

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Aplicação de diferentes tecnologias na extração de pectina  
presente na casca do maracujá**

-Tese de Doutorado-

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

## **Aplicação de diferentes tecnologias na extração de pectina presente na casca do maracujá**

Cibele Freitas de Oliveira

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia. Área de concentração: Fenômeno de Transporte e Operações Unitárias.

**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ligia Damasceno Ferreira Marczak

**Co-orientadora:**

Dr.<sup>a</sup> Poliana Deyse Gurak

**Colaboradora:**

Florencia Cladera Olivera

Porto Alegre

2015

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
João Carlos e Lídia, pelo constante  
apoio, estímulo e carinho.*

## **Agradecimentos**

Às minhas orientadoras, Ligia, Poliana e Florencia, por me apoiarem, acreditarem no meu trabalho, contribuírem para o meu crescimento profissional e pessoal e ainda pela amizade construída ao longo dos últimos quatro anos.

Aos colegas e amigos do LATEPA que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao bolsista de iniciação científica, Diego Giordani, pela dedicação e auxílio na realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a CAPES pelo auxílio financeiro.

À *Rutgers University* e Professor Mukund Karwe pelo apoio durante a realização do doutorado sanduíche.

Aos colegas da *Rutgers University* por me acolherem durante a minha estada nos Estados Unidos.

À minha família, em especial meus avós, Oscarina e Moacyr pelo carinho e por entenderem a minha ausência. Aos meus irmãos, Rafael e Leticia, por me incentivarem constantemente e por terem me dado quatro lindos sobrinhos. Ao meu amigo e irmão Eduardo, pela parceria e conselhos. Aos meus queridos sobrinhos, Gustavo, Gabriel, Rafaela e Pedro, pelo carinho e amor demonstrado a cada encontro. Aos meus cunhados, Daniel e Carolina, pelas longas conversas e incentivos.

Ao meu futuro marido, Fabricio, pela paciência, apoio e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais João Carlos e Lídia, pelo constante apoio, incentivos e compreensão em todos os momentos da minha vida; e ainda, por não medirem esforços para que eu prossiga em busca dos meus sonhos.

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial de diferentes tecnologias na extração de pectina da casca do maracujá e está dividido em quatro etapas. A primeira etapa do trabalho consistiu em realizar a obtenção e caracterização da farinha da casca do maracujá por diferentes métodos de secagem (estufa a 60 °C com circulação de ar e liofilização). Os resultados desta primeira etapa mostraram que a farinha da casca do maracujá, obtida por ambos os tratamentos de secagem, apresentou elevado conteúdo de fibras alimentares totais (63,98-72,62 % b.s) e conteúdo de pectina, que variou entre 6,98 e 19,6 % (b.s). O conteúdo de pectina foi maior para a amostra liofilizada e esses coprodutos apresentaram capacidade de retenção de água entre 6,30 e 14,9 g água/g amostra e capacidade de retenção de óleo que variou entre 2,6 e 6,5 g óleo/g amostra, sendo os maiores valores para as amostras liofilizadas. A segunda etapa do trabalho teve como objetivo estudar a extração da pectina assistida pela tecnologia de campo elétrico moderado e compará-la com a extração convencional da pectina. Para isso, diferentes condições de tempo de extração, temperatura, pH e tensão do campo elétrico moderado foram aplicadas na farinha da casca do maracujá. O rendimento de extração de pectina foi de 6,20 % (b.s) quando as condições de extração foram pH 2,0, razão sólido:líquido 1:30, 100 V, 50 °C e 15 min; para as mesmas condições sem o uso do campo elétrico moderado o rendimento obtido foi de 4,80 % (b.s). Na terceira etapa, a pesquisa foi voltada para a extração da pectina assistida por alta pressão hidrostática. Para a realização dos ensaios dois planejamentos experimentais foram realizados. O primeiro planejamento consistiu em determinar as melhores condições de temperatura e pressão para a extração da pectina que, posteriormente, foram utilizadas como pré-tratamento para a extração convencional. O segundo planejamento foi realizado para determinar as melhores condições de tempo e temperatura da extração convencional, utilizando a alta pressão como pré-tratamento. Foi observado que a alta pressão hidrostática, combinada com temperatura moderada (300 MPa e 50 °C), tem potencial para ser utilizada como pré-tratamento na extração convencional, levando a um rendimento de extração de pectina de 14,34 %. Por fim, a última etapa do presente trabalho foi a extração da pectina assistida por ultrassom, tendo sido desenvolvido um planejamento experimental com duas variáveis, temperatura e intensidade de potência do ultrassom. Os resultados desta etapa demonstraram que um maior rendimento de extração (12,67 % b.s) foi obtido na maior temperatura e intensidade de potência, 85 °C e 664 W/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Os resultados demonstraram que a pectina tem potencial para ser melhor extraída da casca de maracujá com o uso das tecnologias emergentes empregadas neste trabalho, pois obteve-se um maior rendimento de extração em menor tempo de processo, quando comparada com a extração convencional. **Palavras chave:** extração convencional, alta pressão hidrostática, ultrassom, campo elétrico moderado, pectina, *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

## Abstract

The aim of this work was to study the potential of different technologies for extraction of pectin from passion fruit peel. The work is divided in four steps. The first step was performed to obtain and characterize the passion fruit peel powder by convective hot air-drying at 60 °C and freeze-drying. The results showed that the passion fruit powder obtained by different methods of dehydration, had a high content of dietary fiber (63.98-72.62 % d.m) and the content of pectin ranged between 6.98 from 19.6 % (d.m). The content of pectin was high in freeze-dried samples. In addition, these fiber-rich co-products have potential applications as ingredients in products requiring hydration and viscosity development due to their high total dietary fiber content and good technological proprieties, especially their water holding (6.30-14.9 g H<sub>2</sub>O/g) and oil holding capacities (2.6–6.5 g oil/g), especially for the freeze-dried samples. The purpose of the second step was to explore the conventional and moderate electric field extractions of pectin from passion fruit peel. Different conditions of time, pH, temperature and voltage were applied. The extraction yield of pectin was 6.20 % (d.m) when the extraction conditions were pH 2.0, solid:liquid ratio 1:30, 100V, 50 °C and 15 minutes; for the same conditions, without moderate electric field, the yield was 4.80 % (b.s). In the third step, the aim was to investigate the potential of high pressure to extract the pectin from passion fruit peel. Two experimental designs were performed; the first was used to determine the optimal conditions of pressure and temperature for pectin extraction and use these conditions as a pre-treatment for conventional extraction. The second experimental design was performed to determine the best conditions of the time and temperature using high pressure as a pre-treatment. The results showed that the yield of extraction enhance twice (7.4 to 14.34 %) when high pressure (300 MPa and 50 °C) was used as a pre-treatment, using the same conditions of conventional extraction. Finally, the last step of this work was to explore the pectin extraction assisted by ultrasound using an experimental design. The independent variables were temperature and power intensity. The highest yield (12.67 %) of pectin was obtained using power intensity of 644 W/cm<sup>2</sup> and temperature of 85 °C. The results showed that the pectin from passion fruit peel can be extracted using emerging technologies, since the yield of extraction was high in less time comparing with conventional extraction. **Keywords:** conventional extraction, high hydrostatic pressure, ultrasound, moderate electric field, pectin, *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

ANOVA - Análise de variância, do inglês *analysis of variance*

AOAC - do inglês, *Association of Official Analytical Chemists*

APH - alta pressão hidrostática

$a_w$  - atividade de água

b.u - base úmida

b.s - base seca

CEM - campo elétrico moderado

D[4,3] - diâmetro médio de partícula

DE - grau de esterificação, do inglês *degree of esterification*

DM - grau de metilação, do inglês *degree of methylation*

d.m – base seca, do inglês *dry matter*

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GAE - Equivalente de ácido gálico, do inglês *gallic acid equivalent*

GalA - ácido galacturônico, do inglês *galacturonic acid*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

P – pressão (Mpa)

PCA - Análise de Componentes Principais, do inglês *Principal Components Analysis*

PSD - distribuição do tamanho de partícula, do inglês *particle size distribution*

TDF - fibras alimentar total, do inglês *total dietary fiber*

T - temperatura (°C)

TPC - conteúdo de compostos fenólicos totais, do inglês *total phenolic compounds*

T - tempo (min)

US - ultrassom

Y - variável de resposta

Y - rendimento

WHC – capacidade de retenção de água, do inglês *water holding capacity*

OHC – capacidade de retenção de óleo, do inglês *oil holding capacity*



## Sumário

<b>Capítulo 1- Introdução</b>	<b>11</b>
<b>Capítulo 2– Fundamentação Teórica e Revisão Bibliográfica</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Definições e características do maracujá</b>	<b>13</b>
2.1.1 A casca do maracujá	15
<b>2.2 Fibras Alimentares</b>	<b>20</b>
2.2.1. Pectina	21
2.2.1.1 Características e aspectos gerais da pectina	21
2.2.1.2 Estrutura molecular	25
2.2.1.3 Grau de metoxilação e esterificação	27
2.2.1.4 Degradação da pectina	29
2.2.1.5 Fontes e aplicações da pectina	31
2.2.1.6 Extração convencional da pectina	32
<b>2.3 Tecnologias alternativas para a extração da pectina</b>	<b>35</b>
2.3.1 Campo elétrico moderado	35
2.3.1.1 Princípios gerais do processamento utilizando campo elétrico moderado	37
2.3.2.2 Processamento de alimentos por campo elétrico moderado	39
2.3.2 Alta pressão hidrostática	41
2.3.2.1 Princípios gerais do processamento utilizando alta pressão hidrostática	42
2.3.2.2 Processamento de alimentos por alta pressão hidrostática	43
2.3.3 Ultrassom	46
2.3.2.1 Princípios gerais do processamento utilizando ultrassom	48
2.3.2.2 Processamento de alimentos por ultrassom	49
<b>Capítulo 3 – Materiais e Métodos</b>	<b>53</b>
<b>3.1 Matéria-prima: Obtenção da farinha da casca do maracujá</b>	<b>53</b>
<b>3.2 Composição e caracterização das farinhas da casca de maracujá</b>	<b>54</b>
3.2.1 Análises físico-químicas	54
3.2.2 Determinação da capacidade de retenção de água e óleo	55
3.2.3 Análise de cor	56
3.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais	56
3.2.5 Determinação de flavonóides	57
3.2.6 Determinação de carotenoides	57
3.2.7 Tamanho de partícula e distribuição de tamanhos	57
3.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura	58
3.2.9 Análise estatística	58

<b>3.3 Extração da pectina da casca do maracujá</b>	<b>58</b>
3.3.1 Extração convencional	59
3.3.2 Extração assistida por campo elétrico moderado (CEM)	62
3.3.3 Extração assistida por alta pressão hidrostática (APH)	64
2.3.4 Extração assistida por ultrassom (US)	65
<b>3.4 Caracterização da pectina</b>	<b>66</b>
3.4.1 Rendimento gravimétrico da pectina extraída	67
3.4.2 Grau de esterificação	67
3.4.3 Conteúdo de ácido galacturônico	67
3.4.4 Determinação da viscosidade aparente	68
3.4.5 Análise estatística	68
<b>Capítulo 4</b>	<b>69</b>
<b>Artigo 1- Evaluation of Physicochemical, Technological and Morphological Characteristics of Powdered Yellow Passion Fruit Peel.</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo 5</b>	<b>90</b>
<b>Artigo 2 - Extraction of Pectin from Passion Fruit Peel Using Moderate Electric Field and Conventional Heating Extraction Methods.</b>	<b>90</b>
<b>Capítulo 6</b>	<b>118</b>
<b>Artigo 3 - Combined Effect of High Pressure and Conventional Heating on Pectin Extraction from Passion Fruit Peel.</b>	<b>118</b>
<b>Capítulo 7</b>	<b>140</b>
<b>ARTIGO 4 - EXTRACTION OF PECTIN FROM PASSION FRUIT PEEL ASSISTED BY ULTRASOUND.</b>	<b>140</b>
<b>Capítulo 8 – Considerações finais e sugestões para trabalhos futuros</b>	<b>157</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>161</b>

## Capítulo 1- Introdução

A completa exploração dos resíduos da indústria de alimentos como matérias-primas para o desenvolvimento de novos produtos constitui uma das etapas fundamentais para o processo de reciclagem e diminuição de danos ambientais. No Brasil, o panorama geral de resíduos orgânicos evidencia uma crescente preocupação com esses materiais. O gerenciamento adequado dos resíduos produzidos nas indústrias de alimentos pode ser um dos caminhos para a diminuição do acúmulo de resíduos com alto valor agregado no meio ambiente. Além disso, o aproveitamento das cascas e sementes de frutas para a produção de ingredientes funcionais para serem utilizados em alimentos, e também na produção de cosméticos, é uma área de pesquisa que vem ganhando grande destaque.

Dentre os frutos nativos do Brasil, o maracujá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) destaca-se devido sua alta produção; os últimos dados mostram que são produzidas cerca de 776 mil toneladas deste fruto (IBGE, 2012). A variedade mais importante cultivada para fins comerciais é a *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, que também é conhecida popularmente como maracujá amarelo, sendo destinada à produção de sucos, polpas e iogurtes. As parcelas comestíveis e não comestíveis do maracujá desempenham um papel importante na saúde humana devido às suas propriedades funcionais tecnológicas e à presença de compostos bioativos e fibras alimentares.

A indústria de processamento de maracujá gera aproximadamente 60% do peso total do fruto em resíduo, sendo composto pela casca, também conhecida como epicarpo, e pelo albedo, também conhecido como mesocarpo. O restante da fruta equivale à parte comestível composta pela polpa e sementes. Quantidades significativas da casca de maracujá, proveniente das indústrias de sucos e polpas, são descartadas na forma de resíduos gerando problemas ambientais.

A valorização de coprodutos agrícolas tem crescido nos últimos anos uma vez que a conversão de resíduos vegetais em ingredientes alimentícios com valor agregado é importante, tanto do ponto de vista industrial quanto ambiental. A casca do maracujá é

conhecida por apresentar quantidades significativas de fibras, destacando-se a pectina, que é numa fibra solúvel com propriedades benéficas para o organismo humano, estando relacionada com a prevenção de câncer (Glinsky & Raz, 2009) e com a redução do colesterol e de riscos de doenças cardiovasculares (Manderson *et al.*, 2005). Além disto, a pectina é muito utilizada como agente estabilizante e/ou geleificante na indústria de alimentos e farmacêutica devido às suas propriedades funcionais tecnológicas.

A busca de um método adequado para extração de pectina é importante para maximizar o rendimento da extração e a qualidade do produto obtido. A literatura apresenta vários estudos científicos que demonstram a influência de condições de extração nas características físico-químicas e propriedades funcionais tecnológicas da pectina extraída a partir de vários tecidos de plantas. Os métodos mais comumente usados incluem a ebulição direta e o aquecimento por micro-ondas. Em escala industrial, a pectina é normalmente extraída na forma convencional usando água quente acidificada (HCl, HNO<sub>3</sub>) sob pH ácido (1,3 a 3,0), temperatura entre 60 e 100 °C, e tempo de processo que varia de 20 a 360 minutos. Devido ao longo período de aquecimento direto, a pectina extraída pode sofrer degradações em sua estrutura, que podem resultar em alterações indesejáveis nas suas propriedades físico-químicas e funcionais tecnológicas. Além disso, os gastos energéticos são elevados devido ao longo período de tempo necessário para a obtenção de rendimentos de extração satisfatórios. Existe, portanto, uma necessidade industrial de explorar novos métodos de extração que sejam eficazes, mais curtos e que levem à obtenção de uma fibra com atributos de qualidade desejados.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de tecnologias emergentes na extração da pectina da casca do maracujá. As tecnologias investigadas foram o campo elétrico moderado, a alta pressão hidrostática e o ultrassom.

A partir deste objetivo geral, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ obter e caracterizar a farinha da casca do maracujá obtida pelo processo de secagem à 60 °C e liofilização;
- ✓ extrair pela metodologia convencional a pectina da casca do maracujá;

- ✓ extrair a pectina do maracujá utilizando o campo elétrico moderado;
- ✓ extrair a pectina do maracujá utilizando a alta pressão hidrostática;
- ✓ extrair pelo método convencional a pectina utilizando alta pressão como pré-tratamento;
- ✓ extrair a pectina do maracujá utilizando ultrassom.

O presente texto encontra-se estruturado na seguinte forma. O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica; o Capítulo 3 descreve os materiais e métodos utilizados para realização deste trabalho. Os Capítulos 4, 5, 6 e 7 apresentam os resultados obtidos e estão apresentados na forma de artigos científicos; o Capítulo 4 trata da caracterização da casca do maracujá e o Capítulo 5 apresenta os resultados obtidos para a extração da pectina assistida por campo elétrico moderado. O Capítulo 6 mostra os resultados da extração da pectina assistida por alta pressão hidrostática e, finalmente, o Capítulo 7 trata dos resultados obtidos para a extração assistida por ultrassom. O Capítulo 8 apresenta uma conclusão geral do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.

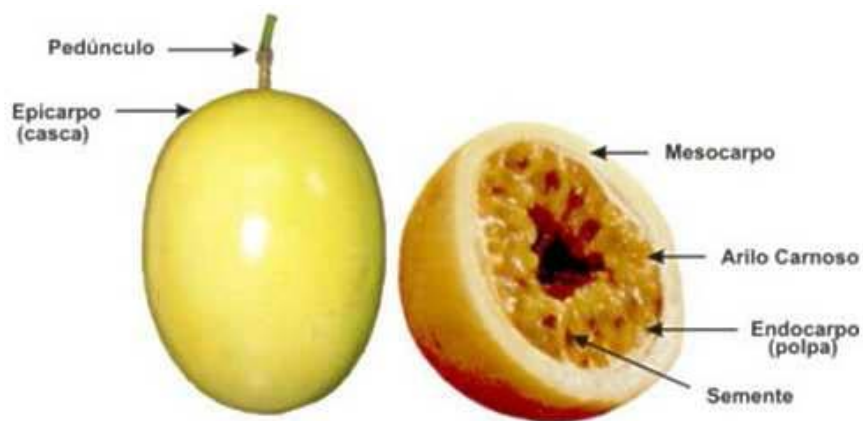
## **Capítulo 2– Fundamentação Teórica e Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Definições e características do maracujá**

Maracujá é o nome popularmente dado a várias espécies do gênero *Passiflora*; registros da literatura indicam que esta fruta é originária de países tropicais da América do Sul, sendo que, nos últimos anos, o Brasil passou a ser o maior produtor, exportador e consumidor da fruta (EMBRAPA, 2010). Segundo o IBGE, a produção brasileira em 2010 foi de 920 mil toneladas, o que corresponde a 70 % da produção mundial.

Botanicamente, o maracujá (*Passiflora* sp) é classificado como fruto carnoso de forma arredondada com aproximadamente 8 a 10 cm de diâmetro, o qual apresenta sementes com arilo carnoso, conforme mostrado na Figura 1. Suas sementes são rodeadas por uma polpa amarela gelatinosa que apresenta um aroma intenso devido à presença de

compostos voláteis, como os pertencentes à classe dos ésteres, e sabor doce-ácido (Bruckner & Picanço, 2001).



**Figura 2.1** Partes constituintes do maracujá amarelo. Fonte: FAEP (2010).

O maracujá-azedo, ou também conhecido simplesmente de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deg., *Passifloraceae*), é o mais cultivado e comercializado no país devido as condições climáticas para produção de polpa e suco concentrado destinados à elaboração de doces, sucos, refrescos, geleias e sorvetes, entre outros produtos alimentares.

O maracujá amarelo apresenta uma série de características consideradas superiores às demais variedades (como o maracujá roxo, por exemplo), tais como: maiores tamanho do fruto, peso, acidez total, resistência a pragas e produtividade por hectare (Zibadi & Watson, 2004). Adicionalmente, este fruto é fonte de fibras, vitamina C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e pró-vitamina A - devido à presença de alguns carotenoides, como o all-*trans*- $\beta$ -caroteno - e sais minerais (K, P, Ca, Fe). Segundo Souci *et al.* (2008), 100 g do fruto apresentam, em média, 75,8 g de água, 9,5 g de carboidratos, 0,4 g de lipídios, 2,4 g de proteínas, 1,5 g de fibra alimentar, 3,9 g de ácidos orgânicos e 0,9 g de minerais, fornecendo 63 kcal por 100 g do produto. Além disso, os valores de vitamina C situam-se em torno de 40 mg/100 g de suco de maracujá natural (Suntornsuk *et al.*, 2001). Vale destacar, ainda, a presença de

substâncias polifenólicas com atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antiviral, (López-Vargas *et al*, 2013) e fibras alimentares, especialmente a pectina (Córdova *et al.*, 2005). Devido à presença destes compostos, diferentes produtos derivados do maracujá quando ingeridos podem apresentar efeitos benéficos à saúde.

Segundo a ANVISA (Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999), um alimento é considerado funcional devido ao seu papel metabólico ou fisiológico no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. As fibras alimentares, presentes em quantidades significativas no maracujá, auxiliam no funcionamento do intestino, podendo indicar o maracujá como um alimento funcional. Vale ressaltar que é requisito, especificado pela ANVISA, que a porção do produto pronto para o consumo forneça, no mínimo, 3 g de fibras se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido para que o mesmo seja considerado um alimento funcional.

### **2.1.1 A casca do maracujá**

Segundo o Instituto Brasileiro de Frutas, em 2013 o Brasil produziu 43,6 milhões de toneladas de frutas, sendo o terceiro maior produtor de frutas do mundo. A indústria de processamento de frutas, que visa à produção de sucos, néctares e drinques, é responsável por consumir 23,8 milhões de toneladas de frutas (Instituto Brasileiro de Frutas, 2013). Dessa forma, muitos pesquisadores têm atuado em estudos que visam à melhoria da qualidade deste tipo de produto, a fim de contribuir para a consolidação de bebidas de frutas industrializadas no mercado interno e externo. No entanto, apesar do grande número de pesquisas realizadas em relação ao suco da fruta e a melhoria de sua qualidade na industrialização, é de grande importância maiores investigações que apontem o aproveitamento dos resíduos gerados pela indústria de processamento de frutas.

No contexto do presente trabalho, é importante entender a diferença conceitual entre resíduo e coproduto (subproduto) e as características que os distinguem. Basicamente, ambos são substâncias ou matérias geradas secundariamente em um processo de produção. No entanto, a maioria dos autores distingue resíduo de coproduto em relação à existência ou não de um mercado definido para a sua comercialização. Os produtos secundários de um processo agroindustrial que são demandados pelo mercado e que apresentam um valor de

comercialização definido são chamados de coprodutos e aqueles que não têm potencial mercadológico, ou cujo potencial não é efetivamente explorado, são chamados de resíduos. Na maioria dos estudos a casca do maracujá é considerada um coproduto, porém existem pesquisadores que a classificam como resíduo. No presente trabalho, a casca do maracujá será considerada um coproduto da indústria do processamento de frutas.

De acordo com Oliveira *et al.* (2002), os coprodutos (cascas e sementes) produzidos no processamento do suco do maracujá correspondem a cerca de 65 a 70% do peso do fruto sendo, portanto, um grande problema de resíduo agroindustrial. A utilização destes subprodutos na alimentação humana ou animal como fonte alimentar de bom valor nutricional mostra-se viável, diminuindo os problemas de eliminação dos subprodutos provenientes do processamento da fruta.

A casca de maracujá é rica em fibras solúveis, principalmente pectina, que é benéfica ao ser humano (Guertzenstein, 1998; Yapó & Koffi, 2006). Ao contrário da fibra insolúvel (contida no farelo dos cereais), que pode interferir, por exemplo, na absorção do ferro, a fibra solúvel pode auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares e gastrointestinais, câncer de colón, hiperlipidemias, diabetes e obesidade, entre outras (Turano *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2008).

Segundo Ferrari *et al.* (2004), as cascas e sementes provenientes do processo de esmagamento do maracujá para obtenção do suco são utilizadas por produtores rurais na suplementação da alimentação animal, não havendo, contudo, estudos sistemáticos no que diz respeito à qualidade desta suplementação. Uma vez que a quantidade de resíduo gerada é grande, há interesse econômico, científico e tecnológico de se agregar valor a esses subprodutos. Muitas pesquisas vêm sendo feitas no que tange à conversão de subprodutos em ingredientes alimentícios e outros materiais com valor agregado, podendo ser citados os trabalhos de Sant'Ana *et al.* (2011) que estudaram a capacidade antioxidante, o conteúdo de compostos fenólicos e vitamina C da polpa, casca e sementes de 24 frutos provenientes da Colômbia, e López-Vargas *et al.* (2013) que investigaram as propriedades químicas, físico-químicas, funcionais tecnológicas, antibacterianas e antioxidantes dos coprodutos do maracujá amarelo.



A casca do maracujá vem sendo testada com relativo sucesso na alimentação animal e humana e, ainda, como ingrediente na elaboração de produtos alimentícios. A Tabela 1 mostra alguns estudos realizados com a casca do maracujá entre os anos de 1958 a 2015.

**Tabela 1.** Estudos realizados com a casca do maracujá.

Autores	Objetivo	Resultados
Otagaki & Matsumoto (1958)	Utilizar cascas de maracujá em ração para suplementação de vacas leiteiras e outros animais.	Maior produção de leite e menos problemas intestinais, provavelmente, pela a presença de quantidades significativas de fibras na casca do maracujá.
Guertzein & Sabaa-Srur (1999)	Verificar os benefícios da casca do maracujá como redutor da glicemia.	A casca do maracujá amarelo mostrou-se eficiente no tratamento do diabetes mellitus tipo II, sendo o provável mecanismo desta ação a presença de um alto teor de pectina, totalmente degradável no organismo, que ajuda a diminuir a taxa de glicose e colesterol no sangue.
Ramos <i>et al.</i> (2007)	Fazer um estudo clínico utilizando farinha da casca do maracujá ( <i>P. edulis</i> fo. <i>flavicarpa</i> ).	Foi observada uma diminuição dos níveis de colesterol em mulheres entre 30 e 60 anos que apresentavam hipercolesterolemia (colesterol $\geq 200$ mg/dL).
Agra <i>et al.</i> (2007)	Estudar as plantas medicinais mais utilizadas no nordeste brasileiro.	Foi evidenciado que o mesocarpo seco e pulverizado de <i>P. edulis</i> (variedade não especificada) pode ser utilizado no controle da diabetes.
Watson <i>et al.</i> (2008)	Estudar pacientes com asma durante quatro semanas, administrando extratos de cascas de maracujá roxo ou pílulas placebo, para posterior comparação.	Os efeitos dos extratos foram avaliados por meio dos sintomas clínicos da asma e testes espirométricos. Foi constatado que o extrato da casca do maracujá roxo, administrado por via oral em seres humanos, melhorou os sintomas clínicos da asma, como diminuição do chiado no peito e tosse e causou uma melhora em relação à falta de ar, os pacientes não apresentaram efeitos colaterais.
Farid <i>et al.</i> (2010)	Avaliar a ingestão de casca de maracujá roxo em pacientes com osteoartrite no joelho.	Os resultados deste estudo mostraram que a casca do maracujá alivia os sintomas da osteoartrite, devido suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.
Sant'Ana <i>et al.</i> (2011)	Determinar a capacidade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais da polpa, casca e sementes de 24 frutos.	A casca do maracujá apresentou $288 \pm 8,41$ mg de ácido gálico / 100g amostra (compostos fenólicos totais); $36,7 \pm 0,07$ $\mu$ mol Trolox / g amostra (capacidade antioxidante). A polpa do maracujá apresentou valores maiores em comparação com a casca, porém em comparação com a casca da banana e do tomate valores obtidos foram maiores.
López-Vargas <i>et al.</i> (2013)	Determinar as características físico-químicas, tecnológicas, compostos fenólicos,	A casca do maracujá possui quantidades significativas de fibras dietéticas, compostos fenólicos e boas propriedades

	propriedades antioxidantes e antibacterianas da casca do maracujá.	tecnológicas, antioxidante e antibacteriana; podendo ser usada como ingrediente no desenvolvimento de alimentos funcionais.
Perina <i>et al.</i> (2015)	Estudar a utilização de óleo vegetal e farinha da casca do maracujá para produzir um novo iogurte funcional com benefícios para a saúde.	Foi visto que mesmo tendo conhecimento dos potenciais benefícios para a saúde do produto suplementado com óleo vegetal e farinha da casca do maracujá, os autores observaram uma diminuição na firmeza do produto suplementado; o que é uma característica de extrema importância para o iogurte.

Os coprodutos do processamento do maracujá podem ser convertidos em diferentes produtos comerciais, quer como matérias-primas, ou apenas como um ingrediente para a elaboração de novos produtos (Sánchez-Zapata *et al.*, 2009). O estudo realizado por López-Vargas *et al.* (2013) mostrou que o albedo do maracujá amarelo possui maiores quantidades de fibras alimentares solúveis e insolúveis do que a polpa, assim como valores significativos de cinzas, proteínas e lipídeos. Além disso, a capacidade de retenção de óleo e água também foi maior quando comparada com a polpa e sementes.

A Tabela 2 apresenta os resultados da composição centesimal da casca de maracujá amarelo obtidos por diferentes autores. As variações de seus constituintes dependem, principalmente, do estágio de maturação do fruto, tendo em vista que o amadurecimento leva à perda de umidade, o que acarreta na concentração dos demais constituintes; além disto, há também outros fatores, tais como o local de plantio, condições climáticas e as condições genéticas das plantas.

**Tabela 2.** Teor de nutrientes em cascas secas de maracujá amarelo (*P. edulis* fo. *flavicarpa*).

Componentes (%)	Casca de Maracujá
Umidade	4,60 - 9,93
Cinzas	3,36 – 9,27
Lipídeos	0,01 – 2,08
Proteínas	4,05 – 5,26
Fibras totais	57,36 – 69,69
Fibras solúveis	15,81 – 23,32
Fibras Insolúveis	34,37 – 46,37

Pinheiro (2007); Kliemann (2006); Oliveira *et al.* (2015); Macagnan *et al.* (2014).

\* Os resultados apresentados encontram-se em base seca.

## 2.2 Fibras Alimentares

As fibras alimentares têm ocupado uma posição de destaque devido aos resultados divulgados em estudos científicos que demonstram a ação benéfica desses compostos no organismo e a relação entre o seu consumo, em quantidades adequadas, e a prevenção de doenças; além disso, sabe-se que as fibras possuem boas propriedades funcionais tecnológicas para a elaboração de alimentos e produtos farmacêuticos.

A presença de fibras em quantidades insuficientes na alimentação por prolongados períodos de tempo pode contribuir para o aparecimento de doenças crônicas, como constipação, doenças cardiovasculares e câncer de intestino. O aumento na ocorrência das doenças citadas justifica a importância de se atingir a recomendação diária de fibras. No Brasil, o consumo de fibras é muito baixo; de fato, as últimas pesquisas realizadas pelo IBGE em 2011 mostraram que o consumo de fibras é em torno de 2,4 g/dia, valor muito inferior ao recomendado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) que é de, no mínimo, 25 g/dia.

Os termos e definições com relação às fibras alimentares se diferenciam nas diversas partes do mundo, sendo que a mais comumente aceita é: “Resíduo de células vegetais que não são digeridas pela parte superior do tubo digestivo do homem e, portanto,

não fornecem calorias, sendo compostas de celulose, oligossacarídeos, pectina, goma e ceras.” O Ministério da Saúde, pela portaria n° 41, de 14 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, define fibras alimentares como: “Qualquer material comestível de origem vegetal que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano, determinado segundo o método 985.29 da AOAC 15° ed. 1990”.

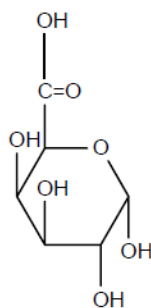
A passagem das fibras alimentares pelo trato digestivo resulta em diversos efeitos fisiológicos importantes, sendo que o mais conhecido é, sem dúvida, o bom funcionamento do intestino e prevenção de doenças. No entanto, nem todas as fibras atuam da mesma forma. As fibras alimentares dividem-se em duas categorias, classificadas como insolúveis e solúveis; essa classificação é muito útil para o entendimento das propriedades fisiológicas das fibras alimentares, permitindo uma divisão simples entre aquelas que são fermentadas lenta e incompletamente, tendo efeitos mais pronunciados nos hábitos intestinais, denominadas fibras insolúveis (lignina, celulose e hemiceluloses) e as que têm efeito, principalmente, sobre a absorção de glicose e lipídios no intestino delgado, que são facilmente fermentadas por bactérias no cólon, denominadas fibras solúveis (pectinas, gomas e mucilagens) (Fenemma, 2010). No presente estudo, será dado um maior enfoque para fibra solúvel denominada pectina, que é alvo do presente trabalho.

## **2.2.1. Pectina**

### ***2.2.1.1 Características e aspectos gerais da pectina***

Os carboidratos são amplamente disponíveis na natureza, pois constituem mais de 90% da matéria seca das plantas; são componentes frequentes dos alimentos podendo estar presentes naturalmente ou adicionados como ingrediente. Apresentam estruturas moleculares, tamanhos e configurações diversas, com diferentes propriedades físicas e químicas, que acarretam em mudanças em sua aplicação na indústria de alimentos e efeitos fisiológicos quando ingeridos. Por esta razão, os carboidratos são passíveis de modificações químicas empregadas comercialmente no melhoramento de suas propriedades e na ampliação de suas aplicações. Comumente, os carboidratos são subdivididos, em função do tamanho de sua estrutura química, em monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (Fenemma, 2010).

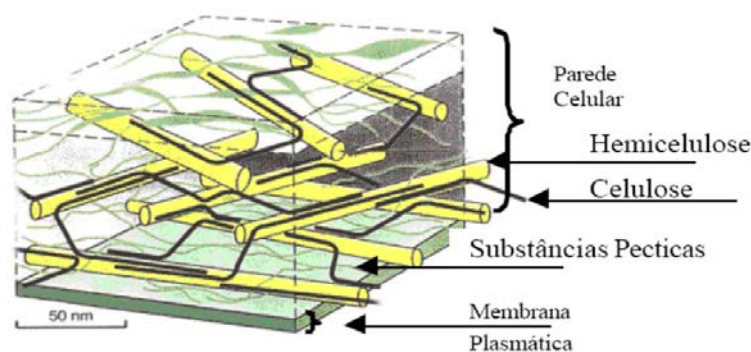
A pectina, substância de interesse do presente trabalho, refere-se aos polissacarídeos com estruturas diversas que apresentam um esqueleto péctico, sendo primariamente um homopolímero de ácido galacturônico (Figura 2) ligado em  $\alpha(1\rightarrow4)$ , com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados (Voragen *et al.*, 1995). Polissacarídeos classificados como pectinas devem ser constituídos de, no mínimo, 65 % de ácido galacturônico, segundo a FAO (Willats *et al.*, 2006). Alguns açúcares, como galactose, glicose, ramnose, arabinose e xilose, também podem estar presentes na estrutura química da pectina, normalmente entre 5 a 10 % da massa de ácido galacturônico, podendo estar inseridos na cadeia principal, ligados como cadeias laterais, ou apresentando-se como contaminantes isolados (Yapo e Koffi, 2006; Yapo *et al.*, 2007).



**Figura 2.2** Estrutura da unidade do ácido galacturônico.

Naturalmente, a pectina é encontrada na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares, contribuindo para a adesão entre as células, firmeza e resistência mecânica do tecido, conforme representação esquemática mostrada na Figura 3 (Carpita *et al.*, 2000). Além do seu papel importante no crescimento das células, as pectinas estão envolvidas em interações com agentes patogênicos e a sua quantidade e natureza são determinantes para a textura de frutos em geral durante o crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento (Mesbahi *et al.*, 2005). A pectina encontra-se associada à celulose, hemicelulose e lignina e é designada de protopectina; pode ser extraída, com abundância, do bagaço de maçã (15-20 % matéria seca), albedo cítrico (30-35 % matéria

seca) e polpa de beterraba (15-20 % matéria seca) (Thibault & Petit, 1979; Lopez-Vargas *et al.*, 2013).



**Figura 2.3** Estrutura da parede celular de plantas. Fonte: IPPA (2008).

A maior parte da pectina extraída pela indústria de alimentos é originária das matérias-primas citadas anteriormente, sendo extraída em condições ácidas e em alta temperatura. Vale ressaltar que o teor e as propriedades das pectinas extraídas variam de acordo com a fonte de obtenção, o processo usado durante a extração e os tratamentos subsequentes (Thibault, 1980; Fenemma, 2010).

As matérias-primas mais importantes para a extração comercial de pectina constituem-se na polpa de maçã e cascas de frutas cítricas (subprodutos da indústria de sucos), as quais dão origem a pectinas de alto grau de metoxilação (Thakur *et al.*, 1997; Thibault, 1980). Segundo Thakur *et al.* 1997, a casca de laranja possui em torno de 3,5 a 5,5 % de pectina.

A casca do maracujá tem sido estudada como uma boa fonte de pectina e pesquisas mostram um teor de 6,3 % desta fibra solúvel nas condições de extração de 80 °C, 60 minutos, pH 2,0 e razão sólido/líquido 1:30 (Kulkarni & Vijayanand, 2010). Conforme discutido por López-Vargas *et al.* (2013), é importante lembrar que o conteúdo de fibras varia de acordo com o grau de maturação do fruto, época de colheita, tempo de armazenamento e método de extração.

Considerando a fonte da qual se extrai a pectina, a mesma pode variar consideravelmente em sua capacidade de formar géis, em função das diferenças de tamanho da cadeia de ácidos poligalacturônicos e do grau de esterificação de seus grupos carboxílicos. O procedimento de extração, a localização da pectina no tecido da planta, e o teor de açúcares neutros presentes na cadeia também determinam as variabilidades nas características finais da pectina (Barrera *et al.*, 2002).

