

Bianca Coelho

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E APLICAÇÃO
BIONANOTECNOLÓGICA DOS POLISSACARÍDEOS DO
BAGAÇO DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin.

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coelho, Bianca
Caracterização química e aplicação
bionanotecnológica dos polissacarídeos do bagaço da
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) / Bianca Coelho
; orientador, Marcelo Maraschin, 2018.
146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

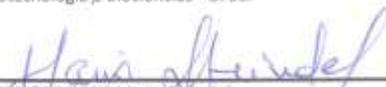
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Bagaço de
mandioca. 3. Pectina. 4. Hemicelulose. 5.
Nanopartículas. I. Maraschin, Marcelo. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III.
Título.

"Caracterização química e aplicação bionanotecnológica dos polissacarídeos do bagaço da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)"

Por

Bianca Coelho

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (016/PPGBT/2018) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



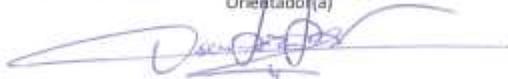
Prof. (a) Dr. (a) Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



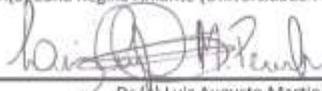
Dr. (a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador (a)



Dr. (a) Oscar Bruna-Romero (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Edna Regina Amante (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Luiz Augusto Martins Peruch
(Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A)

Florianópolis, 28 de maio de 2018.

Este trabalho é dedicado aos meus pais,
Osvalda e Garibaldi, alicerces da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Garibaldi e Osvalda pelo carinho e apoio durante esta trajetória. Em especial a minha mãe, meu maior exemplo de vida e incentivadora.

Ao meu orientador, prof. Dr. Marcelo Maraschin, pelos 11 anos de orientação durante a minha trajetória de vida acadêmica e durante a realização desta tese. Obrigada pela confiança em meu trabalho e pela oportunidade.

À Dra. Letícia Mazzarino pela coorientação, apoio e disponibilidade durante toda execução prática e teórica da tese. A segunda etapa deste trabalho nasceu graças ao teu incentivo de que daria tudo certo. E realmente deu! Muito obrigada.

Aos meus amigos do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal pelo companheirismo na bancada, na escrita ou mesmo em nossos cafés e confraternizações. Todos foram muito importantes nessa caminhada e sentirei muitas saudades da companhia de todos vocês.

À Daniela Coelho, Ana Voytena, Chirle Ferreira e Marília Shibata por tantos dias que dispensaram a me ajudar na bancada e na escrita. Vocês são incríveis e sempre levarei no meu coração todo o auxílio e apoio que vocês me ofereceram.

Às minhas grandes amigas Heloísa Pitz e Naira Fernanda Schneider, que além do suporte na tese, tive a oportunidade de encontrá-las durante esta trajetória e a felicidade em construir uma sólida amizade.

Às “Claudetes” do Laboratório de Virologia Aplicada. Lara, Laurita, Paula, Naira e, em especial a Clarissa Feltrin por ter me ensinado com tanto zelo e carinho a trabalhar com as células Caco-2 e pelas contribuições na escrita. E também a profa. Dra. Cláudia Maria

Oliveira Simões por ter disponibilizado seu laboratório para o desenvolvimento do trabalho *in vitro*.

Às minhas grandes amigas Jucilene, Letícia, Pâmela e Monique pelo incentivo durante esta trajetória.

Ao Enilto de Oliveira Neubert pela construção do projeto inicial, ideias, esclarecimento de dúvidas, pela logística das amostras de bagaço de mandioca, e por ser um incentivador de ações que valorizem e destaquem a cadeia produtiva de *Manihot esculenta* Crantz.

À fecularia Machado pelas amostras e informações fornecidas para o desenvolvimento da tese.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade, e a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A persistência é o menor caminho do
êxito”.
(Charles Chaplin)

RESUMO

A cada tonelada de raízes processadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) à produção de fécula, aproximadamente igual massa (em base úmida) de resíduos sólidos, o bagaço de mandioca (BM), é gerada. Esse subproduto é um problema às fecularias pela falta de valor comercial e, além disso, se descartado de forma inadequada, pode gerar impactos ambientais. Nesse contexto, este trabalho objetivou caracterizar quimicamente as frações pécnicas e hemicelulósicas do BM e, num segundo momento, desenvolver nanopartículas mucoadesivas revestidas com pectina (PC) extraídas do BM, contendo β -caroteno (BC) para a administração gastrointestinal, visando potencializar a biodisponibilidade desse nutracêutico lipofílico. O processo de extração das amostras de BM oriundas das safras de 2014/2015 e 2015/2016 apresentou rendimentos das frações pécnicas (2,42 e 3,14%, respectivamente) e hemicelulósica (2,04 e 3,34%, respectivamente - hemicelulose A - KOH 1 M) semelhantes, sendo tais frações majoritárias nas safras analisadas. Análises cromatográfica (GC) e espectroscópicas (FTIR e ^1H e ^{13}C -RMN) revelaram que o domínio RG-I da pectina consiste em uma cadeia principal de repetições de dissacarídeos α -(1 \rightarrow 2)-L-ramnose- α -(1 \rightarrow 4)-ácido D-galacturônico (AGal) apresentando também cadeias laterais de D-manose e D-galactose. Nas frações hemicelulose A e B (KOH 1 M) foram detectados o ácido D-galacturônico e D-manose como os constituintes majoritários de suas estruturas químicas, enquanto nas frações hemicelulósicas A e B (KOH 4 M), para além desses constituintes, as análises também revelaram altas concentrações de D-galactose. Adicionalmente, as frações de pectina e hemicelulose das safras em estudo (2014/2015 e 2015/2016) e apresentaram perfis monossacarídicos qualitativamente semelhantes, porém distintos quantitativamente. Assim, não foi possível confirmar um padrão de estrutura química para as frações desses biopolímeros. Na segunda etapa do trabalho, nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, utilizando diferentes tipos e concentrações de óleo (triglicerídeo de cadeia média (TCM) e óleo de milho) e surfactante (Tween 20 e 80), visando otimizar as condições de preparo. A partir da escolha das melhores condições de preparo e da melhor concentração de PC testada foram desenvolvidas duas nanoformulações distintas. Assim, as nanopartículas (NP) desenvolvidas foram caracterizadas quanto ao seu tamanho, potencial zeta, índice de polidispersão (IPD), pH, morfologia e estabilidade física. O teor total e a eficiência de encapsulação (EE) do BC foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e a

atividade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil). O ensaio de mucoadesão foi realizado utilizando mucina da glândula submaxilar bovina e a citotoxicidade determinada em células Caco-2 pelo método da sulforrodamina B. As NP de PC contendo BC caracterizaram-se pelo formato esférico e distribuição monodispersa de partículas, com tamanhos médios de 21,3 nm (IPD 0,29) para BC PC T80-NP (nanopartícula com Tween 80) e 261,4 nm (IPD 0,1) para BC PC T20-NP (nanopartícula com Tween 20). O BC foi nanoencapsulado com sucesso, detectando-se teores de 530 e 324 $\mu\text{g/ml}$ para BC PC T80-NP e BC PC T20-NP, respectivamente, com EE elevada ($> 95\%$) e, aumento da sua capacidade antioxidante *in vitro* com EC_{50} de 0,080 e 0,074 mg/ml, respectivamente. BC PC T80-NP não evidenciou toxicidade em células Caco-2 e BC PC T20-NP apresentou apenas nas concentrações mais elevadas. Uma forte interação entre a mucina e as NP revestidas com PC foi detectada em BC PC T20-NP, a qual se mostrou estável durante 90 dias de armazenamento a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os resultados sugerem que BC PC T20-NP é um produto interessante ao incremento da biodisponibilidade e permeação de nutracêuticos lipofílicos para administração em superfícies mucosas.

Palavras-chaves: Bagaço de mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, pectina, hemicelulose, nanopartículas, emulsificação espontânea, mucoadesão, β -caroteno, atividade antioxidante, sistema de liberação (*delivey system*), nutracêuticos lipofílicos.

ABSTRACT

Every ton of cassava processed root (*Manihot esculenta* Crantz) from starch production generate the same amount of mass of solid waste (wet weight), called cassava bagasse (CB). This byproduct generation is a problem for starch processing industry due to lack of economic value. Besides inappropriate waste disposal promotes negative environmental impacts. This study aimed to characterize pectin and hemicellulose fractions chemical structures from CB. In addition, mucoadhesive nanoparticles coated with cassava pectin (PC) containing β -carotene (BC) for gastrointestinal administration were developed for increasing bioavailability of this lipophilic nutraceutical. Samples from 2014/2015 and 2015/2016 seasons showed similar extraction yield for pectin (2,42 and 3,14%, respectively) and hemicellulose (2,04 and 3,34%, respectively - hemicellulose A - KOH 1 M) fractions. In this sense, both fractions were the main compounds found in the studied harvests. Chromatographic (GC) and spectroscopic (FTIR e ^1H e ^{13}C -RMN) analysis demonstrated that pectin RG-I domain comprises a main chain formed by disaccharides repetition α -(1 \rightarrow 2)-L-rhamnose- α -(1 \rightarrow 4)-D-galacturonic acid (GalA) with D-mannose and D-galactose side chains. Hemicellulose fractions A and B (KOH 1 M) are constituted by D-galacturonic acid and D-mannose, these monosaccharides are the main molecules compounds. In addition to monosaccharides above, hemicellulose fractions A and B (KOH 4 M) also present high concentration of D-galactose in their structure. The monosaccharides profile of pectin and hemicellulose fractions from 2014/2015 and 2015/2016 seasons were similar qualitatively but distinct in their contents. Therefore, none chemical structure pattern was confirmed for these biopolymers. In a second moment, nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification method using different types and concentration of medium chain triglyceride (MCT) and corn oil and surfactants (Tween 20 and 80), aimed to optimizer preparation conditions. The best preparation conditions and PC concentration were chosen and two nanoformulations were generated. Nanoparticles (NP) were characterized according to the size, zeta potencial, polydispersity index (PDI), pH, morphology and physical stability. The total content and encapsulation efficiency (EE) of BC were determined by high-performance liquid chromatography and *in vitro* antioxidant activity by the 2, 2'-diphenyl-2'-picrylhydrazyl (DPPH) method. The mucoadhesion assay was performed using bovine submaxillary gland mucin and the cytotoxicity determined on Caco-2 cells by the sulforhodamine B method.

The pectin-coated nanoparticles containing BC showed spherical shape and monodisperse distribution, with a mean size of 21.3 nm (PDI 0.29) for BC PC T80-NP (NP with Tween 80) and 261.4 nm (PDI 0.1) for BC PC T20-NP (NP with Tween 20). BC was successfully encapsulated at amounts of 530 and 324 $\mu\text{g/ml}$ for BC PC T80-NP and BC PC T20-NP, respectively, with high EE (> 95%), increasing its antioxidant capacity in vitro. BC PC T80-NP didn't exhibit cytotoxicity in Caco-2 and BC PC T20-NP was toxic for cells only in increased concentrations. A strong interaction with mucin and PC coated NP was observed in BC PC T20-NP. This NP was stable over a 90 days storage period ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$). The results suggest that pectin-coated BC PC T20-NP is an interesting strategy to improve the bioavailability and permeation of lipophilic nutraceuticals for administration through mucosal surfaces.

Keywords: Cassava bagasse, *Manihot esculenta* Crantz, pectin, hemicellulose, nanoparticles, spontaneous emulsification, mucoadhesion, β -carotene, antioxidant activity, delivery system, lipophilic nutraceuticals.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1- Etapas do processamento da fécula de mandioca.	34
Figura 2- Ilustração esquemática dos tipos de hemiceluloses de paredes celulares vegetais.....	37
Figura 3- (A) Formas de ácido galacturônico (AGal) encontradas na pectina: (i) AGal, (ii) AGal metilado e (iii) AGal <i>O</i> -acetilado; e (B) Ilustração esquemática dos principais domínios da pectina ligados covalentemente: (i) homogalacturonana (HG), (ii) ramnogalacturonana I (RG-I) e (iii) ramnogalacturonana II (RG-II).....	40
Figura 4- Fases do mecanismo de mucoadesão.....	46

Capítulo 2

Figura 1 - Difratograma de raio-X do bagaço de mandioca de amostras coletadas nas safras 2014/2015 (a) e 2015/2016 (b).	83
Figura 2 - Micrografia eletrônica de varredura do bagaço de mandioca em estudo. a-c. Tecido parenquimático com grânulos de amido (seta). d. Detalhe de um elemento de vaso. e-f. Elementos de vaso com tecido parenquimático (estrelas). g. Detalhe dos grânulos de amido. h. Células esclerenquimáticas (seta). i. Detalhe das células esclerenquimáticas....	85
Figura 3 - Fotomicrografias de secções do bagaço da raiz de mandioca de amostras coradas com Lugol (a, b), ATO (c, d) e CBB (e, f) - safra 2014/2015 (a, c, e) e da safra de 2015/2016 (b, d, f). a-b. Detalhe das células parenquimáticas com vasta presença de grânulos de amido em todas as amostras (setas); não se observam diferenças na distribuição desses grânulos entre as duas safras. c-d. Detalhe das paredes celulares das células parenquimáticas evidenciando a presença de pectinas em todas as amostras (setas); não se detectam diferenças na distribuição da pectina entre as duas safras. e-f. Detalhe das células parenquimáticas e dos elementos de vaso do xilema com presença de proteínas (setas), nota-se maior concentração de proteínas nas amostras da safra de 2015/2016 (f).	88
Figura 4 - Quantificação de ácido D-galacturônico de frações de pectina e hemiceluloses de parede celular de bagaço de mandioca obtidas por extração alcalina: 1MA e 1MB (A e B KOH 1 M) e 4MA (A KOH 4 M).	94
Figura 5 - Espectros de FTIR de pectina (a) e de frações hemicelulósicas (1MA, 1MB, 4MA e 4MB) (b) de amostras de bagaço de mandioca coletadas nas safras (2014/2015 e 2015/2016).....	96

Capítulo 3

- Figura 1** - Tamanho de partícula e potencial zeta das nanopartículas preparadas com Tween 80 (A) e Tween 20 (B), de acordo com as concentrações de pectina..... 124
- Figura 2** - Microscopia eletrônica de transmissão de BC PC T80-NP (A) e BC PC T20-NP (C) com pectina e BC T80-NP (B) e BC T20-NP (D) sem pectina. 127
- Figura 3** - Estudo de estabilidade das nanopartículas BC PC T80-NP (●) e BC PC T20-NP (■). Tamanho de partícula (A), potencial zeta (B), índice de polidispersão (C), e pH (D) das nanopartículas armazenadas por 90 dias, a 4 °C. 128
- Figura 4** - Ilustração esquemática das nanopartículas revestidas com pectina contendo β -caroteno. 130
- Figura 5** - Atividade de sequestro dos radicais DPPH do β -caroteno livre (A), BC PC T80-NP (B), e BC PC T20-NP (C). 131
- Figura 6** - Variação do tamanho de partícula (pico principal) do sistema de mucina coloidal (250 μ g/ml) em função da adição de diferentes concentrações das nanopartículas revestidas com pectina (BC PC T20-NP)..... 133
- Figura 7** - Efeito citotóxico do β -caroteno livre (CC= controle celular) (A), BC PC T80-NP (barras pretas) e Branca PC T80-NP (barras cinzas) (B), e BC PC T20-NP (barras pretas) e Branca PC T20-NP (barras cinzas) (C) em linhagens celulares Caco-2, após 6h de incubação. 136

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1- Composição centesimal (g/100 g peso seco) de bagaço de mandioca.	82
Tabela 2- Rendimento (%- peso seco) de frações de polissacarídeos extraídas de amostras de bagaço de mandioca coletadas nas safras 2014/2015 e 2015/2016.	89
Tabela 3- Concentração (mg/ml) e porcentagem (%) de monômeros detectados por análises em CG-FID em frações de polissacarídeos da parede celular do bagaço de <i>M. esculenta</i> Crantz.	90

Capítulo 3

Tabela 1 - Composição das formulações estudadas para obtenção de nanoemulsões com β -caroteno pela técnica de emulsificação espontânea.	115
Tabela 2 - Tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões desenvolvidas para otimização da formulação.	122
Tabela 3 - Concentração de β -caroteno ($\mu\text{g/ml}$) e eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas revestidas com pectina.	129
Tabela 4 - Atividade antioxidante do β -caroteno e das nanopartículas determinada pelo método de DPPH.	131
Tabela 5 - Tamanho de partícula de dispersões contendo mucina e nanopartículas revestidas e não revestidas com pectina contendo β -caroteno (BC PC T80-NP e BC T80-NP 2,5%, v/v; BC PC T20-NP e BC T20-NP 20%, v/v).	134

LISTA DE ABREVIATURAS

^1H e ^{13}C RMN – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13

1MA - Fração hemicelulose A, extraída com solução de KOH 1 M

1MB - Fração hemicelulose B, extraída com solução de KOH 1 M

4MA - Fração hemicelulose A, extraída com solução de KOH 4 M

4MB - Fração hemicelulose B, extraída com solução de KOH 4 M

AGal - Ácido galacturônico

AGalp - Ácido galacturônico piranosídico

AME - Pectina com alta metoxilação

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOC – Association of Official Analytical Chemists

BC – β -caroteno

BC PC T20-NP – Nanopartículas com β -caroteno, pectina e Tween 20

BC PC T80-NP – Nanopartículas com β -caroteno, pectina e Tween 80

BC T20-NP – Nanopartículas sem pectina e com β -caroteno e Tween 20

BC T80-NP – Nanopartículas sem pectina e com β -caroteno e Tween 80

BHL – Balanço hidrofílico-lipofílico

BM – Bagaço de mandioca

BME – Pectina com baixa metoxilação

Branca PC T80-NP – Nanopartículas sem β -caroteno e com pectina e Tween 80

Branca PC T20-NP – Nanopartículas sem β -caroteno e com pectina e Tween 20

BSM – Mucina da glândula submaxilar bovina

CG – Cromatografia gasosa

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH - 2, 2- difenil-2-picril-hidrazil

DRX – Difração de raio-X

EE – Eficiência de encapsulação

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

FTIR – Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier

GM – Grau de metil-esterificação da pectina

HG – Homogalacturonana

IC – Índice de cristalinidade

IPD – Índice de polidispersão

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

ML – Microscopia de luz

NP – Nanopartícula

NP_{ol} – Nanopartículas poliméricas

PC – Pectina

RG-I - Ramnogalacturonana I

RG-II - Ramnogalacturonana II

TCM – Triglicérido de cadeia média

TLM – Triglicérido de cadeia longa

SUMÁRIO

SUMÁRIO	23
INTRODUÇÃO GERAL.....	27
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1 Mandioca.....	31
2.1.1 Importância socioeconômica.....	31
2.1.2 Utilização e principais produtos.....	31
2.1.3 Subprodutos oriundos da agroindústria da mandioca.....	32
2.2 Química de carboidratos.....	34
2.2.1 Parede celular vegetal.....	34
2.2.1.1 Polissacarídeos.....	36
2.2.1.2 Celulose e lignina.....	36
2.2.1.3 Hemiceluloses.....	36
2.2.1.4 Pectina.....	39
2.3 Nutracêuticos lipofílicos.....	42
2.3.1 β -caroteno.....	43
2.4 Nanopartículas poliméricas.....	44
2.4.1 Nanopartículas revestidas com biopolímeros mucoadesivos.....	44
2.4.1.1 Mucoadesão.....	44
2.4.1.1.1 Mecanismos de mucoadesão.....	45
2.4.1.1.2 Teorias de mucoadesão.....	46
2.4.2 Nanopartículas revestidas com pectina.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
3. OBJETIVOS.....	69
3.1 Objetivo geral.....	69
3.2 Objetivos específicos.....	69
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES PÉCTICAS E HEMICELULÓSICAS DO BAGAÇO DE MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	71
1. RESUMO	73
2. INTRODUÇÃO.....	74

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
3.1 Material e bagaço de mandioca (BM)	76
3.2 Caracterização do BM bruto	76
3.2.1 Composição centesimal.....	76
3.2.2 Difração de raio-X (DRX) e índice de cristalinidade (IC)	76
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	77
3.2.4 Microscopia de luz (ML) - análises anatômicas e citoquímicas... 77	
3.3 Composição química das frações pécnicas e hemicelulósicas da parede celular do BM.....	77
3.3.1 Extração de pectina e hemiceluloses.....	77
3.3.1.1 Remoção de amido.....	77
3.3.1.2 Extração de pectina	78
3.3.1.3 Extração de hemicelulose.....	78
3.3.2 Hidrólise química das frações pécnicas e hemicelulósicas A e B (1 M e 4 M)	79
3.3.3 Derivatização	79
3.3.4 Cromatografia gasosa (GC-FID).....	79
3.3.5 Análises de ácidos urônicos	80
3.3.6 Massa molecular da pectina	80
3.3.7 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR).....	80
3.3.8 Espectroscopias de ¹ H-RMN e ¹³ C-RMN	80
3.3.8.1 Determinação do grau de metil-esterificação (GM) da pectina. 81	
3.3.9 Análises estatísticas.....	81
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1 Caracterização química do BM.....	82
4.1.1 Composição centesimal.....	82
4.1.2 Difração de raio-X	83
4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	84
4.1.4 Microscopia de luz.....	86
4.2 Composição química das frações pécnicas e hemicelulósicas da parede celular do BM.....	89
4.2.1 Rendimento de extração, massa molecular e CG-FID	89
4.2.2 Teor de ácidos urônicos	93
4.2.3 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR).....	94
4.2.4 Espectroscopia de RMN de ¹ H e ¹³ C.....	98
5. CONCLUSÕES	101

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
---	------------

CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS COM PECTINA DE BAGAÇO DE MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) CONTENDO B-CAROTENO PARA APLICAÇÕES MUCOADESIVAS	109
--	------------

1. RESUMO	111
------------------------	------------

2. INTRODUÇÃO	112
----------------------------	------------

3. MATERIAL E MÉTODOS	113
------------------------------------	------------

3.1 Material	113
--------------------	-----

3.2 Extração de pectina	114
-------------------------------	-----

3.3 Desenvolvimento de nanopartículas.....	114
--	-----

3.3.1 Estudo de otimização das condições	114
--	-----

3.3.2 Revestimento de nanopartículas com pectina.....	116
---	-----

3.4 Caracterização das nanopartículas.....	116
--	-----

3.4.1 Medidas de tamanho de partícula e potencial zeta	116
--	-----

3.4.2 Morfologia das nanopartículas	116
---	-----

3.5 Estudo de estabilidade	117
----------------------------------	-----

3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).....	117
--	-----

3.6.1 Condições cromatográficas	117
---------------------------------------	-----

3.6.2 Determinação do teor de BC	117
--	-----

3.6.3 Determinação da eficiência de encapsulação	118
--	-----

3.7 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	118
--	-----

3.8 Interação mucina-nanopartículas revestidas com PC	118
---	-----

3.9 Ensaio de citotoxicidade em células Caco-2	119
--	-----

3.10 Análises estatísticas.....	119
---------------------------------	-----

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
--	------------

4.1 Desenvolvimento das nanopartículas	120
--	-----

4.1.1 Otimização das condições	120
--------------------------------------	-----

4.1.2 Revestimento das nanopartículas com pectina	123
---	-----

4.2 Caracterização das nanopartículas.....	126
--	-----

4.2.1 Morfologia.....	126
-----------------------	-----

4.2.2 Estudo de estabilidade.....	127
-----------------------------------	-----

4.3 Concentração de β -caroteno e eficiência de encapsulação	128
--	-----

4.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	130
--	-----

4.5 Interações entre mucina e nanopartículas revestidas com pectina.	132
---	-----

4.6 Citotoxicidade em células Caco-2.....	134
---	-----

5. CONCLUSÕES.....	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
CONCLUSÕES GERAIS.....	145

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (FAO, 2017) e a produção de fécula é, por exemplo, um dos importantes derivados comerciais obtidos a partir dessa biomassa (EPAGRI/CEPA, 2017) que apresenta ampla relevância industrial (EMBRAPA, 2003). Todavia, para cada tonelada de raiz processada à extração de fécula, praticamente igual quantidade é gerada em resíduos sólidos (em base úmida), i.e., o bagaço de mandioca (BM). Essa biomassa residual é considerada um problema às feculárias por não ter valor comercial e, além disso, se descartada de forma inadequada, pode gerar impactos ambientais devido a sua alta carga orgânica (LEONEL, 2000).

A escassez de fontes naturais e o interesse na substituição de produtos à base de petróleo estão ligados a demandas por soluções de problemas ambientais mundiais, as quais, usualmente, consideram o uso de fontes renováveis de insumos. Tal cenário é observado em relação a subprodutos da agroindústria, haja vista que, apenas uma fração da colheita anual de biomassa vegetal de florestas e cultivos agrícolas é utilizada, especialmente celulose e amido (EBRINGEROVÁ, 2006). Assim, a conversão de hemicelulose e pectina em produtos úteis pode ser uma solução aos problemas acima mencionados. Todavia, um pré-requisito importante para aplicação biotecnológica desses biopolímeros é o conhecimento dos seus componentes por meio da caracterização química.

O potencial de aplicação de hemiceluloses é imenso e suas propriedades funcionais já foram descritas em diversas fontes vegetais como casca de trigo sarraceno, espigas de milho, aveia e cevada (EBRINGEROVÁ, 1992; EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005; GARCIA et al., 2001; HROMÁDKOVÁ; EBRINGEROVÁ; HIRSCH, 2005). Da mesma forma, a pectina é um polímero muito valorizado e amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica. As principais fontes comerciais são cascas de frutas cítricas, bagaço de maçã e polpa de beterraba-sacarina (beterraba branca) (NAQASH et al., 2017). Todavia, o estudo de fontes alternativas se justifica, pois aqueles biopolímeros apresentam grande variação na sua composição química e, portanto, em suas propriedades físico-químicas dependendo da fonte botânica e também do tecido do qual são extraídos (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; SILA et al., 2009).

Dentre esses biopolímeros, a pectina desperta interesse em aplicações nanotecnológicas por suas características de atoxicidade,

resistência à degradação por proteases e amilases e de mucoadesão (MARRAS-MARQUEZ; PEÑA; VEIGA-OCHOA, 2015). Assim, como fibra solúvel, a pectina possibilita que um bioativo nanoencapsulado derivado transite pelo sistema gastrointestinal protegido do ataque enzimático. Adicionalmente, nanopartículas (NP) revestidas com pectina, por meio da sua propriedade de mucoadesão, possuem a vantagem de prolongar o período de retenção do fármaco/nutracêutico no local de absorção aumentando a sua eficácia terapêutica (ALEXANDER et al., 2011; ASIJA, 2014).

O BM é uma fonte de biopolímeros como a celulose, pectina e hemiceluloses, bem como parte do amido que não foi extraído das raízes da planta (LEONEL, 2000). Embora esse resíduo já tenha sido investigado previamente como fonte de nanofibras de celulose (LEITE; ZANON; MENEGALLI, 2017) e seus efeitos prebióticos (BUSSOLO DE SOUZA et al., 2014), entre outros, outras possibilidades de uso industrial são vislumbradas. Além disso, dados sobre a caracterização química das frações polissacarídicas de *M. esculenta* e estudos com aplicação nanotecnológica com a pectina são escassos na literatura científica, o que evidencia o caráter inovador deste trabalho.

Assim, o presente estudo tem como hipótese que o BM possui frações polissacarídicas com perfis quali e/ou quantitativos que oscilam de acordo com as diferentes safras agrícolas. Adicionalmente, assume-se que a fração pectica do BM possui características químicas apropriadas ao desenvolvimento de NP mucoadesivas contendo β -caroteno (BC).

Dessa forma, o presente estudo objetivou caracterizar quimicamente o BM e suas frações polissacarídicas, bem como desenvolver sistemas de liberação por meio de NP revestidas com pectina contendo BC para administração gastrointestinal visando potencializar a biodisponibilidade desse nutracêutico lipofílico.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mandioca

2.1.1 Importância socioeconômica

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie nativa do Brasil, com provável origem ao longo da fronteira sul da bacia Amazônica (OLSEN; SCHAAL, 1999). Constitui a terceira fonte de calorias mais importante nos trópicos, após o arroz e milho, sendo que milhões de pessoas a consomem na África, Ásia e América Latina, onde é produzida por pequenos agricultores, principalmente, sendo importante fonte de renda e base da segurança alimentar (FAO, 2008).

No último levantamento da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), na safra 2015/2016, o Brasil produziu cerca de 21 milhões de toneladas de raízes, ocupando a 3ª posição no cenário mundial de produtores, antecedido por Tailândia e Nigéria que produziram 31 e 57 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2017). O modelo de exploração dessa cultura entre os continentes difere em seus níveis de tecnologia e industrialização. No continente africano a mandioca destina-se basicamente à subsistência, sendo a base alimentar para expressiva parte da população. No entanto, nos continentes asiático e americano a industrialização das raízes e seus produtos é notória, apoiada em maior uso de tecnologia (EPAGRI/CEPA, 2017).

