



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DENILTON GARCIA SANTOS**

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE DA PECTINA DO NONI**  
*(Morinda citrifolia L)*

**FORTALEZA**  
**2015**

**DENILTON GARCIA SANTOS**

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE DA PECTINA DO NONI**  
*(Morinda citrifolia L)*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Constantino Grombone Vasconcellos

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nágila M. P. S. Ricardo

**FORTALEZA**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- S234e Santos, Denilton Garcia.  
Extração, caracterização e toxicidade da pectina do noni (*Morinda citrifolia* L) / Denilton Garcia Santos. – 2015.  
99 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2015.  
Área de Concentração: Química Inorgânica.  
Orientação: Prof. Dr. Luiz Constantino Grombone Vasconcellos.  
Coorientação: Profa. Dr. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.
1. Noni (Planta). 2. Polissacarídeos. 3. Citotoxicidade. I. Título.

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

---

Denilton Garcia Santos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 30/03/2015.

EXAMINADORES:

---

Prof. Dr. Luiz Constantino Grombone Vasconcellos  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dra. Cristiane Pinto Oliveira  
Universidade Federal do Ceará – UFC

A Deus.

A minha querida Mãe (*In memoriam*).

A minha esposa e meus filhos, com amor.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu senhor que nos momentos mais difíceis e angustiantes, sempre esteve ao meu lado e a quem dedico todas as minhas vitórias.

Aos meus pais, pela minha vida, apoio e amor.

Ao Prof. Dr. Luiz Constantino Grombone Vasconcellos pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência e grande exemplo de profissionalismo ético na Universidade Federal do Ceará.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nágila Maria Pontes Silva Ricardo pela coorientação e também de todo coração pelo apoio e por me dar a oportunidade de aprender cada vez mais.

A todos os meus professores da Universidade Federal do Ceará, do curso de Pós-Graduação em Química, pela contribuição ao meu aperfeiçoamento acadêmico.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Leonia da Costa Gonzaga, pelas sugestões valiosas ao trabalho de dissertação e grande ajuda nas análises físico-química.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Teresa Salles Trevisan, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra de Aguiar Soares e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Elenir Nobre Pinho, pelas sugestões valiosas no Exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Davi Felipe Farias e a Mestranda Clidia Eduarda Moreira Pinto e Ana Fontenele Urano Carvalho, pelo apoio aos testes dos bioensaios e sugestões ao trabalho de dissertação.

Aos meus parentes e amigos pelo afeto e apreço.

Aos meus irmãos e amigos de farda, pelo respeito e companheirismo a mim dedicado.

A minha esposa Emanuele de Lima Oliveira Garcia, pelo companheirismo, paciência, dedicação e amor.

Aos meus filhos: Felipe, Gabriel, Higo e Enzo, pelo amor, compreensão e carinho.

Aos colegas e amigos da pós-graduação, em especial a Doutoranda Arcelina Pacheco Cunha, pelos ensinamentos, amizade e dedicação aos estudos.

Ao grupo de polímero, professores e colegas, pelo companheirismo e os bons momentos em harmonia.

As funcionárias e amigas, Elis, Tereza, Nádia, Gilda, pelas análises, amizade e profissionalismo.

Aos funcionários Orlando e Célia, da Coordenação da Pós-Graduação em Química pelo pronto atendimento e serviços prestados com paciência e dedicação.

A equipe do Departamento de Engenharia de Alimento, Bruno, Patrícia, Luciana e Cristina, pelos esforços, paciência e apoio durante todo o curso.

Ao Laboratório de Termoanálises, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, pelas análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e as Análises Termogravimétricas (TG/DTG).

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENUREMN), pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Ao Instituto de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – IPDI, Departamento de Física da UFC, pelas análises de Microscopia de Força Atômica (AFM).

Ao Programa de Bioquímica do Departamento de Biologia da UFC, pelos ensaios de toxicidade.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), por ceder amostras de sangue para análises de citotoxicidade.

## RESUMO

O Noni (*Morinda citrifolia* L.) é uma planta que tem despertado o interesse da comunidade científica. No entanto são escassos trabalhos científicos sobre a pectina extraída deste fruto. A extração foi realizada em três faixas de pH's (3; 7 e 10), dentro de um intervalo de tempo e temperatura definidos. Foram utilizados três diferentes agentes extratores. A pectina extraída em pH 3 (PDN-a) foi submetida ao processo de sulfatação e confirmada por análise elementar. Todas as amostras de pectinas provenientes dos processos de extrações e a pectina cítrica de uso comercial (Vetec®) foram caracterizadas por: FT – IR, onde foi possível determinar o grau de esterificação (30%) o qual foi confirmado com os resultados obtidos por titulação potenciométrica e por RMN <sup>1</sup>H. Através das análises de GPC e de viscosidade foi possível determinar respectivamente as massas molares das amostras de pectinas ( $3,8 \times 10^5$  a  $6,8 \times 10^5$  g/mol). As análises de RMN de <sup>1</sup>H foram importantes para determinação dos cinco sinais correspondentes aos hidrogênios da cadeia do ácido galacturônico. Já com as análises térmicas, TGA e DSC, foi possível observar a faixa de estabilidade das pectinas e comparar em relação à pectina cítrica de uso comercial. Nas análises de AFM foi possível observar a nível molecular como a estrutura da pectina foi afetada (fragmentada) pelo processo de extração e sulfatação. Nas análises do Potencial Zeta foi confirmado o caráter aniônico da cadeia de pectina (-32,2 mV e -42,1 mV), para a pectina extraída em pH ácido e sua amostra sulfatada. Foi determinada a Tensão Superficial e a Concentração Micelar Crítica (CMC), para a amostra de pectina (pH 3). O Estudo reológico e algumas propriedades físico-químicas, como, Teor de umidade, Determinação de lipídios, Determinação de proteínas e Determinação de fibras solúveis também foram realizadas. A amostra PDN-a que obteve um melhor rendimento (19%) e sua cadeia polimérica foi pouco afetada pelo processo de extração, foi submetida a testes toxicológicos *in vivo* (ratos), onde foi realizado um ensaio de toxicidade aguda via oral, Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos e verificação do peso úmido relativo dos órgãos, onde sua toxicidade foi descartada. PDN-s (pectina sulfatada) foi utilizada para os testes de citotoxicidade *in vitro*, (sangue humano) e a verificação da atividade da enzima Lactato Desidrogenase, onde não houve uma variação significativa em relação aos controles utilizados.

Palavras Chave: Pectina, Sulfatação, Caracterização, Toxicidade, Citotoxicidade.



## ABSTRACT

Noni (*Morinda citrifolia* L.) is a plant that has aroused the interest of the scientific community. However there are few scientific papers on the pectin extracted from this fruit. The extraction was conducted at three pH's tracks (3, 7 and 10), within a time interval and set temperature. Three different extracting agents were used. The pectin extracted at pH 3 (PDN-a) was subjected to the process of sulfation and confirmed by elemental analysis. All samples from pectin extraction processes and citrus pectin commercial use (Vetec®) were characterized by FT - IR, it was possible to determine the degree of esterification (30%) which was confirmed with the results obtained By potentiometric titration and <sup>1</sup>H NMR. Through the GPC and viscosity analyzes it was possible to determine respectively the molecular weights of the pectin samples (3.8 x10<sup>5</sup> 6.8 x10<sup>5</sup> g / mol). The NMR analysis of <sup>1</sup>H were important in determination of the five signals corresponding to hydrogens of the galacturonic acid chain. Now the thermal analysis, TGA and DSC, observed the range of stability of pectins and compare in relation to citrus pectin commercial use. In AFM analysis it was possible to observe the molecular level how the structure of pectin was affected (fragmented) by extraction and sulfation process. In the analyzes Zeta potential was confirmed the anionic character of the pectin chain (-32.2 mV and -42.1 mV) to the pectin extracted at acid pH and their sulfated sample. It was determined Surface Tension and Critical Micelle Concentration (CMC) for the pectin sample (pH 3). The rheological study and some physicochemical properties such as moisture content, Determination of lipids, Determination of protein and soluble fiber determination were also performed. The PDN-a sample -the one with a better yield (19%) and its polymer chain was little affected by the extraction process, was subjected to in vivo toxicological tests (mice), which had undertaken an acute oral toxicity test, Determination of haematological and biochemical parameters and check the wet relative weight of organs, where its toxicity has been dropped. PDN-s (sulfated pectin) was used for in vitro cytotoxicity testing (human blood) and verification of the enzyme lactate dehydrogenase activity, where no significant differences compared to controls used.

Keywords: Pectin, Sulfation, Characterization, Toxicity, Cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Flor do Noni	23
Figura 2	Parte da estrutura de uma folha.....	24
Figura 3	Fruto do Noni maduro e sementes.....	25
Figura 4	Cadeia linear com ligações glicosídica $\alpha$ -(1→4) do ácido D-galacturônico.....	30
Figura 5	Cadeia ramificada com ligações glicosídica $\alpha$ -(1→4) para o amido.	30
Figura 6	Cadeia linear com ligações glicosídica $\beta$ -(1→4) para a celulose.....	30
Figura 7	Estruturas dos constituintes da parede celular.....	31
Figura 8	Esquema da extração da pectina do Noni.....	37
Figura 9	Espectros de FT – IR das pectinas (PDN-a e PDN-s).....	54
Figura 10	Espectros de FT – IR das pectinas (PDN-a, PDN-n, PDN-b e PDN-s).....	56
Figura 11	Efeito do procedimento de extração nas bandas nas regiões de FT-IR.....	56
Figura 12	GPC das pectinas.....	59
Figura 13	Determinação do grau de esterificação da amostra PDN-a.....	60
Figura 14	Valores correspondentes a H-1; H-5; H-4; H-3 e H-2, respectivamente da amostra PDN-a.....	61
Figura 15	Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PDN-a	63
Figura 16	Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PDN-n	64
Figura 17	Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PDN-b	65
Figura 18	Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PC.....	66
Figura 19	Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PDN-s	67
Figura 20	DSC das amostras de PDN-a e PC.....	68
Figura 21	Potencial Zeta da amostra de PDN-a.....	71
Figura 22	Potencial Zeta da amostra de PDN-s.....	71
Figura 23	Análise transversal das cadeiasde pectina (PDN-a).....	72
Figura 24	Análise transversal das cadeiasde pectina (PDN-s).....	73
Figura 25	Imagem de AFM da pectina (PDN-a).....	74
Figura 26	Imagem de AFM da pectina (PDN-s).....	74

Figura 27	Gráfico da tensão superficial e determinação da CMC.....	75
Figura 28	Viscosidade da amostra PDN-a.....	76
Figura 29	Comportamento Reologia das amostras de pectina (PDN-a e PC) em concentração de 1%.....	77
Figura 30	Cálculo do índice de comportamento do material ( $n$ ) para PDN-a...	78
Figura 31	Cálculo do índice de comportamento do material ( $n$ ) para PC.....	78
Figura 32	Evolução do peso corpóreo ( $g$ ) de camundongos fêmeas.....	81
Figura 33	Efeito da pectina na viabilidade de neutrófilos humanos medido por lactato desidrogenase (LDH).....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alguns nomes conhecidos em diversas partes do mundo da <i>Morinda citrifolia</i> L.....	26
Tabela 2	Alguns constituintes químicos do Noni.....	28
Tabela 3	Valores de rendimento das extrações em diferentes valores de pH.....	53
Tabela 4	Atribuições das frequências das principais bandas dos polissacarídeos.....	57
Tabela 5	Grau de Esterificação das pectinas (PDN-a e PC).....	57
Tabela 6	Valores de polidispersividade e massas molares.....	59
Tabela 7	Distribuição dos eventos na PDN-a.....	63
Tabela 8	Distribuição dos eventos na PDN-n.....	64
Tabela 9	Distribuição dos eventos na PDN-b.....	65
Tabela 10	Distribuição dos eventos na PC.....	66
Tabela 11	Distribuição dos eventos na PDN-s.....	67
Tabela 12	Teor de umidade.....	68
Tabela 13	Propriedades Físico-químicas.....	69
Tabela 14	Valores de Viscosidade da amostra PDN-a.....	76
Tabela 15	Elementos químicos principais existentes nas amostras de PDN-a e PDN-s.....	79
Tabela 16	Os parâmetros hematológicos dos ratos.....	82
Tabela 17	Peso úmido relativo (%) dos órgãos dos ratos.....	83
Tabela 18	Parâmetros bioquímicos de camundongos fêmeas.....	84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>GE</i>	Grau de Esterificação
HM	Alto Grau de Esterificação
LM	Baixo Grau de Esterificação
pH	Potencial Hidrogeniônico
PC	Pectina Cítrica de uso Comercial
PDN-a	Pectina extraída do Noni pela ação do Oxalato de Amônia
PDN-b	Pectina extraída do Noni pela ação do Hidróxido de Sódio
PDN-n	Pectina extraída do Noni pela da água
PDN-s	Pectina extraída do Noni pela ação do Oxalato de Amônia e sulfatada
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton de Hidrogênio
<i>T<sub>i</sub></i>	Titulação inicial
<i>T<sub>f</sub></i>	Titulação final
APGCE	Área dos Picos dos Grupos Carboxílicos Esterificados
APGCNE	Área dos Picos dos Grupos Carboxílicos Não Esterificados
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
DSC	Calorimetria Exploratória de Varredura
TGA	Análise Termogravimétrica
DTG	Derivada de Análise Termogravimétrica
AFM	Microscopia de Força Atômica
Mill-Q	Água ultrapura
$\eta_{int}$	Viscosidade intrínseca
$\eta_{rel}$	Viscosidade relativa
$\eta_{sp}$	Viscosidade específica
$\eta_{red}$	Viscosidade reduzida
$\eta_{iner}$	Viscosidade inerente
CMC	Concentração Micelar Crítica
$\mu\%$	Teor de Umidade

LDM	Lactato Desidrogenase
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico-Pirúvica
DMSO	Dimetilsulfóxido
HBSS	Solução Salina Equilibrada
IPD	Índice de Polidispersividade
<i>PI</i>	Ponto Isoelétrico
VCM	Volume Corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Médio
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
RDW-CV	Distribuição das Hemácias Medida como Coeficiente de Variação
RDW-SD	Distribuição das Hemácias Medida como Desvio Padrão
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
WBC	Contagem de Células Brancas do Sangue
RBC	Contagem de Células Vermelhas do Sangue
HGB	Contagem de Hemoglobinas
HCT	Hematócrito
PLT	Contagem de Plaquetas

## LISTA DE SÍMBOLOS

Z	Potencial Zeta
C	Concentração
$\gamma$	Tensão Superficial
T	Tensão de Cisalhamento
k	Índice de Consistência do Material
$\dot{\gamma}$	Taxa de Cisalhamento
v	Estiramento
$\delta$	Deformação Angular
[ ]	Concentração

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
2.1	Classificação botânica.....	21
2.2	Origem e Características morfofisiológicas.....	21
2.3	Condições para cultivo.....	22
2.4	Clima.....	22
2.5	Floração e frutificação.....	23
2.6	Folhas.....	24
2.7	Fruto.....	24
2.8	Caule e Raiz.....	25
2.9	Sementes.....	26
2.10	Outros nomes dado a planta.....	26
2.11	Constituição.....	27
2.11.1	<i>Constituintes químicos de Noni</i> .....	27
2.12	Relatos com referência das possíveis bioatividades.....	28
2.13	Pectinas.....	29
2.14	Grau de Esterificação.....	34
3	OBJETIVOS.....	35
4	METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS.....	36
4.1	Materiais.....	36
4.1.1	<i>Reagentes</i> .....	36
4.1.2	<i>Tratamento da espécie botânica</i> .....	36
4.2	Métodos.....	36
4.2.1	<i>Extração e purificação do polissacarídeo</i> .....	36
4.2.2	<i>Modificação química por sulfatação (PDN-s)</i> .....	38
4.3	Caracterização do polissacarídeo.....	39
4.3.1	<i>Análise de FT-IR de pectinas (PDN-a), (PDN-n), (PDN-b), (PC) e (PDN-s)</i> .....	39
4.3.2	<i>Determinação do grau de esterificação</i> .....	39
4.3.2.1	<i>Por Titulação Potenciométrica</i> .....	39
4.3.2.2	<i>Por Interação em FT-IR</i> .....	40



4.3.2.3	<i>Por Integração em RMN <sup>1</sup>H.....</i>	40
4.3.3	<i>Estimativa da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel.....</i>	41
4.3.4	<i>Análise da pectina do Noni por RMN <sup>1</sup>H (PDN-a).....</i>	41
4.3.5	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial.....</i>	41
4.3.6	<i>Análise Termogravimétrica.....</i>	42
4.3.7	<i>Microscopia de força atômica.....</i>	42
4.3.8	<i>Potencial Zeta.....</i>	42
4.3.9	<i>Análise elementar.....</i>	43
4.3.10	<i>Determinação da viscosidade intrínseca e massa molar.....</i>	43
4.3.11	<i>Tensão Superficial.....</i>	45
4.3.12	<i>Concentração micelar crítica.....</i>	45
4.3.13	<i>Estudo reológico.....</i>	46
4.4	<i>Análises físico-químicas.....</i>	46
4.4.1	<i>Teor de umidade.....</i>	46
4.4.2	<i>Determinação de lipídios.....</i>	47
4.4.3	<i>Determinação de proteínas.....</i>	47
4.4.4	<i>Determinação de fibras.....</i>	48
4.5	<i>Farmacologia e toxicidade.....</i>	48
4.5.1	<i>Materiais.....</i>	48
4.5.1.1	<i>Reagentes biológicos.....</i>	48
4.5.1.2	<i>Animais de Laboratório e alojamento.....</i>	49
4.5.2	<i>Métodos.....</i>	49
4.5.2.1	<i>Ensaio de toxicidade aguda via oral da amostra PDN-a em camundongos..</i>	49
4.5.2.2	<i>Determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos.....</i>	50
4.5.2.3	<i>Determinação do peso úmido relativo dos órgãos e análises histopatológicas.....</i>	51
4.5.3	<i>Análise estatística dos dados do ensaio de toxicidade.....</i>	51
4.6	<i>Estudos de citotoxicidade em neutrófilos humanos.....</i>	52
4.6.1	<i>Isolamento de neutrófilos humanos.....</i>	52
4.6.2	<i>Ensaio Lactato desidrogenase.....</i>	52
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	53
5.1	<i>Extrações e rendimentos.....</i>	53
5.2	<i>Sulfatação da pectina.....</i>	54

5.3	Espectroscopia de infravermelho e Determinação do grau de esterificação..	54
5.4	Cromatografia de permeação em gel.....	58
5.4.1	Polidispersividade e massa molecular.....	58
5.5	RMN <sup>1</sup> H da pectina do Noni (PDN-a): Determinação do grau de metilação	60
5.6	Análise termogravimétrica.....	61
5.7	Análises físico-química.....	68
5.7.1	Teor de umidade.....	68
5.8	Potencial Zeta e Microscopia de força atômica.....	69
5.9	Determinação da tensão superficial, viscosidade intrínseca e massa molar...	75
5.10	Estudo Reológico.....	77
5.11	Análise elementar.....	79
5.12	Farmacologia e toxicidade.....	79
5.13	Citotoxicidade.....	85
5.13.1	Estudos de citotoxicidade em neutrófilos humanos.....	85
6	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

## 1. INTRODUÇÃO

Durante toda história da humanidade o ser Homem teve a necessidade do uso de plantas para curar suas enfermidades e várias são as plantas medicinais com potenciais para serem utilizadas pelo homem, para tratamento de diversos tipos de males, dentre essas plantas podemos citar: *Zingiber officinalis*, *Cannabis sativae* e a *Melissa officinalis*, todas com potenciais antivirais (Muhammad Mukhtar *et al.*, 2008) e segundo Priscila Ikeda Ushimaru *et al.*, (2007), foi comprovada a eficiência de extratos de plantas com potenciais antibacterianos e de acordo com Notka *et al.*, (2004) em seu trabalho foi confirmado o potencial de plantas na inibição do processo de replicação do vírus HIV. Muitas outras pesquisas estão comprovando cientificamente a eficácia dos princípios ativos das plantas.

Dentre estas muitas plantas pesquisadas, podemos destacar uma que há muito tempo, com a colonização das ilhas do Pacífico Sul, foi trazida de suas ilhas de origem pelos antigos povos da Polinésia Francesa, junto com outras plantas sagradas que eram utilizadas para a cura de diversas doenças. Esta planta em destaque é a *Morinda citrifolia* L., conhecida no Brasil como Noni. O seu fruto era, naquela época, uma importante fonte de alimentos para os povos da Polinésia em tempos de fome, os frutos verdes eram cozidos, enquanto os maduros eram comidos crus com sal. As sementes, folhas, cascas e raízes serviram também como alimento (Morton, J. F. 1992). O aumento das populações das plantas e suas distribuições, além de ser afetada pela ação do homem e dos animais, como os pássaros (Zoocoria), conta com a ajuda das sementes por possuírem uma camada interna de ar (Scot C. Nelson. 2001), que possibilita a flutuabilidade, com isso elas eram mais bem distribuídas para as ilhas vizinhas, por meio dos rios e do oceano.

De acordo com o trabalho de Leirson *et al.*, (2012), de caracterização da fruta da *Morinda citrifolia* L. (Noni), podemos morfologicamente dizer que a planta pode atingir de 3,3 a 4,4 m de altura. As flores da planta são de cor branca cremosa, o fruto é de formato ovóide, com textura suculenta e apresenta várias sementes triangulares de coloração vermelha com uma película de revestimento. Considerando a polpa, ocorre mudança de coloração, passando da cor verde para a amarela esbranquiçada, à medida que o fruto amadurece.

Em estudos realizados com o fruto (Chan-Blanco *et al.*, 2006) foi confirmado que o Noni é constituído por 90% de água, sendo que os principais componentes da matéria seca são sólidos solúveis, fibras, proteínas e hidratos de carbono.

No Brasil o consumo do Noni como alimento ou como medicamento tem aumentado significativamente nos últimos anos (Costa, A. B. 2001). Em 2007 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou um informe técnico, (n. 25, de 29 de maio de 2007), no qual adverte que, produtos que contiverem Noni não devem ser comercializados no Brasil como alimento, até que seja comprovada a segurança em seu uso.

Com base em pesquisa realizada que determina os constituintes do fruto (Chan-Blanco *et al.*, 2006). O fruto se encaixaria na categoria de alimento funcional, aquele que traz benefícios além dos meramente nutricionais. No entanto, há uma carência de comprovações dos benefícios da fruta. Essa comprovação requer várias etapas, como a quantidade a ser ingerida em dose diária, como também sua toxicidade no organismo. Com base nestas informações e diante da relevância que tem alcançado os estudos sobre as propriedades medicinais da *Morinda citrifolia* L. é fundamental que sejam feitas pesquisas que avaliem os reais benefícios que esta planta pode trazer à saúde dos consumidores, haja vista que, quando tratamos o fruto (Noni) como remédio, passamos a consumi-lo sem orientação adequada, às vezes ingerindo doses altas, acreditando que ele fará milagre.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 2.1. A Classificação botânica (Schultz, A. R. 1945)

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Gentianales

Família: Rubiaceae

Gênero: *Morinda*

Espécie: *Morinda citrifolia*

Nome científico: *Morinda citrifolia* L.

A Família Rubiaceae, criada em 1789 por De Jussieu (Cronquist, A. 1981), são predominantemente distribuídas em áreas tropicais e compreendem aproximadamente 637 gêneros, com cerca de 10.700 espécies (Robbrecht, E. 1988).

O nome botânico para o gênero foi derivado de duas palavras latinas, *Morus*, que significa amora e *indicus*, que significa indiana, em referência à semelhança do fruto Noni ao da amoreira (*Morus alba* L.) O nome indica as semelhanças existentes entre as espécies dentro da família Rubiaceae, isso em relação às folhagens das plantas (Will C. & McClatchey, 2003).

### 2.2. Origem e Características morfofisiológicas

A *Morinda citrifolia* é nativo do Sudeste Asiático (Indonésia) e da Austrália, agora também pode ser encontrado nos trópicos. O fruto do Noni é de formato ovalado, suculento e apresenta várias sementes por fruto. A casca do fruto é uma película fina, facilmente retirada, quando o fruto está maduro. Quando verde, tem coloração da casca verde e quando maduro, a cor da casca torna-se amarela esbranquiçada e é perceptível um aroma característico nos frutos maduros. (Leirson *et al.*, 2012).

Amplamente adaptada aos trópicos, a uma altitude que pode variar de 1 a 800 m, dependendo da latitude, a planta pode desenvolver-se em temperaturas médias anuais de 20 a

35°C, ela está bem adaptada à precipitação anual de 250 a 4000 mm. Sua árvore é associada com uma grande variedade de arbustos comuns em floresta costeira e litorânea. Ela cresce em uma variedade ampla de solos e tem potencial invasivo naturalizado fora de sua área nativa em muitos locais do Pacífico e nos trópicos, embora raramente possa ser considerada uma praga (Scot C. Nelson, 2006).

A planta do Noni pode ser vista como uma pequena árvore perene ou arbusto, ela por vezes, se apóia em outras plantas como um cipó durante o seu desenvolvimento, mas existem muitas variações na forma geral da planta, como por exemplo, tamanho de frutos, tamanho das folhas, morfologia, palatabilidade, cheiro de fruta madura e número de sementes por fruto (Scot C. Nelson, 2006).