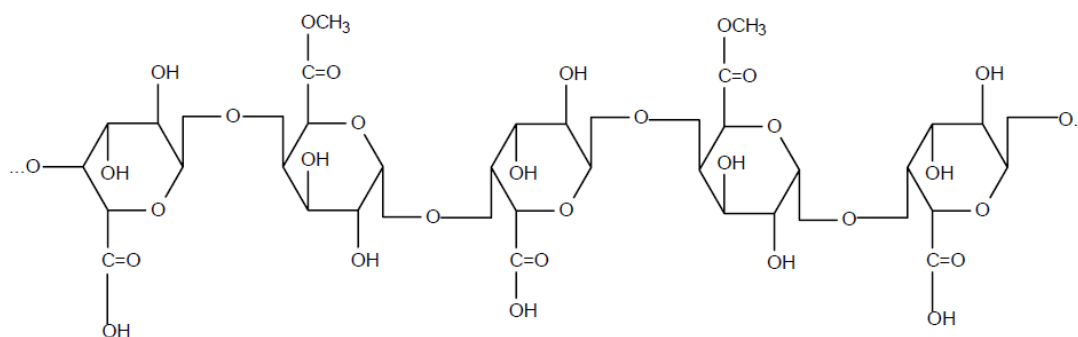
A descoberta da pectina, enquanto composto químico, foi feita por Vauquelin em 1790. Braconnot, no ano de 1824, foi o primeiro pesquisador a caracterizar a pectina como composto das frutas responsável pela formação do gel e sugerir o nome de pectina, proveniente do grego que significa espesso (Braverman & Berk, 1976 *op cit* Canteri, 2010). A ocorrência de substâncias pécticas diferindo em solubilidade e facilidade de extração é conhecida desde o ano de 1848, quando o pesquisador Fremy reportou a existência de um precursor péctico insolúvel em água, denominado posteriormente de protopectina por Tschirch (Joslin & Deuel, 1963 *op cit* Canteri, 2010). Até o ano de 1930, a pectina era considerada como uma pequena estrutura cíclica; o pesquisador Smolenski, em 1923, foi o primeiro a sugerir que a pectina era um polímero complexo, comparável com a estrutura do amido, sendo que as análises de difração de raios-X concordavam com essa hipótese, mas indicaram que a semelhança com a celulose era mais coerente (Owens *et al.*, 1946 *op cit* Canteri, 2010).

A produção industrial de pectina cítrica no Brasil teve início em 1954, em São Paulo, na cidade de Limeira. A primeira fábrica de extração de pectina cítrica foi fundada pelo químico industrial italiano Bruno Palladino, - atualmente é conhecida como CP Kelco Brasil - sendo a única fábrica de pectina no país e a maior produtora mundial de pectina cítrica (ACIL, 2013). A maioria dos países importa a pectina, mas a produção por pequenos processadores poderia suprir a demanda com custo mais baixo, desde que existisse incentivo governamental. No entanto, existem algumas barreiras que ainda necessitam ser superadas, como o custo, a dificuldade para o isolamento da pectina sob a forma de pó em pequena escala e a obtenção de pectinas com propriedades específicas, recomendadas para diferentes aplicações. A maior parte da pectina utilizada nos EUA é importada, principalmente, da Europa e das Américas Central e do Sul (ITDG, 2006).



### 2.2.1.2 Estrutura molecular

A pectina, enquanto composto químico, é constituída de uma cadeia principal linear de unidades repetidas de ácido D-galacturônico ligados covalentemente por ligações  $\alpha$ -(1,4), como mostra a Figura 4; a cadeia principal pode ser interrompida por unidades de L-ramnose através de ligações  $\alpha$ -(1,2), às quais estão ligadas cadeias laterais, formadas por açúcares, principalmente unidades de galactose e arabinose (Yapo & Koffi, 2006; Yapo *et al.*, 2007). Os grupos ácidos carboxilas dos monômeros dos ácidos galacturônicos podem, ou não, estar esterificados com grupamentos metil, sendo a porcentagem dos grupos esterificados expressa como grau de metoxilação (Yapo *et al.*, 2007).



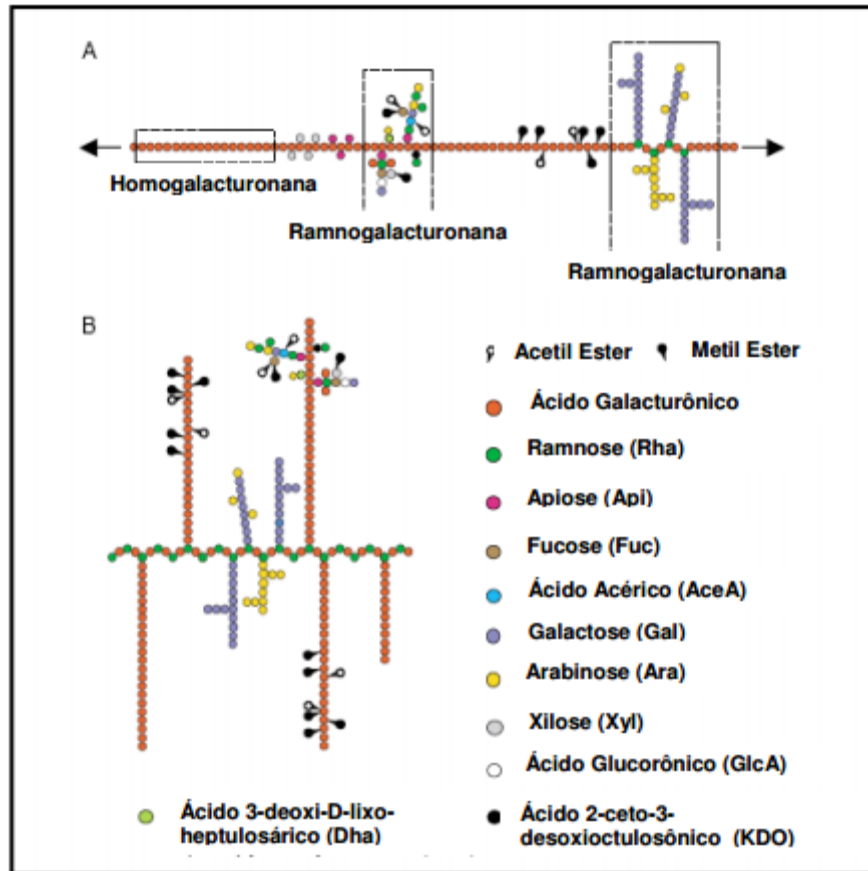
**Figura 2.4** Estrutura de ácidos galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ - (1,4).

A estrutura química das pectinas pode ser heterogênea entre as espécies de vegetais, entre tecidos e, até mesmo, partes do fruto, resultando na enorme variedade das estruturas da pectina. O conteúdo e composição dos açúcares, comprimento da cadeia, grau de metoxilação e de acetilação, são fatores que podem interferir no rendimento de extração (Yapo *et al.*, 2007).

As pectinas são formadas por três principais frações: a fração linear, conhecida como homogalacturonana (HG), e as frações ramificadas, conhecidas como ramnogalacturonana I (RG-I) e ramnogalacturonana II (RG-II), esquematicamente mostradas na Figura 5A (Willats *et al.*, 2006). As HG são polímeros constituídos por longas

cadeias de unidades de ácido galacturônico em ligação  $\alpha$ -(1,4), que podem estar parcialmente esterificadas, razão pela qual são mais resistentes à hidrólise. Unidades de ramnose podem ser encontradas ocasionalmente na homogalacturonana (Kjoniksen *et al.*, 2005). A RG-I é o segundo polissacarídeo mais importante das pectinas e sua cadeia consiste da repetição de unidades de dissacarídeos de ácido galacturônico e ramnose, apresentando cadeias laterais formadas por diferentes açúcares, principalmente, arabinanas e galactanas, ligados diretamente às unidades de ramnose, em C-4 (Gulfi *et al.*, 2007). A RG-II é um polissacarídeo péptico complexo de baixa massa molar, formado por ácido galacturônico, ramnose, galactose e alguns açúcares raros como apiose, ácido acérico (Vidal *et al.*, 2000; Gulfi *et al.*, 2007).

Num primeiro momento, foi visto que a estrutura principal da pectina era formada pelas homogalacturonanas, com ligações simples chamadas de “regiões lisas”, e as ramnogalacturonanas, com ramificações contendo vários açúcares, chamadas de “regiões em cabeleira” (*hairy region*), como mostrado na Figura 5A. Mais tarde, uma nova estrutura foi estudada, na qual HG pode ser considerada como uma cadeia lateral da RG-I (Figura 5B), o que causou grande impacto nos estudos de estrutura das pectinas (Vincken *et al.*, 2003; Willats *et al.*, 2006).



**Figura 2.5** Representação esquemática da estrutura inicialmente estabelecida (A) e da estrutura atualmente conhecida (B) das pectinas. Fonte: Willats *et al.* (2006).

### 2.2.1.3 Grau de metoxilação e esterificação

As pectinas apresentam parte dos grupos carboxilas da cadeia principal de ácido galacturônico esterificados, sendo o substituinte mais comum o grupo metila (Sriamornsak, 2003), sendo que essa substituição é expressa em grau de metilação (DM) ou grau de esterificação (DE). Na prática, o grau de esterificação e metilação são utilizados de forma indistinta, porém o DM corresponde ao percentual total de resíduos de ácido galacturônico esterificados apenas com grupos metila (Huismann *et al.*, 2004), enquanto que o DE corresponde à razão dos grupamentos esterificados de ácido D-galacturônico pelo total de grupamentos de ácido galacturônico. O DE inclui outros grupos que podem promover a esterificação além dos grupos metila, como os grupamentos acetila (Sriamornsak, 2003).

O grau de esterificação desempenha um importante papel na capacidade da pectina para formar um bom gel, sendo parâmetro para indicar as propriedades físicas e funcionais tecnológicas das pectinas (Wong, 1995), juntamente com outros fatores como massa molar, pH, presença de açúcares (Mikkelsen, 2006).

O grau de esterificação de 50% é utilizado como um parâmetro de referência, sendo que as pectinas são comercialmente classificadas em pectinas de alto grau de esterificação - quando contêm acima de 50% de seus grupos carboxílicos esterificados - e de baixo grau de esterificação - quando valores iguais ou inferiores a 50% destes grupos apresentam-se esterificados (Turquois *et al.*, 1999). O mecanismo de geleificação da pectina depende do grau de esterificação; pectinas de alto DE formarão gel em pH próximo a 3,6 e na presença de açúcares em concentração maior que 65%. A função do açúcar na formação de géis de pectinas de alto DE é de estabilizar as “zonas de junção”, promovendo interações hidrofóbicas entre os grupos metil esterificados (Willats *et al.*, 2006). Nas pectinas de baixo grau de esterificação, as “zonas de junção” são formadas por ligações de íons cálcio com os grupos carboxílicos livres (Buchanan *et al.*, 2000).

Pectinas de baixo grau de esterificação, que requerem controle da quantidade de íons cálcio para formar géis, podem ser utilizadas como agente geleificante em produtos com baixo teor de açúcares, como geleias e gelatinas *light* (Iglesias & Lozano, 2004). Os géis resultantes são termo reversíveis, mais macios e mais elásticos do que os obtidos de pectinas de alto grau de esterificação (Belitz & Grosch, 1997; Penna, 2002). A literatura ressalta que pectinas de baixo grau de esterificação possuem limitadas aplicações como agentes geleificantes (Arsalan, 1995; Michel *et al.*, 1985).

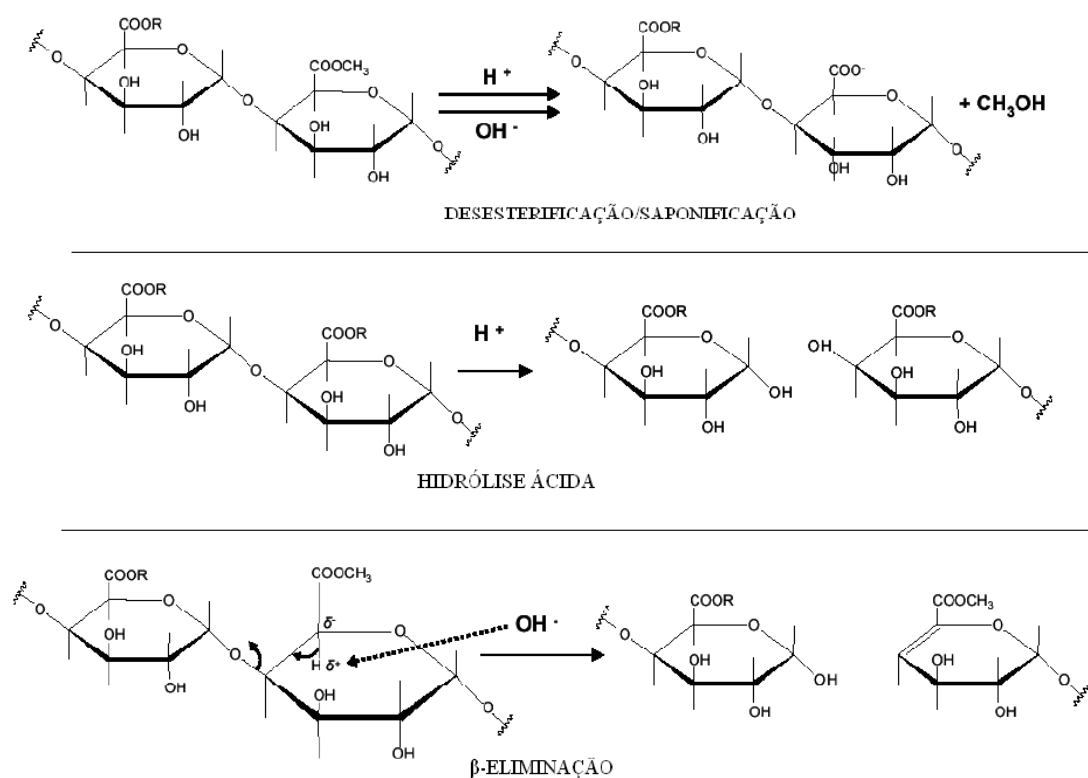
Pectinas de alto grau de esterificação são consideradas mais importantes e são utilizadas como agentes geleificantes na produção de geleias, marmeladas, estabilizantes de bebidas e sorvetes e produtos de confeitaria. Na pectina de alto DE, as zonas de junção são formadas por ligações cruzadas do ácido galacturônico por pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas entre os grupos metil. O abaixamento do pH (2,2 a 3,0) e a elevada concentração de açúcares (> 60%) facilita este processo e induz a redução da solvatação da pectina, aumentando a interação entre as suas moléculas (May, 1990).

A presença de cadeias laterais, principalmente com unidades de arabinose e galactose, afeta significativamente as propriedades funcionais das pectinas, tais como solubilidade, geleificação, formação de filme e propriedades reológicas, além de favorecer a agregação em soluções concentradas (Brandão & Andrade, 1999). A concentração da pectina também é um fator importante, sendo necessária sua presença, em produtos que necessitem a formação de gel, de pelo menos 0,1-1% para que a geleificação ocorra, visto que, em quantidades reduzidas, géis frágeis podem ser formados (Corredig *et al.*, 2000).

#### ***2.2.1.4 Degradação da pectina***

As pectinas podem ser degradadas através de hidrólise ácida, alcalina ou enzimática. Em meio ácido (pH entre 1 a 3) e temperaturas inferiores a 10 °C, predominam as desesterificações (Figura 6) (Thibault & Petit, 1979). A primeira fase desta degradação consiste na eliminação de um número variável de grupos metoxila (desesterificação), formando o ácido poligalacturônico, o qual contém grande número de grupamentos carboxílicos e, por isso, possui alta solubilidade em água (Braverman, 1976). Outro mecanismo, denominado de despolimerização (Figura 6) (diminuição do tamanho da cadeia polimérica), pode acontecer por hidrólise (ácida ou enzimática) das ligações  $\alpha(1-4)$  em temperaturas acima de 10 °C. Porém, a não ser que sejam condições drásticas, essas reações não chegam a comprometer as características gerais da pectina (Thibault & Petit, 1979).

Em meio alcalino ocorre uma desmetoxilação rápida, assim como a degradação que se inicia pela ruptura da ligação glicosídica em C<sub>5</sub>, esse mecanismo é conhecido como  $\beta$ -eliminação (figura 6) (Thibault *et al.*, 1991).



**Figura 2.6** Principais modificações que ocorrem nas substâncias pécicas. Fonte: Colin-Henrion (2008).

Existem enzimas que catalisam diferentes etapas da degradação das pectinas: as pectinesterases catalisam a eliminação dos grupos metoxila da molécula pécica; as poligalacturonases catalisam a hidrólise glicosídica do ácido poligalacturônico em unidades individuais de ácido D-galacturônico; as pectinadespolimerase quebram a molécula de pectina em moléculas menores; e as polimetilgalacturonases que também quebram a ligação glicosídica, no entanto, em contraste com as poligalacturonases, podem atuar sobre o polímero totalmente metilado (Serrat *et al.*, 2002).

No presente trabalho, há uma maior possibilidade de ocorrer a despolimerização da cadeia polimérica, uma vez que as extrações ocorreram em meio ácido (pH 0,3-2,0) e em temperaturas superiores a 30°C. A desesterificação, por sua vez, que costuma ser evidente

em temperaturas inferiores a 10°C, tem uma menor probabilidade de ocorrer nas extrações estudadas uma vez que as temperaturas utilizadas foram maiores do que 10°C.

#### ***2.2.1.5 Fontes e aplicações da pectina***

A pectina, em função de seu caráter hidrofílico, devido à presença de grupos polares, apresenta a propriedade de envolver grande quantidade de água, produzindo uma solução viscosa. Em função dessa capacidade, a pectina é amplamente utilizada no preparo de geleias, doces de frutas, iogurtes, produtos de confeitaria, sucos de frutas e em outros ramos da indústria de alimentos. Há, ainda, outras propriedades da pectina, podendo ser citadas: a prevenção de flotação em preparados de frutas, a estabilidade de produtos de panificação, a estabilização proteica, a maciez a partir da melhoria da textura e o aumento do volume (Voragen *et al.*, 2009). As pectinas também são utilizadas em alimentos como espessantes, texturizantes, emulsificantes ou estabilizantes (Bowers, 1992).

Em relação aos efeitos farmacológicos da pectina, ela encontra-se dentro do grande grupo das fibras dietéticas, integrando o grupo dos polissacarídeos não-amiláceos, juntamente com as gomas, hemiceluloses,  $\beta$ -glucanas, entre outros. Estes compostos não são degradados por enzimas humanas; porém, podem ser degradados pela microbiota natural, principalmente durante a passagem pelo intestino grosso, dando origem a ácidos graxos de cadeia curta (acético, butírico e propiônico), sendo que tal fato é responsável pelo uso da pectina como um prébiótico (Masnderson *et al.*, 2005). Existem outras propriedades de promoção à saúde, comprovadas cientificamente, associadas às substâncias pécticas, dentre elas pode-se destacar a redução do colesterol total (Brouns *et al.*, 2011); redução do risco de doenças cardiovasculares; redução do peso corporal pela imobilização de nutrientes no intestino e aumento da sensação de saciedade (Kendall *et al.*, 2010; Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

A pectina pode ser utilizada para fins não alimentícios, incluindo produção de filmes biodegradáveis, adesivos substitutos de papel, espumas e plastificantes, agentes de

superfície para produtos médicos, materiais para implantes biomédicos e sistemas de liberação de fármacos (Mohnen, 2008).

### ***2.2.1.6 Extração convencional da pectina***

A extração sólido-líquido pode ser descrita como uma Operação Unitária que envolve a remoção de um componente desejado (soluto) de um alimento usando-se um líquido (solvente) que é capaz de dissolver o soluto. Esse processo ocorre através da mistura do sólido, que contém o composto a ser extraído, com o solvente, podendo acontecer em um único ou em múltiplos estágios e em um tempo predeterminado; por fim, o solvente é separado e recuperado (Fellows, 2006).

Durante a extração, alguns fatores devem ser levados em consideração, destacando-se:

tempo: o tempo de contato deve ser suficiente para que o solvente dissolva uma quantidade satisfatória de soluto, e para que as mudanças na composição alcancem o equilíbrio (Mesbahi *et al.* 2005; Fellows, 2006);

temperatura: quanto mais alta a temperatura durante a extração, maior é taxa na qual o soluto se dissolve no solvente; porém, em alguns casos, acima de determinada temperatura, o rendimento do processo começa a diminuir (esse comportamento esta associado à degradação dos compostos extraídos) (Mesbahi *et al.* 2005; Mesbahi *et al.*, 2009; Prasad *et al.*, 2011);

área superficial dos sólidos: a taxa de transferência de massa é diretamente proporcional à área superficial; dessa forma, a redução no tamanho das partículas aumenta a taxa de extração até certos limites (Fellows, 2006);

viscosidade do solvente: a viscosidade deve ser baixa para permitir ao solvente penetrar facilmente no leito das partículas sólidas (Fellows, 2006);

taxa de fluxo do solvente: taxas de fluxos altas reduzem a camada limite de soluto concentrado na superfície das partículas e aumentando a taxa de extração (Fellows, 2006).



O processo de obtenção da pectina envolve geralmente três etapas principais: primeiramente a extração aquosa do material da planta, seguida da purificação do extrato líquido e, por fim, a separação do extrato da pectina do líquido. A extração da pectina pode ser realizada por meio aquoso ácido, básico, com agentes quelantes ou por ação de enzimas. O processo de extração básica resulta em pectinas de baixo grau de esterificação, como resultado da saponificação dos grupos ésteres, enquanto que o processo de extração ácida geralmente resulta em pectinas de alto grau de esterificação, próximo do grau de esterificação de ocorrência natural (Levigne *et al.*, 2002).

Normalmente, as pectinas são extraídas com água acidificada com ácidos fosfórico, acético, sulfúrico, nítrico ou clorídrico em pH variando de 1 a 3 em temperatura entre 80 e 100 °C. Diversos trabalhos têm reportado que fatores como temperatura, pH, tempo e tipo de ácido podem influenciar, não somente no rendimento da pectina, mas também na estrutura química do produto final (Pagán *et al.*, 2001; Levigne *et al.*, 2002, Koubala *et al.*, 2008).

Estudos recomendam o uso de ácido clorídrico (Iglesias & Lozano, 2004; Mesbahi *et al.*, 2005), e ácido nítrico (Pagán *et al.*, 2001; Levigne *et al.*, 2002) como agentes extratores. Segundo Mesbahi *et al.* (2005), períodos longos de aquecimento na extração da pectina em temperatura acima de 90 °C podem provocar a hidrólise e degradação da pectina, resultando em uma molécula de baixa massa molar. Canteri-Schemin *et al.* (2005) extraíram e caracterizaram a pectina presente no bagaço de maçã e observaram um rendimento de 17,82 % (b.s) utilizando ácido cítrico na concentração de 6,20 % (p/v) a 100 °C por 153 minutos, e a pectina obtida apresentou grau de esterificação de aproximadamente 68,84 %. Marcon (2004) obteve resultado semelhante, com um rendimento de 16,8 % (p/p), quando extraiu pectina com 5% (p/v) de ácido cítrico a 100 °C durante 80 minutos.

Klieman *et al.* (2009) encontraram valores entre 1,1-27,7% em extração com ácido nítrico do mesocarpo de maracujá-amarelo, sob diferentes condições. O rendimento total de pectina extraída com água acidificada de 14,2% da casca de maracujá desidratada foi encontrado por Yapo & Koffi (2006) em extração sequencial, sob condições mais severas.

O rendimento descrito por Yapo (2009a) para pectinas obtidas a partir de resíduos de indústria de suco de maracujá foi de 6,5 % para extração com ácido nítrico 10 mM. Rendimentos de pectinas entre 3,9-10,8 % foram obtidos para o mesmo resíduo por extração com ácido cítrico ou suco de limão com pH equivalente (Yapo, 2009b). Para justificar esses diversos valores é importante enfatizar que existem algumas diferenças que influenciam o resultado do processo como as condições endoclimáticas do fruto, o tratamento antes da extração (relativo à matéria-prima), a razão soluto/solvente e o tempo de extração. Vale ressaltar a importância da rápida desidratação da matéria-prima de origem industrial, a fim de evitar a ação de enzimas e fungos produtores de enzimas pectínicas (May, 1990; Thakur *et al.*, 1997).

D'Addosio *et al.* (2005) extraíram e caracterizaram a pectina da casca do maracujá amarelo em diferentes graus de maturação. As extrações foram realizadas com ácido clorídrico, fosfórico e uma mistura dos dois ácidos. A pectina de melhor qualidade, ou seja, maior grau de esterificação e teor de ácido galacturônico, foi obtida quando o ácido clorídrico foi utilizado como agente extrator.

Kliemann (2006) extraiu e caracterizou a pectina da farinha da casca do maracujá amarelo com e sem flavedo; foram realizadas extrações com ácidos cítrico, clorídrico e nítrico e foi observado que o rendimento e as características da pectina extraída variaram dependendo das condições de extração. O melhor rendimento (70 % matéria seca) foi obtido com ácido cítrico, nas condições de extração de 90 °C, pH 1,2 por 10 min, não havendo diferença estatística entre as amostras com e sem flavedo. Entretanto, estas condições de extração afetaram a estrutura química da pectina, levando à obtenção de uma pectina de baixo grau de esterificação. Resultados similares foram obtidos por Yapo & Koffi (2006), que fracionaram as substâncias pectínicas da casca de maracujá amarelo com água, oxalato de amônia e soluções diluídas de ácido nítrico, obtendo uma fibra com alto conteúdo de ácido galacturônico (maior que 65 %) e com baixo grau de esterificação.

## 2.3 Tecnologias alternativas para a extração da pectina

A extração de um composto a partir de um tecido vegetal tem como objetivo a obtenção de um elevado rendimento de extração, com um mínimo de impacto nas propriedades do composto extraído e, ainda, minimizar a extração de compostos indesejáveis. Dentro desse contexto, a utilização de um método adequado na extração da pectina é importante para aumentar o rendimento de extração e melhorar a qualidade da fibra extraída. Inúmeras publicações científicas têm estudado a influência de condições de extração nas características físico-químicas e propriedades funcionais tecnológicas da pectina extraída, a partir de vários tecidos de plantas (Koubala *et al.*, 2008; Levigne *et al.*, 2002; Yapo, 2009; Yapo *et al.*, 2007, Guo *et al.*, 2012, Wai *et al.*, 2010; Liew *et al.*, 2014; Minjares-Fuentes *et al.*, 2014).

Os métodos mais comumente usados para a extração de pectina incluem ebulição direta e aquecimento por micro-ondas (Yeoh *et al.*, 2008); porém, além de consumirem muito tempo e apresentarem um alto consumo energético, utilizam grande quantidade de solventes. Devido a isso, novas tecnologias vêm sendo estudadas para a extração de compostos de fontes vegetais, destacando-se entre elas, o campo elétrico moderado (Oliveira *et al.*, 2015), a alta pressão hidrostática (Strati *et al.*, 2015) e o ultrassom (Barrales *et al.*, 2015). Evidências científicas mostraram que estas tecnologias alternativas apresentam um aumento na eficiência do processo, melhora no rendimento de extração e na qualidade do composto extraído e, também, podem ser conduzidas em temperaturas relativamente baixas, levando a uma menor degradação de compostos termolábeis (Tiwari, 2015; Wang *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009).

Nesta seção são abordadas as três tecnologias para a extração da pectina e que foram estudadas experimentalmente neste trabalho: campo elétrico moderado (CEM), alta pressão hidrostática (APH) e ultrassom (US)

### 2.3.1 Campo elétrico moderado

As tecnologias elétricas consistem na passagem ou manutenção do alimento em um campo elétrico gerado por eletrodo, ocasionando a formação de dipolo elétrico a partir do

emprego de corrente elétrica alternada. O dipolo acarreta a polarização das cargas das células, com efeito, principalmente, nas membranas das células e de organelas citoplasmáticas, as quais são constituídas de lipoproteínas com cargas positivas e negativas de acordo com os aminoácidos constituintes. A polarização das cargas das membranas ocasiona a formação de poros que, conseqüentemente, podem levar a morte das células microbianas e um incremento na extração de compostos em células vegetais (Zhang *et al.*, 1995; Vorobiev & Lebovka, 2008).

As principais características e vantagens dos processos que utilizam campo elétrico são listadas a seguir.

- ✓ Aquecimento volumétrico dos alimentos por geração interna de calor, sem as limitações ou as não uniformidades das trocas de calor convencionais.

- ✓ A temperatura das partículas pode ser igual ou maior que a dos líquidos, o que não é atingido pelo método convencional.

- ✓ Redução de queima do produto, resultando em um mínimo dano mecânico e melhor retenção de vitaminas e nutrientes.

- ✓ Alta eficiência energética, 90% da energia elétrica é convertida em calor (Ghnnimi *et al.*, 2008).

- ✓ Fácil controle do processo, pois pode ser ligado e desligado instantaneamente.

- ✓ Sistema menos agressivo ao meio ambiente.

O uso de tecnologias elétricas vem sendo explorado desde o século passado com o intuito de implantar essas tecnologias na indústria de alimentos. Os estudos relacionados com essa tecnologia iniciaram em técnicas de branqueamento, evaporação, pasteurização, desidratação e a extração de compostos presentes em tecidos vegetais (FDA, 2000). Após alguns anos de utilização, essas tecnologias acabaram sendo abandonadas devido aos altos preços da eletricidade da época e aos efeitos de eletrólise (Bansal & Chen, 2006). Na década de 1980, estas tecnologias começaram a ser reutilizadas com a finalidade de esterilização contínua de misturas sólido-líquidas e pasteurização. Após esforços iniciais, o

progresso tem ocorrido em um ritmo constante e, a partir de nos anos 1990, o número de instalações comerciais tem crescido e novos fabricantes entraram no mercado (Herrick *et al.*, 2000; Bansal & Chen 2006; Sastry, 2008).

Primeiramente, acreditava-se que os efeitos ocasionados pela aplicação da corrente elétrica eram devido ao aquecimento ocorrido pela transformação da energia elétrica em térmica (fenômeno conhecido como aquecimento Joule) e que o campo elétrico aplicado não teria efeitos sobre as células biológicas (Sastry, 2008; Herrick *et al.*, 2000). No entanto, mais recentemente, percebeu-se a existência dos efeitos não térmicos associado à aplicação da corrente elétrica. Isso resultou no desenvolvimento de uma classe de processos denominado de Campo Elétrico Moderado que compreende os processos que envolvem campos elétricos inferiores a  $1000 \text{ Vcm}^{-1}$  e frequências na ordem de 20 a 50 Hz (Sastry, 2008).

### ***2.3.1.1 Princípios gerais do processamento utilizando campo elétrico moderado***

Embora o principal interesse para a indústria de alimentos esteja relacionado com a aplicação de campo elétrico na esterilização e pasteurização de alimentos sólido-líquido, outras aplicações úteis têm sido identificadas nos últimos dez anos. Em particular, a interação de campos elétricos com materiais biológicos apresenta um crescente interesse para o processamento de alimentos.

Os processos que se baseiam exclusivamente nos efeitos não térmicos da eletricidade, ou a combinação dos efeitos elétricos e térmicos, são descritos como Campo Elétrico Moderado (Sastry, 2008). Ao contrário do campo elétrico pulsado, que trabalha com tensões que variam de  $0,1-80 \text{ kVcm}^{-1}$  e tempos na ordem de microsegundos, o campo elétrico moderado envolve a aplicação de campos elétricos tipicamente menores do que  $1 \text{ kVcm}^{-1}$  e tempos na ordem de segundos. As moderadas tensões aplicadas têm por finalidade promover a eletroporação de células vegetais e, conseqüentemente, a extração não térmica de compostos presentes em alimentos sólidos (Kulshrestha *et al.*, 2008).

O fenômeno de eletroporação consiste num aumento significativo na permeabilidade da membrana causada pela aplicação de um campo elétrico. O modelo que

descreve a eletroporação é o modelo de poro transiente, na qual poros hidrofílicos são formados na camada lipídica da membrana celular quando exposta a um campo elétrico. O campo elétrico irá induzir uma diferença de potencial através da membrana, fornecendo a energia necessária para o rearranjo dos fosfolipídios da membrana e permitindo a formação de poros hidrofílicos (Tsong, 1991; Weaver e Chizmadzhev, 1996; Kanduser e Miklavci, 2008). A eletroporação é afetada pela intensidade do campo elétrico, tempo de tratamento, frequência aplicada e, ainda, pela composição química do meio utilizado e pelas características da célula que está exposta ao campo elétrico (Vorobiev & Lebovka, 2010).

A porcentagem de células danificadas pode ser medida pelo grau de danificação ( $Z$ ) que baseia-se em medidas de condutividade elétrica, uma vez que esse parâmetro aumenta com o dano celular. O grau de desintegração em função da condutividade elétrica ( $Z_c$ ) pode ser definido como (Lebovka *et al.*, 2002):

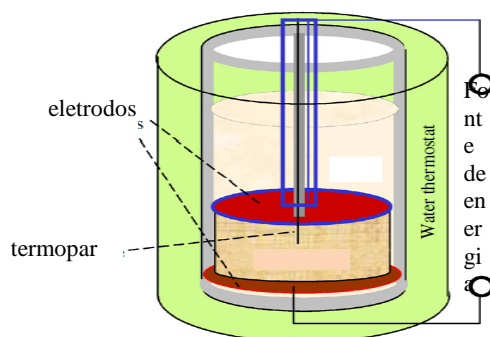
$$Z_c = \frac{\sigma - \sigma_i}{\sigma_d - \sigma_i} \quad (1)$$

onde  $\sigma$  é o valor de condutividade elétrica medido e os índices  $i$  e  $d$  referem-se às condutividades do tecido intacto e do tecido totalmente danificado, respectivamente. Valores de  $Z_c$  próximos a zero estão relacionados a um tecido pouco danificado e próximos a 1, a um tecido altamente danificado.

O grau de desintegração utilizado para avaliar a desintegração celular pode ser considerado um método direto e pode ser utilizado para uma estimativa aproximada do impacto do tratamento em tecidos vegetais (Vorobiev & Lebovka, 2011).

A unidade de processamento de alimentos típica para campos elétricos é um sistema composto por uma fonte de energia, um sistema de aquisição de dados e uma câmara de tratamento (Wan, 2009). Na Figura 7 pode ser observado um diagrama esquemático mostrando o princípio de funcionamento do campo elétrico moderado. O sistema de fornecimento de energia normalmente é composto por um estabilizador e um variador de tensão. O sistema de aquisição de dados é responsável pelo monitoramento e registro dos dados relativos à corrente elétrica, tensão e temperatura em função do tempo. A câmara de tratamento possui dois eletrodos e é entre eles que se posiciona o alimento a ser tratado,

além de possuir um conjunto de dispositivos de monitoramento e controle (Soliva-Fortuny *et al.*, 2009). As câmaras podem ser estáticas ou contínuas; as estáticas tratam os alimentos em bateladas e são utilizadas com eficiência em atividades de pesquisa. As câmaras contínuas, por sua vez, proporcionam um fluxo contínuo e são mais adequadas aos processos industriais. Com a finalidade de maximizar a eficiência das câmaras, diferentes formatos surgiram nas últimas décadas, levando sempre em conta a possibilidade de um tratamento homogêneo com máxima eficiência e que minimize possíveis reações eletroquímicas e ruptura dielétrica no alimento enquanto o mesmo estiver sendo submetido ao tratamento de campo elétrico moderado (Ramos, 2006).



**Figura 2.7** Diagrama esquemático mostrando o princípio de funcionamento campo elétrico moderado. Adaptado de Lebovka *et al.*, (2007).

### ***2.3.2.2 Processamento de alimentos por campo elétrico moderado***

A extração de sólidos é amplamente utilizada para fins farmacêuticos e, na indústria de alimentos, tem a finalidade de remover componentes importantes de matrizes vegetais. O campo elétrico moderado pode ser utilizado para a maximização da extração de compostos devido à permeabilização temporária ou definitiva da membrana celular resultando num melhoramento de transferência de massa (Şensoy & Sastry, 2004a Kulshrestha & Sastry, 2003).

Em alimentos de origem vegetal, os compostos bioativos encontram-se, na grande maioria das vezes, no interior das células, as quais necessitam ser danificadas para facilitar

a recuperação da matéria intracelular. Técnicas convencionais de danos, como a fragmentação mecânica, tratamentos térmicos, químicos e enzimáticos podem levar a um maior grau de desintegração dos componentes do tecido, incluindo parede celular e membranas celulares o que pode acarretar na perda parcial do composto de interesse. O campo elétrico moderado pode ser usado para promover uma extração mais seletiva dos compostos celulares, por promover a formação de poros além de ser menos destrutivo do que os métodos convencionais (Vorobiev & Lebovka, 2010).

Sensoy & Sastry (2004) estudaram a extração de sólidos da folha de chá preto e hortelã utilizando o campo elétrico moderado e extração com água quente. Neste estudo, foi observado que houve uma melhora na lixiviação do soluto do material vegetal fresco quando comparado apenas com o aquecimento. Porém, não foi observado diferença quando a amostra foi previamente seca; também foi observado que uma diminuição na frequência implica num aumento da permeabilização da membrana.

Kulshrestha & Sastry (2003) estudaram a variação da frequência e tensão sobre a difusão de compostos sólidos presentes na beterraba. As frequências testadas variaram entre 0 e 5000 Hz e as intensidades de campo entre 0 e  $23,9 \text{ Vcm}^{-1}$ , enquanto que a temperatura foi mantida em  $45^\circ\text{C}$  durante o processo, tendo sido notado um aumento na difusão com o aumento do campo elétrico, enquanto que com o aumento da frequência não foi observado melhora na difusão dos compostos sólidos.

Os efeitos da aplicação de campo elétrico moderado sobre o tecido da beterraba foi discutido por Lebovka *et al.* (2007) que observaram que a intensidade de campo de  $100 \text{ Vcm}^{-1}$  desintegra de forma eficaz o tecido de beterraba a temperaturas moderadas de aquecimento ( $50\text{-}60^\circ\text{C}$ ) por tempos inferiores a 100 s. Assim, em tais condições de tratamento, os resultados produzidos pelos efeitos térmicos são dispensáveis e a desintegração observada ocorre devido à eletroporação.

Vários estudos vêm demonstrando que o campo elétrico moderado é capaz de promover a extração de compostos presentes em tecidos vegetais tais como, o aumento da extração da sacarose a partir de beterraba (Lebovka *et al.*, 2007), maiores rendimentos de extração de suco de maçã quando a mesma é submetida a um campo elétrico (Wang *et al.*,



2002) e extração de substâncias solúveis presentes na maçã (Jemai *et al.*, 2002). Porém, são escassas as informações sobre a extração de fibras, não sendo encontrados estudos que relatem a extração da pectina da casca do maracujá, justificando a proposta de pesquisa do presente trabalho.

### **2.3.2 Alta pressão hidrostática**

A alta pressão hidrostática (APH) tem sido reconhecida como uma tecnologia “amiga” do ambiente, segundo a *Food and Drug Administration* (FDA, 2007), e está sendo utilizada com sucesso nas indústrias químicas, cerâmicas e de plásticos por décadas; no entanto, a indústria de alimentos não havia reconhecido a sua potencial aplicação até o meio da década de 1980 (Huang *et al.*, 2013).