A mandioca é cultivada em todas as regiões do Brasil com finalidades distintas. Nas regiões norte e nordeste apresenta forte conexão com os fatores culturais e também é importante fonte de subsistência, enquanto na região centro-sul predomina a industrialização e o consumo *in natura* (EPAGRI/CEPA, 2017). No estado de Santa Catarina, o cultivo para fins comerciais para produtos como farinha, fécula e polvilho azedo, encontra-se principalmente nas regiões Sul, Vale e Alto Vale do Itajaí e em alguns municípios da Grande Florianópolis (EPAGRI/CEPA, 2017).

2.1.2 Utilização e principais produtos

Em sua dieta, o brasileiro consome as raízes de mandioca *in natura* (cozida, assada e frita), como farinha, em farofas e pirões. Além disso, ela também pode ser utilizada na alimentação animal como feno de ramas e ensilada. A importância econômica da cultura da mandioca reside em suas raízes ricas em amido à fabricação de produtos alimentícios e de uso industrial. A partir das raízes de *M. esculenta* é possível obter uma série

de produtos como farinhas de variados tipos, fécula ou polvilho doce (amido), polvilho azedo, amidos modificados, tapioca, beiju, sagu, salgadinhos, além de raízes minimamente processadas, congeladas, desidratadas, pré-cozidas e fritas tipo *chips*. Adicionalmente, o amido de mandioca ainda pode ser usado como ingrediente, ou aditivo, na fabricação de embutidos, chocolates, balas, bolachas, pães e sopas (EMBRAPA, 2003).

Os principais produtos comercializados a partir da cultura da mandioca são a farinha, fécula e o polvilho azedo (EPAGRI/CEPA, 2017). Segundo a instrução normativa 52/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), farinha de mandioca é o produto obtido de raízes de mandioca, do gênero *Manihot*, submetidas a processo tecnológico adequado de fabricação e beneficiamento (MAPA, 2011). Enquanto, a Resolução - CNNPA nº 12, de 1978 define amido como o produto amiláceo extraído das partes aéreas comestíveis dos vegetais, como por exemplo, as sementes; e fécula é o produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis dos vegetais, como os tubérculos, raízes e rizomas (ANVISA, 1978). E por fim, o polvilho azedo é um amido modificado por oxidação (fermentação), processo esse que confere ao produto uma propriedade física importante com alta capacidade de expansão (EMBRAPA, 2003).

2.1.3 Subprodutos oriundos da agroindústria da mandioca

No Brasil, a maioria das unidades de produção de fécula de mandioca, também chamada de amido ou polvilho doce, localiza-se nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul (LEONEL, 2000). Em Santa Catarina, na região do alto vale do Itajaí, predomina a utilização das raízes de mandioca à produção de fécula, enquanto no sul catarinense encontram-se também engenhos de farinha (EPAGRI, 2002).

Em 2016, surgiu a primeira indústria de tapioca na região sul de Santa Catarina (município de Sangão), como resultado de uma crescente dinamização do setor feculeiro. A tapioca (fécula de mandioca hidratada) é um alimento típico da região norte e nordeste do Brasil, no entanto, sua popularização e crescente consumo nas regiões sul e sudeste têm impulsionado a produção de raízes nos últimos anos. Destaca-se que, das 755 mil toneladas de fécula produzida em 2015 no país, 8% destinaram-se à fabricação de tapioca (EPAGRI/CEPA, 2017).

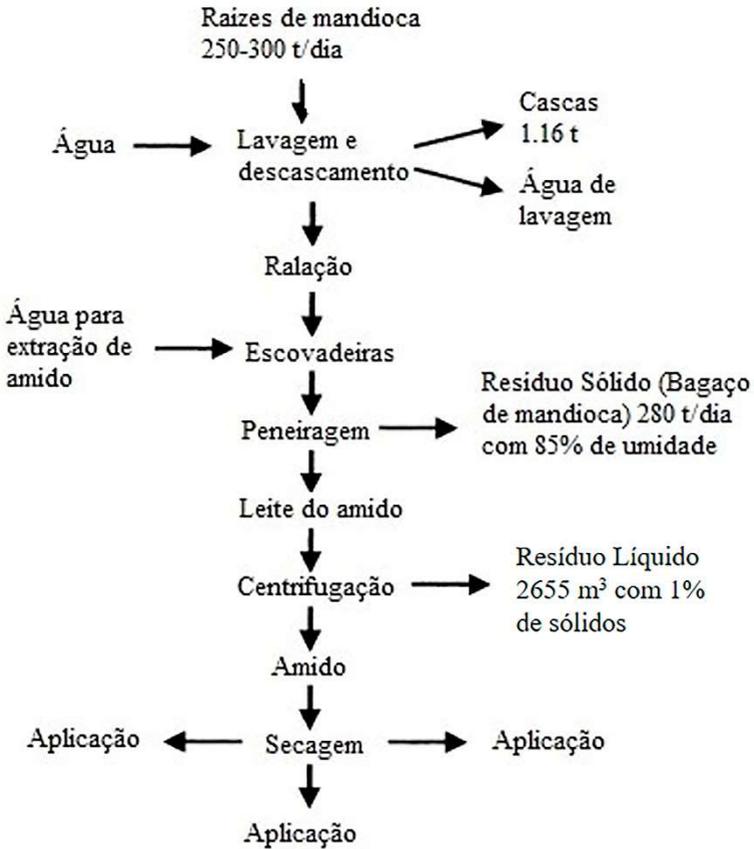
Todavia, o consumo crescente de fécula determina o aumento na produção de resíduos da agroindústria. Durante a produção de fécula de

mandioca as raízes são basicamente: lavadas e descascadas, raladas, peneiradas e centrifugadas para obtenção do amido e posterior secagem (Figura 1). Esse processamento gera resíduos líquidos oriundo da lavagem, extração e centrifugação do amido, bem como resíduos sólidos, i.e., as cascas, que durante o processo de peneiração separam o amido da massa sólida fibrosa (PANDEY et al., 2000), denominada bagaço, massa, farelo, ou polpa residual. Esse subproduto caracteriza-se por ser uma biomassa altamente fibrosa, contendo ainda parte da fécula que não foi extraída das raízes da planta (CEREDA, 1994).

A quantidade de bagaço de mandioca (BM) produzido nas fecularias é bastante elevada, pois, a cada tonelada de raiz processada, à obtenção de amido, são gerados 928,6 kg de bagaço com 85% de umidade (LEONEL; CEREDA; ROAU, 1999). Tal resíduo é visto como um problema às fecularias, pois além da elevada quantidade gerada, não possui valor comercial. Usualmente, é doado a pecuaristas para a alimentação animal ou vendida a preço irrisório. Quando lançado no ambiente, pode causar sérios problemas de poluição devido à alta carga orgânica dessa biomassa (LEONEL, 2000).

A reutilização de resíduos agroindustriais é importante à resolução de problemas logísticos, financeiros e ambientais dos setores afins e, em caráter mais amplo, da sociedade como um todo. Nesse contexto, observa-se que a investigação da composição química do bagaço de mandioca, rico em amido e polissacarídeos de parede celular, tem sido pouco explorada, dificultando a detecção de eventuais potenciais e aplicações biotecnológicas para destinações mais relevantes do BM.

Figura 1- Etapas do processamento da fécula de mandioca.



Adaptado de Pandey et al. (2000).

2.2 Química de carboidratos

2.2.1 Parede celular vegetal

As paredes celulares das plantas representam cerca de 50% da biomassa vegetal e uma importante fonte de biomassa renovável, sendo alvos biotecnológicos importantes à produção de biocombustíveis e como

alimentos funcionais à saúde humana, entre outros (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010).

A parede celular é composta por microfibrilas de celulose imersas em uma matriz contendo polissacarídeos não-celulósicos, a saber: as pectinas e hemiceluloses. Além disso, dependendo do tipo de parede celular e da espécie vegetal, ela poderá conter quantidades variáveis de substâncias inorgânicas (sílica e cristais de cálcio, e.g.), além de lignina, proteínas e lipídios (KRAUS et al., 2006).

As primeiras camadas de parede celular formadas constituem a parede celular primária. Essa estrutura possui elevado teor de água (~65%, m/m) e biopolímeros: celulose (30%), hemiceluloses (30%), pectina (30%) e proteínas (10%) (KRAUS et al., 2006). Adicionalmente, entre as paredes primárias de células adjacentes há uma região chamada de lamela média que é rica em pectina, responsável pela união dessas estruturas (EVERT; EICHHORN, 2014; KRAUS et al., 2006).

Algumas células podem apresentar somente a parede primária e outras, internamente a ela, sofrem à deposição de camadas adicionais de biopolímeros, originando a parede secundária. Essa última estrutura apresenta um baixo teor de água devido ao acúmulo de uma substância hidrofóbica, a lignina. A celulose é o seu polissacarídeo majoritário, compondo cerca de 50 a 80% dessa camada, seguida da hemicelulose (5 a 30%), lignina (35%) e pouca ou até mesmo ausência de PC (EVERT; EICHHORN, 2014; KRAUS et al., 2006).

Os componentes principais da parede celular secundária de plantas terrestres são as xilanas, importantes ao desenvolvimento e crescimento normal da planta. Adicionalmente, essa parede apresenta uma elevada biomassa lignocelulósica que se destaca como uma matéria-prima potencial à produção de biocombustíveis (YORK; O'NEILL, 2008). A biomassa lignocelulósica é importante para reforçar a estrutura da parede e manter a sua integridade (YANG et al., 2013).

As características químicas da parede celular influenciam diretamente sobre a textura, propriedades nutricionais e de processamento de alimentos de origem vegetal à alimentação humana e animal (DOBLIN; PETTOLINO; BACIC, 2010). Assim, é importante conhecer quimicamente os polissacarídeos de determinada espécie vegetal e as eventuais discrepâncias entre genótipos, a fim de compreender, desenvolver e explorar as potencialidades biotecnológicas oriundas dessa diversidade de carboidratos poliméricos.

2.2.1.1 Polissacarídeos

A preocupação em substituir produtos derivados de petróleo conectada à solução de problemas ambientais; com a futura escassez de fontes naturais de energia e a elevada demanda por alimentos saudáveis e medicamentos alternativos é um dos principais motivos para a diversidade de pesquisas com polissacarídeos (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005). Tais macromoléculas são biopolímeros naturais presentes na maioria dos organismos vivos e possuem diversas aplicações nas indústrias farmacêuticas, cosmética, alimentícia e de adesivos (KARAKI et al., 2016).

2.2.1.2 Celulose e lignina

A celulose é o componente estrutural mais importante das plantas, sendo um homopolímero com elevada massa molecular, constituído de cadeia linear rígida de monômeros de D-glucose unidos por ligações β -(1,4) (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010; KLEMM et al., 2005). O grau de polimerização e o número de unidades de glucose podem chegar a 20.000, no entanto, também ocorrem cadeias mais curtas; em especial aquelas que fazem parte das paredes celulares primárias dos vegetais (HABIBI; LUCIA; ROJAS, 2010). A celulose caracteriza-se por sua hidrofobicidade, biodegradabilidade e ampla capacidade de modificações químicas e formação de morfologias de fibras semicristalinas versáteis (KLEMM et al., 2005).

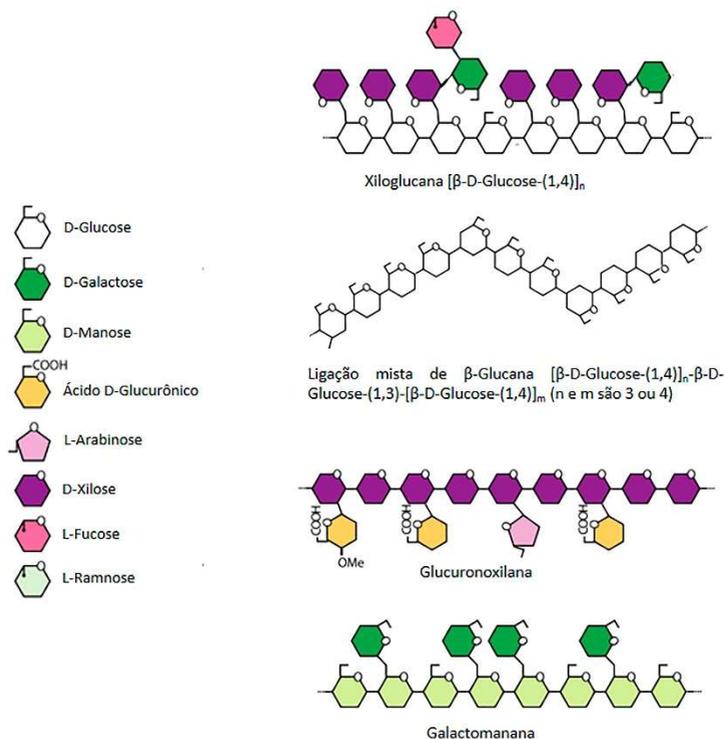
Em tecidos lignificados, a celulose ocorre junto à lignina, uma substância amorfa presente em plantas vasculares, formada pela polimerização dos álcoois *p*-coumaril, coniferil e sinapil (SCATENA; SCREMIN-DIAS, 2006).

2.2.1.3 Hemiceluloses

Contrariamente à celulose, as hemiceluloses são heteropolímeros constituídos por resíduos monoméricos C5 e C6 (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014). Hemiceluloses formam um grupo heterogêneo de polissacarídeos caracterizados por apresentar uma cadeia principal de D-xilose, D-manose ou D-glucose com ligações β -(1→4). Todos esses glicanos tem esqueleto estrutural semelhante, pois possuem a mesma configuração equatorial em C1 e C4. Na literatura científica, as hemiceluloses são divididas em quatro grupos de polissacarídeos

estruturalmente distintos, a saber: xiloglucanas, xilanas, mananas ou glucomonanas e glucanas (Figura 2). A estrutura das hemiceluloses apresenta grande variação entre as espécies vegetais e o tipo de tecido (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Figura 2- Ilustração esquemática dos tipos de hemiceluloses de paredes celulares vegetais.



Adaptado de Scheller e Ulvskov (2010).

As xiloglucanas são as hemiceluloses mais abundantes nas paredes primárias de dicotiledôneas (BAUER; TALMADGE, KENNETH W. KEEGSTRA; ALBERSHEIM, 1973). Variações estruturais são encontradas nesses biopolímeros, porém as xiloglucanas são formadas

por uma cadeia principal de unidades de D-glucop, com ligações β -(1 \rightarrow 4) (FRY et al., 1993). Ligadas ao C6 desses resíduos de glucose há cadeias laterais de α -D-Xilose. Adicionalmente, também podem ocorrer modificações estruturais por meio de *O*-acetilações nos resíduos de D-glucose da cadeia principal e da cadeia lateral com resíduos de D-galactose e L-fucose ou L-arabinose (JIA et al., 2005). O padrão de ramificação de xiloglucanas tem relevância funcional e taxônomica (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Xilanas são polissacarídeos que apresentam em comum cadeias principais lineares com resíduos de β -(1 \rightarrow 4)-D-xilop, ocorrendo sob a forma de arabinoxilanas, glucuronoxilanas, glucuronoarabinoxilanas, ou simplesmente homoxilanas não substituídas. As xilanas também podem apresentar *O*-acetilações em O-2 ou O-3 (CHESSON; GORDON; LOMAX, 1983). As glucuronoxilanas são os polissacarídeos dominantes em paredes secundárias de dicotiledôneas, caracterizando-se por uma substituição com resíduos de glucuronosil e 4-*O*-metil glucuronosil, por meio de ligações α -(1 \rightarrow 2) (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005). De maneira geral, observam-se variações na estrutura química desse grupo polissacarídico entre espécies vegetais e que ainda não são bem conhecidas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

As mananas são polissacarídeos amplamente distribuídos no reino vegetal (POPPER, 2008; POPPER; FRY, 2003) que apresentam ligação β -(1 \rightarrow 4) e cadeias principais inteiramente formadas por manose, como as mananas e galactomananas, ou alternadas com manose e glucose, em um padrão não repetitivo, como em glucomananas e galactoglucomananas. As mananas e glucomananas são frequentemente acetiladas. Esse grupo tem sido bastante estudado como uma fonte importante de polissacarídeos de armazenamento em sementes (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005). Nas espematófitas, as mananas e glucomananas parecem ter sido substituídas por outros tipos de hemiceluloses, pois são muito menos abundantes (GOUBET et al., 2003).

Por fim, as glucanas caracterizam-se por sua cadeia principal formada por β -(1 \rightarrow 4)-D-glucop, com resíduos intercalados do tipo β -(1 \rightarrow 3)-D-glucop (STONE; CLARKE, 1992). Tais biopolímeros são encontrados em Poaceae, não ocorrendo em dicotiledôneas (SMITH; HARRIS, 1999).

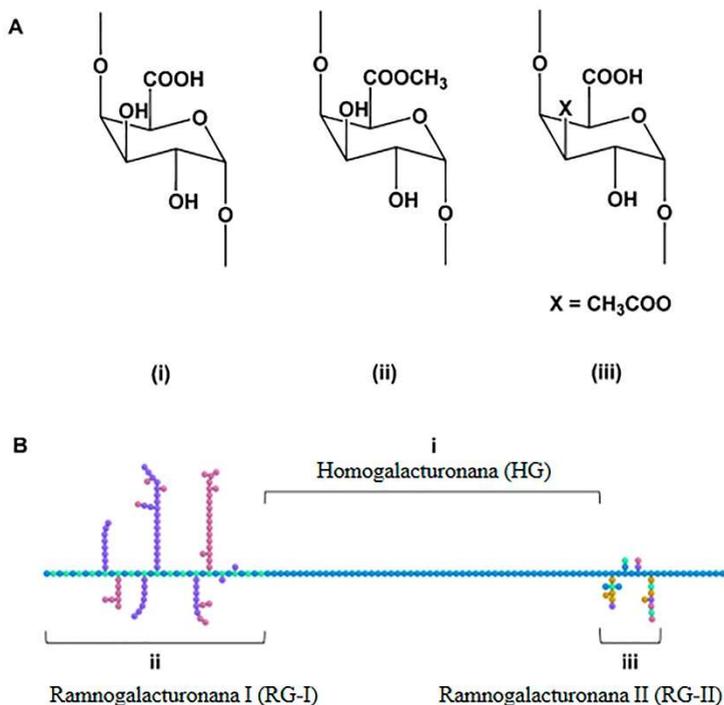
As hemiceluloses sucedem a celulose em abundância na natureza, com teores que variam de 25% a 33% na parede celular vegetal, (FREDON et al., 2002), sendo, portanto, um imenso recurso renovável de biopolímeros. As primeiras pesquisas na área da química estrutural das hemiceluloses buscavam desvendar o potencial daqueles biopolímeros à

obtenção de açúcares, produtos químicos, como fontes de energia térmica e combustíveis. Posteriormente, as hemiceluloses passaram a ser investigadas como biopolímeros que podem ser utilizados em suas formas nativas ou modificadas nas áreas alimentícias e não alimentícias (EBRINGEROVÁ, 2006). De fato, o potencial de aplicação de hemiceluloses é imenso e suas propriedades funcionais já foram descritas em fontes vegetais como cascas de trigo sarraceno - fibra dietética e aditivo alimentar (HROMÁDKOVÁ; EBRINGEROVÁ; HIRSCH, 2005), em espigas de milho - aditivo na fabricação de papel (EBRINGEROVÁ, 1992) e no desenvolvimento de micro e nanopartículas transportadoras de fármacos e outros compostos (GARCIA et al., 2001) e em aveia e cevada - substitutos de gordura em queijo e fibra dietética antidiabética (EBRINGEROVÁ; HROMÁDKOVÁ; HEINZE, 2005).

2.2.1.4 Pectina

A pectina é um polissacarídeo extremamente diverso estruturalmente, ocorrendo na parede celular primária e na lamela média de plantas terrestres. De maneira geral, é composta por 3 domínios que estão unidos por ligações covalentes, a saber: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG-I) e ramnogalacturonana II (RG-II), conforme podem ser visualizados na Figura 3 (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

Figura 3- (A) Formas de ácido galacturônico (AGal) encontradas na pectina: (i) AGal, (ii) AGal metilado e (iii) AGal *O*-acetilado; e (B) Ilustração esquemática dos principais domínios da pectina ligados covalentemente: (i) homogalacturonana (HG), (ii) ramnogalacturonana I (RG-I) e (iii) ramnogalacturonana II (RG-II).



Adaptado de Chan et al. (2017).

A razão entre os domínios é variável mas, em geral, HG é o mais abundante e constitui aproximadamente 65% (m/m) da PC (MOHNEN, 2008). Esse domínio mostra-se linear e, por isso, é conhecido como “região lisa” da pectina. É formado por ligações α -(1→4) do ácido galacturônico (AGal_p) e esses resíduos podem ser parcialmente metil-esterificados em C-6 ou *O*-acetilado em O-2 ou O-3 (CAFFALL; MOHNEN, 2009; HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010; MOHNEN, 2008). Assim, de acordo com seu grau de metil-esterificação

(GM), a PC é classificada com alto grau de metoxilação (AME, GM >50%) ou baixo grau de metoxilação (BME, GM <50%) (YAPO, 2011). O GM é relevante, porque influencia no mecanismo de gelificação, condições de processamento e propriedades da PC (VORAGEN et al., 2009).

RG-I é altamente ramificada, sendo conhecida como a “região pilosa” da pectina, compondo aproximadamente 20 a 35% da molécula (CHAN et al., 2017; MOHNEN, 2008). Dentre os três domínios, é o único que não é formado exclusivamente por galacturonanas. Essa região consiste em 100 ou mais unidades repetidas do dissacarídeo α -(1→2)-L-ramnose- α -(1→4)-D-AGal. Os resíduos de AGal podem ser *O*-acetil-esterificados e, diferentemente do que ocorre em HG, nas regiões RG-I não há metil-esterificação (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Os resíduos de ramnose representam mais de 30% do polímero péctico, estimando-se que 50-78% desses ocorram no domínio RG-I (RENARD; CRÉPEAU; THIBAUT, 1995; RENARD; THIBAUT, 1996). Os resíduos de ramnose da cadeia principal de RG-I podem ser substituídos por cadeias laterais de β -(1→4)-galactana, arabinana ramificadas e/ou arabinogalactana. Além disso, ao contrário de RG-II, as cadeias laterais de RG-I sofrem variações dependentes da espécie vegetal (VINCKEN et al., 2003).

Enquanto os demais domínios apresentam heterogeneidade estrutural entre espécies, RG-II é um domínio bastante conservado no reino vegetal, o que sugere uma função importante na estrutura e crescimento dos vegetais superiores. Embora RG-II esteja presente em menor quantidade, é o componente estruturalmente mais complexo (PÉREZ; RODRÍGUEZ-CARVAJAL; DOCO, 2003). Esse domínio também está incluso na “região pilosa”, sendo composto por uma cadeia principal de HG contendo aproximadamente 9 unidades de AGal em ligações α -(1→4), algumas metil-esterificadas. Ligadas a essa cadeia principal, 4 cadeias laterais estruturalmente distintas e constituídas por onze açúcares raros (e.g., apiose, 2-*O*-metil-L-fucose e 2-*O*-metil-D-xilose (YAPO, 2011) são encontradas.

A pectina é um polímero muito valorizado e amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica. As principais fontes comerciais são cascas de frutas cítricas, bagaço de maçã e polpa de beterraba-sacarina (beterraba branca) (NAQASH et al., 2017). Além das fontes convencionais, outros resíduos de frutas e vegetais também são fontes promissoras de pectina, com aplicação funcional ou nutricional, e que estão sendo investigados para valorização desses subprodutos devido as suas funcionalidades (CHRISTIAENS et al., 2015), e.g., rejeitos de

cenoura (CHRISTIAENS et al., 2015), cascas de tomate (GRASSINO et al., 2016) e mamão (KOUBALA et al., 2014), entre outras. Esse interesse em fontes alternativas se justifica devido às eventuais propriedades nanoestruturais da fração pectínica, as quais dependem da fonte botânica e do tecido vegetal fontes. Características como grau de ramificação e de polimerização (massa molar), distribuição de grupos éster (metilação e acetilação), composição monossacarídica e de ácidos urônicos e solubilidade definem as propriedades físico-químicas daqueles biopolímeros, conferindo-lhes distintas aplicações (SILA et al., 2009).

A pectina vem sendo estudada devido a seus efeitos promissores à saúde humana, tais como a redução de colesterol plasmático, de glicose sérica e atividade antitumoral (LIU et al., 2016). De forma similar, devido à resistência à destruição ao longo do trato gastrointestinal, pectinas têm sido investigadas como sistemas *delivery* de probióticos (CABRERA; CAMBIER; CUTSEM, 2011), melhorando a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* em ambientes gástricos (GEREZ et al., 2012), bem como prebiótico, por sua natureza de fibra dietética solúvel e reconhecidos benefícios ao trato gastrointestinal (CABRERA; CAMBIER; CUTSEM, 2011; GEREZ et al., 2012; HO; LIN; WU, 2017). Além disso, o interesse na segurança e utilização de tecnologias naturais e ecologicamente corretas encontra na pectina características relevantes para conservação de alimentos com sua aplicação em embalagens e como molécula carreadora de antimicrobianos, antioxidantes e outros compostos (MAHALIK; NAMBIAR, 2010). Adicionalmente, biomateriais a base de pectina têm aplicações em curativos (MUNARIN; TANZI; PETRINI, 2012) e engenharia de tecidos (COIMBRA et al., 2011). A pectina também tem sido estudada, mais recentemente, com viés nanotecnológico para administração de medicamentos, considerando suas propriedades emulsionantes em nanoemulsões (ARTIGA-ARTIGAS et al., 2018), ou ainda como nanopartículas ao transporte de fármacos, explorando suas propriedades mucoadesivas (SHARMA; AHUJA; KAUR, 2012).

2.3 Nutraceuticos lipofílicos

Alimento funcional é aquele que em função de sua composição é fonte de nutrientes e, adicionalmente, confere benefícios à prevenção de doenças e promoção da saúde, quando consumidos como parte da dieta regular. Diversas classes de compostos têm sido apontadas como responsáveis por tais benefícios: vitaminas e fitoquímicos, como os polifenóis e carotenoides, entre outros (JACKSON; PALIYATH, 2011). Alimentos funcionais lipofílicos se destacam pela presença de compostos

bioativos com funções importantes como antioxidantes, anti-inflamatórios, antitumoral e na cicatrização de feridas. No entanto, esses ativos lipofílicos possuem limitações em sua aplicação em sistemas alimentares, ou em sistemas de administração oral, devido à baixa solubilidade em meio aquoso, implicando em reduzida biodisponibilidade oral e fácil oxidação (EZHILARASI et al., 2013).

2.3.1 β -caroteno

Dentre os nutraceuticos lipofílicos de importância à saúde humana destacam-se os carotenoides, compostos isoprenoides que ocorrem em várias espécies vegetais como pigmentos naturais (YONEKURA; NAGAO, 2007). Dentre esses, destaca o β -caroteno (BC), um pigmento encontrado em frutas e verduras com cores alaranjada e amarela (SAINI; NILE; PARK, 2015). O BC foi e continua sendo amplamente estudado, por ser o principal carotenoide com atividade provitamina A e por seus alegados efeitos na redução do risco de doenças crônicas, como o câncer e doenças cardiovasculares, e aquelas relacionadas à idade (LIANG et al., 2013; SAINI; NILE; PARK, 2015).

Apesar das inúmeras atividades biológicas atribuídas ao BC, sua biodisponibilidade é baixa e sua absorção pode ser inferior a 10% em alimentos de origem vegetal (BOILEAU; MOORE; ERDMAN, 1999). Isso ocorre, principalmente, devido à resistência dos complexos caroteno-proteína e das paredes celulares vegetais que dificultam a liberação adequada do composto (ERDMAN; BIERER; GUGGER, 1993; REIN et al., 2013). Além disso, outro fator que reduz a biodisponibilidade oral do BC é a sua estrutura química, tipicamente de natureza hidrofóbica e, conseqüentemente, de baixa solubilidade em meio aquoso (RAO et al., 2013). Nesse contexto, a baixa biodisponibilidade do BC de fontes naturais levou ao desenvolvimento de métodos de extração e isolamento, a fim de fornecê-lo como suplemento alimentar, ou na fortificação de alimentos (DONHOWE; KONG, 2014). No entanto, o BC puro é sensível à degradação química pela oxidação por radicais livres, altas temperaturas ou metais pesados (ACHIR et al., 2010). Dessa forma, encapsular o BC em estruturas que permitam seu transporte e liberação constitui-se em uma abordagem de interesse para evitar sua degradação (LIN et al., 2018). Atualmente, os estudos de encapsulamento de BC estão focados principalmente em sistemas de nanoemulsões (WANG et al., 2018), com pouca ou nenhuma informação sobre sua nanoencapsulação utilizando polissacarídeos.