### **2.3. Condições para cultivo**

Para que ocorra um cultivo adequado do Noni, é fundamental que o produtor considere as informações necessárias para que realize um manejo correto da planta, a fim de permitir à mesma um melhor potencial na produção de frutos. Antes de tomar a decisão de estabelecer uma plantação comercial do Noni, o produtor deve coletar informações locais referentes à altura do campo de produção (altitude); da temperatura do ar; da velocidade do vento; da intensidade de luz solar; da precipitação pluvial e das características do solo, como a profundidade, drenagem, pH e os nutrientes essenciais. Essas informações são necessárias para qualquer cultivo em escala comercial.

### **2.4. Clima**

Embora que os trópicos estão dentro da faixa de temperatura onde a planta tem desenvolvimento, é importante notar que, quando a temperatura do ar for superior a 30°C, ocorre um efeito indesejável na planta, ou seja, as temperaturas elevadas aumentam a tal ponto os processos fisiológicos, que a planta perde volumes substanciais de água por evapotranspiração. De modo semelhante, a perda por evaporação sobre o solo, é significativa. No entanto, a planta tem mecanismos de defesa contra alta temperatura do ar, ela fecha os estômatos. Este mecanismo ocorre nas horas de maior intensidade solar, reduzindo assim a

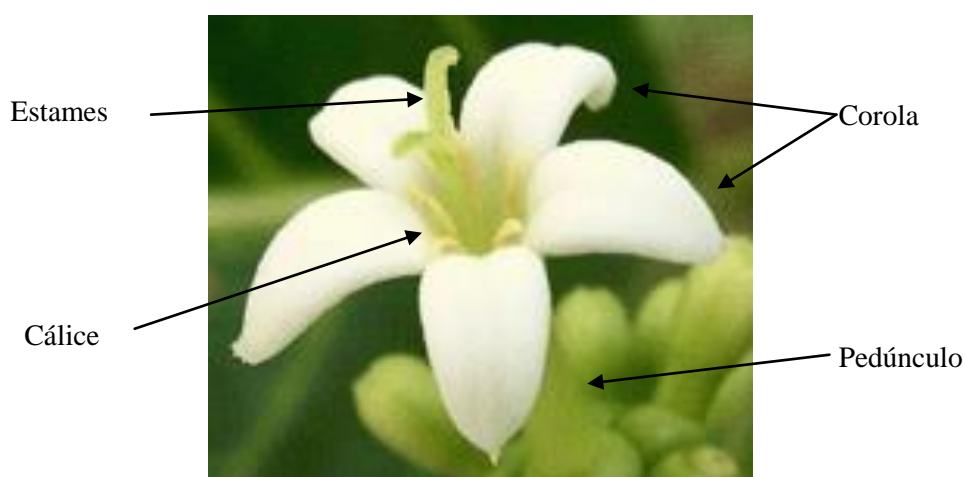
perda de água por evapotranspiração (Miguel A. Acosta, 2003). No entanto a planta pode desenvolver-se bem em temperaturas médias anuais de aproximadamente 20 a 35°C.

## 2.5. Floração e frutificação

A floração e frutificação são contínuas ao longo do ano, não sendo restrita a determinados períodos, no entanto, flutuações na floração e frutificação podem ocorrer devido a efeitos sazonais, como por exemplo: variações de temperaturas, níveis de precipitação diferentes ao longo do ano, intensidade de luz solar, ou seja, estes fatores podem influenciar no desenvolvimento da planta (Scot C. Nelson, 2006), reduzindo assim o seu potencial produtivo.

Com relação às flores (Figura 1), elas possuem uma simetria nas pétalas, o pedúnculo tem entre 10 a 30 mm de comprimento, o cálice é truncado em forma de aro. A corola é branca, possui cinco lóbulos (pétalas), o tubo branco esverdeado de 7 a 9 mm de comprimento e possui cinco estames isômeros de aproximadamente 15 mm, fixados ao tubo da corola (Scot C. Nelson, 2001 e 2006). A flor do Noni é uma parte essencialmente sensível da planta e está unida nos galhos onde ela nasce e assim dará início ao desenvolvimento do fruto (Miguel A. Acosta, 2003).

Figura 1 – Flor do Noni

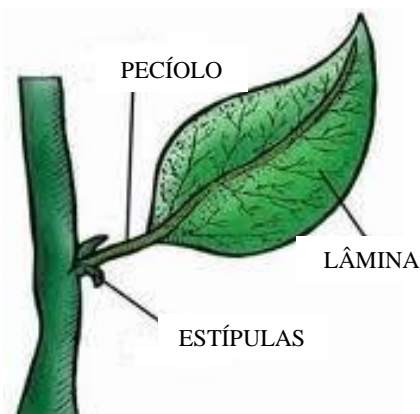


Fonte: <http://tropicapanama.blogspot.com.br/2008/12/consideraciones-sobre-la-biologa-floral.html>

## 2.6. Folhas

As folhas são opostas e brilhantes. As lâminas são membranosas e elípticas de 20 a 45 cm de comprimento por 7 a 25 cm de largura. O pecíolo tem 1,5 a 2 cm de comprimento, as estípulas são distintas e medem de 1 a 1,2 cm (Scot C. Nelson, 2006). Estruturalmente as folhas se apresentam como sendo agudas no ápice, tendo uma forma de cuia em sua base (figura 2), com uma coloração verde escuro. Elas possuem laterais quase arredondadas em formato ovalado com uma metragem de 12 a 20 mm de largura e 2 mm de diâmetro (Miguel A. Acosta, 2003 e Barroso, G.M. *et al.*, 1986).

Figura 2 – Parte da estrutura de uma folha



Fonte: Produção do próprio autor

## 2.7. Fruto

O fruto, tecnicamente conhecido como sincarpo que é a condescência de vários frutos contíguos em desenvolvimento, dando uma infrutescência, como na jaca e no abacaxi. Ele é branco amarelado, carnudos, de 5 a 10 cm de comprimento e cerca de 3 a 4 cm de diâmetro (variando dentro dos seus estágios de amadurecimento), é macio e fétido quando maduros (Scot C. Nelson, 2006). Possuem a superfície grumosa coberto de secções com formato poligonais (figura 3), onde inicialmente nos primeiros estágios de desenvolvimento eram as flores (McClathey, W. 2002).



Figura 3 – Fruto do Noni maduro e sementes



Fonte: <http://www.enfoconoticias.com.br/noticias-una-planta-medicinal-capaz-de-curar-varias-doenças-saude.891.html>

## 2.8. Caule e Raiz

O caule do Noni se caracteriza como uma das partes principais da planta. O crescimento e formato que ele adquire são eretos, composto de um talo principal de onde se desprendem vários ramos angulares para adquirir sustentação das extensas folhas, além de conter fibras internas firmes e uma textura externa caulina lisa, que muito favorece a funcionalidade das outras partes da planta, o caule possui a forma quadrática, que pode ser observado quando cortado perpendicularmente (Dittmar, A. 1993). O vegetal possui uma raiz principal de onde se desprendem as raízes secundárias, a raiz principal é bem expressiva em relação às outras partes da planta, mas é proporcional a profundidade e a largura. A mesma tem a capacidade de aderência da terra que consegue absorver tantos nutrientes bem distribuídos para toda a planta, com relação ao enraizamento, a planta tem o desenvolvimento semelhante ao do café, possui um extenso desenvolvimento lateral e um sistema radicular profundo perpendicular (Scot C. Nelson, 2001).

## 2.9. Sementes

Para o fruto além das propriedades nutritivas, que foi utilizado ao longo dos séculos como um alimento puro em épocas de fome, suas sementes (Figura 3) eram também utilizadas como alimento, medicamento e na produção de pigmentos, elas tem a forma de disco de 0,4 a 0,6 cm de diâmetro, são de coloração marrom avermelhada, tem uma bolsa de ar que lhe permite flutuar na água durante meses e ajudando também na sua distribuição geográfica. Cada carpelo produz quatro sementes, no entanto, o número total de sementes nas infrutescências dependerá do número de carpelos (Scot C. Nelson, 2001 e Barroso, G.M. *et al.*,1986).

## 2.10. Outros nomes dados à planta

O Noni, como é conhecido no Brasil, possui diversos nomes, que se modificam de acordo com a localização e a cultura da população. Dependendo de sua utilização e características, diversos povos deram a planta varias denominações, alguns deles estão relacionados na tabela 1.

Tabela 1 – Alguns nomes conhecidos em diversas partes do mundo da *Morinda citrifolia* L.

<b>Nome vernáculo</b>	<b>Pais</b>	<b>Referência</b>
<b>Forbidden fruit</b>	Barbados	Gooding <i>et al.</i> , 1965
<b>Coca</b>	Republica Dominicana	Pierre-Noel 1971
<b>Bankoro</b>	Filipinas	Quisumbing 1951
<b>Feuille douleur</b>	Haiti	Pierre-Noel 1971
<b>Hog apple</b>	Jamaica	Adams 1972
<b>Morinda</b>	Austrália	Webb 1948
<b>Mulberry</b>	Índia	Watt 1908
<b>Nho</b>	Laos	Petelot 1953
<b>Noni</b>	Havaí	Degener 1945
<b>Wild pine</b>	Barbados	Gooding <i>etal.</i> ,1965

Alguns nomes retirados da tabela preparada por Scot C. Nelson; Craig R. Elevitch, 2006

## 2.11. Constituição

### 2.11.1. *Constituintes químicos de Noni*

As plantas são únicas em sua habilidade de produzir um extraordinário e variado número de metabólitos secundários, para diversas finalidades dentro e fora da planta. Muitos destes metabólitos têm atributos medicinais comprovados. O caráter medicinal das plantas é estudado pelo homem há séculos e esta tradição permanece atualmente no uso crescente de medicinas alternativas e desenvolvimento de suplementos dietéticos em nossa sociedade (Barthelson *et al.*, 2006). Nos estudos com os metabólitos, seus efeitos benéficos, que são gerados pelos constituintes de uma planta no organismo vivo são verificados, para confirmar o que a princípio, somente se baseava nos conhecimentos populares de uso repetitivo e tradicional. Sabe-se que os vegetais, em particular as frutas, possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidantes, antimutagênicos e até anticarcinogênico (Wang, M. Y. *et al.*, 2002), (Eiichi Furusawa, M. D. 2003).

Muitos são os constituintes químicos do Noni, alguns possuem propriedades terapêuticas e medicinais comprovadas, outros ainda necessitam desta confirmação científica. Já foram identificados aproximadamente 160 compostos fitoquímicos da planta do Noni, sendo a maioria compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcalóides (Heinicke, 1985). No entanto, essas composições são variadas, de acordo com parte da planta que está sendo analisada, como também a localização desta parte da planta na árvore (Wang, M. Y. 2008), alguns destes compostos e suas possíveis aplicações dos constituintes estão listados na tabela 2.

Tabela 2 – Alguns constituintes químicos do Noni

Localização	Compostos	Referências	Aplicação <sup>a</sup>	Referências <sup>b</sup>
Raízes	Damnacanthal	Morton J. F. (1992)	Antimicrobiana; Atividade contra HIV	Ali, A. M. <i>et al.</i> , (2000)
	Morindone	Sang, S. <i>et al.</i> , (2002)	Antimicrobiana	Ali, A. M. <i>et al.</i> , (2000)
Sementes	Ácido Ricinoleico	Solomon, N. (1999)	Carrapaticida	André Arnosti <i>et al.</i> , (2011)
	Ácido Ascórbico	Liu, G. <i>et al.</i> , (2001)	Melhorar o efeito antifúngicoe antioxidante	Omar Arafat Kdudsi Khalil. <i>et al.</i> , (2012)
Fruta	Escopoletina	Farine, J. P. <i>et al.</i> , (1996)	Antitumoral	Wukun Liu. <i>et al.</i> , (2012)
Folhas	Metionina	Dittmar, A. (1993)	Efeito Imunonutriente	Panagiotis Sakkas. <i>et al.</i> , (2013)
	β-sitosterol	Sang, S. <i>et al.</i> , (2002)	Efeito de redução do colesterol	Cicero, Arrigo F. G. <i>et al.</i> , (2002)

<sup>a</sup>Efeito dos compostos químicos de outras fontes.

<sup>b</sup>Estudo dos compostos químicos de outras fontes.

## 2.12. Relatos com referência das possíveis bioatividades

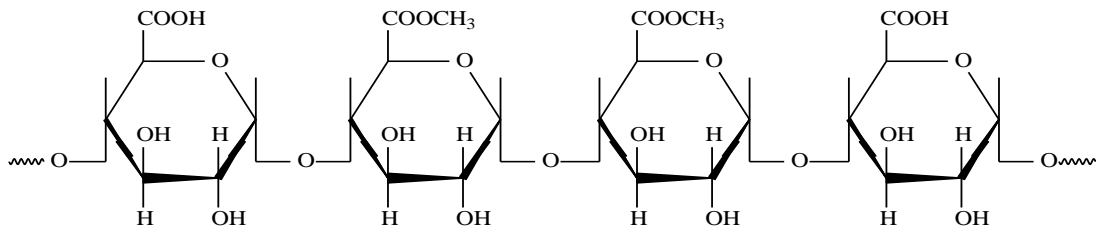
O estudo e a determinação de compostos fitoquímicos ativos que podem ser usados de forma segura é uma prática extremamente vantajosa para o homem, pois o uso da fitoterapia possui poucos efeitos indesejáveis se comparado com as drogas sintéticas correspondentes (Turolla, M. S. dos R e Nascimento, E. de S. 2006). Tais compostos são identificados em diversas partes das plantas (como pode ser observado na tabela 2), em especial no fruto. No entanto, o seu uso indevido pode trazer riscos, apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, muitos estudos devem ser realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas com base somente na cultura popular. Pesquisas estão sendo feitas com a planta *Morinda citrifolia* L. nos países onde o cultivo e o consumo do Noni são atribuídos a possíveis propriedades bioativas. No Brasil existe a necessidade de mais estudos sobre plantas não nativas, como é o caso da planta utilizada neste trabalho.

O emprego na medicina popular desta planta está atribuído aos efeitos relacionados com atividades biológicas. Praticamente todas as partes da planta são aproveitadas. A casca do tronco possui constituintes que apresentam propriedades adstringentes e por isso ela é utilizada no tratamento da malária (Satoru *et al.*, 2010); as folhas são usadas como analgésico e para inflamações externas; as flores são empregadas no tratamento de inflamações oculares; o extrato das raízes no tratamento da hipertensão e as sementes são utilizadas como laxante (Elkins, R. 1997), além de outras atividades, como: antibacteriana, antisséptica natural, regulador metabólico, regenerador celular, antioxidante, antiviral, antifúngica, hipotensora e imunoestimulante (Wang, M. Y *et al.*, 2002). Estudos científicos estão comprovando algumas propriedades do Noni, como: atividades anticâncer (Eiichi Furusawa, M. D. 2003), efeito sobre o sistema imunológico (Afa K. Palu *et al.*, 2008), ação de proteção hepática (Wang, M. Y. *et al.*, 2008), potencial antitumoral (Eiichi Furusawa *et al.*, 2003), atividades gastrocinéticas (Sawpheyah Nima *et al.*, 2012), atividades anti-helmínticas (Danilo R. B. B. *et al.*, 2009). Estas propriedades estão relacionadas a constituintes químicos extraídos na maioria das vezes do fruto, que é a finalidade deste trabalho apresentado, utilizando para isso a pectina extraída do fruto como ponto de partida.

### 2.13. Pectinas

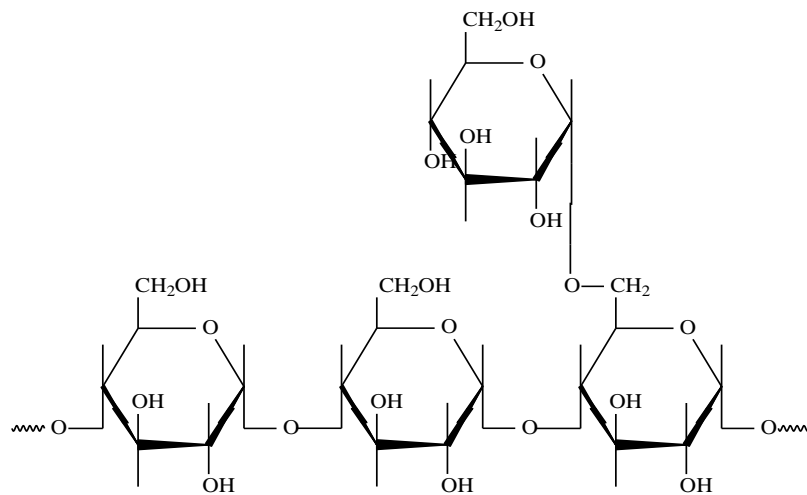
Os polissacarídeos são uma família de polímeros naturais sintetizadas preferencialmente pelas plantas, embora haja polissacarídeos também sintetizados pelos animais, como é o caso de crustáceos. Entre os polissacarídeos mais conhecidos destaca-se a celulose, que exerce a função de sustentação das plantas; o amido, que é a reserva energética das plantas; a pectina, fibra insolúvel presente nos frutos que funcionam como arcabouço da parede celular; o ágar e o alginato presentes em algas marinhas e a quitina componente principal de esqueleto dos crustáceos. As cadeias poliméricas de polissacarídeos são constituídas pelos anéis de anidroglicose ligados entre si através de ligações  $\alpha$ -(1→4) (Figura 4),  $\alpha$ -(1→6) (Figura 5) e  $\beta$ -(1→4) (Figura 6).

Figura 4 – Cadeia linear com ligações glicosídica  $\alpha$ -(1→4) do ácido D-galacturônico.



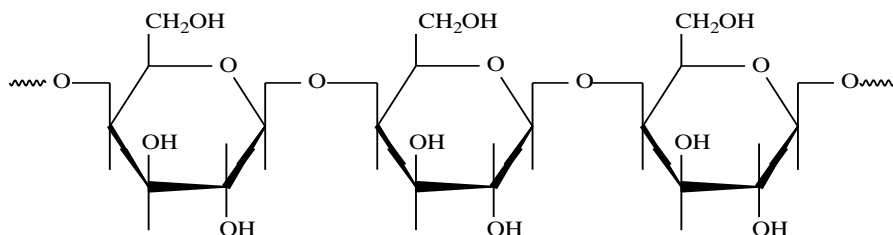
Fonte: Produção do próprio autor

Figura 5 – Cadeia com ligações glicosídica  $\alpha$ -(1→4) e ramificações  $\alpha$ -(1→6) para o amido.



Fonte: Produção do próprio autor

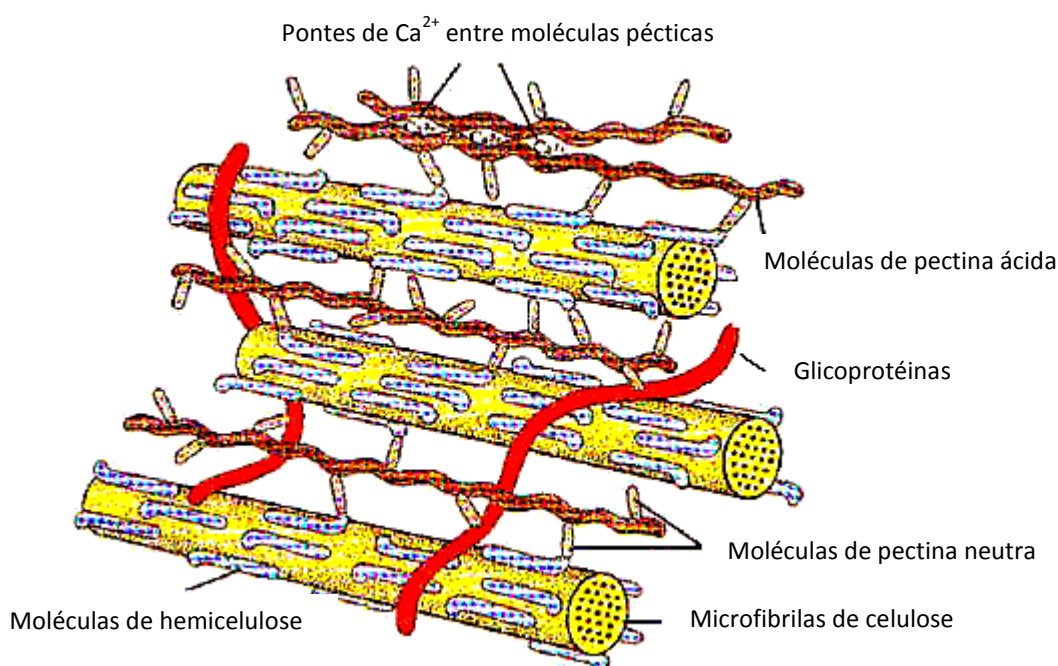
Figura 6 – Cadeia linear com ligações glicosídica  $\beta$ -(1→4) para a celulose.



Fonte: Produção do próprio autor

As substâncias pécicas encontram-se nos tecidos de uma grande variedade de plantas (Figura 7) e compreendem um conjunto de gacturonoglicanos com grupos carboxila esterificados com metanol. Constituindo as paredes celulares e as lamelas médias das células vegetais associadas à celulose, formando a protopectina, que é a substância pécica matriz, insolúvel em água que, por hidrólise parcial, fornecem pectina. A hidrólise mais completa produz ácido pécico, ácido galacturônico e álcool metílico (Taiz, L. & Zeiger, E. 2004). Esta associação dos polissacarídeos estruturais contribui para adesão entre as células e para a resistência mecânica da parede celular (Iglesias, M. T. and Lozano, J. E. 2004).

Figura 7 – Estruturas dos constituintes da parede celular.



Fonte: <http://html.rincondelvago.com/enzimas-comerciales.html>

Estas pectinas derivadas da protopectina apresentam variações, como por exemplo, no grau de metilação e esta modificação da composição pode variar de acordo com a origem, existindo na natureza um grande número de pectinas, provenientes das diferentes variedades de frutas e hortaliças, e estas diferenças esta relacionada quanto ao teor de metanol, propriedades físicas, grau de polimerização, grau de esterificação. E todos estes fatores podem variar com a metodologia de extração (Siew-Yin Chan and Wee-Sim Choo.

2013), matéria-prima e localização no fruto. O comprimento da cadeia e o grau de esterificação são importantes para determinar as propriedades das pectinas como sua capacidade de geleificação. As pectinas com mais da metade dos grupos carboxila esterificados com metanol são pectinas de alta metoxilação e com menos da metade, pectinas de baixa metoxilação, sendo que as primeiras são ideais para a formação de gel na presença de açúcar e ácido (Campbell, A. M. *et al.*, 1979).

A pectina é uma fibra, diferente da celulose, principalmente devido ao tipo de ligação entre seus monômeros, como pode ser observado nas figuras 4 e 6, esta diferença no tipo de ligação faz com que a celulose não possa ser digerida pelo organismo humano, diferentemente da pectina. Ela (pectina) desempenha importantes funções no trato gastrointestinal, as quais têm repercussões em toda a saúde do corpo. A pectina absorve água e retarda o esvaziamento do conteúdo gástrico para o intestino delgado. Por causa dessa ação e por aumentar o volume do intestino, ela proporciona uma sensação de saciedade, deste fato vem à importância da pectina no controle da obesidade. Ela também se liga aos ácidos biliares e ao colesterol, além de regular a absorção da glicose através das paredes intestinais, o que é importante para aqueles que apresentam alterações em sua glicemia (níveis de açúcar no sangue). Tem sido demonstrado que uma dieta rica em gorduras e pobre em fibras causa aumento dos ácidos biliares fecais (Fietz, Vivian R. e Salgado, Jocelim M. 1999). Essa situação favorece a formação de tumores no trato intestinal causados pela conversão desses ácidos pelas bactérias de sua flora em sais biliares secundários. Esses sais, em particular, agem então como agentes cancerígenos no trato intestinal. Ao ingerirmos pectina regularmente, aumentamos o volume do bolo alimentar (e do bolo fecal), reduzindo, desse modo, a concentração das fezes, bem como a das substâncias carcinogênicas presentes no intestino (Terpstra, A. H. M. *et al.*, 1998). A pectina também acelera o trânsito do conteúdo intestinal, permitindo assim um tempo de contato reduzido dos carcinógenos fecais e das colônias de bactérias com as paredes do intestino. Ela também altera o metabolismo dessas bactérias, o que ajuda a reduzir a produção de carcinógenos dentro do lúmen intestinal. (Wardlaw, G. and Insel, P. 1990; Juliana Piedade *et al.*, 2003).

A matéria prima mais utilizada na obtenção da pectina é a casca de frutas cítricas (limão, laranja, lima), contudo já existem pesquisas com a pectina extraída de outros tipos de espécies botânicas, como por exemplo: a manga (Koubala, B. B. *et al.*, 2008), pera (Kojima, T. *et al.*, 2004), girassol (Iglesias, M. T. and Lozano, J. E. 2004) e maçã (Virk, B. S. and Sogi, D. S. 2004). O produto comercial é um pó branco ou creme que pode ser dissolvido em água



formando uma solução viscosa. A pectina forma géis facilmente na presença de açúcar dissolvido, cátions e pH baixo, em torno de 3 (Pereda, J. A. O. *et al.*, 2005), (Wellner, N. *et al.*, 1998) e (Doungra, E. N. *et al.*, 2012).