O primeiro registro da utilização de alta pressão hidrostática para o processamento de alimentos foi feito em 1899 pelo pesquisador Hite que investigou sua aplicação como meio de conservar o leite obtendo resultados satisfatórios (Hite, 1899). Mais tarde, em 1914, estudos foram realizados com respeito à conservação de frutas e legumes que também pareceu ser eficaz (Hite *et al.*, 1914). Infelizmente, desvantagens tecnológicas tornaram difícil o desenvolvimento desta técnica. Passados aproximadamente 80 anos, o Japão redescobriu o interesse da indústria pela alta pressão e, desde então, esta tecnologia tem sido adaptada às necessidades específicas da indústria de alimentos (Zimmerman & Bergman, 1993).

Atualmente esta tecnologia é aplicada para a conservação e transformação de alimentos, incluindo a destruição de microrganismos, a inativação da atividade enzimática, a mudança de fases e a alteração da conformação de biopolímeros (Bang & Chung, 2010). Segundo Guerrero-Beltran *et al.*, (2009), a APH também é capaz de fazer algumas alterações estruturais nos alimentos, tais como danos e deformações nas células e nas suas membranas, desnaturar proteínas e enzimas e, ainda, causar a ruptura de ligações fracas, como a ligação de hidrogênio, van der Waals e ligações hidrofóbicas. Além disso, as altas pressões causam o colapso dos vacúolos intracelulares e danos à parede celular e às membranas citoplasmáticas e, por isso, vêm sendo estudadas para a extração de compostos

bioativos a partir de diferentes matrizes vegetais (Fellows, 2006; Jun *et al.*, 2010; Corrales *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014).

O processo de extração de compostos bioativos a partir de materiais vegetais pode ser descrito como um fenômeno de transferência de massa onde os sólidos contidos na matriz das plantas são transferidos para os solventes até a sua concentração de equilíbrio. Os fenômenos de transferência de massa podem ser maximizados com a aplicação da alta pressão (Butz e Tausher 2002). O aumento no rendimento da extração causado pela alta pressão é atribuído à capacidade desta tecnologia em remover prótons de grupamentos carregados, interromper pontes salinas e ligações hidrofóbicas nas membranas celulares, e, conseqüentemente, ocasionar danos à membrana e parede celular (Dornenburg & Knorr 1993). A aplicação de alta pressão hidrostática pode aumentar a transferência de massa, aumentar a permeabilidade do solvente nas células da planta e a difusão de metabólitos secundários e, ainda, encurtar o tempo e aumentar o rendimento da extração (Zhang *et al.*, 2004).

#### ***2.3.2.1 Princípios gerais do processamento utilizando alta pressão hidrostática***

A APH envolve a aplicação de pressões que variam de 100 a 1000 MPa, sendo conhecida por ser uma técnica rápida e eficaz (Ahmed & Ramaswamy 2006; Lopes *et al.*, 2010). Dois princípios formam a base do efeito da alta pressão hidrostática: o princípio de *Le Chatelier* e o princípio de pressão isostática. O princípio de *Le Chatelier* baseia-se no fato de que qualquer fenômeno de transição de fase, de mudança de conformação molecular ou uma reação química, acompanhado por uma redução de volume, é favorecido pelo aumento de pressão, e vice-versa, sendo que a pressão altera o equilíbrio da reação na direção do sistema de menor volume (Pflanzer *et al.*, 2008; Cheftel, 1995).

No processamento isostático, o produto é embalado em ausência de ar e colocado no interior do vaso de pressão (ou recipiente) para ser processado. Esse vaso contém um meio que transfere a pressão ao produto (este meio normalmente é a água) (Pelletier, 2001). Experimentos demonstraram que qualquer embalagem plástica, com flexibilidade suficiente para compensar a compressão do ar dentro dela e a redução do volume do alimento

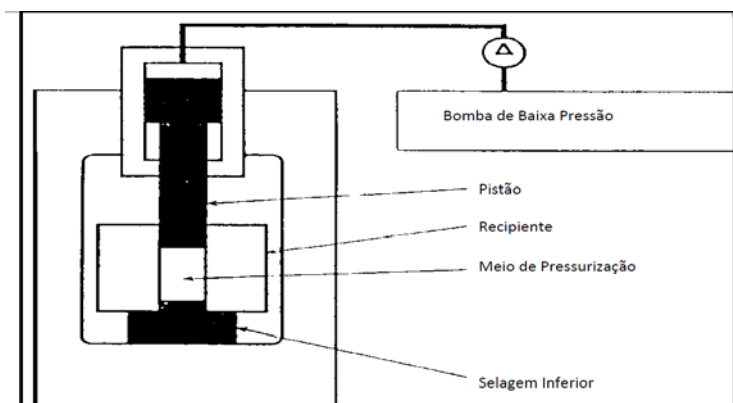
(aproximadamente 12 % a 400 MPa, ou até 15 % em pressões acima de 500 MPa) (Farkas & Hoover, 2000), pode ser adotada sem sofrer danos (Food Manufacture, 1992). Pelo princípio isostático, a pressão é instantaneamente transmitida de maneira uniforme em todos os sentidos e direções, por todo o alimento, independente do tamanho, geometria ou volume. Isso faz com que essa tecnologia se diferencie do processamento térmico, onde o calor atinge primeiramente a superfície do alimento, para depois, lentamente, chegar ao seu centro geométrico (Hogan *et al.*, 2005; Smelt, 1998).

É importante ressaltar a ocorrência de um aquecimento adiabático durante o período de compressão, havendo um aquecimento em torno de 3 °C para cada 100 MPa, podendo chegar a temperatura em torno de 20 °C quando pressões de 600 MPa são aplicadas. Também ocorre um resfriamento adiabático durante o período de descompressão do equipamento e do produto que está sendo processado (Ferreira *et al.*, 2008). Mesmo havendo o aquecimento adiabático, esta tecnologia é considerada não térmica por operar em temperaturas baixas em comparação com métodos térmicos de processamento de alimentos (Aymerich *et al.*, 2008). O processamento a alta pressão exige um tempo inicial para atingir a pressão de trabalho requerida; logo em seguida ocorre o tempo de pressurização no nível desejado, seguido da despressurização do vaso de pressão (Barbosa-Cánovas & Rodríguez, 2002).

#### ***2.3.2.2 Processamento de alimentos por alta pressão hidrostática***

O aspecto principal da tecnologia de alta pressão hidrostática é o meio fluido; a água é relativamente incompressível sob alta pressão e, devido à sua compatibilidade biológica, é o meio preferido para a aplicação de alta pressão hidrostática (Hite *et al.*, 1914). Durante o processamento de alimentos utilizando equipamento de alta pressão hidrostática, o alimento a ser processado juntamente com o solvente de extração, é embalado num saco de plástico flexível e, em seguida colocado num vaso de alta pressão, rodeado pelo meio de transmissão de pressão. O vaso de alta pressão é de aço e com espessura e resistência adequadas para que possa haver a passagem do meio pressurizador para as amostras, transmitindo uniformemente a pressão por todo o recipiente.

Uma representação esquemática de uma unidade de APH está mostrada na Figura 8. Um aspecto positivo deste processo é a possibilidade de utilizar o sistema para vários alimentos, sem o risco de contaminação cruzada ou a necessidade de limpeza entre um processamento e outro, pois os alimentos já foram previamente embalados (FAO, 2001).



**Figura 2.8** Esquema de um pressurizador. Fonte: Brites *et al.* (2010).

São diversas as vantagens conferidas aos alimentos tratados pela tecnologia de alta pressão hidrostática. Dentre elas podemos citar:

- ✓ não produz deterioração de nutrientes termolábeis, como por exemplo, as vitaminas; também, não alteram compostos de baixa massa molar, fundamentalmente aqueles responsáveis pelo sabor e aroma (Télléz-Luis *et al.*, 2001);
- ✓ a alta pressão age imediata e igualmente através de uma massa alimentar, independente do seu tamanho, forma ou composição (Cheftel, 1995);
- ✓ as altas pressões não favorecem a reação de Maillard ou de escurecimento enzimático; sendo assim, não alteram o sabor natural nem a coloração do alimento (Gross; Jaenické, 1994);
- ✓ trata-se de uma energia limpa que não produz resíduos, o que vai ao encontro das políticas de preservação do meio ambiente (Télléz-Luis *et al.*, 2001);

- ✓ a alta pressão influencia as estruturas secundárias e terciárias das proteínas e polissacarídeos, e pode alterar as propriedades funcionais destes compostos (Télléz-Luis *et al.*, 2001);
- ✓ auxilia na obtenção de altos rendimentos de extração e pode diminuir o tempo de extração (Lebovka *et al.*, 2011).

A alta pressão pode ser utilizada para a extração de composto bioativos e, neste contexto, podem ser citados os trabalhos que envolvem a extração de catequinas do chá verde (Jun *et al.*, 2010), de antocianinas de uvas (Corrales *et al.*, 2008), de flavonoides do pericarpo de lichia (Prasad *et al.*, 2009), entre outros. Porém sua principal aplicação está voltada para a inativação de microrganismos e enzimas.

Trujillo (2002) mostrou que a alta pressão hidrostática (300 a 600 MPa) tem sido eficaz para inativar microrganismos, incluindo os patogênicos, presentes no leite e derivados. Além disso, esse processo aumenta a vida de prateleira do produto e mantém características de qualidade importantes, tais como sabor, aroma, cor e preserva os nutrientes sensíveis a altas temperaturas de processamento.

Inúmeros estudos, com diferentes objetivos, vêm sendo realizados com o uso da tecnologia de alta pressão hidrostática. A aplicação dessa técnica em presunto foi estudada por Slongo (2008), que concluiu que a aplicação da APH no presunto levou à inativação da maior parte da flora presente no produto; porém, foi verificado que o controle da temperatura de armazenamento é de extrema importância, pois a qualidade e extensão da vida de prateleira do presunto processado dependem diretamente da temperatura de armazenamento.

Somkuti & Smeller (2013) estudaram o efeito da alta pressão na modificação da estrutura de proteínas alergênicas a fim de diminuir seus efeitos alérgicos. Esta investigação mostrou que a alta pressão combinada com outras técnicas é capaz de alterar a estrutura tridimensional das proteínas podendo diminuir os efeitos alérgicos; no entanto, segundo os autores, estudos mais aprofundados precisam ser realizados.

Embora a maior parte das pesquisas que envolvem o processamento de alimentos por APH estejam voltadas para a inativação de microrganismos e enzimas, nos últimos anos pesquisadores vêm dedicando estudos para a extração de compostos com atividade biológica de fontes vegetais. Strati *et al.* (2015), estudaram a extração de carotenoides da casca do tomate assistida por APH e observaram um aumento no rendimento de extração em relação ao processo de extração convencional; e ainda o tempo de processo foi reduzido em 10 minutos quando a alta pressão foi utilizada. Uribe *et al.* (2015) investigaram a extração de compostos antioxidantes do mamão (*Vasconcellea pubescens*) utilizando diferentes tecnologias. Os maiores valores encontrados para compostos fenólicos e vitamina C para as diferentes técnicas de extração estudadas pelos autores foram obtidos quando a alta pressão hidrostática foi combinada com a tecnologia de ultrassom.

Poucos são os estudos que relatam a utilização da alta pressão hidrostática para a extração de polissacarídeos como a pectina. Guo *et al.* (2012) extraíram a pectina da casca da laranja por três diferentes métodos: i) extração convencional, ii) microondas e iii) alta pressão hidrostática. Neste estudo, os autores observaram um maior rendimento para a pectina extraída utilizando a APH (20,44 %) seguido da tecnologia de microondas (18,13 %) e, por fim, a extração convencional (15,47 %). A pectina extraída por APH apresentou uma maior viscosidade dos que as pectinas extraídas pelos outros métodos, porém o grau de esterificação e o conteúdo de ácido galacturônico foram menores quando comparado com a pectina extraída pelas demais técnicas. Na sequência, o mesmo grupo de pesquisa, estudou as propriedades (potencial zeta, viscosidade aparente e microscopia) da pectina extraída por APH e por outros métodos de extração; e foi concluído que o método de extração tem influência significativa nas propriedades da pectina (Guo *et al.*, 2014).

### **2.3.3 Ultrassom**

O principal objetivo de um processo de extração de fontes vegetais é maximizar o rendimento de um composto alvo, com um impacto mínimo nas propriedades deste composto e, simultaneamente, minimizar a extração de substâncias indesejáveis. Nas

técnicas de extração convencional, vários solventes clorados (por exemplo, clorofórmio, tetracloreto de carbono e clorobenzeno) e solventes não clorados (por exemplo, clorofórmio, tetracloreto de carbono, tetracloreto de carbono, tetracloreto de carbono, clorobenzeno e ácido nítrico) são utilizados para a extração a partir de diferentes matrizes vegetais, dependendo das propriedades do composto a ser extraído. Riscos de segurança, toxicidade de certos solventes e presença de resíduos de solventes no composto de interesse, juntamente com baixo rendimento de extração e elevado tempo de processo tem estimulado o interesse em utilizar tecnologias de extração alternativas que minimizem o uso de solventes e o tempo de extração e ainda aumentem o rendimento de extração.

O interesse industrial por processos mais sustentáveis e a exigência dos consumidores por alternativas e ingredientes naturais que agridem o mínimo possível o meio ambiente são fatores que intensificam a busca por novas tecnologias para o processamento de alimentos. Dentro desse contexto, o uso de ultrassom para a extração de compostos bioativos de fontes vegetais oferece um enorme potencial para reduzir o uso de solventes químicos e, ainda, é capaz de aumentar o rendimento de extração e qualidade do extrato. Além disso, a extração assistida por ultrassom é considerada uma técnica de extração a frio, visto que a temperatura durante o processo de extração pode ser controlada em valores relativamente baixos e, por isso, afetada minimamente o composto extraído (Tiwari *et al.*, 2015).

Entre as inúmeras técnicas de extração, a aplicação de ultrassom aumentou nas últimas décadas devido às várias desvantagens associadas a outras técnicas de extração, como elevado investimento de capital, alto consumo de energia e consumo de solventes orgânicos. Além disso, o ultrassom é fácil de usar, versátil e flexível e, ainda, é uma tecnologia de extração para várias moléculas, incluindo polissacarídeos, óleos essenciais, proteínas, peptídeos, corantes, pigmentos e moléculas bioativas de importância comercial (Wang *et al.*, 2006; Luque-Garcia *et al.*, 2004; Shirsath *et al.*, 2012).

### **2.3.2.1 Princípios gerais do processamento utilizando ultrassom**

O ultrassom (US) é um processo que utiliza a energia de ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior à capacidade auditiva do ouvido humano. Estas ondas geram uma única vibração que causam variações na pressão do líquido, gerando a cavitação. Este fenômeno aumenta a transferência de massa entre as interfaces, ocorrendo a quebra da parede celular, ocasionada pelo colapso das bolhas e permitindo maior penetração do solvente na matriz de extração (Prakash maran *et al.*, 2013).

A história de avanços científicos e a descoberta de ultrassom estão enraizados no estudo do som feito por Isaac Newton que propôs sua teoria de ondas sonoras em 1687 (Mason, 1998). A diferença fundamental entre o som e o ultrassom é a frequência da onda; geralmente, as ondas sonoras são divididas em três categorias que abrangem diferentes faixas de frequência, mostradas a seguir:

- ✓ ondas sonoras que se encontram dentro da gama de sensibilidade do ouvido humano (10 Hz – 20 kHz);
- ✓ ondas infrassônicas que tem frequência abaixo da faixa audível (<16 Hz); e
- ✓ ondas de ultrassom com frequência acima da gama audível (> 20 kHz) e menores do que a frequência de microondas (até 10 MHz).

O nível de energia transmitida pelo ultrassom depende da intensidade do mesmo, que está relacionada com a potência por unidade de área do transmissor. A intensidade de uma onda de ultrassom é um parâmetro importante para a quantidade de energia que será transmitida, assim como a sua frequência de oscilação.

Os efeitos ocasionados pelas ondas ultrassônicas são diversos, o que aumenta a sua possibilidade de utilização. Dentre os efeitos mecânicos pode-se citar a cavitação e a coagulação; os efeitos térmicos levam a um aumento da temperatura das substâncias processadas com ultrassom e os efeitos físico-químicos, como polimerização de compostos, têm impacto na taxa de reação e no aumento da ionização (Dolatowski e Stasiak, 2012).



No presente trabalho, os efeitos a serem levados em consideração são o físico-químico e a cavitação. O efeito físico-químico aumenta a taxa de extração pelo rompimento das barreiras do líquido através da criação de microfluxos (Dolatowski e Stasiak, 2012). A cavitação, como mencionado anteriormente, é um fenômeno que ocorre em líquidos quando bolhas de gás se formam no seu interior, pela criação de pequenos vácuos causados pela diferença de pressão que colapsam violentamente, provocando uma pequena vibração no fluido. Como o ultrassom são ondas de pressão, existe a cavitação ultrassônica, que é a principal responsável pelos efeitos mecânicos dessa tecnologia (Webster, 1963).

### ***2.3.2.2 Processamento de alimentos por ultrassom***

A utilização das ondas de ultrassom em diferentes matrizes é feita com combinações de frequência e intensidade. Normalmente, em análises de materiais em diagnósticos médicos, são utilizadas ondas de alta frequência e baixa intensidade, entre 5 e 10 MHz e menores que 1 W/cm<sup>2</sup>; para causar mudanças químicas e físicas nas substâncias, as ondas de ultrassom devem apresentar baixa frequência e alta intensidade, entre 20 e 100 kHz e entre 10 e 1000 W/cm<sup>2</sup> (Hoover, 2000; Dolatowski & Stasiak, 2012). Sendo assim, a sonicação de alta intensidade é utilizada em processos de extração já que são necessárias mudanças físicas na matriz das células. No entanto, vale destacar que fenômenos físicos e químicos, incluindo agitação, vibração, pressão, força de cisalhamento, compressão e rarefação, cavitação e formação de radicais são efeitos ocasionados pelo ultrassom (Tiwari, 2015).

A aplicação desta tecnologia em alimentos já vem sendo utilizada, destacando-se os processos de extração, cristalização, salga e cura, secagem e em processos de separação com membranas. O uso desta técnica na extração de compostos tem a vantagem de não necessitar a redução do tamanho da partícula para o aumento da superfície de contato, uma vez que a quebra da estrutura celular ocorre com a aplicação das ondas. Além disso, em alguns casos, não é necessário o incremento de temperatura para aumentar a difusão, uma vez que o ultrassom já causa essa melhora difusiva (Dolatowski & Stasiak, 2012).

Os tipos de equipamentos de ultrassom mais utilizados são basicamente dois: a sonda e o banho. A Figura 9 mostra os diferentes equipamentos, sendo que cada um deles é utilizado para diferentes processos. No ultrassom tipo sonda, a sonda fica em contato direto com o sistema reacional e pode ser utilizada em recipientes de qualquer tamanho e ainda possibilita aplicações que exigem alta intensidade de potência. A desvantagem deste tipo de equipamento é o aquecimento na face do emissor, que deve ser controlado para evitar a perda de compostos sensíveis ao calor (Dolatowski & Stasiak, 2012).

O ultrassom tipo banho é o mais utilizado e, neste caso, as ondas são emitidas por um transdutor de energia fixado na parte inferior do banho e é transmitida através de um líquido (normalmente a água) à substância presente no interior do banho. Devido ao grande volume e, ainda por ser fixo, as ondas sonoras emitidas tendem a ter uma maior dispersão e, por esse motivo, a densidade de potência emitida é baixa; fato este que, algumas vezes, limita o uso deste tipo de ultrassom. Portanto, este tipo de ultrassom, na maioria das vezes, é utilizado para baixas e médias intensidades de potência (Dolatowski & Stasiak, 2012).

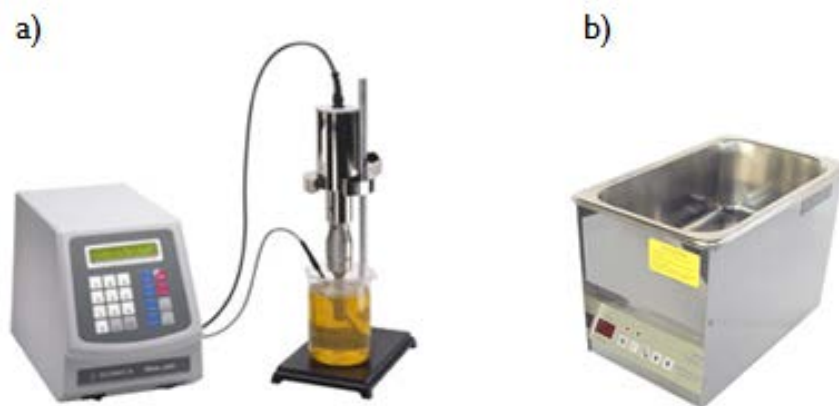


Figura 2.9 Tipos de ultrassom: a) ultrassom tipo sonda (disponível em [www.sonics.com](http://www.sonics.com)); b) ultrassom tipo banho (disponível em [www.ciencor.com.br](http://www.ciencor.com.br))

O processamento de alimentos por ultrassom apresenta algumas vantagens, podendo-se destacar:

- ✓ o equipamento de ultrassom é facilmente manuseado e versátil;

- ✓ a redução do tempo e temperatura durante o processo ( Tiwari *et al.*, 2015; Fellows, 2008);
- ✓ o aumento no rendimento de extração de compostos alvo (Tiwari *et al.*, 2015);
- ✓ trata-se de uma energia limpa que não produz resíduos e de baixo consumo energético (Tiwari *et al.*, 2015);
- ✓ tem-se modificações da estrutura e da textura do alimento (Fellows, 2008; Earnshaw, 1998);
- ✓ em comparação com as novas tecnologias utilizadas para o processamento de alimentos, o ultrassom é uma tecnologia que requer um menor investimento de capital (Tiwari *et al.*, 2015);
- ✓ tem-se efeito contra células vegetativas, esporos e enzimas (Fellows, 2008; Earnshaw, 1998).

Uma das desvantagens desta tecnologia é o alto ruído provocado pela cavitação ultrassônica, o que pode ocasionar danos auditivos se os equipamentos de segurança não forem utilizados de forma adequada (Dolatowski & Stasiak, 2012). Além disso, podem ocorrer possíveis danos aos radicais livres, modificações indesejadas da estrutura e da textura do alimento e, algumas vezes, esta técnica necessita ser usada em combinação com outros processos (Fellows, 2008, Earnshaw, 1998).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas para investigar o uso do ultrassom na extração de compostos presentes nos vegetais. Jovanovic-Malinovska *et al.* (2015) estudaram o uso do ultrassom para aumentar a extração de oligossacarídeos prébióticos de frutas e vegetais e foi possível observar que a extração assistida por ultrassom é um método eficiente quando comparado com a extração convencional. Rostagno *et al.* (2007) investigaram a extração de isoflavonas presentes em bebidas de soja misturadas com suco de laranja e concluíram que esse componente pode ser extraído por ultrassom de maneira simples e reprodutível. Jerman *et al.* (2010) pesquisaram a extração de compostos fenólicos presentes na fruta da oliveira assistida por ultrassom e observaram que o ultrassom é uma ferramenta que auxilia a extração de compostos fenólicos da fruta de oliveira. Wang *et al.*

(2015) investigaram a extração convencional e assistida por ultrassom da pectina da casca da uva utilizando a metodologia de superfície de reposta, e foi observado que a extração assistida por ultrassom apresentou valores de rendimento mais elevado em menos tempo de processo, quando comparado com a extração convencional; ainda, estudos de imagem mostraram que a pectina extraída por US apresentou algumas modificações na microestrutura. Por fim, Rodrigues *et al.* (2015) avaliaram a extração assistida por US de compostos fenólicos e antocianinas da casca da jabuticada e observaram que em 10 minutos de sonicação é possível obter um rendimento de extração elevado.

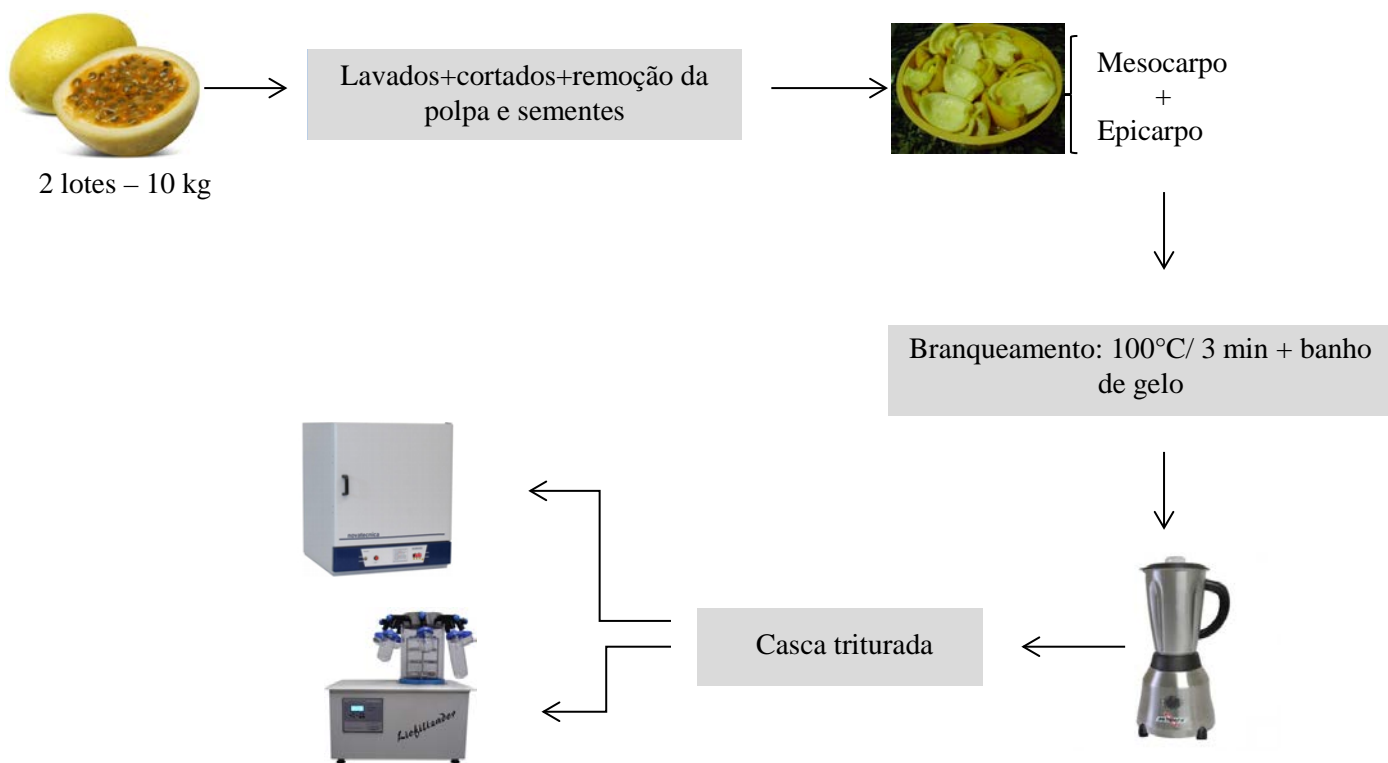
Vale destacar que o ultrassom também tem efeitos na redução da atividade enzimática e amaciamento dos tecidos cárneos (devido à exposição prolongada ao US e, conseqüentemente, liberação de proteínas miofibrilares, resultando num aumento da capacidade de retenção de água, da maciez e da coesividade do tecido cárneo) (McClements, 1995). Além disso, as mudanças de pressão ocasionadas pelas ondas ultrassônicas são efetivas na destruição das células microbianas, especialmente quando combinadas com outros tratamentos, por exemplo, calor, modificação do pH e cloração (Lillard, 1994).

## Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Neste Capítulo são descritos os materiais e a metodologia experimental utilizadas no presente trabalho. Este capítulo está estruturado da seguinte forma: primeiramente será descrita a etapa de processamento da casca, seguido das metodologias utilizadas para caracterização da mesma; logo após serão expostas as tecnologias e condições de extração da pectina e, por fim, serão discutidos os métodos de purificação e análises da pectina.

### 3.1 Matéria-prima: Obtenção da farinha da casca do maracujá

A Figura 3.1 mostra o fluxograma de obtenção da farinha da casca do maracujá. Dois lotes de 10 kg de maracujá foram adquiridos no comércio local (CEASA-Porto Alegre/RS), foram lavados e cortados para a remoção da polpa e sementes. A casca, composta de epicarpo e mesocarpo, sofreu o processo de branqueamento (100 °C / 3 minutos) e logo foi triturada e separada em duas partes. Uma parte foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar (60 °C/ 48 horas), e o restante da casca foi liofilizado (25 °C/ 72 horas). Após os dois processos de desidratação, as amostras foram novamente trituradas e peneiradas até a obtenção de um pó com granulometria inferior a 60 *mesh*. Adicionalmente, uma amostra de farinha da casca de maracujá foi adquirida no comercio local (Porto Alegre, RS) com a finalidade de comparar com as farinhas obtidas neste estudo.



**Figura 3.1:** Fluxograma da obtenção da farinha da casca do maracujá.

### 3.2 Composição e caracterização das farinhas da casca de maracujá

A metodologia das análises físico-químicas, propriedades funcionais tecnológicas, determinação de cor, compostos fenólicos totais, flavonoides, carotenoides, tamanho e distribuição de partículas e, por fim, as microestruturas das farinhas da casca do maracujá, serão descritas a seguir.

#### 3.2.1 Análises físico-químicas

O conteúdo de umidade, cinzas, proteína e lipídios foram determinados pelo método estabelecido pela AOAC, 1997. A umidade da farinha da casca do maracujá foi determinada por secagem direta das amostras em estufa a 105 °C até massa constante e os resultados foram expressos em g/100g. A partir do resultado de umidade das farinhas, todos

os demais resultados obtidos para diferentes análises foram expressos em base seca. O teor de cinzas foi determinado sob aquecimento em forno a 550 °C por 6 horas e o resultado expresso em g/100g (b.s). As proteínas foram medidas pelo método Kjeldahl, utilizando o fator de correção para o nitrogênio de 5,75 (Brasil, 2003). O conteúdo de lipídios foi avaliado pela perda de peso depois de seis ciclos de extração com éter de petróleo utilizando o aparato *soxhlet*, e os resultados foram expressos em g/100g (b.s). As fibras alimentares totais foram determinadas seguindo o método 991.43 AOAC (1997). Os carboidratos disponíveis foram calculados pela subtração dos componentes da análise centesimal.

Os minerais presentes na casca do maracujá foram determinados pelo Laboratório de Análises Químicas e Microbiológicas (Químicapura), localizado na cidade de Porto Alegre, RS, tendo sido utilizada a metodologia proposta pelo Instituto Adolfo Lutz (2005).

O pH das amostras foi medido em um pHmetro digital (modelo pH/Ion 510, Eutech Instruments Pte Ltd., Singapore), utilizando uma solução aquosa composto por 3 g de farinha da casca do maracujá e 30 mL de água deionizada; após a preparação da solução, a mesma foi agitada com agitador magnético (AREE, Veko Scientifica, Itália) para evitar que a amostra sedimentasse durante as medidas. O pHmetro foi calibrado utilizando soluções tampão de pH 7,0 e 4,0.

A acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,01N seguindo o método descrito na AOAC (1997). Por fim, a atividade de água ( $a_w$ ) foi medida utilizando o equipamento TH-500 Sprint Novasina Thermoconstanter (Pfäffikon, Switzerland) à 25 °C. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados correspondem a média  $\pm$  desvio padrão.

### **3.2.2 Determinação da capacidade de retenção de água e óleo**

As medidas de capacidade de retenção de água e óleo foram determinadas segundo o método proposto por Robeterson *et al.* (2000). A capacidade de retenção de água foi expressa em gramas de água retida por gramas de amostra seca, enquanto que a capacidade de retenção de óleo foi expressa em gramas de óleo absorvido por gramas de amostra seca.

Apenas estas duas análises foram feitas em quintuplicata, e os resultados foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.3 Análise de cor

A cor das farinhas foi medida em colorímetro Minolta CM-2600d (Minolta Camera Co., Osaka, Japan). Os parâmetros colorimétricos  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  da escala CIELAB foram obtidos através do espectro de refletância da amostra. No espaço de cores, o  $L^*$  indica a luminosidade, e o  $a^*$  e o  $b^*$  representam as coordenadas cromáticas. Os valores de  $L^*$  variam de 0 (totalmente preta) a 100 (totalmente branca). A coordenada de cromaticidade  $a^*$  varia do verde ao vermelho, e a coordenada de cromaticidade  $b^*$  varia do azul ao amarelo. A coordenada de cromaticidade  $+a^*$  indica a direção vermelho enquanto que  $-a^*$  indica a direção verde. Da mesma forma,  $+b^*$  indica a direção do amarelo e  $-b^*$ , a direção do azul. A partir dos valores  $a^*$  e  $b^*$ , pode-se calcular a distância da coordenada (a,b) em relação a sua origem (0,0), o que é conhecido por Chroma ( $C_{ab}^*$ ) e o ângulo de tonalidade  $h_{ab}$ , que é medido em uma escala de 0 a 360 °, determinando a localização correta da amostra em questão no espaço de cor (Minolta, 1998). Os valores de  $C_{ab}^*$  e  $h_{ab}$  foram calculados conforme as equações abaixo.

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

$$h_{ab} = \text{tg}^{-1} \left( \frac{a^*}{b^*} \right) \quad (3)$$

### 3.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram determinados segundo o método proposto por Larrauri *et al.* (1997), com algumas modificações. Foram pesadas aproximadamente 2 g de farinha da casca do maracujá e dissolvidas em 10 mL de metanol (80 %); em seguida foi misturada em vortex por 10 minutos e, por fim, a solução foi centrifugada (5200 g). Esse procedimento foi repetido 5 vezes. Após este passo, a amostra foi extraída novamente com acetona (70 %), e o mesmo procedimento descrito acima foi repetido. O conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC) foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu



(Singleton & Rossi, 1965). Os resultados foram expressos em g de ácido gálico (GAE equivalentes)/kg de amostra. Os resultados foram expressos em base seca.

### **3.2.5 Determinação de flavonóides**

O teor de flavonóides totais foi determinado baseado no método proposto por Zhishen *et al.*, (1999) com pequenas modificações. Uma amostra de 250 µL de extrato de casca de maracujá foi misturado com 75 mL de NaNO<sub>2</sub> (5 %) e, após 5 minutos, foram adicionados 150 µL de AlCl<sub>3</sub> (10 %). As amostras foram misturadas durante 2 minutos em um vortex; após 6 minutos de repouso foram neutralizadas com 0,5 mL de NaOH (1 M). O conteúdo de flavonóides foi determinado por espectrofotometria a 510 nm e correlacionada com uma curva de calibração. Diferentes concentrações de catequina foram utilizadas para a calibração e os resultados foram expressos em g de catequina / kg de amostra. O teor total de flavan-3-óis foi determinado de acordo com Arnous *et al.* (2001) e Poudel *et al.* (2008) e expresso em g epicatequina/kg de amostra.

### **3.2.6 Determinação de carotenoides**

Os carotenoides foram exaustivamente extraídos com acetona fria, em seguida sofreram partição em éter de petróleo e, por fim, foram lavados com água destilada. O teor total de carotenoides foi determinado por espectrofotometria a 450 nm, em éter de petróleo, e o resultado foi expresso em termos de all-*trans*-β-caroteno utilizando um coeficiente de absortividade de 2592 (Rodriguez-Amaya, 2001).

### **3.2.7 Tamanho de partícula e distribuição de tamanhos**

O tamanho de partículas foi determinado através da avaliação do diâmetro de partícula por difração a laser (Malvern 2000 Mastersizer, Malvern Instruments, Reino Unido) em meio seco. A distribuição do tamanho de partícula foi avaliada a partir do *SPAN* (equação 4), onde  $d_{0,1}$ ,  $d_{0,5}$  e  $d_{0,9}$  são os diâmetros das partículas determinados em 10 % , 50 % e 90 % da distribuição dos volumes acumulados, respectivamente. Os cálculos para a distribuição do tamanho de partículas forma baseados na teoria proposta por Mie-Scattering e o diâmetro médio foi calculado baseado no volume (D[4,3]).

$$SPAN = \frac{d_{0.9} - d_{0.1}}{d_{0.5}} \quad (4)$$

### 3.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para visualizar as características das farinhas da casca do maracujá foi empregada a técnica da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando um microscópio JEOL JSM-6060 (Jeol, Tóquio, Japão). Para isso, as amostras foram anexadas em *stubs* de 2,54 cm de diâmetro usando uma fita dupla face de carbono. As micrografias foram feitas na magnitude de 1500 x.

### 3.2.9 Análise estatística

As análises referentes à caracterização da casca de maracujá foram realizadas em triplicata e os valores apresentados representam a média destes valores. Análise de variância foi conduzida seguida pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ) para a comparação de médias. Para explorar os dados foi realizada a análise de componente principal (PCA), que é uma técnica matemática da análise multivariada, que possibilita investigações com um grande número de dados disponíveis. Permite, também, a identificação das medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas significativas de informações. Além disso, transforma um conjunto original de variáveis em outro conjunto: os componentes principais (PCs) de dimensões equivalentes. Essa transformação, em outro conjunto de variáveis, ocorre com a menor perda de informação possível, sendo que esta também busca eliminar algumas variáveis originais que possuam pouca informação (Shin *et al.*, 2010). Para a realização das análises estatísticas foi utilizando o software Statistica 8.0 para Windows (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

### 3.3 Extração da pectina da casca do maracujá

Nesta seção serão descritos, detalhadamente, os métodos e as condições utilizados para a extração convencional da pectina e assistida por campo elétrico moderado, alta

pressão hidrostática e ultrassom. A extração convencional, assistida por campo elétrico moderado e ultrassom foi realizada no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS. A extração assistida por alta pressão hidrostática foi conduzida no Departamento de Ciência de Alimentos na *Rutgers University* - Universidade do Estado da Nova Jersey- nos Estados Unidos, durante a realização do estágio sanduíche. Esta etapa do trabalho foi orientada pelo Professor Mukund Karwe.