2.4 Nanopartículas poliméricas

A tecnologia de encapsulamento tem atraído a atenção para suas aplicações na indústria alimentícia com objetivo de proteger compostos lábeis da degradação e liberar de forma direcionada e controlada o bioativo no local alvo (ARVANITOYANNIS, 2009; PAUL et al., 2010).

Dentre os métodos de encapsulamento destacam-se as nanopartículas poliméricas (NPol) que são eficientes como carreadoras de compostos bioativos, melhorando sua estabilidade e liberação controlada no local alvo. Uma das principais vantagens das NPol é superar limitações de sistemas de transporte e liberação a base de lipídios, como por exemplo os lipossomas, emulsões e micelas (KAMALY et al., 2012)

A escolha do biopolímero a ser utilizado em NPol é um fator importante, pois esse precisa ser compatível com o bioativo a ser nanoencapsulado. Os principais polímeros utilizados pela indústria farmacêutica são: poli (caprolactona) – PCL, ácido polilático - PLA, poli D, L-lactídeo-co-glicolídeo - PLGA, ácido poliglutâmico - PGA, entre outros (SUN et al., 2012). No entanto, a escolha de biopolímeros como celulose, alginato, quitosana, dextrana e pectina, por exemplo, é preferível ao desenvolvimento de sistemas de transporte e liberação com grau alimentício, além de suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade (SHIN; KIM; PARK, 2015).

2.4.1 Nanopartículas revestidas com biopolímeros mucoadesivos

2.4.1.1 Mucoadesão

A mucoadesão é a adesão de um material polimérico à(s) membrana(s) mucosa(s) do corpo humano. Assim, esse material polimérico, contendo um composto ativo, adere à mucosa alvo por um maior período de tempo, comparativamente ao composto ativo livre, prolongando a residência do bioativo e aumentando a sua permeabilidade e biodisponibilidade (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009)

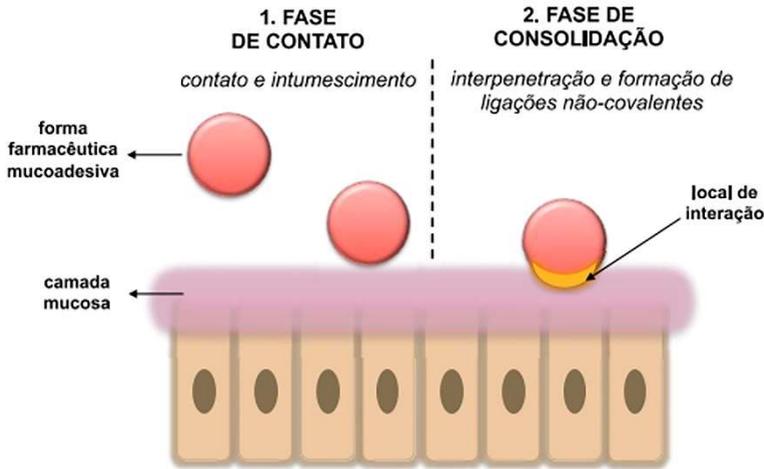
Mucoadesivos podem ser utilizados em formulações farmacêuticas e alimentares para carrear uma série de compostos bioativos para uma variedade de tecidos mucosos alvo (e.g., mucosa nasal, vaginal, bucal e do trato gastrointestinal). Cada uma dessas vias de administração possui diferenças tanto nas estruturas mucosas quanto na composição do muco

secretor que, em conjunto, afetam a força mucoadesiva (COOK et al., 2017; RICHARDSON et al., 2004) .

2.4.1.1.1 Mecanismos de mucoadesão

A mucoadesão ocorre por uma série de interações físico-químicas entre o material polimérico e o ambiente mucoso. O muco é um gel viscoso composto principalmente por água (~90%) e, em menor proporção, sais, lipídios, mucinas e carboidratos. As mucinas são glicoproteínas e as principais responsáveis na formação de uma rede em 3D viscoelástica e heterogênea (NETSOMBOON; BERNKOP-SCHNURCH, 2015). Assim, a interação mucina-polímero é determinada por alguns fatores como pH e o fluxo de secreção mucosa. Geralmente, são considerados dois estágios essenciais ao estabelecimento da mucoadesão (Figura 4) (DUCHENE; TOUCHARD; PEPPAS, 1988): **a) fase de contato**: caracteriza-se por um contato íntimo entre o polímero mucoadesivo e a membrana mucosa, ocorrendo um fenômeno de membrana que permite a transferência de água da camada de muco ao polímero, resultando em seu umedecimento ou inchaço e **b) fase de consolidação**: ocorre a penetração do polímero mucoadesivo no tecido ou superfície da membrana mucosa (interpenetração) (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009; SANKAR; JAIN, 2013).

Figura 4- Fases do mecanismo de mucoadesão.



Fonte: Mazzarino (2013).

2.4.1.1.2 Teorias de mucoadesão

Há seis mecanismos de mucoadesão propostos, os quais podem ser pensados como complementares por descrever fenômenos de ocorrência simultânea, ou em diferentes estágios do processo, facilitando a mucoadesão (LAWS; GU; MARSHALL, 2001). As seis teorias propostas são:

a) **Teoria do umedecimento:** relaciona a dispersão dos polímeros e sua capacidade de inchamento no ambiente da mucosa úmida. Essa teoria considera como pré-requisito ao processo adesivo a habilidade do sistema polimérico em se espalhar na superfície mucosa. Uma elevada habilidade está associada a uma performance mucodesiva mais forte. Geralmente, esse fenômeno de umedecimento é importante para mucoadesivos líquidos (COOK et al., 2017).

b) **Teoria de adsorção:** essa teoria considera dois tipos de ligações químicas, a saber: as forças de van der Waals e as ligações de hidrogênio que ocorrem durante as

interações mucoadesivas. Quando há o contato inicial das superfícies envolvidas, a adesão do polímero ocorre a partir de uma série de forças superficiais que atuam entre ele e as moléculas da membrana mucosa (AHUJA; KHAR; ALI, 1997).

c) **Teoria eletrônica:** descreve que o contato entre o polímero adesivo e o muco ocorre devido as diferenças eletrônicas da superfície de ambos. A adesão se dá por transferência de elétrons entre o sistema polimérico e o epitélio da membrana mucosa, permitindo a formação de uma camada dupla de cargas eletrônicas na interface da rede mucina-polímero. Assim, há formação de forças atrativas entre as duas superfícies por meio dessa dupla camada eletrônica (DODOU; BREEDVELD; WIERINGA, 2005).

d) **Teoria da fratura:** assume que as ligações adesivas entre o muco e o sistema adesivo estão relacionadas com a força necessária para separar ambas superfícies. Essa teoria relaciona a força da ligação adesiva de acordo com a força do deslocamento do polímero do muco após o estabelecimento da adesão (AHAGON; GENT, 1975).

e) **Teoria da difusão:** considera que a ligação adesiva ocorre devido ao embricamento das cadeias do polímero e da mucina devido a interpenetração, permitindo a formação de outras ligações primárias e potencialmente secundárias fortalecendo a adesão (JABBARI; WISNIEWSKI; PEPPAS, 1993; PEPPAS; BURI, 1985). Embora existam muito fatores envolvidos nesse processo, o peso molecular, a mobilidade/flexibilidade da cadeia, a capacidade de expansão de ambas as redes, a densidade de reticulação e a temperatura são propriedades básicas que determinam significativamente essa difusão. Polímeros de cadeia longa podem se difundir e interpenetrar em maior extensão com a superfície do muco. Todavia, sabe-se que para que isso ocorra de forma suficiente é necessário um comprimento crítico de cadeia de pelo menos 100 kDa (THAKUR et al., 2015).

f) **Teoria mecânica:** considera que as irregularidades de uma superfície áspera aumentam a área interfacial disponível para interações, favorecendo a

adesão por meio do preenchimento dessas irregularidades por um líquido mucoadesivo (SMART, 2005; THAKUR et al., 2015)

2.4.2 Nanopartículas revestidas com pectina

A biodisponibilidade oral de um nutracêutico é definida como a fração desse bioativo que alcança a circulação sistêmica (sangue) na sua forma ativa e, dessa forma, pode ser distribuído aos tecidos e órgãos para exercer suas atividades biológicas benéficas à saúde. No entanto, para alcançar a circulação sistêmica em sua forma ativa, alguns nutracêuticos enfrentam barreiras que podem reduzir essa biodisponibilidade, como por exemplo: *i*) instabilidade química durante a digestão, *ii*) baixa solubilidade em fluidos gastrointestinais de compostos lipofílicos com lenta absorção naquele ambiente, e *iii*) o metabolismo de primeira passagem (PARADA; AGUILERA, 2007; YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014).

A utilização da nanotecnologia para o encapsulamento de nutracêuticos em sistemas de entrega baseados em nanopartículas (NP) tem sido uma estratégia eficaz para melhorar a biodisponibilidade desses compostos (YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014). Diversas NP já foram fabricadas e testadas com potencial uso em sistemas de entrega de nutracêuticos para promoção da saúde por meio do seu encapsulamento, proteção e/ou liberação controlada. Dessa forma a melhora da solubilidade e da biodisponibilidade oral desses bioativos por meio de NP tem sido uma estratégia promissora para aumentar a sua eficácia em humanos (YAO; XIAO; MCCLEMENTS, 2014).

Além das vantagens do encapsulamento de nutracêuticos por meio de NP, o seu revestimento com biopolímeros como a PC traz benefícios adicionais por suas características atóxicas, resistência à degradação por proteases e amilases e de mucoadesão (MARRAS-MARQUEZ; PEÑA; VEIGA-OCHOA, 2015), permitindo que o bioativo transite pelo sistema gastrointestinal protegido do ataque enzimático.

Adicionalmente, a propriedade mucoadesiva da PC traz outros inúmeros benefícios. A sua mucoadesividade ocorre devido à interação dos grupos carboxílicos presentes em sua estrutura com a mucina. A pectina em meio aquoso hidrata-se, formando um hidrogel viscoso que facilita a mucoadesão. Possivelmente, o mecanismo de mucoadesão que explica a interação pectina-mucina ocorra por meio da teoria de adsorção (SRIAMORNSAK; WATTANAKORN; TAKEUCHI, 2010).

Nesse contexto, NP revestidas com pectina, por meio da sua propriedade de mucoadesão, possuem a vantagem de prolongar o período de retenção do fármaco/nutracêutico no local de absorção, aumentando sua eficácia terapêutica. Além disso, a superfície mucosa possui um suprimento abundante de sangue e uma taxa de fluxo sanguíneo suficiente que aceleram o processo de adsorção do sistema mucoadesivo. Por fim, em princípio, a dose do bioativo a ser utilizada poderá ser reduzida substancialmente minimizando efeitos colaterais (ALEXANDER et al., 2011; ASIJA, 2014).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(AOAC). **Official Methods of the AOAC International**. 18^a ed. Maryland: 2005.

ACHIR, N. et al. Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 349–361, 2010.

AHAGON, A.; GENT, A. N. Effect of interfacial bonding on the strength of adhesion. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics**, v. 13, p. 1285–1300, 1975.

AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, J. Mucoadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, p. 489–515, 1997.

AKHTAR, M. et al. Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 3, p. 249–256, 2002.

ALBERSHEIM, P. et al. An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls higher plants. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.). **Pectins and pectinases**. Elsevier Science B.V: 1996. p. 47–55.

ALBUQUERQUE, P. B. S. et al. **Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis***, 2014.

ALEXANDER, A. et al. Mechanism responsible for mucoadhesion of mucoadhesive drug delivery system: A review. **International Journal**

of **Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 434–445, 2011.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 3, p. 505–518, 2009.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1–2, p. 142–47, 2009.

ANVISA. **Resolução - CNNPA nº 12, de 1978**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/12_78.pdf>. Acesso em: 2 maio. 2016.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.

ARTIGA-ARTIGAS, M. et al. Influence of essential oils and pectin on nanoemulsion formulation: A ternary phase experimental approach. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 209–2019, 2018.

ARVANITOYANNIS, I. S. Encapsulation and controlled release Technologies in food systems. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 7, p. 1462–1463, 2009.

ASIJA, R. Gastrointestinal mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Drug Discovery and Therapeutics**, v. 2, p. 1–6, 2014.

BAI, L. et al. Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 703–711, 2016.

BAUER, W. D.; TALMADGE, KENNETH W. KEEGSTR, K.; ALBERSHEIM, P. The Structure of Plant Cell Walls. **Plant Physiology**, v. 51, p. 174–187, 1973.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 484–489, 1973.

BÖHM, V. et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 221–226, 2002.

BOILEAU, T. W. M.; MOORE, A. C.; ERDMAN, J. W. Carotenoids, vitamin A, and human health. In: PAPAS, A. M. (Ed.). **Antioxidant status, diet, nutrition, and health**. [s.l.] Boca Raton, FL: CRC Press., 1999. p. 133–158.

BONI, F. I. et al. Mucoadhesive nanostructured polyelectrolytes complexes modulate the intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 73–82, 2018.

BOON, C. S. et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 50, n. 6, p. 515–532, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.

BRÍGIDA, A. I. S. et al. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 832–838, 2010.

BUSSOLO DE SOUZA, C. et al. Prebiotic effects of cassava bagasse in TNO's in vitro model of the colon in lean versus obese microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 210–220, 2014.

CABRERA, J. C.; CAMBIER, P.; CUTSEM, P. V. Drug encapsulation in pectin hydrogel beads—A systematic study of stimulated digestion media. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 5, p. 292–299, 2011.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–1900, 2009.

CAI, Y. et al. Study of the structure and biosynthetic pathway of lignin in stone cells of pear. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 374–379, 2010.

CASTRO-ALVES, V. C. et al. Polysaccharides from raw and cooked chayote modulate macrophage function. **Food Research International**, v. 81, p. 171–179, 2016.

CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. (Ed.). **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: 1994. p. 11–50.

CHAN, S. Y. et al. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 118–139, 2017.

CHANAMAI, R.; HORN, G.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of Oil Polarity on Droplet Growth in Oil-in-Water Emulsions Stabilized by a Weakly Adsorbing Biopolymer or a Nonionic Surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 247, n. 1, p. 167–176, 2002.

CHANG, Y. .; MCCLEMENTS, D. J. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2306–2312, 2014.

CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physicochemical Properties and Antimicrobial Efficacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8906–8913, 2013.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 272–283, 2006.

CHESSON, A.; GORDON, A. H.; LOMAX, J. A. Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, n. 12, p. 1330–1340, 1983.

CHRISTIAENS, S. et al. Pectin characterisation in vegetable waste streams: A starting point for waste valorisation in the food industry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 275–282, 2015.

CIPRIANI, T. R. et al. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thrombosis Haemostasis**, v. 101, p. 860–866, 2009.

COIMBRA, P. et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 112–118, 2011.

COOK, S. L. et al. Mucoadhesion: A food perspective. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 281–296, 2017.

CUI, F.; QIAN, F.; YIN, C. Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 316, p. 154–161, 2006.

DAVIS, E. A. et al. Isolation and an N.M.R. study of pectins from flax (*linum usitatissimum* L.). **Carbohydrate Research**, v. 197, p. 205–215, 1990.

DOBLIN, M. S.; PETTOLINO, F.; BACIC, A. Evans Review: Plant cell walls: The skeleton of the plant world. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 5, p. 357–381, 2010.

DODOU, D.; BREEDVELD, P.; WIERINGA, P. Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 1–16, 2005.

DONHOWE, E. G.; KONG, F. Beta-carotene: Digestion, microencapsulation, and in vitro bioavailability. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 2, p. 338–354, 2014.

DUCHENE, D.; TOUCHARD, F.; PEPPAS, N. A. Pharmaceutical and medical aspects of bioadhesive systems for drug administration. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 14, n. 2–3, p. 283–318, 1988.

DUFOUR, É. Principles of Infrared Spectroscopy. In: SU, D.-W. (Ed.). **Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control**. 1ª ed. Burlington, San Diego, London, New York: 2009. p. 1–27.

DUTTA, R. K.; SAHU, S. Development of a novel probe sonication assisted enhanced loading of 5-FU in SPION encapsulated pectin nanocarriers for magnetic targeted drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 1, p. 58–65, 2012.

EBRINGEROVÁ, A. Hemicelulosen als biopolymere Rohstoffe. **Das Papier**, v. 46, p. 726–734, 1992.

EBRINGEROVÁ, A. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, p. 1–12, 2006.

EBRINGEROVÁ, A.; HROMÁDKOVÁ, Z.; HEINZE, T. Hemicelulose. **Advances in Polymer Science**, v. 186, p. 1–67, 2005.

EDHIREJ, A. et al. Cassava / sugar palm fiber reinforced cassava starch hybrid composites : Physical , thermal and structural properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 75–83, 2017.

ELANTHIKKAL, S. et al. Cellulose microfibrils produced from banana plant wastes: Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 852–859, 2010.

EMBRAPA. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: processamento da mandioca**. [s.l]: 2003.

EPAGRI. **Fatores que afetam a competitividade das farinhas e polvilheiras na agricultura familiar catarinense**. Florianópolis: 2002.

EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2016-2017**. Florianópolis: EPAGRI/CEPA, 2017.

ERDMAN, J. W.; BIERER, T. L.; GUGGER, E. T. Absorption and transport of carotenoids. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 691, n. 1, p. 76–85, 1993.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Célula vegetal e ciclo celular. In: **Raven - Biologia Vegetal**. 8ª ed. Rio de Janeiro: 2014. p. 38–74.

EZHILARASI, P. N. et al. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628–647, 2013.

FAO. **Cassava**. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/gcds/index_en.html>. Acesso em: 2 maio. 2016.

FAO. **Crops**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

FDA. **Food Additive Status List**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

FERREIRA, D. et al. Use of FT-IR spectroscopy to follow the effect of processing in cell wall polysaccharide extracts of a sun-dried pear. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 2, p. 175–182, 2001.

FONTANA, J. D. et al. The 4-O-methyl- α -D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 560–571, 1988.

FREDON, E. et al. Hydrophobic films from maize bran hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 1–12, 2002.

FRY, S. C. et al. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. **Physiologia Plantarum**, v. 89, n. 1, p. 1–3, 1993.

GAHAN, P. B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. London: Academic Press, 1984.

GARCIA, R. B. et al. Preparation of micro and nanoparticles from corn cobs xylan. **Polymer Bulletin**, v. 46, n. 5, p. 371–379, 2001.

GEREZ, C. L. et al. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Letters in**

Applied Microbiology, v. 54, n. 6, p. 552–556, 2012.

GORDON, E. M.; MCCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. **Proceedings of Nova Scotia Institute of Science**, v. 27, p. 111–133, 1973.

GOUBET, F. et al. AtCSLA7, a Cellulose Synthase-Like Putative Glycosyltransferase, Is Important for Pollen Tube Growth and Embryogenesis in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 131, p. 547–557, 2003.

GRASDALEN, H.; BAKOY, O. E.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-N.M.R Spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 183–191, 1988.

GRASSINO, A. N. et al. Utilization of tomato peel waste from canning factory as a potential source for pectin production and application as tin corrosion inhibitor. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 265–274, 2016.

GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 438–446, 2016.

GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability. **Food Chemistry**, v. 171, p. 117–122, 2015.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose Nanocrystals : Chemistry , Self-Assembly , and Applications. **Chemical Reviews**, v. 110, p. 3479–3500, 2010.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of Pectin. **Plant Physiology**, v. 153, p. 384–395, 2010.

HAYAKAWA, K. et al. Quality characteristics of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): properties of starch gelatinization and retrogradation. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 576–580, 1997.

HO, Y.-Y.; LIN, C.-M.; WU, M.-C. Evaluation of the prebiotic effects

of citrus pectin hydrolysate. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 3, p. 550–558, 2017.

HROMÁDKOVÁ, Z.; EBRINGEROVÁ, A.; HIRSCH, J. An Immunomodulatory Xylan-Phenolic Complex from the Seed Hulls of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Chemical Papers**, v. 59, n. 3, p. 223–224, 2005.

IAL. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. In: **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4ª ed. Brasília: 2005. p. 1018.

JABBARI, E.; WISNIEWSKI, N.; PEPPAS, N. A. Evidence of mucoadhesion by chain interpenetration at a poly (acrylic acid)/mucin interface using ATR-FTIR spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 26, n. 2, p. 99–108, 1993.

JACKSON, C. J. C.; PALIYATH, G. Functional foods and nutraceuticals. In: PALIYATH, G.; BAKOVIC, M.; SHETTY, K. (Eds.). **Functional foods, nutraceuticals, and degenerative disease prevention**. 1ª ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2011. p. 11–43.

JAIN, R. K.; SJÖSTEDT, M.; GLASSER, W. . Thermoplastic xylan derivatives with propylene oxide. **Cellulose**, v. 7, p. 319–336, 2000.

JIA, Z. et al. NMR characterization of endogenously O-acetylated oligosaccharides isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) xyloglucan. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1818–1825, 2005.

JIN, H. et al. Fabrication of β -conglycinin-stabilized nanoemulsions via ultrasound process and influence of SDS and PEG 10000 co-emulsifiers on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Research International**, v. 106, p. 800–808, 2018.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York ; London: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1940.

KACURÁKOVÁ, M. et al. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 195–203, 2000.

KAMALY, N. et al. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles:

design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2971–3010, 2012.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41–60, 2009.

KARAKI, N. et al. Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 1–18, 2016.

KEENAN, M. H. J. et al. A ¹³C NMR study of sugar-beet pectin. **Carbohydrate Research**, v. 138, p. 168–170, 1985.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149–156, 2002.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KOMAİKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 331–352, 2016.

KOUBALA, B. B. et al. Isolation and structural characterisation of papaya peel pectin. **Food Research International**, v. 55, p. 215–221, 2014.

KRAUS, J. E. et al. A célula vegetal. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Eds.). . **Anatomia Vegetal**. 2^a ed. Viçosa: 2006. p. 31–86.

KRSTONOŠIĆ, V. et al. Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2212–2218, 2009.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria.

Biotechnology Advances, v. 19, n. 8, p. 597–625, 2001.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 850–864, 2000.

LEITE, A. L. M. P.; ZANON, C. D.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from cassava root bagasse and peelings. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 962–970, 2017.

LEONEL, M. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. (Ed.). **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: 2000. p. 211–212.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; ROAU, X. Aproveitamento do resíduo da produção de etanol a partir de farelo de mandioca, como fonte de fibras dietéticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 241–245, 1999.

LI, Y. R.; JIA, Z.; TRUSH, M. A. Defining ROS in biology and medicine. **Reactive Oxygen Species**, v. 1, n. 1, p. 9–21, 2016.

LIANG, R. et al. Stability and bioaccessibility of b-carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 6, p. 1249–1257, 2013.

LIN, Q. et al. Factors affecting the bioaccessibility of b-carotene in lipid-based microcapsules: Digestive conditions, the composition, structure and physical state of microcapsules. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 187–203, 2018.

LIU, Y. et al. Anti-diabetic effect of citrus pectin in diabetic rats and potential mechanism via P13/Akt signaling pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 484–488, 2016.

LOPES, L. C. et al. Effect of low and high methoxyl citrus pectin on the properties of polypyrrole based electroactive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 11–18, 2017.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, p. 81–85,

2000.

LUO, X. et al. Fabrication of b-carotene nanoemulsion-based delivery systems using dual-channel microfluidization: physical and chemical stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 328–335, 2017.

MACEDO, J. P. F. et al. Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2006.

MAHALIK, N. P.; NAMBIAR, A. N. Trends in food packaging and manufacturing systems and technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 3, p. 117–128, 2010.

MAO, L. et al. Emulsion design for the delivery of β -carotene in complex food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 770–784, 2018.

MAPA. **Instrução normativa 52/2011**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=497488882>>. Acesso em: 2 maio. 2016.

MARASCHIN, M. et al. Cell wall polysaccharides from *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) cultured cells: Extraction and chemical structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 1, p. 55–60, 2000.

MARCON, M. V. et al. Pectins from apple pomace – Characterization by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. **Annual Magnetic Resonance**, v. 4, p. 56–63, 2005.

MARRAS-MARQUEZ, T.; PEÑA, J.; VEIGA-OCHOA, M. D. Robust and versatile pectin-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 265–276, 2015.

MATSUNAGA, T. et al. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes: implications for the evolution of vascular plants. **Plant Physiology**, v. 134, p. 339–351, 2004.

MAZZARINO, L. et al. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, p. 58–66, 2012.

MAZZARINO, L. **Sistemas nanoestruturados decorados com quitosana para liberação bucal da curcumina**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina e Université de Grenoble, 2013.

MAZZARINO, L. et al. On the Mucoadhesive Properties of Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles Loaded with Curcumin Using Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 787–794, 2014a.

MAZZARINO, L. ÍCIA et al. Xyloglucan-block-Poly(ϵ -Caprolactone) Copolymer Nanoparticles Coated with Chitosan as Biocompatible Mucoadhesive Drug Delivery System. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, p. 709–719, 2014b.

MEDINA, R. D. et al. In vitro cultured primary roots derived from stem segments of cassava (*Manihot esculenta*) can behave like storage organs. **Annals of Botany**, v. 99, n. 3, p. 409–423, 2007.

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

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681–689, 2012.

NACONSIE, M. et al. Cassava root membrane proteome reveals activities during storage root maturation. **Journal of Plant Research**, v. 129, n. 1, p. 51–65, 2016.

NAGGAR, V. F. et al. Pectin, a possible matrix for oral sustained-release preparations of water-soluble drugs. **Pharma Sciences**, v. 2, n. 3, p. 227–234, 1992.

NAQASH, F. et al. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 227–239, 2017.

NASCIMENTO, G. E.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. A comparative study of mucilage and pulp polysaccharides from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, p. 278–283, 2016.

NATOLI, M. et al. Good Caco-2 cell culture practices. **Toxicology In Vitro**, v. 26, p. 1243–1246, 2012.

NETSOMBOON, K.; BERNKOP-SCHNURCH, A. Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 98, p. 76–89, 2015.

O'NEILL, M. A. et al. Rhamnogalacturonan II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 109–139, 2004.

OEHLKE, K. et al. Potential bioavailability enhancement of bioactive compounds using food-grade engineered nanomaterials: a review of the existing evidence. **Food & Function**, v. 5, p. 1341–1359, 2014.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 5586–5591, 1999.

PALAZZO, C. et al. Mucoadhesive properties of low molecular weight chitosan- or glycol chitosan- and corresponding thiomers-coated poly (isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 117, p. 315–323, 2017.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: Cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 81–87, 2000.

PARADA, J.; AGUILERA, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of Food Science**, v. 72, p. R21–R32, 2007.

PAUL, D. V. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292–302, 2010.

PEPPAS, N. A.; BURI, P. A. Surface interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. **Journal of Controlled Release**, v. 2, p. 257–276, 1985.

PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; DOCO, T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. **Biochimie**, v. 85, n. 1–2, p. 109–121, 2003.

PETERSEN, B. O. et al. Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy—assignment of reference compounds. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2830–2833, 2008.

POPPER, Z. A. Evolution and diversity of green plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 286–292, 2008.

POPPER, Z. A.; FRY, S. C. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. **Annals of Botany**, v. 91, p. 1–12, 2003.

QIAN, C. et al. Inhibition of b-carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. **Food Chemistry**, v. 135, p. 1036–1043, 2012.

RADJABI-NASSAB, F. et al. Further studies of the glucomannan from *Aloe vahombe* (liliaceae). II. Partial hydrolyses and NMR ¹³C studies. **Biochimie**, v. 66, p. 563–567, 1984.

RAO, J. et al. Nutraceutical nanoemulsions: influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β-carotene bioavailability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3175–3183, 2013.

REIN, M. J. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588–602, 2013.

RENARD, C. M. G. C.; CRÉPEAU, M. J.; THIBAUT, J. F. Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. **Carbohydrate Research**, v. 275, n. 1, p. 155–165, 1995.

RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J. F. Degradation of pectins in

alkaline conditions: Kinetics of demethylation. **Carbohydrate Research**, v. 286, n. 0, p. 139–150, 1996.

RICHARDSON, J. C. et al. Oesophageal bioadhesion of sodium alginate suspensions: Particle swelling and mucosal retention. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 49–56, 2004.

RONDEAU-MOURO, C.; BULÉON, A.; LAHAYE, M. Caractérisation par RMN des biopolymères d'origine végétale, de la molécule à l'organisation supramoléculaire. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, n. 4–5, p. 370–379, 2008.

ROSE, M. C.; VOYNOW, J. A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. **Physiological reviews**, v. 86, p. 245–278, 2006.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735–750, 2015.

SANKAR, R.; JAIN, S. K. Development and characterization of gastroretentive sustained-release formulation by combination of swelling and mucoadhesive approach: a mechanistic study. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 7, p. 1455–1469, 2013.

