecimento as duas pectinas convergiram para valores similares de viscosidade intrínseca, o que pode ser atribuído a maior tendência de despolimerização de pectinas com maior grau de esterificação, devido a esse grupo contribuir a ocorrência de eliminação β . (RENARD et al., 1996)

5.7 Determinação da massa molar

Com a equação de Mark-Howink e os parâmetros definidos na seção 4.2.6 obteve-se os valores indicados na tabela.

Tabela 5-7 Massa molecular das alíquotas

Pectina	Massa molecular (Da)		
Pectina alto grau de esterificação	0	4	8
	137155	86518	71546
Pectina baixo grau de esterificação	96959	81106	70588

Percebe-se uma queda vigorosa da massa molecular das pectinas estudadas após as 4 primeiras horas de aquecimento, seguido de uma queda mais suave, o que está de acordo com os resultados encontrados por Merrill et al, (1945). E alcançando-se massas moleculares similares a encontradas por Mazoyer et al., (2002) e Schmidt et al., (2017).

5.8 Preparo de emulsões óleo em água

O preparo sobre agitação foi suficiente para emulsificar, visualmente, os óleos na solução aquosa contendo oligômeros de pectina. Não se percebeu a formação de espuma.

A formação de espuma, está usualmente ligada a existência de longas cadeias hidrofóbicas não ramificadas e a localização do grupo hidrofílico em posições terminais. (ROSEN et al., 2012)

Como discutido na seção 3.4, pectinas usualmente contém ramificações ligadas à sua cadeia principal de ácido poligalacturônico, além da presença de diversos grupos hidrofílicos espalhados por toda sua estrutura ao contrário de apenas em regiões terminais da molécula como, por exemplo, sabões (que possuem grande capacidade de gerar espuma), que são compostos por longas cadeias hidrofóbicas com apenas uma região hidrofílica por molécula situando-se em um extremo da mesma. (ROSEN et al., 2012)

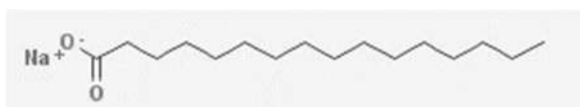


Figura 5-9 Palmitato de sódio.

Fonte: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sodium_palmitate

Após isso a metade das amostras foi neutralizada com aminometil propanol para pH 7. Não se percebeu mudança física significativa nas amostras neutralizadas, não ocorrendo, por exemplo, a formação de géis.

5.9 Análise do grau de emulsificação

No caso das alíquotas 0, que não passaram por tratamento despolimerizante as emulsões sofreram total separação após 1 dia, não havendo diferença entre aquelas que foram preparadas com limoneno ou óleo de girassol e pectina de alto ou baixo GE.



Figura 5-10 Separação completa da mistura d-limoneno e Aliquota 0

Consequentemente, não foi possível determinar o tamanho das gotículas presentes, pois a análise com microscópio não demonstrou a presença de óleo no meio.

Para as alíquotas 4, ocorreu formação e estabilidade de emulsão após o primeiro dia, e foi possível conduzir análise dos tamanhos das gotículas. Porém, após uma semana a separação total das fases ocorreu, novamente com todas as amostras estudadas.

Já para as alíquotas 8, tanto com pectina de alto e baixo GE e para o óleo essencial de laranja e óleo de girassol, ocorreu não só a formação de emulsão, como a estabilidade prolongada da mesma após uma semana.

Devido a baixa precisão do método de análise por microscópio óptico, não foi possível perceber diferença significativa no tamanho das gotículas entre o óleo de girassol e o óleo essencial de laranja. Foi possível, no entanto, detectar uma diferença significativa na estabilidade das emulsões em condições diferentes de pH.

Os resultados podem ser vistos na Tabela 5-8.