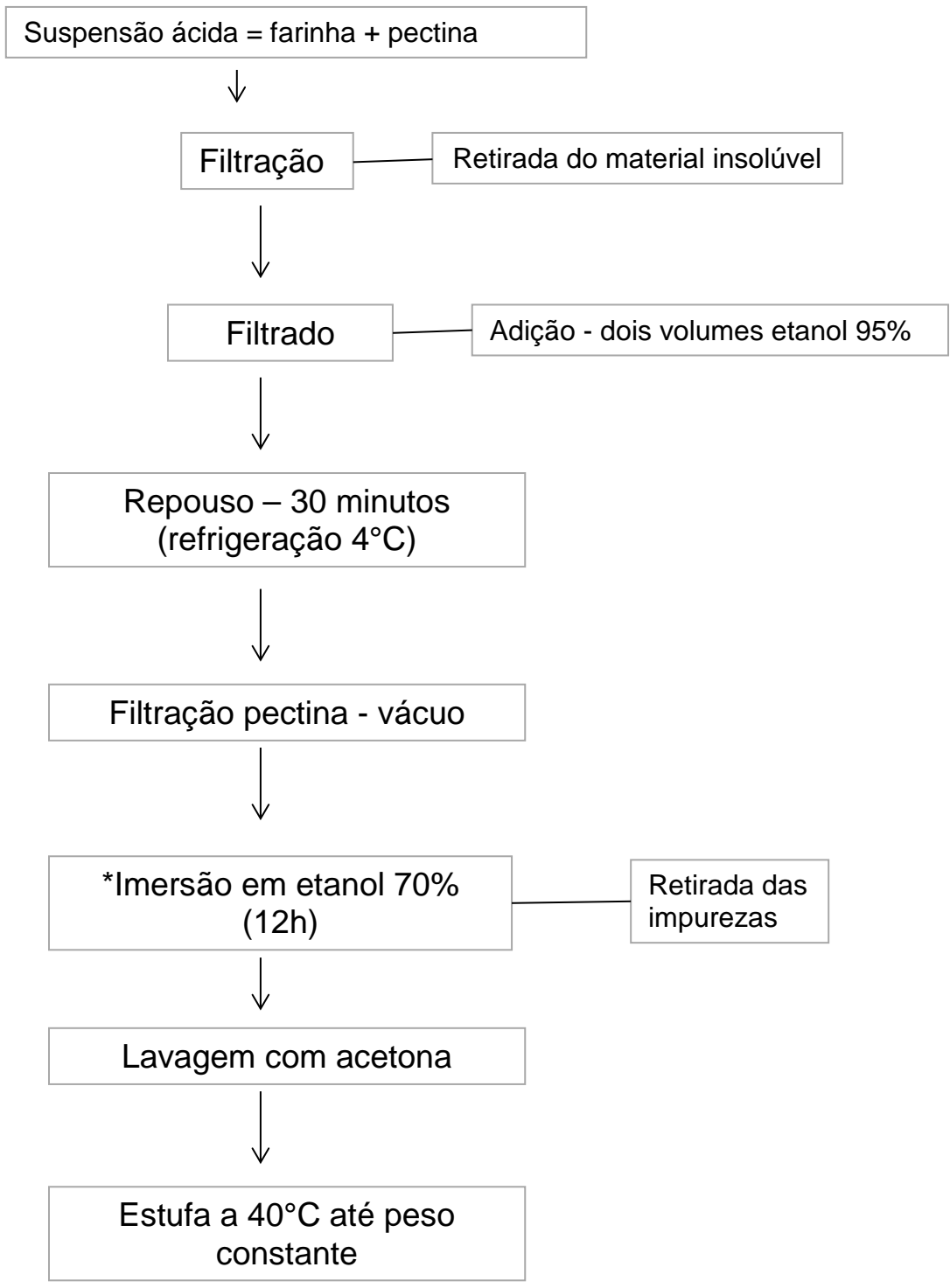
### 3.3.1 Extração convencional

A extração e o isolamento da pectina nesse trabalho foram conduzidos a partir de estudos preliminares, realizados na etapa inicial do trabalho, e também de acordo com as metodologias descritas por Kratchanova *et al.* (2004) e Scabio *et al.* (2007) com algumas modificações. O ácido nítrico foi selecionado como agente extrator em função de seu uso corrente em processos industriais devido à sua eficiência e ao seu limitado impacto corrosivo em tubulações e tanques de aço inox. Em todos os experimentos, para a obtenção do pH desejado, foi utilizado HNO<sub>3</sub> 1M.

Ao longo do presente trabalho, diversas condições de extração convencional foram avaliadas, sendo que cada parâmetro foi estudado separadamente. Foram avaliados diferentes valores de pHs, temperaturas, tempos e diferentes proporções sólido:líquido. Os pHs avaliados foram 0,3±0,02; 1,0±0,02; 2,0±0,02; 5,0±0,02; os tempos variaram entre 5 e 60 minutos; as temperaturas variaram entre 50 e 100±3 °C e a razão sólido:líquido foi de 1:25 e 1:30.

Para a extração convencional, a solução ácida foi colocada em um béquer de 400 mL e aquecida até a temperatura desejada; em seguida a farinha da casca do maracujá foi adicionada e a solução foi mantida sob aquecimento até completar o tempo de extração. Durante a extração a temperatura foi medida com o uso de um termômetro, a fim de verificar que a mesma não variasse mais do que 3 °C. Se uma variação maior do que 3 °C fosse observada o experimento era desconsiderado. Atendido o tempo de extração, ocorreu a etapa de precipitação e purificação da pectina extraída. A Figura 3.2 apresenta as etapas de precipitação e purificação da pectina. Como pode ser observada no fluxograma, a

solução acidificada contendo a casca do maracujá foi rapidamente resfriada e, em seguida, filtrada para a retirada do resíduo insolúvel. Após a filtração, ocorreu a adição de dois volumes de etanol 95 % no filtrado, e o mesmo foi submetido à refrigeração por 30 minutos. Após o tempo de repouso, a pectina foi filtrada e imersa em etanol 70 % para a retirada de impurezas; por fim, foi lavada com acetona e seca em estufa a 40 °C até peso constante.



\* Nesta etapa a pectina foi colocada em sacos de tecido sintético e posteriormente imersa em etanol 70%

**Figura 3.2** Fluxograma de precipitação e purificação da pectina.

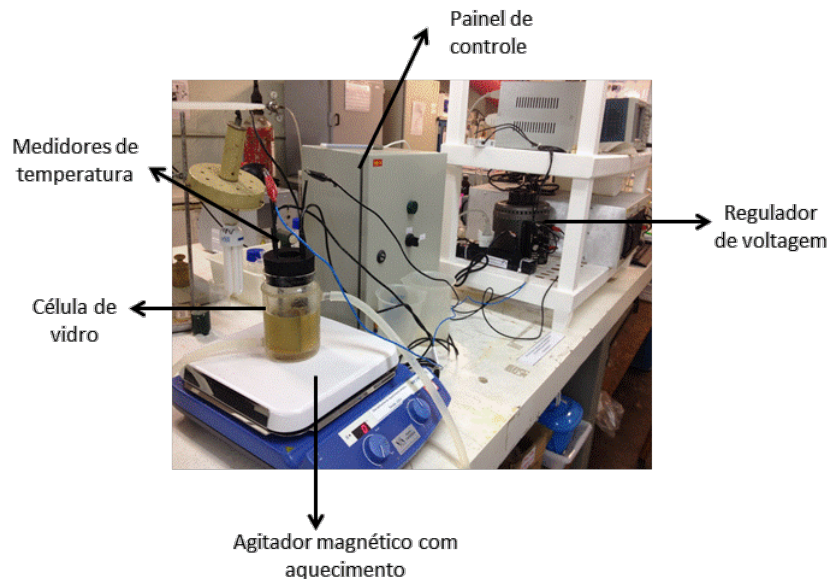
### 3.3.2 Extração assistida por campo elétrico moderado (CEM)

O processo de extração com aplicação de campo elétrico moderado foi realizado utilizando o aparato experimental apresentado na Figura 12 e que contém os seguintes equipamentos:

i) Sistema de fornecimento de energia: composto por um estabilizador (*Forceline*, modelo EV 1000 T/2-2, Brasil), um variador de tensão de 0 a 220 V (*Sociedade Técnica Paulista LTDA*, modelo Varivolt, Brasil) e um disjuntor (*Siemens*, Brasil). O estabilizador foi conectado à rede local, utilizando corrente alternada com frequência de 60 Hz.

ii) Sistema de aquisição de dados: responsável pelo monitoramento e registro de dados relativos à corrente elétrica, tensão e temperatura em função do tempo. Os dados foram coletados utilizando um módulo de aquisição e registro (*Novus*, modelo Field logger, Brasil).

Para monitoramento da temperatura, foram utilizados medidores de temperatura do tipo Pt-100 (*Novus*, Brasil), com haste de aço inoxidável revestida com uma liga de níquel-fósforo para evitar reações de eletrodo e consequente corrosão. Para o monitoramento da tensão através das amostras, foi utilizado um transdutor de tensão CA (*Yokogawa*, modelo 2374A-T13-VRX/AN, Taiwan), na qual o sinal de entrada varia de 0 a 300 V. A corrente elétrica foi monitorada através de um transdutor de corrente CA, (*Yokogawa*, modelo 2374A-T13-ALS/NA, Taiwan) com sinal de entrada de 0 a 5 A (Mercali, 2013).



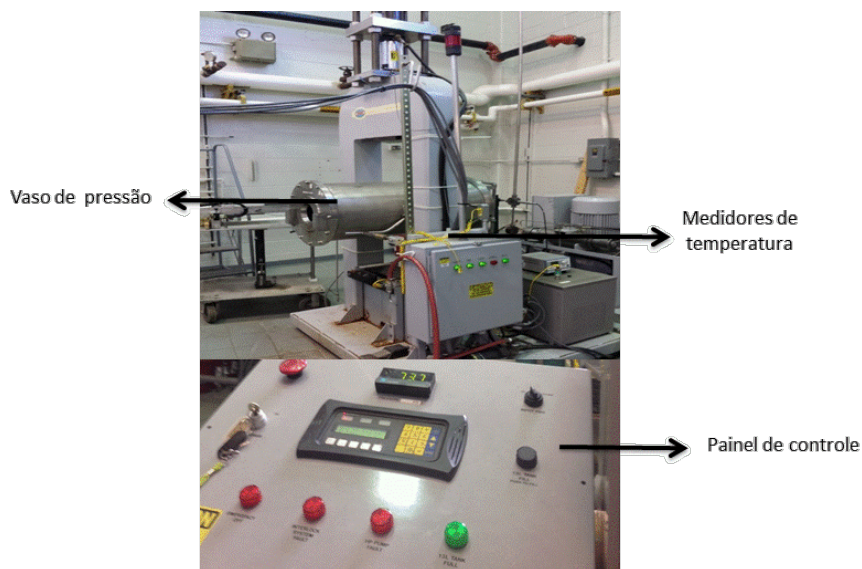
**Figura 12.** Fotografia do sistema de campo elétrico moderado. Fonte. Arquivo pessoal

Uma célula de vidro, com 8 cm de diâmetro, foi colocada sobre um agitador magnético para promover a agitação da solução durante a extração; dois termômetros foram imersos na solução para medir a temperatura. Atingido o tempo de extração, foi realizado o mesmo procedimento de precipitação e purificação da pectina, como descrito anteriormente e cujo fluxograma está apresentado na Figura 10.

Foram realizados experimentos independentes para avaliar o pH, tempo e tensão durante a extração da pectina da casca do maracujá; para isso foi estudada uma variável de cada vez mantendo as demais constantes. A razão sólido:líquido foi mantida 1:30 em todos os experimentos e a temperatura foi monitorada para que não ultrapassasse 50 °C, visto que nesta etapa o objetivo era avaliar apenas o efeito do campo elétrico aplicado durante a extração. Para esta constatação, foram realizados experimentos preliminares e observou-se que a partir de 50 °C a temperatura começa a influenciar na extração da pectina. Para o controle da temperatura durante os experimentos foi utilizado um banho termostático (*Lauda*, RM 12, Brasil). Os tempos de extração avaliados foram de 5, 15, 40 e 60 minutos, os pHs foram  $1,00 \pm 0,2$ ,  $0,2 \pm 2,00$  e  $5,00 \pm 0,2$  e a tensão aplicada foi de 30 V, 50 V e 100 V.

### 3.3.3 Extração assistida por alta pressão hidrostática (APH)

O processo de extração assistida por alta pressão hidrostática foi realizado utilizando o equipamento (Elmhusrt Systems, LLC., Albany, NY) apresentado na Figura 13, composto por um vaso de pressão de 10L de capacidade, um sistema de geração de pressão (gera pressões de até 690 MPa) e um sistema de registro de dados em tempo real.



**Figura 13.** Fotografia do equipamento de alta pressão hidrostática. Fonte. Arquivo pessoal

A farinha da casca do maracujá, juntamente com a solução acidificada, foi colocada em sacos de polietileno, os sacos foram selados, em seladora a vácuo, e conduzidos ao equipamento de alta pressão. Assim que o tempo de extração foi atingido, o procedimento de precipitação e purificação foi realizado (Figura 10).

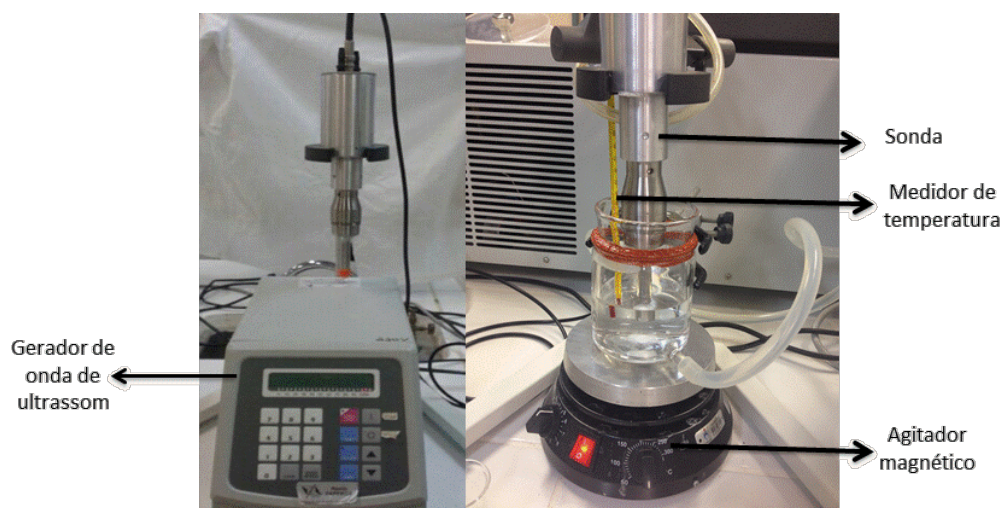
Nesta etapa do trabalho, foram realizados vários testes preliminares para observar o comportamento da pectina durante a aplicação da APH. Após os testes, foi determinado o melhor tempo de extração da pectina da casca do maracujá utilizando as seguintes condições: razão sólido:líquido 1:30, pH  $2 \pm 0,02$  (1.0 M  $\text{HNO}_3$ ), 500 Mpa e cinco tempos diferentes: 5, 10, 20, 30 e 40 minutos. A temperatura foi mantida abaixo de 50 °C.



Ainda, nesta etapa do trabalho, foi realizado um planejamento experimental  $2^2$  com quatro repetições no ponto central e seis pontos axiais, para avaliar o efeito da pressão e temperatura no rendimento da pectina. A temperatura variou entre 10 e 60 °C e a pressão entre 230 e 568 Mpa; o pH (2,00), a razão sólido:líquido (1:30) e o tempo (20 minutos) foram mantidos constantes.

#### 2.3.4 Extração assistida por ultrassom (US)

A extração da pectina da casca do maracujá assistida por ultrassom foi conduzida no equipamento mostrado na Figura 14. O equipamento de ultrassom (Sonics & Materials, Inc., modelo VCX750, Newtown, Estados Unidos) é do tipo sonda (diâmetro de 1,2 cm) e é composto por um gerador de ondas ultrassônicas, o qual é responsável por emitir as ondas para o meio. A potência máxima do equipamento é de 750 W e a frequência de 20 kHz.



**Figura 14.** Fotografia do equipamento de ultrassom. Fonte. Arquivo pessoal

Uma célula de vidro, com 8 cm de diâmetro, foi colocada sobre um agitador magnético para promover a agitação da solução durante a extração. O controle da temperatura foi feito com o auxílio de um banho termostático (Lauda R. Wobser GmbH &

Co. KG, modelo Alpha RA 12, Lauda-Königshofen, Alemanha), e a mesma foi controlada com a imersão de um termômetro na solução. Testes preliminares foram realizados para determinar a temperatura do banho termostático durante a realização dos experimentos, visto que as ondas de pressão do ultrassom causam um aquecimento da solução. Atingido o tempo de extração, foi realizado o mesmo procedimento de precipitação e purificação da pectina, como descrito anteriormente (Figura 10).

Primeiramente foi determinado o tempo de extração assistida por ultrassom. A razão sólido:líquido (1:30) e o pH ( $2,00 \pm 0,02$ ; 1.0 M HNO<sub>3</sub>) foram mantidos constantes. A temperatura foi monitorada para que não atingisse valores maiores do que 50 °C. Foram avaliados os tempos de 3, 6, 10, 15 e 20 minutos. Posteriormente, foi realizado um planejamento experimental 2<sup>2</sup> com três repetições no ponto central para avaliar o efeito da temperatura e intensidade de potência do ultrassom. A razão sólido:líquido (1:30), pH ( $2,00 \pm 0,02$ ; 1.0 M HNO<sub>3</sub>) e o tempo de extração (10 minutos) foram mantidos constantes. Os valores reais e codificações encontram-se na tabela 3.

**Tabela 3.** Valores das variáveis independentes em diferentes níveis do planejamento experimental 2<sup>2</sup> para os experimentos com US.

Variáveis independentes	-1	0	+1
Temperatura (°C)*	45,0	65,0	85,0
Intensidade de potência (W/cm <sup>2</sup> )	132,8	398,4	664,0

\* A temperatura durante o processo variou  $\pm 4^\circ\text{C}$

### 3.4 Caracterização da pectina

Nesta seção serão descritas as análises realizadas na pectina extraída pelos diferentes métodos de extração. Os reagentes utilizados para as análises citadas a seguir foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

### 3.4.1 Rendimento gravimétrico da pectina extraída

O percentual gravimétrico de cada processo de extração foi calculado a partir da equação 5.

$$Y = \frac{\text{massa.pectina}(g)}{\text{massa.amostra}(g)} \times 100 \quad (5)$$

### 3.4.2 Grau de esterificação

O grau de esterificação (DE) foi determinado por titulação pelo método proposto por Bocek *et al.* (2001) com algumas modificações. Amostras de pectina seca (0,05g) foram solubilizadas em 100 mL de água destilada e 2 mL de etanol durante 2 horas a 50°C em recipiente fechado. A solução foi titulada com solução de NaOH 0,05 N até pH 8,5 ±0,2, verificado em pHmetro digital (Tecnal, TEC-3MP, Brasil), sendo o volume gasto registrado como inicial (V<sub>1</sub>). Em seguida, foi adicionado 10 mL de NaOH 0,5 N, a amostra foi agitada e ficou em repouso por 15 minutos a 30°C em estufa. Logo após, a solução foi neutralizada pela adição do mesmo volume de HCl 0,5 N. O excesso de HCl foi titulado com NaOH 0,5 N e o resultado registrado como volume final (V<sub>2</sub>). O DE foi calculado através da seguinte equação:

$$\%DE = \frac{V_2}{V_1 + V_2} \times 100 \quad (6)$$

### 3.4.3 Conteúdo de ácido galacturônico

Para a dosagem do teor de ácido galacturônico, foi construída uma curva de calibração de cinco pontos com padrão de ácido galacturônico, com concentração variando entre 0 a 100 µg mL<sup>-1</sup>. Para a curva de calibração, os ensaios foram realizados em duplicata. Nos tubos imersos em banho de água e gelo, acrescentou-se 0,5 mL de amostra hidrolisada, adequadamente diluída, ou da solução padrão, mais 3 mL de solução de tetraborato em ácido sulfúrico. Os tubos foram agitados com auxílio de vórtex (Santalydia, Brasil) e, em seguida, imersos em banho-maria termostatizado a 80 °C durante dez minutos.

A reação foi paralisada pela imersão dos tubos em banho de gelo e água, até temperatura ambiente. Em cada tubo, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de metahidroxidifenil para as amostras ou 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,125N para os brancos, com agitação intensa em vórtex. A leitura foi feita a 520 nm em espectrofotômetro, depois de exatamente dez minutos de incubação (Blumenkrantz, Asboe-Hansen, 1973).

#### **3.4.4 Determinação da viscosidade aparente**

A viscosidade aparente das amostras foi medida utilizando um viscosímetro (Brookfield, modelo DV-I a 25 ° C). Uma haste (*spindle 2.0*) de aço inox foi imersa na solução numa velocidade de 3,0 rpm. Soluções contendo 25 % de pectina e 65 % de sacarose em pH 2.0 ( $\text{HNO}_3$ ) foram preparadas sob aquecimento e agitação.

#### **3.4.5 Análise estatística**

Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores apresentados representam o valor médio das análises. Uma análise de variância foi realizada seguida pelo teste de Tukey ( $\alpha < 0,05$ ) para comparação de médias. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 8.0 para Windows (Statsoft, Tulsa, OK, EUA).

## **Capítulo 4**

### **Artigo 1- Evaluation of Physicochemical, Technological and Morphological Characteristics of Powdered Yellow Passion Fruit Peel.**

**Abstract:** The aims of this study were to ascertain the physicochemical properties, technological properties, phytochemical compounds and morphology of powdered yellow passion fruit products to determine their suitability for use as natural food ingredients. Passion fruit peel powder was obtained by convective hot air-drying at 60°C, freeze-drying and compared with a commercial sample. The passion fruit peel (dried at 60°C and freeze-dried powders) could be used as an intermediate food ingredient in the development of functional foods because of its good levels of phenolic compounds and the high total dietary fiber (63.98-72.62%) content as pectin (6.98-19.6%). In addition, these fiber-rich co-products have potential applications as ingredients in products requiring hydration and viscosity development due to their high total dietary fiber content and good technological properties, especially their water holding (6.30-14.9 g H<sub>2</sub>O/g) and oil holding capacities (2.6–6.5 g oil/g), especially for the freeze-dried samples.

**Keywords:** *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*, co-product, dietary fiber, phenolics, carotenoids, multivariate analysis.

## **Introduction**

The term 'passion fruit' comprises several species from the genus *Passiflora L.*, family Passifloraceae; the genus *Passiflora* consists of approximately 400 species, with over 150 being native from Brazil (Bruckner and Picanço, 2001). The most important variety cultivated in Brazil for commercial purposes is the yellow passion fruit, *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener* (Teixeira *et al.*, 1994), which is used for pulp and juice processing. The *P. edulis var. flavicarpa* fruits are round in shape, with a diameter between 8 and 10 cm and a green peel at maturity. The edible part of the passion fruit (40%) consists of pulp with seeds, and 60% of the peel consists of mesocarp and epicarp. They contain many seeds (as do the other Passifloraceae species) surrounded by a gelatinous yellow pulp that has an intense aroma and a sweet-acid taste (López-Vargas *et al.*, 2013).

Pulp, seeds, peel and pericarp from this fruit play an important role in human nutrition and health because of their nutritional and bioactive properties (e.g., pectin, fibers, phenolic compounds, and carotenoids) (Chankvetadze *et al.*, 2011). The valorization of

agricultural residues is receiving more attention nowadays, and many researchers have been evaluating the conversion of by-products into food ingredients and other value-added materials (Arnous *et al.*, 2001; López-Vargas *et al.*, 2013; Viuda-Martos *et al.*, 2011). These by-products may still contain many valuable substances, such as pigments, sugars, organic acids, flavors and bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial activities, as well as being valuable sources of dietary fiber (Fernández-López *et al.*, 2009). Hypocholesterolemic and blood glucose reduction properties, among others, have been attributed to the passion fruit peel (Chau & Huang, 2005; Janebro *et al.*, 2008; Salgado *et al.*, 2010; Zibadi *et al.*, 2007).

Dietary fiber from the passion fruit peel can be added to a variety of foods, including meat products (M. Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernández-López, & Pérez-Álvarez, 2010), breakfast cereals, bakery products (Vergara-Valencia *et al.*, 2007) and dairy products (Sendra *et al.*, 2008). Therefore, this part of the fruit (mesocarp and epicarp) should not be considered just as industrial residue because it can be used for the development of new functional and technological products. The aim of this study was characterize the physicochemical properties, technological and morphological characteristics of powdered passion fruit peel obtained by hot-air convection drying, freeze drying and compare with a commercial sample.

## **Material and methods**

### **Plant material**

Two batches of 10 kg of yellow *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener* were purchased from a local market (Porto Alegre, RS, Brazil). The fruits were washed and sliced to remove the pulp with seeds. The peels (composed with mesocarp, and epicarp) were blanched in water (100°C for 3 min) followed by cooling in an ice bath. After, they were ground in a domestic blender (according to the manufacturer's instructions). The peels were dried in an oven with air circulation (60°C for 48h) or freeze-dried (25 °C for 72 h). After drying, the samples were milled again in the domestic blender until pass through mesh 60#. A sample of passion fruit powder (drying by convection hot-air) was purchased from a local market (Porto Alegre, RS, Brazil).

### **Physicochemical analysis and technological properties**

Moisture, ash, protein, and fat content were determined by AOAC methods (AOAC, 1997). Moisture (g/100 g) was determined by drying at 105 °C to constant weight. Ash (g/100 g) was performed by heating in an oven at 550 °C for 6 h. Protein (g/100 g) was analyzed according to the Kjeldahl method using a nitrogen conversion factor of 5.75 (BRASIL, 2003). Fat (g/100 g) was determined by weight loss after a 6-cycle extraction with petroleum ether in a Soxhlet apparatus. Total dietary fiber (TDF) (g/100 g) was determined following the 991.43 AOAC method (AOAC, 1997). All analyses above were expressed in dry weight (d.w.). Available carbohydrate was calculated by difference; the amount of dietary fiber is analyzed and subtracted from total carbohydrate, thus: 100 - (weight in grams [protein + fat + water + ash + dietary fiber] in 100 g of sample).

Pectin was extracted by traditional heating extraction based on the method of Kratchanova et al. (Kratchanova *et al.*, 2004) with slight modifications. The sample (4 g) was mixed with acidified 100 mL hot water (HNO<sub>3</sub> 50 mM). After that, the mixture was heated to 80–82 °C using a heating magnetic stirrer, and the extraction was carried out with continuous stirring for 20 min. The hot mixture was cooled and filtered by vacuum filtration, and the filtrate was collected and stored in a refrigerator at 4 °C for subsequent purification. The extracted pectin was precipitated with two volumes of 95% ethanol (v/v) and allowed to stand for 30 min. Thereafter, the pectin was immersed in 70% ethanol for 12h for the removal of impurities and then washed with acetone and immediately dried at 40°C for 12h in an oven with air circulation. All values were expressed in g/100 g of d.w. The pH was measured in a suspension resulting from blending 3 g sample with 30 mL of deionized water using a pH meter (model pH/Ion 510, Eutech Instruments Pte Ltd., Singapore). The acidity was determined by titration with 0.01N NaOH as described in AOAC methods (AOAC, 1997). The water activity ( $a_w$ ) was determined in a TH-500 Sprint Novasina Thermoconstanter (Pfäffikon, Switzerland) at 25°C.

The color was studied in CIELAB color space using a Minolta CM-2600d (Minolta Camera Co., Osaka, Japan) with D<sub>65</sub> as an illuminant and an observer angle of 10° (Recommendations on uniform color spaces, color-difference equations, 1978).



The water holding capacity (WHC) and oil holding capacity (OHC) were determined according methodology described by Robertson et al. (Robertson *et al.*, 2000). The WHC is expressed as g water held/ g sample; the OHC is expressed as g of oil held/g sample. Each assay was carried out in quintuplicate.

### **Quantitative analysis of phenolic compounds and total carotenoids**

The phenolic compounds were determined by the procedure developed by (Larrauri *et al.*, 1997) with minor modifications; phenolic compounds were extracted by weighing approximately 2 g of sample and adding 10 mL of 80% methanol followed by ultrasonic mixing in a vortex for 10 min followed by a 10 min centrifugation (5200 g). This procedure was repeated 5 times. After this step, the sample was extracted again with 70% acetone repeating the same procedure described above. The total phenol content (TPC) was determined using Folin–Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965). The results were expressed as g gallic acid equivalents (GAE)/kg sample. The total flavonoid content was determined by the method based on (Zhishen, Mengcheng, & Jianming, 1999) with minor modifications. A sample of 250  $\mu$ L of passion fruit peel extract was mixed with 75 mL  $\text{NaNO}_2$  (5%), and 150  $\mu$ L  $\text{AlCl}_3$  (10%) was added after 5 min. The samples were mixed in a vortex for 2 min, and after 6 min they were neutralized with 0.5 mL NaOH (1 M). The absorbance was read at 510 nm, and correlated to a calibration curve. Different concentrations of catechin were used for calibration and the results were expressed in g catechin/kg sample. The total flavan-3-ols content was determined according to Arnous *et al.*, 2001 and Poudel, Tamura, Kataoka, & Mochioka, 2008 and expressed as g epicatechin/kg sample. The carotenoids were exhaustively extracted with cold acetone, partitioned into petroleum ether and washed with distilled water. The total content of carotenoids was determined by spectrophotometry at 450 nm in petroleum ether, and the result is expressed in terms of  $\beta$ -carotene using an absorptivity coefficient of 2592 (Rodriguez-Amaya, 2001).

### **Particle size distribution and scanning electron microscopy**

Particle size distribution (PSD) was determined using a MasterSizer Laser Diffraction Particle Size Analyzer (Malvern Instrument Ltd, Malvern, England). Size

distribution was quantified as relative volume of particles in size bands presented as size distribution curves (Malvern MasterSizer Micro software v 5.40). The PSD parameters recorded included specific surface area, largest particle size ( $D_{90}$ ), mean particle volume ( $D_{50}$ ), smallest particle size ( $D_{10}$ ), Sauter mean diameter ( $D[3,2]$ ) and mean particle diameter ( $D[4,3]$ ) (Afoakwa, Paterson, & Fowler, 2007). The microstructure of the passion fruit peel was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Powders were mounted on aluminum stubs with sticky double-side conductive metal tape without special treatment. Examination was performed with a TM3000 table-top scanning electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) at 10 kV accelerating voltage. The image acquisition was performed by TM300 Microscope software, version 02-01 (Hitachi High-Tech, Tokyo, Japan).

### **Statistical analysis**

All reported values represent the average value of the analysis of at least three separate replicates. An ANOVA was performed followed by Tukey's test ( $\alpha < 0.05$ ) for mean comparison. To explore the data, principal component analysis (PCA) was also performed. PCA is a multivariate statistical method that entails data reconstruction and reduction. It generates a set of a new orthogonal axes known as principal components (PCs) from the original variables (Shin, Craft, Pegg, Phillips, & Eitenmiller, 2010). The Statistica 8.0 software for Windows (Statsoft, Tulsa, OK, USA) was employed.

## **Results and discussion**

### **Physicochemical analysis and technological properties**

Table 1 shows the chemical compositions of passion fruit peel dried at hot-air convection ( $60^{\circ}\text{C}$ ), freeze-dried and the commercial sample, with the results expressed on dry weight. For the samples freeze-dried and dried at  $60^{\circ}\text{C}$  two batches were analyzed. The total dietary fiber was high ( $>60\%$  d.w.). López-Vargas et al. (2013) found a total dietary fiber content of 71.8 g/100 g d.w. for the passion fruit mesocarp. In the present study, under the same conditions (passion fruit peel dried at  $60^{\circ}\text{C}$ ), the level of dietary fiber was 72.7 g/100 g d.w. for the first batch and 64.0 g/100 g d.w. for the second. The high fiber content associated with the flavor and aroma makes the dehydrated passion fruit peel products

potentially usable in some food preparations with the purpose of increasing fiber content. These co-products can be incorporated in several foods due to their capacity to retain water and increase satisfaction after eating, as well as its ability to decrease the time of nutrient absorption. In addition, these co-products can have technological applications as important thickening agents, gelling and stabilizers of foams and emulsions (Fito *et al.*, 2012). Passion fruit peel has been reported to contain significant amount of pectin (Kulkarni & Vijayanand, 2010). In this study, there was significant difference in the amount of pectin between the two batches of peel dried at 60°C. This difference is most likely due to the differences in the degree of maturity, storage time and harvest time. It is worth noting that, as expected, the amount of pectin of the powdered obtained by freeze-dried is greater than that dried with hot air convection, for the same batches (15.91 and 6.98% d.w. for batch 1 and 19.60 and 13.54 for batch 2). Moreover, the commercial sample (that was dried according to the information of the label) shows a significantly lower level when compared with the peel dried at 60°C (second batch) and peel freeze-dried. Freeze-drying is used and restricted primarily to industry because it requires qualified personnel and higher investment costs. In contrast, convective hot-air drying demands a small investment for crop producers and small industries. The utilization of passion fruit peel for commercial pectin production will not only solve waste disposal problems but can enhance the availability of pectin in the marketplace. The pectin extracted from the peels of passion fruit can be used to enhance the functional properties of different food products (Kulkarni and Vijayanand, 2010).

**Table 1.** Physicochemical composition of powdered passion fruit peel.

Sample	Passion fruit peel - dried at 60 °C		Passion fruit peel - freeze dried		Commercially produced
	batch 01	batch 02	batch 01	batch 02	
Moisture (%) <sup>1</sup>	6.72±0.45	4.75±0.86 <sup>b</sup>	9.46±0.48 <sup>c</sup>	6.36±0.53 <sup>d,a,b</sup>	7.56±0.91 <sup>a,c,d</sup>
Ash (%) <sup>1</sup>	8.42±0.11 <sup>a</sup>	7.24±0.09 <sup>b,c</sup>	9.47±0.46 <sup>a</sup>	8.76±0.07 <sup>a,d</sup>	8.17±0.03 <sup>c,d</sup>
Protein (%) <sup>1</sup>	7.89±0.42 <sup>a</sup>	7.88±0.52 <sup>a</sup>	8.64±0.19 <sup>a</sup>	8.48±0.14 <sup>a</sup>	7.77±0.19 <sup>a</sup>
Fat (%) <sup>1</sup>	1.16±0.07 <sup>a</sup>	0.98±0.15 <sup>a,b</sup>	0.91±0.16 <sup>a,d</sup>	0.86±0.21 <sup>b,d</sup>	2.87±0.06 <sup>c</sup>
Dietary fiber (%) <sup>1</sup>	72.67±0.27 <sup>a</sup>	63.98±0.11 <sup>b</sup>	67.40±0.12 <sup>c</sup>	65.91±0.86 <sup>c</sup>	72.68±0.19 <sup>a</sup>
Available carbohydrate <sup>2</sup>	3.14	15.17	4.12	9.63	0.95
Pectin (%) <sup>1</sup>	6.98±0.32 <sup>a</sup>	13.54±1.01 <sup>b</sup>	15.91±0.29 <sup>c,b</sup>	19.60±1.62 <sup>c</sup>	8.38±0.35 <sup>a</sup>
Water activity	0.398±0.001 <sup>a</sup>	0.415±0.001 <sup>b</sup>	0.455±0.001 <sup>c</sup>	0.474±0.001 <sup>d</sup>	0.437±0.001 <sup>e</sup>
Acidity (g C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> /100 g sample)	1.22±0.02 <sup>a</sup>	1.85±0.03 <sup>b</sup>	3.32±0.04 <sup>c</sup>	2.05±0.03 <sup>d</sup>	1.97±0.00 <sup>d</sup>
pH	5.28	4.83	4.53	4.91	4.56

The results represent the average of triplicate ± standard deviation followed by different small letters in line indicate significant difference (p<0.05) by the Tukey test. <sup>1</sup> Values are expressed as g/100 g d.w. <sup>2</sup>Calculated by difference.

The proximate composition analysis showed higher fat contents in the commercial sample compared to the other samples (p<0.05). The average fat content found in the samples that were freeze-dried and dried at 60°C (0.88% and 1.07% d.w., respectively) are very close to those found by López-Vargas *et al.* (2013) (1.00% d.w.). The ashes content of the samples varied between 7.24 and 9.47% d.w., which are higher than the values obtained by Martínez *et al.* (2012) for different fruit peels, such as mango and pineapple. According to the same authors, the high ash content could be a problem in the potential application of these co-products in food since the amounts of metal ions would increase considerably and might facilitate the oxidation of the product in which they are incorporated. The ashes are made up mainly of potassium (4.49 g/100 g d.w.), sodium (0.136 g/100 g d.w) and magnesium (0.109 g/100 g of d.w.) (data not shown). It can also be observed that there is a difference (p<0.05) in ash between lots of passion fruit peel dried at 60°C that is probably due to the degree of ripeness of the fruit. Regarding the proteins, the passion fruit peel that was dried at 60°C had a protein content of approximately 8% d.w., which was higher than that reported by Martínez *et al.* (2012) and López-Vargas *et al.* (2013) in passion fruit extracts obtained from pulp, peel and seeds (6.2% and 0.35%).

The pH ranged from 4.53±0.01 to 5.28± 0.03; the pH of passion fruit peel dried at 60°C were similar to that found by López-Vargas *et al.* (2013) (4.36). However, the pH values of passion fruit peel were higher than the co-product fiber of lemon albedo (3.96) obtained by (Lario *et al.*, 2004). The acidity results obtained for the passion fruit peel

powder showed variation between the fruit peel dried at 60°C and freeze-dried. The decrease in acidity in fruit peel dried at 60°C may be due to the loss of volatile acid compounds during the thermal process. For the freeze-dried samples, the acidity was higher, most likely because they were not subjected to heat and the dehydration process occurs in the absence of oxygen. The low water activity and pH values (both parameters highly related to product deterioration) of the samples indicate that the risk of deterioration (by microorganisms or enzymes) is minimal. Almost all deterioration processes that occur in food are influenced by the mobility and concentration of water, so it is necessary to control the moisture and the  $a_w$  of food to increase its shelf life. In this study, the dehydrated products had  $a_w$  values lower than 0.60, which can prevent microorganisms, xerophilic molds and osmophilic yeasts from growing because they typically grow between  $a_w$  of 0.60 and 0.65.