SCATENA, V. L.; SCREMIN-DIAS, E. Parênquima, colênquima e esclerênquima. In: APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Eds.). **Anatomia Vegetal**. 2^a ed. Viçosa: [s.n.], p. 109–127.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.

SCHMIDGALL, J.; HENSEL, A. Bioadhesive properties of polygalacturonides against colonic epithelial membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 217–225, 2002.

SCHMIDT, U. S. et al. Effect of Molecular Weight Reduction, Acetylation and Esterification on the Emulsification Properties of Citrus

Pectin. **Food Biophysics**, v. 10, n. 2, p. 217–227, 2015.

SELVENDRAN, R. R.; O'NEILL, M. A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. **Methods in Biochemical Analysis**, v. 32, p. 25–153, 1987.

SELVENDRAN, R.; STEVENS, B.; O'NEILL, M. Developments in the isolation and analysis of cell walls from edible plants. In: BRETT, C. T.; HILLMAN, J. R. (Eds.). **Biochemistry of plant cell walls**. London: 1985. p. 39–78.

SHARMA, R.; AHUJA, M.; KAUR, H. Thiolated pectin nanoparticles: Preparation, characterization and ex vivo corneal permeation study. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1606–1610, 2012.

SHIN, G. H.; KIM, J. T.; PARK, H. J. Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 144–157, 2015.

SILA, D. N. et al. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II—Structure–Function Relationships. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 86–104, 2009.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1–2, p. 19–38, 2001.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**. 2^a ed. [s.l]: 1993.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1556–1568, 2005.

SMITH, B. G.; HARRIS, P. J. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 1, p. 33–53, 1999.

SOLANS, C.; ISABEL, S. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N. Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 474–481, 2008.

SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N.; TAKEUCHI, H. Study on the mucoadhesion mechanism of pectin by atomic force microscopy and mucin-particle method. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 54–59, 2010.

STONE, B. A.; CLARKE, A. E. **Chemistry and Biology of (1→3)-β-Glucans**. [s.l.] Bundoora: La Trobe University Press, 1992.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 201–230, 2004.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195–204, 2004.

SUN, M. et al. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. **Nanomedicine**, v. 7, n. 7, p. 1085–1100, 2012.

SUN, X. F. et al. Extraction and characterization of original lignin and hemicellulose from wheat straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 860–8/70, 2005a.

SUN, X. F. et al. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 860–870, 2005b.

SUNGTHONGJEEN, S. et al. Studies on Pectins as Potential Hydrogel Matrices for Controlled-Release Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 12, p. 1271–1276, 1999.

SVÄRD, A.; BRÄNNVALL, E.; EDLUND, U. Rapeseed straw as a renewable source of hemicelluloses: Extraction, characterization and film formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 179–186, 2015.

SVÄRD, A.; BRÄNNVALL, E.; EDLUND, U. Rapeseed straw polymeric hemicelluloses obtained by extraction methods based on severity factor. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 305–315,

2017.

TAMAKI, Y. et al. Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 352–361, 2008.

THAKUR, S. et al. Impact of pegylation on biopharmaceutical properties of dendrimers. **Polymer**, v. 59, p. 67–92, 2015.

THIRAWONG, N.; KENNEDY, R. A.; SRIAMORNSAK, P. Viscometric study of pectin–mucin interaction and its mucoadhesive bond strength. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 170–179, 2008.

VALLAR, S. et al. Oxide slurries stability and powders dispersion: optimization with zeta potential and rheological measurements. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 19, p. 1017–1021, 1999.

VAZQUEZ, G. et al. FTIR, H-1 and C-13 NMR characterization of acetosolv-solubilized pine and eucalyptus lignins. **Holzforschung**, v. 51, p. 158–166, 1997.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112–1116, 2006.

VINCKEN, J.-P. et al. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1781–1789, 2003.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263–275, 2009.

WANG, M. et al. Fabrication and characterization of carboxymethyl chitosan and tea polyphenols coating on zein nanoparticles to encapsulate b-carotene by anti-solvent precipitation method. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 577–587, 2018.

WINNING, H. et al. Quantification of the degree of blockiness in pectins using ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 256–266, 2007.

WU, M.-H. et al. Effects of emulsifier type and environmental stress on

the stability of curcumin emulsion. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 10, p. 1375–1380, 2017.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice husks. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, p. 307–319, 2001.

YANG, F. et al. Engineering secondary cell wall deposition in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 3, p. 325–335, 2013.

YAO, M. F.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Delivery of lipophilic bioactives: assembly, disassembly, and reassembly of lipid nanoparticles. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 53–81, 2014.

YAPO, B. M. Pectin rhamnogalacturonan II: on the “small stem with four branches” in the primary cell walls of plants. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

YI, J. et al. Cellular Uptake of β -Carotene from Protein Stabilized Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Homogenization–Evaporation Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1096–1104, 2014.

YI, J. et al. Beta-carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxy radical oxidation in Caco-2 cells. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 31–40, 2015.

YONEKURA, L.; NAGAO, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 107–115, 2007.

YORK, W. S.; O’NEILL, M. A. Biochemical control of xylan biosynthesis - which end is up? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 258–265, 2008.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente as estruturas dos polissacarídeos do bagaço da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), a fim de identificar componentes com propriedades químicas de interesse ao desenvolvimento de produtos bionanotecnológicos.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar o teor de fibras (solúvel e insolúvel), cinzas, proteínas, lipídios, umidade, teor de amido e amido resistente do BM;
- 2) Determinar o perfil espectroscópico de FTIR e o índice de cristalinidade do BM;
- 3) Caracterizar a morfologia dos grânulos de amido residual e das fibras do BM;
- 4) Investigar a anatomia do bagaço de mandioca via microscopia de luz;
- 5) Extrair as frações pectínica e hemicelulósicas da parede celular do BM;
- 6) Determinar a composição monossacarídica e de ácidos urônicos das frações de pectina e hemiceluloses do BM;
- 7) Determinar o conteúdo de ácidos urônicos das frações de pectina e hemiceluloses;
- 8) Determinar a massa molecular das frações pectínica e hemicelulósicas;
- 9) Determinar o perfil espectroscópico de FTIR da fração pectínica;
- 10) Investigar a estrutura química das frações pectínica e da hemicelulose majoritária via ^1H - e ^{13}C -RMN;
- 11) Determinar o grau de metil-esterificação da fração pectínica via ^1H -RMN;
- 12) Preparar suspensões de nanopartículas de pectina contendo β -caroteno pela técnica de emulsificação espontânea;

- 13) Caracterizar as suspensões de nanopartículas quanto ao tamanho de partícula, morfologia, potencial zeta, teor de β -caroteno e eficiência de encapsulação;
- 14) Determinar a estabilidade das suspensões de nanopartículas quanto tamanho de partícula, potencial zeta e pH;
- 15) Determinar os potenciais antioxidante e mucoadesivo das suspensões de nanopartículas de pectina contendo β -caroteno;
- 16) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das suspensões de nanopartículas com pectina contendo β -caroteno em cultura de células Caco-2.

**CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES
PÉCTICAS E HEMICELULÓSICAS DO BAGAÇO DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)**

1. RESUMO

Neste estudo, amostras de bagaço de mandioca (BM) coletadas nas safras 2014/2015 e 2015/2016 foram caracterizadas quanto as suas frações pectíca e hemicelulósica majoritárias. Os valores de rendimentos de extração se mostraram semelhantes entre as safras analisadas, a saber: pectina - 2,42% (2014/2015) e 2,04% (2015/2016, m/m) e hemicelulose A/KOH 1 M - 3,34% (2014/2015) e 3,14% (2015/2016). Análises cromatográfica (GC) e espectroscópicas (FTIR e ^1H e ^{13}C -RMN) revelaram que o domínio RG-I das amostras de pectina, da primeira safra, consiste em uma cadeia principal de repetições de dissacarídeos α -(1 \rightarrow 2)-L-ramnose- α -(1 \rightarrow 4)-D-AGal apresentando também cadeias laterais de D-manose, D-galactose e possivelmente outros açúcares neutros. Enquanto a pectina extraída na segunda safra apresentou resultados discrepantes em relação a primeira e aos modelos já descritos na literatura necessitando maior investigação. Os resultados analisados para as frações hemicelulósicas revelaram que os monossacarídeos majoritários são os mesmos, em geral ácido D-galacturônico e D-manose para as frações A e B (KOH 1 M) e, para A e B (KOH 4 M) além desses monômeros citados também foi detectada a presença de D-galactose em todas as safras. No entanto, não foi possível confirmar um padrão de estrutura química para as frações desses biopolímeros. Assim, as frações pectícas e hemicelulósicas do BM revelaram composição monossacarídica similar, diferindo nos conteúdos daqueles constituintes ao longo das safras. Dessa forma, os resultados obtidos fornecem subsídios relevantes para pesquisas aplicadas visando o desenvolvimento de produtos bio(nano)tecnológicos baseados nesses biopolímeros.

Palavras-chave: *Manihot esculenta* Crantz, bagaço de mandioca, pectina, hemicelulose.

2. INTRODUÇÃO

A parede celular vegetal consiste principalmente em celulose, seguida por hemicelulose e pectina. Os dois últimos biopolímeros constituem uma matriz na qual as microfibrilas de celulose são incorporadas (HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010). As hemiceluloses podem consistir em vários polímeros distintos, principalmente xilanas, xiloglucanas e (gluco)mananas, tendo uma cadeia principal constituída por ligação do tipo β -(1 \rightarrow 4) entre seus monômeros (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). As pectinas também são polímeros heterogêneos com estruturas que variam de homogalacturonanas (HG) lineares a domínios altamente ramificados e complexos como as ramnogalacturonanas (RG-I e RG-II) (ALBERSHEIM et al., 1996). HG é o domínio mais abundante e representa cerca de 60-65% da quantidade total de pectina na parede celular. É constituído por unidades de ácido D-galacturônico (AGalp) unidas por ligação do tipo α -(1 \rightarrow 4) (VORAGEN et al., 2009). RG-I é o único domínio não formado por homogalacturonanas, constituído por uma cadeia principal de repetições de dissacarídeos (α -1,4-D-AGalp \rightarrow α -1,2-L-ramnopiranosil (Ramp)), onde os resíduos de Ramp podem ser substituídos por cadeias laterais de galactana β -(1 \rightarrow 4), arabinana ramificada e/ou arabinogalactana (VINCKEN et al., 2003). O domínio RG-II, diferentemente do RG-I, é uma região altamente conservada entre as plantas vasculares (MATSUNAGA et al., 2004; O'NEILL et al., 2004). É composto de uma cadeia principal de HG e quatro cadeias laterais poliméricas estruturalmente diferentes, consistindo em açúcares raros, como, por exemplo, apiose, 2-O-metil-L-fucose e 2-O-metil-D-xilose (YAPO, 2011).

As pectinas são polissacarídeos biodegradáveis, biocompatíveis e não-tóxicos que as tornam biomateriais de interesse para uma variedade de aplicações industriais, como na formulação de produtos farmacêuticos, cosméticos, nutracêuticos e em embalagens de alimentos (NAGGAR et al., 1992; SUNGTHONGJEEN et al., 1999). Por sua vez, as hemiceluloses têm sido utilizadas em revestimentos e aditivos na fabricação de papéis e como termoplásticos, além de aplicações farmacêuticas e cosméticas (FREDON et al., 2002; JAIN; SJÖSTEDT; GLASSER, 2000). Ambos os polímeros diferem em sua estrutura química e composição de acordo com as espécies vegetais das quais são originários, apresentando propriedades físico-químicas distintas (CHAN et al., 2017; SJÖSTRÖM, 1993). Essas diferenças podem afetar as propriedades funcionais desses polissacarídeos e, portanto, sua

caracterização em novas fontes fornece subsídios para melhorar os produtos existentes e/ou o desenvolvimento de novas aplicações.

A pectina está presente em um grande número de espécies vegetais, no entanto suas fontes são limitadas. As principais fontes comerciais são cascas de frutas cítricas, bagaço de maçã e polpa de beterraba-sacarina (beterraba branca) (NAQASH et al., 2017). Enquanto isso, hemiceluloses têm sido obtidas de diferentes resíduos agrícolas, como palha de trigo, hastes de milho e bagaço de cana-de-açúcar, entre outros que foram investigados para fins de produção de combustíveis, produtos químicos e materiais (SUN et al., 2004, 2005a; SVÄRD; BRÄNNVALL; EDLUND, 2015; XIAO; SUN; SUN, 2001). No entanto, outras espécies de plantas podem potencialmente ser exploradas para produzir esses polissacarídeos, especialmente a partir de resíduos industriais locais. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma espécie nativa do Brasil, cultivada em vários países tropicais para a produção de farinha e fécula. O processamento de suas raízes para a produção de fécula origina grandes quantidades de um resíduo sólido denominado bagaço. Essa biomassa residual não possui valor econômico e seu descarte inadequado pode causar problemas ambientais, além do desperdício de uma biomassa rica em amido e polissacarídeos com eventuais atividades biológicas (por exemplo) de interesse para a indústria.

Nesse sentido, a literatura científica registra alguns trabalhos que investigaram o bagaço de mandioca (BM) como fonte de nanofibras de celulose (LEITE; ZANON; MENEGALLI, 2017) e seu efeito prebiótico (BUSSOLO DE SOUZA et al., 2014), por exemplo. Entretanto, não há estudos prévios que caracterizem quimicamente as frações pécticas e hemicelulósicas dessa biomassa que, além de serem potencialmente uma nova fonte de obtenção desses polímeros, podem também elucidar suas características composicionais e estruturais. Diante desse cenário, a hipótese do presente trabalho é de que o BM possui frações de polissacarídeos com perfis qualitativos e/ou quantitativos que oscilam de acordo com as diferentes safras agrícolas. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente as frações da parede celular de pectina e hemicelulose do BM, a fim de identificar novos polissacarídeos com eventuais propriedades químicas de interesse para o desenvolvimento de produtos bionanotecnológicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e bagaço de mandioca (BM)

Todos os produtos químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico. O BM foi fornecido pela agroindústria Fecularia Machado localizada no sul do Brasil (29° 06' 50" S, 49° 37' 00" W, 15 m de altitude - cidade de Sombrio, Santa Catarina) e colhido nas safras 2014/2015 e 2015/2016. As amostras de BM foram levadas ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal no mesmo dia da coleta e secas em estufa com ventilação forçada a 45 °C, por 48 h. Após a secagem, as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.2 Caracterização do BM bruto

3.2.1 Composição centesimal

Os teores de fibra alimentar (solúvel e insolúvel - método AOAC 991.43), amido resistente (método AOAC 991.16), amido (método AOAC 996.11) e proteína total (total N x 6.25 - método AOAC 991.20) foram determinados seguindo as metodologias da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2005). Cinzas, lipídios, umidade e substâncias voláteis a 105 °C foram analisadas de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Os valores das variáveis descritas acima foram expressos em g/100 g de peso seco de BM.

3.2.2 Difração de raio-X (DRX) e índice de cristalinidade (IC)

Os difratogramas de raio-X das amostras foram obtidos em difratômetro de raios-X (X-ray Powder X`Pert PRO Multi-Purpose Pan Analytical, Holanda), junto ao Laboratório de Difração de Raios X, LDRX) da UFSC. As amostras foram escaneadas com radiação Cu K α ($\lambda= 1,5418\text{\AA}$), atuando na faixa angular 2θ de 4-50°. A variação 2θ foi empregada com um passo de 0,334° e intervalo de tempo de 10 s, operando em condições de 45 kV e 40 mA. O IC relativo foi determinado e adaptado conforme descrito por Hayakawa et al. (1997). As linhas de base da área total do difratograma, bem como dos picos cristalinos para o cálculo da integral das áreas amorfas e cristalinas, foram definidos utilizando o software *OriginPro8* SR4. O IC foi calculado usando a seguinte equação 1:

$$(1) IC(\%) = (Ac/(Ac + Aa))100$$

Onde IC (%) corresponde ao índice de cristalinidade, Ac é a área da região cristalina e Aa a área da região amorfa.

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras de bagaço e dos seus grânulos de amido residuais foi obtida por MEV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para tal, amostras (~10 mg, peso seco) foram depositadas em fita adesiva dupla face de carbono e transferidas para um suporte de alumínio (*stub*). Posteriormente, as amostras foram recobertas com uma camada fina de ouro, usando polarina E5001, e visualizadas (ampliações de 25, 130, 200, 500 e 1000X) em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV operando a 15 Kv.

3.2.4 Microscopia de luz (ML) - análises anatômicas e citoquímicas

Amostras da biomassa em estudo foram emblocadas com meio de inclusão para espécies em congelamento (Tissue-Tek®), a -25 °C, em micrótomo equipado com aparelho criostato (Leica modelo CM 1850 UV - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia - LAMEB). As secções (espessura de 5µm) foram dispostas em lâminas previamente gelatinizadas para análise citoquímica utilizando azul de toluidina (ATO, 0,25%, m/v) para detecção de polissacarídeos ácidos (Gordon & McCandless, 1973), azul brilhante de Coomassie (CBB) para identificação de proteínas (GAHAN, 1984), e lugol para coloração de grânulos de amido (Johansen, 1940). As seções foram montadas entre a lâmina e a lamínula com uma gota de água destilada. O material foi analisado e fotografado em microscópio de luz (Olympus BX41 - Japão).

3.3 Composição química das frações pecticas e hemicelulósicas da parede celular do BM

3.3.1 Extração de pectina e hemiceluloses

3.3.1.1 Remoção de amido

Amostras (50 g, peso seco) de BM foram adicionadas a 3V de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 90% (v/v) e incubadas a 25 °C/26 h, sob agitação. A biomassa foi posteriormente transferida a um banho-maria (40 °C/35 min) e centrifugada (4.000 rpm/10 min/25 °C) (MARASCHIN et al., 2000). O sobrenadante obtido, isto é, a fração de amido, foi descartada e o resíduo (R1) coletado, seco em estufa (50 °C-peso constante) e posteriormente pesado.

3.3.1.2 Extração de pectina

Ao R1 (40 e 37,49 g, safras 2014/2015 e 2015/2016, respectivamente), 3V de solução de oxalato de amônio (0,5%, w/v) foram adicionados e incubados por 2 h, a 60 °C. A biomassa foi centrifugada (4.000 rpm/10 min/25 °C), gerando o resíduo (R2) e o sobrenadante (S2 – fração pectica). R2 foi seco em estufa (50 °C) até peso constante, enquanto a S2 foram adicionados 3V de etanol (92,8 GL), seguido de incubação durante 3 dias, a 4 °C para formar um floculado pectico. O floculado foi recuperado por centrifugação (4.000 rpm / 10 min / 25 °C), adicionado com algumas gotas de acetona e armazenado a 8 °C para posterior análise (MARASCHIN et al., 2000).

3.3.1.3 Extração de hemicelulose

A extração das frações hemicelulósicas foi realizada de acordo com os protocolos de Selvedran, Stevens e O'Neill (1985) e Selvendran e O'Neill (1987), com modificações. Assim, 3V de hidróxido de potássio (KOH 1 M e 4 M) foram sequencialmente adicionados às frações R2 (35,16 e 33,88 g, safras 2014/2015 e 2015/2016, respectivamente), após incubação (48h/25 °C) e adição de 100 mg de boroidreto de sódio (NaBH₄) para recuperação total da fração hemicelulósica. A biomassa foi centrifugada (4.000 rpm/10 min/25 °C), gerando o resíduo (R3) que foi seco em estufa (50 °C, peso constante), sendo o sobrenadante (S3) coletado. Ao S3 adicionou-se ácido acético glacial até pH 5,25-5,36, seguido de incubação (4 °C, *overnight*), centrifugação (4000 rpm/10 min/25 °C) e recuperação do resíduo correspondente à fração hemicelulósica A. A essa fração foram adicionadas três gotas de acetona, seguido de armazenamento em geladeira, a 4 °C. Por sua vez, o sobrenadante foi adicionado de 3V de etanol (92,8 GL), incubado (4 °C, *overnight*) e centrifugado (4000 rpm / 10 min / 25 °C). O sobrenadante

foi descartado e o resíduo correspondente à fração hemicelulósica B foi coletado, adicionado de três gotas de acetona e armazenado (4 °C).

3.3.2 Hidrólise química das frações pécicas e hemicelulósicas A e B (1 M e 4 M)

Amostras (20 mg) das frações de interesse foram hidrolisadas com 750 µL de ácido trifluoroacético 2 M (TFA) em *vials* selados, a 100 °C/6 h. A reação foi bloqueada em banho de gelo (30 min) e o TFA removido em centrífuga a vácuo, conforme descrito por Maraschin et al. (2000).

3.3.3 Derivatização

Amostras (~10 mg) de cada fração hidrolisada foram convertidas aos seus persilil derivados pela adição de 0,1 ml de piridina e 0,1 ml de BSTFA [N, O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida, Sigma-Aldrich, MO - EUA], seguido de incubação a 70 °C/20 min, com agitação ocasional em vórtex (FONTANA et al., 1988). O mesmo procedimento foi realizado para os padrões analíticos (Sigma-Aldrich, MO - EUA), ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, D-galactose, D-glucose, D-manose, L-arabinose, L-fucose, L-ramnose, D-xilose e D-frutose.

3.3.4 Cromatografia gasosa (GC-FID)

Amostras (1 µl) dos persilil derivados foram injetadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC 2014), equipado com uma coluna capilar de vidro (Restek, 30 m x 0,25 mm ϕ interno e 0,25 µm de espessura), com um programa de temperatura de 2 min à 60°C, seguido de aquecimento à 17 °C/min a 280 °C, durante 10 min. As temperaturas do injetor e do detector (FID) foram de 180 °C e 300 °C, respectivamente, usando N₂ como gás carreador (20 Psi, 1,0 ml/min) e fenil- β -D-galactopiranosídeo (5 mg/ml) como padrão interno (MARASCHIN et al., 2000).

3.3.5 Análises de ácidos urônicos

O teor de ácido urônico foi determinado espectrofotometricamente, seguindo o protocolo de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), utilizando o ácido D-galacturônico como padrão.

3.3.6 Massa molecular da pectina

A massa molecular da fração pectica foi determinada por cromatografia por exclusão de alta eficiência (Infinity System, Agilent, CA, USA), acoplada a detector de índice de refração (30 °C) e um sistema de quatro colunas em série (PL-aquagel-OH - 60, 50, 40 e 30, 300 × 7.5 mm), conforme previamente descrito por Castro-Alves et al. (2016). Como fase móvel uma solução 0,1 M de NaNO₃/0,002% NaN₃ foi utilizada com fluxo de 0,7 ml/min, a 25 °C. Como padrões de massa molecular foram usadas dextrans (5–20000 kDa).

3.3.7 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)

A análise por espectroscopia FTIR das amostras de BM e das frações de pectina e hemicelulose A e B (1 M e 4 M) (~10 mg, peso seco), das safras 2014/2015 e 2015/2016, foi realizada em um espectrômetro Bruker IFS-55 (Modelo Opus v. 5.0, Bruker Biospin, Alemanha), equipado com um detector DGTS e sistema de reflexão única (ângulo de 45° de incidência) com acessório de atenuação da refletância total ATR (golden gate). Cinco espectros/amostra foram coletados em uma janela espectral de 4000 a 400 ondas.cm⁻¹, com resolução de 4 ondas.cm⁻¹. Os dados espectrais foram analisados utilizando o software Essential FTIR (v3.50.075), considerando a delimitação da janela espectral de interesse (3.000-600 ondas.cm⁻¹), a correção da linha de base, normalização e a otimização da relação sinal/ruído.

3.3.8 Espectroscopias de ¹H-RMN e ¹³C-RMN

As análises por espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C foram realizadas conforme previamente descrito por Maraschin et al. (2000). Para isso, amostras liofilizadas (~100 mg) das frações hemicelulósica 1M-A e pectica foram solubilizadas em 2 ml de DMSO-d₄ e D₂O respectivamente, seguido de centrifugação (4.000 rpm/15 min) e recuperação do sobrenadante para posterior análises de RMN de ¹H e ¹³C.

3.3.8.1 Determinação do grau de metil-esterificação (GM) da pectina

Utilizou-se a espectroscopia de ^1H -RMN para calcular o GM das amostras pécnicas, como previamente descrito por Grasdalen, Bakoy e Larsen (1988). O GM foi obtido a partir da equação 2:

$$(2) \text{GM}(\%) = (IA - IB/IA + IB)100$$

Onde GM (%) corresponde ao grau de metil-esterificação, IA refere-se à soma das intensidades dos sinais de ressonância de H-1 de todas as unidades de AGal esterificadas ($\sim \delta$ 4,94 ppm) ou não ($\sim \delta$ 5,12 ppm) e de H-5 de todas as unidades de AGal esterificadas ($\sim \delta$ 5,06 ppm), e IB refere-se à intensidade dos sinais de ressonância das unidades AGal de H-5 não esterificadas ($\sim \delta$ 4,91 ppm).

3.3.9 Análises estatísticas

A estatística descritiva foi apresentada na forma de média e desvio padrão. Aos dados com distribuição gaussiana aplicou-se teste t de Student ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o suporte dos programas de *Bioestat* (v. 5.3), *Excel* (Microsoft Office, 2016) e *GraphPad Prism* (v. 5.01).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização química do BM

4.1.1 Composição centesimal

A Tabela 1 mostra a composição centesimal do BM coletado nas duas safras em estudo. Embora seja uma biomassa residual oriunda do processo de extração de fécula, o conteúdo de amido detectado se mostra elevado, sugerindo a necessidade de melhorias na tecnologia adotada pela indústria para recuperá-lo a partir de raízes de mandioca.

Tabela 1- Composição centesimal (g/100 g peso seco) de bagaço de mandioca.

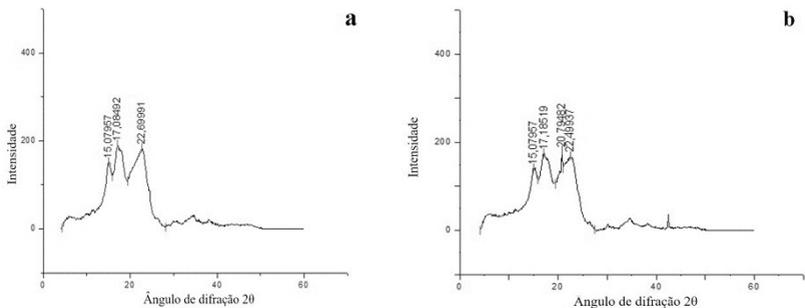
	<i>Safras</i>	
	<i>2014/2015</i>	<i>2015/2016</i>
<i>Lipídios</i>	<0,5	<0,5
<i>Proteínas</i>	1,70 ^b ±0,05	1,90 ^a ±0,01
<i>Amido</i>	45,20 ^b ±0,14	47,20 ^a ±0,20
<i>Cinzas</i>	1,90 ^b ± 0,02	2,10 ^a ± 0,02
<i>Umidade</i>	5,60 ^a ±0,04	4,80 ^b ±0,07
<i>Fibra solúvel</i>	3,00 ^b ±0,07	9,80 ^a ±1,06
<i>Fibra insolúvel</i>	35,60 ^a ±0,14	30,20 ^b ±1,63
<i>Amido resistente</i>	5,20 ^a ±0,14	0,10 ^b ±0,01

^{ab}Letras distintas sobrescritas comparadas horizontalmente denotam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras coletadas em diferentes safras (Teste *t* de Student - $P < 0,05$). Os valores estão expressos em média ± desvio padrão (n = 2, exceto cinzas e umidade onde n=3).

4.1.2 Difração de raio-X

Perfis de difratograma de raios-X semelhantes de BM foram detectados para as amostras das safras investigadas (Figura 1). A análise de DRX sugere que a biomassa apresenta uma estrutura semi-cristalina, devido a seus principais componentes amorfos como a lignina, hemicelulose, pectina, amilose e frações de celulose, bem como aqueles resultantes de seus componentes cristalinos, e.g., a amilopectina e a celulose. Esses resultados corroboram o observado por Edhirej et al. (2017).

Figura 1 - Difratograma de raio-X do bagaço de mandioca de amostras coletadas nas safras 2014/2015 (a) e 2015/2016 (b).