Como existe também o interesse científico para a aplicação biológica da pectina no tratamento de diversas doenças, dentre os estudos já mencionados anteriormente, podemos destacar um estudo realizado na Universidade de Geórgia, nos EUA no ano de 2007, que demonstrou que a pectina consegue eliminar as células cancerosas da próstata em até 40%. O experimento realizado com pectina mostrou significativo efeito na eliminação de células que geralmente não respondem à terapia convencional e, por isso, são de difícil tratamento com as medicações disponíveis no momento (Jackson, C. L. *et al.*, 2007).

Com todas estas propriedades biológicas atribuídas aos princípios ativos do Noni, como foi mencionado anteriormente, existem poucas pesquisas direcionadas a pectina deste fruto. Quando extraída das plantas, a pectina é utilizada como aditivo para os produtos alimentícios. Tendo com alguns dos efeitos benéficos para saúde, a contribuição para a melhoria do processo de digestão e diminuição da quantidade de colesterol no sangue (Fietz, Vivian R. e Salgado, Jocelma M. 1999), (Juliana Piedade *et al.*, 2003), (Fernandez, M. L. *et al.*, 1994) e (Rugang Zhu *et al.*, 2013). Ainda relacionados aos processos biológicos das pectinas de outras fontes, muitas pesquisas foram realizadas, com intuito de determinar suas possíveis atividades biológicas, como foi observado por Vladislav, V. *et al.*, (2009), onde constatou a função anti-metastática no tratamento de câncer de próstata em ratos, fato esse, também foi verificado por outros pesquisadores (Jun Yan & Aaron Katz, 2010); (Jackson, C. L. *et al.*, 2007) e este efeito foi observado em outros tipos de cânceres. (Nangia-Makker, *et al.*, 2002; Liu, H. *et al.*, 2008).

Um modo de melhorar uma possível bioatividade da pectina do Noni é realizando sua modificação química por sulfatação. Estes estudos foram realizados e de acordo com Nadiezda C. Maas *et al.*, (2012), mostra que em polissacarídeos sulfatados, apresentam efeitos anticoagulante e antitrombótica. Com esse estudo foi verificado que a substituição de grupos carboxílicos por ésteres de sulfato, potencializa os efeitos das pectinas não sulfatadas. Outros estudos também confirmaram a potencialização da pectina sulfatada (Huang, R. *et al.*, 1993; Fan, F. *et al.*, 2003; Bae, I. Y. *et al.*, 2009; Cipriani, T. R. *et al.*, 2009; Vityazev F. V. *et al.*, 2010), este último trabalho também confirma o efeito anticoagulante associado a um efeito de inibição do fibrinogênio.

## 2.14. Grau de Esterificação

As pectinas constituem um grupo de substâncias com alto valor comercial, principalmente para a indústria de alimentos. Nos últimos anos, estes compostos vêm sendo muito utilizados como espessantes, estabilizadores, agentes de geleificação e modificadores de textura, devido a sua capacidade de atuar como agentes geleificantes (Doungra E. N. *et al.*, 2012).

O grau de esterificação (*GE*) possui uma influência importante nas propriedades da pectina e pode ser determinado pela razão entre os grupos ésteres e os grupos ácidos galacturônicos totais, as pectinas podem ser divididas em duas classificações: alto grau de metoxilação (HM) e baixo grau de metoxilação (LM). Pectina do tipo HM forma géis em pH baixos em torno de 3,0 ou menor, enquanto que a pectina do tipo LM requer a presença de uma quantidade controlada de cálcio, ou outros cátions divalentes, devido à desidratação parcial da molécula de pectina que leva a um estágio intermediário entre a solução e a precipitação (May, C. D. 1990). Vários fatores determinam as propriedades geleificantes, incluindo temperatura, tipo de pectina, grau de esterificação, grau de acetilação, massa molar, pH, açúcares, outros solutos e cálcio (Willats, W. G. T. *et al.*, 2006).

### **3. OBJETIVOS**

Os objetivos deste trabalho são a extração, caracterização e modificação química de pectina da *Morinda citrifolia* para testes de toxicidade e citotoxicidade.

#### **3.1. Objetivos específicos**

- 3.1.1 Verificar as condições e rendimentos de extração em diferentes valores de pH;
- 3.1.2. Caracterizar as pectinas das extrações em pH 3, 7 e 10, comparando com a pectina cítrica de uso comercial;
- 3.1.3. Modificar quimicamente, por sulfatação a pectina extraída por meio ácido;
- 3.1.4. Estudar a toxicidade da pectina extraída a pH 3;
- 3.1.5. Estudar a citotoxicidade da pectina sulfatada.

## **4. METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS**

### **4.1. Materiais**

#### ***4.1.1. Reagentes***

A pectina cítrica (PC) foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes eram de grau analítico. A polpa do fruto seco (*Morinda citrifolia* L) foi obtida a partir da desidratação do fruto maduro, coletado no CVT (Centro Vocacional Tecnológico) situado a Av. Manoel Batista da Silva, na cidade de Aracoiaba, nas coordenadas geográficas 4°21'52.2"S e 38°47'57.2"W, Ceará, Brasil.

#### ***4.1.2. Tratamento da espécie botânica***

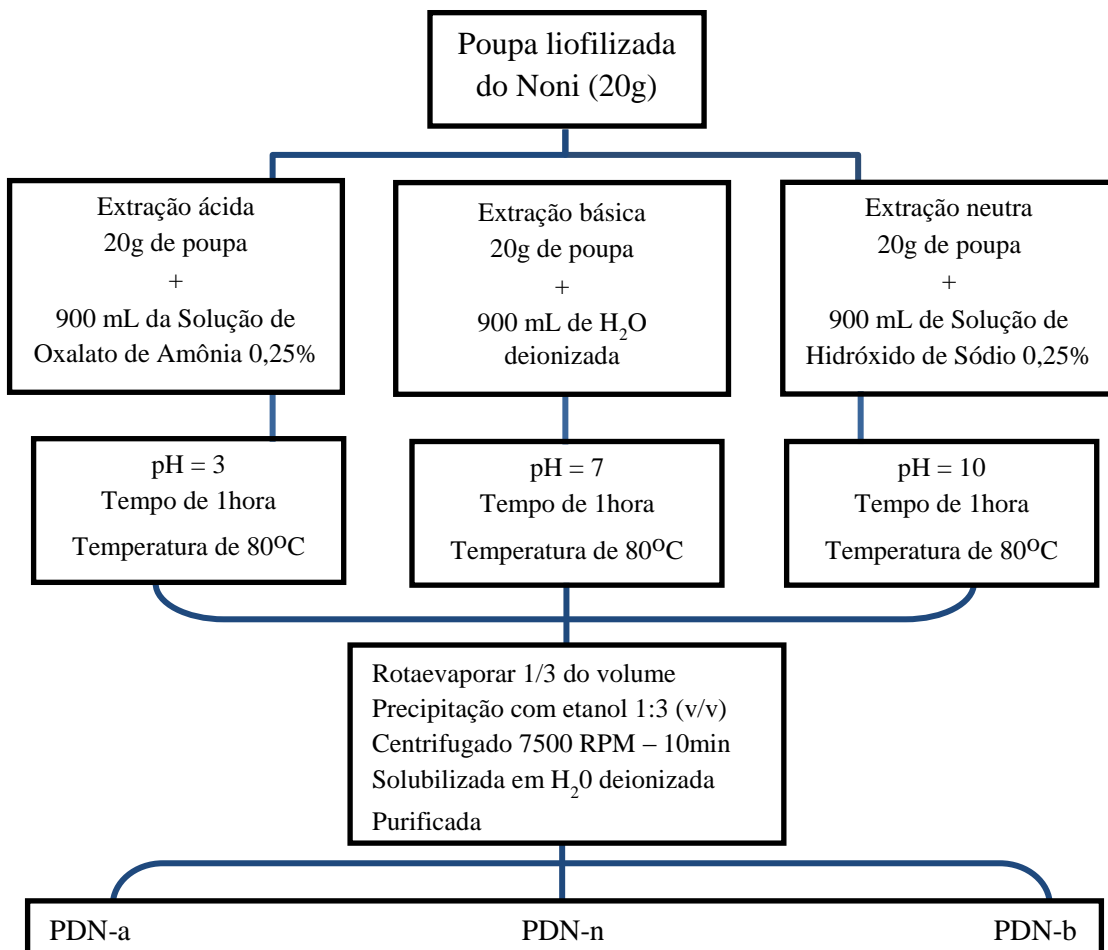
Os frutos foram lavados em água destilada e após uma pré-seleção com o descarte dos frutos danificados e em fase de senescência avançada, a polpa foi separada das sementes através de processos físicos de catação, em seguida liofilizadas à temperatura de -5°C. Para o processo de extração foi utilizados 20g de base seca. A exsicata da espécie botânica se encontra depositada no herbário Prisco Bezerra sob o número 53459.

### **4.2. Métodos**

#### ***4.2.1. Extração e purificação do polissacarídeo***

A metodologia foi adaptada de acordo com Koubala, B. B. *et al.*, (2008), onde a três porções de 20 g de poupa de Noni, foram adicionado 900 mL de agente extrator, para cada porção de massa seca, considerando as condições descritas na Figura 8. Todas as extrações foram feitas em triplicata.

Figura 8 – Esquema da extração da pectina do Noni.



Fonte: Produção do próprio autor

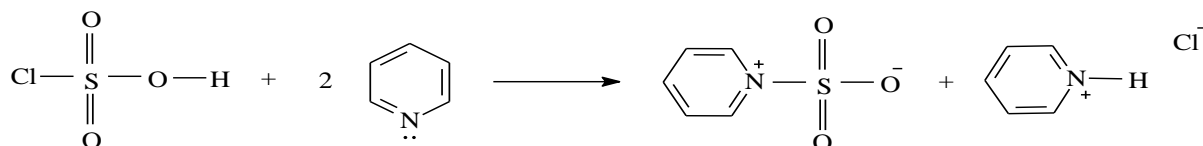
A presença de material insolúvel em água a 25 °C foi observado no precipitado obtido. Afim de não comprometer a realização de algumas análises e procedimentos futuros, foi feita a remoção destes resíduos como descrito a seguir:

Após três precipitações sucessivas o precipitado foi colocado em um recipiente com água deionizada, mantido sob agitação por 24 horas e centrifugado por 10 min a 7500 rotações por minuto (RPM) para remoção da parte insolúvel. A fração solúvel (sobrenadante) foi liofilizada e posteriormente pesada, caracterizada e denominada PDN-a, para extração em pH ácido; PDN-n, para extração em pH neutro e PDN-b, para extração em pH básico.

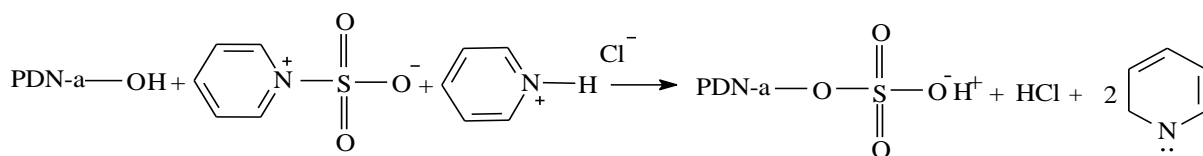
#### 4.2.2. Modificação química por sulfatação (PDN-s)

O procedimento experimental adotado foi adaptado da metodologia proposta por O'Neill A. N. (1955), no qual 300 mg de pectina do Noni (extração pH 3) foram adicionadas em uma mistura de piridina e N,N-dimetilformamida (50:10 v/v), com agitação magnética a 25°C por 12 horas. Após esse procedimento, a mistura foi mantida condicionada, em sistema fechado, à temperatura de 4°C e após as 12 horas o ácido clorossulfônico (4,0 mL) foi adicionado lentamente à mistura com agitação, em banho de gelo, gerando os produtos da etapa 1 e estes produtos no meio reacional em contato como a amostra PDN-a tiveram como resultado os produtos da etapa 2. Com o término da adição do ácido, a mistura reacional foi novamente resfriada a 4°C por 24 horas e em seguida neutralizada com uma solução saturada de NaHCO<sub>3</sub>, de acordo com a etapa 3. O produto obtido foi dialisado (membrana de corte 12.000 g/mol) por 120 horas e posteriormente liofilizada e denominada PDN-s.

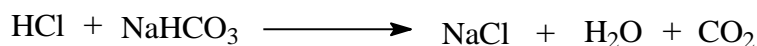
##### Etapa 1 – (Formação do sal de piridina)



##### Etapa 2 – (Formação da pectina sulfatada)



##### Etapa 3 – (Reação de Neutralização)



### 4.3. Caracterização do polissacarídeo

#### 4.3.1. Análise de FT-IR das pectinas (PDN-a), (PDN-n), (PDN-b), (PC) e (PDN-s)

Os resultados das análises de FT-IR para as amostras de PDN-a, PDN-b, PDN-n e PDN-s foram obtidos por análise de fragmentos das membranas na composição de pastilha de KBr sob pressão de 8 toneladas na prensagem para composição da pastilha. A análise foi realizada num equipamento Perkin Elmer, modelo 16 PC.

#### 4.3.2. Determinação do grau de esterificação

##### 4.3.2.1. Por Titulação Potenciométrica

O grau de esterificação (GE) das amostras de pectinas foi determinado pelo método de titulação potenciométrica de acordo com Bocek, A. M. *et al.*, (2001). As amostras de pectina previamente liofilizadas (200 mg) foram colocadas em um bécker e a ela foi adicionada etanol 96% até que cobrisse completamente a amostra, em seguida água destilada aquecida a 40°C (20 mL) foi adicionada e o polímero foi dissolvido sob agitação por 2 horas. A solução resultante foi titulada com NaOH 0,1 mol/L na presença de fenolftaleína e o volume utilizado foi anotado como titulação inicial ( $T_i$ ). Depois, adicionou-se 10 mL da solução de NaOH 0,1 mol/L à amostra neutralizada e agitou-se esta solução por mais 2 horas para saponificação dos grupos carboxílicos esterificados do polímero. Após este período 10 mL de HCl 0,1 mol/L foi adicionado. O excesso de HCl foi titulado com NaOH 0,1 mol/L e volume utilizado foi anotado como titulação final ( $T_f$ ). O número de grupos carboxílicos esterificados foi calculado a partir do volume de NaOH gasto na titulação final. O grau de esterificação foi calculado usando a equação 1:

$$\%GE = \left[ \frac{T_i}{(T_i + T_f)} \right] \times 100 \quad (1)$$

#### 4.3.2.2. Por Interação em FT-IR

Conforme metodologia proposta por Monsoor, M. A. *et al.*, (2001). Foi utilizado um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) para cálculo do grau de esterificação (*GE*) a Equação 2 foi usada para o cálculo.

$$\%GE = \left[ \frac{APGCE}{APGCE+APGCNE} \right] \times 100 \quad (2)$$

onde, *APGCE* é a área dos picos dos grupos carboxílicos esterificados (1760-1745  $\text{cm}^{-1}$ ) e *APGCNE* é a área dos picos dos grupos carboxílicos não esterificados (1640-1620  $\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.3.2.3. Por Integração em RMN $^1\text{H}$

Para a determinação do grau de esterificação foram observados os sinais dos prótons H-5 adjacentes aos grupos ésteres (ICOOMe) que eram comparados com o somatório dos sinais de integração de H-5 adjacente ao ésteres (ICOOMe) e H-5 adjacente aos grupos carboxilato (ICOO<sup>-</sup>). Em consequência da grande proximidade (ou sobreposição) dos sinais de H-1 e H-5 (COOMe) (IH1 + ICOOMe). Pela equação para o GE (Equação 3) a quantidade total de prótons H-5 é equivalente à soma dos prótons anoméricos H-1: ICOOMe + ICOO<sup>-</sup> = IH1. Por meio de algumas manipulações matemáticas simples, o grau de esterificação (*GE*) pode ser determinado (Rosenbohm *et al.*, 2003), como apresentado a seguir:

$$\begin{aligned} GE &= \frac{ICOOMe}{ICOOMe + ICOO^-} = \frac{2(ICOOMe)}{2(ICOOMe + ICOO^-)} = \\ &= \frac{ICOOMe + ICOOMe + (ICOO^- - ICOO^-)}{ICOOMe + ICOOMe + (ICOO^- + ICOO^-)} = \\ &= \frac{(ICOOMe+IH1)-ICOO^-}{(ICOOMe+IH1)+ICOO^-} \end{aligned} \quad (3)$$



#### **4.3.3. Estimativa da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)**

Os perfis cromatográficos da PDN-a, PDN-b, PDN-n, PDN-s e PC foram determinados em um cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-10A a 40°C. Para condução da análise, as amostras foram solubilizadas em 2,0 mL de água deionizada e em seguida, filtradas em membrana de acetato de celulose com poros de 0,45 µm. A análise foi realizada com uma coluna Ultrahydrogel linear 7,8 x 300 mm, fase móvel de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol/L à temperatura ambiente com fluxo de 0,5 mL/min e o volume de amostra injetada foi de 20 µL. A curva de calibração foi construída utilizando-se padrões de pululana com massas molares em intervalo de grandeza de 10<sup>3</sup> a 10<sup>6</sup> g/mol.

#### **4.3.4. Análise da pectina do Noni por RMN <sup>1</sup>H (PDN-a)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H foram obtidos num equipamento Bruker Avance-DMX 500 (USA, Califórnia), com transformada de Fourier. Foram preparadas soluções das amostras de pectina com D<sub>2</sub>O na concentração de 20 mg/mL, sendo as amostras deixadas em água deuterada nessa concentração por 24 horas. A análise foi realizada a 80 °C para deslocar o sinal da água por volta de 4,2 ppm, onde sua interferência não pudesse sobrepor os sinais de pectina (Rosenbohm, C. *et al.*, 2003).

#### **4.3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

As curvas de DSC foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 400 °C, em célula calorimétrica, com atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min). A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios no eixo de temperatura, utilizando padrão de Índio metálico com pureza de 99,99% (T<sub>fusão</sub> = 156,6 °C). Utilizou-se cápsulas de alumínio parcialmente fechadas contendo aproximadamente 5 mg de amostra e 10 mg de Alumina (α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) como referência. O aquecimento foi realizado em uma taxa de 10 °C/min e o equipamento utilizado foi um DSC Q50 da TA.

#### **4.3.6. Análise Termogravimétrica (TGA)**

As curvas TGA foram obtidas em um módulo termogravimétrico DTG – 600 Hz. As medidas termogravimétricas foram efetuadas usando suporte de amostra de platina, massas de amostra em torno de 6.1 mg, razão de aquecimento de 10 °C/min, num intervalo de temperatura de 25 a 800 °C, em atmosfera dinâmica de nitrogênio, com vazão de 30 mL/min em equipamento utilizado foi um DTG modelo Q50 da TA.

#### **4.3.7. Microscopia de Força Atômica (AFM)**

A microscopia de força atômica foi realizada utilizando o equipamento NanoScope III A (Veeco Instruments, Santa Barbara, CA), com acessório para a realização de Microscopia de Força Atômica, no modo de contato intermitente, utilizando sondas de silício de comprimento igual a 228 µm, com frequência de ressonância de 200 Khz e constantes de força de 5-8 N/m. Aproximadamente 10 µL das amostras (PDN-a e PDN-s) foram depositados em mica recentemente clivada. O excesso de umidade das amostras foi retirado com o uso de um fluxo de nitrogênio e a varredura foi efetuada a uma velocidade de 1 Hz com resolução de 512 x 512 pixels.

#### **4.3.8. Potencial Zeta**

Para a determinação do potencial Zeta ( $\zeta$ ) das amostras de pectina (PDN-a e PDN-s), 50 µL da solução foram diluídos em 1,5 mL de solução de NaCl (0,001M) preparada com água ultrapura Milli-Q, para garantir uma intensidade de sinal adequada por parte do equipamento. As medidas foram executadas por meio da medida da mobilidade eletroforética por anemometria *laser Doppler*, em triplicata, à temperatura de 25 °C e pH 7,0, utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 HS .

#### 4.3.9. Análise elementar

As amostras PDN-a e PDN-s foram analisadas para determinar os teores de carbono, hidrogênio, enxofre e nitrogênio, foram realizadas utilizando uma microanalyzer Carlo ERBA EA 1108. O grau de sulfatação (*GS*) foi calculado de acordo com a equação 4 (Bae, I. Y. *et al.*, 2009).

$$GS = \frac{162X(\%S/32)}{100 - [(80/32)X\%S]} \quad (4)$$

#### 4.3.10. Determinação da viscosidade intrínseca ( $\eta_{int.}$ ) e massa molar ( $M_v$ )

Uma das técnicas para a determinação da massa molar e o comportamento de espécies em solução é a viscosimetria, que avalia o fluxo da amostra em relação a aplicação de uma força. Assim é definido como o deslocamento irrecuperável de moléculas em relação à outras, sob a ação de uma tensão externa. Como exemplo, um fluido escoando através de um tubo capilar. Esse fluido é dividido arbitrariamente em camadas concêntricas e que essas camadas que constituem o fluxo movem-se com velocidades diferentes, com a velocidade no interior do tubo bem menor do que aquela próxima à parede do tubo, devido ao atrito entre o fluido e a parede. Assim, durante o escoamento, as moléculas que estão expostas a diferentes velocidades colidem entre si, gerando uma troca de momento entre as camadas, causando uma fricção interna, dificultando o escoamento. Essa resistência ao escoamento, causada pela fricção interna é chamada viscosidade (Lucas, E. F., *et al.*, 2001).

No estudo de soluções diluídas de polímeros é muito comum determinar-se a viscosidade da solução em relação ao solvente puro. A relação entre a viscosidade da solução e a do solvente puro é denominada viscosidade relativa ( $\eta_{rel}$ ). Para determinar o valor desta viscosidade, o tempo de escoamento do solvente,  $t_0$  e da solução  $t_s$  são medidos no mesmo viscosímetro. Considerando que a densidade de soluções diluídas é praticamente igual à do solvente puro, a viscosidade relativa pode ser definida como a razão entre o tempo de escoamento da solução e do solvente puro.

$$\eta_{rel} = t_s / t_0 \quad (5)$$

onde  $t_s$ : tempo de escoamento da solução,  $t_0$ : tempo de escoamento do solvente puro.

A viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) é definida entre a diferença dos tempos de escoamento da solução e do solvente puro ( $t_s - t_0$ ), dividido pelo tempo de escoamento do solvente puro ( $t_0$ ). Ambas são adimensionais, os valores foram calculados equação abaixo:

$$\eta_{sp} = (t_s - t_0) / t_0 \quad (6)$$

Dividindo-se a viscosidade específica pela concentração da solução em g/dL, obtém-se a viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ):

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / C \quad (7)$$

Para determinar a viscosidade intrínseca  $[\eta]$  é necessário determinar a viscosidade reduzida ou a inerente a várias concentrações e extrapolar para a concentração zero. A viscosidade intrínseca é independente da concentração da solução. A viscosidade de um sistema polimérico depende de vários fatores como a massa molar do polímero, temperatura e natureza do solvente.

A viscosidade intrínseca é relacionada à massa molar por meio da equação conhecida como equação de Mark-Houwink (Equação 8).

$$[\eta] = k \times M v^a \quad (8)$$

onde,  $k$  e  $a$  são constantes dependentes da natureza do soluto e do solvente. Os fatores  $k = 0,00067 \text{ cm}^3/\text{g}$  e o expoente  $a = 0,75$  foram usados para os cálculos (Varum, K. M. *et al.*, 1991).

Foram preparadas cinco amostras de pectina da extração ácida (PDN-a), com as respectivas concentrações: 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0%, 1,2% e 1,4% (m/v) e uma amostra de H<sub>2</sub>O milli-Q para teste branco. As amostras foram submetidas à agitação por 24 horas. As

medidas de viscosidade foram realizadas em viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde, a  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

#### **4.3.11. Tensão Superficial**

Soluções das pectinas em concentrações variadas (0,01% a 0,21%), foram submetidas a medidas de tensão superficial ( $\gamma$ ) através do método de du Nouy (Gomes, P. T. 2009). As soluções analisadas foram preparadas usando-se água Milli-Q e filtradas para realização das medidas, que foram feitas as temperaturas de  $25^\circ\text{C}$  em uma balança de torção da White Elec. Inst. Co. LTD. O procedimento consiste na aplicação da força necessária para remover um anel de platina previamente mergulhado na solução em estudo. A força é aplicada através do braço do tensiômetro, que suspende lentamente o anel até desprendê-lo da superfície do líquido. O valor da tensão superficial no momento do deslocamento do anel é lido diretamente na balança, em Din/cm.

#### **4.3.12. Concentração Micelar Crítica (CMC)**

A Concentração Micelar Crítica é a concentração na qual a tensão superficial assume valor constante (considerando que as micelas começam a se formar em proporções detectáveis a uma concentração na qual a monocamada superficial está completa). O valor da *CMC* é obtido a partir do gráfico da tensão superficial *versus*  $\ln$  da concentração ( $\ln[C]$ ), considerando o ponto em que a tensão se mantém constante. Aplicando o inverso da função para este ponto específico têm-se a concentração micelar crítica da solução, ou seja:

$$CMC = e^{\ln[C]} \quad (9)$$

#### 4.3.13. Estudo reológico

O comportamento reológico das amostras foi avaliado no Reômetro Advanced AR 2000, com spindle CP60 com a finalidade de se observar mais claramente o comportamento do material a taxas de cisalhamento mais baixas (de 10 a 100 s<sup>-1</sup>). Foram utilizadas soluções das amostras em concentrações iguais a 1%. As análises foram realizadas em triplicata a 25°C.