Tabela 5-8 Tamanho de gotículas em emulsões

	pH entre 3 e 3,5		pH 7	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
Alíquota 0, alto GE	Separação	-	Separação	-
Alíquota 0, baixo GE	Separação	-	Separação	-
Alíquota 4, alto GE	15 µL	Separação	16µL	Separação
Alíquota 4, baixo GE	15 µL	Separação	18 µL	Separação
Alíquota 8, alto GE	15 µL	25 µL	17 µL	40 µL
Alíquota 8, baixo GE	17 µL	24 µL	17 µL	43 µL

Os resultados das alíquotas 8 podem ser vistos em uma comparação na Figura 5-11 e Figura 5-12:

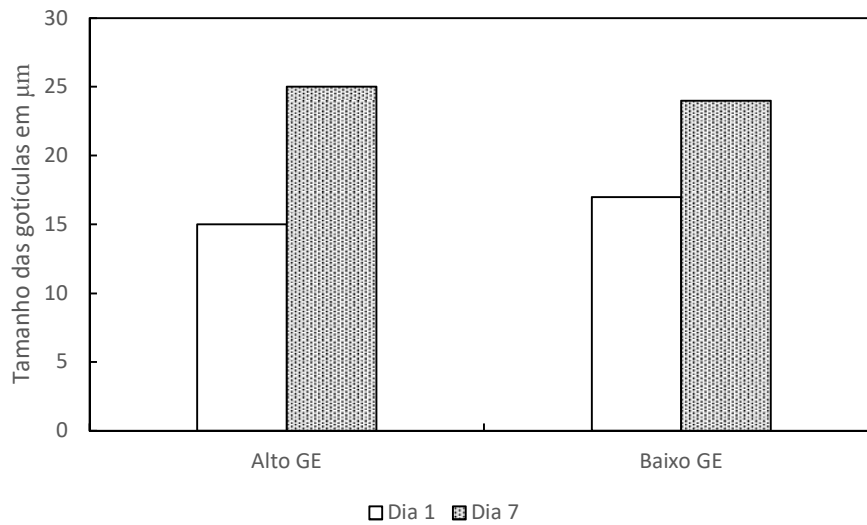


Figura 5-11 Distribuição do tamanho das gotículas em pH 3-3,5

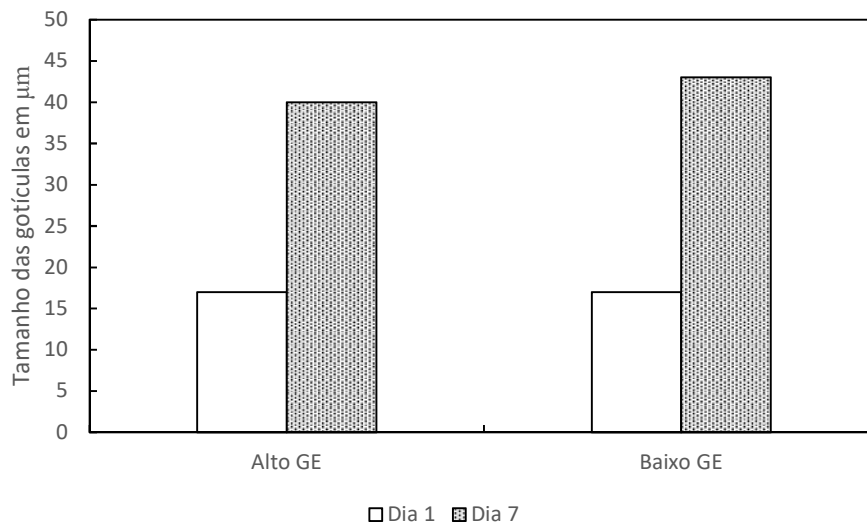


Figura 5-12 Distribuição do tamanho das gotículas em pH 7

Percebe-se maior habilidade emulsificante nas soluções pectínicas em pH natural em torno de 3 a 3,5 (sem adição de ácidos ou bases), o que é condizente com o resultado de pesquisas semelhantes. Postula-se que o pH mais alto contribui para degradação posterior das cadeias de ácido galacturônico e saponificação dos grupos metila, o que demonstraria a importância das interações hidrofóbicas desse grupo na estabilização das micelas. (SCHMIDT *et al.*, 2017)