Regarding the color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  and  $h_{ab}$ ) present in the Table 2, all the powdered passion fruit peel were located on the 2<sup>nd</sup> quadrant of the CIELAB  $a^*b^*$  plane (values of  $a^*$  ranging from 0.21 to 3.78 and values of  $b^*$  ranging from 15.28 to 24.37), so were classified as yellowish. The difference in lightness ( $L^*$ ) between the samples was statistically significant ( $p < 0.05$ ). In regard to the red-green coordinate, ( $a^*$ ), differences occurred between the samples dried at 60°C and freeze-dried. The yellow–blue coordinate ( $b^*$ ) of the freeze-dried sample had a value of approximately 24, while the sample dried at 60°C had a value of approximately 16, with a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ). The differences in chroma ( $C_{ab}^*$ ) values and hue angle ( $h_{ab}$ ) between the samples dried at 60°C, freeze-dried and commercially produced were also statistically significant ( $p < 0.05$ ). There was some browning in the hot-air convection drying samples, whereas the freeze-dried samples had a lighter coloring compared to the fresh fruit. In general, all the dehydrated products presented a variation in yellowish coloring (Chua *et al.*, 2001). The dark yellow observed in samples dried at 60°C is most likely due to enzyme activity which resulted in the oxidation of phenolic compounds to o-quinones due to the polyphenol oxidase (PPO) activity. During the freeze-drying process the enzymatic browning reaction did not occur, leaving the samples lighter. Finally, it can be observed that the coordinates  $L^*$ , chroma and hue angle values indicated that the convective hot-air

dried sample presented a darker color (orange) when compared to the freeze-dried sample (light yellow).

**Table 2.** Technological properties, particle size distribution and phytochemical compounds of powdered passion fruit peel.

Sample	Passion fruit peel - dried at 60°C		Passion fruit peel – freeze-dried		Commercially produced
	batch 01	batch 02	batch 01	batch 02	
<i>L</i> *	41.45±0.14 <sup>a</sup>	40.46±0.12 <sup>b</sup>	84.36±0.03 <sup>c</sup>	85.48±0.09 <sup>d</sup>	35.02±0.51 <sup>e</sup>
<i>a</i> *	3.60±0.03 <sup>a</sup>	3.78±0.02 <sup>b</sup>	0.27±0.01 <sup>c</sup>	0.21±0.01 <sup>c</sup>	3.56±0.05 <sup>a</sup>
<i>b</i> *	16.69±0.14 <sup>a</sup>	15.88±0.02 <sup>b</sup>	24.37±0.06 <sup>c</sup>	23.16±0.04 <sup>d</sup>	15.28±0.14 <sup>e</sup>
<i>C</i> <sub>ab</sub> *	17.07±0.14 <sup>a</sup>	16.33±0.01 <sup>b</sup>	24.37±0.06 <sup>c</sup>	23.16±0.04 <sup>d</sup>	15.69±0.15 <sup>e</sup>
<i>h</i> <sub>ab</sub>	1,36±0,00 <sup>a</sup>	1,34±0,00 <sup>b</sup>	1,56±0,00 <sup>c</sup>	1,56±0,00 <sup>c</sup>	1,34±0,00 <sup>b</sup>
WHC <sup>1</sup>	9.82±0.57 <sup>a</sup>	6.30±0.04 <sup>b</sup>	14.99±0.67 <sup>c</sup>	14.91±0.41 <sup>c</sup>	8.02±0.31 <sup>d</sup>
OHC <sup>2</sup>	2.65±0.25 <sup>a</sup>	3.16±0.18 <sup>a</sup>	6.36±0.23 <sup>b</sup>	6.55±0.40 <sup>b</sup>	3.06±0.14 <sup>a</sup>
D <sub>10</sub> (µm)	31.61	34.81	38.46	41.15	23.67
D <sub>50</sub> (µm)	246.31	307.33	186.43	247.45	111.51
D <sub>90</sub> (µm)	837.50	751.31	588.4	502.21	386.96
D[3,2] (µm)	3.27	2.33	2.95	1.86	3.26
D[4,3] (µm)	345.06	345.54	259.64	250.39	163.87
Phenolic compounds <sup>3</sup>	6.39±0.33 <sup>a</sup>	5.02±0.33 <sup>b</sup>	9.04±0.12 <sup>c</sup>	6.47±0.21 <sup>a</sup>	5.79±1.58 <sup>a,b</sup>
Flavonoid <sup>4</sup>	1.02±0.01 <sup>a</sup>	0.95±0.03 <sup>a</sup>	0.68±0.02 <sup>b</sup>	0.59±0.05 <sup>b</sup>	1.42±0.02 <sup>c</sup>
Flavan-3-ols <sup>5</sup>	0.009±0.001 <sup>a</sup>	0.012±0.001 <sup>b</sup>	0.023±0.001 <sup>c</sup>	0.019±0.01 <sup>d</sup>	0.025±0.001 <sup>c</sup>
Total carotenoids <sup>6</sup>	2.55±0.18 <sup>a</sup>	9.41±0.66 <sup>b</sup>	5.29±0.19 <sup>c</sup>	8.03±0.51 <sup>d</sup>	5.96±0.55 <sup>c</sup>

The results represent the average of triplicate ± standard deviation followed by different small letters in line indicate significant difference (p< .05) by the Tukey test. <sup>1</sup> WHC (Water Holding Capacity), g of H<sub>2</sub>O/g. <sup>2</sup> OHC (Oil Holding Capacity), g oil/g. <sup>3</sup> g gallic acid equivalents (GAE/Kg d.w.). <sup>4</sup> g catechin/Kg d.w. <sup>5</sup> g epicatechin/ kg d.w. <sup>6</sup> µg all-trans-β-carotene/g d.w.

The results for the water holding capacity (WHC) and oil holding capacity (OHC) of passion fruit peel dried at 60°C, freeze-dried and commercially produced are shown in Table 2. The hydration properties of dietary fiber are related to the chemical structure of the polysaccharide component and other factors such as porosity, particle size, ionic form, extraction condition pH, temperature, ionic strength, type of ions in solution, vegetable source and stresses on fibers (Elleuch *et al.*, 2011). The water-holding capacity is an important property of dietary fiber from both physiological and technological standpoints. This property shows the ability of a moist material to retain water when subjected to an external centrifugal gravity force or compression. Processes such as grinding, drying, heating or extrusion cooking, for example, may modify the physical properties of the fiber matrix, also affect the hydration properties (Elleuch *et al.*, 2011). According to Table 2, the WHC values of the peel that was dried at 60°C were significantly different between the two batches; for the lyophilized powder, the values did not differ significantly. There was a

significant difference ( $p < 0.05$ ) between the WHC of the peel dried at  $60^{\circ}\text{C}$  ( $9.82 \pm 0.57$  and  $6.30 \pm 0.04$ ) and the higher values of the freeze-dried peel ( $14.99 \pm 0.67$  and  $14.91 \pm 0.41$ ). Exposure to  $60^{\circ}\text{C}$  for an extended period could have altered the polysaccharide structure and, consequently, created a decrease in water-holding capability. The commercial sample showed values similar to those of peel dried at  $60^{\circ}\text{C}$ . Fito *et al.* (2012) found values for water-holding capacity of 6.40 and 13.50 g/g for mango and passion fruit concentrates, respectively. López-Vargas *et al.* (2013) found similar values of WHC (13.00 g  $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ ) for passion fruit albedo with those found in the present study for freeze-dried peel.

The oil holding capacity (OHC) is also a technological property related to the chemical structure of plant polysaccharides and depends on their chemical and physical structure (Martínez *et al.*, 2012). As noted in Table 2, OHC values were shown to be within the range of 2.65–6.55 g oil/g, with statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) for the freeze-dried samples compared with the others; The freeze-dried sample showed a higher OHC when compared to the other samples, indicating that exposure of passion fruit peel to a temperature of  $60^{\circ}\text{C}$  for a long period altered the physicochemical structure of plant polysaccharides and the hydrophobic nature of the particle (Fernández-López *et al.*, 2009). López-Vargas *et al.* (2013) found an OHC of passion fruit albedo of 2.03 g oil/g, a value similar to that found in this work for the passion fruit peel dried at  $60^{\circ}\text{C}$ . Other studies have reported the OHC of fibrous residues, such as coconut fiber (5.30 g oil/g) (Raghavendra *et al.*, 2006) or fiber-rich banana powder (2.20 g oil/g) (Rodríguez-Ambriz *et al.*, 2008).

### **Phytochemical Compounds**

Phenolic content can be used as an important indicator of antioxidant capacity and as a preliminary screen for any product intended to be used as a natural source of antioxidants in functional foods (Viuda-Martos *et al.*, 2011). The total phenol content of dried at  $60^{\circ}\text{C}$  samples ranged from  $5.02 \pm 0.33$  g/kg d.w. (second batch) to  $6.39 \pm 0.33$  g/kg d.w. (first batch) with statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the two batches (Table 2). López-Vargas *et al.* (2013) found the TPC of passion fruit albedo to be 0.64 g/kg d.w. when the conditions were the same used in this study. Martínez *et al.* (2012) obtained TPC of the fiber concentrates from pineapple equal to 1.29 g/kg d.w. Freeze-dried samples showed the highest TPC, ranging from  $6.47 \pm 0.21$  (second batch) to  $9.04 \pm 0.12$  g/kg d.w.

(first batch), with a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between the two batches. For the same batch, the freeze-dried samples presented a higher TPC values when compared with samples dried at  $60^{\circ}\text{C}$ . These data suggest that phenolic compounds were retained in the process of lyophilization because enzymatic activity was inhibited during the drying time. The lighter coloration observed in these samples indicates the absence of brown compounds such as o-quinones. Prolonged exposure to  $60^{\circ}\text{C}$  and oxygen was most likely the cause of the degradation of phenolic compounds observed in the dried passion fruit peel. With regard to the commercial sample, the TPC was  $5.8 \pm 1.58$  g GAE/kg d.w., which was not significantly different ( $p < 0.05$ ) from the dried samples. These values are within the broad range reported in the literature for the peels of exotic fruit such as banana passion fruit (*Passiflora mollissima*) (2.46 g GAE/kg d.w.), cocona (*Solanum sessiliflorum*) (0.87 GAE/kg d.w.), and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (2.52 g GAE/kg d.w.) ( Sant'Ana *et al.*, 2011).

The total flavonoid (TFC) content in the commercial sample was the highest ( $1.42 \pm 0.02$  g catechin /kg d.w.), which was statistically significantly different ( $p < 0.05$ ) from the others samples. Surprisingly, the dried samples had higher TFC when compared to the freeze-dried samples. The flavan-3-ols contents ranged from  $0.009 \pm 0.001$  to  $0.025 \pm 0.001$  g epicatechin/kg d.w. The commercial sample showed the highest flavan-3-ols content, differing significantly from the dried at  $60^{\circ}\text{C}$  samples (first and second batch) and the second batch of the freeze-dried sample. The concentration and type of phytochemical compounds in fruit and fruit co-products depend on several factors: differences in varieties, ripeness and season; environmental factors (such as soil type and climate); genetic factors, processing and extraction methods.

In addition to their colorant properties, carotenoids are known to have several other biological functions, such as vitamin A activity, cancer-preventing effects, protective effects against cardiovascular disease and reduction of the risk of cataracts and age-related macular degeneration (Rodriguez-Amaya, 2001). According to Souza *et al.* (2012),  $\beta$ -carotene is the majority carotenoid found in passion fruit. The carotenoid levels are also shown in Table 2 and ranged from  $2.55 \pm 0.18$  to  $9.41 \pm 0.66$   $\mu\text{g}$  all-*trans*- $\beta$ -carotene/g. Souza *et al.* (2012) found  $13.10$   $\mu\text{g}$   $\beta$ -carotene/g d.w. for the sweet passion fruit pulp and  $12.10$   $\mu\text{g}$

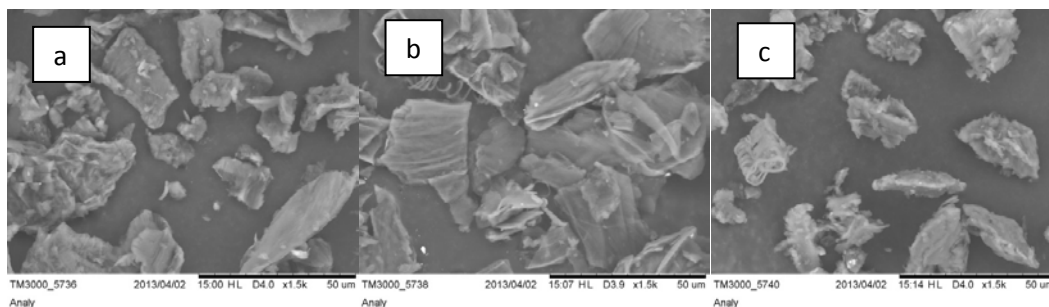


$\beta$ -carotene/g d.w. for soursop. All these studies were analyzed by spectrophotometer at wavelengths of 450 nm for  $\beta$ -carotene.

### **Particle size distribution and microstructure**

The particle size distribution is of major importance because it determines both the technological functionality of the fiber and its role in the digestive tract (transit time, fermentation, fecal excretion). The shape and consequently the size of the fibers depend on the degree of processing and may also vary during transit in the intestine tract as a result of digestion processes (Rosell *et al.*, 2009). Researchers have shown that the co-products of passion fruit are rich in fiber (López-Vargas *et al.*, 2013), so the study of the structure and the particle size is of great importance. The particle size distribution (PSD) of the different sample powders is presented in Table 2. The commercial sample showed the lowest mean particle diameter (D[4,3]) and the largest particle size was observed for the dried peel. The average diameter and particle size distribution showed similar values for the two batches (sample hot-dried and freeze-dried), which would be expected since the two batches were prepared by the same milling processes (even though the process for the hot-dried samples took more time). A reduction in particle size has typically been associated with lower ability to retain water and oil holding capacity. Certainly, particle size is not the only determinant parameter of hydration; chemical structure and shape also play essential roles. Therefore, the effect of particle size on water and oil holding cannot be generalized and must be assessed for each type of fiber (Shin *et al.*, 2010). In this study, the average particle size of the lyophilized powder was smaller than hot-dry powder while its capacity for holding water and oil was the greatest of all.

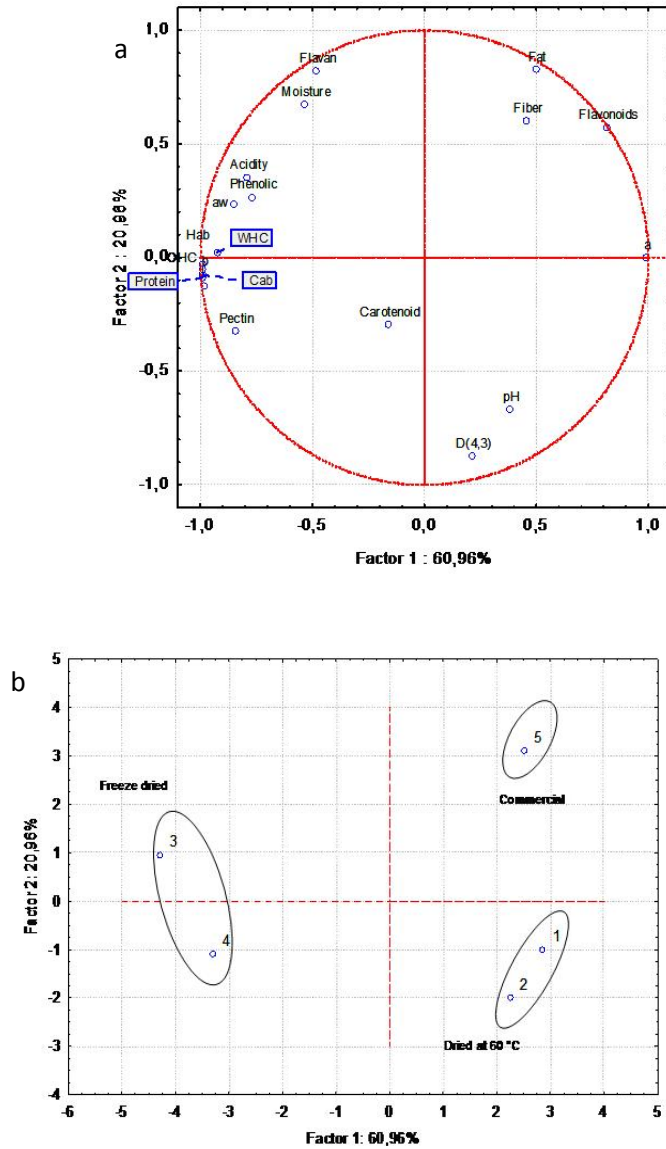
In order to investigate the change in the microstructure caused by the drying process, Figure 1 shows the scanning electron micrographs of the samples. As can be seen, the structure of the lyophilized powder was more conserved when compared to the hot-dry and commercial sample. The microstructures were similar to others samples from plant sources that have a high fiber content (Rosell *et al.*, 2009).



**Figure 1.** Scanning electron micrographs (x1500 magnification) of passion fruit peel. a) commercial sample, b) freeze-dried sample, c) dried at 60 °C sample.

### Multivariate analysis

The results of multivariate analysis are showed in Figure 2. The first principal component (i.e., PC1) accounted for 60.96% of the variability in the data set, and the second (i.e., PC2) accounted for 20.96% of the variance in the data (Figure 2a). The PC1 has high and positive contributions from chromatic coordinate  $a^*$  (0.989) and flavonoids (0.816) and presented high and negative contributions from colour:  $L^*$  (-0.965), chromatic coordinate  $b^*$  (-0.987),  $C_{ab}^*$  (-0.987) and  $h_{ab}$  (-0.987); from technological properties: OHC (-0.990) and WHC (-0.925); and some physicochemical properties: protein content (-0.989), pectin (-0.845) and water activity (-0.849). The PC2 has high and positive contribution from fat (0.826), flavan-3-ols (0.819), moisture (0.676) and fiber (0.603) and high and negative contributions from D(4,3) (-0.875) and pH (-0.667). The score plots of the five powders of passion fruit peel generated from comparisons of the two PC (PC1 and PC2) are depicted in Figure 2b. Three distinct groups of samples can be seen (freeze-dried, convective dried at 60°C and commercial sample). The freeze-dried powders were separated from the others by PC1 (being well differentiated by color and by technological variables). The difference between the commercial and freeze-dried powders can be explained mainly by the difference in the values of fat, D[4,3] and flavonoids. Multivariate analysis allowed the grouping of samples that were subjected to the same treatments despite differences obtained in the analyzes of different batches.



**Figure 2.** Results of the principal component analysis: a) loading plot of PC1-PC2. b) score plots for samples.

## Conclusion

In the present work, two different methods of dehydration – freeze-drying and convective drying at 60°C – were used to produce a powdered passion fruit peel, which is a co-product of the production of passion fruit juice. This powder is rich in dietary fiber and

bioactive compounds, so researches concerning its reuse in the food industry are of great importance.

It was observed that the freeze-dried powder presented a less dark color, a higher ability to absorb water and oil and a higher phenolic compounds and pectin content when compared with the others samples. The drying process a 60°C, which is a much less expensive process, produced a powder with a more intense color but preserved the amount of the total dietary fiber.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) as a scholarship to the first author and by the PNPB Project (Programa Nacional de Pós-Doutorado) and also from FAPERGS (Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul).

### **References**

- Afoakwa, E. O., Paterson, A. and Fowler, M. 2007. Effects of particle size distribution and composition on rheological properties of dark chocolate. *European Food Research and Technology*, 226(6): 1259–1268.
- AOAC. (1997). *Methods of analysis of AOAC International*. (A. of O. A. Chemists, Ed.) (18th ed.). Arlington.
- Arnous, A., Makris, D. P. and Kefalas, P. 2001. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(12): 5736–42.
- BRASIL. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados (2003). Brasil: Diário Oficial da União, Brasília, 26 dez. 2003. Seção 1.

- Bruckner, C.H. and Picanço, M. C. 2001. *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado*. (C. Continentes, Ed.). Porto Alegre.
- Chankvetadze, B., Cifuentes, A., Naczki, M. and Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *41*(5): 1523–1542.
- Chau, C.-F. and Huang, Y.-L. 2005. Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output. *Molecular nutrition & food research*, *49*(8): 786–90.
- Chua, K. J., Mujumdar, A. S., Hawlader, M. N. A., Chou, S. K. and Ho, J. C. 2001. Batch drying of banana pieces — effect of stepwise change in drying air temperature on drying kinetics and product colour. *Food Research International*, *34*(8): 721–731.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C. and Attia, H. 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, *124*(2): 411–421.
- Fernández-López, J., Sendra-Nadal, E., Navarro, C., Sayas, E., Viuda-Martos, M., & Alvarez, J. A. P. 2009. Storage stability of a high dietary fibre powder from orange by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, *44*(4): 748–756.
- Fito, P., Toldrá, F., Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Martín-Sánchez, A., Sánchez-Zapata, E. and Pérez-Álvarez, J. A. 2012. Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses powder co-product. *Journal of Food Engineering*, *110*(2): 220–224.
- Janebro, D. I., Queiroz, M. S. R., Ramos, A. T., Sabaa-Srur, A. U. O., Cunha, M. A. L. and Diniz, M. F. 2008. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *18*: 724–732.

- Kratchanova, M., Pavlova, E. and Panchev, I. 2004. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, 56(2): 181–185.
- Kulkarni, S. G. and Vijayanand, P. (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 43(7): 1026–1031.
- Lario, Y., Sendra, E., Garcia-Pérez, J., Fuentes, C., Sayas-Barberá, E., Fernández-López, J. and Pérez-Alvarez, J. A. (2004). Preparation of high dietary fiber powder from lemon juice by-products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1): 113–117.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P. and Saura-Calixto, F. 1997. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4): 1390–1393.
- López-Vargas, J. H., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A. and Viuda-Martos, M. 2013. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, 51(2): 756–763.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., and Viuda-Martos, M. 2012. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135(3): 1520–1526.
- Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I. and Mochioka, R. 2008. *Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 622-625.
- Raghavendra, S. N., Ramachandra Swamy, S. R., Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Kumar, S. and Tharanathan, R. N. 2006. Grinding characteristics and hydration

properties of coconut residue: A source of dietary fiber. *Journal of Food Engineering*, 72(3): 281–286.

Recommendations on uniform color spaces, color-difference equations, psychometric color terms. (1978). No Title. Viena: Bureau Central de la CIE.

Robertson, J. A., de Monredon, F. D., Dysseler, P., Guillon, F., Amado, R., and Thibault, J.-F. 2000. Hydration Properties of Dietary Fibre and Resistant Starch: a European Collaborative Study. *LWT - Food Science and Technology*, 33(2): 72–79.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI PRESS.

Rodríguez-Ambriz, S. L., Islas-Hernández, J. J., Agama-Acevedo, E., Tovar, J. and Bello-Pérez, L. A. 2008. Characterization of a fibre-rich powder prepared by liquefaction of unripe banana flour. *Food Chemistry*, 107(4): 1515–1521.

Rosell, C. M., Santos, E. and Collar, C. 2009. Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach. *Food Research International*, 42(1): 176–184.

Salgado, J. M., Bombarde, T. A. D., Mansi, D. N., Piedade, S. M. de S., & Meletti, L. M. M. (2010). Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic rat. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(3), 784–789.

Sant'Ana, A. de S., Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A. and González-Aguilar, G. A. 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 44(7): 1866–1874.

Sant'Ana, A. de S., Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., and García-Villanova, B. 2011. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C

- in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, *44*(7): 2047–2053.
- Sendra, E., Fayos, P., Lario, Y., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E. and Pérez-Alvarez, J. A. 2008. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bacteria. *Food Microbiology*, *25*(1): 13–21.
- Shin, E.-C., Craft, B. D., Pegg, R. B., Phillips, R. D. and Eitenmiller, R. R. 2010. Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). *Food Chemistry*, *119*(3): 1262–1270.
- Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3): 144–158.
- Teixeira, C. G., de Castro, J. V., Tocchini, R. P., Nisida, A. L. A. C., Hashizume, T. and Medina, J. C. (1994). Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. (I. Série Frutas Tropicais, Ed.). Campinas.
- Vergara-Valencia, N., Granados-Pérez, E., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., Ruales, J. and Bello-Pérez, L. A. 2007. Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(4): 722–729.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez, J. A. (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Science*, *85*(3): 568–576.
- Viuda-Martos, Manuel, Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E. and Pérez-Álvarez, J. A. 2011. Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International*, *44*(5): 1217–1223.



Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4): 555–559.

Zibadi, S., Farid, R., Moriguchi, S., Lu, Y., Foo, L. Y., Tehrani, P. M. and Watson, R. R. 2007. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. *Nutrition Research*, 27(7): 408–416.

## **Capítulo 5**

**Artigo 2 - Extraction of Pectin from Passion Fruit Peel Using Moderate Electric Field and Conventional Heating Extraction Methods.** Artigo publicado no periódico *Innovative Food Science and Emerging Technologies*

*Abstract:* Yellow passion fruit peel contains a high level of pectin that can be extracted from cell walls of plants. Direct boiling is a conventional method of extraction, which takes around two hours to obtain a good yield of pectin. The long period of heating can produce degradation in the pectin, when the conventional heating is used to extract the pectin a lot of time and energy is spent. The purpose of this study was to explore the conventional and the moderate electric field extractions of pectin from passion fruit peel. The comparison of galacturonic acid content and esterification degree of the pectin obtained by different extraction methods indicated that similar values were obtained. Furthermore, moderate electric field is an efficient, timesaving, and eco-friendly method for the extraction of pectin from passion fruit peel, especially for pectin with a high esterification degree and galacturonic acid content higher than 65 %.

*Keywords:* pectin, soluble fiber, galacturonic acid, esterification degree, scanning electron microscopy, emerging technologies.

*Industrial relevance:* This information is important for food industry since direct boiling, that is a conventional method of extraction, takes around two hours to obtain a good yield of pectin and uses strong acid solutions. Also, today, this information which shows much interest in the food industry.

### **Highlights**

Yellow passion fruit peel contains a high level of pectin.

Different extraction methods were used, traditional heating and moderate electric field.

Moderate electric field is an eco-friendly method for the pectin extraction.

## 1. Introduction

Coproducts may be converted into a range of commercial products either as raw materials for secondary processes (intermediate food ingredients), as operating supplies, or as ingredients of new products (Sánchez-Zapata et al., 2009). Although plant food coproducts are interesting from a nutritional point of view, only a few of them have been successfully developed from the vast quantities of plant residues produced by the food processing industry. The edible part of passion fruit (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) (40 %) consists of pulp with seeds, and 60 % of the peel consists of mesocarp and epicarp. The peel of yellow passion fruit contains bioactive compounds and high levels of dietary fiber, such as pectin (López-Vargas, Fernández-López, Pérez-Álvarez, & Viuda-Martos, 2013; Sant'Ana et al., 2011; Seixas et al., 2014).

Pectin is a complex polysaccharide material that can be extracted from the cell walls of non-graminaceous plants (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001). The structure of pectin is based on 1,4-linked  $\alpha$ -D-galacturonic acid and has L-rhamnose residues with side-chains of neutral sugars (mainly D-galactose and L-arabinose) (Mohnen, 2008). Pectin is a soluble fiber, and it can be used as a gelling agent and stabilizer in a variety of food, pharmaceutical, and cosmetic products (Espitia, Du, Avena-Bustillos, Soares, & McHugh, 2014; Guo et al., 2014; Thakur, Singh, & Handa, 1997). Pectin is poorly digested in the small intestine but is fermented by bacteria in the colon, leading to the production of short chain fatty acids. This characteristic has led to interest in pectin as a prebiotic (Manderson et al., 2005). Due to its simple and cytocompatible gelling mechanism, pectin has been recently exploited for different biomedical applications, including drug delivery, wound healing and tissue engineering (Munarin, Tanzi, & Petrini, 2012). Min, Bae, Lee, Yoo, & Lee, (2010) used pectin-enriched materials from apple pomace as a fat replacer in a model food system, and Tripathi, Mehrotra, & Dutta, (2010) studied pectin as a material for food-packaging applications.

Commercial pectin is usually produced from the waste plant material remaining after the extraction of juice (apple pomace or citrus peel) or sugar (sugar beet pulp). Industrial pectins have particular specifications that include no less than 65 % galacturonic acid as stated by the Food and Agricultural Organization. With respect to the degree of esterification, pectin with a degree of esterification higher than 50 % is named high

methoxyl pectin (HMP), and pectin with a degree of esterification less than 50 % is named low methoxyl pectin (LMP).

Extraction is a method used for obtaining components from a solid mixture or solution. Generally the extraction consist of two steps, the material to be extracted is first soaked in a solvent to swell and hydrate it, and then the soluble components move into the extraction solvent by the mass transfer actions of diffusion and permeation (Mustafa & Turner, 2011). The utilization of a suitable method for pectin extraction is significant to maximize its extraction yield and improve the product quality. Numerous scientific publications have studied the influence of extraction conditions on the physicochemical characteristics and functional properties of pectin extracted from various plant tissues (Guo et al., 2014; Jiang et al., 2012; Koubala et al., 2008; Levigne, Ralet, & Thibault, 2002; Xu et al., 2014; Yapo, Robert, Etienne, Wathelet, & Paquot, 2007; Yapo, 2009). The most commonly used methods for the extraction of pectin include direct boiling and microwave heating (Fishman, Chau, Hoagland, & Ayyad, 1999; Guo et al., 2014; Joye & Luzio, 2000; Kratchanova, Pavlova, & Panchev, 2004; Guo, Hana, Xia, Raoa, Liaoa, Hua, Wua, 2012) to increase extraction yield, higher quality, and environmental protection compared with conventional direct boiling acid extraction (Fishman et al., 1999; Fishman, Chau, Hoagland, & Hotchkiss, 2006; Wang et al., 2007).

Nevertheless, none of the methods extract all of the pectin without causing some degradation. Direct boiling is a conventional method of pectin extraction, which takes up to approximately two hours to obtain a good yield of pectin (El-Nawawi & Shehata, 1987; Yeoh, Shi, & Langrish, 2008). Due to a relatively long period of direct heating, the extracted pectin undergoes thermal degradation (Einhorn-Stoll, Kastner, & Drusch, 2014; El-Nawawi & Shehata, 1987; Xie et al., 2011).

Several kinds of new technologies, such as microwave heating at ambient and moderate pressures, ultrasonication, and super high frequency electromagnetic field are currently used, either sequentially or independently, in the extraction of pectin. Actually there three main applications of the electric current in food processing: the ohmic heating, which is simply passing continuously a determined electrical current, (liquids), the pulsed electric field or PEF, which means passing discrete discharges of electrical current, (liquids), the electric field, which means having two charged electrodes with not passing

the electrical current (liquids semisolids and solids). Moderate electric field (MEF) is defined as a process of controlled and possibly reversible permeabilization characterized by use of electric fields (typically below 1 KV/cm) with arbitrary waveform electric fields, heating usually occurs in these applications, but controlled studies have shown enhanced mass transfer effects that are nonthermal in nature. Depending on the relative electric and thermal exposure of a particular treatment, it is possible to obtain a wide variety of effects in biological materials (Sensoy & Sastry, 2004).

The aim of this study was to explore the potential of moderate electric field (MEF) extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) and conventional heating extraction (CHE).

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Plant material**

Two batches of 10 kg of yellow *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener* fruits were purchased in different days from a local market (Porto Alegre, RS, Brazil). The fruits were washed and sliced to remove the pulp with seeds. The peels (composed of mesocarp and epicarp) were then immersed in water at approximately 100 °C for 3 min followed by cooling in an ice bath (blanching). The peels were then ground in a domestic blender according to the manufacturer's instructions, and the peels were dried in an oven with air circulation at 60 °C for 72 h. After drying, the samples were milled again in the domestic blender as many times as necessary to pass through mesh 60#. The powder of passion fruit peel obtained from two different batches, were homogenates before the experiments start.

### **2.2 Physicochemical analysis**

Moisture, ash, protein, and fat contents were determined by AOAC methods (AOAC, 1997). Moisture was determined by drying at 105 °C to a constant weight. Ash was measured by heating in an oven at 550 °C for 6 h. Protein was analyzed according to the Kjeldahl method using nitrogen conversion factor of 5.75 (ANVISA, 2003). Fat was determined by weight loss after a 6-cycle extraction with petroleum ether in a Soxhlet apparatus for one hour each cycle. Total dietary fiber, soluble fiber and insoluble fiber were

determined following the 991.43 AOAC method (AOAC, 1997). Determination of minerals was performed by atomic emission spectrometry according to methods 393/IV and 395/IV of Instituto Adolfo Lutz, (2005). All results are expressed as g per 100 g dry matter (d.m.).

### **2.3. Extraction and purification of pectin**

For conventional heating and moderate electric field extraction single factor experiments were performed to determine the appropriate pH, time, voltage for the extraction of pectin by varying one independent variable.

#### **2.3.1 Conventional heating extraction**

Pectin extracted by the conventional heating extraction (CHE) method was based on the method of Kratchanova et al., (2004) with slight modification. In the extraction process, many factors, including extraction solvent, pH of solvent, solid liquid ratio, extraction temperature and extraction time, can affect the efficiency of pectin extraction. According to the previous studies the dried peel/extractant ratio and temperature were maintained at 1:30 (w/v) and  $85 \pm 2$  °C, respectively, during extraction. To determine the best extraction conditions, two factors, including time and pH were considered as major factors. The effect of each individual factor was investigated by single-factor experiments. The extraction time of pectin was varied for 10, 30 and 60 min, and different extractants with pH of  $0.30 \pm 0.02$ ,  $1.00 \pm 0.02$ ,  $2.00 \pm 0.02$  and  $5.00 \pm 0.02$  were prepared by diluting the stock nitric acid solution. After the time of extraction, the hot mixture was centrifuged and filtered by vacuum filtration, and the filtrate was collected and stored in a refrigerator at 4 °C for subsequent purification.

#### **2.3.2 Moderate electric field extraction**

Experiments were performed in a batch stirred reactor with a moderate electric field at 60 Hz. The moderate electric field apparatus consisted of the following components: a manual transformer (0-240 V); a data acquisition system that recorded temperature, current and voltage data (data logger); and a glass cell containing platinum electrodes and a water jacket. The cell was built in a Pyrex glass shape with a diameter of 8 cm. The setup used is shown in Fig. 1 where VT and A represent the voltage and current transducers,

respectively, and T represents the temperature sensors. To homogenize the peel, the glass cell was placed above a magnetic stirrer, and to ensure a uniform temperature profile, the temperature was monitored in two different locations inside the cell as follows: near the electrode and near the cell wall.

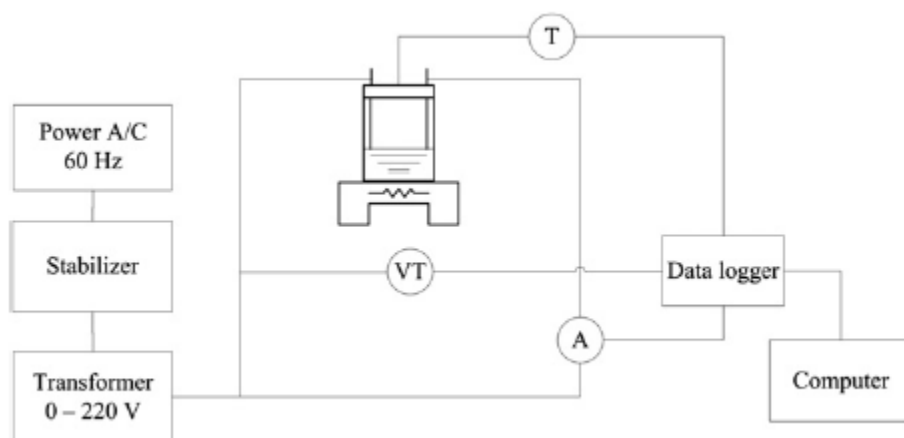
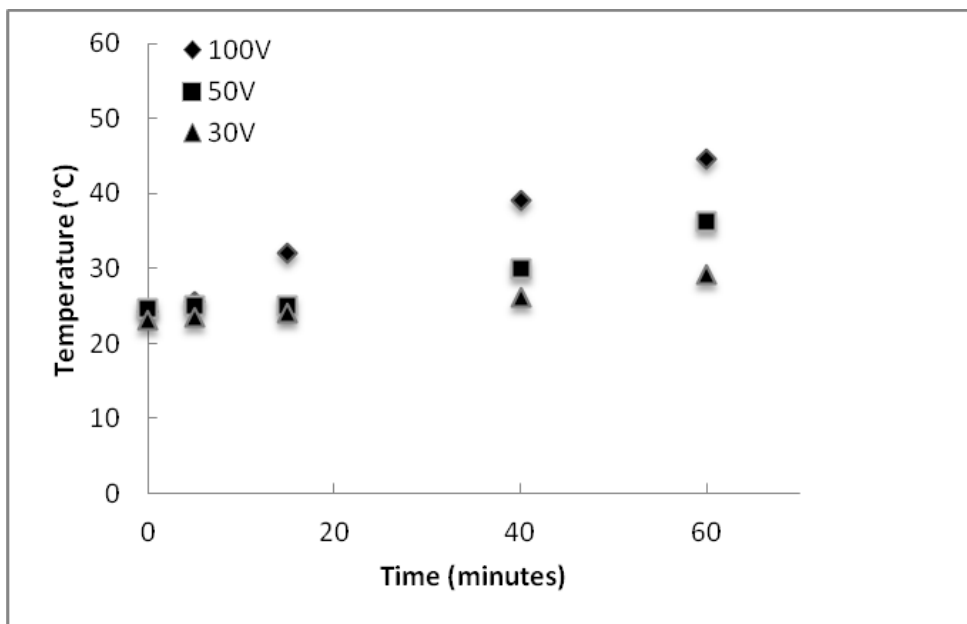


Figure 1. Schematic of the experimental moderate electric field setup (adapted from Mercali et al., 2012).

The conditions of extractions by the moderate electric field (MEF) method are mentioned below. Single factor experiments were performed to determine the appropriate pH, time and voltage for the extraction of pectin by varying one independent variable at a time while keeping the others constant. Some experiments were conducted to determine the temperature that extraction of pectin begins, and was observed that in temperatures less than 50 °C the extraction not occur. Therefore, the experiments using MEF were conducted in temperature not higher than 50 °C to observe only the electric field effects, and the dried peel/extractant ratios were maintained at 1:30 (w/v) in all experiments. The profile of temperature during the experiments for each voltage can be observed in Fig 2. The extraction time of pectin was varied for 5, 15, 40 and 60 min, and different extractants with pH of  $1.00\pm 0.2$ ,  $2.00\pm 0.2$  and  $5.00\pm 0.2$  were prepared by diluting the stock nitric acid solution. The voltage was varied for 30 V, 50 V and 100 V. After the time of extraction, the mixture was centrifuged and filtered by vacuum filtration, and the filtrate was collected and stored in a refrigerator at 4°C for subsequent purification.