Para confirmar o comportamento reológico das amostras foram traçado gráficos com os dados do logaritmo taxa de cisalhamento (s<sup>-1</sup>) pelo logaritmo da tensão de cisalhamento (Pa), a fim de se determinar, por meio da equação 11, o índice de comportamento do fluido (*n*), usado para definir seu caráter pseudoplástico, onde, *T* é a tensão de cisalhamento (Pa), *k* é o índice de consistência do material (Pa.sn) e  $\bar{Y}$  é a taxa de cisalhamento (1/s). Aplicando log em ambos os lados da equação 10, obtém-se a equação 11:

$$T = k\bar{Y}^n \quad 10$$

$$\log T = \log k + n \log \bar{Y} \quad 11$$

#### 4.4. Análises físico-químicas

##### 4.4.1. Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985) e Farmacopéia Brasileira (1988). Esse método baseia-se na perda por dessecação em estufa e visa determinar a quantidade de substância (s) volátil (eis) de qualquer natureza eliminada (s) nas condições especificadas. Inicialmente foi colocados três cadinho na estufa durante 30 min. a 105°C, e em seguida retirados da estufa e colocados em um dessecador até a temperatura ambiente (25°C) para então serem pesados. As amostras foram trituradas e suas massas (~0,5g) foram pesadas nos cadinhos tarados em balança analítica. Esse procedimento foi realizado distribuindo o material de maneira uniforme no cadinho. Após a pesagem a amostra foi colocada em estufa à temperatura de

105°C por 30 min. Depois de arrefecidas à temperatura ambiente em dessecador, foram submetidas à nova pesagem até a obtenção do peso constante. As análises foram realizadas para as amostras de PDN-a, PDN-b e PDN-n (triplicata). E o teor de umidade foi calculado conforme a equação abaixo:

$$\mu\% = \left( \frac{m_1 - m_2}{m_2} \right) \times 100 \quad (12)$$

onde  $\mu\%$  é o teor de umidade,  $m_1$  é a massa da amostra úmida e  $m_2$  é a massa da amostra seca.

#### ***4.4.2. Determinação de lipídios***

O procedimento de extração da porção de gordura foi realizado utilizando o processo tipo Soxhlet (M. D. Luque de Castro and F. Priego-Capote, 2010). Foram pesados 3 balões de 500 ml para cada amostra, em seguida foram pesado aproximadamente 200 mg das amostra e submetidas ao processo de extração durante 8 horas utilizando hexano como agente extrator, após esse período as amostra foram submetidas ao Rotaevaporador para retirada do hexano, em seguida foram pesados (balão com gordura) para descobrir o teor de gordura através das diferenças de massa.

#### ***4.4.3. Determinação de proteínas***

A determinação de proteína baseia-se na determinação de nitrogênio processo de digestão de acordo com o método Kjeldahl (Yasuhara, T. and Nokihara, K 2001) Este método, idealizado em 1883, tem sofrido numerosas modificações e adaptações, porem sempre se baseia em três etapas: Digestão, Destilação e Titulação.

A matéria orgânica e decomposta e o nitrogênio existente é finalmente transformado em amônia. Sendo o conteúdo de nitrogênio das diferentes proteínas aproximadamente 16%, introduz-se o fator empírico 6,25 para transformar o numero de gramas de nitrogênio encontrado em numero de gramas de proteína (Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, 2008).

Aproximadamente 500 mg das amostras foram submetidos ao processo e foram utilizado 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N e 1 g de CuSO<sub>4</sub> como catalizador, após a etapa de digestão as amostra foram submetidas a destilação e a titulação com NaOH 0,1N, para obter sulfato de amônia em solução. As análises foram feitas em triplicata e o percentual de proteína foi determinado de acordo com equação abaixo:

$$\%Protéina = \left( \frac{(VA \times NA) - (VS \times NS)}{\text{Peso da amostra (g)}} \right) \times 6,25 \quad (13)$$

onde VA é o Volume (mL) da solução de ácido sulfúrico; NA é a normalidade da solução de ácido sulfúrico; VS é o volume (mL) da solução de NaOH; NS é a normalidade da solução de não e 6,25 é o fator de conversão e equivalência.

#### ***4.4.4. Determinação de fibras***

O cálculo do teor de fibra se processou através das amostras que foram submetidas ao procedimento de extração de gordura, onde as amostras foram pesadas e calculadas a porcentagem de gordura através da diferença de massa, obtendo ao final do processo de teor de gordura, fibras solúveis purificadas.

### **4.5. Farmacologia e toxicidade**

#### ***4.5.1. Materiais***

##### ***4.5.1.1. Reagentes biológicos***

Todos os reagentes eram de grau analítico.



#### **4.5.1.2. Animais de Laboratório e alojamento**

Vinte camundongos fêmeas convencionais, da linhagem Swiss, foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (Biocen-UFC) com três semanas de idade. Os animais foram alojados no Biotério Experimental do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec), do Departamento de Biologia da UFC, com condições de temperatura ( $23,0 \pm 2,0$  °C), fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro) e umidade do ar controlada (45-55%). Os camundongos foram mantidos em número adequado em caixas de polipropileno com substrato de raspa de pinho (Biotécnicas, São Paulo, Brasil) e água e ração (Biobase, Bio-Tec, São Paulo, Brasil) *ad libitum* até atingirem o peso aproximado de 20 g para realização dos testes.

Todos os protocolos com animais, adotados neste trabalho, foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, que adota os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e obedece a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regula o uso de animais em pesquisas científicas.

#### **4.5.2. Métodos**

##### **4.5.2.1. Ensaio de toxicidade aguda via oral da amostra PDN-a em camundongos**

O estudo de toxicidade aguda, em dose única, via oral da amostra PDN-a foi realizado de acordo com o protocolo teste limite Nº 425 da OECD (2001). Foram utilizados camundongos fêmeas ( $n = 5/$  por grupo). A amostra PDN-a foi ressuspensa em água destilada e administrada oralmente nas doses de 5, 50 ou 300 mg/Kg de peso corpóreo, por gavagem, para cada grupo de animais. Um grupo de camundongos administrados somente com o veículo, água destilada, também foi realizado. Todos os camundongos foram observados nas primeiras horas após a administração da amostra e, depois, duas vezes ao dia durante 14 dias. A possível intervenção da amostra PDN-a sobre o comportamento natural dos camundongos foi observada, bem como indícios de toxicidade a partir da verificação dos seguintes sintomas/características: piloereção, anestesia, atividade motora, frêmito vocal, resposta ao toque, equilíbrio, presença de contorções, tremores, ptose e presença de fezes escuras ou disformes. O peso de todos os camundongos foi registrado nos dias 0, 4, 7, 10 e

14. No 14º dia, os animais foram levemente sedados com éter etílico e exsanguinados pela via do seio retro-orbital para determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos do soro. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e dissecados para observação, monitorada por um patologista, da condição anatomomorfológica de órgãos vitais, sendo, depois, pesados cuidadosamente para obtenção do peso úmido relativo.

#### ***4.5.2.2. Determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos***

Ao final do experimento de toxicidade aguda, os animais receberam uma leve anestesia por inalação de éter etílico e, posteriormente, o sangue foi coletado via plexo retro-orbital com auxílio de tubo capilar heparinizado. Uma parte do sangue foi coletada em tubos heparinizados para a determinação dos parâmetros hematológicos e outra parte foi coletada para obtenção de soro para dosagem de parâmetros bioquímicos. Para análise dos parâmetros hematológicos foi utilizada uma alíquota 15 µL de sangue total de cada animal em um analisador hematológico veterinário (Sysmex, modelo pocH-100iV Diff, Kobe, Japão). Os parâmetros verificados foram: número de células brancas no sangue (leucócitos), número de células vermelhas do sangue (hemácias), concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM.), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM.), número de plaquetas, % de linfócitos nas células brancas totais, % de neutrófilos, basófilos e monócitos, amplitude de distribuição das hemácias medida como coeficiente de variação (RDW-CV) e amplitude de distribuição das hemácias medida como desvio padrão (RDW-SD). As amostras de sangue para análise bioquímica sérica foram mantidos durante 12 horas, a 4 °C, até a coagulação completa. Em seguida, o sangue coagulado foi centrifugado a 600 RPM, durante 10 min, e o soro foi recolhido. Os seguintes parâmetros bioquímicos foram medidos: Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase alcalina, Creatinina, Ureia, Proteína total, Albumina, Colesterol total. Todas as análises de soro sanguíneo foram realizadas utilizando kits específicos (Labtest, Minas Gerais, Brasil) para cada parâmetro, de acordo com as instruções do fabricante.

#### ***4.5.2.3. Determinação do peso úmido relativo dos órgãos***

Ao final do experimento de toxicidade aguda, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. Os animais foram dissecados e cuidadosamente os órgãos/tecidos foram verificados quanto ao seu aspecto (cor, presença de manchas e/ou irregularidades anatômicas etc) por um histopatologista e, em seguida, pesados em balança de precisão (Bioprecisa, modelo FA2104N, São Paulo, Brasil). Posteriormente, os órgãos foram fixados com álcool etílico 70%, por 24 horas e depois, com formalina 10%. Os órgãos/tecidos dissecados foram: cérebro, timo, coração, pulmões, fígado, baço, pâncreas, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso, rins, bexiga, útero, tuba uterina e ovários. Todos os órgãos/tecidos fixados de acordo com o item anterior foram processados em várias etapas de desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes de 70 até 100%, diafanizados com xilol, para então serem embebidos e emblocados em parafina. Em seguida, foram feitos cortes em micrótomo com lâmina de diamante e, então, corados com hematoxilina e eosina.

#### ***4.5.3. Análise estatística dos dados do ensaio de toxicidade***

As comparações estatísticas foram concebidas para determinar se as diferenças nas variáveis de resposta referidas acima (peso corporal, hematologia e parâmetros bioquímicos do soro e peso relativo de órgãos), entre grupos, foram atribuíveis à amostra PDN-a comparada ao grupo controle (água destilada). A homogeneidade de variância foi analisada por meio da análise de variância simples (One-way ANOVA) com o “software” estatístico GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, EUA). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **4.6. Estudos de citotoxicidade em neutrófilos humanos**

### ***4.6.1. Isolamento de neutrófilos humanos***

Sangue rico em leucócitos humanos de adultos saudáveis foi obtido a partir Hemoce (banco de sangue), Fortaleza, CE, Brasil. A suspensão de células que contém predominantemente neutrófilo (~92%) foram isolados por um método de Lucisano, M. Y. e Mantovani, B. (1984), com ligeiras modificações (Kabeya, L. M. *et al.*, 2002). A viabilidade celular determinada pelo teste com azul de tripano foi de  $89 \pm 2,0\%$ .

### ***4.6.2. Ensaio Lactato desidrogenase (LDH)***

Células de neutrófilos humanos ( $2,5 \times 10^6$  células/ml) em uma suspensão foram incubadas com a amostra de PDN-s (10, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/ml}$ ), DMSO foi utilizado como veiculo/controle (1% v/v), HBSS (não tratados) e Triton X-100 (Tx, 0,2% v/v, droga padrão) por 15 min. a 37°C. A atividade da LDH foi determinada através de um método disponível no mercado (Liquiform LDH de Labtest Diagnóstico, Lagoa Santa, MG, Brasil).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Extrações e rendimentos

Mc Cready em 1970 e outros pesquisadores mais recentes, tais como Levigne *et al.*, (2002) reportam que a condição de extração tem efeitos não apenas na extração propriamente dita, mas também no rendimento e na estrutura química do material extraído. É notadamente reconhecido que a redução do pH inicial de extração permite obter melhores rendimentos e a redução extrema pode ser desfavorável, visto que pode acelerar a degradação do polímero e a desesterificação da pectina (Yapo, B. M. *et al.*, 2007). Isto foi observado durante o procedimento de extração da pectina do Noni, notou-se que a influencia do pH para a solução de extração aquosa e básica (pH 7 e 10 respectivamente) foi o fator preponderante para o baixo rendimento, já na extração ácida o valor de pH elevou-se de 3,0 a aproximadamente 3,5, muito próximo do valor encontrado por Chunhieng, M. T. (2003) em seu trabalho sobre desenvolvimento de novos alimentos, direcionado às nozes de origem Brasileira e *Morinda citrifolia* de origem Cambojana, onde o valor de pH foi 3,72 e confirmando o que foi constatado no ano de 2002 por pesquisadores da Comissão Europeia, que encontraram um valor de pH entre 3,4-3,6. Através dos procedimentos de extração e purificação realizados obteve-se um rendimento médio de acordo com a Tabela 3. Resultados muito semelhantes aos obtido por Anh Kim T. *et al.*, (2006) que foi de 16% e também de acordo com o resultado encontrado por Hirazumi e Furusawa (1999) que obteve um rendimento de 13% no seu trabalho.

Baseando nestes argumentos da extração: pH, rendimento e o não aumento da degradação do polímero, a amostra PDN-a foi utilizada para o procedimento de sulfatação, visto que, a sulfatação por se só altera a cadeia polimérica, assim seria utilizado uma amostra proveniente de uma extração não tão agressiva.

Tabela 3 – Valores de rendimento das extrações em diferentes valores de pH

<b>Extração</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Ácida</b>	3,8789	19,39
<b>Neutra</b>	2,4582	12,29
<b>Básica</b>	2,9681	14,84

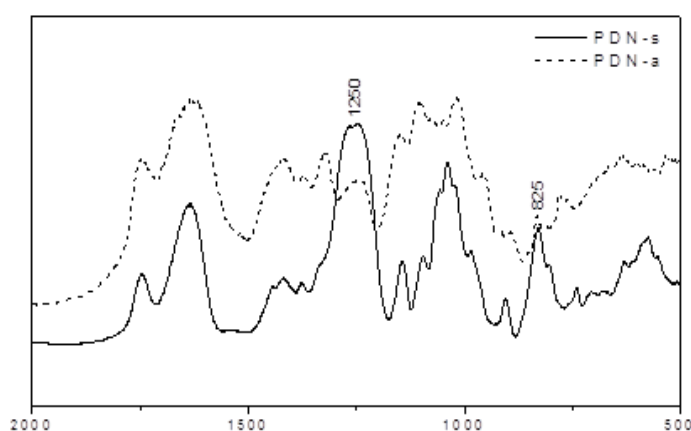
Fonte: Produção do próprio autor

## 5.2. Sulfatação da pectina

Como as atividades biológicas das pectinas estão relacionadas com as suas características estruturais, podemos assim modifica-la para melhorar suas propriedades (Bae, I. Y. *et al.*, 2009), de acordo com Nadiezda C. Maas *et al.*, (2009) que mostra em estudos de polissacarídeos sulfatado, apresentarem efeitos anticoagulante, antitrombótica, com esse estudo foi verificado que a substituição de grupos carboxílicos por ésteres de sulfato potencializa os efeitos das pectinas não sulfatadas, melhorando assim seus efeitos biológicos.

A presença de grupos sulfato na estrutura do PDN-s derivado do PDN-a foi confirmado por FT – IR. As bandas  $828\text{ cm}^{-1}$  e  $1260\text{ cm}^{-1}$  (Figura 9), foram muito próximos ao encontrado por Bae, I. Y. *et al.*, (2009) que foi de  $810\text{ cm}^{-1}$  para vibrações características de ligação C-O-S e  $1250\text{ cm}^{-1}$  para ligações S=O, evidenciando assim a sulfatação da amostra de PDN-a, fato esse também foi confirmado através da análise elementar da amostra.

Figura 9 – Espectros de FT – IR das pectinas (PDN-a e PDN-s)



Fonte: Produção do próprio autor

## 5.3. Espectroscopia de infravermelho (FT – IR) e Determinação do grau de esterificação

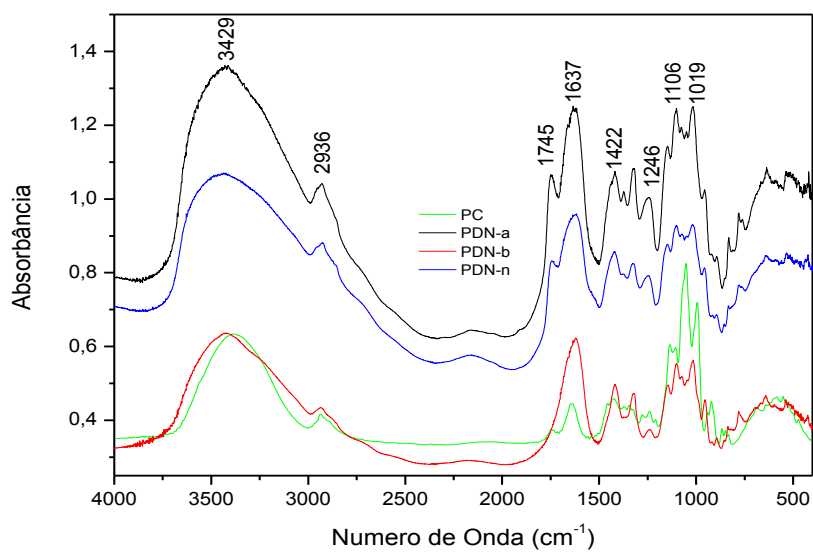
A espectroscopia de infravermelho também tem sido sugerida como uma ferramenta útil de análise não destrutiva para distinguir diferentes pectinas (Abdenor Fellah *et al.*, 2009). Esta técnica proporciona um método simples e rápido para a detecção quantitativa e separação de pectinas com diferentes graus de esterificação, com a vantagem da obtenção de informações sobre a distribuição dos substituintes.

Os resultados das análises de FT – IR para as amostras de PDN-a, PDN-b, PDN-n, PC e PDN-s são mostrados nas Figuras 9, 10 e 11, onde podemos observar bandas  $3429\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao alongamento da vibração do grupo hidroxila,  $2936\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao alongamento CH do grupo  $\text{CH}_2$ ,  $1746\text{ cm}^{-1}$  correspondente a grupos carboxílicos esterificados ( $\text{COO}^-$ ), duas outras bandas em  $1637$  e  $1422\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a vibrações da ligação  $\text{O}=\text{C}-\text{O}$  e mais duas bandas em  $1246$  e  $956\text{ cm}^{-1}$  que segundo Guillermo D. M and Franco M. L (2002) correspondente região de “Impressão Digital”, específico para polissacarídeos e todas estas bandas pode ser comparada com as encontradas na literatura (Tabela 4).

Na Figura 10 a região entre  $1800$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  (em destaque na figura 11) é de interesse especial no que diz respeito à avaliação do grau de esterificação, uma vez que permite a observação da absorção de infravermelhos do ácido carboxílico e os grupos de ésteres carboxílicos das moléculas de pectina (Abdenor Fella *et al.*, 2009). O exame desta região espectral da Figura 11 revela a existência de duas bandas centradas em  $1746$  e  $1637\text{ cm}^{-1}$ . Podemos observar uma supressão destas bandas quando o pH da solução extratora é mais elevado e notar que a banda de  $1746\text{ cm}^{-1}$  não é evidenciada em valores de pH em torno de 10, Sendo assim é esperado que a amostra de PDN-b apresenta um baixo grau de esterificação (Guillermo D. M and Franco M. L., 2002), podemos observar esta conclusão da Tabela 5, mais não seria possível o cálculo do grau de esterificação por FT – IR, pois não daria para determinar a área a baixo da banda correspondente. Agora a banda de  $1746\text{ cm}^{-1}$  pode ser visto aumentada em pH baixo, devido à presença dos grupos de ácido carboxílico protonado.

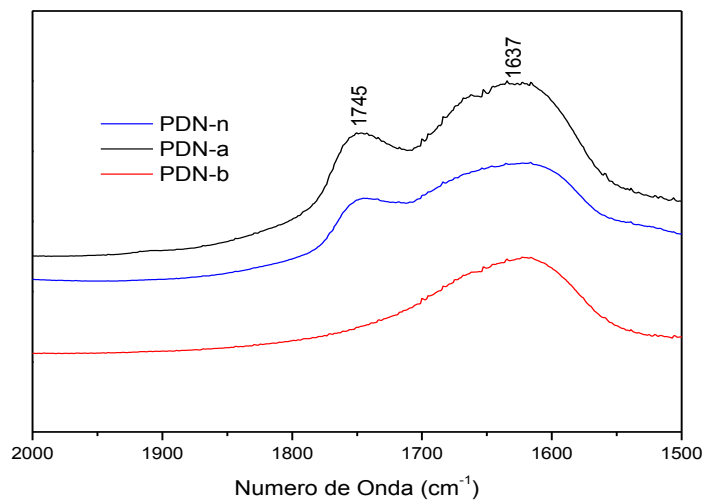
Resultado da determinação do grau de esterificação das pectinas pelo método de titulação potenciométrica, por integração da área abaixo das bandas de FT – IR e integração dos sinais correspondente de H-1 e H-5 no RMN  $^1\text{H}$ , estão relacionados na Tabela 5. Houve uma correlação entre os valores encontrados entre a pectina de uso comercial como a estudada neste trabalho, apresentaram grau de esterificação inferior a 50%, sendo caracterizadas como pectinas de baixo grau de esterificação. Em seu trabalho Márcia V. Marcon *et al.*, (2005) extraíram pectina de baixa grau de esterificação (14,3 a 29,4%) de bagaço de maçã com ácido cítrico a 5%, tempos de extração entre 30-80 min. e temperaturas entre  $50-100\text{ }^\circ\text{C}$ , como também Koubala, B. B. *et al.*, (2007) obteve pectina de grau de esterificação igual a 49%, extraído do limão, em HCl, pH 1,5.a  $85^\circ\text{C}$  por 1 hora.

Figura 10 – Espectros de FT – IR das pectinas (PDN-a, PDN-n, PDN-b e PDN-s).



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 11 – Efeito do procedimento de extração nas bandas nas regiões de FT – IR



Fonte: Produção do próprio autor



Tabela 4 – Atribuições das frequências das principais bandas dos polissacarídeos

<b>Nº de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuições</b>
<b>3428</b>	$\nu$ (O-H) e (N-H)
<b>2936</b>	$\nu$ (C-H)
<b>1746</b>	( $\nu$ C=O)
<b>1637</b>	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$
<b>1422</b>	$\nu_s(\text{COO}^-)$
<b>1246</b>	$\nu_{as}(\text{S=O})$
<b>1147</b>	$\nu$ (C-O-C) éter da ligação glicosídica
<b>1106</b>	$\nu$ (C-H) carbono anomérico
<b>1040</b>	$\nu$ (C-S)
<b>1019</b>	$\nu$ (C-O) álcool primário
<b>956</b>	$\delta$ C-H em configuração $\alpha$
<b>906</b>	$\delta$ C-H em configuração $\beta$
<b>828</b>	Aromáticos com substituição no anel. (C-O-S)
<b>700</b>	$\nu$ (S=O)
<b>623</b>	Aromáticos com substituição no anel.

As regiões características encontradas acima foram citadas baseadas em Silverstein(1996)

Tabela 5 – Grau de Esterificação das pectinas (PDN-a e PC)

<b>AMOSTRA</b>	<b>Titulação</b>	<b>FT – IR</b>	<b><i>RMN</i><sup>1</sup><i>H</i></b>
<b>PDN-a</b>	30,74	30,28	30
<b>PC</b>	34,39	34,15	-

Fonte: Produção do próprio autor

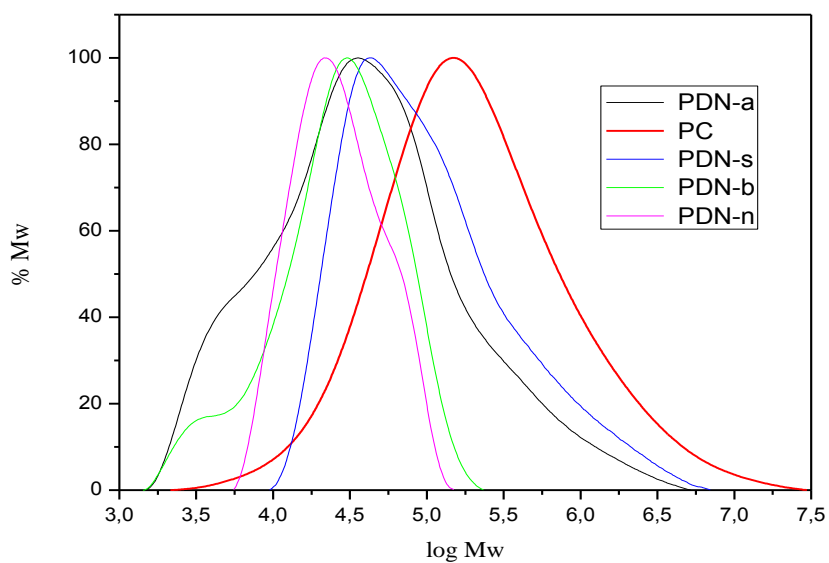
## 5.4. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

### 5.4.1. *Polidispersividade e massa molecular*

Pode ser observado na Figura 12 o comportamento cromatográfico das amostras, mais para chegar a estes resultados, foi necessário que a partir dos valores dos logaritmos das massas molares dos padrões de pululana e suas respectivas percentagens de massa molecular, com isso foi possível construir a curva de calibração para esta análise e obter os valores de índice de polidispersividade (IPD) para as amostras, (Tabela 6). O IPD variou entre 3,84; 5,49 e 6,84 para a PDN-s, PC e PDN-a, respectivamente, os IPD apresentaram valores próximos dos encontrados por Muhidinov, Z. K. *et al.*, (2010) que foi de 6,2; 2,0 e 6,1 para as pectinas maçã, laranja e girassol, respectivamente.