SCHMIDT *et al.* (2017) e MAZOYER *et al.* (2002), relataram tamanhos consideravelmente menores de gotículas de óleo em suspensão. Esse fato pode ser atribuído a utilização de

emulsificadores de alta pressão, porém, a estabilidade a curto prazo, ao menos não parece ser afetada pelos tamanhos iniciais maiores das micelas. Embora, seja possível que em um período de tempo maior, a estabilidade da emulsão seja comprometida, devido ao fato de que gotículas menores diminuem a chance de coalescência e quebra de emulsão. (ROSEN et al, 2012)

Capítulo 6 Proposta de processo

Baseado nas experiências obtidas durante o trabalho, propõe-se o desenvolvimento de um processo de maior escala para o aproveitamento dos resíduos cítricos para a produção de emulsificante a base de pectina.

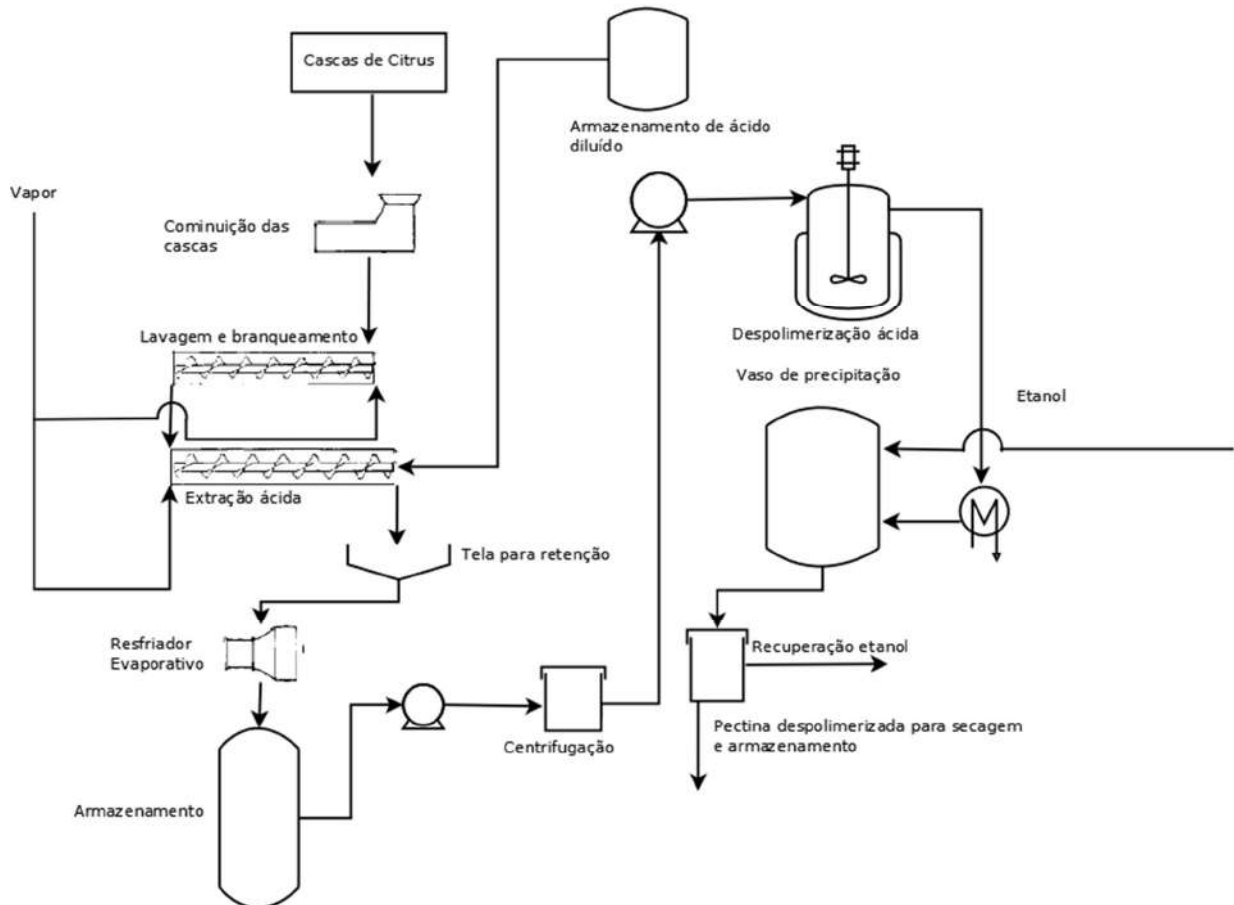


Figura 6-1 Fluxograma de Processo

O fluxograma da Figura 6-1, foi elaborado pelo autor através do *software* livre Dia versão 0.97.2.