Os índices de cristalinidade (IC) foram de 24,26% e 21,24% para as amostras coletadas nas safras 2014/2015 e 2015/2016, respectivamente. Esses resultados assemelham-se ao observado por Edhirej et al. (2017), 22,5%, mas diferem daqueles encontrados por Leite et al. (2017), 46%, ambos em BM. Tais discrepâncias podem ser explicadas levando-se em consideração os conteúdos distintos dos componentes amorfos e cristalinos das raízes de mandioca processadas à extração de amido. Sabe-se que as agroindústrias processam as raízes de muitas cultivares de mandioca, de vários agricultores, e que essas plantas eventualmente crescem sob condições distintas de solo e clima. Tal cenário ajuda a explicar os valores contrastantes do IC reportados na literatura para a biomassa investigada. Além disso, de acordo com o objetivo industrial em usar as raízes de mandioca, tratamentos químicos

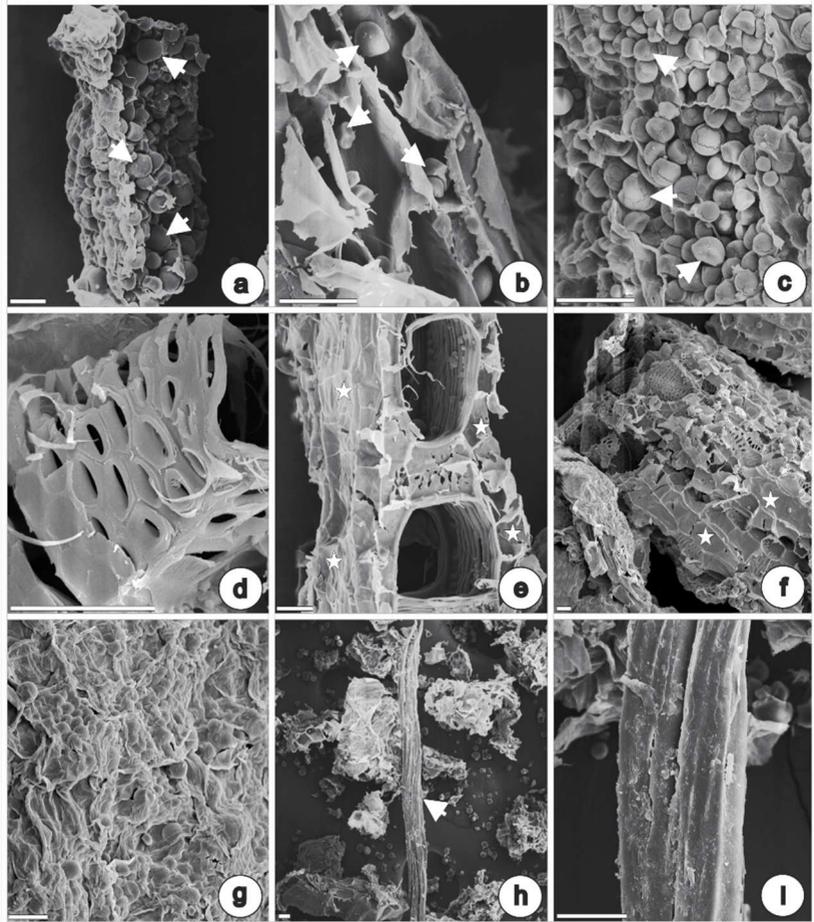
como a hidrólise ácida podem ser adotados para remover compostos amorfos, aumentando assim o IC (ELANTHIKKAL et al., 2010).

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A MEV foi utilizada para investigar a morfologia e a anatomia do BM. De maneira geral, essa biomassa residual é tipicamente caracterizada pela presença abundante de grânulos de amido, bem como tecidos parenquimático, esclerenquimático e elementos de vasos (Figura 2).

A raiz de mandioca é formada principalmente pelo xilema e, portanto, as estruturas visualizadas em MEV são aquelas que compõem os elementos de vaso, tecido parenquimático e células esclerenquimáticas (fibras). Assim, após o processamento do amido, a biomassa foi encontrada com tecidos e/ou células dispersas e desorganizadas em relação à estrutura original da raiz, sendo que alguns desses não puderam ser analisados em suas características anatômicas devido aos danos causados na agroindústria, ou mesmo na trituração das amostras em laboratório. Em decorrência da necessidade de expor o amido para aumentar a extração, o cisalhamento dos tecidos é inevitável.

Figura 2 - Micrografia eletrônica de varredura do bagaço de mandioca em estudo. **a-c.** Tecido parenquimático com grânulos de amido (seta). **d.** Detalhe de um elemento de vaso. **e-f.** Elementos de vaso com tecido parenquimático (estrelas). **g.** Detalhe dos grânulos de amido. **h.** Células esclerenquimáticas (seta). **i.** Detalhe das células esclerenquimáticas.



Escala: 25 μ m.

A análise anatômica permitiu observar células parenquimáticas com reserva de amido com grânulos praticamente intactos (Figura 2 a-c). Especula-se que tal fato possa explicar em alguma extensão os altos valores de conteúdos de amido encontrados no resíduo em estudo (Tabela 1), mesmo após um intenso processo industrial que visa única e exclusivamente extraí-lo. Cereda (1994) pondera que certas tecnologias usadas pelas fecularias para extrair o amido das raízes de mandioca contribuem para diminuir o rendimento de recuperação desse polissacarídeo.

Além de alguns grânulos de amido esparsos e fibras, isto é, células esclerenquimáticas (Figura 2 h-i) encontradas com menor frequência no BM, também foi possível visualizar elementos de vaso preservados (Figura 2 d-f). Esses resultados sugerem que a persistência de parênquima aderidos aos elementos de vaso resulta da resistência mecânica da parede celular secundária deste último, que mantém ambos unidos no xilema, ao contrário do tecido parenquimático do córtex que não possui tais estruturas.

De fato, os detalhes da morfologia da raiz intacta de *M. esculenta* demonstrados por Naconsie et al. (2016) e Medina et al. (2007) evidenciam o tamanho do parênquima do xilema que constitui o principal elemento de reserva e ocupa um grande espaço nas raízes, provavelmente originando essas estruturas parenquimáticas aderidas aos elementos de vaso. As células do parênquima cortical também acumulam grânulos de amido (MEDINA et al., 2007), mas pela ausência dos elementos de vaso sugere-se que elas se desfaçam mais facilmente entre o emaranhado de estruturas esparsas no BM.

4.1.4 Microscopia de luz

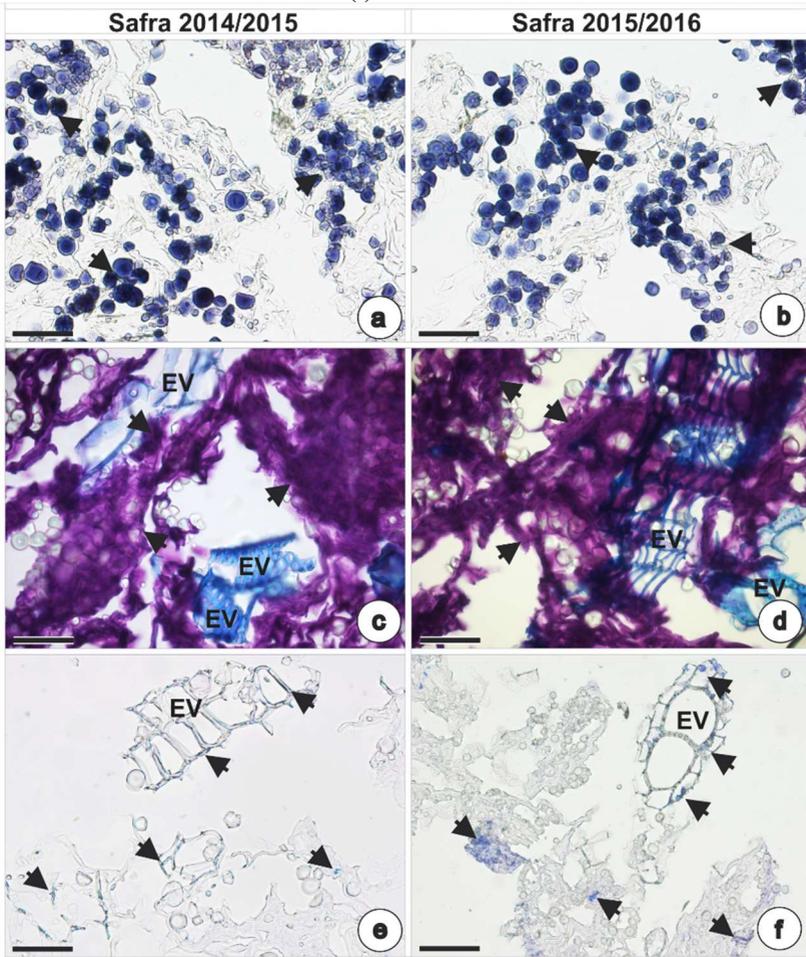
Paralelamente à análise de MEV, as características anatômicas do BM também foram estudadas usando protocolos citoquímicos e microscopia de luz. Numa primeira abordagem, o reagente lugol (Figura 3 a-b) foi usado para detectar grânulos de amido em amostras coletadas nas safras 2014/2015 e 2015/2016. Sugere-se que os grânulos de amido observados provêm do parênquima do xilema secundário e também do córtex, ainda que minoritariamente, como observado por Naconsie et al. (2016) em raízes de mandioca intacta e jovem (90 dias). De outra forma, na porção central, i.e., xilema primário, os grânulos de amido detectados foram menores, ou ainda ausentes.

As amostras também foram coradas com azul de toluidina (ATO) para estudar as estruturas dispersas do BM com base nas diferenças do

tipo de parede celular. Assim, células com paredes celulares secundárias, como as esclerenquimáticas e os elementos do vaso, reagem com o ATO manifestando uma coloração azul claro, evidenciando a presença de lignina. Por sua vez, as células com paredes primárias, como o tecido do parênquima, coradas com ATO, revelam uma coloração púrpura associada à presença de pectinas (Figura 3c-d) nas amostras das duas safras investigadas.

As raízes de mandioca são conhecidas por seu baixo conteúdo em proteínas e, conseqüentemente, as biomassas residuais analisadas para ambas as safras revelaram uma pequena quantidade dessas macromoléculas quando coradas com azul brilhante de Coomassie (Figura 3 e-f), corroborando com os resultados de sua composição química (Tabela 1).

Figura 3 - Fotomicrografias de secções do bagaço da raiz de mandioca de amostras coradas com Lugol (a, b), ATO (c, d) e CBB (e, f) - safra 2014/2015 (a, c, e) e da safra de 2015/2016 (b, d, f). **a-b.** Detalhe das células parenquimáticas com vasta presença de grânulos de amido em todas as amostras (setas); não se observam diferenças na distribuição desses grânulos entre as duas safras. **c-d.** Detalhe das paredes celulares das células parenquimáticas evidenciando a presença de pectinas em todas as amostras (setas); não se detectam diferenças na distribuição da pectina entre as duas safras. **e-f.** Detalhe das células parenquimáticas e dos elementos de vaso do xilema com presença de proteínas (setas), nota-se maior concentração de proteínas nas amostras da safra de 2015/2016 (f).



Legenda: EV- elemento de vaso. **Escala:** 50 μ m.

4.2 Composição química das frações pécnicas e hemicelulósicas da parede celular do BM

4.2.1 Rendimento de extração, massa molecular e CG-FID

O protocolo de extração adotado à recuperação dos polissacarídeos da parede celular revelou a pectina e a fração ácida da hemicelulose 1MA como os principais constituintes do BM, independentemente da safra amostrada (Tabela 2).

Tabela 2- Rendimento (%- peso seco) de frações de polissacarídeos extraídas de amostras de bagaço de mandioca coletadas nas safras 2014/2015 e 2015/2016.

<i>Frações</i>	<i>Safra 2014/2015</i>	<i>Safra 2015/2016</i>
<i>Pectina</i>	2,42	3,14
<i>1MA^a</i>	2,04	3,34
<i>1MB^a</i>	0,14	0,16
<i>4MA^a</i>	0,10	0,24
<i>4MB^a</i>	0,68	0,74

^aFrações de hemicelulose obtidas por extração alcalina: 1MA e 1MB (KOH 1 M, frações A e B) e 4MA e 4MB (KOH 4 M, frações A e B).

É importante salientar que o tratamento da biomassa residual (R4) com KOH 5 M produziu quantidades insignificantes de hemiceluloses da parede celular (dados não apresentados).

Adicionalmente, a análise cromatográfica revelou a existência de um único pico na fração pécnica com massa molecular de 13 kDa.

A análise de CG apresentou perfis quantitativos de monossacarídeos, que compõem as frações de pectina e hemiceluloses, mais propensos à variação quando comparados aos qualitativos analisados em cada safra (Tabela 3). Essa informação fornece subsídios para eventuais aplicações biotecnológicas desses polissacarídeos, uma vez que suas propriedades funcionais dependem principalmente de suas estruturas químicas.

Tabela 3- Concentração (mg/ml) e porcentagem (%) de monômeros detectados por análises em CG-FID em frações de polissacarídeos da parede celular do bagaço de *M. esculenta* Crantz.

Amostras	<i>Glu</i>	<i>Ram</i>	<i>Fuc</i>	<i>Xil</i>	<i>Ara</i>	<i>Man</i>	<i>Gal</i>	<i>AGal</i>	<i>Others</i>
<i>Pectina 2015^m</i>	0,49 ^a ± 0,08 (1,00)	0,01 ^b ± 0,001 (0,03)	0,30 ^b ± 0,02 (0,62)	0,14 ^b ± 0,005 (0,29)	0,92 ^a ± 0,12 (1,88)	3,70 ^b ± 0,25 (7,56)	13,89 ^a ± 0,93 (28,40)	18,33 ^a ± 1,63 (37,45)	22.8
<i>Pectina 2016^a</i>	0,29 ^a ± 0,04 (0,98)	1,66 ^a ± 0,13 (5,64)	1,21 ^a ± 0,09 (4,10)	0,38 ^a ± 0,02 (1,30)	0,64 ^a ± 0,04 (2,16)	5,42 ^a ± 0,43 (18,38)	3,50 ^b ± 0,23 (11,87)	3,75 ^b ± 0,31 (12,71)	48.5
<i>IMA 2015^m</i>	0,27 ± 0,12 (0,22)	0,26 ^b ± 0,001 (0,23)	n.d	n.d	0,13 ^b ± 0,002 (0,10)	10,08 ^a ± 0,003 (8,34)	n.d	43,07 ^a ± 0,34 (35,63)	55.71
<i>IMA 2016^a</i>	n.d	1,47 ^a ± 0,004 (3,57)	0,27 ± 0,12 (0,22)	n.d	0,35 ^a ± 0,001 (0,86)	8,56 ^b ± 0,07 (20,84)	n.d	8,65 ^b ± 0,06 (21,05)	56.1
<i>IMB 2015^m</i>	n.d	n.d	2,83 ^a ± 0,67 (4,40)	n.d	n.d	5,43 ^a ± 1,30 (11,23)	1,94 ± 1,03 (2,22)	1,82 ^b ± 0,39 (2,84)	74.47
<i>IMB 2016^a</i>	n.d	1,67 ± 0,07 (4,00)	2,83 ^a ± 0,67 (4,40)	n.d	0,52 ± 0,03 (1,24)	8,73 ^a ± 0,40 (20,95)	n.d	8,10 ^a ± 0,34 (19,45)	56.42
<i>4MA 2015^m</i>	n.d	0,06 ^a ± 0,004 (0,28)	0,51 ^a ± 0,01 (2,50)	n.d	n.d	1,72 ^a ± 0,03 (8,39)	7,1 ^a ± 0,17 (34,64)	7,56 ^a ± 0,27 (36,88)	17.59
<i>4MA 2016^a</i>	n.d	0,12 ^a ± 0,002 (1,86)	0,26 ^b ± 0,002 (4,22)	0,03 ± 0,0002 (0,54)	n.d	0,78 ^b ± 0,01 (12,70)	1,6 ^b ± 0,02 (25,86)	1,41 ^b ± 0,04 (22,84)	33.84
<i>4MB 2015^m</i>	n.d	n.d	0,30 ^a ± 0,13 (0,70)	n.d	n.d	5,28 ^a ± 0,78 (12,52)	4,47 ^b ± 0,14 (10,58)	3,70 ^b ± 0,01 (8,76)	67.44

<i>AMB 2016^a</i>	n.d	0,72 ± 0,01 (2,51)	0,42 ^a ± 0,006 (1,45)	0,28 ± 0,003 (0,98)	0,22 ± 0,016 (0,75)	4,99 ^a ± 0,13 (17,36)	5,67 ^a ± 0,31 (19,70)	6,63 ^a ± 0,13 (23,05)	36.71
-----------------------------	-----	-----------------------	-------------------------------------	------------------------	------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------------------------------------	-------

^{a,b}Letras distintas sobrescritas comparadas verticalmente denotam diferenças estatisticamente significativas entre os monômeros de cada fração (Teste *t* de Student, $P < 0,05$). Os valores estão expressos em média ± desvio padrão ($n = 2$). n.d = não detectado; Glu = D-glucose/TR (tempo de retenção-min) = 14,3min, Ram= L-Ramnose/TR=12,5min, Fuc = L-fucose/TR= 12,7min, Xil = D-xilose/TR= 13,0min, Ara = L-arabinose/TR= 12,30min-12,31min, Man = D-manose/TR= 13,7min, Gal = D-galactose/TR= 14,1min. e AGal = ácido D-galacturônico/TR= 14,6min. ^msafras 2014/2015 e ⁿ2015/2016.

A pectina da safra 2014/2015 apresentou o ácido D-galacturônico, D-galactose e D-manose, como primeiro, segundo e terceiro constituintes majoritários, respectivamente, sugerindo que o primeiro monômero esteja relacionado aos domínios HG, RG-I e RG-II da cadeia principal, enquanto a D-galactose e D-manose compõem principalmente as cadeias laterais de RG-I, formando galactanas e/ou combinações com outros monômeros identificados, e.g., D-arabinose. Além disso, a detecção de L-ramnose provavelmente está relacionada a formação das repetições de dissacarídeos α -(1 \rightarrow 2)-L-ramnose- α -(1 \rightarrow 4)-D-AGal presentes em RG-I (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Isso porque, os resíduos de L-ramnose podem representar mais de 30% da molécula de pectina e, desse total, estima-se que 50-78% esteja localizado no domínio RG-I (RENARD; CRÉPEAU; THIBAUT, 1995; RENARD; THIBAUT, 1996). Todavia, de encontro à literatura científica, a pectina dessa safra não apresenta mais de 6% de resíduos de L-ramnose, conforme pode ser visualizado na Tabela 3. Adicionalmente, e em menor extensão, a detecção de L-fucose pode estar relacionada principalmente à ligação de RG-II e açúcares raros.

Diferentemente do cenário anterior, a pectina da segunda safra apresentou D-manose, ácido D-galacturônico e D-galactose, nessa ordem respectivamente, como constituintes majoritários. Dessa forma, essa estrutura destoa não somente em relação a primeira, mas também em relação aos modelos descritos na literatura, que indicam as cadeias principais de pectina formadas, principalmente, por ácido D-galacturônico, sugerindo assim a necessidade de maior investigação, inclusive em novas safras a fim de comparação e confirmação de tipos distintos de pectina em *M. esculenta*.

As hemiceluloses são polissacarídeos muito distintos estruturalmente e em suas propriedades físico-químicas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). De fato, os resultados de CG analisados para as frações hemicelulósicas revelaram que os monossacarídeos majoritários são os mesmos, em geral ácido D-galacturônico e D-manose para as frações 1MA e 1MB e, para 4MA e 4MB, além desses monômeros citados também foi detectada a presença de D-galactose em todas as safras. No entanto, não foi possível confirmar um padrão de estrutura química para as frações desses biopolímeros pois, por exemplo, na fração 1MA a proporção entre AGal e D-manose é de aproximadamente ~4:1 na primeira safra, enquanto na segunda é de 1:1 (Tabela 3). Nas frações 4MB, por exemplo, na primeira safra a concentração de D-manose é maior, enquanto na segunda safra o AGal está em maior quantidade e a

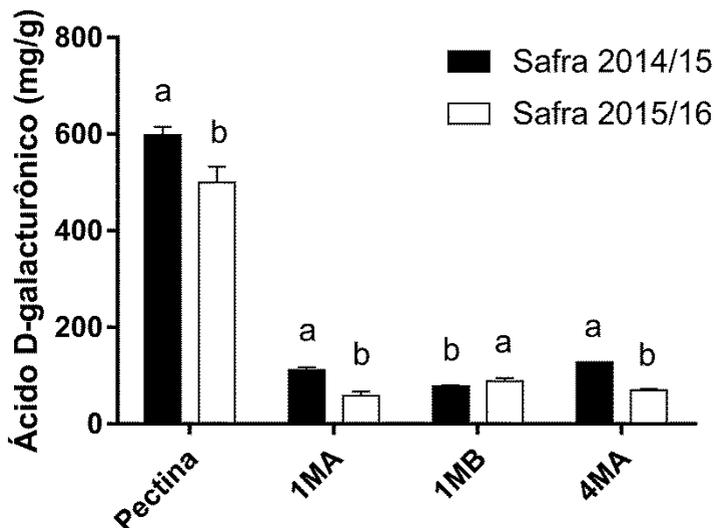
D-manose ocupa a terceira posição, indicando possivelmente a presença de diferentes estruturas de hemiceluloses em cada safra.

Adicionalmente, esses resultados sugerem padrões estruturais distintos daqueles relatados na literatura, onde xiloglucanas, xilanas, mananas, glucomananas e glucanas são os tipos de hemiceluloses comumente encontrados em plantas terrestres (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Assim, devido à falta de um padrão entre as frações nas diferentes safras estudadas, consequentemente não foi possível classificá-las e isso ocorre, pois a estrutura das hemiceluloses apresenta grande variação entre as espécies vegetais e o tipo de tecido (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Em conjunto, esses resultados demonstram o ineditismo sobre a caracterização desses polissacarídeos em amostras de raízes de *M. esculenta*.

4.2.2 Teor de ácidos urônicos

A análise por espectrofotometria UV-vis do conteúdo de ácidos urônicos (Figura 4), um dos principais constituintes em todas as frações analisadas, corroborou com os resultados dos perfis cromatográficos (CG-FID, Tabela 3), exceto pela fração de 4MB (resultados não conclusivos).

Figura 4 - Quantificação de ácido D-galacturônico de frações de pectina e hemiceluloses de parede celular de bagaço de mandioca obtidas por extração alcalina: 1MA e 1MB (A e B KOH 1 M) e 4MA (A KOH 4 M).



Os resultados estão representados em valores de média \pm desvio padrão (n=3).

4.2.3 Espectroscopia vibracional de infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)

A análise espectroscópica do FTIR permitiu obter um melhor entendimento sobre as estruturas químicas do BM e suas frações polissacarídicas da parede celular ao longo das safras estudadas. Além disso, foi possível detectar eventuais alterações na estrutura dos polímeros da parede celular após sua extração em relação ao bagaço.

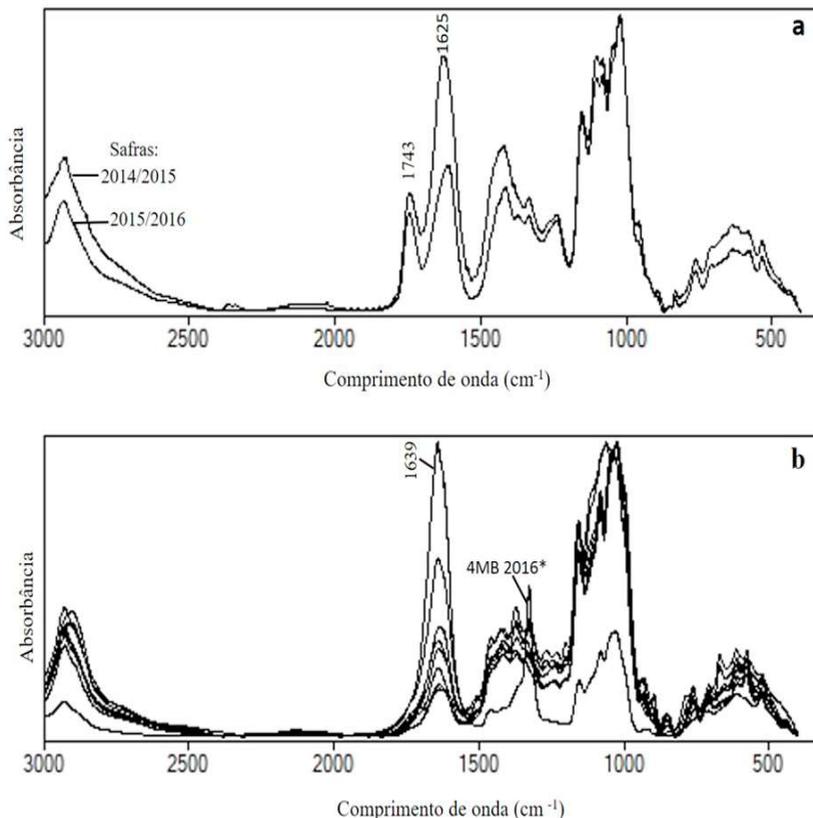
Os espectros de FTIR de pectinas (Figura 5) das safras em estudo apresentaram perfis químicos semelhantes. Bandas típicas correspondendo aos grupos carboxilas metil-esterificados ($-\text{COOCH}_3$) e não-esterificados ($-\text{COO}^-$) foram detectadas em $\sim 1742 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1625 \text{ cm}^{-1}$ (LOPES et al., 2017), respectivamente, e estão relacionadas as cadeias principais de galacturonanas que compõem as pectinas. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados nas análises cromatográficas, que evidenciaram o ácido D-galacturônico como um dos principais

constituintes para a maioria dos polissacarídeos da parede celular investigados.

Os polissacarídeos têm uma região de *fingerprint* na faixa de 1200-1000 cm^{-1} , onde as vibrações do anel se sobrepõem ao grupo lateral (C-OH) e à ligação glicosídica (C-O-C) (KACURÁKOVÁ et al., 2000). Por sua vez, os sinais em 1458-1419 cm^{-1} representam flexão ou alongamento em C-H e C-O (BRÍGIDA et al., 2010). Na região de *fingerprint* da pectina, as bandas foram detectadas em 1151 cm^{-1} , 1101 cm^{-1} e 1022 cm^{-1} , assim como em 1080 cm^{-1} e 1046 cm^{-1} , correspondendo às galactop e aos constituintes das arabinof, respectivamente (KACURÁKOVÁ et al., 2000).

Os espectros de FTIR das frações hemicelulósicas corroboraram com os resultados da análise cromatográfica, demonstrando que o efeito sazonal não alterou significativamente o perfil químico desses polímeros, com exceção da fração 4MB. Em geral, a fração 1MA diferiu apenas na segunda safra, com um sinal de 1701 cm^{-1} , correspondendo a grupos ácidos (SVÄRD; BRÄNNVALL; EDLUND, 2017). Enquanto a fração 4MA apresentou bandas em 1335 cm^{-1} , 1318 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} e, essas duas últimas reproduziram um sinal mais pronunciado e definido na segunda safra. O aumento do sinal em 1060 cm^{-1} pode estar relacionado à presença de D-xilose, conforme observado na Tabela 3. As bandas associadas àquela pentose geralmente ocorrem em $\sim 1043 \text{ cm}^{-1}$ (FERREIRA et al., 2001), no entanto, o espectro de um polissacarídeo é determinado pela composição da sua cadeia principal, mas também é fortemente influenciado pelos componentes da sua cadeia lateral (KACURÁKOVÁ et al., 2000), os quais podem deslocar aquela banda e, neste caso, em uma região de *fingerprint*.

Figura 5 - Espectros de FTIR de pectina (a) e de frações hemicelulósicas (1MA, 1MB, 4MA e 4MB) (b) de amostras de bagaço de mandioca coletadas nas safras (2014/2015 e 2015/2016).



*Refere-se à amostra B (KOH 4 M) da safra 2015/2016.

Por fim, o perfil espectroscópico de FTIR da hemicelulose 4MB (safra 2015/2016) diferiu dos demais (Figura 5), com destaque à região entre 1457 cm⁻¹ e 1203 cm⁻¹ e com o aumento do sinal em 1639 cm⁻¹, associado ao aumento de conteúdo de ácido D-galacturônico entre as primeira e segunda safra, conforme revelado pela análise cromatográfica (Tabela 3).

A literatura caracteriza as hemiceluloses de algumas espécies vegetais como xilanas lineares e ramificadas, com ligações β -(1 \rightarrow 4), como a glucuronoxilana e arabinoxilanas (KACURÁKOVÁ et al., 2000). No entanto, as frações hemicelulósicas aqui investigadas apresentaram teores muito baixos de D-xilose, sendo essa pentose detectada apenas nas frações 4MA e 4MB, da safra 2015/2016. Esse resultado é evidente na análise dos espectros de FTIR devido à ausência da banda a 1043 cm^{-1} , típica de polissacarídeos ricos em D-xilose (FERREIRA et al., 2001). De fato, as frações hemicelulósicas em estudo apresentaram o ácido D-galacturônico como um de seus principais constituintes, evidenciado pelas bandas entre 1633-1642 cm^{-1} atribuídas aos grupos carboxílicos não-esterificados ($-\text{COO}^-$) (LOPES et al., 2017) e aos sinais detectados em 1701 cm^{-1} , 1719 cm^{-1} e 1732 cm^{-1} em 1MA (safra 2015/2016), 4MA (ambas as safras) e 1MB (safra 2015/2016), respectivamente. Sugere-se que tais bandas estejam relacionadas aos grupos carboxila metil-esterificados encontrados em \sim 1749 cm^{-1} por Lopes et al. (2017), ou simplesmente a grupos ácidos em 1700 cm^{-1} , conforme descrito por Svärd, Brännvall e Edlund (2017).