A polidispersividade de uma amostra polimérica está associada com a “largura” da sua curva de distribuição de massa molar. Para duas amostras de um mesmo polímero com mesmos valores médios de massa molar, o IPD é um indicativo da faixa de variação das propriedades mecânicas da amostra. O ideal é que o IPD seja o menos disperso possível para que a variação nas propriedades seja a menor possível (Harding, 2005), isso fato foi observado em PDN-a e PDN-s, essa diferença pode estar relacionado também ao processo de sulfatação, resultando em uma fragmentação da cadeia polimérica, apresentando valores diferentes entre si. Esta divergência nos valores de IPD é aceitável, visto que, de acordo com Catoire, L. *et al.*, (1998), pectinas comerciais provindas da mesma origem possuem ampla gama no valor do índice de polidispersividade, como também os procedimentos de extração entre PDN-a e PC foram distintas, todos estes eventos podem degradar a cadeia polimérica (Yali Zhang *et al.*, 2010; Nadiezda C. Maas *et al.*, 2012; Mc Cready, 1970; Yapo, B. M. *et al.*, 2007), variando com isso o IPD da amostra.

Figura 12 – GPC das pectinas



Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 6 – Valores de polidispersividade e massas molares

AMOSTRA	$M_n$	$M_w$	$M_w/M_n$
<b>PDN-a</b>	20052	137310	6.84780
<b>PC</b>	89756	493214	5.49506
<b>PDN-b</b>	18390	406630	2.21120
<b>PDN-n</b>	22864	347370	1.51927
<b>PDN-s</b>	61596	236638	3.84178

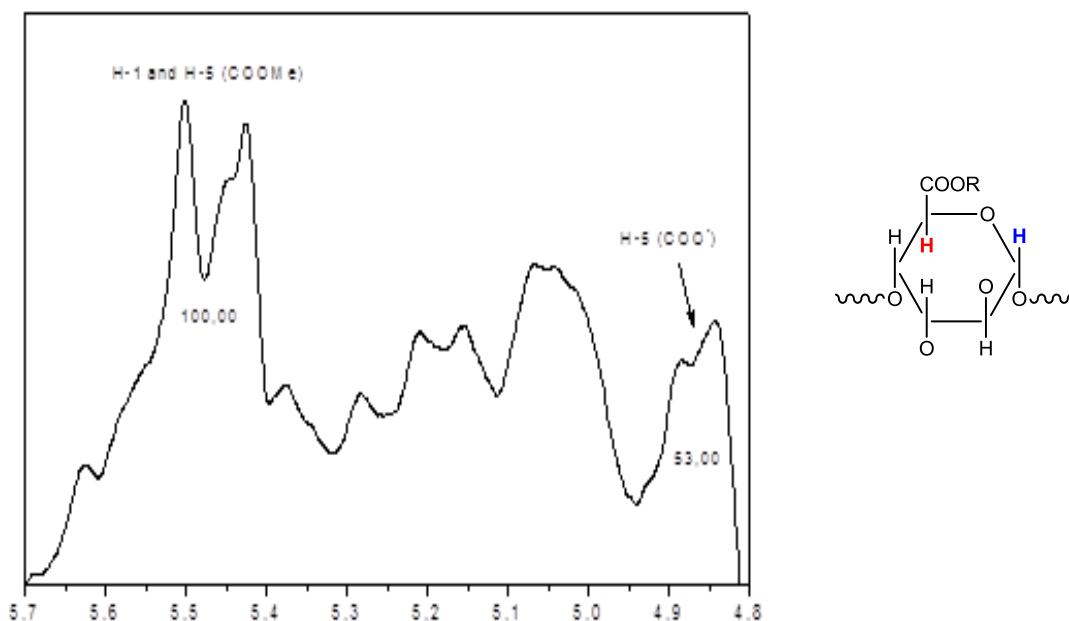
Fonte: Produção do próprio autor

## 5.5. RMN $^1\text{H}$ da pectina do Noni (PDN-a)

Os sinais dos prótons H-1 e H-5 adjacentes aos grupos ésteres apresentaram-se entre 5,5-5,4 ppm enquanto os sinais H-5 adjacentes aos grupos carboxilato ( $\text{ICOO}^-$ ) eram vistos a cerca de 4,8 ppm. Esses sinais (H-1 e H-5) deveriam estar em torno de 5,2 e 4,9 ppm respectivamente. Esses deslocamentos dos sinais são devidos, as condições de conservação e armazenamento da amostra preparada para análise. A caracterização da pectina do Noni por RMN  $^1\text{H}$  (Figura 13), possibilitou a determinação do grau de esterificação ( $GE$ ). De acordo com a metodologia de Rosenbohm *et al.*, (2003), o  $GE$  ficou em torno de 30%. Próximos aos valores encontrados na análises por FT – IR e Titulação potenciométrica (Tabela 5).

Cinco sinais foram observados no espectro  $^1\text{H}$  (Figura 14) e podem ser atribuída a H-1 em 5,50 ppm; H-2, 3,74; H-3, 3,92; H-4, 4,43 e H-5, 4,82 ppm. Valores muito próximos aos encontrados por Tamaki *et al.*, 2008.

Figura 13 – Determinação do grau de esterificação da amostra PDN-a



Fonte: Produção do próprio autor

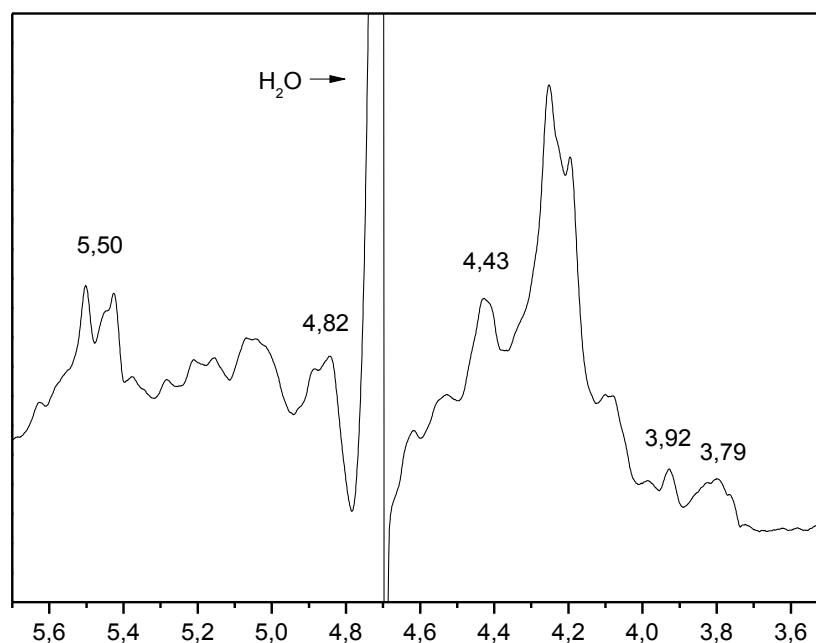
Onde:

R = H,  $\text{CH}_3$  ou  $\text{C}_2\text{H}_5$

**H** = H-5

**H** = H-1

Figura 14. Valores correspondentes a H-1; H-5; H-4; H-3 e H-2, respectivamente da amostra PDN-a



Fonte: Produção do próprio autor

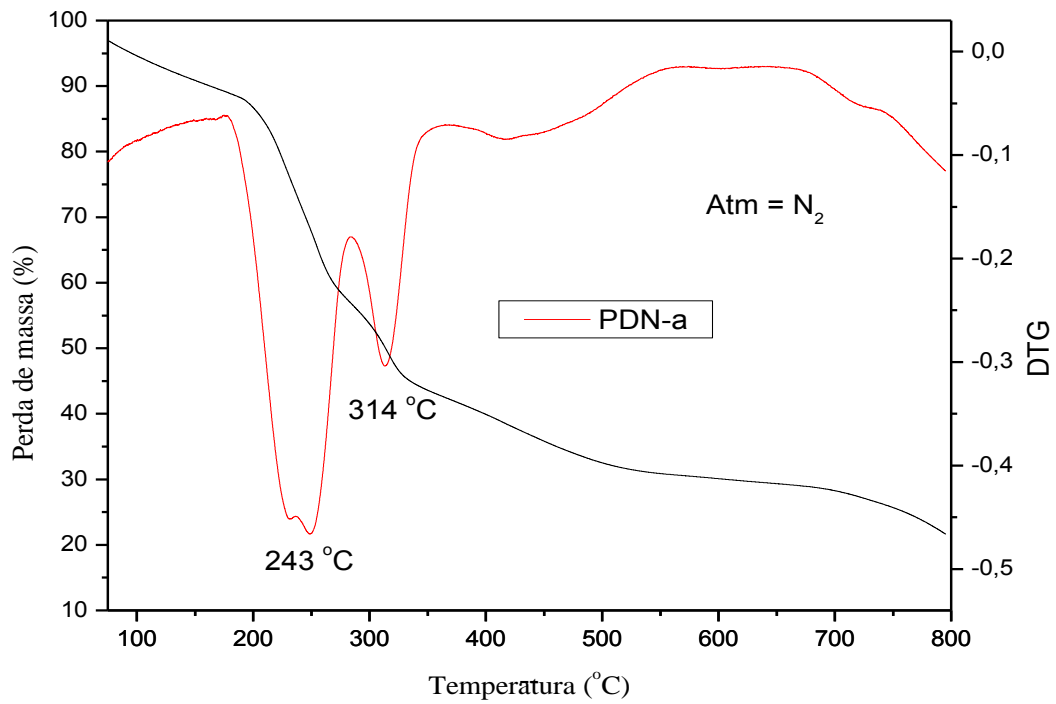
## 5.6. Análise termogravimétrica

As curvas TG/DTG das amostras de pectinas (Figura 15, 16, 17, 18 e 19) mostraram que a substância é termicamente estável até aproximadamente 200 °C, apresentando até esta faixa de temperatura eventos associado à perda de água. O pico exotérmico no gráfico de DSC (Figura 20) para a PC em torno de 235°C, pode ser associado à degradação da pectina (Einhorn-Stoll, U. *et al.*, 2007) e para PDN-a essa degradação ocorre em torno de 260°C.

Não foi possível encontrar as temperaturas de decomposição com a técnica de DSC devido à programação de temperatura realizada na análise. Já nas figuras mencionados no parágrafo acima, pela técnica de TG, foi possível observar que as temperaturas de degradação ficam na faixa de 230°C a 260°C. Para as amostras analisadas, foi verificada uma perda de massa de aproximadamente 32,16% em 243°C e de 14,87% em 341°C, para PDN-a.

Para a PDN-n observou-se somente uma perda de massa de 30,92% em 250°C. Para PDN-b foi observado dois valores de perda de massa (somados o valor é 30,27%) na faixa de temperatura de 254°C e 313°C. Para a amostra PDN-s houve uma perda de 30,27% em 263°C e outra de 27,60% em 750 °C, que poderia esta associada à decomposição do grupamento sulfato (eliminação de enxofre em forma de gás). Já para a amostra de referencia (PC) houve somente um evento associado à perda de massa, em 230°C, o valor da diminuição da massa foi de 68,95%, todos estes eventos de perda de massa e suas respectivas temperaturas podem ser observados nas Tabelas 7 - 11. O teor de resíduo das amostras foi de aproximadamente 16,01% para PDN-n, 21,99% para PDN-a, 22,08% para PC, 23,80% para PDN-b e 25,39% para PDN-s. Para esta última amostra, o resíduo foi muito alto e pode estar relacionado ao agente incorporados na amostra durante o procedimento de sulfatação, vale ressaltar que a amostra controle (PC) apresentou um teor de resíduo acima dos valores aceitos para compostos orgânicos. Pode-se inferir através das curvas de análise térmica que os mecanismos de degradação térmica para as pectinas estudadas são similares.

Figura 15 – Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PDN-a



Fonte: Produção do próprio autor

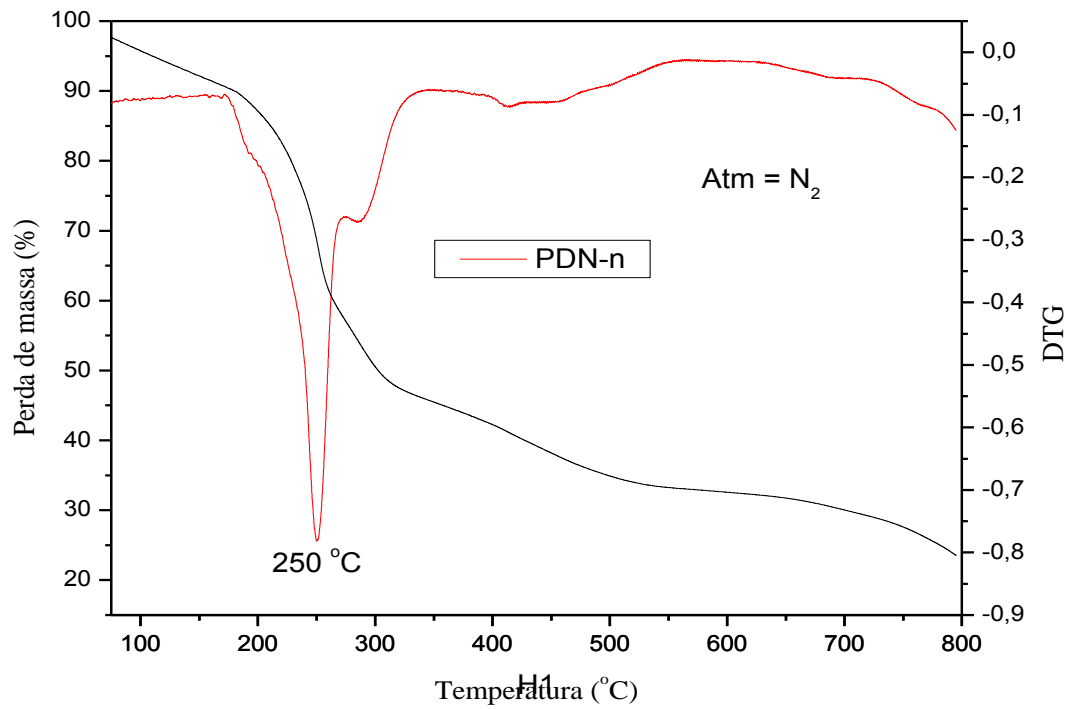
Tabela 7 – Distribuição dos eventos na PDN-a

EVENTO	1	2	3	4
Massa perdida (mg)	0,6725	2,024	0,9361	1,243
Massa perdida (%)	10,68	32,16	14,87	19,57
Faixa de temperatura (°C)	60-160	161-280	281-360	361-790

Fonte: Produção do próprio autor

A massa residual foi de 1,384mg, que corresponde a 21,99%.

Figura 16 – Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PDN-n



Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 8 – Distribuição dos eventos na PDN-n

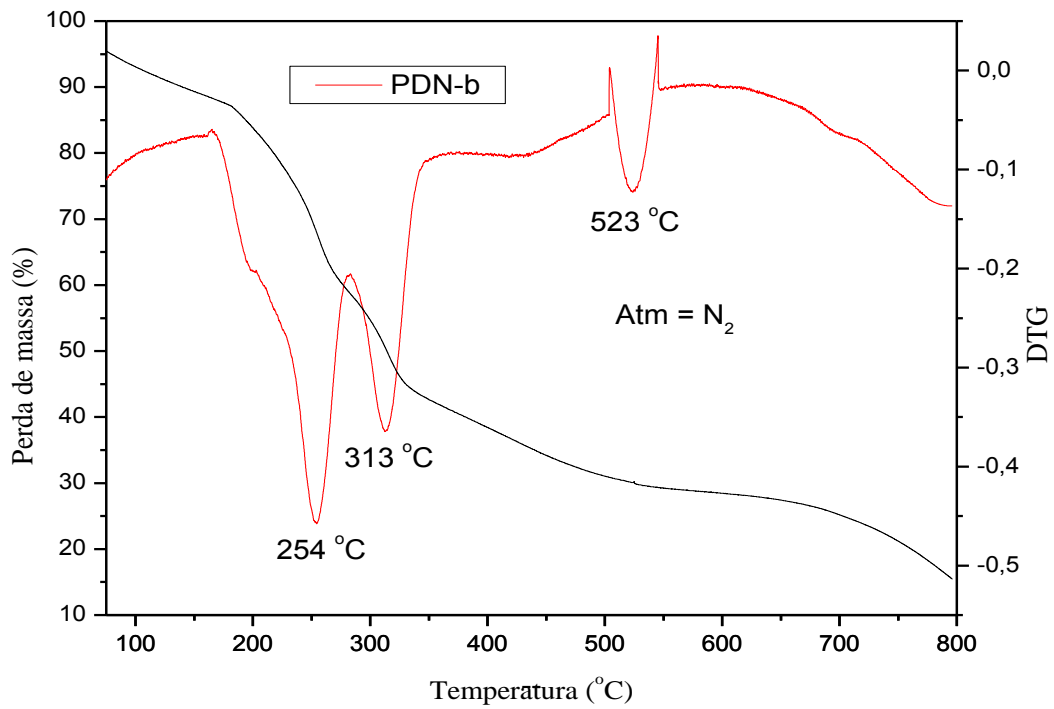
<b>EVENTO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Massa perdida (mg)</b>	0,9017	2,614	3,574
<b>Massa perdida (%)</b>	10,70	30,92	42,27
<b>Faixa de temperatura (°C)</b>	55-160	161-280	281-790

Fonte: Produção do próprio autor

A massa residual foi de 1,384mg, que corresponde a 21,99%.



Figura 17 – Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PDN-b



Fonte: Produção do próprio autor

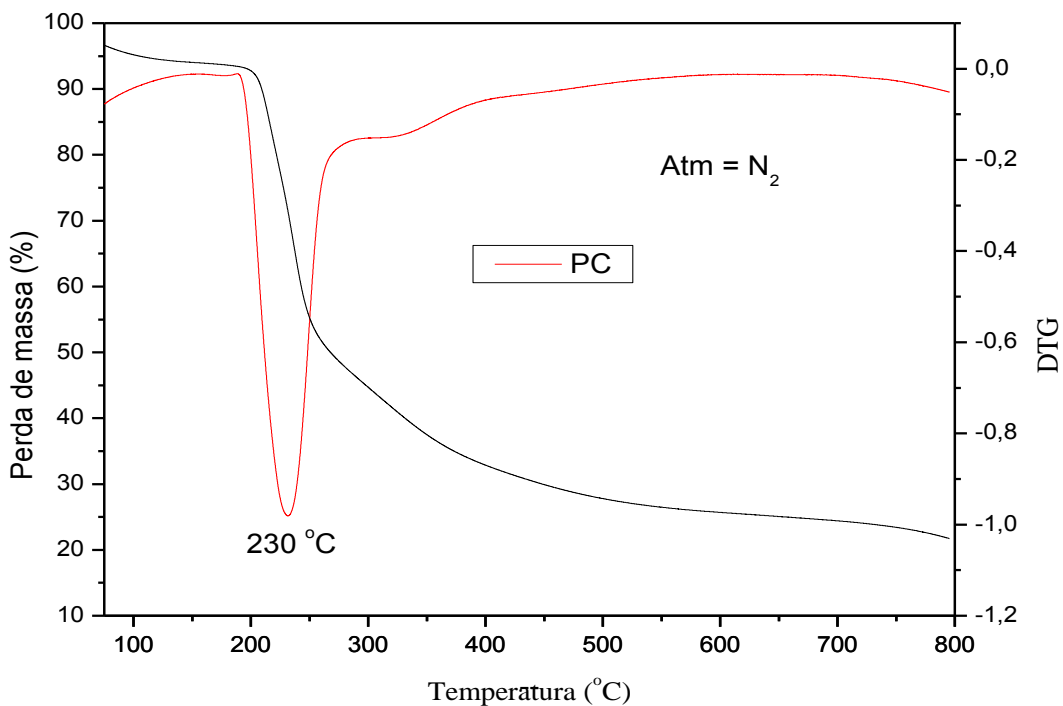
Tabela 9 – Distribuição dos eventos na PDN-b

EVENTO	1	2	3	4
Massa perdida (mg)	0,5677	1,6270	0,2208	1,4830
Massa perdida (%)	10,57	30,27	6,156	27,60
Faixa de temperatura (°C)	55-190	191-450	451-600	601-790

Fonte: Produção do próprio autor

A massa residual foi de 1,960 mg, que corresponde a 22,08%

Figura 18 – Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PC



Fonte: Produção do próprio autor

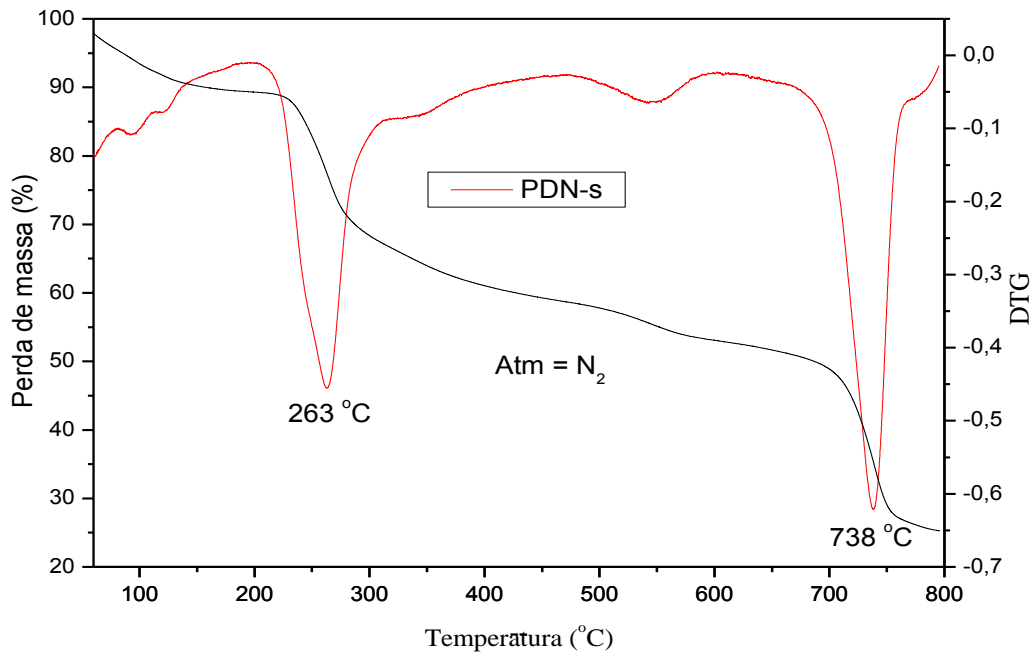
Tabela 10 – Distribuição dos eventos na PC

<b>EVENTO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Massa perdida (mg)</b>	0,5378	6,121
<b>Massa perdida (%)</b>	6,058	68,95
<b>Faixa de temperatura (°C)</b>	50-160	161-655

Fonte: Produção do próprio autor

A massa residual foi de 1,960 mg, que corresponde a 22,08%

Figura 19 – Análise de TG e tratamento matemático (DTG) da amostra PDN-s



Fonte: Produção do próprio autor

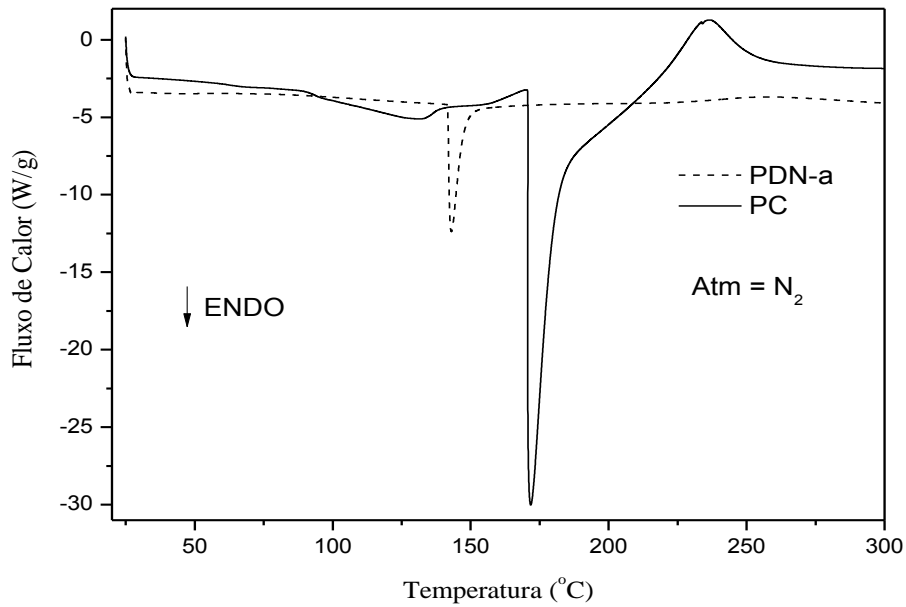
Tabela 11 – Distribuição dos eventos na PDN-s

<b>EVENTO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Massa perdida (mg)</b>	0,5677	1,6270	0,2208	1,4830
<b>Massa perdida (%)</b>	10,57	30,27	6,156	27,60
<b>Faixa de temperatura (°C)</b>	55-190	191-450	451-600	601-790

Fonte: Produção do próprio autor

A massa residual foi de 1,364 mg, que corresponde a 25,39%

Figura 20 – DSC das amostras de PDN-a e PC



Fonte: Produção do próprio autor

## 5.7. Análises físico-química

### 5.7.1. Teor de umidade

Os valores de teor de umidade observados na Tabela 12 encontram-se um pouco acima dos determinados pelas análises térmicas, mais as condições de análises foram diferentes (tamanho do cadinho, massa da amostra, tipo de sistema de aquecimento).