- Cominuição das cascas: Para que a hidrólise da protopectina presente nas cascas de frutas cítricas ocorra de maneira eficiente é importante que o material seja previamente cominuído, Graham et al, 1953, recomenda que as cascas sejam reduzidas a fatias não maiores que 3mm.
- Lavagem e Branqueamento: A etapa de lavagem e branqueamento deve ser feita imediatamente após a cominuição dos resíduos. Ela consiste na injeção de vapor

entrando em corrente com as cascas reduzidas, esse vapor cumpre o papel de inativar enzimas pectinolíticas presentes na casca de diversos *citrus*. Na ausência dessa etapa as enzimas pectinolíticas são capazes de rapidamente degradar a pectina. (CANTERI et al., 2010). No presente processo propõe-se o uso de um transportador de parafuso flexível. Um transportador desse tipo com 3,5m de comprimento e 30m de largura é capaz de processar 180kg de cascas por hora, com um tempo de retenção de 30 minutos. (GRAHAM et al.,1953)

- Extração ácida: Para a extração ácida da pectina, propõe-se a adição em reator, agitado e aquecido por serpentinas por onde é passado vapor, de ácido cítrico previamente diluído com concentração de 0,086% m/v e tempo de residência por batelada de 60min a 90°C. Obtendo-se concentrações de pectina em torno de 1%. (PINHEIRO et al., 2008 e CASAS-OROZCO et al.,2015). Após o fim do processo, os conteúdos do reator filtrados até restarem apenas partículas capazes de passarem por tela 40 mesh.
- A solução passa por processo de resfriamento evaporativo para se evitar a degradação da pectina e concentrá-la para uma concentração de 4% m/v. Amônia em solução aquosa (hidróxido de amônio) é adicionado para se alcançar um pH entre 3 e 4, minimizando a degradação da pectina.
- Armazenamento: O extrato contendo apenas partículas sólidas pequenas e pectina em solução é mantido em armazenamento até o fim do processo de batelada.
- Centrifugação: Para se iniciar nova batelada de despolimerização, os conteúdos do vaso de armazenamento são centrifugados a 6000RPM para a remoção de partículas sólidas em suspensão e enviados para o reator de despolimerização. Os sólidos são descartados.
- Despolimerização: Baseado nos resultados do presente trabalho, propõe-se a despolimerização a 100°C e pH entre 3-4 e tempo de residência de 8h. Soluções de pectina a 4% m/v apresentam características não newtonianas e alta viscosidade. Propõe-se agitação vigorosa para evitar a formação de subprodutos de cor escura como ocorreu nos experimentos, que se supõe foi devido a transferência de calor insatisfatória.

- Precipitação: A precipitação de soluções pectínicas, mesmo de massa molar abaixo de 100kDa, pode ser conduzida pela adição de álcool etílico 96%. (STEPHEN, 2006 e CASAS-OROZCO et al., 2015) Para tal processo propõe-se adição de um volume de álcool duas vezes maior que o de solução pectínica. (CASAS-OROZCO et al.,2015)
- Os conteúdos do vaso de precipitação são então centrifugados a 6.000 RPM e o álcool é enviado para a recuperação, não contemplada no presente trabalho, enquanto que a pectina despolimerizada é enviada para secagem e armazenamento.

Capítulo 7 Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

O presente trabalho corrobora a literatura que demonstra que é possível a transformação de pectina de origem cítrica em um surfactante polimérico capaz de emulsificar óleos de origem vegetal. O processo para essa transformação não envolve mais do que o aquecimento em condições controladas de temperatura, concentração, agitação e tempo, para que o grau de despolimerização da pectina seja adequado.