**Figure 2.** The profile of temperature during the moderate electric field extraction.

### 2.3.3 Pectin purification procedure

One volume of crude pectin filtrate extracted by various technologies was precipitated using two volumes of 95 % (v/v) ethanol at 4 °C for 30 min. The precipitated pectin was separated by vacuum filtration and then immersed in 70 % ethanol for 12 h for the removal of impurities (such as monosaccharides, disaccharides and phenolic compounds (Minkov, Minchev, & Paev, 1996)), and the pectin was then washed with acetone and immediately dried at 40 °C for 12 h in an oven with air circulation. The dried pectin was then weighed with an analytical balance. All values are expressed in grams per 100 g of dry matter (g/100 g). The extraction yields (Y) of diverse technologies were calculated as follows (Equation 1):

$$Y(\%) = \frac{\text{Pectin.weight.(g)}}{\text{Sample.weight.(g)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

## **2.4. Methods of analysis**

### **2.4.1. Determination of galacturonic acid**

Total galacturonic acid (GalA) content of the polysaccharides was determined by the m-hydroxybiphenyl method (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). Galacturonic acid solutions (2–100 µg/mL) were used to construct the standard curve for the determination of the galacturonic acid content.

### **2.4.2 Degree of esterification**

The degree of esterification (DE) of pectin was determined by the titrimetric method of Food Chemical Codex (National Academy of Sciences, 1981) and Bocek, Zabivalova, & Petropavlovskii, (2001).

### **2.4.3 Scanning electron microscopy**

Morphological observations of the samples were performed by scanning electron microscopy (SEM). All pectin samples (obtained after drying and purification) were mounted on aluminum stubs with sticky double-side conductive metal tape without special treatment. Examination was performed with a TM3000 table-top scanning electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan) at 10 kV accelerating voltage. The image acquisition was performed by TM300 Microscope software, version 02-01 (Hitachi High-Tech, Tokyo, Japan).

### **2.4.5 Statistical analysis**

All reported values represent the average value of the analysis of three replicates. An ANOVA was performed followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ) for mean comparison. The Statistica 8.0 software for Windows (Statsoft, Tulsa, OK, USA) was employed.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Composition of passion fruit peel

Table 1 shows the chemical composition of passion fruit peel dried at 60 °C with the results expressed on a dry matter (d.m.) basis. The contents of moisture, ash, protein and fat were similar to those found by for passion fruit peel (López-Vargas et al., 2013; Martínez et al., 2012). With respect to dietary fiber content, the passion fruit peel had a high content of fiber ( $69.69 \pm 0.88$  g/100 g). López-Vargas et al. (2013) found a total dietary fiber content of 71.8 g/100 g d.m. for the passion fruit mesocarp. The large amount of insoluble fiber present in passion fruit peel ( $46.37 \pm 0.38$  g/100 g) indicates a considerable amount of celluloses and hemicelluloses. A high proportion of insoluble fiber in the coproducts could be considered an advantage because insoluble fiber can be used by the food industry as an ingredient to increase the content of indigestible insoluble compounds (Navarro-González, García-Valverde, García-Alonso, & Periago, 2011). In addition, high insoluble fiber content could have beneficial health effects related to increase in satiety as well as in the volume and weight of fecal mass, thus promoting improved functioning of the digestive system (Ku & Mun, 2008). Soluble fibers were present in lower amounts in the passion fruit peel ( $23.32 \pm 0.38$  g/100 g).

In this work, the content of minerals was determined since ionic constituents are necessary to the passage of electric current during the moderate electric field process. The ash content of the sample was 9.27 % d.b. (dry basis), which was higher than the values obtained by Martínez et al., (2012) for different fruit peels, such as mango and pineapple. The contents of calcium, copper, iron, magnesium, sodium and potassium were determined (Table 1). In passion fruit peel, the potassium content (4.49 g/100 g d.m.) was higher than that of other minerals. Potassium is an important mineral for the proper function of all cells, tissues, and organs in the human body. Potassium is crucial for heart function and plays a key role in skeletal and smooth muscle contraction, thereby making it important for normal digestive and muscular function (Rafferty & Heaney, 2008).

**Table 1.** Composition of passion fruit peel dried at 60 °C. Values are expressed as g/100 g dry matter (d.m.).

Analysis	Value (g/100 g of passion fruit peel d.m.)
Moisture	6.61±0.36
Ash	9.27±0.05
Protein	4.90±0.25
Fat	2.08±0.01
Dietary fiber	69.69±0.88
Soluble fiber	23.32±0.38
Insoluble fiber	46.37±0.38
Calcium	0.226
Copper	0.0012
Iron	0.0040
Magnesium	0.109
Potassium	4.49
Sodium	0.136
Zinc	0.0012

## 3.2 Conventional heating extraction of pectin

### 3.2.1 Effect of pH

The effect of pH on the yield and quality characteristics of pectin extracted from dried peels of passion fruit is shown in Table 2. In these experiments, the ratio of dried peels, extraction temperature, and time were maintained at 1:30 (w/v), 85 °C and 30 min, respectively. The pH value of passion fruit peel and water without addition of nitric acid was pH 5.00±0.02.

**Table 2.** Conventional heating extraction: effect of pH on the yield, galacturonic acid content, and esterification degree of pectin extracted from dried peels of passion fruit\*. Values are expressed as g/100 g dry matter (d.m.).

pH	Yield (g per 100 g of peel d.m.)	Galacturonic acid (g per 100 g of pectin d.m.)	Esterification degree (%)**
0.3±0.02	8.54±0.76 <sup>a</sup>	23.05±1.23 <sup>a</sup>	27.25±0.26 <sup>a</sup>
1.0±0.02	9.67±0.95 <sup>a</sup>	72.13±4.23 <sup>b</sup>	30.88±0.51 <sup>b</sup>
2.0±0.02	9.21±0.48 <sup>a</sup>	82.40±3.54 <sup>c</sup>	82.98±1.34 <sup>c</sup>
5.0±0.02	8.68±0.97 <sup>a</sup>	71.36±0.89 <sup>b</sup>	89.40±0.94 <sup>d</sup>

The results represent the average of triplicates ± standard deviation. Results followed by different small letters in the column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

\*Extraction conditions: peel/extractant ratio of 1:30 (w/v), temperature of 85±2 °C and extraction time of 30 min.

\*\*The unit of the degree of esterification (%) represents the percentage of carboxyl groups esterified

In this work, the galacturonic acid content and esterification degree were considered as two important parameters that determine the quality of the pectin and contribute to the gelling properties. The structure of pectin is based on 1,4-linked  $\alpha$ -D-galacturonic acid, when the galacturonic acid content is high, the ability to form gel is also high. The degree of esterification represents the carboxyl groups of the main chain of galacturonic acid that are esterified with methyl or acetyl groups, which are responsible for gel formation. As shown in Table 2, the yield of pectin in the extraction was not significantly different with the variation of pH between 0.3 and 5.0 with yields between 9.67 and 8.54 g/100 g of peel d.m. (Kulkarni & Vijayanand, 2010) found a pectin yield of 9.02 g/100 g (d.m.) from yellow passion fruit peel when the extraction conditions were 1:30 w/v, 60 min, 98.7 °C and pH 2. Mayers & Baker (1929) reported that the yield of pectin increases with decreases in the pH of the extractant, and they also reported that the maximum yield of pectin is obtained from lemon albedo with hydrochloric acid at pH of 1.45. Pagán, Ibarz, Llorca, Pagán, & Barbosa-Cánovas (2001) extracted pectin from peach pomace and found approximately 10 g/100 g (d.m.) of pectin when the conditions were 80 °C, 60 min, 1:25 w/v and pH 2.0, and they reported that when the pH is changed to 1.5, the yield is approximately 16 g of pectin per 100 g of sample (d.m.).

In this study, the pH did not significantly influence the yield of the extracted pectin in the pH range studied, but pH influenced the content of galacturonic acid. Industrial pectins have particular specifications as stated by the Food and Agricultural Organization, which

specifies a minimum of 65 % galacturonic acid. Only at high acid pH levels (pH=0.3), the content of galacturonic acid is less than 65 % (23.05 g/100 g of pectin). At pH 2.0±0.02, the content of galacturonic acid was higher than other conditions (82.40 g/100 g of pectin (d.m.)). Kulkarni & Vijayanand (2010) found a pectin yield of 80.2 g/100 g at the same pH, same solid/liquid ratio, extraction time of 60 min and temperature of 98.7 °C. The values found for the degree of esterification for pH 0.3 and 1.0 were lower than for the other two conditions with yields of 27.25 and 30.88 g/ 100g of pectin d.m., respectively, indicating that high acid pH values favor the de-esterification. In pH 2.0 and 5.0, the values found for degree of esterification were 82.98 % d.m. and 89.40 % d.m., respectively, which were similar to the results found by Canteri et al., 2012) for passion fruit peel. The content of galacturonic acid and degree of esterification are related with the technological characteristics of the ability of pectin to form gels. In the food industry, pectin is known primarily as a gelling agent and is widely used in the production of jams, jellies, fruit juice, confectionary products and bakery fillings.

### 3.2.2 Effect of time

The pectin yield, galacturonic acid content and esterification degree at different extraction times (10, 30 and 60 min) are shown in Table 3. The other extraction conditions, such as peel/extractant ratio, extractant pH, and extraction temperature were maintained at 1:30 (w/v), 2.00 and 85±2 °C, respectively.

**Table 3.** Conventional heating extraction: effect of time on the yield, galacturonic acid content, and esterification degree of pectin extracted from dried peels of passion fruit\*. Values are expressed as g/100 g dry matter (d.m.).

Time pectin extraction (min)	Yield (g per 100 g of peel d.m.)	Galacturonic acid (g per 100 g of pectin d.m.)	Esterification degree (%)**
10	7.48±0.78 <sup>a</sup>	48.06±4.04 <sup>a</sup>	92.76±1.95 <sup>a</sup>
30	9.21±0.46 <sup>b</sup>	82.40±3.54 <sup>b</sup>	82.03±1.34 <sup>b</sup>
60	10.90±0.66 <sup>c</sup>	70.35±3.70 <sup>c</sup>	86.75±0.64 <sup>c</sup>

The results represent the average of triplicates ± standard deviation. Results followed by different small letters in the column indicate significant difference (p<0.05) according to Tukey's test.

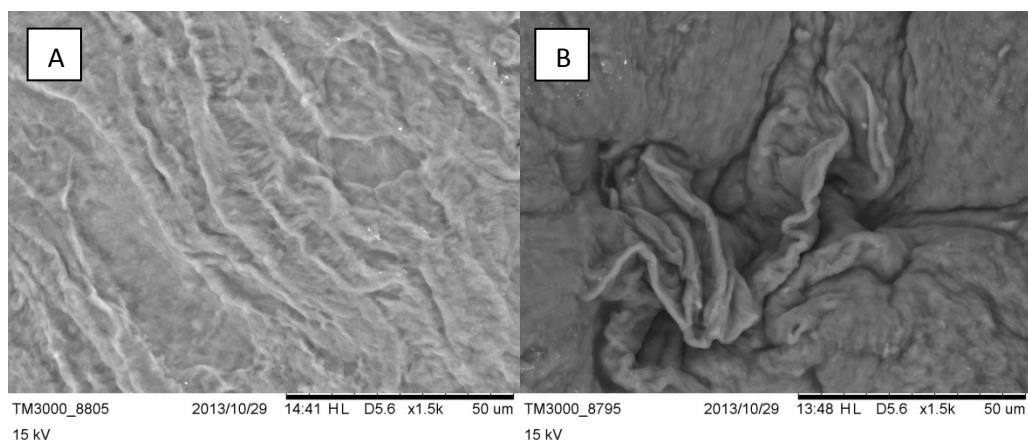
\*Extraction conditions: peel/extractant ratio of 1:30 (w/v), temperature of 85±2 °C and pH 2.0±0.2.

\*\* The unit of the degree of esterification (%) represents the percentage of carboxyl groups esterified

The results showed that the yield of pectin increased with extraction time. The pectin yield was 9.21 g/100 g of peel d.m. at 30 min boiling and increased to 10.90 g per 100 g of peel d.m. at 60 min boiling. The same trend occurred in the study of Kulkarni & Vijayanand (2010), where the pectin yield was found to be 5.59 g/100 g of peel (d.m.) at 30 min boiling and 9.06 g/100 g of peel (d.m.) at 60 min boiling (the other conditions of extraction were temperature of 98.7 °C, pH 2.0±0.02 and solid/liquid ratio of 1:30). Guo, Hana, Xia, Raoa, Liaoa, Hua, & Wua (2012) found 15.45 g of pectin per 100 g of orange peel (d.m.) with an extraction time of 60 min, temperature of 80±2 °C and solid/liquid ratio of 1:50.

The galacturonic acid content was higher than 65 % d.b. for 30 min and 60 min of extraction, but pectin extracted for 30 min had higher galacturonic acid content (82.40 g per 100 g of pectin d.m.) compared to pectin extracted for 60 min (70.35 g per 100 g of pectin d.m.), which may be due to the partial degradation of pectin. In this case, it is possible to observe the depolymerization of pectin when the extraction time was 60 min, indicating that much time in high temperature can affect the structure of polysaccharide.

To investigate the change in the microstructure caused by the extraction process, Figure 3 shows the scanning electron micrographs of the surface of pectin. Figure 3A shows the micrographs for the extraction conditions of 85 °C, 30 min, pH 2.0 and 1:30 solid/liquid ratio, which were the conditions that promoted the highest galacturonic acid content. The micrographs showed parallel fibers with some damage in the fiber structure, which may have resulted from the extraction process (Figure 3B will be discussed later).



**Figure 3.** Figure 3. Scanning electron micrograph (x1500 magnification) of pectin from passion fruit peel obtained by (A) traditional extraction and (B) moderate electric field extraction.

### 3.3 Moderate electric field extraction

#### 3.3.1 Effect of voltage

Moderate electric field treatment has been recognized as useful for improving the pressing, drying, extraction, and diffusion processes during the last decade Angersbach, Heinz, & Knorr (2000); Vorobiev, Jemai, Bouzrara, Lebovka & Bazhal (2005); Vorobiev & Lebovka (2006). The principle of MEF is to destroy the cell membrane structure after exceeding a critical value of approximately 1 V of transmembrane potential, and repulsion occurs between the charge-carrying molecules that form pores in weak areas of the membrane, which causes a drastic increase in permeability (Bryant & Wolfe, 1987). Lebovka, Shynkaryk, & Vorobiev (2007) showed that the field strength increase results in more intensive tissue damage, thereby increasing extraction.

The pectin yield, galacturonic acid content and esterification degree at different voltages are shown in Table 4. The extraction voltages were maintained at 30 V, 50 V and 100 V for each extraction. The electrical conductivity observed in each of the conditions with 30 V, 50 V and 100 V was  $0.174 \pm 0.01$ ,  $0.166 \pm 0.010$ , and  $0.189 \pm 0.010$ , respectively. The other extraction conditions, including peel/extractant ratio, extractant pH, temperature and extraction time, were maintained at 1:30 (w/v),  $2.0 \pm 0.02$ ,  $45 \pm 2$  °C, and 15 min,



respectively. The results showed that the pectin yield increased with increasing voltage. The pectin yield was 4.98 g/100 g of peel d.m. at 30 V and increased to 6.20 g/100 g of peel d.m. at 100 V. Thus, the voltage of extraction for the maximum yield of pectin was found to be 100 V without affecting the quality of pectin (galacturonic acid content of 68.72 g/100 g of pectin d.m. and esterification degree of 82.68 g/100 g of pectin d.m.). The control showed a yield of 4.80 g/100 g of peel d.m., galacturonic acid content of 40.62 g/100 g of pectin d.m. and esterification degree of 85.00 % d.m., thereby showing that the moderate electric field can extract pectin with higher galacturonic acid content. The conditions of the control extraction were the same as those of the MEF extraction without the application of electric field. No other studies that report the extraction of pectin using MEF were found in the literature. Sensoy & Sastry (2004) showed that MEF treatment increases the membrane permeability and diffusion rate of solids for fresh mint leaves. One application for increasing the permeability via electric field is juice extraction. The juice yield of pressed apple cossettes is increased by electroplasmolysis pretreatment (Bazhal & Vorobiev, 2000). Electroplasmolysis has been shown to increase the extraction rate for beet cossettes (Bouzzara, 2000).

**Table 4.** Moderate electric field extraction: effect of voltage on the yield, galacturonic acid content and esterification degree of pectin extracted from dried peels of passion fruit\*. Values are expressed as g/100 g dry matter (d.m.).

Voltage used during extraction of pectin (V)	Yield (g per 100 g of peel d.m.)	Galacturonic acid (g per 100 g of pectin d.m.)	Degree of esterification (%)**
0 (control)	4.80 ±0.53 <sup>a</sup>	40.62±3.68 <sup>a</sup>	85.00±0.60 <sup>a</sup>
30	4.98±0.17 <sup>a,b</sup>	71.52±4.09 <sup>b</sup>	81.71±1.73 <sup>b</sup>
50	5.20±0.30 <sup>b</sup>	69.21±3.27 <sup>b</sup>	90.68±0.70 <sup>c</sup>
100	6.20±0.26 <sup>c</sup>	68.72±4.25 <sup>b</sup>	82.68±0.78 <sup>b</sup>

The results represent the average of triplicates ± standard deviation. Results followed by different small letters in the column indicate significant difference (p<0.05) according to Tukey's test.

\*Extraction conditions: peel/extractant ratio of 1:30 (w/v), temperature of 50±2 °C, pH 2.0±0.02 and time 15 min.

\*\* The unit of the degree of esterification (%) represents the percentage of carboxyl groups esterified

A scanning electronic microscopy image of the sample treated with MEV (100 V, 50 °C, 15 min, pH 5.0 and solid/liquid ratio 1:30) is presented in Figure 3B. The pectin extracted by MEF had a sharper and rougher grooved appearance when compared with the pectin obtained by conventional extraction (Figure 3A). Moreover, it was possible to observe the structural integrity change of the fiber.

During the experiments, the pectin obtained by MEF was more soluble than the pectin obtained by traditional extraction. The electric field may affect the polarity of polysaccharides, leaving the fiber more polar and with higher solubility in water. More studies about this behavior are necessary and are being conducted.

### **3.3.2 Effect of time**

The yield, galacturonic acid content and esterification degree of pectin at different extraction times are shown in Table 5. The extraction times were 5 min, 15 min, 40 min and 60 min for each extraction (other conditions were peel/extractant ratio of 1:30 (w/v), voltage of 100 V, pH of 5.0, and temperature  $45\pm 2$  °C). The solid/liquid ratio was selected to be 1:30 (w/v) because previous studies have reported that this is the best solid/liquid ratio. The pH was selected to be  $5.0\pm 0.02$  because this was the value without the addition of acid. The voltage was fixed at 100 V because this voltage promoted the highest yield with a galacturonic acid content higher than 65 % d.m. The temperature was maintained less than 45 °C to observe only the electric fields effects. As shown in Table 5, the galacturonic acid content of pectin was influenced by the time of extraction within the range of 5 and 15 min because the galacturonic acid content of pectin increased from 47.77 to 68.72 g/100 g d.m. ( $p < 0.05$ ). In this range of extraction time (and even for 40 min and 60 min), however, the yield and esterification degree of the pectin were not significantly different. Based on these results, the ideal extraction time was 15 min. The control (50 °C, 15 min, pH  $5.0\pm 0.02$ , liquid/solid ratio of 1:30 and without electric field) showed a yield, galacturonic acid content and esterification degree of 3.43 g/100 g d.m. of peel; 42.71 g/100 g d.m. of pectin and 87.82 % d.m. of pectin, respectively.

A moderate electric field can increase mass transfer during extraction by destroying the membrane structure of plant materials, enhancing the extraction and decreasing the extraction time. MEF has been applied to improve the release of intracellular compounds

from plant tissue with the help of increasing cell membrane permeability (Toepfl, Mathys, Heinz, & Knorr, 2006). When the moderate electric was applied, the effects caused by temperature can be neglected because the temperature used was low. In this case, only the electrically induced damage during the moderate electric field treatment was considered. The use of low temperatures and less time can minimize the degradation of heat sensitive compounds as discussed by Ade-Omowaye, Angersbach, Taiwo, & Knorr (2001). On the industrial scale, pectin is usually extracted using hot water acidified with an acid under the pH, temperatures, and duration conditions generally in the range of 1.3–3, 60–100 °C, and 20–360 min, respectively. Due to a relatively long period of direct heating, the extracted pectin undergoes thermal degradation, which could result in undesired changes in physicochemical and functional properties of pectin. In conditions used in this study it was not possible to observe large changes in characterizes of pectin extracted with different methods, probably because the maximum time and temperature of conventional extraction were, 60 min and  $85\pm 2$  °C, respectively.

Information on the extraction of pectin using MEF is still scarce in the literature, so it is difficult to compare the results obtained in the present work. Studies have shown that electric fields can be used to extract other bioactive compounds. According to Fincan, DeVito, & Dejmek (2004), electric field treatment in a solid/liquid extraction process for the extraction of betanin from beetroots shows the highest degree of extraction compared to freezing and mechanical pressing. Guderjan, Töpfl, Angersbach, & Knorr (2005) showed that the recovery of phytosterols from maize increases by 32 % and that isoflavonoids (genistein and daidzein) from soybeans increase by  $20\pm 1$  % when electric field is used as a pretreatment process. Corrales, Toepfl, Butz, Knorr, & Tauscher (2008) extracted bioactive compounds, such as anthocyanins, from grape byproducts using various techniques, and they found a better extraction of anthocyanin monoglucosides by pulsed electric field. The application of an electric field treatment on grape skin before the maceration step can reduce the duration of maceration and improve the stability of bioactives (anthocyanins and polyphenols) during vinification (López, Puértolas, Condón, Álvarez, & Raso, 2008). The permeabilization of Merlot grape skin by an electric field treatment results in increased extraction of polyphenols and anthocyanins (Delsart et al., 2012).

**Table 5.** Moderate electric field extraction: effect of time on the yield, galacturonic acid content and esterification degree of pectin extracted from dried peels of passion fruit\*. Values are expressed as g/100 g dry matter.

Time pectin extraction (min)	Yield (g per 100 g of peel d.m.)	Galacturonic acid (g per 100 g of pectin d.m.)	Degree of esterification (%)***
5	6.37±0.61 <sup>a</sup>	47.77±1.84 <sup>a</sup>	88.27±1.33 <sup>a</sup>
15	6.82±0.34 <sup>a</sup>	68.72±4.24 <sup>b,c</sup>	89.03±0.14 <sup>a</sup>
40	7.86±0.42 <sup>a</sup>	72.49±4.07 <sup>b</sup>	87.78±0.79 <sup>a</sup>
60	6.70±1.14 <sup>a</sup>	62.39±1.33 <sup>c</sup>	89.75±0.59 <sup>a</sup>
Control**	3.43±0.75 <sup>b</sup>	42.71±1.14 <sup>d</sup>	87.82±0.34 <sup>a</sup>

The results represent the average of triplicates ± standard deviation. Results followed by different small letters in the column indicate significant difference (p<0.05) according to Tukey's test.

\*Extraction conditions: peel/extractant ratio of 1:30 (w/v), temperature of 50±2 °C, pH 5.0±0.02 and voltage 100 V.

\*\* Control: 50 °C, 15 min, pH 5.0±0.02, liquid:solid ratio of 1:30 and without electric field.

\*\*\* The unit of the degree of esterification (%) represents the percentage of carboxyl groups esterified

### 3.3.3 Effect of pH

The effect of pH on the yield and quality characteristics of pectin extracted from dried peels of passion fruit is shown in Table 6. The other extraction conditions, including dried peel/extractant ratio, extraction temperature, voltage and time, were maintained at 1:30 (w/v), less than 45 °C, 50 V and 15 min, respectively. The yields of pectin in the extraction were 4.24, 5.20 and 6.70 g/100 g of peel d.m. at pH 1.0±0.02, 2.0±0.02 and 5.0±0.02, respectively. The profile clearly demonstrated that the extraction yield of pectin was significantly increased and that the galacturonic acid content was decreased, thereby showing that lower pH with a moderate electric field (50 V) favors higher content of galacturonic acid.

The quality characteristics and yield of passion fruit peel pectin extracted at pH 2.0 revealed that the pectin had a galacturonic acid content of 69.21 g/100 g d.m., esterification degree of 90.68 % d.m. and yield of 5.20 g/100 of peel d.m., which were found to be the highest among the different extraction conditions studied. The galacturonic acid content decreased with increasing pH of extracting medium, which may be due to partial degradation of pectin. It may be concluded that the maximum quality characteristics of

pectin can be obtained at pH 2.0 and moderate electric field of 50 V. It is noteworthy that there was a significant difference between these results, thereby indicating that pH by itself may have a dominant effect.

**Table 6.** Moderate electric field extraction: effect of pH on the yield, galacturonic acid content and esterification degree of pectin extracted from dried peels of passion fruit\*. Values are expressed as g/100 g dry matter.

Condition of pH during extraction of pectin	Yield (g per 100 g of peel d.m.)	Galacturonic acid (g per 100 g of pectin d.m.)	Degree of esterification (%)**
1.0±0.02	4.24±0.53 <sup>a</sup>	71.61±4.31 <sup>a</sup>	75.01±0.04 <sup>a</sup>
2.0±0.02	5.20±0.30 <sup>b</sup>	69.21±3.34 <sup>a</sup>	90.68±0.70 <sup>b</sup>
5.0±0.02	6.70±0.25 <sup>c</sup>	62.03±2.30 <sup>b</sup>	81.29±0.84 <sup>c</sup>

The results represent the average of triplicates ± standard deviation. Results followed by different small letters in the column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

\*Extraction conditions: peel/extractant ratio of 1:30 (w/v), voltage 50 V, temperature  $30 \pm 2$  °C and time 15 min were maintained during pectin extraction.

\*\* The unit of the degree of esterification (%) represents the percentage of carboxyl groups esterified

## 5. Conclusion

Moderate electric field extraction, as an emerging novel technology, was applied to extract pectin from passion fruit peel. Under the conditions applied, the extraction yield of MEF was lower than that of the traditional extraction. The comparison of characteristics in terms of galacturonic acid content and esterification degree of the pectin obtained using different extraction methods indicated that similar values were obtained. The results of the studies demonstrated that MEF is an efficient, timesaving, and eco-friendly method for the extraction of pectin from passion fruit peel, especially for pectin with a high esterification degree and galacturonic acid content higher than 65 g/100 g of pectin. However, a research about the energy expenditure of the two processes as well on the investment costs to implement the novel technology will be interesting to compare these two technologies.

The utilization of moderate electric field like a pre-treatment can be an alternative to increase the yield during the traditional heating, since the moderate electric field induce a damage in cell wall and increase the permeability.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) as a scholarship to the first author and by the project PNPB (Programa Nacional de Pós-Doutorado) and also from FAPERGS (Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Sul).

## 6. References

- Ade-Omowaye, B. I. O., Angersbach, A., Taiwo, K. A., & Knorr, D. (2001). Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science & Technology*, *12*, 285–295.
- Angersbach, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2000). Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *1*, 135–149.
- AOAC. (1997). *Methods of analysis of AOAC International*. (A. of O. A. Chemists, Ed.) (18th ed.). Arlington.
- Bazhal, M., & Vorobiev, E. (2000). Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*, 1668–1674.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, *54*, 484–489.
- Bochek, A. M., Zabivalova, N. M., & Petropavlovskii, G. A. (2001). Determination of the Esterification Degree of Polygalacturonic Acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, *74*, 796–799.
- Bouzzara H, V. E. (2000). Beet juice extraction by pressing and pulsed electric fields. *Int Sugar J*, *102*, 194–200.

- BRASIL. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados (2003). Brasil: Diário Oficial da União, Brasília, 26 dez. 2003.
- Bryant, G., & Wolfe, J. (1987). Electromechanical stresses produced in the plasma membranes of suspended cells by applied electric fields. *The Journal of Membrane Biology*, 96, 129–139.
- Canteri, M. H. G., Scheer, A. P., Ginies, C., Reich, M., Renard, C. M. C. G., & Wosiacki, G. (2012). Rheological and macromolecular quality of pectin extracted with nitric acid from passion fruit rind. *Journal of Food Process Engineering*, 35, 800–809.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 85–91.
- Delsart, C., Ghidossi, R., Poupot, C., Cholet, C., Grimi, N., Vorobiev, E., ... Mietton Peuchot, M. (2012). Enhanced Extraction of Phenolic Compounds from Merlot Grapes by Pulsed Electric Field Treatment. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 205–211.
- Einhorn-Stoll, U., Kastner, H., & Drusch, S. (2014). Thermally induced degradation of citrus pectins during storage – Alterations in molecular structure, colour and thermal analysis. *Food Hydrocolloids*, 35, 565–575.
- El-Nawawi, S. A., & Shehata, F. R. (1987). Extraction of pectin from Egyptian orange peel. Factors affecting the extraction. *Biological Wastes*, 20, 281–290.
- Espitia, P. J. P., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. de J., Soares, N. de F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 35, 287–296.

- Fincan, M., DeVito, F., & Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid–liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering*, *64*, 381–388.
- Fishman, M. L., Chau, H. K., Hoagland, P., & Ayyad, K. (1999). Characterization of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure. *Carbohydrate Research*, *323*, 126–138.
- Fishman, M. L., Chau, H. K., Hoagland, P. D., & Hotchkiss, A. T. (2006). Microwave-assisted extraction of lime pectin. *Food Hydrocolloids*, *20*, 1170–1177.
- Guderjan, M., Töpfl, S., Angersbach, A., & Knorr, D. (2005). Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering*, *67*, 281–287.
- Guo, X., Zhao, W., Pang, X., Liao, X., Hu, X., & Wu, J. (2014). Emulsion stabilizing properties of pectins extracted by high hydrostatic pressure, high-speed shearing homogenization and traditional thermal methods: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, *35*, 217–225.
- Jiang, Y., Du, Y., Zhu, X., Xiong, H., Woo, M. W., & Hu, J. (2012). Physicochemical and comparative properties of pectins extracted from *Akebia trifoliata* var. *australis* peel. *Carbohydrate Polymers*, *87*, 1663–1669.
- Joye, D. ., & Luzio, G. . (2000). Process for selective extraction of pectins from plant material by differential pH. *Carbohydrate Polymers*, *43*, 337–342.
- Koubala, B. B., Mbome, L. I., Kansci, G., Tchouanguép Mbiapo, F., Crepeau, M.-J., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C. (2008). Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry*, *106*, 1202–1207.



- Kratchanova, M., Pavlova, E., & Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, *56*, 181–185.
- Ku, C. S., & Mun, S. P. (2008). Optimization of the extraction of anthocyanin from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) marc produced during traditional wine processing and characterization of the extracts. *Bioresource Technology*, *99*, 8325–8330.
- Kulkarni, S. G., & Vijayanand, P. (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.). *LWT - Food Science and Technology*, *43*, 1026–1031.
- Lebovka, N. I., Shynkaryk, M., & Vorobiev, E. (2007). Moderate Electric Field Treatment of Sugarbeet Tissues. *Biosystems Engineering*, *96*, 47–56.
- Levigne, S., Ralet, M.-C., & Thibault, J.-F. (2002). Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, *49*, 145–153.
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2008). Effects of pulsed electric fields on the extraction of phenolic compounds during the fermentation of must of Tempranillo grapes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*, 477–482.
- López-Vargas, J. H., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, *51*, 756–763.
- Lutz, I. A. (2005). *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos* (4 ed.). São Paulo.

- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., ... Rastall, R. A. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 8383–9.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, *135*, 1520–1526.
- Mayers, P. B., & Baker, G. L. (1929). *Fruit jellies VI, the role of pectin, the extraction of pectin from pectic materials* (p. 160). Delaware Agriculture Experimental Station Bulletin.
- Min, B., Bae, I. Y., Lee, H. G., Yoo, S.-H., & Lee, S. (2010). Utilization of pectin-enriched materials from apple pomace as a fat replacer in a model food system. *Bioresource Technology*, *101*, 5414–5418.
- Minkov, S., Minchev, A., & Paev, K. (1996). Modelling of the hydrolysis and extraction of apple pectin. *Journal of Food Engineering*, *29*, 107–113.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, *11*, 266–277.
- Munarin, F., Tanzi, M. C., & Petrini, P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, *51*, 681–689.
- Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, *703*, 8–18.
- National Academy of Sciences. (1981). *Food Chemical Codex* (pp. 283–286). Washington.

- Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., & Periago, M. J. (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, *44*, 1528–1535.
- Pagán, J., Ibarz, A., Llorca, M., Pagán, A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2001). Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Research International*, *34*, 605–612.
- Rafferty, K., & Heaney, R. P. (2008). Nutrient Effects on the Calcium Economy: Emphasizing the Potassium Controversy. *J. Nutr.*, *138*, 166S–171.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, *57*, 929–967.
- Sánchez-Zapata, E., Fuentes-Zaragoza, E., Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., & Pérez-Alvarez, J. A. (2009). Preparation of dietary fiber powder from tiger nut (*Cyperus esculentus*) milk (“Horchata”) byproducts and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 7719–25.
- Sant’Ana, A. de S., Ayala-Zavala, J. F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J. A., ... González-Aguilar, G. A. (2011). Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, *44*, 1866–1874.
- Seixas, F. L., Fukuda, D. L., Turbiani, F. R. B., Garcia, P. S., de O. Petkowicz, C. L., Jagadevan, S., & Gimenes, M. L. (2014). Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids*, *38*, 186-192.
- Sensoy, I., & Sastry, S. K. (2004). Extraction Using Moderate Electric Fields. *Journal of Food Science*, *69*, 7–13.

- Thakur, B. R., Singh, R. K., & Handa, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin--a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 47–73.
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2006). Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing. *Food Reviews International*, 22, 405–423.
- Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, P. K. (2010). Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. *Carbohydrate Polymers*, 79, 711–716.
- Vorobiev, E., Jemai, A.B., Bouzrara, H., Lebovka, N.I., Bazhal, M. I. (2005). Pulsed electric field assisted extraction of juice from food plants. In Barbosa-Canovas & M. P. G., Tapia, M.S., Cano (Eds.), *Novel Food Processing Technologies* (pp. 105–130). New York: CRC Press.
- Vorobiev, E., Lebovka, N. I. (2006). Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In Springer (Ed.), *Pulsed Electric Field Technology for the Food Industry: Fundamentals and Applications*. (pp. 153–194). New York.
- Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., & Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 693–700.
- Xie, Z., Whent, M., Lutterodt, H., Niu, Y., Slavin, M., Kratochvil, R., & Yu, L. L. (2011). Phytochemical, antioxidant, and antiproliferative properties of seed oil and flour extracts of Maryland-grown tobacco cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9877–84.
- Xingfeng Guo, Dongmei Hana, Huping Xia, Lei Raoa, Xiaojun Liaoa, Xiaosong Hua, Jihong Wua. (2012). Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydrate Polymers*, 88, 441–448.

- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, *126*, 72–81.
- Yapo, B. M. (2009). Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*, *42*, 1197–1202.
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathélet, B., & Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, *100*, 1356–1364.
- Yeoh, S., Shi, J., & Langrish, T. A. G. (2008). Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, *218*, 229–237.

## **Capítulo 6**

### **Artigo 3 - Combined Effect of High Pressure and Conventional Heating on Pectin Extraction from Passion Fruit Peel.**

*Abstract:* Passion fruit is one popular fruit in Brazil, the annual production represent 70 % of the world production. The peel (mesocarp and epicarp) consists in 60 % of fruit and contains a high level of pectin that can be extracted using conventional method (heating) or emerging technologies. The purpose of the present work was to investigate the potential of high pressure to extract the pectin from passion fruit peel. The results showed that the yield of extraction enhance twice (7.4 to 14.34 %) when high pressure was used as a pre-treatment, using the same conditions of conventional extraction. The esterification degree and galacturonic acid of the pectin extracted was higher than 50 % and 65 %, respectively. Furthermore, high pressure as a pre-treatment is an efficient, timesaving, and eco-friendly method for the extraction of pectin from passion fruit peel.

*Keywords:* pectin, soluble fiber, galacturonic acid, esterification degree, emerging technologies.

## **1. Introduction**

Passion fruit (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) is one of the popular fruits in Brazil and is widely used in the production of juices, desserts and drinks. The annual production of passion fruit in Brazil was estimated to be more than 920,000 tons in 2010 (IBGE 2011), representing 70 % of the world production. The edible part of the passion fruit consists of pulp with seeds and the remainder (60 %) consists of mesocarp and epicarp (López-Vargas et al. 2013). The use of fruit waste as a raw material for the production of functional ingredients for food and pharmaceutical industries has received more attention lately. Studies have shown that the pericarp (integral part of the peel) of passion fruit, even though processed and stored, could be used as a raw material for obtaining by-products in food industry, such as dietary fiber and other bioactive compounds (Yapo 2009).

The pericarp of passion fruit has significant amount of pectin which is a soluble fiber. Pectin is naturally found in the primary cell walls of plant cells and in the intercellular layers, contributing for adhesion between cells, firmness and strength of the

tissue. The structure of pectin which is a polysaccharide, is based on 1,4-linked  $\alpha$ -D-galacturonic acid and has L-rhamnose residues with side-chains of neutral sugars which are mainly D-galactose and L-arabinose (Mohnen 2008). The carboxyl acid groups of the monomers of galacturonic acids may or not be esterified with methyl groups. The fraction of esterified groups is expressed as the degree of methoxylation (Yapo 2009). Pectins have particular specifications that include no less than 65 % galacturonic acid as stated by the Food and Agricultural Organization. This soluble fiber represents a high-value functional food ingredient widely used as gelling agent and stabilizer, particularly in jams and jellies (Willats et al. 2006); it can be found in significant amounts in citrus fruit peel (30-35 % d.m), apple bagasse (15-20% d.m) and pulp beet (15-20 % d.m).

Pectin extraction is a multiple-stage physicochemical process which involves hydrolysis and extraction of pectin macromolecules from plant tissue, purification of the liquid extract and isolation of the extracted pectin from the liquid. These processes are influenced by various factors, mainly temperature, pH, and time (Pagán et al. 2001). The choice of a suitable method for pectin extraction is based upon maximization of the extraction yield and better the product quality. The most commonly used methods for the extraction of pectin include direct boiling (60 °C – 100 °C) for 20 min – 360 min (Liu et al. 2006; Levigne et al. 2002; Koubala et al. 2008). The conventional thermal technique needs a lot of time and energy and also can cause thermal degradation in the fiber extracted.