Tabela 12 – Teor de umidade

AMOSTRAS	Massa da amostra(g)	Massa de água(g)	Teor de umidade (%)
<b>PDN-a</b>	0,5016	0,0586	11,68
<b>PDN-n</b>	0,5017	0,0755	15,05
<b>PDN-b</b>	0,4971	0,0859	17,28
<b>PDN-s</b>	0,4707	0,1025	21,78

Fonte: Produção do próprio autor

Os valores das propriedades físico-químicas podem ser observados na tabela 13 e confirmam os estudos em relação a uma quantidade majoritária de Fibra na amostra estudada (Chan-Blanco *et al.*, 2006), com também uma percentagem de quase 10 % de proteína.

Tabela 13– Propriedades Físico-químicas

	<b>Lipídios</b>	<b>Fibras</b>	<b>Proteínas</b>
<b>PDN-a</b>	0,78%	99,22%	9,26%

Fonte: Produção do próprio autor

## 5.8. Potencial Zeta e Microscopia de Força Atômica

Para a análise de potencial Zeta (Figura 21 e 22), para as amostras PDN-a e PDN-s mostraram cargas negativas em água (pH 7) de -32,2mV e -42,1mV respectivamente, devido a um valor do *PI* (ponto isoelétrico) abaixo do valor pH, apresentando com isso uma carga líquida negativa.(Zhu, X. *et al.*, 2007). Estas cargas foram resultado da ionização dos grupos carboxílicos na pectina, uma vez que o pH do meio foi maior do que o pKa da pectina, que é cerca de 3 a 4. A amostra PDN-s mostrou carga mais negativa do que a PDN-a, valor da ionização aumentado devido à incorporação do grupo sulfato na pectina, como foi observado por Yali Zhang *et al.*, (2010).

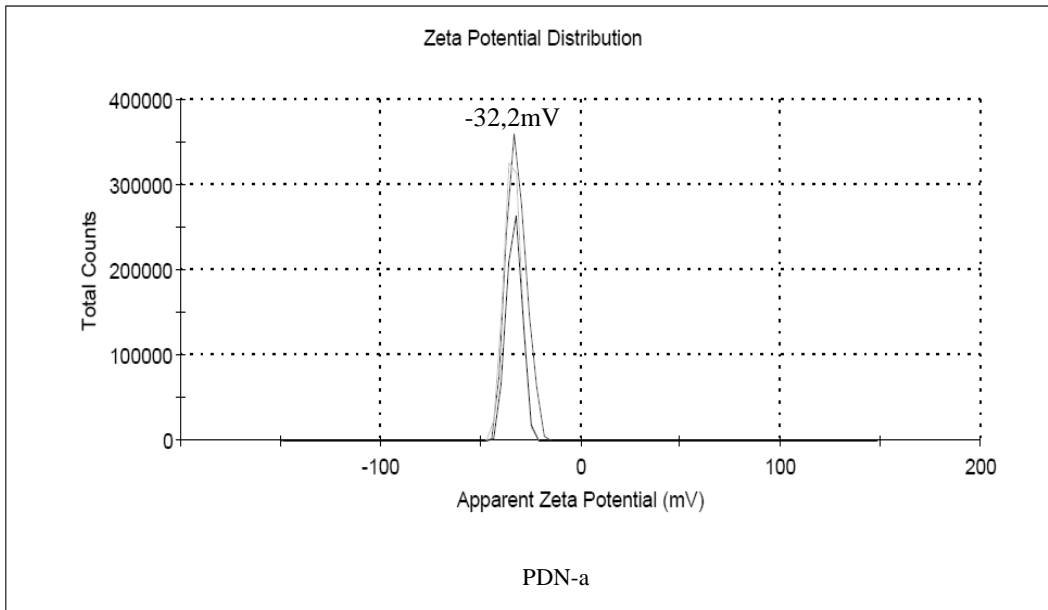
Agora em relação as análises de AFM, seu potencial pode chegar efetivamente à obtenção de imagem próxima ao nível atômico (Figura 23c e 24c). Nestas figuras, são mostradas as análises dassecções transversais de uma parte da cadeia depectina (PDN-a e PDN-s, respectivamente), uma linha de corte transversal foi traçada através da imagem de AFM e o perfil de altura da seção transversal em destaque na imagem (Figura 23a e 24a). Os resultados da parcela da secção transversal entre os dois cursores selecionados são mostrados na parte superior esquerda das figuras (23b e 24b). O espectro de potência ao longo da secção transversal é apresentado na parte central inferior das figuras (23d e 24d). Até três pares de cursores podem ser aplicadas na seção de linha e os resultados são apresentados em vermelho, verde e branco na parte inferior direita das figuras 23 (e) e 24 (e).

Muitos fatores podem influenciar na largura das pectinas nas imagens de AFM, como por exemplo: a forma da amostra, o tamanho, as propriedades e as possíveis interações

entre a ponta do cantilever e a superfície da amostra (Priscila Ikeda Ushimaru *et al.*, 2005), como também as condições de extração favorecem a degradação da pectina. Análises de AFM de pectina da mesma fonte em estágios de maturação diferentes, apresentaram tamanho de cadeia diferente, devido à rigidez das cadeias poliméricas e isso podem estar relacionados ao processo de maturação, onde ocorre um aumento da pectina solúvel, ácidos pécicos e pectato de cálcio, o qual é normalmente acompanhado da diminuição da protopectina, indicando que as pectinas solubilizadas são originadas de polímeros mais firmemente integrados a parede celular e possivelmente também a hemicelulose e esse aumento na solubilização e despolimerização é geralmente correlacionado com a diminuição da firmeza do tecido (Wakabayashi, K., 2000).

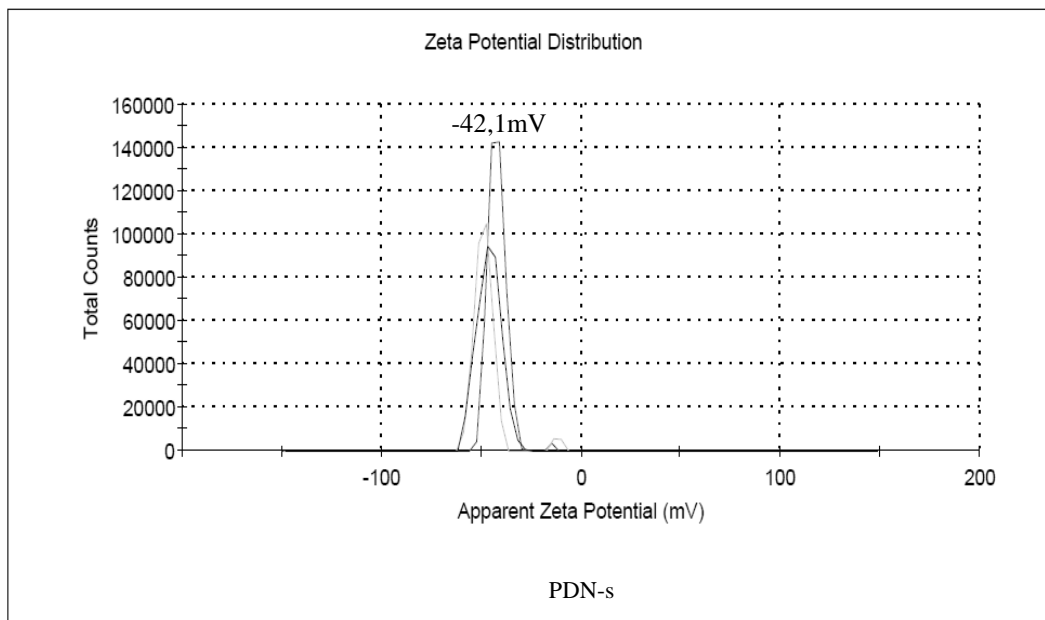
Todos estes fatores são justificados quando são amostras da mesma fonte e estado de maturações diferentes, mais no presente estudo a amostra PDN-s e proveniente de PDN-a, ambas foram submetidas ao mesmo processo de extração, somente PDN-s sofreu processo de sulfatação, o que pode justificar a tamanho reduzido da cadeia, sua menor polidispersividade e fragmentação (Figura 25 e 26), e essas duas imagens, sugere uma vasta gama de distribuição de peso molecular (Hongshun Yang *et al.*, 2009).

Figura 21 – Potencial Zeta da amostra de PDN-a



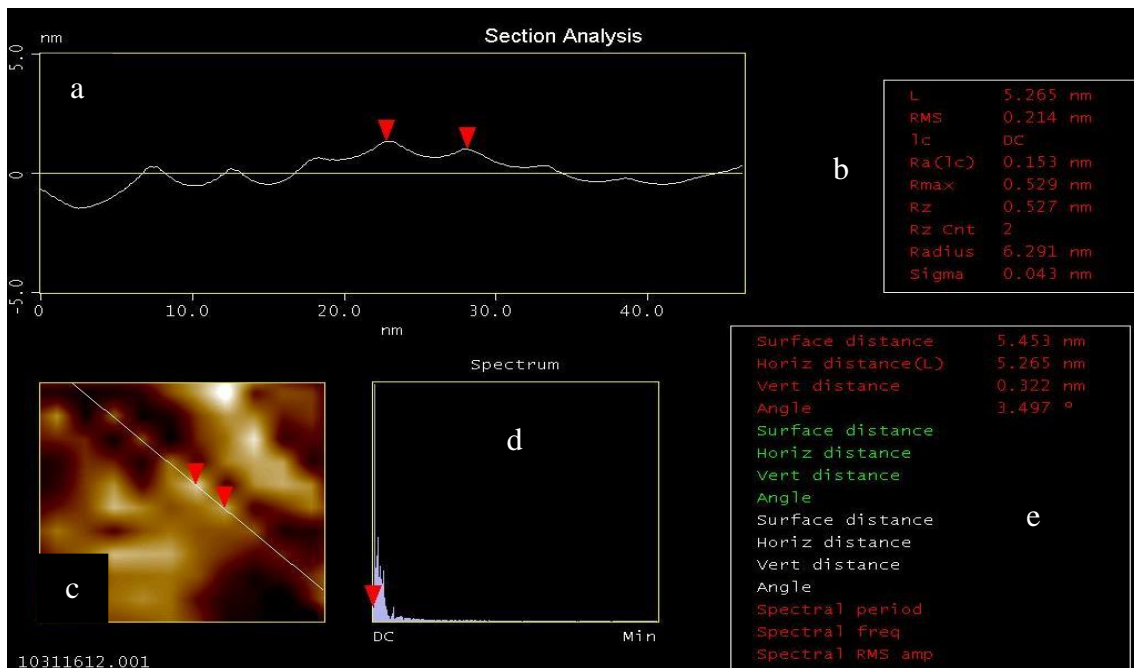
Fonte: Produção do próprio autor

Figura 22 – Potencial Zeta da amostra de PDN-s



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 23 – Análise transversal das cadeias de pectina (PDN-a)

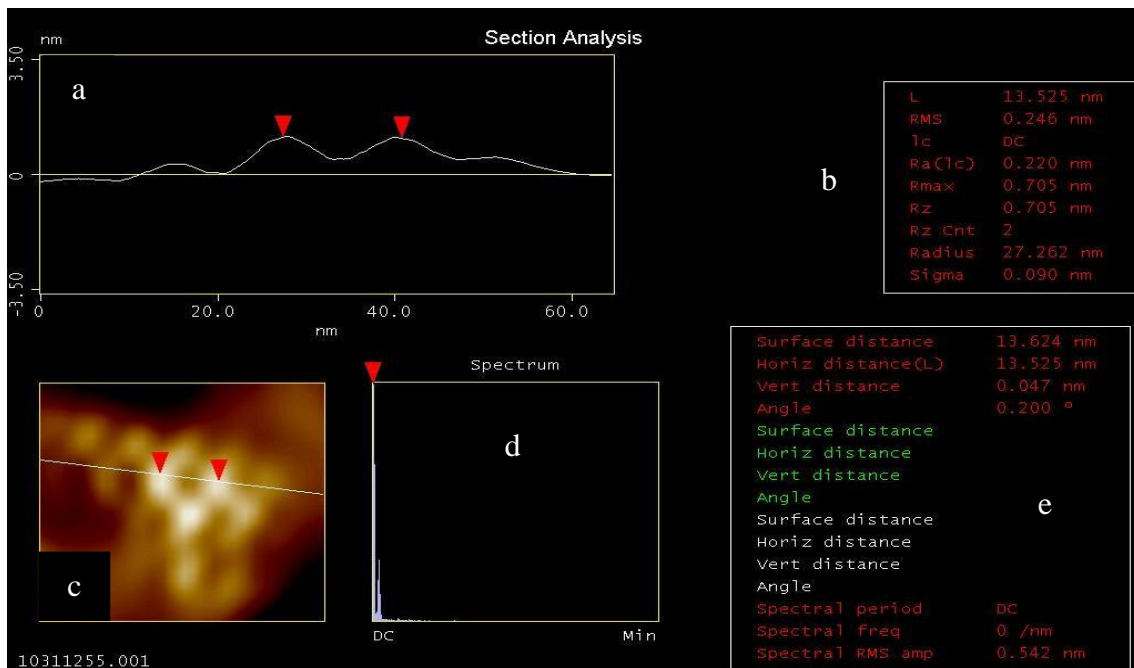


Fonte: Produção do próprio autor

**Nota:** As regiões da figura estão divididas em, (a) o perfil de altura ao longo de uma linha transversal; (b) as medições da dimensão da porção de secção transversal entre os dois cursores coloridos; (c) uma amostra de imagem AFM; (d) o espectro de energia ao longo da secção transversal; (e) medidas de dimensão até três pares de cursores colocados na secção de linha.



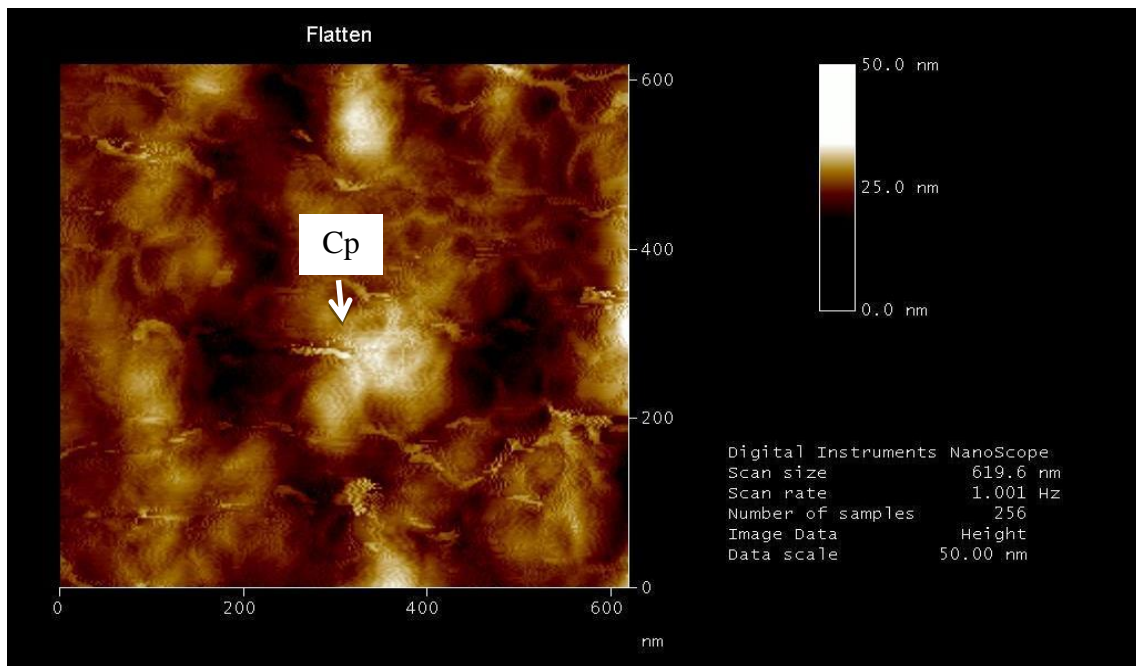
Figura 24 – Análise transversal das cadeias de pectina (PDN-s)



Fonte: Produção do próprio autor

**Nota:** As regiões da figura estão divididas em, (a) o perfil de altura ao longo de uma linha transversal; (b) as medições da dimensão da porção de secção transversal entre os dois cursores coloridos; (c) uma amostra de imagem AFM; (d) o espectro de energia ao longo da secção transversal; (e) medidas de dimensão até três pares de cursores colocados na secção de linha.

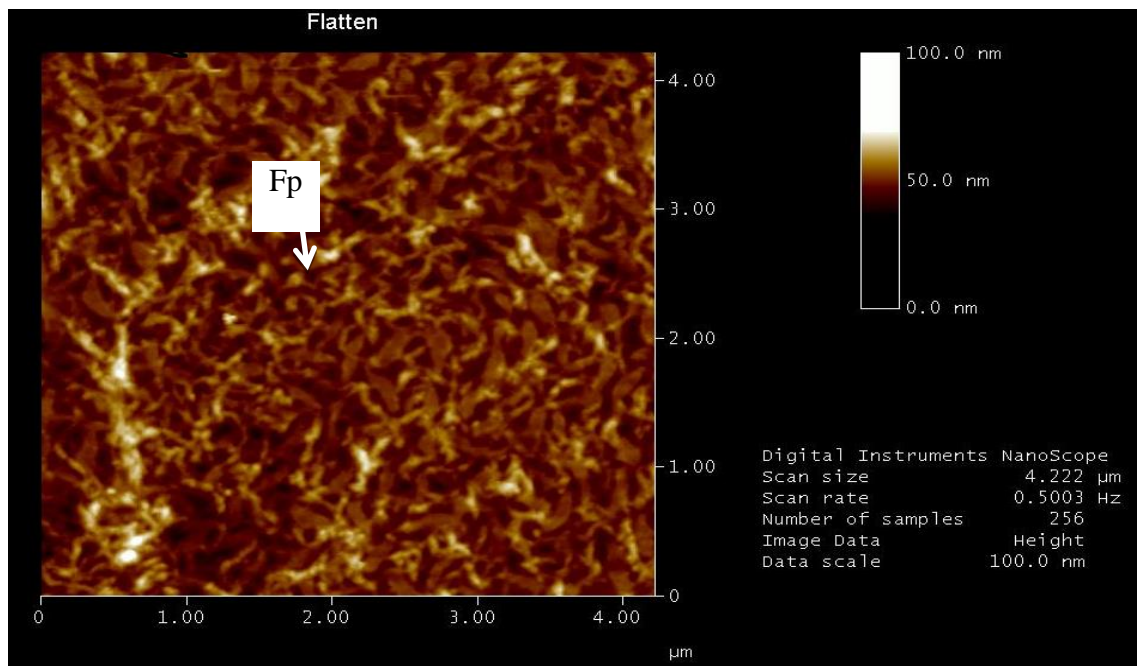
Figura 25 – Imagem de AFM da pectina (PDN-a)



Fonte: Produção do próprio autor

Nota: Cp (Cadeia de pectina).

Figura 26 – Imagem de AFM da pectina (PDN-s)



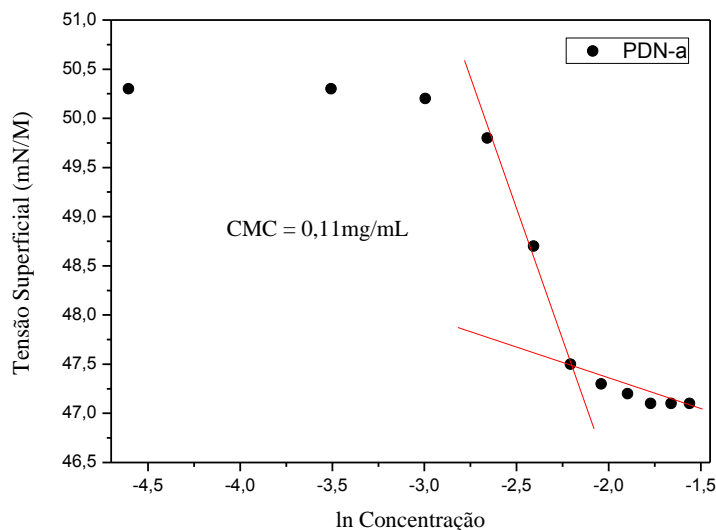
Fonte: Produção do próprio autor

Nota: Fp (fragmentos de pectina).

## 5.9. Determinação da tensão superficial, viscosidade intrínseca e massa molar

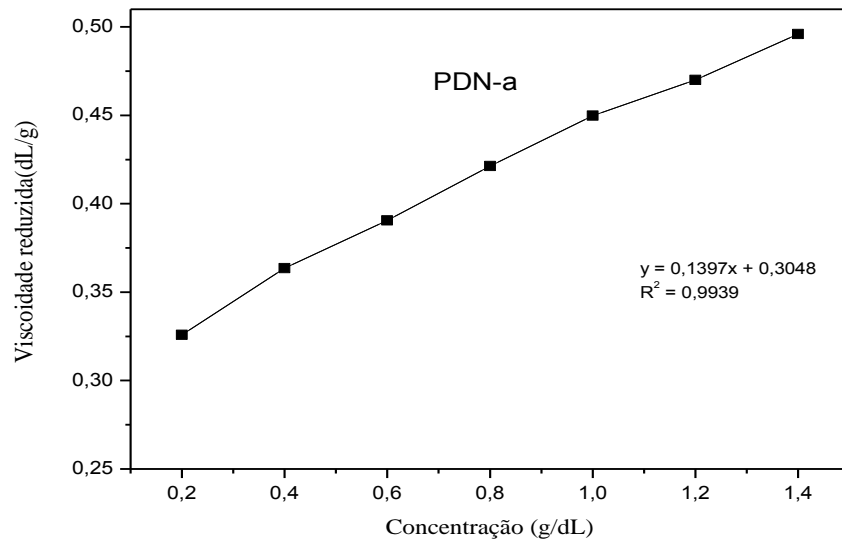
Após a determinação das tensões superficiais, os valores obtidos foram plotados no gráfico (Figura 27) que mostra a evolução desta em função do logaritmo neperiano da concentração da solução. Numa fase inicial verifica-se que a tensão diminui claramente com o aumento da concentração. Isto ocorre devido ao fato de que as soluções de pectina possuem a capacidade de reter água, provocando um aumento da viscosidade da solução (Figura 28 e tabela 14), e como consequência, diminuindo a tensão superficial da água. Esta capacidade de reter água está associada aos grupos hidrofílicos presentes na estrutura da molécula do polissacarídeo. No entanto, a partir de um determinado valor esta capacidade se estabiliza não mais se alterando significativamente. O valor de concentração a partir da qual o valor da tensão superficial estabiliza é a Concentração Micelar Crítica (CMC), e pode ser determinada pela intersecção das duas retas correspondentes às regressões lineares das duas zonas. O valor da CMC obtida foi de 0,11 mg/mL.

Figura 27 – Gráfico da tensão superficial e determinação da CMC



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 28 – Viscosidade da amostra PDN-a



Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 14 – Valores de Viscosidade da amostra PDN-a

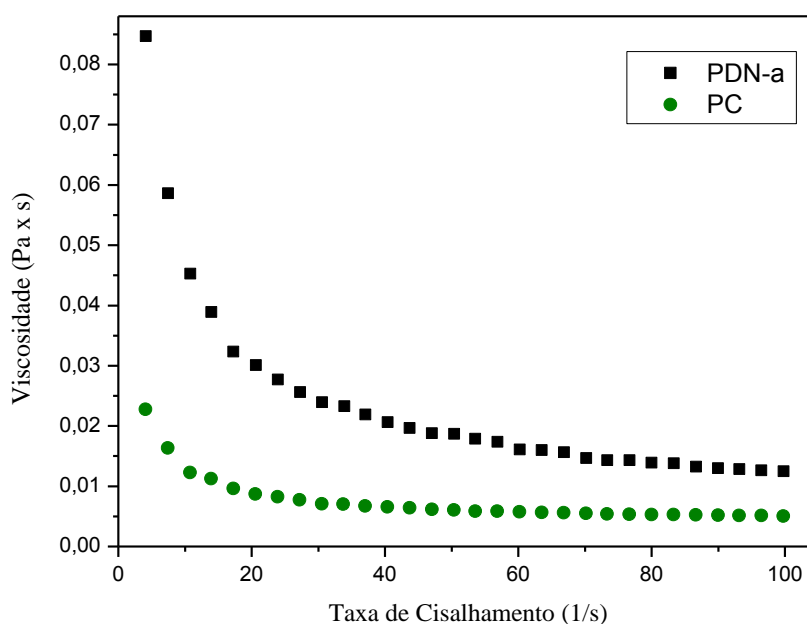
Concentração (g/ml)	$t_s$ (s)	$\eta(rel)$	$\eta(sp)$	$\eta(red)$	$ln(\eta(red))$	$\eta(incr)$
<b>0,002</b>	33,18	1,065169	0,065169	0,325843	0,063133	0,315665
<b>0,004</b>	35,68	1,145425	0,145425	0,363563	0,135776	0,33944
<b>0,006</b>	38,45	1,234350	0,234350	0,390583	0,210544	0,350907
<b>0,008</b>	41,65	1,337079	0,337079	0,421348	0,290487	0,363109
<b>0,010</b>	45,16	1,449759	0,449759	0,449759	0,371397	0,371397
<b>0,012</b>	48,72	1,564045	0,564045	0,470037	0,447275	0,372729
<b>0,014</b>	52,78	1,694382	0,694382	0,495987	0,527318	0,376656

Fonte: Produção do próprio autor

## 5.10. Estudo Reológico

Para as amostras analisadas, a diminuição na viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação se caracteriza pelo início do escoamento sob a ação de tensões de cisalhamento infinitesimais, isso determina um comportamento pseudoplásticos (Tófano *et al.*, 2005). É possível inferir do gráfico de tensão de cisalhamento versus viscosidade (Figura 29) que as amostras de PDN-a e PC apresentam comportamento reológico pseudoplásticos.