Baseado nos processos atuais de produção de pectina industrialmente, a inclusão de uma etapa posterior de despolimerização dependeria apenas da adição de um reator onde as condições para a despolimerização pudessem ser alcançadas.

No entanto, o presente trabalho não determina a sua viabilidade econômica ou aceitação no mercado. Não há atualmente dados sobre a comercialização de emulsificante derivado de pectina, e é incerto se mesmo que ele apresente características similares aos emulsificantes já presentes no mercado que este consiga substituí-los.

7.1 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar os efeitos de diferentes temperaturas e concentrações na despolimerização da pectina.
- Estudar o efeito da presença de proteínas na pectina. Determinar a quantidade de proteínas presente e experimentar se a remoção ou adição de proteínas pode aumentar ou diminuir o poder surfactante da mesma.
- Utilizar técnicas mais modernas como a cromatografia por exclusão de tamanho para se determinar com maior precisão a massa molecular das pectinas despolimerizadas. Possivelmente utilizar esses dados para obtenção de valores mais consistentes para a equação de Mark-Houwink.
- Realizar modelagem matemática para planta de produção de pectina despolimerizada, descrevendo parâmetros como tamanho do reator, velocidade ótima de agitação e temperatura para a produção em escala industrial de pectina despolimerizada.

Referências Bibliográficas

- 1- ARIS, Z.F.M., BOULDIN, R.M., PELLETIER, M.G.H., GAINES, P., BUDHLALL, B., NAGARAJAN, R.; Microwave-assisted synthesis and characterization of hydrophilically functionalized polygalacturonic acid. **Carbohydrate Polymers**, 155, 432-439, 2017.
- 2- AULTON, M.E., TAYLOR, K.M.G.; **Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines**. Churchill Livingstone, London, UK, 2013.
- 3- BEMILLER, J.N.; An Introduction to Pectins: Structure and Properties. **Chemistry and Function of Pectins**, 2-10, 1986.
- 4- BIZ, A., FARIAS, F.C., MOTTER, F.A., DE PAULA, D.H., RICHARD, P.; Pectinase Activity Determination: An Early Deceleration in the Release of Reducing Sugars Throws a Spanner in the Works!, **PLOS ONE**, 9(10): e109529, 2014.
- 5- BOCHEK, A. M., ZABIVALOVA, N.M., PETROPAVLOVSKII, G. A.; Determination of the Esterification Degree of Polygalacturonic Acid. **Russian Journal of Applied Chemistry**, 74 (5), 796-799, 2001.
- 6- CANTERI, M.H.G., SCHEER, A.P., GINIES, C., RENARD, C.M.G.C, WOSIACKI, G.; Importância do Tratamento Térmico Na Casca De Maracujá Para Extração De Pectina, **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, 04(1), 109-121, 2010.
- 7- CASAS-OROZCO, D., VILLA, A.L., BUSTAMANTE, F., GONZÁLEZ, L.; Process development and simulation of pectin extraction from Orange peels, **Food and Bioproducts Processing**, 96, 86-98, 2015.
- 8- COLQUHOUN, I.J., RUITER, G.A., SCHOLS H.A., VORAGEN, A.G.J.; Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase. **Carbohydrate Research**, 206(1), 131-144, 1990.
- 9- CONSTELA, D., LOZANO J.E., Kinetic model of pectin demethylation. **Latin American Applied Research**, 33, 91-96, 2003.
- 10- COX, M., NELSON, D.; **Lehninger principles of biochemistry, Fourth Edition**, W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2005.
- 11- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations; **Compendium of Food Additive Specifications**, 2016.
- 12- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Citrus Fruit – Fresh and Processed: Statistical Bulletin**, 2016.