Combination of conventional and nonconventional methods for extraction of pectin can be an alternative to increase the extraction yield, reduce the extraction time and, consequently, the energy consumption. High pressure process (HPP) is a novel technique that has been used for extraction of active ingredients from plant materials (Chen et al. 2009; Jun et al. 2011; Prasad et al. 2009; Chen et al. 2014). In HPP, pressures in the range of 100 to 700 MPa are used. HPP has been recognized as an environment-friendly technology by the U.S. Food and Drug Administration and is extensively utilized in pharmaceutical, metallurgical and food industries (Chen et al. 2014). The high pressure modifies the cell walls in plant tissues, facilitating an access to solvents allowing better extraction. The purpose of this study was to investigate the potential of combination of HPP and conventional but milder thermal treatment for extraction of pectin from passion fruit peel so as to maximize the yield of extraction.



## **2 Materials and Method**

### **2.1 Preparation of passion fruit peel powder**

Two batches (10 kg each) of yellow passion fruit (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) were purchased on different days from a local market (Porto Alegre, RS, Brazil). The fruits were washed and sliced to remove the pulp and the seeds. For the purpose of blanching, the peels (composed of mesocarp and epicarp) were immersed in water at 100 °C for 3 min followed by cooling in an ice bath. The peels were ground in a domestic blender and the pulp was dried in an oven with air circulation at 60 °C for 72 h. The dried peels were then milled to 60 mesh size, using sieve. The powders of passion fruit peel obtained from the two different batches were mixed thoroughly and all further experiments were performed using samples from this mixture. The final moisture content of the powder was 5.73 g 100 g<sup>-1</sup>.

### **2.2 Pectin extraction**

Two processes were combined for extraction of pectin: HPP and conventional heating. The extraction process was divided in four different steps as described in the next section.

#### **2.2.1 Determination of pressure-holding time for extraction of pectin assisted by HPP**

High pressure was used as a pre-treatment for extraction of pectin and the first step was to choose the pressure-holding time. This analysis was performed using the following conditions according to previous studies: dried peel/solvent ratio 1:30 (w/w), pH 2.0 (1.0 M HNO<sub>3</sub>), room temperature, 500 MPa and five different times: 5, 10, 20, 30 and 40 min. The ratio peel/solvent and pH of the solution was used according to reported by de Oliveira et al. (2015). The purpose of this step is just to see the effect of pressure during different times of extraction, so the pressure of 500 MPa was to choose since in this pressure the temperature during the process is not higher than 50 °C. The passion fruit peel powder (6.6 g) was dissolved in acid solution (HNO<sub>3</sub> - pH 2.0), placed in a plastic bag (polyethylene) and subjected to the high pressure in a 10 liter vessel (Elmhurst Systems, LLC, Albany,

New York). The processed sample was centrifuged and the supernatant was filtered using vacuum filtration. The filtrate was collected and stored in a refrigerator at 4 °C for subsequent purification (described below). All experiments were performed in triplicate.

### **2.2.2 Determination of pressure and temperature for extraction of pectin assisted by HPP**

The next step was to determine the optimum conditions in terms of temperature and pressure for the extraction using a response surface methodology. In order to evaluate the effect of the variables pressure, ranged from 230 to 568 MPa, and temperature, ranged from 10 to 60 °C, on the yield of pectin, a complete factorial experimental design was used. The pH of the solution (2.0), peel/solvent ratio (1:30 (w/w)) and time (20 min that was determined in the first step) were maintained constant.

In developing the regression equation, the test factors were coded according to the following equation:

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X_i} \quad (1)$$

where  $x_i$  is the coded value of the independent variable,  $X_i$  the natural value of the independent variable,  $X_0$  the natural value of the independent variable at the center point and  $\Delta X$  the step change value (the value of  $\Delta X$  was 15 °C for temperature and 100 MPa for pressure). For a two factors system, the model regression equation for the predicted response  $Y$  is:

$$Y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (2)$$

The results were analyzed by the Experimental Design Module of the Statistica 7.0 software (Statsoft, USA).

### **2.2.3 Extraction of pectin by conventional heating using high pressure as a pre-treatment**

The third step was the use of the HPP as a pre-treatment for conventional heating extraction. After the high pressure process, the sample was submitted to heating with a magnetic stirrer and the conventional extraction was performed based on the method described by (Kratchanova et al. 2004). After extraction, the sample was centrifuged and filtered by vacuum filtration, and the filtrate was collected and stored in a refrigerator at 4 °C for subsequent purification (which will be described later). The effect of time, ranged from 5 to 29 min, and temperature, ranged from 50 to 100°C, were evaluated according to the complete factorial experimental design. The pH of the solution (2.0) and the peel/solvent ratio (1:30 (w/w)) were maintained constant. The dependent variables evaluated were yield, galacturonic acid content, esterification degree and viscosity.

### **2.2.4 Extraction of pectin assisted by conventional heating**

Experiments using just conventional extraction were performed to compare the results obtained with and without the HPP pre-treatment. Six experiments in triplicate were conducted maintaining pH at 2.0, peel/solvent ratio 1:30, and temperature of 100 °C. The extraction times were (17, 27, 37, 47, 57 and 67) min; 17 min was the time associated with the highest yield found for conventional heating extraction using HPP as a pre-treatment. After 67 min the yield started decreasing.

## **2.3 Physicochemical analyses of the pectin extracted**

### **2.3.1 Pectin purification procedure**

Pectin extracted by different technologies was precipitated by ethanol 95 % (v/v) at 4 °C for 30 min. The precipitated pectin was separated by vacuum filtration and then immersed in ethanol (70 %) for 12 h to remove the impurities (such as monosaccharides, disaccharides and phenolic compounds) according to (Minkov et al. 1996). The pectin was then washed with acetone and immediately dried at 40 °C for 12 h in an oven with air

circulation. All values are expressed in grams per 100 g of dry matter (g/100 g). The extraction yields (Y) were calculated as equation (3):

$$Y(\%) = \frac{\text{PectinWeight}}{\text{SampleWeight}} \quad (3)$$

### 2.3.2 Determination of galacturonic acid

Galacturonic acid (GalA) was determined by m-hydroxydiphenyl method (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973). Samples of pectin (200  $\mu\text{L}$ ) were mixed thoroughly with 1.2 mL of 0.125 M sodium tetraborate solution (in concentrated sulfuric acid) in an ice bath. The mixtures were heated in a boiling bath for 5 min and subsequently cooled in an ice bath. The mixtures were added with 20  $\mu\text{L}$  of 0.15% m-hydroxydiphenyl (in 0.5 % NaOH) and mixed. A pink color developed in 5 min. After that, the absorbance was recorded at 520 nm using an UV spectrophotometer (Shimadzu® Model UV-Vis 1800). A standard curve was obtained using galacturonic acid at (2 – 100)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 2.3.3 Degree of esterification

The degree of esterification (DE) of pectin was determined by the titrimetric method of Food Chemical Codex (National Academy of Sciences 1981) and Bocek et al. 2001. The analyses were performed in triplicate. Dried sample (50 mg) was solubilized in 100 mL of water with 2 mL of ethanol. After the sample was completely dissolved, five drops of phenolphthalein were added, the sample was titrated with 0.05 M sodium hydroxide and the result was recorded as the initial titer. Then, 10 mL of 0.5 M sodium hydroxide were added, the sample was shaken vigorously, and allowed to stand for 15 min at 30 °C; 10 mL of 0.5 M hydrochloric acid were added and the sample was shaken until the pink color disappeared. Phenolphthalein (five drops) was added and the solution was titrated with 0.5 M sodium hydroxide to a faint pink color that persisted after vigorous shaking (end-point). This volume of titration was recorded as the saponification titer (the final titer). The DE was calculated from the following equation:

$$\%DE = \frac{\textit{the final titer}}{\textit{the initial titer} + \textit{the final titer}} \quad (4)$$

### 2.3.4 Apparent viscosity

The apparent viscosity of the samples was measured using a viscometer (Brookfield, model DV-I at 25 °C). The number two spindle used was and the rotor speed was 3.0 rpm. The solutions with 0.25 % (w/v) of pectin were prepared using 65 % (w/v) of sucrose at pH 2.0 (HNO<sub>3</sub>). These solutions were prepared using a stirrer with heating to dissolve the pectin. The analyses were performed in triplicate.

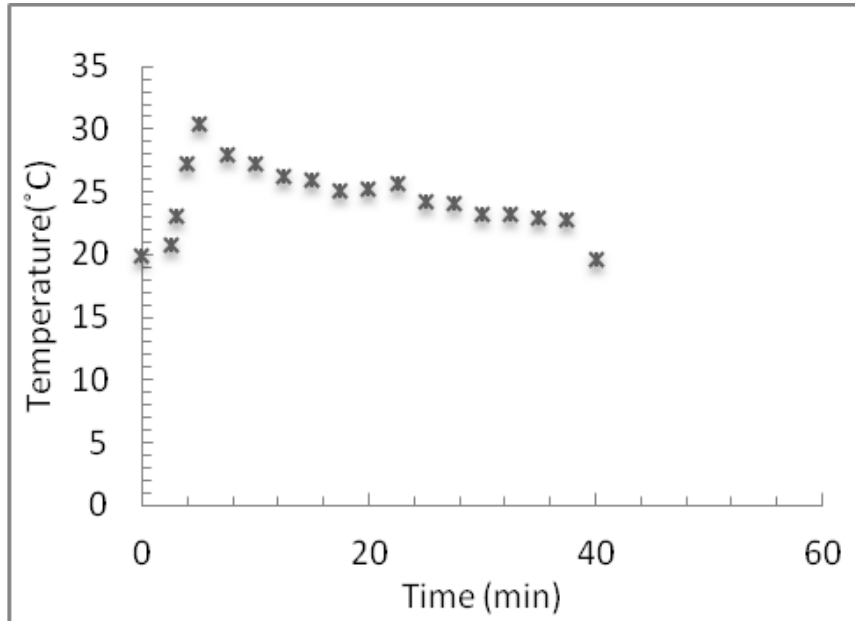
### 2.3.5 Statistical analysis

All results presented are an average of the three replicates. An ANOVA was performed followed by Tukey's test (p<0.05), using Statistica 8.0 software for Windows (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

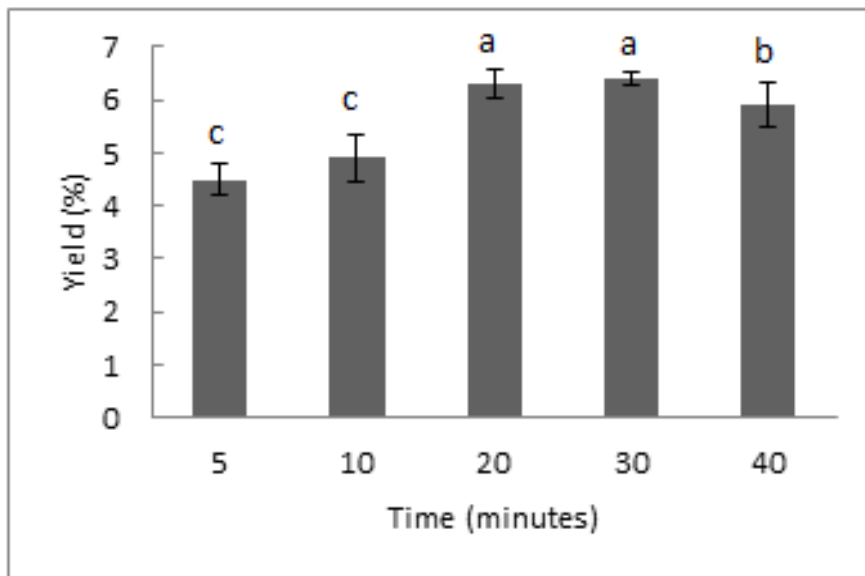
## 3. Results and Discussions

### 3.1 Determination of pressure-holding time for extraction of pectin assisted by HPP

In order to investigate the influence of HPP on the extraction of pectin, the temperature has to be maintained below 50 °C, which is the temperature at which the pectin gets extracted due to the effect of temperature. The profile of temperature during HPP is shown in Figure 1. As can be seen, during all HPP runs the temperature was below 50 °C. Figure 2 presents the yield of pectin at different times. It clearly indicates that the extraction yield of pectin significantly (p<0.05) increased as the pressure-holding time increased from 5 min to 20 min, but there was no significant increase in the yield for an additional time from 20 min to 40 min. The highest yields occurred at 20 min and 30 min but, since there was no significant difference (p<0.05) between these two times, 20 min was chosen as the optimal pressure-holding time for HPP extraction. Guo et al. (2012) investigated the pressure-holding time in the range between 5 min to 25 min for extraction of pectin from orange peel and observed that the highest yield was 15 % when the time was 15 min at 500 MPa and 45 °C.



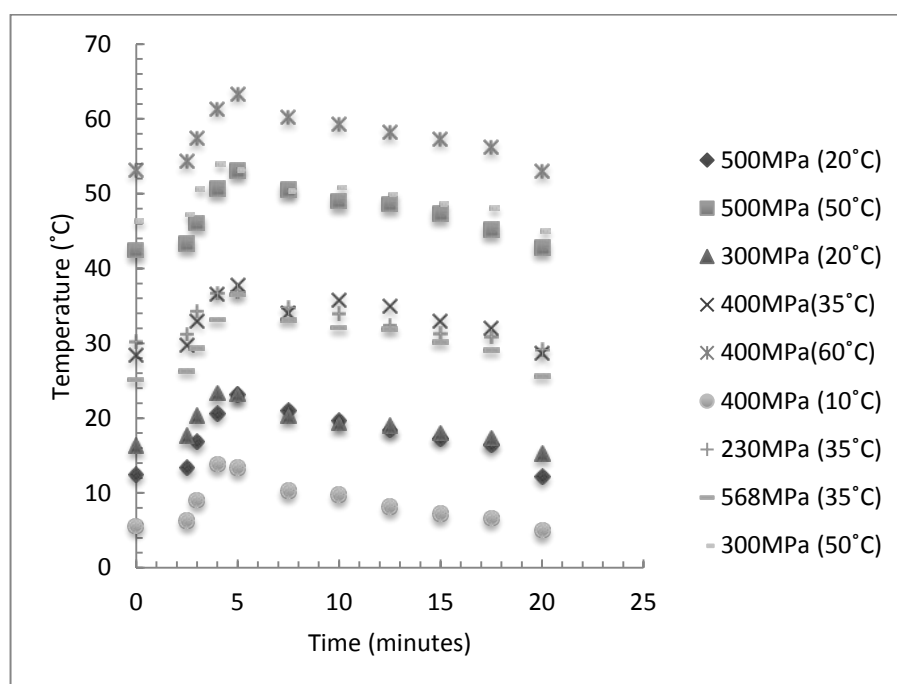
**Figure 1.** Profile of temperature during HPP at 500 MPa (CV < 0.02)



**Figure 2.** Pectin yield as a function of time at 500 MPa and room temperature.

### 3.2 Determination of pressure and temperature for extraction of pectin assisted by HPP

After it was determined that 20 min was the optimum time for pectin extraction by HPP, the next step was to determine the conditions of temperature and pressure, using a response surface methodology. Effects of pressure from 230 MPa to 568 MPa, and the effect of temperature from 20 °C to 60 °C keeping fixed pressure-holding time of 20 min were investigated. Figure 3 presents the profile of temperature plotted against time for all conditions used during the HPP process. The extraction yield of the pectin was considered as the indicators of extraction efficiency and the results are presented in Table 1, together with the points of the experimental design. These results are also presented in Figure 4, which shows the contours of extraction yield of pectin as a function of temperature and pressure.



**Figure 3.** Temperature profile during HPP at different pressure (CV < 0.02)

As can be observed, the yield increases for low pressures and temperature higher than 35 °C. The experiment 1, which used 50 °C and 300 MPa, resulted in the highest yield

(6.39 %); when the pressure increases to 500 MPa, maintaining the temperature constant, the yield decreases twice (3.09 %). This result is important in HPP, since a good yield can be obtained under a combined moderate temperature and pressure. Usually, high pressure machines operate in pressures below 600 MPa; the operation of the equipment near its high pressure limit reduces the life of the machine and, increases the cost of the process.

**Table 1.** Experimental design and results of extraction of pectin from passion fruit peel by HPP. Experimental conditions: pH 2, solid:liquid ratio 1:30 and 20 min.

Run	T (°C)	P (MPa)	Yield (%)
1	50	300	6.39
2	20	500	3.49
3	50	500	3.09
4	20	300	3.70
5	35	400	2.66
6	35	400	2.53
7	35	400	3.02
8	60	400	3.09
9	10	400	4.02
10	35	230	4.99
11	35	568	2.45
12	35	400	2.71

A second-order response surface model was used to fit the data using analysis of variance (ANOVA) and *F*-test. The model adequacy was checked by *F*-test and by the determination coefficient  $R^2$ . The results for ANOVA led to value  $F_{(4,7)} = 6.066$  greater than *F* tabulated ( $F_{t(4,7)} = 4.12$ ), which demonstrated significance for the regression model. The value of  $R^2$  was 0.764 indicating that the model could explain 76.2 % of the variability for response. A value of  $R^2 > 0.760$  indicates the aptness of the model. So, even though  $R^2$  value obtained in the present work was low, it could be considered acceptable. In the range



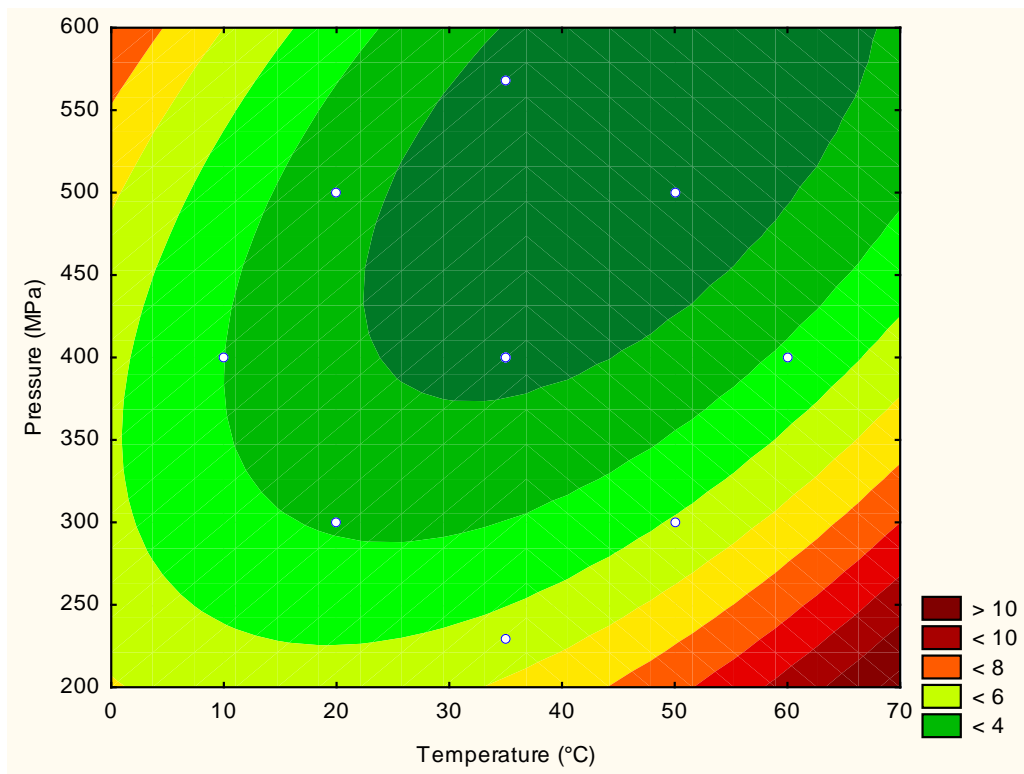
studied, the variables pressure (linear and quadratic effect), temperature (quadratic effect), as well as the interaction between them had significant effect on the yield and the following regression equation was obtained:

$$Y (\%) = 2.876 - 0.806x_1 + 0.425x_1^2 + 0.366x_2^2 - 0.773x_1x_2$$

Where  $x_1$  represents the pressure and  $x_2$  represents the temperature.

Gue et al. (2012) studied the extraction of pectin from orange peel assisted by high pressure and their results showed that at 300 MPa (others extraction conditions were 45 °C, 15 min, pH 1.5 and solid: liquid ratio 1:50) the yield was around 10 %. Naghshineh et al. (2013) evaluated the application of high pressure for enzymatic extraction of pectin from lime peel. Their results showed that enzyme and high pressure extraction resulted in yields which were significantly ( $p < 0.05$ ) higher than those using acid and aqueous extraction. To the best of our knowledge, there are no studies in the literature about the extraction of pectin from passion fruit peel assisted by high pressure.

In the conditions studied, the pressure of 300 MPa and temperature of 50 °C, with the pressure-holding time of 20 min, were the optimal extraction conditions for use of pressure as a pre-treatment in the conventional heating extraction.



**Figure 4.** Contours of extraction yield of pectin as a function of temperature and pressure.

### 3.3 Extraction of pectin by conventional heating using high pressure as a pre-treatment

Pectin is a soluble fiber extensively distributed in almost all fruits and vegetables as the structural unit of fresh cells and the junction between the cells (Ridley et al. 2001; Handa et al. 1996). Pectin is widely used as a gelling agent and as a stabilizer in a variety of foods, pharmaceuticals, and cosmetic products (Thakur et al. 1997). On the industrial scale, the extraction of pectin involves a lot of time under direct boiling, expending a significant amount of energy and allowing thermal degradation. For this reason, the aim of this step is to study high pressure as a pre-treatment for decrease the extraction time, enhance the yield and improve the characteristics of pectin extracted. The galacturonic acid content, esterification degree and viscosity were considered important parameters for quality of pectin, contributing to the gelling properties (Guo et al. 2012).

To determine the optimal time and temperature for conventional extraction using HPP as a pre-treatment, twelve experiments were performed. In these experiments, the pH

and solid:liquid ratio were maintained constant, at 2.0 and 1:30, respectively. As mentioned earlier, before doing conventional extraction, all samples were submitted to a pre-treatment of 300 MPa pressure, and 50 °C temperature for 20 min. The effect of temperature and time on the yield and on the characteristics of pectin extracted (galacturonic acid content and degree of esterification) is shown in Table 4. Figure 4 shows the corresponding contour plots.

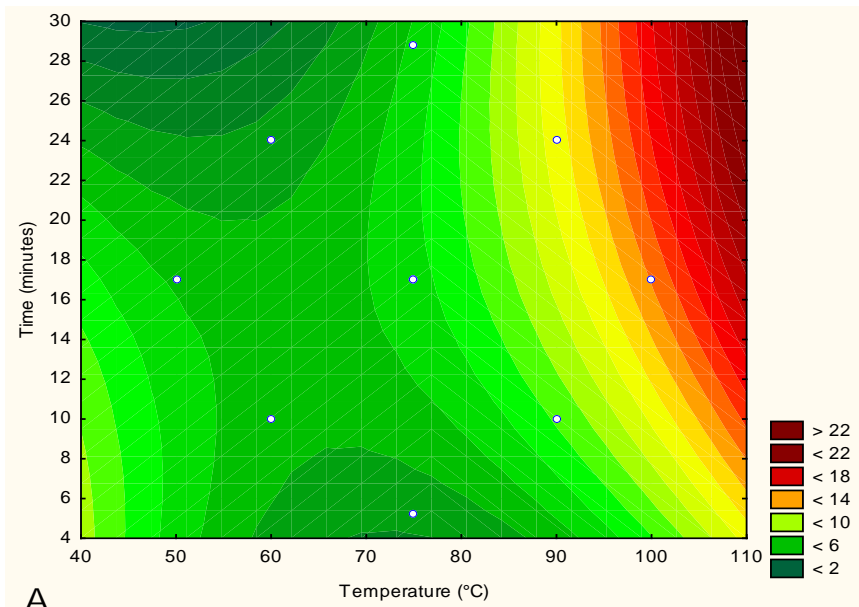
From Table 2 it is possible to observe that as time increased from 10 min to 24 min, keeping the temperature constant at 90 °C, the yield increased from 7.27 % to 11.86 %. It has been reported that the extended time favors the recovery of pectin. This might be due to the time required for full release of pectin within an acidic medium where the liquid has to penetrate into the dried peel albedo, dissolve the pectin and subsequently diffuse out from the albedo (Masmoudi et al. 2008). At temperature of 100 °C and time of 17 min (experiment 8), the yield obtained was the highest (14.34 %), indicating that the temperature is a key parameter for pectin extraction. This could be explained by the increase of solubility of the pectin extracted as the temperature of extraction increases. Moreover, the diffusion coefficient of extraction solvent also increases as the temperature increases, augmenting the rate and yield of extraction. It could be observed that HPP as a pre-treatment improved the extraction yield using less time compared to conventional heating extraction. Probably HPP caused cell permeabilization and enhanced the mass transfer rate and the solvent permeability in cells (Butz & Tauscher 2002; Liew et al. 2014) studied the extraction of pectin from passion fruit peel using conventional method and obtained a yield of 14.6 % when the extraction conditions were pH 2.0, 75 min of process time, solid: liquid ratio of 1:25 and temperature of 75 °C. It is worth noting that they needed 75 min while in the present work, only 37 min (20 min for pre-treatment + 17 min for conventional extraction) were necessary to obtain approximately the same yield.

**Table 2.** Experimental design and results of extraction of pectin from passion fruit peel by conventional heating. Experimental conditions: pH 2.0, solid:liquid ratio 1:30. Pre-treatment conditions: 300 MPa, 50 °C and 20 min.

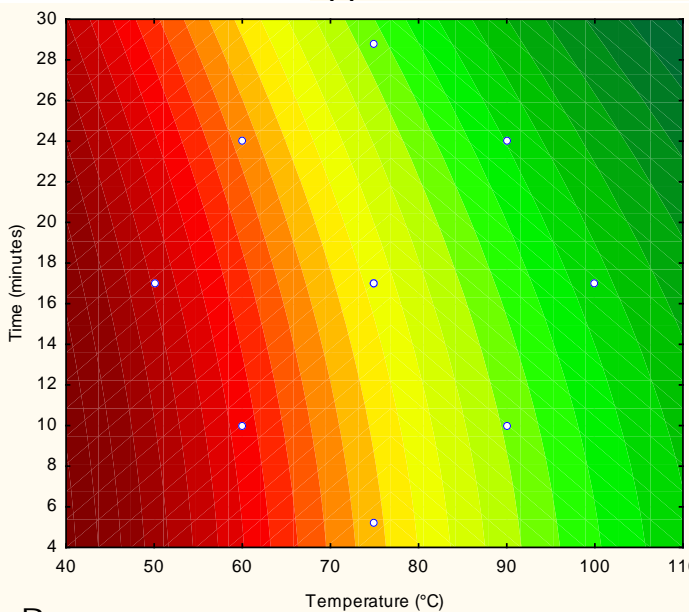
Run	T(°C)	Time (min)	Yield (%)	Galact.Acid (%)	D.E (%)	Viscosity ( mPa.s)
1	90	10	7.27	67.50	68.98	20
2	60	24	4.95	73.58	76.78	25
3	90	24	11.86	65.49	71.00	15
4	60	10	4.80	75.86	75.79	30
5	75	17	6.86	71.78	80.28	20
6	75	17	6.42	71.94	81.04	20
7	75	17	6.85	72.15	79.68	20
8	100	17	14.34	65.96	64.66	10
9	50	17	5.78	80.94	80.13	45
10	75	5.24	5.15	74.53	79.91	15
11	75	28.76	5.60	68.77	78.86	10
12	75	17	6.6	71.99	80.24	20

Figure 5A shows the contours for the yield. The statistical analysis showed that the temperature ( $x_1$ ), time ( $x_2$ ) and interaction between them, in the range studied, had a significant effect on the yield. The results showed an increase on the yield as temperature and time increased. The results of the second-order response surface models were examined by analysis of variance (ANOVA).  $F$ -test showed the value  $F_{(5,6)} = 34.77$  which is greater than  $F$  tabulated ( $F_{t(5,6)} = 4.39$ ), demonstrating significance for the regression model (Myers & Montgomery, 2002). Regressions obtained indicated the  $R^2$  value of 0.969 for yield showing that the model could explain 96.9 % of the variability for response. The following regression equation was obtained:

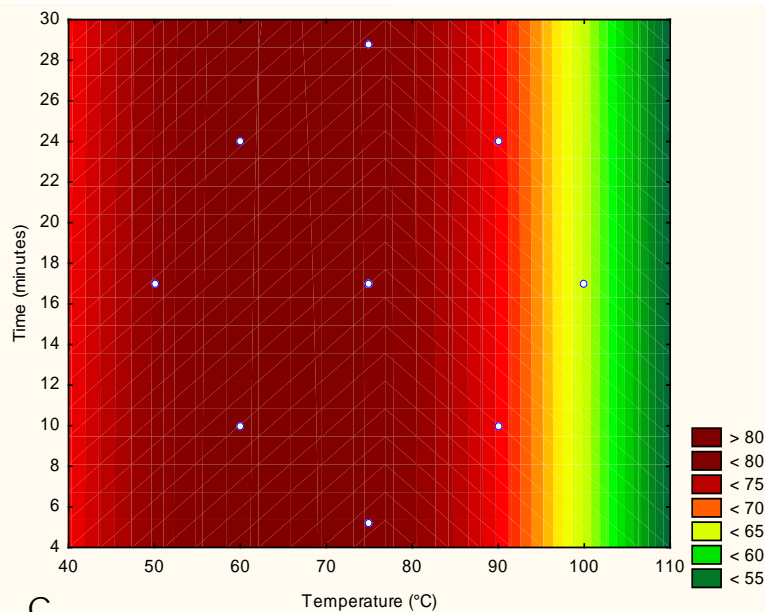
$$Y (\%) = 6.646 + 2.464x_1 + 0.569x_2 + 1.178x_1^2 - 0.482x_2^2 + 1.110x_1x_2$$



A



B



C

**Figure 5.** (A) Contours of extraction yield pectin as a function of temperature and time. (B) Galacturonic acid content depending on the temperature and time. (C) Esterification degree depending on the temperature and time.

Regarding the galacturonic acid content (GalA), it can be observed from Table 4 that, for all experiments, GalA was higher than 65 %, which is the minimum value accepted to be considered pectin by the Food and Agricultural Organization. It can also be seen that

the highest GalA is obtained at temperature of 50 °C and 17 min (experiment 9). The amount of GalA in the structure of polysaccharide is associated with gelling formation. From the contours of GalA (Figure 5B) it can be noted that high values of galacturonic acid content were obtained at low temperature and low time; this behavior was expected, since high temperatures can cause polymer degradation.

The statistical analysis showed that the temperature ( $x_1$ ) and time ( $x_2$ ), in the range studied, had a significant effect on the galacturonic acid content. The results of the second-order response surface models were examined by analysis of variance (ANOVA). *F*-test showed the value  $F_{(4,6)} = 32.78$  which is greater than *F* tabulated ( $F_{t(4,6)} = 4.53$ ), demonstrating significance for the regression model (Myers & Montgomery, 2002). Regressions obtained indicated the  $R^2$  value of 0.956 for yield. The following regression equation was obtained:

$$Y (\%) = 71.639 - 4.315x_1 - 1.448x_2 + 0.361x_1^2 - 0.277 x_2^2$$

Table 2 also presents the results associated with the degree of esterification (DE) of the pectin extracted. The esterification degree is related to the number of esterified galacturonic acid groups in comparison with the total galacturonic acid groups presented in the pectin and is defined as the ratio between the esterified galacturonic acid groups and the total galacturonic acid groups (Farris et al. 2009). Pectin can be classified as high methoxyl pectin (HMP) or low methoxyl pectin (LMP); HMP has over 50 % of their carboxyl groups esterified ( $DE > 50$ ), while LMP has a  $DE < 50$ . The esterification degree affects gelling properties of pectins: LMP forms gel in presence of multivalent ions, which acts as a bridge between pairs of carboxyl groups of different pectin chains which is the reason why it is normally used in low sugar concentration products. On the other hand, HMP forms gel in acidic media with the addition of different sugars such as sucrose or glucose (Videcoq et al. 2011). The values obtained of esterification degree for all pectin extracted in the present work were higher than 50 % (Table 2). The same results can be observed in Figure 5C, where all conditions tested were effective to obtain pectin with HMP.

The statistical analysis showed that the temperature,  $x_1$ , (linear and quadratic effect) and time,  $x_2$ , (quadratic effects) in the range studied had a significant effect on the esterification degree (DE). The results of ANOVA and *F*-test showed the value  $F_{(3,8)} =$

14.43 which is greater than  $F$  tabulated ( $F_{t(3,8)} = 4.07$ ). Regressions obtained indicated the  $R^2$  value of 0.842 for DE; the following regression equation was obtained:

$$Y (\%) = 79.586 - 4.00x_1 - 3.181x_1^2 - 0.704 x_2^2$$

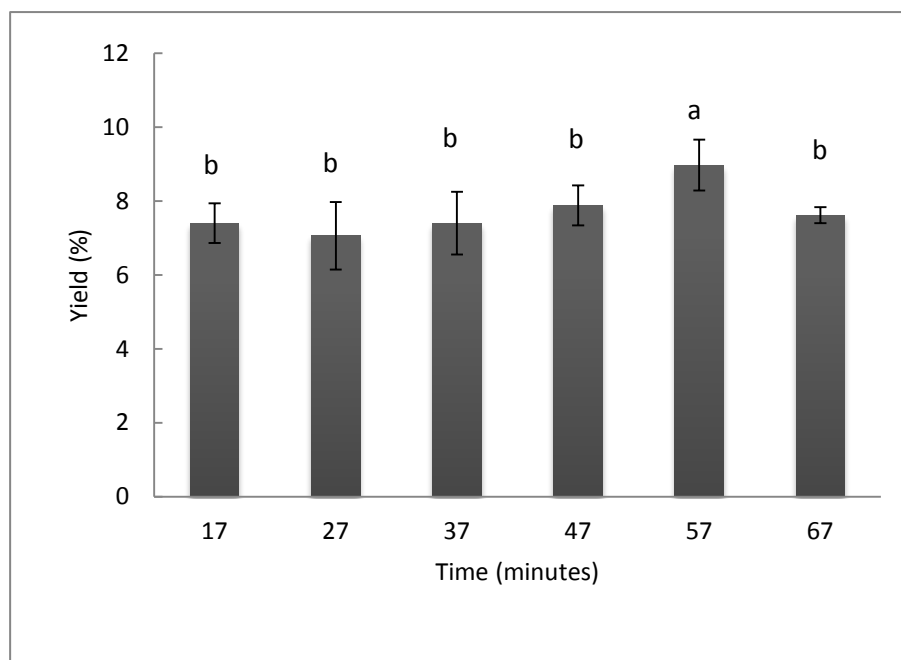
The amount of GalA and DE are related with the ability of pectin to form gels. In the food industry, pectin is known primarily as a gelling agent and is widely used in the production of jams, jellies, fruit juice, confectionary products and bakery fillings. The use of pectin as a natural additive in food products is very extensive, so the production of this soluble fiber from passion fruit peel could be an alternative for an industry that normally discards this co-product. On the other hand, the reuse of peel from passion fruit could also help to decrease environmental problems.

Viscosity has a significant effect on the stability of colloidal solution and emulsion. It was clearly revealed that the extraction method had a significant influence on the viscosity of the solution. Our results showed that the viscosity ranged from 10 to 45 mPa.s, however a very poor correlation between temperature and pressure for viscosity was found. The highest values of viscosity were found in runs that used low temperatures (50 and 60 °C), probably because the high temperature can cause the degradation of polysaccharide and decrease the size of the chain. However, a more detailed study of rheological characteristics of the fiber is needed.

### **3.4 Extraction of pectin assisted by conventional heating**

Experiments using only conventional extraction were performed to compare the results obtained with and without the HPP pre-treatment. Experiments were conducted maintaining pH 2.0, peel/extractant ratio at 1:30 and temperature of 100 °C. The extraction time was varied between 17 min to 67 min and the results are presented in Figure 6. Pectin, a carbohydrate polymer which is composed of  $\alpha$ -(1, 4) linked units of galacturonic acid, needs time to soften its structure during extraction. The highest yield (8.97 %) was obtained when time for conventional extraction was 57 min. Comparing these results with those using HPP as a pretreatment, it can be seen that the yield of 7.4 % obtained in 17 min is smaller than the yield obtained using the same time for conventional extraction using HPP pre-treatment (14.34 %). Therefore, the use of HPP as a pre-treatment could be an

alternative to enhance the extraction yield of pectin and decrease the time of conventional extraction.



**Figure 6.** Conventional heating extraction of pectin from passion fruit peel. Extraction conditions  $100\pm 3$  °C, pH 2.0 and solid: liquid ratio 1:30.

#### 4. Conclusions

Pectins are widely used in the food, nutritional, cosmetics and pharmaceutical industries and products. Our results indicated that the time of extraction decreased when HPP was used as a pre-treatment and the pectin yield increases from 7.40 % to 14.34 %. The GalA and DE values higher than 65 % and 50 %, respectively, indicated good pectin characteristics. Furthermore, the extraction of pectin from passion fruit peel can be an alternative for food industry to make available pectin from a natural source, reuse of by-products and consequently helps to decrease the environmental problems. Finally, the emerging technologies, such as high pressure, can enhance the yield and decrease the time of extraction.



## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) as a scholarship to the first author.

## References

- Boчек, A.M., Zabivalova, N.M. & Petropavlovskii, G.A., 2001. Determination of the Esterification Degree of Polygalacturonic Acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 74(5), pp.796–799.
- Butz, P. & Tauscher, B., 2002. Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35(2-3), pp.279–284.
- Chen, R. et al., 2009. Effects of ultrahigh pressure extraction conditions on yields and antioxidant activity of ginsenoside from ginseng. *Separation and Purification Technology*, 66(2), pp.340–346.
- Chen, R. et al., 2014. Ultrahigh pressure extraction of polysaccharides from *Cordyceps militaris* and evaluation of antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 134, pp.90–99.
- Farris, S. et al., 2009. Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), pp.316–332.
- Guo, X. et al., 2012. Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), pp.441–448.
- Handa, A.K. et al., 1996. *Pectins and Pectinases, Proceedings of an International Symposium*, Elsevier.
- IBGE, 2011. No Title.
- Jun, X. et al., 2011. Micromechanism of ultrahigh pressure extraction of active ingredients from green tea leaves. *Food Control*, 22(8), pp.1473–1476.
- Koubala, B.B. et al., 2008. Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry*, 106(3), pp.1202–1207.