Em geral, as frações pécicas e hemicelulósicas apresentaram sinais na faixa de 2917-2930 cm^{-1} atribuídos ao estiramento C-H dos grupos metoxi aromáticos e metileno (SUN et al., 2005b). Além disso, os picos em 1625-1639 cm^{-1} são indicativos da presença de grupos carboxílicos não-esterificados ($-\text{COO}^-$) característicos do ácido D-galacturônico que faz parte da cadeia principal de pectinas (LOPES et al., 2017) e não comumente encontrados em hemiceluloses, cujas cadeias principais são geralmente compostas por resíduos de D-xilose, D-glucose e D-manose (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Além disso, tem sido relatado que as dicotiledôneas têm predominantemente paredes celulares secundárias, com hemiceluloses compostas de cadeias laterais de ácido D-glucurônico, isto é, os glucuronoxilanas, que são polímeros com cadeias principais com unidades de D-xilose β -(1 \rightarrow 4) e resíduos de glucuronosil e 4-O-metilglucuronosil com ligação α -(1 \rightarrow 2) (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Entretanto, contrariando esses resultados, *M. esculenta* distinguiu-se em relação à estrutura química de suas hemiceluloses, conforme observado nas análises cromatográficas e espectroscópica (FTIR), aonde todas as frações apresentaram a banda em \sim 1639 cm^{-1} , corroborando a presença do ácido D-galactutônico como um dos componentes principais.

A banda em 1373 cm^{-1} não foi detectada nas frações pectínica e hemicelulósica 4MB (safra 2015/2016), sendo atribuída a unidades condensadas de siringila e guaiacila associadas à lignina (CAI et al.,

2010), demonstrando resquícios desse polímero que não foi eficientemente removido durante o processo de extração alcalina. Adicionalmente, bandas em $\sim 1245\text{ cm}^{-1}$, correspondentes aos grupos carboxila e vibrações de C-O, também foram observadas (FERREIRA et al., 2001), bem como a presença de cadeias laterais de arabinosil relacionadas ao sinal em 1154 cm^{-1} (VAZQUEZ et al., 1997).

O efeito safra também não promoveu alterações significativas nos perfis espectrais de FTIR das amostras de BM analisadas. Apenas dois sinais distintos, em 2360 e 2340 cm^{-1} (não identificados), apareceram na safra 2014/2015 e não foram detectados na segunda safra. Adicionalmente, a presença das bandas em 1079 e 1019 cm^{-1} podem estar relacionadas ao amido residual presente na biomassa antes do processo de extração com DMSO (DUFOUR, 2009).

A comparação dos perfis espectrais de FTIR do BM bruto e das frações pécnicas e hemicelulósicas permite visualizar claramente as distinções na região em $1750\text{-}930\text{ cm}^{-1}$, que inclui as janelas espectrais de *fingerprint* de polissacarídeos, sugerindo que o processo de extração para cada fração analisada foi eficiente.

4.2.4 Espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C

As espectroscopias de RMN de carbono 13 e hidrogênio foram aplicadas às frações pécnicas e a hemicelulose 1MA, as quais apresentaram os maiores rendimentos de extração nas safras em estudo. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram detectar sinais de correlação C/H (δ_{ppm}) da fração pécnica associados ao C1/H1 ($99,5/5,10\text{ ppm}$ e $100,0/4,96\text{ ppm}$) de resíduos de α -D-ácido galacturônico (AGalp) não esterificados e esterificados, respectivamente, C2/H2 ($68,2/3,76\text{ ppm}$), C3/H3 ($71,8/4,05\text{ ppm}$), C4/H4 ($78,7/4,46\text{ ppm}$) e C5/H5 ($70,6/4,92$ e $5,06\text{ ppm}$), estes últimos atribuídos a resíduos não esterificados e esterificados da cadeia principal com ligações α -(1 \rightarrow 4)-AGalp, respectivamente (CIPRIANI et al., 2009; PETERSEN et al., 2008). Além disso, a correlação de C6/H6 também pode ser identificada com sinais em δ $60,7/3,74\text{ ppm}$ (ALBUQUERQUE et al., 2014) e os sinais de C6 em δ $174,9$ e $173,6\text{ ppm}$ estão relacionados aos grupos carboxila das unidades de AGalp esterificado e não esterificado, respectivamente (MARCON et al., 2005).

Os espectros de RMN da pectina também apresentaram correlação C1/H1 com sinais das extremidades redutoras em δ $92,4/5,42\text{ ppm}$ [C1 – α -(AGalp)] e C1/H1 em δ $96,4/4,63\text{ ppm}$ [β -(AGalp)], e indicam pectinas de baixo peso molecular (PETERSEN et al., 2008) corroborando os dados

de massa molecular apresentados anteriormente. Adicionalmente, foi possível detectar ressonâncias em δ 53,0/3,79 ppm atribuídas ao grupamento carboxílico metil-esterificado do AGalp (KEENAN et al., 1985). E, além disso, o sinal de H em δ 3,67 ppm é atribuído aos prótons do grupo metoxila a partir de unidades esterificadas de AGalp (WINNING et al., 2007).

Confirmando os dados prévios das análises cromatográficas, foi possível detectar os sinais em δ 4,61 ppm (^1H), δ 73,1/3,71 ppm e δ 4,13 ppm (^1H), os quais foram atribuídos ao H1, C2/H2 e H4 do resíduo de D-galactose (Galp) das cadeias laterais da pectina formadas por ligações β -(1 \rightarrow 4) (DAVIS et al., 1990; NASCIMENTO; IACOMINI; CORDEIRO, 2016; TAMAKI et al., 2008). Além disso, as ressonâncias em δ 72,9/3,89 ppm e 3,74 ppm (^1H) foram atribuídas a C5/H5 e H6, respectivamente, do resíduo de α -D-Galp (ALBUQUERQUE et al., 2014).

O domínio RG-I da pectina consiste em uma cadeia principal de repetições de dissacarídeos α -(1 \rightarrow 2)-L-ramnose- α -(1 \rightarrow 4)-D-AGal (CAFFALL; MOHNEN, 2009). De fato, os resíduos de L-ramnose, detectados em baixa concentração via CG-FID, foram confirmados via espectroscopia de RMN por meio dos sinais dos prótons H1 em δ 5,34 e H2 3,54 ppm (RONDEAU-MOURO; BULÉON; LAHAYE, 2008) sugerindo a presença desse monômero em RG-I interceptando o ácido D-galacturônico desse domínio nas frações pécticas de *M. esculenta*. Além disso, a maioria dos resíduos desse monômero pode ser substituída na posição C-4 por cadeias laterais de açúcares neutros (MOHNEN, 2008), por exemplo, por cadeias laterais de β -(1 \rightarrow 4)-galactana, arabinana ramificada e/ou arabinogalactana (VINCKEN et al., 2003). Adicionalmente, também há possibilidade de substituição nas posições C-2 e C-3 e/ou C-4 por outros resíduos como a D-glucose, D-manose, L-fucose, D-xilose e ácido D-glucurônico ligados covalentemente às cadeias principais formando ramificações (VORAGEN et al., 2009).

Assim, nas regiões ramificadas, possivelmente a D-manose é constituinte das cadeias laterais que forma as manogalactanas, ao lado de outras ramificações como as galactanas, uma vez que a D-galactose se mostrou como um dos componentes majoritários nesse biopolímero, havendo outros açúcares neutros covalentemente ligados (L-arabinose, L-fucose, D-xilose e D-glucose, e.g.), porém em menor concentração.

Dessa forma, as ressonâncias $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ em δ 4,77 ppm (H1), 71,8/4,12 ppm (C2/H2), 3,80 ppm (H3), 3,84 ppm (H4), 76,9/3,55 ppm (C5/H5) e 3,95 ppm (H6) foram associadas aos resíduos de D-manose ligados em β -(1 \rightarrow 4). Destaca-se que os prótons H2, H3 e H6 possuem sinais idênticos àqueles associados aos carbonos correspondentes aos

monômeros ramificados e não-ramificados em *O*-6, não sendo possível distingui-los. De outra forma, as ressonâncias dos prótons H1 e H4, associados aos seus respectivos carbonos, permitiram sua identificação de forma associada à estrutura ramificada do biopolímero neste mesmo ponto (ALBUQUERQUE et al., 2014; RADJABI-NASSAB et al., 1984).

Em relação aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da fração hemicelulósica IMA, foram detectados sinais típicos do ácido D-galacturônico e D-manose, confirmando os resultados das análises cromatográfica e espectroscópica (FTIR). Sinais de correlação C/H foram encontrados em δ 100,1/5,11 ppm (C1/H1), 3,59 ppm (H3) e 3,88 ppm (H5) e associados aos resíduos de α -(1 \rightarrow 4)-AGalp (RONDEAU-MOURO; BULÉON; LAHAYE, 2008).

Adicionalmente, ligações β -(1 \rightarrow 4) de resíduos de D-manose com ramificações em *O*-6 foram identificadas com sinais δ 101,9 ppm (C1) e 74,06 ppm (C5) (ALBUQUERQUE et al., 2014). Além disso, as ressonâncias em δ 75,6 ppm (C5) e 71,6 ppm (C2) foram atribuídas aos resíduos de manose β -(1 \rightarrow 4) não ramificados (ALBUQUERQUE et al., 2014; RADJABI-NASSAB et al., 1984). Albuquerque et al. (2014) encontraram ressonâncias de C3 coincidentes para resíduos de D-manose ramificados e não ramificados. Como os espectros do presente estudo apresentaram sinais únicos de ^{13}C em δ 72,73 ppm (C3), para ambas as safras, não foi possível fazer essa distinção.

Além disso, apesar da pequena quantidade de L-arabinose na fração de hemicelulose IMA (Tabela 3), foi possível detectar uma ressonância em δ 78,8 ppm atribuída ao C3 de ligações α -(1 \rightarrow 5) de arabinanas (RONDEAU-MOURO; BULÉON; LAHAYE, 2008).

As pectinas podem ser parcialmente metil-esterificadas em CO_2H -6 e classificadas de acordo com o grau de metil-esterificação (GM). Pectinas com baixa metoxilação (BME) apresentam valores $<50\%$, enquanto aquelas altamente metoxiladas (AME) situam-se acima de 50% (LOPES et al., 2017). Assim, a espectroscopia de RMN de ^1H permitiu calcular a GM das frações pécticas, resultando em valores de 32,39% (safra 2014/2015) e 89,94% (safra 2015/2016), caracterizando-as como pectinas com BM e AM, respectivamente. É notável a discrepância dos valores de GM entre as frações de pectina coletadas nas safras estudadas. Especula-se que eventuais alterações edafoclimáticas ao longo das safras investigadas e também diferentes genótipos de mandioca, processados pela indústria à extração de amido contribuam à variação dos teores de ácido D-galacturônico nas amostras e, conseqüentemente, no GM observado.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou resultados inéditos referentes à caracterização da estrutura química das frações pectícas e hemicelulósicas majoritárias do BM, identificando o efeito de safra sobre essas variáveis, bem como demonstrando as peculiaridades desses biopolímeros de *M. esculenta* em relação a outras espécies vegetais já descritas na literatura.

Assim foi possível elucidar o domínio RG-I da pectina, extraída na primeira safra, dessa espécie confirmando que ele consiste em uma cadeia principal de repetições de dissacarídeos α -(1 \rightarrow 2)-L-ramnose- α -(1 \rightarrow 4)-D-AGal e com cadeias laterais de D-manose, D-galactose e possivelmente havendo outros açúcares neutros covalentemente ligados (L-arabinose, L-fucose, D-xilose e D-glucose, e.g.), porém em menor concentração. Entretanto, a amostra de pectina extraída na segunda safra apresentou resultados discrepantes da primeira e dos demais modelos descritos na literatura sugerindo mais estudos a fim de elucidar melhor essa estrutura.

Adicionalmente, na fração majoritária hemicelulósica 1MA por meio da espectroscopia de RMN foram detectados sinais típicos do ácido D-galacturônico e D-manose. Enquanto, os resultados de CG analisados para as demais frações hemicelulósicas revelaram que os monossacarídeos majoritários são os mesmos para a fração 1MB e, para 4MA e 4MB, além dos monômeros acima citados também foi detectada a presença de D-galactose em todas as safras. No entanto, não foi possível confirmar um padrão de estrutura química para as frações desses biopolímeros.

Dessa forma, esses resultados sugerem a necessidade de maior investigação, inclusive em novas safras a fim de comparação e confirmação de tipos distintos de pectinas e hemiceluloses em *M. esculenta*.

Contudo, essas informações fornecem suporte para futuras pesquisas sobre as propriedades funcionais das frações investigadas e suas eventuais aplicações nos setores biomédico, cosmético, farmacêutico e alimentício, por exemplo. Adicionalmente, o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas para esse resíduo agroindustrial fortalece a cadeia produtiva de *M. esculenta*, de modo a explorar e agregar valor a um subproduto agrícola, além de evitar a poluição ambiental com o descarte indevido dessa biomassa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (AOAC). **Official Methods of the AOAC International**. 18^a ed. Maryland: 2005].
- ALBERSHEIM, P. et al. An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls higher plants. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds.). **Pectins and pectinases**. [s.l.] Elsevier Science B.V, 1996. p. 47–55.
- ALBUQUERQUE, P. B. S. et al. **Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis***, 2014.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 484–489, 1973.
- BRÍGIDA, A. I. S. et al. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 832–838, 2010.
- BUSSOLO DE SOUZA, C. et al. Prebiotic effects of cassava bagasse in TNO's in vitro model of the colon in lean versus obese microbiota. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 210–220, 2014.
- CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 14, p. 1879–1900, 2009.
- CAI, Y. et al. Study of the structure and biosynthetic pathway of lignin in stone cells of pear. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 374–379, 2010.
- CASTRO-ALVES, V. C. et al. Polysaccharides from raw and cooked chayote modulate macrophage function. **Food Research International**, v. 81, p. 171–179, 2016.
- CEREDA, M. P. Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, M. P. (Ed.). **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: 1994. p. 11–50.
- CHAN, S. Y. et al. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 118–139, 2017.

- CIPRIANI, T. R. et al. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thrombosis Haemostasis**, v. 101, p. 860–866, 2009.
- DAVIS, E. A. et al. Isolation and an N.M.R. study of pectins from flax (*linum usitatissimum* L.). **Carbohydrate Research**, v. 197, p. 205–215, 1990.
- DUFOUR, É. Principles of Infrared Spectroscopy. In: SU, D.-W. (Ed.). **Infrared Spectroscopy for food quality analysis and control**. 1^a ed. Burlington, San Diego, London, New York: 2009. p. 1–27.
- EDHIREJ, A. et al. Cassava / sugar palm fiber reinforced cassava starch hybrid composites : Physical , thermal and structural properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 75–83, 2017.
- ELANTHIKKAL, S. et al. Cellulose microfibrils produced from banana plant wastes: Isolation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 852–859, 2010.
- FERREIRA, D. et al. Use of FT-IR spectroscopy to follow the effect of processing in cell wall polysaccharide extracts of a sun-dried pear. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 2, p. 175–182, 2001.
- FONTANA, J. D. et al. The 4-O-methyl- α -D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 560–571, 1988.
- FREDON, E. et al. Hydrophobic films from maize bran hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 1–12, 2002.
- GAHAN, P. B. **Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction**. London: Academic Press, 1984.
- GORDON, E. M.; MCCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. **Proceedings of Nova Scotia Institute of Science**, v. 27, p. 111–133, 1973.
- GRASDALEN, H.; BAKOY, O. E.; LARSEN, B. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-N.M.R Spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 183–191, 1988.

- HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of Pectin. **Plant Physiology**, v. 153, p. 384–395, 2010.
- HAYAKAWA, K. et al. Quality characteristics of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.): properties of starch gelatinization and retrogradation. **Cereal Chemistry**, v. 74, p. 576–580, 1997.
- IAL. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. In: **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 4ª ed. Brasília: 2005. p. 1018.
- JAIN, R. K.; SJÖSTEDT, M.; GLASSER, W. . Thermoplastic xylan derivatives with propylene oxide. **Cellulose**, v. 7, p. 319–336, 2000.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. New York ; London: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1940.
- KACURÁKOVÁ, M. et al. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 195–203, 2000.
- KEENAN, M. H. J. et al. A ¹³C NMR study of sugar-beet pectin. **Carbohydrate Research**, v. 138, p. 168–170, 1985.
- LEITE, A. L. M. P.; ZANON, C. D.; MENEGALLI, F. C. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from cassava root bagasse and peelings. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 962–970, 2017.
- LOPES, L. C. et al. Effect of low and high methoxyl citrus pectin on the properties of polypyrrole based electroactive hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 11–18, 2017.
- MARASCHIN, M. et al. Cell wall polysaccharides from *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) cultured cells: Extraction and chemical structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 1, p. 55–60, 2000.
- MARCON, M. V. et al. Pectins from apple pomace – Characterization by ¹³C and ¹H NMR spectroscopy. **Annual Magnetic Resonance**, v. 4, p. 56–63, 2005.
- MATSUNAGA, T. et al. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes: implications for the evolution of vascular plants. **Plant Physiology**, v. 134, p. 339–351, 2004.
- MEDINA, R. D. et al. In vitro cultured primary roots derived from stem

segments of cassava (*Manihot esculenta*) can behave like storage organs. **Annals of Botany**, v. 99, n. 3, p. 409–423, 2007.

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

NACONSIE, M. et al. Cassava root membrane proteome reveals activities during storage root maturation. **Journal of Plant Research**, v. 129, n. 1, p. 51–65, 2016.

NAGGAR, V. F. et al. Pectin, a possible matrix for oral sustained-release preparations of water-soluble drugs. **Pharma Sciences**, v. 2, n. 3, p. 227–234, 1992.

NAQASH, F. et al. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 227–239, 2017.

NASCIMENTO, G. E.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. A comparative study of mucilage and pulp polysaccharides from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, p. 278–283, 2016.

O'NEILL, M. A. et al. Rhamnogalacturonan II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 109–139, 2004.

PETERSEN, B. O. et al. Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy—assignment of reference compounds. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2830–2833, 2008.

RADJABI-NASSAB, F. et al. Further studies of the glucomannan from *Aloe vahombe* (liliaceae). II. Partial hydrolyses and NMR ¹³C studies. **Biochimie**, v. 66, p. 563–567, 1984.

RENARD, C. M. G. C.; CRÉPEAU, M. J.; THIBAUT, J. F. Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. **Carbohydrate Research**, v. 275, n. 1, p. 155–165, 1995.

RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J. F. Degradation of pectins in alkaline conditions: Kinetics of demethylation. **Carbohydrate Research**, v. 286, n. 0, p. 139–150, 1996.

RONDEAU-MOURO, C.; BULÉON, A.; LAHAYE, M. Caractérisation par RMN des biopolymères d'origine végétale, de la molécule à l'organisation supramoléculaire. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, n. 4–5, p. 370–379, 2008.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.

SELVENDRAN, R. R.; O'NEILL, M. A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. **Methods in Biochemical Analysis**, v. 32, p. 25–153, 1987.

SELVENDRAN, R.; STEVENS, B.; O'NEILL, M. Developments in the isolation and analysis of cell walls from edible plants. In: BRETT, C. T.; HILLMAN, J. R. (Eds.). **Biochemistry of plant cell walls**. London: [s.n.]. p. 39–78.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**. 2^a ed. [s.l], 1993.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195–204, 2004.

SUN, X. F. et al. Extraction and characterization of original lignin and hemicellulose from wheat straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 860–8/70, 2005a.

SUN, X. F. et al. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 860–870, 2005b.

SUNGTHONGJEEN, S. et al. Studies on Pectins as Potential Hydrogel Matrices for Controlled-Release Drug Delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 12, p. 1271–1276, 1999.

SVÄRD, A.; BRÄNNVALL, E.; EDLUND, U. Rapeseed straw as a renewable source of hemicelluloses: Extraction, characterization and film formation. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 179–186, 2015.

SVÄRD, A.; BRÄNNVALL, E.; EDLUND, U. Rapeseed straw polymeric hemicelluloses obtained by extraction methods based on severity factor. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 305–315, 2017.

TAMAKI, Y. et al. Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 352–361, 2008.

VAZQUEZ, G. et al. FTIR, H-1 and C-13 NMR characterization of acetosolv-solubilized pine and eucalyptus lignins. **Holzforschung**, v. 51, p. 158–166, 1997.

VINCKEN, J.-P. et al. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1781–1789, 2003.

VORAGEN, A. G. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263–275, 2009.

WINNING, H. et al. Quantification of the degree of blockiness in pectins using ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 256–266, 2007.

XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice husks. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, p. 307–319, 2001.

YAPO, B. M. Pectin rhamnogalacturonan II: on the “small stem with four branches” in the primary cell walls of plants. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

**CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS
REVESTIDAS COM PECTINA DE BAGAÇO DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz) CONTENDO β -CAROTENO PARA
APLICAÇÕES MUCOADESIVAS**

1. RESUMO

Nanopartículas (NP) revestidas com o polissacarídeo mucoadesivo de pectina (PC) de mandioca e contendo β -caroteno (BC) foram desenvolvidas visando a administração gastrointestinal desse nutracêutico. As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, utilizando diferentes tipos e concentrações de triglicerídeos de cadeia média, óleo de milho e surfactantes (Tween 20 e 80). As nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao tamanho, potencial zeta, índice de polidispersão (IPD), pH, morfologia e estabilidade física. O teor total e a eficiência de encapsulação (EE) do BC foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência e atividade antioxidante *in vitro* pelo método 2, 2'-difeníl-2-picril-hidrazil (DPPH). O ensaio de mucoadesão foi realizado utilizando mucina da glândula submaxilar bovina e a citotoxicidade determinada em células Caco-2 pelo método da sulforrodamina B. As nanopartículas revestidas com pectina foram preparadas com sucesso, conforme confirmado pelo aumento do tamanho dessas e da carga superficial negativa devido à natureza aniônica da pectina. As NP apresentaram forma esférica e distribuição monodispersa, com tamanho médio de 21,3 nm (IPD 0,29) para BC PC T80-NP (NP com Tween 80) e 261,4 nm (IPD 0,1) para BC PC T20-NP (NP com Tween 20). O BC foi encapsulado com sucesso, com teores de 530 e 324 $\mu\text{g/ml}$ para BC PC T80-NP e BC PC T20-NP, respectivamente, com EE elevada ($> 95\%$) e, aumento da sua capacidade antioxidante *in vitro* com EC_{50} de 0,080 e 0,074 mg/ml , respectivamente. Além disso, BC PC T80-NP não possui efeito citotóxico e, apenas as duas maiores concentrações de BC PC T20-NP e Branca PC T20-NP (nanopartícula sem BC) diminuíram significativamente a viabilidade das células Caco-2. No entanto, apenas o BC PC T20-NP foi estável ao longo de um período de armazenamento de 90 dias ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$), revelando também uma forte interação com a mucina. Os resultados sugerem que a NP BC PC T20 revestida com pectina é uma estratégia interessante à otimização da biodisponibilidade e permeação de nutracêuticos lipofílicos, tais como BC para administração via superfícies mucosas.

Palavras-chave: bagaço de mandioca; *Manihot esculenta* Crantz; nanopartículas; emulsificação espontânea; pectina; mucoadesão; β -caroteno; atividade antioxidante; *drug delivery system*; nutracêuticos lipofílicos

2. INTRODUÇÃO

Alimentos lipofílicos funcionais destacam-se por suas inúmeras vantagens na promoção da saúde humana devido à presença de compostos bioativos com importantes funções, e.g., antioxidantes, antiinflamatórios, antitumorais e na cicatrização de feridas. No entanto, esses ativos lipofílicos têm limitações na sua aplicação em sistemas alimentares devido à fraca solubilidade aquosa, baixa biodisponibilidade oral e fácil oxidação (EZHILARASI et al., 2013). Entre esses compostos, o β -caroteno (BC) é um pigmento encontrado em frutas e legumes, conferindo-lhes uma cor amarela ou alaranjada típica, como em cenouras, tangerinas e abóboras (SAINI; NILE; PARK, 2015).

O BC possui diversas atividades biológicas, dentre elas é o principal carotenoide com atividade pró-vitamina A (SAINI; NILE; PARK, 2015), apresentando também forte atividade antioxidante, eliminando radicais hidroxila e superóxido e, assim, evitando a peroxidação lipídica das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (BÖHM et al., 2002). Entretanto, apesar de sua importância à saúde humana, esse composto apresenta alguns obstáculos ao seu uso nutracêutico, tais como sua sensibilidade a altas temperaturas, metais pesados e a degradação pela oxidação pelo oxigênio singlete produzido quando exposto à luz (ACHIR et al., 2010). Além disso, BC é uma molécula hidrofóbica longa com alto ponto de fusão e, portanto, sua solubilidade em água, bem como a biodisponibilidade oral, é baixa. Portanto, essas características constituem obstáculos à sua incorporação em alimentos (RAO et al., 2013) e/ou ao desenvolvimento de novas formulações aquosas.

A fim de superar essas restrições, o uso de nano-carreadores tem sido apontado como uma estratégia interessante devido ao tamanho reduzido das partículas e à otimização da solubilidade aquosa dos compostos apolares (OEHLKE et al., 2014). Nesse contexto, o uso de nanopartículas (NP) revestidas com polissacarídeo com propriedades mucoadesivas tem sido considerado uma boa estratégia para aumentar o tempo de contato de compostos bioativos com membranas biológicas (por exemplo, superfícies mucosas), otimizando sua permeabilidade e biodisponibilidade (ROSE; VOYNOW, 2006).

Nos últimos anos, um interesse crescente em estudos que investigam polímeros mucoadesivos tem sido observado (BONI et al., 2018; CUI; QIAN; YIN, 2006; MAZZARINO et al., 2012) devido a capacidade daquelas macromoléculas de interagir com mucinas, que são glicoproteínas produzidas pelos tecidos da mucosa (PALAZZO et al., 2017). Biopolímeros, como as pectinas (PC), têm sido amplamente

utilizados em produtos de liberação controlada devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (SHIN; KIM; PARK, 2015). De fato, as PC têm sido adotadas à formulação de carreadores com liberação controlada de fármacos e/ou nutracêuticos devido às suas características de inocuidade, resistência à degradação por proteases e amilases e propriedades mucoadesivas (MARRAS-MARQUEZ; PEÑA; VEIGA-OCHOA, 2015). PC são abundantes na natureza, presentes na parede celular vegetal, mas com suas fontes comerciais limitadas principalmente ao bagaço de maçã e casca de frutas cítricas (CHAN et al., 2017; MARRAS-MARQUEZ; PEÑA; VEIGA-OCHOA, 2015).

Nesse contexto, a pesquisa e o desenvolvimento de NP de PC de outras fontes botânicas, que não as de cascas de citros e de bagaço de maçã, podem apresentar características funcionais distintas, sendo eventualmente atrativas à otimização da liberação controlada de compostos ativos. Assim, o bagaço de mandioca (BM - *Manihot esculenta* Crantz), um subproduto do processamento de raízes para a produção de amido, praticamente não tem valor econômico e é uma fonte de PC com propriedades ainda não investigadas em relação ao desenvolvimento de novos sistemas de transporte e liberação de fármacos e/ou nutracêuticos.

Até o momento, nenhum estudo sobre nanoformulações contendo PC extraída do BM foi relatado na literatura científica, para o melhor de nosso conhecimento. Assim, o desenvolvimento de NP revestidas com PC e contendo BC fornece subsídios ao entendimento de possíveis eventos de interações mucoadesivas desse polímero, assim como possibilita desenvolver novas estratégias à otimização do encapsulamento do BC, um nutracêutico com baixa biodisponibilidade e facilmente degradável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O BM foi obtido da agroindústria Fecularia Machado, localizada no município de Sombrio, Santa Catarina, a partir de raízes colhidas na safra 2014/2015. Polissorbato 80 (Tween 80) e polisorbato 20 (Tween 20) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A PIC Química (São Paulo, Brasil) gentilmente doou triacilglicerol caprílico/cáprico (Miglyol 812 N), um triglicerídeo de cadeia média (TCM), e o óleo de milho foi comprado em supermercado local. BC ($\geq 97\%$, grau HPLC) e 2, 2-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), enquanto metanol, acetonitrila e acetona (grau HPLC) foram

adquiridos da Tedia Company (Fairfield, OH). Os demais reagentes foram de grau analítico.