Figura 29 – Comportamento reológico das amostras de pectina (PDN-a e PC) em concentração de 1% m/v.

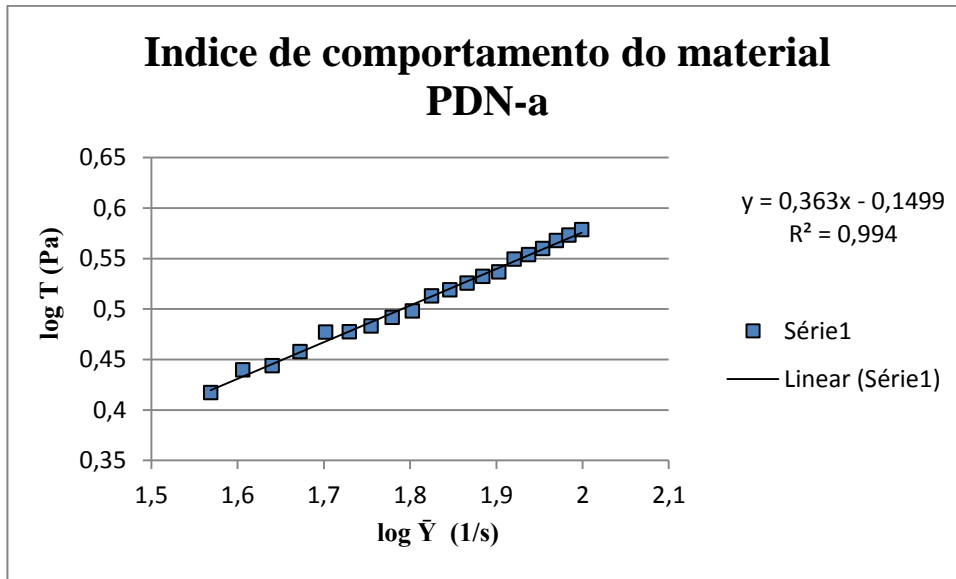


Fonte: Produção do próprio autor

Os resultados para cálculo do índice de comportamento do material, utilizando a equação 11, são mostrados nas Figuras 30 e 31, onde o coeficiente angular da reta gerada representa diretamente o índice de comportamento do material. Materiais cujo índice de comportamento é igual a uma unidade apresentam comportamento newtoniano, não alterando a viscosidade com a tensão de cisalhamento e aqueles que apresentam índice de

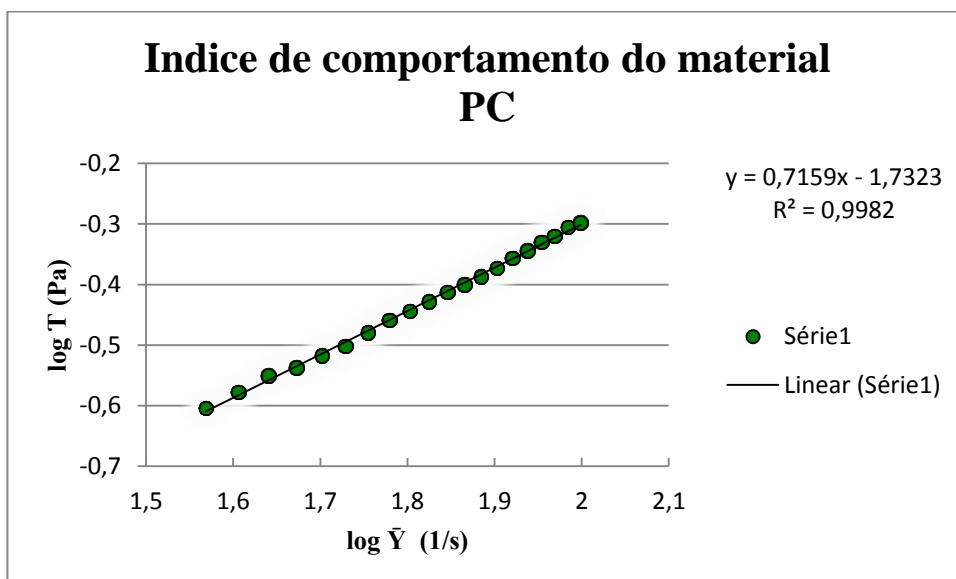
comportamento superior a 1, são classificados como dilatantes, cuja viscosidade modifica-se com a taxa de cisalhamento.

Figura 30 – Cálculo do índice de comportamento do material (n) para PDN-a



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 31 – Cálculo do índice de comportamento do material (n) para PC



Fonte: Produção do próprio autor

Com base nos valores obtidos nas Figuras 30 e 31, podem ser determinados os valores de “n” para as duas amostras (PDN-a e PC) foram 0,3630 e 0,7159, respectivamente, com isso, podemos afirmar que, como o valor de “n” se apresenta um pouco abaixo de uma unidade, as soluções de pectina analisada apresenta caráter ligeiramente pseudoplástico.

### 5.11. Análise elementar

Para a determinação da composição dos elementos químicos presente nas amostras de pectina, foi utilizada a técnica de análise elementar. Por meio desta técnica foram quantificados os teores de carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre nas amostras de pectina. Os resultados dessas análises são apresentados na Tabela 15, onde pode ser confirmado que o percentual de enxofre da amostra de PDN-s corrobora com o procedimento de sulfatação e o valor de DS calculado pela equação 4, que foi de 0,65. Os valores observados na tabela 16 confirmam que na amostra PDN-s o teor de carbono, nitrogênio e hidrogênio é reduzido, devido ao procedimento de sulfatação proporcionar a degradação da cadeia polimérica (Yali Zhang *et al.*, 2010; Nadiezda C. Maas *et al.*, 2012).

Tabela 15 – Elementos químicos principais existentes nas amostras de PDN-a e PDN-s

Amostras	Carbono (%)	Enxofre (%)	Nitrogênio (%)	Hidrogênio (%)
PDN-a	30,11	-	6,35	5,50
PDN-s	9,46	9,72	0,66	2,40

Fonte: Produção do próprio autor

### 5.12. Farmacologia e toxicidade

Após a administração da amostra PDN-a aos camundongos, não foi detectado nenhum sintoma característico de intoxicação.

Na Figura 32 é mostrada a evolução do peso corpóreo (g) dos camundongos tratados com diferentes doses da amostra PDN-a. O peso corpóreo dos animais dos grupos teste não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) daquele dos animais do grupo controle, ocorrendo uma sobreposição clara entre as curvas de crescimento de todos os grupos.

Qualquer redução significativa no peso corpóreo dos animais do grupo teste poderia ser um indicativo de efeitos tóxicos e/ou antinutricionais inerentes às amostras testadas.

Para verificação da toxicidade da amostra PDN-a, os parâmetros hematológicos (Tabela 16) foram analisados e com relação aos valores de RBC e HGB, estiveram próximos aos encontrados na literatura, já os valores de HCT, MCV e WBC, apresentaram abaixo dos valores determinados, agora os resultados de HCM, CHCM e PTL foram obtidos acima dos da literatura (Diniz *et al.*, 2006 e Pinheiro *et al.*, 1998). Estes resultados estão de acordo, pois existem fatores que são determinantes para obtenção de valores próximos, como, a linhagem, o genótipo e podem ser influenciados pela idade, pela dieta, pelo manuseio, pelo ambiente, entre outros fatores. Como também pode ser observado que os valores obtidos com as dosagens analisadas não estiveram distantes dos valores de referencia (Branco).

Quanto ao peso úmido relativo dos órgãos (Tabela 17), foram detectadas alterações significativas ( $p < 0,05$ ) no peso do timo dos animais submetidos à dose de 300 mg/Kg (diminuição relativa) e no peso do pâncreas dos animais submetidos à dose de 5 mg/Kg (aumento relativo), isso quando comparados aos animais do grupo controle.

A análise histopatológica do timo dos animais do referido grupo teste poderá confirmar um possível dano a esse órgão e até revelar o grau dessa provável lesão.

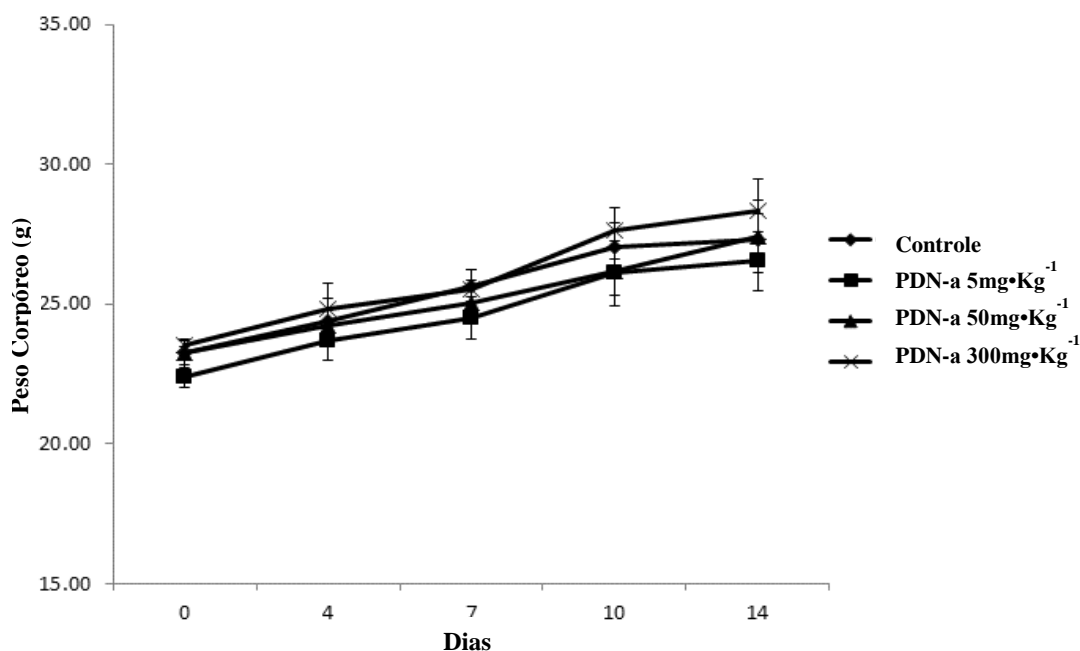
Quanto ao aumento relativo do pâncreas, fica difícil suscitar qualquer efeito tóxico da amostra PDN-a, uma vez que as maiores concentrações testadas não apresentaram efeitos semelhantes. Da mesma forma, a análise histopatológica do timo desses animais poderá mostrar se realmente houve algum efeito deletério. Alterações no peso de órgãos (aumento ou diminuição), especialmente daqueles órgãos envolvidos em processos de detoxificação, podem representar efeitos tóxicos inerentes às substâncias administradas quando comparadas às amostras controle.

No que diz respeito à dosagem dos parâmetros bioquímicos do soro (Tabela 18), os valores de TGO e TGP dos animais do grupo teste foram menores ( $p < 0,05$ ) dos aqueles animais do grupo controle. O mesmo também foi visto para o valor de creatinina dos animais submetidos a maior dose da amostra PDN-a. Diminuição dos valores de TGO e TGP pode está relacionado à insuficiência renal (falência dos rins), cetoacidose diabética e doença hepática severa, mais todos os parâmetros bioquímicos estiveram com valores próximos da literatura (Diniz *et al.*, 2006 e Pinheiro *et al.*, 1998). A análise histopatológica do fígado e dos rins dos animais tratados com a amostra PDN-a poderá confirmar uma possível lesão a esses órgãos, bem como avaliar o grau das lesões.



Apesar da amostra PDN-a ter apresentado efeitos sobre o peso úmido relativo do timo e na dosagem de TGO e TGP nos camundongos, isso foi mais pronunciado nos animais tratados com a maior dose testada (300 mg/Kg). Vale ressaltar também, que nas doses de 5 e 50 mg/Kg praticamente nenhum efeito significativo sobre os parâmetros testados foi detectado, o que já exclui a amostra PDN-a de classificações como extremamente, altamente ou moderadamente tóxica. Além disso, as demais dosagens bioquímicas aliadas às análises histopatológicas serão decisivas para chegarmos a uma conclusão sobre a toxicidade aguda para camundongos da amostra PDN-a.

Figura 32 – Evolução do peso corpóreo (g) de camundongos fêmeas



Fonte: Produção do próprio autor

**Nota:** (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5, 50 e 300 mg/ kg peso corpóreo) da amostra PDN-a e com o veículo, água destilada, durante 14 dias. Os valores são médias  $\pm$  desvios-padrão para cada.

Tabela 16 – Os parâmetros hematológicos dos ratos

Parâmetros	PDN-a (mg/Kg)			
	Água	5	50	300
<b>WBC (10<sup>3</sup>/μL)</b>	3,80 ± 0,33	4,20 ± 0,50	4,53 ± 1,02	4,90 ± 0,41
<b>RBC (10<sup>12</sup>/μL)</b>	9,02 ± 0,08	8,57 ± 0,29	9,44 ± 0,44	9,20 ± 0,44
<b>HGB (g/dL)</b>	13,78 ± 0,69	13,16 ± 0,74	14,63 ± 0,81	14,08 ± 0,81
<b>HCT (%)</b>	38,20 ± 1,43	38,33 ± 1,78	41,25 ± 1,77	39,40 ± 2,07
<b>MCV (fL)</b>	43,34 ± 1,45	43,84 ± 1,21	44,40 ± 1,71	43,60 ± 0,61
<b>MCH (pg)</b>	15,32 ± 0,64	15,34 ± 0,44	15,60 ± 0,43	15,28 ± 0,31
<b>MCHC (g/dL)</b>	35,32 ± 0,60	35,00 ± 0,34	35,18 ± 1,07	35,06 ± 0,75
<b>PLT (10<sup>3</sup>/μL)</b>	876,30 ± 65,18	1027,0 ± 84,18	1120,0 ± 36,69 <sup>a</sup>	989,70 ± 103,50
<b>RDW-SD (fL)</b>	26,56 ± 0,70	26,98 ± 0,92	26,83 ± 1,17	26,38 ± 0,81
<b>RDW-CV (%)</b>	14,54 ± 1,23	14,54 ± 0,61	14,40 ± 1,06	14,22 ± 0,53

Fonte: Produção do próprio autor

Os valores são médios ± DP.

<sup>a</sup>p<0,05(ANOVA) grupos experimentais em relação ao grupo controle em branco.

<sup>b</sup>p<0,05(ANOVA) grupo experimental 5mg/Kg em comparação com os grupos experimentais 50 e 300mg/Kg.

p<0,05(ANOVA) grupo experimental de 50mg/kg em relação ao grupo experimental 300mg/Kg.

**Nota:** (n=5/grupo) submetidos a uma dose oral única de PDN-a, em concentrações de 5, 50 e 300mg/Kg, em comparação com o controle, a água destilada.

Tabela 17 – Peso úmido relativo (%) dos órgãos dos ratos

Órgãos	Grupos			
	Controle	PDN-a 5 mg/Kg	PDN-a 50 mg/Kg	PDN-a 300 mg/kg
<b>Cérebro</b>	2,38 ± 0,08	2,37 ± 0,06	2,51 ± 0,15	2,34 ± 0,13
<b>Timo</b>	0,51 ± 0,04	0,60 ± 0,00	0,051 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,44 ± 0,06 <sup>a,b</sup>
<b>Coração</b>	0,77 ± 0,09	0,79 ± 0,08	0,75 ± 0,05	0,75 ± 0,08
<b>Pulmões</b>	0,88 ± 0,07	0,88 ± 0,02	0,88 ± 0,08	0,87 ± 0,10
<b>Baço</b>	0,38 ± 0,07	0,43 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,36 ± 0,04
<b>Pâncreas</b>	0,99 ± 0,23	1,46 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,04 ± 0,22 <sup>b</sup>
<b>Fígado</b>	6,74 ± 0,48	6,83 ± 0,46	7,06 ± 0,43	7,00 ± 0,41
<b>Rins</b>	2,07 ± 0,17	2,08 ± 0,04	2,04 ± 0,08	2,06 ± 0,16
<b>Estômago</b>	1,24 ± 0,08	1,33 ± 0,08	1,31 ± 0,08	1,25 ± 0,01
<b>Duodeno</b>	2,71 ± 0,55	2,79 ± 0,19	3,04 ± 0,64	2,77 ± 0,42
<b>Jejuno</b>	2,56 ± 0,29	2,75 ± 0,41	2,47 ± 0,25	2,28 ± 0,45
<b>Ílio</b>	2,16 ± 0,17	2,09 ± 0,27	1,87 ± 0,14	2,00 ± 0,19
<b>Intestino Grosso</b>	3,52 ± 0,44	3,60 ± 0,52	3,75 ± 0,22	3,32 ± 0,20
<b>Bexiga</b>	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,03
<b>Ovários</b>	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,03
<b>T. uterina + útero</b>	0,51 ± 0,18	0,62 ± 0,29	0,63 ± 0,33	0,58 ± 0,14

Fonte: Produção do próprio autor

\*Os valores são médios ± desvio padrão (n = 5);

<sup>a</sup>p < 0,05 (One-way ANOVA) para o grupo controle comparado com os grupos PDN-a 5, PDN-a 50 e PDN-a 300 separadamente.

<sup>b</sup>p < 0,05 (One-way ANOVA) para o grupo PDN-a 5 comparado com os grupos PDN-a 50 e PDN-a 300 separadamente.

<sup>c</sup>p < 0,05 (One-way ANOVA) para o grupo PDN-a 50 comparado com o grupo PDN-a 300.

**Nota:** camundongos fêmeas (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5, 50 e 300 mg/kg peso corpóreo) da amostra PDN-a e com o veículo, água destilada.

Tabela 18 – Parâmetros bioquímicos dos camundongos fêmeas

Parâmetros analisados	Grupos			
	Controle	PDN-a 5 mg/Kg	PDN-a 50 mg/Kg	PDN-a 300 mg/Kg
<b>Transaminase pirúvica (U/mL)</b>	99,67 ± 18,56	33,00 ± 3,33 <sup>a</sup>	54,11 ± 10,72 <sup>a</sup>	56,33 ± 4,71 <sup>a</sup>
<b>Transaminase oxalacética (U/mL)</b>	118,6 ± 12,38	93,23 ± 5,32 <sup>a</sup>	105,3 ± 2,35	76,56 ± 5,45 <sup>a,c</sup>
<b>Fosfatase Alcalina (U/L)</b>	36,91 ± 2,93	37,13 ± 1,69	36,80 ± 5,11	32,25 ± 1,99
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,268 ± 0,04	0,427 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,297 ± 0,06	0,471 ± 0,01 <sup>a,c</sup>
<b>Ureia (mg/dL)</b>	47,34 ± 3,69	41,64 ± 3,38	57,07 ± 3,16 <sup>a, b</sup>	49,20 ± 4,60
<b>Proteína Total (g/dL)</b>	4,72 ± 0,35	4,90 ± 0,45	4,46 ± 0,20	4,63 ± 0,29
<b>Albumina (g/dL)</b>	2,97 ± 0,27	3,13 ± 0,44	3,17 ± 0,23	3,18 ± 0,32
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	127,6 ± 12,25	111,40 ± 6,68	133,4 ± 8,56 <sup>b</sup>	121,40 ± 12,83

Fonte: Produção do próprio autor

Os valores médios ± SD.

<sup>a</sup>p < 0,05 (One-way ANOVA) para o grupo controle comparado com os grupos PDN-a 5, PDN-a 50 e PDN-a 300 separadamente.

<sup>b</sup>p < 0,05 (One-way ANOVA) para o grupo PDN-a 5 comparado com os grupos PDN-a 50 e PDN-a 300 separadamente.

<sup>c</sup>p < 0,05 (One-way ANOVA) para o grupo PDN-a 50 comparado com o grupo PDN-a 300.

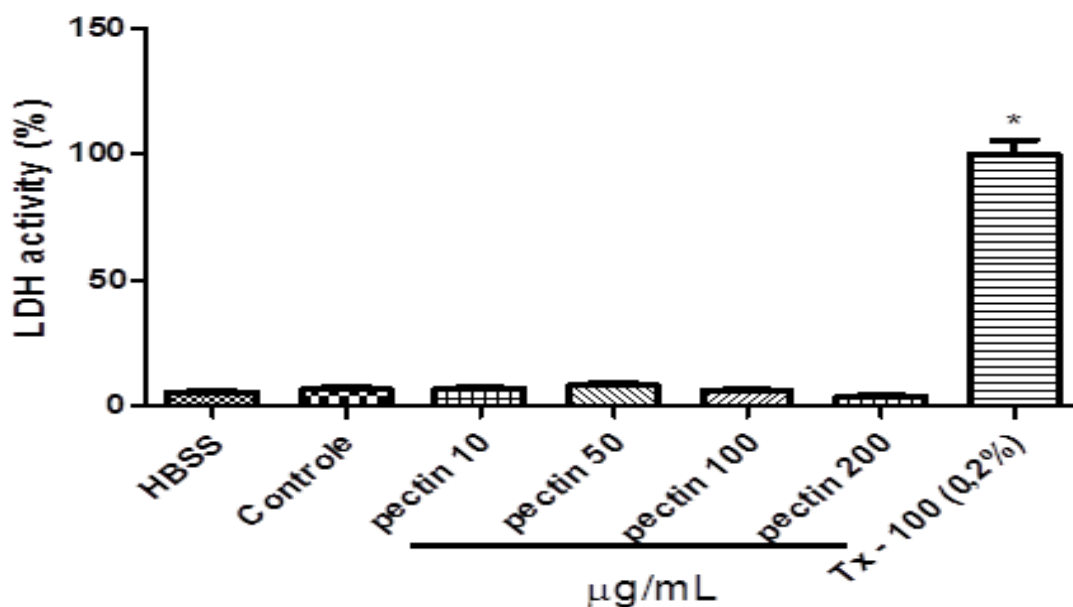
**Nota:** (n=5/grupo) administradas oralmente com dose única (5, 50 e 300 mg/kg de peso corpóreo) da amostra PDN-a e com água destilada como veículo (controle).

### 5.13. Citotoxicidade

#### 5.13.1. Estudos de citotoxicidade em neutrófilos humanos

A adição da amostra PDN-s em concentrações que variam de 10 a 200 µg/ml não produziu qualquer efeito significativo na viabilidade de neutrófilos (Figura 33) e a atividade de LDH a maior concentração de PDN-s (atividade da LDH: 4,08 ± 0,51%) não foi significativamente reduzido quando comparado com controle (atividade da LDH: 6,86 ± 1,16%) o que é indicativo de um maior número de células viáveis presentes.

Figura 33 – Efeito da pectina na viabilidade de neutrófilos humanos



Fonte: Produção do próprio autor

**Nota:** Teste medido por lactato desidrogenase (LDH). Os dados de quatro a oito amostras (Versus controle). Os resultados representam as médias ± D.P.M. ( $p < 0,05$ ; ANOVA e Tukey como teste post hoc).

## 6. CONCLUSÃO

A extração com oxalato de amônia foi adequado para a recuperação de pectina do Noni em relação ao rendimento, sobre determinadas condições, (pH3,0 / 80 °C/ 60min) em comparação a outros valores de pH (7 e 10). O rendimento de 19% foi superior ao encontrado na literatura. A pectina de melhor rendimento apresentou baixo grau de esterificação (30%) e submetida ao tratamento químico apresentou grau de sulfatação de 0,65%.

Através da análise de FT-IR, foram observadas bandas na região de 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ , utilizado para determinação do GE e em 1106-966  $\text{cm}^{-1}$  que é a região característica para polissacarídeos. Na técnica de GPC foi determinado (massa molecular)  $M_w$  de  $1,37 \times 10^5$  e por Viscosidade o valor foi de  $1,70 \times 10^5$ , em relação ao estudo reológico a pectina de melhor rendimento apresentou comportamento pseudoplásticos. No estudo de RMN foram localizados sinais correspondentes aos Hidrogênios do ácido galacturônico (H-1 em 5,50 ppm; H-2, 3,74; H-3, 3,92; H-4, 4,43 e H-5, 4,82, os valores de H-1 e H-5 foram usados para determinação do grau de esterificação (30%).

O tratamento térmico da amostra mostrou uma estabilidade até 200 °C, apresentando somente eventos associados à perda de água. As análise de potencial Zeta e AFM mostraram a existência de carga na amostra, aumentada na PDN-s, devido a incorporação do enxofre na amostra, que foi confirmado na análise elementar.