- 13- FARN, R.J.; **Chemistry and Technology of Surfactants**. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2006.
- 14- GARNA, H., MABON, N., NOTT, K., WATHELET, B., PAQUOT, M.; Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. **Food Chemistry**, 96 (3), 477-484, 2006.
- 15- GRAHAM, R.P., SHEPHERD A.D., Pilot Plant Production of Low-Methoxyl Pectin from Citrus Peel, **Agricultural and Food Chemistry**, 1, 16, 993-1001, 1953.
- 16- GUSAKOV, A.V., KONDRATYEVA E.G., SINITSYN A.P.; Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. **International Journal of Analytical Chemistry**, 2011, 283658, 2011.
- 17- HARDING, S.E., BERTH, G., BALL, A., MITCHELL, J.R., DE LA TORRE J.G.; The Molecular Weight Distribution and Conformation of Citrus Pectins in Solution Studied by Hydrodynamics. **Carbohydrate Polymers**, 16, 1-15, 1991.
- 18- HIEMENZ, P.C., LODGE T.P.; **Polymer Chemistry**. Second edition. CRC Press, Florida, USA, 2007.
- 19- HILLS, C.H., OGG, C.L., SPEISER, R.; Determination of the Methyl Ester Content of Pectin. **Industrial and Engineering Chemistry**, 17, 8, 507-510, 1945.
- 20- HOLMBERG, K.; Natural Surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 6, 148-159, 2001.
- 21- HUGGINS, M.L.; Molecular Weights of High Polymers. **Industrial and Engineering Chemistry**, 35 (9), 980–986, 1943.
- 22- HWANG, J., PYUN Y.R., KOKINI, J.L.; Sidechains of pectins: some thoughts on their role in plant cell walls and foods. **Food Hydrocolloids**, 7(1), 39-53, 1993.
- 23- HWANG, S., YANGN, A., HAN, M., KIM, S.J.; Screening of Hyaluronidase Inhibitor in Korean Medicinal Plants. **Journal of Life Science**, 24, 498-504, 2014.
- 24- KAPARAJU, P.L.N., RINTALA, J.A.; Thermophilic Anaerobic Digestion of Industrial Orange Waste. **Environmental Technology**, 27:6, 623-633, 2006.
- 25- KAUSS, H., HASSID W.; Enzymic Introduction of the Methyl Ester Groups of Pectin. **The Journal of Biological Chemistry**, 242, 15, 3449-3453, 1967.

- 26- KOPPAR, A., PULLAMMANAPPALLIL, P.; Anaerobic digestion of peel waste and wastewater for on site energy generation in a citrus processing facility. **Energy**, 60, 62-68, 2013.
- 27- KUKHETPITAKWONG R., HAHNVAJANAWONG C., PREECHAGOON D., KHUNKITTI W. (2009), Some Properties of a Polymeric Surfactant Derived from Alginate. **13th International Conference on Biomedical Engineering**, 1344-1347, 2009.
- 28- KRAVTCHENKO, T. P., VORAGEN, A. G. J., & PILNIK, W.; Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydrate Polymers**, 18(1), 17–25, 1992.
- 29- LIN, T., FENG, T., CHUNG, Y., LAN, C.; Quantification of methyl ester content of pectin by pectinesterase. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 31, 273-278, 1990.
- 30- LOTZKAR, H., MACLAY W.D.; Pectin as an emulsifying agent. **Industrial and Engineering Chemistry**, 35 (12), 1294–1297, 1943.
- 31- LUZIO, G. A., CAMERON R. G.; Determination of degree of methylation of food pectins by chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 93, 2463–2469, 2013.
- 32- MATA-GÓMEZ, M.A., HEERD, D., OYANGUREN-GARCÍA, I., BARBERO, F., RITO-PALOMARES, M., FERNÁNDEZ-LAHOPE, M.; A novel pectin-degrading enzyme complex from *Aspergillus sojae* ATCC 20235 mutants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 95(7), 1554-1561, 2015.
- 33- MAY, C.D.; Industrial pectins — sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, 12, 79-99, 1990.
- 34- MAZOYER, J., AKHTAR, M., DICKINSON, E., LANGENDORFF, V.; Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. **Food Hydrocolloids**, 16, 249-256, 2002.
- 35- MAZOYER, J., LEROUX, J., LANGENDORFF, V., SCHICK, G., VAISHNAV, V.; Emulsion stabilizing properties of pectin. **Food Hydrocolloids**, 17, 455-462, 2003.
- 36- MERRILL, R.C., WEEKS, M.; The Thermal Degradation of Pectin. **Journal of the American Chemical Society**, 2244-2247, 1945.
- 37- MILLER, G.L.; Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3), 426-428, 1959.
- 38- MULLIGAN, C.N.; Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, 133(2), 183-198, 2005.