3.2 Extração de pectina

Conforme adaptado de Maraschin et al. (2000), 50 g de bagaço de mandioca (peso seco) foram pesados, adicionados de 3V de dimetil sulfóxido (DMSO 90%, v/v) e incubados a 25 °C/26 h, com agitação. Além disso, a biomassa foi incubada (banho-maria, 40 °C/35 min) e centrifugada (4.000 rpm/10 min/25 °C). O sobrenadante (fração S1 contendo amido) foi descartado e o resíduo (R1) coletado, seco em estufa (50 °C - peso constante) e pesado. Três volumes de solução de oxalato de amônio (0,5%, p/v) foram adicionados ao R1, após a incubação durante 2 h, a 60 °C. A biomassa foi centrifugada (4.000 rpm/10 min/25 °C) e ao sobrenadante, ou seja, a fração pectica, 3V de etanol (92,8 °GL) foram adicionados, seguido de incubação (3 dias, 4 °C) para obter a pectina floculada. O floculado foi recuperado por centrifugação (4.000 rpm/10 min/25 °C), liofilizado (24 h) e armazenado em freezer (-20 °C).

3.3 Desenvolvimento de nanopartículas

3.3.1 Estudo de otimização das condições

As nanoemulsões foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea. A fase oleosa composta por 0,1% (v/v) de BC, surfactante e óleo foi aquecida à aproximadamente 70-80 °C, sob agitação até a completa solubilização do caroteno (<5 min). Em seguida, a fase oleosa foi adicionada de fase aquosa (preparada simultaneamente e nas mesmas condições de tempo e temperatura de BC), sob agitação magnética. Para otimizar as condições de preparação, nanoemulsões contendo dois surfactantes (Tween 20 e 80) e concentrações (5, 10 e 20% m/v), e óleos como o triglicerídeo de cadeia média (TCM) (1, 5 e 10% p/v) e óleo de milho (10% p/v) foram preparados. A Tabela 1 ilustra as condições de preparação para as nanoemulsões desenvolvidas. Devido à fotoinstabilidade do BC, todas as formulações foram preparadas na ausência de luz.

3.3.2 Revestimento de nanopartículas com pectina

Foi preparada uma solução de PC em meio aquoso sob agitação *overnight*, seguido de filtração em suporte de celulose (14 μm , diâmetro de poro). As NP revestidas com PC foram preparadas pelo método de emulsificação espontânea, sob agitação magnética, utilizando as condições de preparação selecionadas no estudo de otimização de formulação (Tabela 1). Para isso, diferentes concentrações de PC (0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,2 e 0,5%, p/v) foram previamente solubilizadas na fase aquosa. Além disso, as NP revestidas com PC e sem BC (NP brancas) preparadas com os surfactantes Tween 80 e Tween 20 (Branca PC T80-NP e Branca PC T20-NP, respectivamente) foram obtidas sob as mesmas condições para efeitos de comparação.

3.4 Caracterização das nanopartículas

3.4.1 Medidas de tamanho de partícula e potencial zeta

Por meio da anemometria de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e laser Doppler, determinou-se o tamanho médio de partícula e o potencial zeta, respectivamente. As amostras foram diluídas em água ultrapura e as medidas realizadas a 25 °C. As análises de tamanho foram realizadas em um ângulo de espalhamento fixo (90°), enquanto para medir o potencial zeta (ζ) as amostras foram colocadas em células eletroforéticas com um potencial estabelecido em ± 150 mV. Assim, usando a equação de Smoluchowski, os valores potenciais foram calculados como valores médios da mobilidade eletroforética. Esses parâmetros foram obtidos utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

3.4.2 Morfologia das nanopartículas

A morfologia das nanopartículas foi determinada em microscópio eletrônico de transmissão (MET) Jeol JEM-1011 (Jeol Ltd., Tóquio, Japão). Nanopartículas não revestidas e revestidas com PC foram previamente diluídas (1: 10) em água ultrapura, depositadas em suportes (*grids*) de cobre revestidos com carbono em contato com a solução de contraste de acetato de uranila a 2% (m/v), durante 30 min.

3.5 Estudo de estabilidade

A avaliação da estabilidade física de nanopartículas revestidas com PC contendo BC foi realizada após o armazenamento de amostras em frascos de vidro âmbar a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 90 dias. Após 0, 7, 30 e 90 dias foram medidos o tamanho médio das partículas, o índice de polidispersão, o potencial zeta e o pH.

3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

3.6.1 Condições cromatográficas

As análises por CLAE foram realizadas em UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 RS Dual System (Thermo Fisher Scientific, São José, CA) equipado com uma coluna de fase reversa C18 (Supelco 15 cm x 4,6 mm, 5 μm) e pré-coluna (Sigma-Aldrich 2 cm x 4,0 mm, 5 μm) e detector de arranjo de diodos operando a 450 nm. A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90: 10, v/v) como fase móvel, com um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A quantificação do padrão de BC considerou sua solubilização em solução de clorofórmio e acetona (1: 1, v/v) e a construção de curva padrão (1,6 a 100 $\mu\text{g/ml}$, $y = 1,259x$, $r^2 = 0,99$), considerando a área de pico do analito a partir de três injeções consecutivas por amostra para cálculos de concentração.

3.6.2 Determinação do teor de BC

Para a quantificação de BC, 100 ml de suspensões de NP foram adicionados a 900 ml de acetona, seguido de agitação até completa solubilização e filtração para a remoção da PC, em suporte de celulose regenerada (RC-Vliesverstärkt - 0,2 μm). A verificação do eventual efeito de interferência dos compostos da formulação na análise considerou o preparo de NP brancas, i.e., sem conteúdo de BC, sob as mesmas condições experimentais. Após o preparo, alíquotas das soluções (10 μl) foram injetadas ($n = 3$) em cromatógrafo UHPLC (vide item 3.6.1). O teor de BC foi expresso em mg de BC/ml de NP. A concentração real de BC foi estimada comparando a quantidade total do composto na suspensão em relação àquela adicionada à formulação.

3.6.3 Determinação da eficiência de encapsulação

As suspensões de NP foram transferidas a dispositivos de filtro Amicon (100 kDa, Millipore Corp., Billerica, MA) para centrifugação (6.200 rpm, 30 min), de modo a separar o BC nanoencapsulado (retido pelo filtro) de sua forma livre (filtrada). O teor de BC livre foi determinado por análise cromatográfica, conforme descrito no item 3.6.1 Assim, a eficiência de encapsulação (EE) (%) foi determinada a partir da diferença entre os valores de concentração total de BC nas suspensões de NP após sua completa dissolução em acetona e a concentração do analito recuperada após o procedimento de ultrafiltração/centrifugação.

3.7 Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante do BC livre e das nanopartículas foi determinada utilizando o radical 2, 2-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) (KIM; GUO; PACKER, 2002). A partir de uma solução estoque de DPPH (7,9 mg de DPPH em 2,5 ml de metanol) diluída numa concentração de 1:100 (v/v), foi preparada uma solução de metanol a 80%. As amostras foram diluídas em diferentes concentrações (mg/ml) para BC PC T80-NP, BC PC T20-NP (em água) e BC (em clorofórmio/acetona 1: 1). Assim, uma amostra (10 µl) foi adicionada a 290 µl da solução diluída de DPPH e, após agitação, incubada por 30 min em temperatura ambiente e ausência de luminosidade. Após a incubação, a absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), a 530 nm. A solução de DPPH foi usada como controle negativo e a inibição percentual do radical DPPH foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Inibição DPPH (\%)} = \left(\frac{\text{abs. DPPH} - \text{abs. Amostra}}{\text{abs. DPPH}} \right) 100$$

Onde, *abs. DPPH* é a absorbância da solução de DPPH e *abs. Amostra* é a absorbância da amostra.

3.8 Interação mucina-nanopartículas revestidas com PC

A mucina da glândula submaxilar bovina (BSM) foi preparada na concentração de 250 µg/ml, em solução tampão de fosfato de sódio (0,2 M), pH 8. Diferentes concentrações de nanopartículas (1 a 40%, v/v) foram adicionadas a 2 ml da dispersão de mucina e mantidas sob agitação durante 15 min, à temperatura ambiente. Subsequentemente, o tamanho

médio das partículas dos agregados de NP-mucina foi medido utilizando um Zetasizer Nano ZS90.

3.9 Ensaio de citotoxicidade em células Caco-2

Células Caco-2, células de adenocarcinoma de cólon humano (#HTB-37), obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), foram cultivadas e mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo 4,5 g/L de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de L-glutamina. As células foram cultivadas em atmosfera umidificada e 5% de CO₂, a 37 °C até atingir 80-90% de confluência, inoculadas em placas de 96 poços (2,5 x 10⁴ células/poço) e incubadas durante 48 h. Em seguida, as células Caco-2 foram expostas aos tratamentos de BC livre e NP (T80-NP e T20-NP) por 6 h. Após a incubação, 100 µl de ácido tricloroacético a 10% (TCA) foram adicionados a cada poço para fixar as células durante 1h, a 4 °C. As placas foram então lavadas com água para remover o TCA e coradas com sulforrodamina B (SRB) durante 30 min. Subsequentemente, a placa foi lavada com ácido acético 1% (v/v) para remover a SRB não ligada (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). O corante ligado à proteína foi dissolvido em solução Tris-Base 10 mM (pH 10,5- 5 min), seguido da determinação das densidades ópticas a 510 nm em espectrofotômetro Spectra Max M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Essa metodologia também foi usada à determinação da concentração máxima de tetrahydrofurano (THF) utilizado para solubilizar o BC em meio de cultura.

3.10 Análises estatísticas

A estatística descritiva foi apresentada como média e desvio padrão. A análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett (P <0,05) foi aplicado aos dados com distribuição Gaussiana. As análises estatísticas foram realizadas com o suporte dos softwares Excel (Microsoft Office, 2016) e GraphPad Prism (v. 7.0).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento das nanopartículas

4.1.1 Otimização das condições

O desenvolvimento de nanoemulsões é uma estratégia promissora ao transporte e liberação de moléculas lipofílicas devido ao pequeno tamanho que confere a esses sistemas, estabilidade física e alta biodisponibilidade, características importantes requeridas por inúmeros produtos nas indústrias alimentícia e farmacêutica, por exemplo (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016). A produção de nanoemulsões pode ser feita a partir de técnicas de alta energia, como a homogeneização a alta pressão, que produz elevada força mecânica para romper a fase oleosa em pequenas gotículas (SOLANS; ISABEL, 2012). Alternativamente, por serem mais simples, mais baratos e mais eficientes energeticamente, uma vez que é necessária uma simples agitação, os métodos de emulsificação de baixa energia, como a emulsificação espontânea, ganharam considerável atenção em pesquisas nos últimos anos (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016; SOLANS; ISABEL, 2012).

A emulsificação espontânea ocorre quando dois líquidos imiscíveis se emulsificam sem qualquer ajuda externa, como energia elétrica ou mecânica (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016). Nos sistemas alimentares, devido à preocupação com a segurança, sabor e custo, é desejável evitar o uso de solventes. Assim, uma fase orgânica, contendo óleo e um surfactante hidrofílico, e uma fase aquosa, eventualmente contendo um co-surfactante, são comumente usados (ANTON; VANDAMME, 2009). A eficiência desse processo é função de diversos fatores, incluindo as condições de preparação, formulação, tipo e concentração de surfactante e óleo, entre outros (KOMAIKO; MCCLEMENTS, 2016).

Neste trabalho, nanoemulsões contendo BC foram obtidas pelo método de emulsificação espontânea sem a adição de solventes orgânicos e utilizando ingredientes de grau alimentício. Visando obter uma formulação adequada às nanoemulsões, adotaram-se diferentes condições de preparação variando o tipo e concentração de óleo (TCM ou óleo de milho) e surfactante (Tween 20 ou 80) como pode ser visto na Tabela 1. As 14 formulações desenvolvidas apresentaram colorações amarelas e alaranjadas, variando de translúcido a aspecto leitoso. Curiosamente, todas as formulações preparadas com óleo de milho apresentaram separação de fases. Com base nesse resultado, nanoemulsões preparadas

com óleo TCM em diferentes concentrações foram escolhidas para as avaliações posteriores. Chang, McLandsborough e McClements (2013) relataram que a substituição de TCM por carreadores de triglicerídeos de cadeia longa (TCL), como em óleos de milho e canola, não formaram nanoemulsões estáveis por razões ainda não bem compreendidas. Segundo esses autores, possivelmente as discrepâncias moleculares entre TCM e TCL, como tamanho de cadeia e saturação, podem ter afetado as propriedades físico-químicas (e.g., viscosidade, tensão interfacial, comportamento de fase ou curvatura ótima) que determinam a formação de emulsões espontâneas.

A Tabela 2 apresenta os resultados do tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta das nanoemulsões obtidas (aquelas que não permaneceram homogêneas após a preparação não foram mensuradas). Algumas formulações apresentaram separação de fases ou precipitados de BC, enquanto outras (F6 e F10), inicialmente homogêneas, tornaram-se instáveis após alguns dias de armazenamento. No entanto, aquelas que permaneceram homogêneas foram avaliadas e todas apresentaram um IPD $<0,26$, confirmando a monodispersão das nanoemulsões.

Tabela 2 - Tamanho médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões desenvolvidas para otimização da formulação.

Parâmetros	F2	F6	F11	F12	F14
Tamanho de partícula (nm)	54,2 ± 0,56	180,5 ± 6,45	88,5 ± 1,25	16,1 ± 0,31	132,0 ± 3,77
Índice de polidispersão	0,164 ± 0,018	0,259 ± 0,017	0,224 ± 0,030	0,142 ± 0,022	0,164 ± 0,004
Potencial zeta (mV)	-12,0 ± 1,04	-15,2 ± 0,44	-15,8 ± 1,45	-7,3 ± 0,84	-18,0 ± 2,54

Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n = 3).

Outro fator na composição do sistema nanoparticulado que pode influenciar a formação de emulsões espontâneas é a carga superficial das partículas. Valores altos de zeta potencial (>30 mV) são bons indicadores de estabilidade dos sistemas, uma vez que gotículas com maior carga superficial aumentam a repulsão eletrostática entre as gotículas de óleo da nanoemulsão, impedindo a agregação e a desestabilização (JIN et al., 2018; VALLAR et al., 1999). Baixos valores de potencial zeta foram observados para todas as formulações, isto é, $-7,3$ a $-18,0$ mV, provavelmente resultantes da estabilização de gotículas de TCM com BC por surfactantes não iônicos como o Tween 20 e 80 (CHANAMAI; HORN; MCCLEMENTS, 2002; STRICKLEY, 2004). Curiosamente, apesar dessa natureza não iônica, os valores negativos de potencial zeta detectados podem ser atribuídos à impurezas aniônicas presentes nos surfactantes, como por exemplo, ácidos graxos que conferem cargas superficiais negativas às partículas (WU et al., 2017). Nesse caso, a estabilização física promovida por esses surfactantes não iônicos ocorreu pelo mecanismo estérico e não eletrostático, por meio da adsorção da interface óleo-água, o que reduz a tensão interfacial e melhora a proteção da gota de agregação (BAI et al., 2016; KRSTONOŠIĆ et al., 2009).

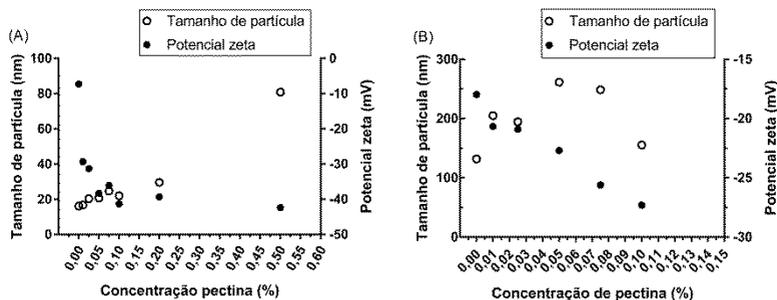
Entre as formulações obtidas, F12 e F14 possuem as mesmas concentrações de todos os componentes, diferindo apenas no tipo de surfactantes (isto é, Tween) utilizados. A formulação F12 apresentou um tamanho de partícula micelar (16,1 nm), demonstrando que o Tween 80 teve uma influência direta nessa variável, comparativamente à formulação F14, preparada com Tween 20 (tamanho de partícula = 132,0 nm). Tween 80 já foi relatado formar gotículas menores que o Tween 20 devido a diferenças de geometrias moleculares. Isso pode ser atribuído ao fato de que o Tween 80 possui uma única cauda hidrofóbica insaturada que é dobrada, enquanto o Tween 20 tem uma única cauda hidrofóbica saturada linear (CHANG; MCLANDBOROUGH; MCCLEMENTS, 2013; GUTTOFF; SABERI; MCCLEMENTS, 2015). Com base nessas propriedades físico-químicas e levando em consideração as concentrações mais baixas de óleo e surfactante requeridos, foram selecionadas as formulações contendo TCM a 1% e Tween 80 a 5% (F12) ou Tween 20 (F14) para preparação de NP revestidas com PC.

4.1.2 Revestimento das nanopartículas com pectina

As concentrações de PC de 0,01 a 0,5% (p/v) foram testadas mantendo, no entanto, todas as outras condições de preparação (Tabela 1) utilizadas para as formulações F12 e F14. Os resultados mostraram que o

tamanho de partícula e o potencial zeta das suspensões de NP dependem da concentração de PC, como mostrado nas Figuras 1a e 1b. Aumentos de concentração de PC causaram incrementos nos valores do potencial zeta, um efeito também relacionado aos baixos valores de carga superficial observados nas nanoemulsões não revestidas com o biopolímero (Tabela 2), o que confirma o revestimento das NP com PC nas formulações desenvolvidas. NP preparadas com Tween 80 e diferentes concentrações de PC apresentaram valores de potencial zeta entre -29,3 mV a -42,4 mV, enquanto valores menores (-20,7 mV a -27,3 mV) foram obtidos com Tween 20. Assim, é possível inferir a existência de discrepâncias entre as interações PC-Tween 80 e PC-Tween 20, uma vez que parece haver uma adsorção mais forte do biopolímero ao primeiro surfactante. Esse aumento na carga superficial ocorre devido à natureza aniônica da PC adsorvida na interface óleo-água, contribuindo com forças eletrostáticas e repulsão estérica que aumentam a estabilidade das NP (CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006).

Figura 1 - Tamanho de partícula e potencial zeta das nanopartículas preparadas com Tween 80 (A) e Tween 20 (B), de acordo com as concentrações de pectina



Outra característica relevante da PC em termos de estabilidade é a sua estrutura química. Algumas pesquisas associaram a presença dos grupos acetil e metil à atividade interfacial da PC em nanoemulsões, levando a uma consequente estabilização do sistema. Em estudos anteriores, a PC extraída e utilizada na presente investigação teve seu grau de metil-esterificação (GM) determinado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) apresentando um valor de 32,39% e caracterizando-a como uma pectina de baixa metoxilação (BME). Dentre as frações pécicas anteriormente estudadas essa fração foi a escolhida

para o desenvolvimento das NP por ser formada majoritariamente por ácido D-galacturônico, pela sua BME a qual a torna uma molécula mais hidrofílica e, conseqüentemente, devido ao aumento do número de cargas, é também mais reativa. Schmidt et al. (2015) observaram uma relação direta entre o GM e a capacidade de emulsão de pectina cítrica, aumentando o GM de ~ 70% para ~ 80%. Entretanto, outros autores investigaram pectina cítrica com GM variando de 22 a 73% e inferiram que o teor de ésteres metílicos possui pouca importância na capacidade de emulsificação desse polissacarídeo (AKHTAR et al., 2002).

No entanto, apesar de seu caráter anfifílico, a PC do BM apresenta um caráter hidrofílico mais pronunciado, quando comparada a similares metoxilados devido a maior disponibilidade de grupos hidroxila em sua molécula, que interagem com as porções polares (por exemplo, grupamentos -OH) das moléculas de surfactante por meio de ligações de hidrogênio. Assim, sugere-se que tais interações podem ser responsáveis pelo aumento do tamanho de partícula conforme aumenta a concentração de PC nas formulações. Na Figura 1a é possível observar que o sistema contendo PC-Tween 80 apresentou discreto aumento no tamanho das partículas para a primeira concentração desse biopolímero e uma maior variação nas concentrações de 0,2 a 0,5%. Por sua vez, os resultados encontrados para o sistema de nanopartículas PC-Tween 20 (Figura 2b) revelam que, em geral, foi observado um aumento no tamanho das partículas até a concentração de 0,075%. Em concentrações mais elevadas, i.e. > 0,1% não foi possível a mensuração dada à instabilidade dos sistemas após a preparação. Isso provavelmente ocorreu devido a uma adsorção mais fraca entre o sistema PC-Tween 20, em comparação ao sistema PC-Tween 80, como indicado pelos valores de potencial zeta discutidos acima. Portanto, há concentrações ótimas de PC que são de interesse para estabilizar o sistema, sendo que valores acima desse limite causam separação de fases, ou ainda precipitação como observado para a formulação com Tween 20.

Adicionalmente, ressalta-se que, além das diferenças na geometria molecular, os surfactantes também apresentam um balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) distinto. Esse sistema classifica os surfactantes hidrofílicos como tendo altos valores de BHL (> 10), enquanto os surfactantes lipofílicos mostram valores abaixo de 10 (MACEDO et al., 2006). Os valores de BHL de Tween 80 e 20 são de 15,0 e 16,7, respectivamente, e embora ambos sejam classificados como hidrofílicos, essas diferenças também podem influenciar as interações com moléculas de PC (CHANG; MCCLEMENTS, 2014). Tais valores de BHL são

relevantes, porque são suficientemente altos para que esses surfactantes sejam hidrofílicos, mas não a ponto de serem insolúveis na fase orgânica.

Vários estudos têm apontado a PC como um excelente estabilizador para os hidrocoloides alimentares, como as nanoemulsões (DUTTA; SAHU, 2012). Uma das características interessantes desse biopolímero é o seu caráter anfifílico, que ajuda a reduzir a tensão interfacial entre o óleo e a fase aquosa, melhorando a estabilidade das nanopartículas (GUERRA-ROSAS et al., 2016). Outra característica relevante do uso de PC no desenvolvimento de nanoemulsões é sua viscosidade. O aumento desse polímero aumenta a viscosidade da fase aquosa e, portanto, a estabilização do sistema, uma vez que diminui o movimento gravitacional das gotículas de óleo retardando ou evitando a coalescência (GUERRA-ROSAS et al., 2016). Além disso, a PC é um biopolímero não tóxico regulado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), como GRAS (*generally recognized as safe*- geralmente reconhecido como seguro) (FDA, 2018) tornando-se um componente de interesse para o desenvolvimento de nanoemulsões destinadas ao uso humano.

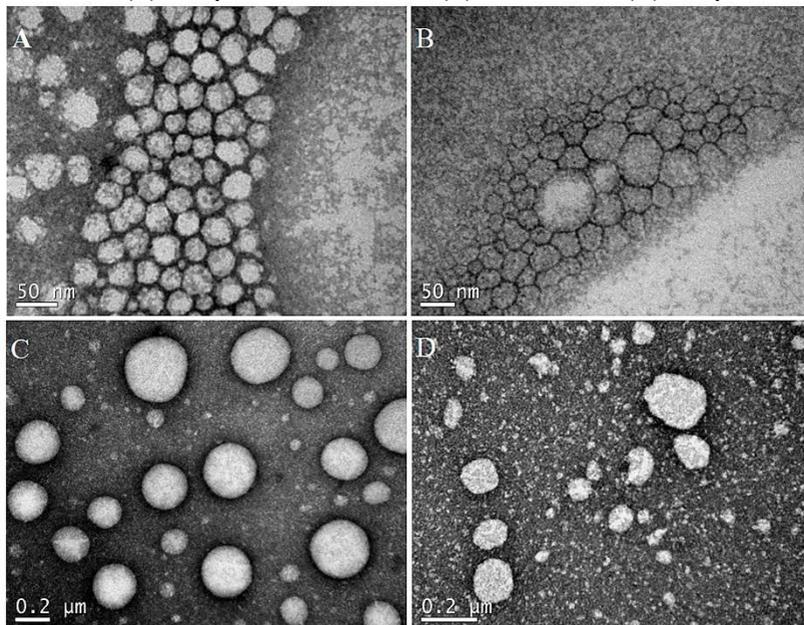
Nas concentrações de PC testadas, o IPD da formulação contendo Tween 80 variou de 0,26 a 0,60. As maiores concentrações de PC (0,1%) das NP proporcionaram um sistema polidisperso ($> 0,3$), com exceção de 0,025%, que apresentou um IPD de 0,32. Por outro lado, NP preparadas com Tween 20 apresentaram valores de IPD entre 0,09 e 0,14, confirmando a distribuição monodispersa de partículas para todas as concentrações de PC. Assim, com base em suas propriedades físico-químicas, as formulações com Tween 80 e Tween 20, ambas com 0,05% de PC, foram selecionadas às próximas análises e caracterizações, sendo doravante denominadas BC PC T80-NP (nanopartículas com BC, pectina e Tween 80) e BC PC T20-NP (nanopartículas com BC, pectina e Tween 20), respectivamente.

4.2 Caracterização das nanopartículas

4.2.1 Morfologia

As imagens de MET (Figura 2) exibem a forma esférica e mais regular das NP revestidas com PC (BC PC T80-NP e BC PC T20-NP), em contraste àquelas sem o biopolímero (BC T80-NP e BC T20-NP). Além disso, a MET exibiu um tamanho médio de partícula semelhante ao obtido pelos estudos de DLS.

Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão de BC PC T80-NP (A) e BC PC T20-NP (C) com pectina e BC T80-NP (B) e BC T20-NP (D) sem pectina.

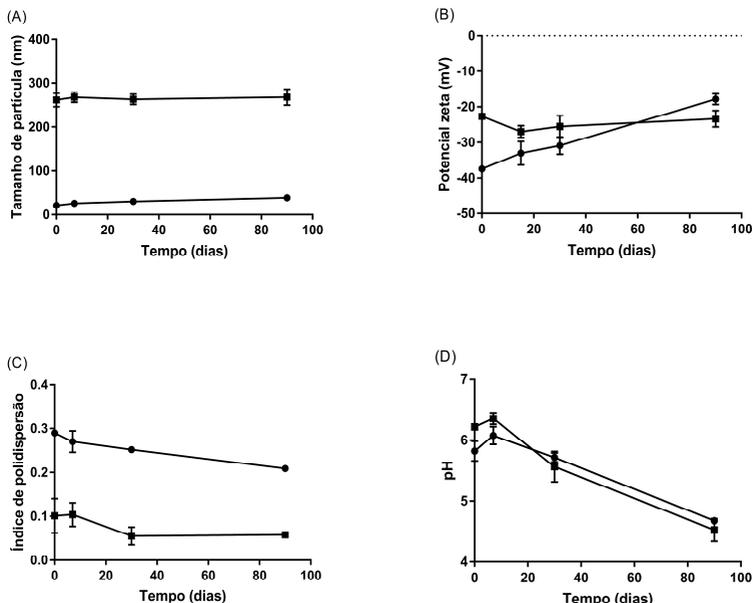


4.2.2 Estudo de estabilidade

Estudos de estabilidade de NP revestidas com PC foram realizados após o armazenamento das amostras em frascos de vidro âmbar, a 4 °C, durante 90 dias. Todas as NP mantiveram aparência homogênea durante o período de estudo. No entanto, a perda gradual de cor (laranja e amarelo até quase incolor) foi observada para as formulações BC PC T80-NP e BC PC T20-NP, indicando uma degradação parcial de BC. Conforme pode ser visualizado na Figura 3, a formulação BC PC T20-NP manteve a distribuição monodispersa das partículas sem alterações significativas no tamanho das partículas e nos valores de potencial zeta. Entretanto, a formulação BC PC T80-NP mostrou uma diminuição significativa nos valores de potencial zeta (-37,4 a -17,9 mV), reduzindo as forças repulsivas entre as gotículas de óleo, culminando com sua coalescência e gerando um aumento no tamanho das partículas, com valores entre 21,3 a 38,5 mV, indicando baixa estabilidade do sistema coloidal. Além disso, ambas as formulações exibiram reduções significativas entre os valores

inicial e final do pH, por exemplo, de 5,8 a 4,7 e de 6,2 a 4,5 para BC PC T80-NP e BC PC T20-NP, respectivamente.

Figura 3 - Estudo de estabilidade das nanopartículas BC PC T80-NP (●) e BC PC T20-NP (■). Tamanho de partícula (A), potencial zeta (B), índice de polidispersão (C), e pH (D) das nanopartículas armazenadas por 90 dias, a 4 °C.



Os dados estão representados em valores de média \pm desvio padrão ($n=3$).