Com relação à toxicidade, todas as alterações detetadas não poderiam ser consistentemente atribuídas à amostra testada. Essas variações pontuais apresentadas dentro dos grupos são comumente identificadas nos estudos de toxicidade de mamíferos, especialmente quando são empregadas cepas heterogêneas e os resultados dos testes de citotoxicidade com a adição de PDN-s em concentrações testadas não produziu qualquer efeito significativo na viabilidade de neutrófilos e a atividade de LDH não foi reduzida significativamente em comparação com os controles, indicando um maior número de células viáveis presentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDENOR Fellah; Padmesh Anjukandi; Mark R. Waterland; Martin A.K. Williams. Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. **Carbohydrate Polymers**, 78, (2009), 847–853.

ADAMS, C. D. **Flowering plants of Jamaica**. Univ. of West Indies, Mona, Jamaica, 1972.

AFA K. Palu; Anne Hirazumi Kim; Brett J. West; Shixin Deng; Jarakae Jensen; Leland White. The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: Its molecular mechanisms of action. **Journal of Ethnopharmacology**, 115, (2008), 502–506.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Gerência Geral de Alimentos. Gerência de Produtos Especiais. **Informe Técnico n. 25**, de 29 de maio de 2007. Disponível em:

<http://www.ivegetal.com.br/Anvisa/Informe%20T%C3%A9cnico%20N%C2%BA%2025%20de%2029%20de%20maio%20de%202007%20-%20Anvisa.htm> Acessado em 11 de setembro de 2013.

ALI, A. M.; Ismail, N. H.; Mackeen, M. M.; Yazan, L. S.; Mohamed, S. M.; Ho, A. S. H.; Lajis, N. H. Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elliptica*. **Pharmaceutical Biology**, 38, (2000), 298-301.

ANDRÉ Arnosti; Paula Desjardins Brienza; Karim Christina Scopinho Furquim; Gilberto Orivaldo Chierice; Gervásio Henrique Bechara; Izabela Braggião Calligaris; Maria Izabel Camargo-Mathias. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. **Experimental Parasitology**, 127, (2011), 575–580.

ANH Kim T. Bui; Antony Bacic; Filomena Pettolino. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni), **Phytochemistry**, 67, (2006), 1271–1275.

ANNE Hirazumi and Eiichi Furusawa. An Immunomodulatory Polysaccharide-Rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) with Antitumour Activity. **Phytotherapy Research**. 13, (1999), 380–387

BAE, I. Y.; Yu Na Joe; Hyun Jae Rha; Suyong Lee; Sang-Ho Yoo; Hyeon Gyu Lee. Effect of sulfation on the physicochemical and biological properties of citrus pectins. **Food Hydrocolloids**, 23, (2009), 1980-1983.

BARTHELSON, R. A., *et al.* Development of a comprehensive detection method for medicinal and toxic plant species. **American Journal of Botany**, 93, (2006), 566-574.

BOCHEK, A. M.; Zabivalova, N. M.; Petropavlovskii, G. A. Determination of the Esterification Degree of Polygalacturonic Acid. **Russian Journal of Applied Chemistry**, 74, (2001), 796- 799.

BARROSO, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G.; Peixoto, A. L. & Lima, H. C. Rubiaceae. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 3, (1986), 189-229. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-químicos para análise de alimentos**. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, (2005), 1018p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BUDDHADEV Layek & Jagdish Singh. Caproic acid grafted chitosan cationic nanocomplexes for enhanced gene delivery: Effect of degree of substitution. **International Journal of Pharmaceutics**, 447, (2013), 182–191.

CAMPBELL, A. M.; Penfield, M. P.; Griswold, R. M. **The experimental study of food**. 2nd edition. Boston: Houghton Mifflin Company, 513p, (1979).

CARDON, D. **Le Monde des Teintures Naturelles**. Belin, Paris (2003).



CATOIRE, L. *et al.* An efficient procedure for studying pectin structure which combines limited depolymerization and C-13 NMR. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, 27, (1998), 127-136.

CHAN-BLANCO, Y.; Vaillan, F.; Perez, A. M.; Reynes, M.; Brillouet, J.; Brat, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition Analysis**, 19, (2006), 645-654.

CHUNHUA Liu; Wei Guo; Xueru Shi; M. A. Kaiumc; XianfengGub; Yi ZhunZhua. Leonurine-cysteine analog conjugates as a new class of multifunctional anti-myocardial ischemia agent. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46, (2011), 3996 – 4009.

CICERO, Arrigo F. G.; Fiorito, Alessia; Panourgia, Maria Panagiota; Sangiorgi, Zina; Gaddi, Antonio. Effects of a New Soy/ $\beta$ -Sitosterol Supplement on Plasma Lipids in Moderately Hypercholesterolemic Subjects. **Journal of the American Dietetic Association**, 102, (2002), 1807-1811.

CIPRIANI, T. R.; Gracher, A. H. P.; Souza, L. M.; Fonseca, R. J.; Belmiro, L.; Gorin, P. A. J. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thrombosis Haemostasis**, 101 (2009), 860–866.

CHUNHIENG, M. T. Développement de nouveaux aliments santé tropicale: **Aplicação à la noix du Brésil et au Bertholettia excelsa Fruto de Cambodge *Morinda citrifolia*** Ph.D. tese, INPL, França (2003).

COSTA, A. B. **Atividade Antioxidante in vitro e Antifúngica do noni (*Morinda citrifolia* L.)**. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Piauí – Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Teresina, (2001).

CRONQUIST, A. **An integrated system of flowering plants**. New York. Columbia (1981).

DANILO R. B. B.; Moreno, R. F.; Zenaide, M. de L. C. M. F.; Daniel, M. de S. F.; Fernanda R. L. R.; Manoel L. da S. F. Anthelmintic activity of aqueous and ethanolic extracts of

*Morinda citrifolia* fruit on *Ascaridia galli*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 18, (2009), 32-36.

DEGENER, O. Plants of the Hawaii National Park illustrative of plants and customs of the South Seas. Author, **New York Botanical Garden**, Bronx Park, NY, 1945.

DINIZ, M. de F.; Medeiros; I. A.; Santos; H. B.; Oliveira, K. M.; Vasconcelos, T. H. C.; Aguiar, F. B.; Toscano, M. das G.; Ribeiro, E. A. N. Padronização dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Camundongos *Swiss* e *Ratos Wistar*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, 10, (2006), 171-176.

DITTMAR, A. *Morinda citrifolia*L.—Use in indigenous Samoan medicine. **Journal of Herbs, Spices and Medicine Plants**, 1 (1993), 77–92.

DOUNGLA E. Ngouémazong; Forkwa F. Tengweh; Ilse Fraeye; Thomas Duvetter; Ruth Cardinaels; Ann Van Loey; Paula Moldenaers; Marc Hendrickx. Effect of demethylesterification on network development and nature of Ca<sup>2+</sup>-pectin gels: Towards understanding structure and function relations of pectin. **Food Hydrocolloids**, 26, (2012), 89-98.

EIICHI Furusawa; Anne Hirazumi; Stephen Story; Jarakae Jensen. **Antitumour Potential of a Polysaccharide-rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on Sarcoma 180 Ascites Tumour in Mice**. 2003. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ptr.1307.

EIICHI Furusawa, M.D., Ph.D. **Anti-cancer Activity of Noni Fruit Juice Against Tumors in Mice**. College of Tropical Agriculture and Human Resources, (2003).

EINHORN-STOLL, U.; Kunzek, H.; Dongowski, G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. **Food Hydrocolloids**, 21, (2007), 1101-1112.

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

**EUROPEAN COMMISSION. HEALTH & CONSUMER PROTECTION**

**DIRECTORATE-GENERAL.** Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on Tahitian Noni® juice (2002).

FAN, F.; Gao, S.; Wang, L.; Wu, P.; Cao, M.; Zheng, H. Synthesis and anticoagulant activity of pectin sulfates. *Journal of Applied Polymer Science*, 124, (2011), 2171–2178.

Farine, J. P., Legal, L., Moreteau, B., Le Quere, J. L. Volatile components of ripe fruits of *Morinda citrifolia* and their effects on *Drosophila*. **Phytochemistry**, 41, (1996), 433–438.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA.** 4 ed., Ed.; Atheneu, São Paulo, (1988).

FERNANDEZ, M. L.; Sun, D. M.; Tosca, M. A. & McNamara, D. J. Citrus pectin and cholesterol interact to regulate hepatic cholesterol homeostasis and lipoprotein metabolism: a dose response study in guinea pigs. **American Journal of Clinical Nutrition**, 59, (1994), 869–878.

FIETZ, Vivian R.; Salgado, Jocelem M. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 19, (1999). Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20611999000300004&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611999000300004&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 20/10/13.

FISHMAN, M. L.; Chau, H. K.; Hoagland, P. & Ayyad, K. Characterization of pectin, flash extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure. **Carbohydrate Research**, 323, (2000), 126–138.

GOODING, E. G. B., A. R. Loveless and G. R. Proctor. **Flora of Barbados**. 7 th ed. Overseas Res. Pub. 7. Her Majesty's Staty. Off., London, 1965.

GOMES, P. T. **Guia de Laboratório de Química Física**, IST – Secção de Folhas, Lisboa (2009).

GUILLERMO D. Manrique; Franco M. Lajolo. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 25, (2002), 99–107.

GUNTUPALLI M. Mohana Rao; Chandana V. Rao; Palpu Pushpangadan; Annie Shirwaikar. Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, 103, (2006), 484–490.

HARDING, S. E. Analysis of polysaccharides by ultracentrifugation. Size, conformation and interactions in solution. **Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use**, 186, (2005), 211-254.

HEINICKE, R. M., **The pharmacologically active ingredient of Noni**. Bulletin of the National Tropical Botanical Garden, (1985).

HONGSHUN Yang; Fusheng Chen; Hongjie An; Shaojuan Lai. Comparative studies on nanostructures of three kinds of pectins in two peach cultivars using atomic force microscopy. **Postharvest Biology and Technology**, 51, (2009), 391–398.

HUANG, R.; Du, Y.; Yang, J.; Fan, L. Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate. **Carbohydrate Research**. Amsterdam, v. 338, (2009) p. 483- 489.

IGLESIAS, M. T. and Lozano, J. E. Extraction and characterization of sunflower pectin. **Journal of Food Engineering**, 62, (2004), 215–223.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. vol. 1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. São Paulo: IMESP, (1985), 21-22.

JACKSON, C. L.; Dreaden, T. M.; Theobald, L. K.; Tran, N. M.; Beal, T. L.; Eid, M.; Gao, M. Y.; Shirley, R. B.; Stoffel, M. T.; Kumar, M. V.; Mohnen, D. **Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: Correlation of apoptotic function with pectin structure** *Glycobiology*, 17, (2007), 805-819.

JULIANA Piedade; Solange Guidolin Canniatti-Brazaca. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e da pectina cítrica de alta metoxilação No nível de colesterol sanguíneo em ratos. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23(2003), 149-156.

JULIANA Tófano de Campos Leite Toneli; Fernanda Elisabeth Xidieh Murr; Kil Jin Park. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, Especial, 7, (2005), 181-204.

JUN Yan, PhD and Aaron Katz, MD. PectaSol-C Modified Citrus Pectin Induces Apoptosis and Inhibition of Proliferation in Human and Mouse Androgen-Dependent and - Independent Prostate Cancer Cells. **Integrative Cancer Therapies**, 9, (2010), 198-202.

KABEYA L. M.; Kanashiro A; Azzolini A. E. C. S.; Soriani F. M.; Lopes J. L. C. *et al.* Inhibitory effect of eight simple coumarins on the lucigenin enhanced chemiluminescence of rabbit neutrophils. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, 111, (2002), 103–114.

KOJIMA, T.; Fujita, S.; Tanaka, M. & Sirisomboon, P. Plant compounds and fruit texture: the case of pear. In Kilcast David (Ed.). **Texture in foods**, first ed. Solid foods, 2, (2004), 259–294. (Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.)

KOUBALA, B. B.; Kansci, G.; Mbome, L. I.; Crépeau, M. J.; Thibault, J. F.; Ralet, M. C. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels. **Food Hydrocolloids**, 22, (2008), 1345-1351.

LEIRSON, C. R. da S.; Vanúbia, P. Q. de M.; Andrade, G. L.; Julliany, K. P. S.; Vander, C. M.; Geomar, C. G. da S. Characterization of *Morinda citrifolia* L. (noni) fruit. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 17, (2012), 93-100.

LEVIGNE, S.; Thomas, M.; Ralet, M.; Thibault, J.F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. **Carbohydrate Polymers**, 49, (2002), 145.

LEI N - 11.794, de 8 de Outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo **procedimentos para o uso científico de animais**; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979.

LIU, G.; Bode, A.; Ma, W. Y.; Sang, S.; Ho, C. T.; Dong, Z. Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line. **Cancer Research**, 61 (2001), 5749–5756.

LIU, H. Y.; Huang, Z. L.; Yang, G. H.; Lu, W. Q.; Yu, N. R. Inhibitory effect of modified citrus pectin on liver metastases in a mouse colon cancer model. **World Journal of Gastroenterology**, 14 (2008), 7386-7391.

LUCAS, E. F.; Soares, B.G.; Monteiro, E. **Caracterização de Polímeros-Determinação de Massa molar e Análise Térmica**. E-Papers Serviços Editoriais, Rio de Janeiro, 2001.

LUCIANO, Y. M.; Mantovani, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **The Journal of Immunology**, 132, (1984), 2015-2020.

M. D. Luque de Castro, F. Priego Capote. Soxhlet extraction: Past and present panacea, **Journal of Chromatography A**, 1217, (2010), 2383-2389.

MÁRCIA V. Marcon; Lúcia C. Vriesmann; Gilvan Wosiacki; Eliana Beleski Carneiro. Pectins from apple pomace. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 15, (2005), n. 2, 127-129.

MAY, C. D. Industrial pectins: sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, 12, (1990), 79-99.

MCCLATHEY, W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing. **Integrative Cancer Therapies**, 1, (2002).

MC CREADY R. M., **Pectin**. In M. A. Joslyn (Ed.), *Methods in food analysis: Physical, chemical, and instrumental*, (1970), 565–599. New York: Academic Press

**MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS** - 4ª Edição 1ª Edição Digital. Secretaria de Estado da Saúde Coordenadoria de Controle de Doenças Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 2008.

MIGUEL A. Acosta. **Manejo ecológico del cultivo de Noni**. Proyecto de generación y transferencia de tecnologías limpias para la producción del Noni (*Morinda citrifolia* L), en Panamá Instituto de investigación agropecuaria de Panamá. Agencia española de cooperación internacional. Panamá, junio 2003

MONSOOR, M. A.; Kalapathy, U.; Proctor, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, 74, (2001), 233-238.

MORTON, J. F. The ocean-going Noni, or Indian mulberry (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae) and some of its “colourful” relatives. **Economic Botany**, 46, (1992), 241–256.

MUHAMMAD Mukhtar; Mohammad Arshad; Mahmood Ahmad; Roger J. Pomerantz; Brian Wigdahl; Zahida Parveen. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, 131 (2008) 111–120.

MUHIDINOV, Z. K.; Fishman, M. L.; Kh. Kh. Avloev; Norovaa, M. T.; Nasriddinov, A. S.; Khalikov, D. Kh. Effect of Temperature on the Intrinsic Viscosity and Conformation of Different Pectins. **Polymer Science A**, 52, (2010), 1257–1263.

NANGIA-MAKKER, P.; Hogan, V.; Honjo, Y.; Baccarini, S.; Tait, L.; Bresalier, R.; Raz, A. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. **Journal of the National Cancer Institute**, 94, (2002), 1854-1862.

NADIEZDA C. Maas; Ana Helena P. Gracher; Guilherme L. Sassaki; Philip A.J. Gorin; Marcello Iacomini; Thales R. Cipriani. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, 89 (2012) 1081– 1087.

NOTKA, F.; Meier, G.; Wagner, R. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. **Antiviral Research**, 64, (2004), 93–102.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Canadian Journal of Chemistry**, 33, (1955), 1097–1101.

OMAR Arafat Kdudsi Khalil; Olga Maria Mascarenhas de Faria Oliveira; José Carlos Rebuglio Velloso; Andreza Urba de Quadros; Lorianela Marcelli Dalposso; Thaysa Ksiaskiewicz Karam; Rubiana Mara Mainardes; Najeh Maissar Khalil. Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**. 133 (2012) 1001–1005.

#### **ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT**

(OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em:

<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg425.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2012.

PANAGIOTIS Sakkas; Leigh A. Jones; Jos G. M. Houdijk; Spiridoula Athanasiadou; Dave P. Knox; Ilias Kyriazakis. Leucine and methionine deficiency impairs immunity to gastrointestinal parasites during lactation. **British Journal of Nutrition**, 109, (2013), 273–282.

PEREDA, J. A. O. *et al.* Tecnologia de Alimentos. **Componentes dos Alimentos e Processos**. vol. 1. Rio Grande do Sul: Artmed, (2005).



PETELOT, A. **Plantes medicinales du Cambodge, du Laos et du Vietnam**. 18. Centre de Rech. Sci. et Tech., Arch. Des Rech. Agron. Au Camb., au Laos et au Vietnam, Saigon, 1953.

PIERRE-NOEL, A. V. Nomenclature polyglotte des plantes Haitienne set tropicales. **Presses Nationales d’Haiti**, Port-au-Prince, Haiti, 1971.

PINHEIRO, D. C. S.; Favali, C. B. F.; Filho, A. A. S.; Silva, A. C. M.; Filgueiras, T. M.; Lima, M. G. S. Parâmetros hematológicos de camundongos e ratos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. **Boletim Informativo**. COBEA n° 03, p.6-9, (1998).

**PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** - (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA)

PRISCILA Ikeda Ushimaru; Mariama Tomaz Nogueira da Silva; Luiz Claudio Di Stasi; Luciano Barbosa; Ary Fernandes Junior - Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, (2007), 717-719.

QUISUMBING, E. Medicinal plants of the Philippines. Tech. Bull. 16. Philippine. **Department of Agriculture and Natural Resources**. Manila, 1951.

ROBBRECHT, E., **Tropical Woody Rubiaceae**. Opera Botanica Belgica, 1, (1988), 14-176.

ROSENBOHM, C.; Lundt, I.; Christensen, T. M. I. E.; Young, N. W. G. Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterisation by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, enzymatic degradation, and gelling properties. **Carbohydrate Research**, 338, (2003), 637–649.

RUGANG Zhu; Tuoping Li; Yinping Dong; Yonghui Liu; Suhong Li; Gang Chen; Zhongsheng Zhao; Youfeng Jia. Pectin pentasaccharide from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. Var. major) ameliorates disorders of cholesterol metabolism in high-fat diet fed mice. **Food Research International**, 54 (2013) 262–268.

SANG, S.; Wang, M.; He, K.; Liu, G.; Dong, Z.; Badmaev, V.; Zheng, Q. Y.; Ghai, G.; Rosen, R. T.; Ho, C. T. **Chemical components in Noni fruits and leaves (*Morinda***

*citrifolia*L.). C.T. Ho, Q.Y. Zheng (Eds.), Quality Management of Nutraceuticals, ASC Symposium Series 803, American Chemistry Society, Washington, DC (2002), pp. 134–150

SATORU Tamura; Bruno Kilunga Kubata; Syamsurizal; Sawako Itagaki; Toshihiro Horii; Muzele Kalulu Taba; Nobutoshi Murakami. New anti-malarial phenylpropanoid conjugated iridoids from *Morinda morindoides*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20 (2010) 1520–1523.

SAWPHEEYAH Nima; Srirat Kasiwong; Wibool Ridditid; Niwan Thaenmanee; Sirima Mahattanadul. Gastrokinetic activity of *Morinda citrifolia* aqueous fruit extract and its possible mechanism of action in human and rat models. **Journal of Ethnopharmacology**, 142 (2012) 354–361.

SCHULTZ, A. R. **Os nomes científicos e populares das plantas**. Rio Grande Sul – Porto Alegre – PUC/EMMA, 1945 146 p.

SCOT C. Nelson. **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry - *Morinda citrifolia* (noni)**. April 2006.

SCOT C. Nelson. **Noni cultivation in Hawaii Fruit and Nuts**, 4, (2001), 1–4.

SCOT C. Nelson; Craig R. Elevitch. **Noni: The Complete Guide for Consumers and Growers**. Permanent Agriculture Resources (2006) p 46.

SIEW-YIN Chan and Wee-Sim Choo. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. **Food Chemistry**, 141 (2013) 3752–3758.

SILVERSTEIN, R. M. & Webster, F.X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6th Edition. John Wiley & Sons, Inc. (1996).

SOLOMON, N. **The Noni Phenomenon**. Direct Source Publishing, Utah (1999)

STAMLER, J.; Brown, I. J.; Daviglius, M. L.; Chan, Q.; Kesteloot, H.; Ueshima, H.; Zhao, L.; Elliott, P. INTERMAP Research Group. Glutamic acid, the main dietary amino acid, and blood pressure: the INTERMAP Study. **International Collaborative Study of Macronutrients, Micronutrients and Blood Pressure**. *Circulation*, 120, (2009), 221–228.

SU-SEN Chang; Mauricio Redondo-Solano; Harshavardhan Thippareddi. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on alfalfa seeds by caprylic acid and monocaprylin. **International Journal of Food Microbiology**, 144, (2010), 141–146.

TAIZ, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. (3<sup>o</sup>ed). Porto Alegre: Artmed. (2004), 719.

TERPSTRA, A. H. M. *et al.* Dietary pectin with high viscosity lowers plasma and liver cholesterol concentration and plasma cholesteryl ester protein activity in hamsters. **The Journal of Nutrition**, 128, (1998), 1944-1949.

TUROLLA, M. S. dos R.; Nascimento, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, (2006), 289-306.

VARUM, K. M.; Martnsen, A.; Smidsrod, O. Fractionation and viscometric characterization of a (1→3), (1→4)-β-D-glucan from oat, and universal calibration of a high-performance size-exclusion chromatographic system by the use of fractionated β-glucans, alginates and pullulans. **Food Hydrocolloids**, 5, (1991), 363-374.

VERA Novy; Stefan Krahulec; Karin Longus; Mario Klimacek; Bernd Nidetzky. Co-fermentation of hexose and pentose sugars in a spent sulfite liquor matrix with genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, 130 (2013) 439–448.

VIRK, B. S. and Sogi, D. S. Extraction and characterization of pectin from apple pomace (*Malus Pumila* Cv Amri) peel waste. **International Journal of Food Properties**, 7, (2004), 1-11.

VITYAZEY, F. V.; Golovchenko, V. V.; Patova, O.A.; Drozd, N. N.; Makarov, V.A.; Shashkov, A. S.; Ovodov, Yu. S. Synthesis of Sulfated Pectins and Their Anticoagulant Activity. **Biochemistry** (Moscow), 75, (2010), 759-768.

VLADISLAV V.; Glinsky; AvrahamRaz. Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. **Carbohydrate Research**, 344 (2009) 1788–1791.

WAKABAYASHI, K. Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. **Journal of Plant Research**, 113, (2000), 231-237.

WANG, M. Y.; Gary Anderson; Diane Nowicki; Jarakae Jensen. Hepatic Protection by Noni Fruit Juice Against CCl<sub>4</sub>-Induced Chronic Liver Damage in Female SD Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, 63, (2008), 141–145.

WANG, M. Y.; West, B.; Jensen, C. J.; Nowicki, D.; Su, C.; Palu, A. K.; Anderson, G. *Morinda citrifolia* (noni): A literature review and recent advances in noni. **Acta Pharmacologica Sinica**. USA, 23, (2002), 1127-1141.

WARDLAW, G.; Insel, P. **Perspectives in Nutrition**, (Times Mirror/Mosby College Publishing, Boston) 1990.

WATT, G. **The commercial products of India**. John Murray, London, 1908.

WEBB, L. J. Guide to the medicinal and poisonous plants of Queensland. Bull. 232. **Council of Scientific & Industrial Research**, Melbourne, Australian, 1948.

WELLNER, N.; Kac̣ura'kova', M.; Malovi'kova', A.; Wilson, R. H. & Belton, R. FT-IR study of pectate and pectinate gels formed by divalent cations. **Carbohydrate Research**, 308, (1998), 123–131.

WILLATS, W. G. T.; Knox, J. P.; Mikkelsen, J. D. **Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel**. Trends in Food Science & Tec, (2006).

WILL C. & McClatchey. Diversity of Growth Forms and Uses in the *Morinda citrifolia* L. Complex. Proceedings of the 2002 Hawaii Noni Conference. **College of Tropical Agriculture and Human Resources**, (2003).

WUKUN Liu; Jie Hua; Jinpei Zhou; Huibin Zhang; Haiyang Zhu; Yanhua Cheng; Ronald Gust. Synthesis and in vitro antitumor activity of novel scopoletin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, (2012), 5008–5012.

YALI Zhang; Jianbao Zhang; Xiaoyan Mo; Xiaoyun Lu; Yuning Zhang; Liguo Qin; Modification, characterization and structure–anticoagulant activity relationships of persimmon polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, 82, (2010), 515-520.

YAPO, B. M.; Robert, C.; Etienne, I.; Wathelet, B.; Paquot, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, 100, (2007), 1356.

YASUHARA T.; Nokihara K. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, (2001), 4581-4583.

YUKIHIRO Tamaki; Teruko Konishi; Masakuni Tako. Isolation and Characterization of Pectin from Peel of Citrus tankan. Bioscience. **Biotechnology. Biochemistry**, 72 (2008), 896–899.

ZHU, X.; Fan, H.; Li, D.; Xiao, Y. & Zhang, X. Protein adsorption and zeta potentials of a biphasic calcium phosphate ceramic under various conditions. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials**, 82, (2007).