- 39- MYERS, D.; **Surfactant Science and Technology**. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 2006.
- 40- NAS; National Academy of Sciences, **Food Chemicals Codex**, Washington D.C, USA, 1972.
- 41- NELSON, D.B., SMIT, C.J.B., WILES, R.R.; Commercially important pectic substances. **Food Colloids**, The Avi Publishing Company, Westport, Connecticut, USA. 418–437, 1977.
- 42- PARKER, A., BOULENGUER, P., KRAVTCHENKO, T. P.; Effect of the addition of high methoxyl pectin on the rheology and colloidal stability of acid milk drinks. **Food hydrocolloids: Structure, properties and functions**, 307–312, 1994
- 43- PAWAR, H.A, KAMAT, S.R, CHOUDHARY, P.D.; An Overview of Natural Polysaccharides as Biological Macromolecules: Their Chemical Modifications and Pharmaceutical Applications. **Biology and Medicine**, 7, 1, 2015.
- 44- PERRY, R.H, GREEN, D.W.; **Perry's Chemical Engineers' Handbook**, Eighth Edition, McGraw-Hill Education, 2007.
- 45- PORTER M.R.; Polymeric Surfactants, **Handbook of Surfactants**, Springer, Boston, MA, USA, 209-211, 1991.
- 46- POURBAFRANI, M., FORGÁCS G., HORVÁTH I.S., NIKLASSON C., TAHERZADEH M.J. (2010), Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**, 101 (11), 4246-4250, 2010.
- 47- RALET M., THIBAUT J.; Interchain Heterogeneity of Enzymatically Deesterified Lime Pectins. **Biomacromolecules**, 3, 917-925, 2002.
- 48- RENARD, C.M.G.C, THIBAUT, J.; Degradation of pectins in alkaline conditions: kinetics of demethylation. **Carbohydrate Research**, 286, 139-150, 1996.
- 49- RIBEIRO, B.D; **Estratégias de Processamento Verde de Saponinas da Biodiversidade Brasileira**. Tese (doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2012.
- 50- ROSEN, M J., KUNJAPPU, J.T.; **Surfactants and Interfacial Phenomena**. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2012.

- 51- SCHMIDT U.S, SCHÜTZ L., SCHUCHMANN H.P., Interfacial and emulsifying properties of citrus pectin: Interaction of pH, ionic strength and degree of esterification. **Food Hydrocolloids**, 62, 288-298, 2017.
- 52- SCHOLFIELD C.R. (1981), Composition of soybean lecithin. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol.58, no.10, 889-892, 1981.
- 53- SELLI, S., KELEBEK, H., PANESAR, P.S.; Citrus Wines. **Science and Technology of Fruit Wine Production**, 7.4, 410, 2016.
- 54- SOBRAL, L.A, **Valorização de subprodutos da Indústria de Suco de Laranja**. 2015. Monografia- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro
- 55- STEPHEN, A.M. (2006), **Food Polysaccharides and their Applications**, Second Edition.
- 56- TRIPODO, M. M., LANUZZA, F., MICALI, G., COPPOLINO, R., NUCITA, F.; Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. **Bioresource Technology**, 91, 111-115, 2004.
- 57- VAN BOEKEL, S. Transformação dos resíduos de industrialização de laranja-pera (*Citrus sinensis* Osbeck) em farinha desidratada e extrudada para alimentação. 2012. 91p. Tese (doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 58- VAN BUREN, J.P.; Function of pectin in plant tissue structure and firmness. **The Chemistry and Technology of Pectin**, 1-18, 1991.
- 59- XU Q., NAKAJIMA M., LIU, Z., SHIINA, T.; Biosurfactants for Microbubble Preparation and Application. **International Journal of Molecular Science**, 12, 462-475, 2011.
- 60- ZHOU, J., WU Y., SHEN Z.; Viscous-flow properties and viscosity-average molecular mass of orange peel pectin. **Journal of Central South University of Technology**, 15 (s1), 520–524, 2008.