4.3 Concentração de β -caroteno e eficiência de encapsulação

O BC é um dos nutrientes essenciais na dieta humana, responsável por múltiplas funções fisiológicas e, entre os carotenoides, tem a maior atividade pró-vitamina A (BOON et al., 2010). Assim, o desenvolvimento de NP capazes de encapsular, proteger e liberar nutracêuticos lipofílicos é relevante devido aos seus benefícios à saúde humana e, ao mesmo tempo, um desafio devido à natureza hidrofóbica desses compostos. Alguns solventes apolares promovem a solubilização do BC, no entanto, alguns estudos demonstraram a solubilização desse composto em óleo comestível, a 50-60 °C, por 5 ou 10 min (LUO et al., 2017; QIAN et al.,

2012). Para o desenvolvimento de NP isentas de solventes neste trabalho, foram realizados diversos testes com óleo de milho e TCM utilizando diferentes tempos e temperaturas à solubilização do BC (temperatura ambiente, 60 °C e 70-80 °C). No entanto, foi necessária a adição de um surfactante (Tween 20 ou 80) para a completa solubilização do BC, que ocorreu apenas sob aquecimento a 70-80 °C, por aproximadamente 5 min.

Na Tabela 3 é possível observar a concentração total de BC nas nanoformulações, que variaram de 324 a 530 µg/ml para BC PC T20-NP e BC PC T80-NP, respectivamente. Uma redução da quantidade total de BC em relação ao inicial adicionado (1 mg/ml) pode ser resultado da sua degradação durante o aquecimento no processo de solubilização. Essa diferença no teor total de BC para as NP revestidas de PC possivelmente ocorreu devido às características dos surfactantes utilizados nas formulações e que afetam diretamente o tamanho das partículas e suas interações com o biopolímero, sugerindo assim uma maior ou menor eficiência na proteção do bioativo. Como discutido acima, a PC tem uma adsorção mais forte à superfície das micelas envolvidas pelo Tween 80 e, além disso, o valor de BHL desse surfactante é menor que o observado para o Tween 20, influenciando diretamente na formação de emulsões envolvendo o BC, fato que provavelmente explica os teores mais altos para BC PC T80-NP. Além disso, a eficiência de encapsulação (EE) para ambas as formulações foi superior a 95% (Tabela 3), provavelmente devido à baixa solubilidade do BC na fase aquosa externa das suspensões de NP. Isso demonstra que as propriedades físico-químicas e o design do sistema de NP desenvolvido foram adequados no encapsulamento do BC.

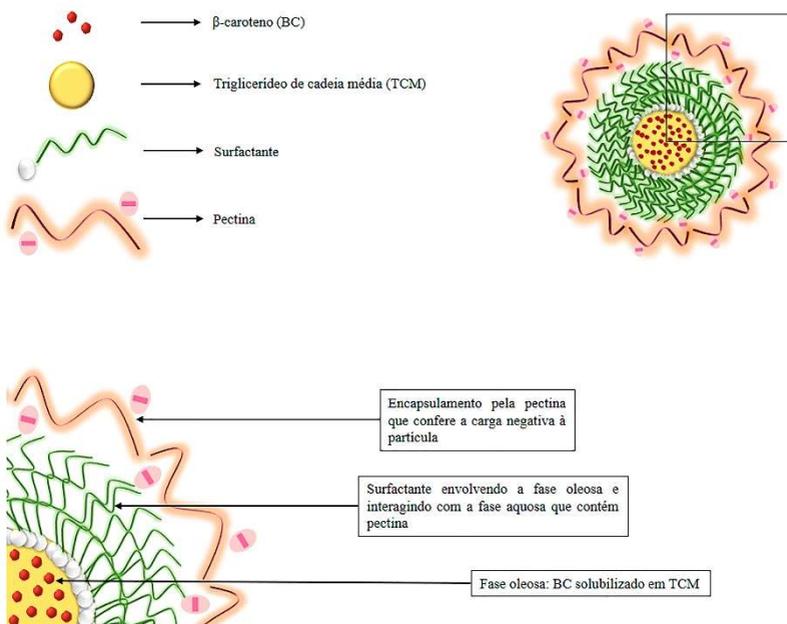
Tabela 3 - Concentração de β-caroteno (µg/ml) e eficiência de encapsulação (EE%) das nanopartículas revestidas com pectina.

Formulação	Concentração (µg/ml)	EE (%)
BC PC T80-NP	530 ± 0,04	95,7 ± 0,22
BC PC T20-NP	324 ± 0,01	98,6 ± 0,02

Os resultados estão expressos em valores de média ± desvio padrão (n= 3).

Baseado nos resultados discutidos, uma representação esquemática de NP revestidas com PC é proposta na Figura 4. Nessa ilustração as moléculas de pectina estão ancoradas à superfície da NP estabilizada por surfactantes não iônicos (Tween 20 ou 80).

Figura 4 - Ilustração esquemática das nanopartículas revestidas com pectina contendo β -caroteno.



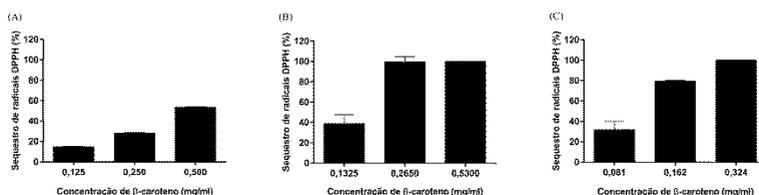
4.4 Atividade antioxidante *in vitro*

Além de ser um dos carotenoides com maior atividade pró- vitamina A, o BC também possui uma forte atividade antioxidante com capacidade de capturar e extinguir os radicais livres como, por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ROS), evitando assim danos oxidativos às células e reduzindo o risco de muitas doenças crônicas (LI; JIA; TRUSH, 2016; MAO et al., 2018).

A atividade antioxidante do BC livre e nanoencapsulado foi medida pelo potencial de sequestro do radical DPPH. Esse método baseia-se na capacidade de doação de átomos de hidrogênio ou uma transferência de elétrons do composto antioxidante para o radical DPPH formando um composto estável (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Os resultados demonstraram que o encapsulamento de BC em NP revestidas com PC aumenta seu potencial antioxidante quando comparado à forma livre do caroteno (Figura 5). O valor da concentração efetiva necessária

para reduzir a concentração inicial de radicais DPPH em 50% (EC₅₀) também foi determinado para as amostras (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995; LU; FOO, 2000). Como pode ser visualizado na Tabela 4, os valores de EC₅₀ das NP revestidas com PC foram significativamente menores em relação ao BC livre, indicando a melhor eficiência antioxidante do composto quando nanoencapsulado. Há poucos relatos na literatura sobre as propriedades antioxidantes dos carotenoides encapsulados, mas os resultados aqui descritos estão de acordo com estudos realizados por Yi et al. (2015) onde NP revestidas com proteínas dietéticas, a 10 µg/ml, apresentaram maior potencial antioxidante (66,8 a 72,8%), quando comparadas ao BC livre (16,7%), através do ensaio de DPPH.

Figura 5 - Atividade de sequestro dos radicais DPPH do β-caroteno livre (A), BC PC T80-NP (B), e BC PC T20-NP (C).



Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n= 3).

Tabela 4 - Atividade antioxidante do β-caroteno e das nanopartículas determinada pelo método de DPPH.

Nanopartículas	EC ₅₀ (mg/ml)
β-caroteno	0,552 ± 0,07 ^a
BC PC T80-NP	0,080 ± 0,01 ^b
BC PC T20-NP	0,074 ± 0,01 ^b

Os dados estão expressos em valores de média ± desvio padrão (n= 3).

EC₅₀: Concentração efetiva para reduzir 50% dos radicais de DPPH.

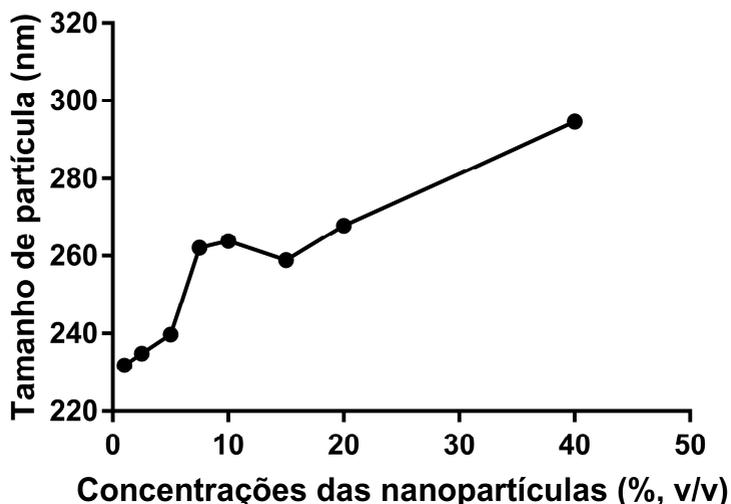
Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (P <0,0001).

4.5 Interações entre mucina e nanopartículas revestidas com pectina

Além das vantagens apresentadas pelo uso do BC nanoencapsulado, como melhor solubilidade em água e maior atividade antioxidante, o revestimento de NP com PC é interessante, pois esse polissacarídeo é uma fibra solúvel, resistente à degradação enzimática nas cavidades bucal e estomacal, porém digerida pela microbiota do cólon (SINHA; KUMRIA, 2001). Essa característica faz com que esse biopolímero seja útil no transporte de alimentos bioativos sensíveis ao ácido gástrico, por exemplo, além da proteção e estabilidade do composto até a sua via de entrega. Além disso, as propriedades mucoadesivas da PC permitem a interação com mucinas da mucosa intestinal que estão relacionadas ao emaranhamento físico da rede de gel. É importante ressaltar que a mucoadesão depende do tipo de PC, do meio de dispersão e da concentração de PC e mucina (SRIAMORNSAK; WATTANAKORN, 2008).

Foram realizados experimentos para determinar a interação entre a mucina de glândula submaxilar bovina (BSM) e as NP revestidas com PC. A dispersão de BSM mostrou um tamanho de partícula de 294,5 nm e alta polidispersão (0,608). Quando as NP revestidas com PC da nanoformação BC PC T20-NP foram adicionadas à dispersão de BSM, em concentrações de 1,0 a 40% (v/v), um aumento no tamanho de partícula de 231,7 para 294,6 nm foi detectado (Figura 6). Além disso, entre 20 a 40% (v/v) de concentrações de NP na dispersão de BSM, a diferença de tamanho de partícula foi de 26,8 nm. Assim, é evidente que o tamanho de partícula depende diretamente da concentração das NP revestidas com PC, sugerindo a formação de agregados resultantes de uma forte interação entre PC e mucina. Para a nanopartícula BC PC T80-NP adicionada à BSM não foi possível detectar mudanças no tamanho das partículas, devido ao tamanho reduzido das partículas micelares (20,7 nm). Eventualmente, nesse caso, poderia ser interessante a utilização de técnicas mais sensíveis, como a microbalança de cristal de quartzo, ou a ressonância plasmônica (MAZZARINO et al., 2014a, 2014b).

Figura 6 - Variação do tamanho de partícula (pico principal) do sistema de mucina coloidal (250 µg/ml) em função da adição de diferentes concentrações das nanopartículas revestidas com pectina (BC PC T20-NP).



A Tabela 5 apresenta os valores de tamanho de partícula em dispersões de mucina e NP não revestidas e revestidas com PC contendo BC. A adição de nanopartículas BC PC T80-NP revestidas com PC às dispersões de mucina resultou em um aumento de 9,2 nm em comparação às nanopartículas sem PC, enquanto para BC PC T20-NP esse aumento foi superior (24 nm), demonstrando a excelente capacidade da PC em interagir com a mucina pelo mecanismo de adesão. A PC possui uma grande quantidade de grupos de ligação de hidrogênio, tais como os grupos carboxílicos (-COOH), que tornam possível a formação de ligação de hidrogênio com os grupos funcionais da mucina. Assim, sugere-se que as interações moleculares do sistema de NP ocorrem por mecanismos de adsorção da PC às moléculas de mucina (LEE; PARK; ROBINSON, 2000). Além disso, o GM da PC também pode influenciar o processo de mucoadesão. Schmidgall e Hensel (2002) relataram uma interação mais significativa com as membranas mucosas do cólon por PC com BM comparativamente à PC com AM, as quais foram ineficazes. Isso pode ocorrer porque a PC com BM possui menor número de grupos metila e, portanto, proporcionalmente um maior número de grupos carboxílicos

disponíveis ao processo de mucoadesão. Como a PC do presente estudo possui BM, essa característica evidencia as propriedades mucoadesivas das NP revestidas com PC que exibem interação excepcional com as mucinas.

Tabela 5 - Tamanho de partícula de dispersões contendo mucina e nanopartículas revestidas e não revestidas com pectina contendo β -caroteno (BC PC T80-NP e BC T80-NP 2,5%, v/v; BC PC T20-NP e BC T20-NP 20%, v/v).

Amostras	Tamanho de partícula (nm)
BC PC T80-NP	37,1
BC T80-NP	27,9
BC PC T20-NP	267,8
BC T20-NP	243,8

Thirawong, Kennedy e Sriamornsak (2008) investigando as interações de PC-mucina descrevem esse polissacarídeo como um promissor biopolímero mucoadesivo no desenvolvimento de sistemas de liberação de medicamentos gastrointestinais. Consequentemente, a capacidade de interação das NP com a superfície da mucosa pode prolongar o tempo de contato do bioativo incorporado ao sistema de entrega, otimizando a permeação e biodisponibilidade de BC e/ou outros nutracêuticos lipofílicos, por exemplo.

4.6 Citotoxicidade em células Caco-2

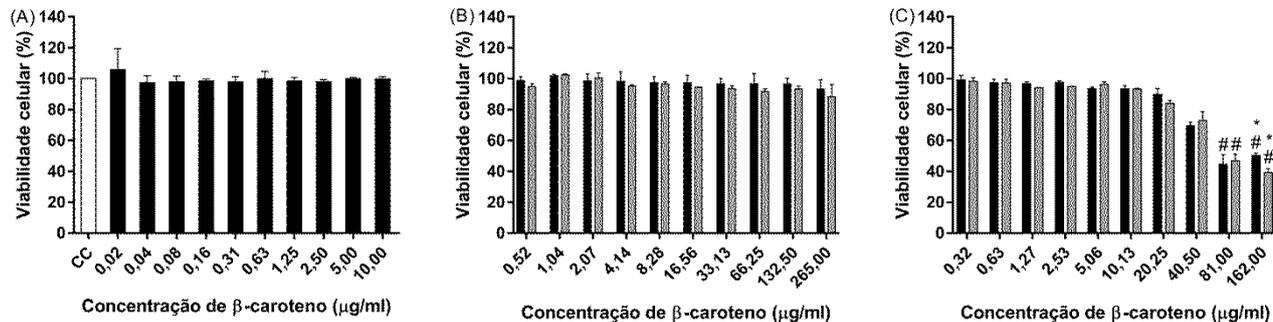
Estudos de citotoxicidade *in vitro* de BC livre e de NP revestidas com PC, contendo ou não BC, foram realizados em linhagens celulares de Caco-2. Essa cultura de células é comumente usada pois é derivada de adenocarcinoma intestinal humano e fornece um modelo útil de cultura celular do epitélio do intestino delgado. Além disso, é no intestino delgado que ocorre a maior parte da digestão e absorção de compostos bioativos (NATOLI et al., 2012).

Devido à baixa solubilidade de BC em meio aquoso, THF (0,125% - v/v) foi adicionado ao sistema, sem prejudicar a viabilidade celular e a solubilização do BC no meio de cultura. Assim, BC a 10 μ g/ml foi a máxima concentração possível dentro desses parâmetros.

Os dados de citotoxicidade *in vitro* obtidos para o BC livre, NP sem BC e NP contendo BC (BC PC T80-NP e BC PC T20-NP) em células Caco-2 após 6 h de incubação são mostrados na Figura 7. Quando

comparado ao controle, não foram observadas reduções significativas na viabilidade celular após o tratamento com BC livre e BC PC T80-NP. Yi et al. (2014) também não encontraram efeito tóxico nas linhagens de células Caco-2 após a exposição ao BC livre. No entanto, as duas concentrações mais altas avaliadas neste estudo, i.e., 81 e 162 $\mu\text{g/ml}$, das nanopartículas revestidas com pectina BC PC T20-NP e Blank PC T20-NP, com e sem BC, respectivamente, apresentaram um efeito citotóxico mais alto, uma vez que aproximadamente 50-60% das células estavam mortas ao término do tempo de cultivo. Como tal efeito também foi observado na NP sem o bioativo, sugere-se que a redução na viabilidade celular ocorreu pela ação tóxica do Tween 20. Esses resultados são relevantes, uma vez que nenhum dos constituintes das nanoformulações se mostrou tóxico nas concentrações máximas de BC.

Figura 7 - Efeito citotóxico do β -caroteno livre (CC= controle celular) (A), BC PC T80-NP (barras pretas) e Branca PC T80-NP (barras cinzas) (B), e BC PC T20-NP (barras pretas) e Branca PC T20-NP (barras cinzas) (C) em linhagens celulares Caco-2, após 6h de incubação.



Os dados estão representados em média \pm desvio padrão ($n=3$). Símbolos distintos (* e #) indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo controle, baseadas em análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por teste *post hoc* de Dunnett (* indica $P < 0,01$ e # $P < 0,05$).

5. CONCLUSÕES

Dois sistemas de NP revestidas com PC extraída de biomassa residual de raízes de mandioca após extração de fécula foram desenvolvidos. Essas nanoformulações foram submetidas a um estudo de otimização e preparadas de forma eficaz. Apesar da degradação do BC, provavelmente associada ao aquecimento necessário à sua solubilização na preparação das formulações, as NP revestidas com PC apresentaram uma excelente EE (>95%) e uma capacidade superior de sequestro de radicais livres (ensaio DPPH), comparativamente ao bioativo livre. Além disso, BC PC T80-NP não foi citotóxico às linhagens celulares Caco-2 em nenhuma das concentrações investigadas, e BC PC T20-NP foi tóxico apenas nas concentrações mais elevadas (81 e 162 µg/ml). Levando em consideração as duas nanopartículas desenvolvidas e revestidas com PC, a formulação BC PC T20-NP mostrou-se mais promissora, para continuação da pesquisa avaliando a biodisponibilidade de BC, por exemplo, devido à alta estabilidade ao longo do período de armazenamento de 90 dias. Além disso, as propriedades mucoadesivas do BC PC T20-NP foram demonstradas pela excelente capacidade de interação da mucina através do mecanismo de adesão.

Diante desse cenário, ressalta-se que os dados aqui apresentados fazem parte da avaliação de resultados inéditos quanto ao desenvolvimento de NP revestidas com PC extraída de um resíduo de mandioca. Essa fonte botânica é distinta daquelas tradicionalmente empregadas no desenvolvimento de nanoformulações, conforme relatado na literatura científica, como citros, bagaços de maçã e beterraba. Assim, acredita-se que as NP aqui desenvolvidas sejam promissoras à administração oral de BC, uma vez que as propriedades mucoadesivas da PC de mandioca facilitam sua interação no trato gastrointestinal, melhorando sua absorção. Além disso, esse modelo também pode ser usado para fornecer outros nutracêuticos lipofílicos, melhorando a sua eficácia terapêutica para administração em superfícies mucosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHIR, N. et al. Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 349–361, 2010.
- AKHTAR, M. et al. Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 16, n. 3, p. 249–256, 2002.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1–2, p. 142–47, 2009.
- BAI, L. et al. Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 703–711, 2016.
- BÖHM, V. et al. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 221–226, 2002.
- BONI, F. I. et al. Mucoadhesive nanostructured polyelectrolytes complexes modulate the intestinal permeability of methotrexate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 73–82, 2018.
- BOON, C. S. et al. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 50, n. 6, p. 515–532, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- CHAN, S. Y. et al. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 118–139, 2017.
- CHANAMAI, R.; HORN, G.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of Oil Polarity on Droplet Growth in Oil-in-Water Emulsions Stabilized by a

Weakly Adsorbing Biopolymer or a Nonionic Surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 247, n. 1, p. 167–176, 2002.

CHANG, Y. .; MCCLEMENTS, D. J. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2306–2312, 2014.

CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. J. Physicochemical Properties and Antimicrobial Efficacy of Carvacrol Nanoemulsions Formed by Spontaneous Emulsification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 8906–8913, 2013.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 272–283, 2006.

CUI, F.; QIAN, F.; YIN, C. Preparation and characterization of mucoadhesive polymer-coated nanoparticles. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 316, p. 154–161, 2006.

DUTTA, R. K.; SAHU, S. Development of a novel probe sonication assisted enhanced loading of 5-FU in SPION encapsulated pectin nanocarriers for magnetic targeted drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 1, p. 58–65, 2012.

EZHILARASI, P. N. et al. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628–647, 2013.

FDA. **Food Additive Status List**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091048.htm>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

GUERRA-ROSAS, M. I. et al. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 438–446, 2016.

GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous

emulsification: factors affecting particle size and stability. **Food Chemistry**, v. 171, p. 117–122, 2015.

JIN, H. et al. Fabrication of β -conglycinin-stabilized nanoemulsions via ultrasound process and influence of SDS and PEG 10000 co-emulsifiers on the physicochemical properties of nanoemulsions. **Food Research International**, v. 106, p. 800–808, 2018.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, p. 41–60, 2009.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149–156, 2002.

KOMAIKO, J. S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 331–352, 2016.

KRSTONOŠIĆ, V. et al. Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2212–2218, 2009.

LEE, J. W.; PARK, J. H.; ROBINSON, J. R. Bioadhesive-based dosage forms: The next generation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, p. 850–864, 2000.

LI, Y. R.; JIA, Z.; TRUSH, M. A. Defining ROS in biology and medicine. **Reactive Oxygen Species**, v. 1, n. 1, p. 9–21, 2016.

LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, p. 81–85, 2000.

LUO, X. et al. Fabrication of b-carotene nanoemulsion-based delivery systems using dual-channel microfluidization: physical and chemical stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 490, p. 328–335, 2017.

MACEDO, J. P. F. et al. Micro-emultocrit technique: a valuable tool for

determination of critical HLB value of emulsions. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2006.

MAO, L. et al. Emulsion design for the delivery of β -carotene in complex food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 770–784, 2018.

MARASCHIN, M. et al. Cell wall polysaccharides from *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) cultured cells: Extraction and chemical structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, n. 1, p. 55–60, 2000.

MARRAS-MARQUEZ, T.; PEÑA, J.; VEIGA-OCHOA, M. D. Robust and versatile pectin-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, p. 265–276, 2015.

MAZZARINO, L. et al. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, p. 58–66, 2012.

MAZZARINO, L. et al. On the Mucoadhesive Properties of Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles Loaded with Curcumin Using Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 787–794, 2014a.

MAZZARINO, L. ÍCIA et al. Xyloglucan-block-Poly(ϵ -Caprolactone) Copolymer Nanoparticles Coated with Chitosan as Biocompatible Mucoadhesive Drug Delivery System. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, p. 709–719, 2014b.

NATOLI, M. et al. Good Caco-2 cell culture practices. **Toxicology In Vitro**, v. 26, p. 1243–1246, 2012.

OEHLKE, K. et al. Potential bioavailability enhancement of bioactive compounds using food-grade engineered nanomaterials: a review of the existing evidence. **Food & Function**, v. 5, p. 1341–1359, 2014.

PALAZZO, C. et al. Mucoadhesive properties of low molecular weight chitosan- or glycol chitosan- and corresponding thiomers-coated poly (isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 117, p. 315–323, 2017.

QIAN, C. et al. Inhibition of β -carotene degradation in oil-in-water

nanoemulsions: influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants.

Food Chemistry, v. 135, p. 1036–1043, 2012.

RAO, J. et al. Nutraceutical nanoemulsions: influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β -carotene bioavailability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 3175–3183, 2013.

ROSE, M. C.; VOYNOW, J. A. Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. **Physiological reviews**, v. 86, p. 245–278, 2006.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735–750, 2015.

SCHMIDGALL, J.; HENSEL, A. Bioadhesive properties of polygalacturonides against colonic epithelial membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, p. 217–225, 2002.

SCHMIDT, U. S. et al. Effect of Molecular Weight Reduction, Acetylation and Esterification on the Emulsification Properties of Citrus Pectin. **Food Biophysics**, v. 10, n. 2, p. 217–227, 2015.

SHIN, G. H.; KIM, J. T.; PARK, H. J. Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 144–157, 2015.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1–2, p. 19–38, 2001.

SOLANS, C.; ISABEL, S. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

SRIAMORNSAK, P.; WATTANAKORN, N. Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 474–481, 2008.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable

Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 201–230, 2004.

THIRAWONG, N.; KENNEDY, R. A.; SRIAMORNSAK, P.
Viscometric study of pectin–mucin interaction and its mucoadhesive bond strength. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 170–179, 2008.

VALLAR, S. et al. Oxide slurries stability and powders dispersion: optimization with zeta potential and rheological measurements. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 19, p. 1017–1021, 1999.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112–1116, 2006.

WU, M.-H. et al. Effects of emulsifier type and environmental stress on the stability of curcumin emulsion. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 38, n. 10, p. 1375–1380, 2017.

YI, J. et al. Cellular Uptake of β -Carotene from Protein Stabilized Solid Lipid Nanoparticles Prepared by Homogenization–Evaporation Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1096–1104, 2014.

YI, J. et al. Beta-carotene encapsulated in food protein nanoparticles reduces peroxy radical oxidation in Caco-2 cells. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 31–40, 2015.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados referentes a caracterização química das frações do BM evidenciaram a fração pectica da safra 2014/2015 semelhante ao modelo já descrito na literatura onde o domínio RG-I da pectina consiste em uma cadeia principal de repetições de dissacarídeos α -(1 \rightarrow 2)-L-ramnose- α -(1 \rightarrow 4)-D-AGal e suas cadeias laterais são formadas por D-manose e D-galactose. Entretanto, a pectina extraída na segunda safra foi discrepante desse modelo sugerindo maior investigação, inclusive, em safras adicionais.

Da mesma forma, a classificação dos tipos de hemiceluloses descritas na literatura científica destoam das estruturas obtidas para as frações encontradas em *M. esculenta* indicando diferenças entre as estruturas observadas neste trabalho para essa espécie comparada a outras já estudadas. Adicionalmente, as frações hemicelulósicas revelaram um perfil químico similar onde os monossacarídeos majoritários são, em geral, os mesmos como o ácido D-galacturônico e D-manose para as frações 1MA e 1MB e, para 4MA e 4MB, além desses monômeros citados também foi detectada a presença de D-galactose em todas as safras. No entanto, a partir das duas safras analisadas não foi possível confirmar um padrão de estrutura química para as frações desse biopolímero.

Em conjunto, esses dados confirmam parcialmente a primeira hipótese do trabalho onde as frações polissacarídicas extraídas do BM apresentaram perfis qualitativamente similares de monossacarídeos e, no entanto, distintos quantitativamente de acordo com a safra agrícola analisada.

Além disso, a utilização da pectina, extraída do BM, no desenvolvimento de duas nanoformulações foi realizada com êxito. As nanopartículas revestidas com pectina demonstraram que o BC foi encapsulado com sucesso, apresentando uma excelente EE (> 95%) e uma capacidade muito melhor no sequestro dos radical livres de DPPH quando comparado ao bioativo livre.

Assim, a segunda hipótese do trabalho foi confirmada demonstrando que a pectina apresenta vantagens no nanoencapsulamento do BC e adicionalmente suas propriedades mucoadesivas foram demonstradas em BC PC T20-NP pela excelente capacidade de interação com a mucina, provavelmente pelo mecanismo de adesão. Então, dentre as duas diferentes nanopartículas desenvolvidas, a formulação BC PC T20-NP mostrou-se mais promissora devido à alta estabilidade durante os 90 dias de armazenamento. No entanto, pesquisas adicionais visando avaliar a liberação controlada e a biodisponibilidade do BC, por meio de

ensaios de cinética de liberação do princípio ativo e de permeação com células Caco-2, por exemplo, são análises importantes para melhorar as nanoformulações desenvolvidas.

Diante desse cenário, destaca-se que os resultados obtidos nos dois capítulos são inéditos com relação a elucidação das frações de hemicelulose e pectina de *M. esculenta* bem como o desenvolvimento de nanopartículas revestidas com essa pectina. Dessa forma o desenvolvimento dessas nanopartículas é promissor para a administração oral de BC e poderá também ser otimizado para outros nutracêuticos lipofílicos, uma vez que as propriedades mucoadesivas da pectina estudada facilitam sua interação no trato gastrointestinal, melhorando sua biodisponibilidade.

Além dessa aplicação bionanotecnológica, as informações geradas fornecem subsídios para pesquisas futuras sobre propriedades funcionais dessas frações de polissacarídeos para aplicação em setores biomédico, cosmético, farmacêutico e alimentício. Adicionalmente, essas aplicações auxiliam em uma exploração e destinação mais nobre desse resíduo, evitam poluição ambiental pelo descarte indevido e fortalecem a cadeia produtiva de *M. esculenta* gerando valor a um subproduto.