- Kratchanova, M., Pavlova, E. & Panchev, I., 2004. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), pp.181–185.
- Levigne, S., Ralet, M.-C. & Thibault, J.-F., 2002. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), pp.145–153.
- Liew, S.Q., Chin, N.L. & Yusof, Y.A., 2014. Extraction and Characterization of Pectin from Passion Fruit Peels. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, pp.231–236.
- Liu, Y., Shi, J. & Langrish, T., 2006. Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal*, 120(3), pp.203–209.
- López-Vargas, J.H. et al., 2013. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, 51(2), pp.756–763.
- Masmoudi, M. et al., 2008. Optimization of pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), pp.185–192.
- Minkov, S., Minchev, A. & Paev, K., 1996. Modelling of the hydrolysis and extraction of apple pectin. *Journal of Food Engineering*, 29(1), pp.107–113.
- Mohnen, D., 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), pp.266–77.
- National Academy of Sciences, 1981. *Food Chemical Codex*, Washington.
- De Oliveira, C.F. et al., 2015. Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, pp.201–208.
- Pagán, J. et al., 2001. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Research International*, 34(7), pp.605–612.
- Prasad, K.N. et al., 2009. High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Separation and Purification Technology*, 70(1), pp.41–45.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A. & Mohnen, D., 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), pp.929–967.

- Videcoq, P. et al., 2011. Influence of calcium on pectin methylesterase behaviour in the presence of medium methylated pectins. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), pp.1657–1664.
- Willats, W.G., Knox, J.P. & Mikkelsen, J.D., 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), pp.97–104.
- Yapo, B.M., 2009. Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. *Bioresource technology*, 100(12), pp.3147–51.
- Yapo, B.M., 2009. Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*, 42(8), pp.1197–1202.

## **Capítulo 7**

**Artigo 4 - Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound.**

**Abstract:** The effect of power intensity of ultrasound and temperature on the pectin extraction from passion fruit peel was evaluated using response surface methodology. The extraction was performed using a dried peel/extractant ratio fixed in 1:30 during 10 minutes of sonication. The dependent variables were the yield, the galacturonic acid content and the esterification degree of the pectin extracted. The highest yield of pectin was obtained using power intensity of  $644 \text{ W/cm}^2$  and temperature of  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ . Under these conditions, the yield, the galacturonic acid content and the esterification degree were 12.67 %, 66.65 % and 60.36 %, respectively. The conventional extraction (dried peel/extractant ratio 1:30, 10 min and  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ ) was performed to compare the results with the ultrasound-assisted extraction. The results showed that the use of ultrasound promoted a better pectin extraction when compared with the conventional method.

*Keywords:* pectin, fiber, galacturonic acid, esterification degree, novel techniques

## **1. Introduction**

Many compounds can be extracted from vegetable tissues and the efficiency of this process is measured both by the extraction yield and the minimal impact on the properties of the extracted compound. The conventional heating extraction is time consuming and use large amount of solvents (Wang & Weller, 2006; Tiwari, 2015). A number of novel alternatives to conventional techniques have been proposed for the extraction of target compounds from various vegetables sources, including ultrasound (Barrales et al., 2015), moderate electric field (Oliveira et al., 2015), pulsed electric field (Medina-Meza & Barbosa-Cánovas, 2015) and high pressure (Strati, Gogou, & Oreopoulou, 2015). These novel techniques offer potential to improve process efficiency, to enhance the extraction yield and to improve the quality of the extracted compound. The low temperature used in these techniques is also an important characteristic, since can be decrease the thermal degradation of extracted compounds. The present work will focus in the ultrasound technique, that is an innovative, clean and green extraction technology for various molecules and biomaterials, including bioactive molecules, proteins, peptides, essential oils and polysaccharides (Tiwari, 2015).

Pectin is one of the most important and widely used polysaccharide in food industry. Pectin consists of a backbone of  $\alpha$ -(1,4) galacturonic acid residues which are partially esterified with methyl alcohol or acetic acid at the carboxylic acid and can be extracted from peels of fruits. This soluble fiber is used as a gelling, stabilizing and thickening agent in food systems such as jams and jellies, confectionery and fruit juice (Thakur et al., 1997). Besides, pectin is suggested to has various pharmaceutical activities, including wound healing, lipase inhibition, apoptosis induction of human cancer cell, as well as immunostimulating, anti-metastasis, anti-ulcer and cholesterol decreasing effects (Espinal-Ruiz et al., 2015).

Passion fruit (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) peel (mesocarp and epicarp) represent 60 % of fruit (in mass) and contains a large amount of bioactive compounds and polysaccharides, such as pectin (López-Vargas et al., 2013). According to some authors, the content of pectin in passion fruit peel ranges from 15 to 20 % (d.m) (Kliemann et al., 2009; Pinheiro et al., 2008; Seixas et al., 2014). The traditional method for pectin extraction includes direct boiling (60 °C – 100 °C) for 20 min - 360 min and low pH (1.0-3.0) (Liu et al. 2006; Levigne et al. 2002; Koubala et al. 2008). This process is time consuming, can cause thermal degradation of the fiber extracted and the pectin yield is sometimes limited by the process conditions (Yeoh, Shi, & Langrish, 2008).

Ultrasound-assisted extraction is a process that uses acoustic energy and solvents to extract target compounds from various plant matrices. The enhancement of the mass transfer is brought about by the acoustic cavitation induced in a liquid medium, which is one of the beneficial effects of this technology (Wang et al., 2015). As pectin is a soluble fiber, which is presented in the plant cell walls, cavitation and cell disruption caused by ultrasound waves may enhance the mass transfer from the solid matrix to the solvent improving the pectin extraction.

The aim of this study is to evaluate the potential of the ultrasound-assisted extraction of pectin from passion fruit peel, using nitric acid as the extracting agent. For this purpose, an experimental design was applied considering the extraction temperature and the power intensity as independent variables.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Plant material – passion fruit powder**

Two batches of yellow passion fruit (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) were purchased from a local market (Porto Alegre, RS, Brazil). The fruits were washed and sliced to remove the pulp and the seeds. The peels (composed of mesocarp and epicarp) were immersed in water at 100 °C for 3 min followed by cooling in an ice bath (blanching). The peels were ground in a domestic blender and the peel was dried in an oven with air circulation at 60 °C for 72 h. The dried peels were then milled to 60 mesh size, using sieve. The powders of passion fruit peel obtained from the two different batches were mixed thoroughly and all further experiments were performed using samples from this mixture. The final moisture content of the powder was  $6.34 \pm 0.76 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ .

### **2.2 Pectin extraction**

The extraction process was divided in three different steps, described as follow.

#### **2.2.1 Determination of sonication time for pectin extraction assisted by ultrasound**

The extraction process was performed using the following conditions according to previous studies described by Oliveira et al. (2015): dried peel/solvent ratio 1:30 (w/w), pH 2.0 (1.0 M HNO<sub>3</sub>). The power intensity of the ultrasound was 664 W/cm<sup>2</sup> (maximum power of the equipment) and the frequency was 20 kHz. The temperature was maintained below to 50 °C since the purpose of this step was simply to observe the effect of the ultrasound during different times of extraction (pectin started to be extracted with temperatures higher than 50 °C). The temperature was controlled using a thermostatic bath (Lauda R. Wobser GmbH & Co. KG, modelo Alpha RA 12, Lauda-Königshofen, Alemanha). Five different times were evaluated: 3, 6, 10, 15 and 20 min, chosen after preliminary tests. The passion fruit peel powder (6.6 g) was dissolved in 200 mL of acid solution (HNO<sub>3</sub> - pH 2.0) and put in the extraction cell, a vessel, made of Pyrex glass, with a water jacket and a volume of 300 mL, with the ultrasound probe (1.2 cm of diameter and 750 W) (Sonics & Materials, Inc., modelo VCX750, Newtown, Estados Unidos). The processed sample was centrifuged

and the supernatant was filtered using vacuum filtration. The filtrate was collected and stored in a refrigerator at 4 °C for 30 min for subsequent purification (described below). All experiments were performed in triplicate.

### **2.2.2 Determination of power intensity and temperature for extraction of pectin assisted by ultrasound**

This part of the study used a response surface methodology. In order to evaluate the effect of the variables power intensity and temperature on the yield of the extraction, galacturonic acid content and esterification degree of pectin, a factorial experimental design  $2^2$  with three replications of the center points was performed. The temperature ranged from 45 to 85 °C and power intensity ranged from 132.8 to 664.0 w/cm<sup>2</sup>. The pH of the solution (pH 2.0; 1.0 M HNO<sub>3</sub>), peel/solvent ratio (1:30 (w/w), time (10 minutes that was determined in the first step) and frequency (20 kHz) were maintained constant. The experimental data were analysed by statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

### **2.2.3 Extraction of pectin by conventional heating**

Conventional extraction (performed in three replicates) was conducted in order to compare with the results obtained by ultrasound extraction. The following conditions were maintained constant: pH at 2.0 (1.0 M HNO<sub>3</sub>), the peel/solvent ratio 1:30, temperature of 85 ± 2 °C and 10 min (same time used in an ultrasound extraction).

## **2.4 Physicochemical analyses of the pectin extracted**

### **2.4.1 Pectin purification procedure**

Pectin extracted was precipitated by ethanol 95 % (v/v) at 4 °C for 30 min. The precipitated pectin was separated by vacuum filtration and then immersed in ethanol (70 %) for 12 h to remove the impurities (such as monosaccharides, disaccharides and phenolic compounds) according to (Minkov, Minchev, & Paev, 1996). The pectin was washed with acetone and immediately dried at 40 °C for 12 h in an oven with air circulation. Values are expressed in grams per 100 g of dry matter (g/100 g). The extraction yields (Y) were



calculated according to the following equation:

$$Y(\%) = \frac{\text{Pectin.Weight}}{\text{Sample.Weight}}$$

#### 2.4.2 Determination of galacturonic acid

Galacturonic acid (GalA) was determined by m-hydroxydiphenyl method (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). Samples of pectin (200  $\mu\text{L}$ ) were mixed thoroughly with 1.2 mL of 0.125 M sodium tetraborate solution (in concentrated sulfuric acid) in an ice bath. The mixtures were heated in a boiling bath for 5 minutes and subsequently cooled in an ice bath. The mixtures were added with 20  $\mu\text{L}$  of 0.15% m-hydroxydiphenyl (in 0.5% NaOH) and mixed. A pink color developed in 5 minutes. After that, the absorbance was recorded at 520 nm using an UV spectrophotometer (Shimadzu® Model UV-Vis 1800). A standard curve was obtained using galacturonic acid at (2 – 100)  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 2.4.3 Degree of esterification

The degree of esterification (DE) of pectin was determined by the titrimetric method of Food Chemical Codex (National Academy of Sciences, 1981) and (Bocek, Zabivalova, & Petropavlovskii, 2001). The analyses were performed in triplicate. Dried sample of pectin (50 mg) was solubilized in 100 mL of water with 2 mL of ethanol. After the sample was completely dissolved, five drops of phenolphthalein were added, the sample was titrated with 0.05 M sodium hydroxide and the result was recorded as the initial titer. Then, 10 mL of 0.5 M sodium hydroxide were added, the sample was shaken vigorously, and allowed to stand for 15 minutes at 30 °C; 10 ml of 0.5 M hydrochloric acid were added and the sample was shaken until the pink color disappeared. Phenolphthalein (five drops) was added and the solution was titrated with 0.5 M sodium hydroxide to a faint pink color that persisted after vigorous shaking (end-point). This volume of titration was recorded as the saponification titer (the final titer). The DE was calculated from the following equation:

$$\%DE = \frac{\text{the final titer}}{\text{the initial titer} + \text{the final titer}}$$

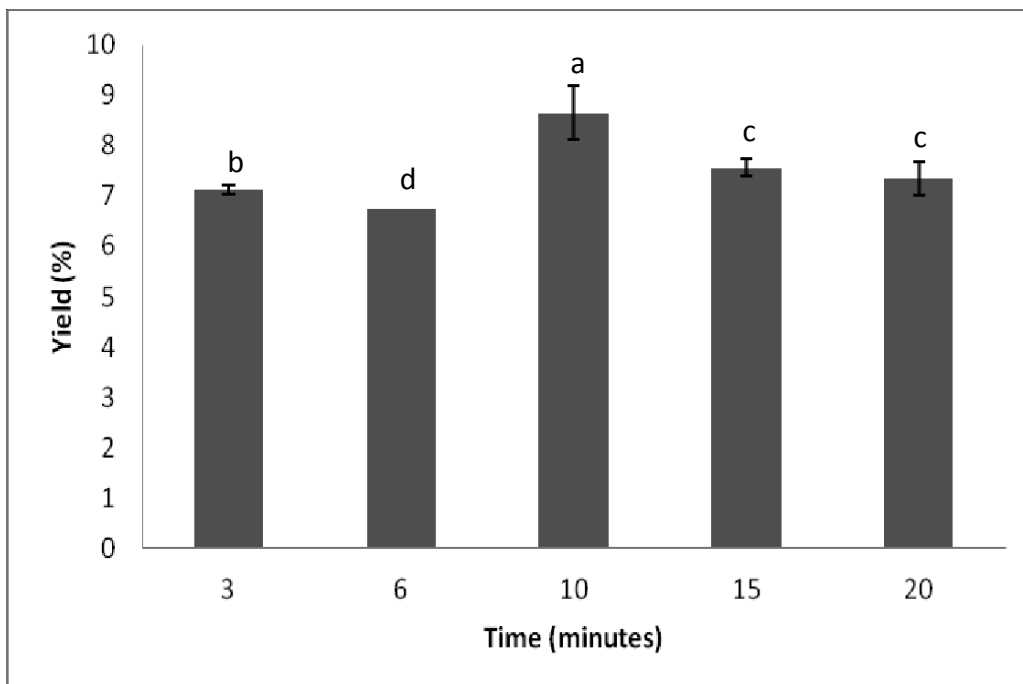
#### **2.4.4 Statistical analysis**

An ANOVA was performed followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ), using Statistic 8.0 software for Windows (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

### **3. Results**

#### **3.1 Determination of sonication time for extraction of pectin assisted by ultrasound**

Figure 1 shows the yield of pectin extraction assisted by ultrasound, for different times. As can be seen, the amount of pectin extracted increased in the first 10 min (even though there was a small decrease after 6 min of extraction); for longer times, the yield slowed down. This decrease is in accordance with the results obtained by Xu et al. (2014) who reported the degradation of pectin when exposed to ultrasound for long time. Therefore, a sonication time of 10 min was enough to attain the equilibrium of mass transfer during ultrasound extraction, under the conditions tested. Xu et al. (2014) studied the effect of ultrasound in the extraction of pectin from grapefruit peel and performed experiments in the time range from 10 to 60 min (other experimental conditions were power density  $0.40 \text{ W mL}^{-1}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , solid-liquid ratio 1:50 g/mL); their results showed that the yield increases in the first 20 min of extraction and started decreasing for longer times. Wang et al. (2015), also working with the extraction of pectin from grapefruit peel assisted by ultrasound, concluded that the optimized time was 27.95 min when the power intensity and temperature were  $12.56 \text{ W cm}^{-2}$  and  $66.71 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectively.



**Figure 1.** Pectin yield as a function of time at  $664 \text{ W cm}^{-2}$ . Results followed by different small letters in the column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

### 3.2 Determination of power intensity and temperature for extraction of pectin assisted by ultrasound

In this step of the work the effect of power intensity and temperature, keeping fixed the sonication time in 10 min, were investigated. The power intensity varied from  $132.8 \text{ W/cm}^2$  to  $664 \text{ W/cm}^2$  and the temperature from  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  to  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ . The extraction yield, galacturonic acid and esterification degree were considered as the indicators of the extraction efficiency. These results are presented in Table 1. It can be observed that the yield of pectin extracted increases 1.41 times when power intensity changes from  $132.8$  to  $664 \text{ W/cm}^2$ , keeping the temperature constant in  $85^\circ\text{C}$ . Also, it can be seen that the yield enhanced (1.67 fold) when the temperature increases from  $45$  to  $85 \text{ }^\circ\text{C}$ , keeping fixed power intensity in  $664 \text{ W/cm}^2$ . The maximum yield ( $12.67 \%$ ) was found under the highest temperature and power intensity tested,  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $14.98 \text{ W/cm}^2$ , respectively. It could be seen that the combination of high temperature and power intensity is essential for the efficiency of ultrasound-assisted extraction. The results for GalA and DE will be discussed

later.

**Table 1.** Experimental design and results of extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. Experimental conditions: pH 2, solid:liquid ratio 1:30 and 10 minutes.

Run	T (°C)	Power intensity (W/cm <sup>2</sup> )	Yield (%)	GalA (%)	DE (%)
1	85	132.8	8.94±0.63 <sup>b</sup>	66.27±0.98 <sup>d</sup>	68.76±0.57 <sup>d</sup>
2	45	664.0	7.57±0.39 <sup>c</sup>	74.18±0.97 <sup>b</sup>	75.36±0.41 <sup>c</sup>
3	85	664.0	12.67±0.81 <sup>a</sup>	66.65±0.46 <sup>d</sup>	60.36±1.17 <sup>e</sup>
4	45	132.8	7.53±0.16 <sup>c</sup>	76.29±76.2 <sup>a</sup>	79.59±0.82 <sup>a</sup>
5	65	398.4	8.19±0.48 <sup>b</sup>	70.16±0.2 <sup>c</sup>	77.43±0.55 <sup>b</sup>
6	65	398.4	8.69±0.19 <sup>b</sup>	70.28±0.1 <sup>c</sup>	76.72±0.23 <sup>b</sup>
7	65	398.4	8.56±0.64 <sup>b</sup>	70.51±0.14 <sup>c</sup>	77.42±0.52 <sup>b</sup>

The results represent the average of duplicates ± standard deviation. Results followed by different small letters in the column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's test.

The response surfaces for the extraction yield and galacturonic acid as a function of temperature and power intensity are presented in Figure 2. As can be seen in Figure 2A, the yield is strongly dependent on the temperature; even with high power intensity of ultrasound, the yield was relatively low under low temperature. The highest yield was obtained using high temperatures and power intensity. These results showed that the temperature is an important parameter for pectin extraction and could be explaining by the increase of solubility of the pectin as the temperature increases. The same behavior was observed by other authors during the extraction of different compounds from vegetable tissues (Butz & Tauscher 2002; Prasad et al. 2009; Liew et al., 2014).

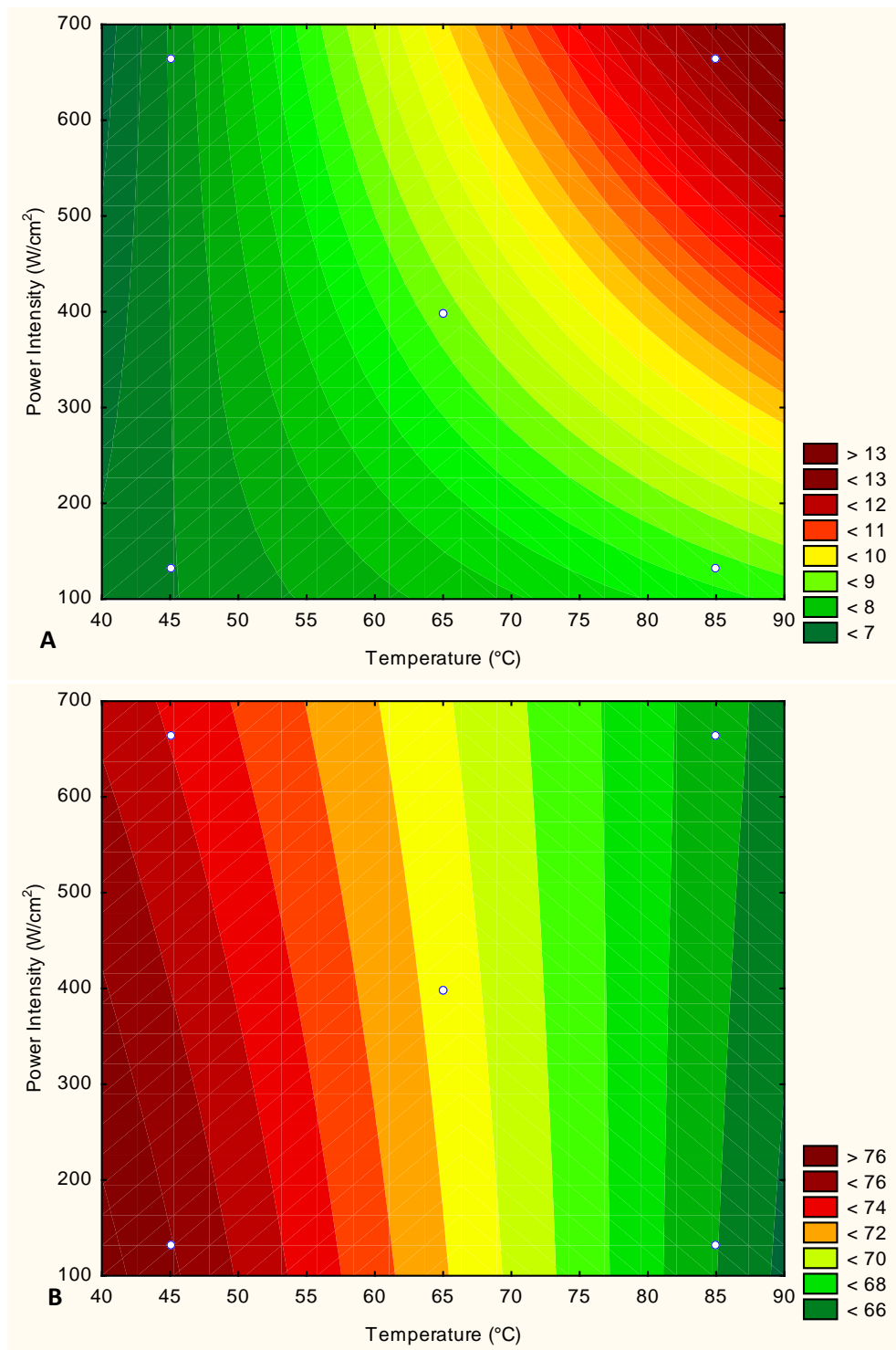
A first-order response surface model was used to fit the data using analysis of variance (ANOVA) and Fischer's  $F$ -test. The model adequacy was checked by  $F$ -test and by the determination coefficient  $R^2$ . The results for ANOVA led to value  $F_{(3,3)} = 18.12$  greater than  $F$  tabulated ( $F_{t(3,3)} = 9.28$ ), which demonstrated significance for the regression model (Myers & Montgomery, 2002). The value of  $R^2$  was 0.948 indicating that the model could explain 95.5 % of the variability for response. A value of  $R^2 > 0.750$  indicates the

aptness of the model. In the range studied, the variables temperature ( $x_1$ ) and power intensity ( $x_2$ ), as well as the interaction between them, had significant effect on the yield and the following regression equation was obtained:

$$Y (\%) = 8.878 + 1.627x_1 + 0.942x_2 + 0.922x_1x_2$$

The ultrasound technique has been studied to improve the extraction of target compounds from plant sources (Guamán-Balcázar, Setyaningsih, Palma, & Barroso, 2015; Rodrigues, Fernandes, de Brito, Sousa, & Narain, 2015). The promotion of extraction of bioactive compounds by ultrasound can be attributed to an intensification of mass transfer, due to the phenomenon of cavitation bubble collapse produced by the sonication, which facilitates the flow of solvent inside the plant tissue, enhancing the efficiency of extraction (Chemat et al., 2011). The ability of ultrasound to cause cavitation depends on the characteristics (frequency and intensity), the properties (viscosity and surface tension) and the ambient conditions (temperature and pressure). For extraction applications, the cavitation phenomenon also depends on solvent properties (Tiwari, 2015).

Different researches have performed studies using ultrasound for extraction of different compounds from vegetables tissue. Rodrigues et al. (2008) studied the extraction of polyphenols and anthocyanins from jaboticaba peel assisted by ultrasound and the results showed that with an adequate operating condition it was possible to reach good yields using ultrasound technic. Additionally, Toma et al. (2001) reported that ultrasonic treatment enhances the swelling and softening process of cell walls via the hydration of pectin material from middle lamella, which leads to the break-up of vegetal tissue during sonication. Therefore, it seems clear that sonication plays an important role in breaking up the vegetal tissue, enhancing the extraction yields.



**Figure 2.** (A) Contours of extraction yield of pectin as a function of temperature and power intensity. (B) Galacturonic acid content depending on the temperature and power intensity.

Concerning the galacturonic acid content (GalA), the results are present in Table 1 and the response surface is shown in Figure 2B. As can be seen in Table 1, the content of GalA increases from 66.27 to 76.29 when the temperature decreases from 85 to 45 °C, keeping power intensity of 132.8 W/cm<sup>2</sup>. On the other hand, the GalA content did not change ( $p > 0.05$ ) when the power intensity increases from 132.8 to 664 W/cm<sup>2</sup>, keeping the temperature of 45 °C. For all experiments, the pectin obtained presented a GalA content higher than 65 %, which is the minimum value accepted to be considered pectin by the Food and Agricultural Organization. It also can be seen that the highest GalA (76.29 %) was obtained at temperature of 45 °C and 132.8 W/cm<sup>2</sup> (run 4). The response surface, Figure 3B, shows that the use of high temperature decreases the GalA content, probably due to the depolymerization of pectin chain. The content of GalA is related with the technological characteristics of the ability of pectin to form gels.

The statistical analysis showed that all variables and the interaction between them, in the range studied, had a significant and negative effect on the GalA. The results of the response surface models were examined by analysis of variance (ANOVA) and Fischer's *F*-test. Fisher's *F*-test showed the value  $F_{(3,3)} = 145.15$  which is greater than *F* tabulated ( $F_{t(3,3)} = 9.28$ ), demonstrating significance for the regression model. Regressions obtained indicated the  $R^2$  value of 0.974 for yield. The regression equation obtained was:

$$Y (\%) = 70.620 - 4.387x_1 - 0.433x_2 + 0.622 x_1 x_2$$

The results related with the degree of esterification (DE) of the pectin extracted are presented in Table 1. The DE represents the carboxyl groups of the main chain of galacturonic acid that are esterified with methyl or acetyl groups (Farris et al., 2009). The values found for the DE for all conditions tested showed values higher than 50 %; pectin with DE higher than 50 % is named high methoxyl pectin and form gel in the presence of high amount of sugar (65% or more) and low pH; pectin with DE > 50 % normally is used for jellies, jams and products with high sugar concentration. On the other hand, pectin with a DE less than 50 % is named low methoxyl pectin and form gel in presence of calcium ions; this kind of pectin is used in low sugar concentration products (such as diet products) (Videcoq et al., 2011).

The statistical analysis showed that the temperature and power intensity had a negative effect on the DE; an increase on the temperature and power intensity promoted a decrease on the DE, in the range studied. However, the regression equation obtained had not a significant effect for the DE ( $F_{(3,3)} = 3.21$  and  $F$  tabulated = 9.28).

It is important to emphasize that, depending on the source, and, mainly, on the experimental conditions applied during the extraction process, the pectin will have different characteristics. The GalA content and the DE of pectic polysaccharides affect the commercial uses of pectin as gelling and thickening agents.

### **3.3 Comparison between conventional heating extraction and ultrasound-assisted extraction**

As discussed earlier, the highest yield of pectin obtained by ultrasound-assisted extraction was 12.67 % (extraction conditions 85°C, 664 W/cm<sup>2</sup>, pH 2.0 and 10 min) (run 3 in Table 2). For these same conditions, a conventional heating extraction was performed and the result was 7.95 %. This result indicates that the extraction yield increased 1.6 fold when the extraction was assisted by ultrasound. Oliveira et al. (2015) obtained a yield of 9.21 % of the pectin extracted from passion fruit peel using conventional heating for 30 min (peel/extractante ratio 1:30, pH 2.0 and 85±2 °C) while, in the present work, the yield was 12.67 % in only 10 min of sonication. These results are in accordance with other studies, which report the short time for effective extraction of polysaccharides, including pectin, hemicelluloses and other water-soluble polysaccharides, assisted by ultrasound (Ebringerová & Hromádková, 2002; Minjares-Fuentes et al., 2014; Wang et al., 2015).

## **4. Conclusion**

In the present study, the effect of temperature and power intensity of ultrasound in the pectin extraction from passion fruit peel was evaluated. All the independent parameters presented significant effect on the extraction yield. The highest yield (12.67 %) was obtained when the power intensity and temperature were 664 W/cm<sup>2</sup> and 85 °C, respectively. The esterification degree was affected by both variables, while only the temperature affected the galacturonic acid content. It is also observed that the extraction



yield increased 1.6 fold when the extraction was assisted by ultrasound. The results obtained demonstrated that ultrasound was an efficient and time saving technique for extraction of pectin from passion fruit peel.

### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support received from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) as a scholarship to the first author and by the PNPD project.

### References

- Barrales, F. M., Rezende, C. A., & Martínez, J. (2015). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, *104*, 183–192. doi:10.1016/j.supflu.2015.06.006
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, *54*(2), 484–489. doi:10.1016/0003-2697(73)90377-1
- Bochek, A. M., Zabivalova, N. M., & Petropavlovskii, G. A. (2001). Determination of the Esterification Degree of Polygalacturonic Acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, *74*(5), 796–799. doi:10.1023/A:1012701219447
- Butz, P., & Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, *35*(2-3), 279–284. doi:10.1016/S0963-9969(01)00197-1
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, *18*(4), 813–835. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023
- De Oliveira, C. F., Giordani, D., Gurak, P. D., Cladera-Olivera, F., & Marczak, L. D. F. (2015). Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *29*, 201–208. doi:10.1016/j.ifset.2015.02.005
- Ebringerová, A., & Hromádková, Z. (2002). Effect of ultrasound on the extractibility of corn bran hemicelluloses. *Ultrasonics Sonochemistry*, *9*(4), 225–229. doi:10.1016/S1350-4177(01)00124-9
- Espinal-Ruiz, M., Restrepo-Sánchez, L.-P., Narváez-Cuenca, C.-E., & McClements, D. J. (2015). Impact of pectin properties on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of citrus and banana passion fruit (*Passiflora tripartita* var.

mollissima) pectins. *Food Hydrocolloids*, 52, 329–342.  
doi:10.1016/j.foodhyd.2015.05.042

Farris, S., Schaich, K. M., Liu, L., Piergiovanni, L., & Yam, K. L. (2009). Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 316–332. doi:10.1016/j.tifs.2009.04.003

Guamán-Balcázar, M. C., Setyaningsih, W., Palma, M., & Barroso, C. G. (2015). Ultrasound-assisted extraction of resveratrol from functional foods: Cookies and jams. *Applied Acoustics*. doi:10.1016/j.apacoust.2015.07.008

Kliemann, E., de Simas, K. N., Amante, E. R., Prudêncio, E. S., Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., & Amboni, R. D. M. C. (2009). Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel ( *Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(3), 476–483.  
doi:10.1111/j.1365-2621.2008.01753.x

Koubala, B. B., Mbome, L. I., Kansci, G., Tchouanguep Mbiapo, F., Crepeau, M.-J., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C. (2008). Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry*, 106(3), 1202–1207. doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.065

Levigne, S., Ralet, M.-C., & Thibault, J.-F. (2002). Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, 49(2), 145–153. doi:10.1016/S0144-8617(01)00314-9

Liew, S. Q., Chin, N. L., & Yusof, Y. A. (2014). Extraction and Characterization of Pectin from Passion Fruit Peels. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 231–236.  
doi:10.1016/j.aaspro.2014.11.033

Liu, Y., Shi, J., & Langrish, T. (2006). Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chemical Engineering Journal*, 120(3), 203–209.  
doi:10.1016/j.cej.2006.02.015

López-Vargas, J. H., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, 51(2), 756–763.  
doi:10.1016/j.foodres.2013.01.055

Medina-Meza, I. G., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2015). Assisted extraction of bioactive compounds from plum and grape peels by ultrasonics and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 166, 268–275. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.06.012

- Myers, R. H., Montgomery, R. C. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, Wiley, New York, 2002.
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simal, S., & Rosselló, C. (2014). Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: a response surface methodology approach. *Carbohydrate polymers*, *106*, 179–89. doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.013
- Minkov, S., Minchev, A., & Paev, K. (1996). Modelling of the hydrolysis and extraction of apple pectin. *Journal of Food Engineering*, *29*(1), 107–113.
- National Academy of Sciences. (1981). *Food Chemical Codex* (pp. 283–286). Washington.
- Pinheiro, E. S. R., Silva, I. M. D. A., Gonzaga, L. V., Amante, E. R., Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., & Amboni, R. D. M. C. (2008). Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource technology*, *99*(13), 5561–6. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.058
- Prasad, K. N., Yang, B., Zhao, M., Wei, X., Jiang, Y., & Chen, F. (2009). High pressure extraction of corilagin from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Separation and Purification Technology*, *70*(1), 41–45. doi:10.1016/j.seppur.2009.08.009
- Rodrigues, S., Fernandes, F. A. N., de Brito, E. S., Sousa, A. D., & Narain, N. (2015). Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jabuticaba peel. *Industrial Crops and Products*, *69*, 400–407. doi:10.1016/j.indcrop.2015.02.059
- Rodrigues, S., Pinto, G. A. S., & Fernandes, F. A. N. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, *15*(1), 95–100. doi:10.1016/j.ultsonch.2007.01.006
- Seixas, F. L., Fukuda, D. L., Turbiani, F. R. B., Garcia, P. S., Petkowicz, C. L. de O., Jagadevan, S., & Gimenes, M. L. (2014). Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids*, *38*, 186–192. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.12.001
- Strati, I. F., Gogou, E., & Oreopoulou, V. (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and Bioproducts Processing*, *94*, 668–674. doi:10.1016/j.fbp.2014.09.012
- Thakur, B. R., Singh, R. K., & Handa, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin--a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *37*(1), 47–73. doi:10.1080/10408399709527767

- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: a clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. . (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137–142. doi:10.1016/S1350-4177(00)00033-X
- Videcoq, P., Garnier, C., Robert, P., & Bonnin, E. (2011). Influence of calcium on pectin methylesterase behaviour in the presence of medium methylated pectins. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1657–1664. doi:10.1016/j.carbpol.2011.06.081
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300–312. doi:10.1016/j.tifs.2005.12.004
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., ... Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: optimization and comparison with the conventional method. *Food chemistry*, 178, 106–14. doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.080
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126, 72–81. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.11.004
- Yeoh, S., Shi, J., & Langrish, T. A. G. (2008). Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, 218(1-3), 229–237. doi:10.1016/j.desal.2007.02.018

## Capítulo 8 – Considerações finais e sugestões para trabalhos futuros

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que a farinha da casca do maracujá obtida por secagem a 60 °C e liofilização tem potencial para ser utilizada como ingrediente na formulação de diferentes produtos com a finalidade de agregar valor aos mesmos devido à presença de compostos fenólicos, carotenoides e, principalmente, devido ao alto conteúdo de fibras alimentares totais (63,98 – 72,62 %). Além disso, foi observado que esta farinha é rica em pectina (6,98 – 19,6 %) e que este composto pode ser extraído por diferentes métodos.

A extração convencional mostrou ser um método eficaz para a extração da pectina, porém o alto consumo de tempo e as elevadas temperaturas necessárias para a obtenção de rendimentos satisfatórios aparecem como desvantagens desta técnica. Diante disso, as tecnologias alternativas ao processo de extração convencional, estudadas no presente trabalho, apresentaram potencial para a extração da pectina da casca do maracujá.

A extração assistida por campo elétrico moderado apresentou um rendimento de extração de pectina menor quando comparada com a extração convencional, porém o tempo e temperatura de processo foram menores. No entanto, o rendimento de extração foi 1,3 vezes maior, quando uma tensão de 100 V foi aplicada, comparado com o experimento controle (sem aplicação do campo elétrico). A maior parte das pectinas extraídas apresentaram um conteúdo de ácido galacturônico maior do que 65 % e grau de esterificação maior do que 50 %.

A tecnologia de alta pressão hidrostática apresentou valores satisfatórios quando utilizada como pré-tratamento para a extração convencional. Foi observado que utilizando 300 Mpa de pressão, 50 °C por 20 minutos, como pré-tratamento para a extração convencional, o rendimento de extração foi de 14,34 %, enquanto que o rendimento observado para a extração convencional sem pré-tratamento foi de 7,40 %.

Por fim, a técnica de ultrassom apresentou um bom desempenho em um curto espaço de tempo, quando comparado com a extração convencional. Os resultados mostraram um elevado rendimento de pectina (13,67 %) quando 664 W/ cm<sup>2</sup>, 85 °C

durante 10 minutos foram aplicados. A extração convencional, conduzida nas mesmas condições, porém sem a aplicação do ultrassom, apresentou um rendimento de 7,95 %.

As três tecnologias estudadas no presente trabalho são capazes de danificar a estrutura da célula vegetal e, por isso, apresentam potencial para melhorar a extração da pectina da casca do maracujá quando comparada à extração convencional. No entanto, a alta pressão hidrostática e o ultrassom, nas condições testadas, apresentaram um maior efeito quando comparado com o campo elétrico moderado. Provavelmente, este comportamento deve-se à localização da pectina na célula vegetal e, também, pelo modo de ação das diferentes técnicas de extração. Conforme discutido, a pectina encontra-se na parede celular das células vegetais, sendo componente principal para rigidez e firmeza do tecido. O modo de ação no tecido vegetal do campo elétrico moderado difere das demais tecnologias, pois esta técnica age formando poros, principalmente, na membrana celular. Enquanto que a alta pressão hidrostática e o ultrassom agem, principalmente, danificando a parede celular e por isso essas técnicas apresentaram uma maior eficiência na extração da pectina.

Outro aspecto importante a ser destacado é o fato de que o emprego de temperaturas acima de 80 °C. Temperaturas mais elevadas favorecem a extração da pectina com o uso de tecnologias alternativas. Isso ocorre porque uma temperatura alta é essencial para aumentar a taxa na qual o soluto se dissolve no solvente; porém, em alguns casos, foi observado que, acima de determinadas temperaturas, e por prolongados períodos de tempo, o rendimento de extração da pectina começou a diminuir, provavelmente, devido à degradação do polímero. No entanto, vale ressaltar que a combinação de temperaturas acima de 80 °C com as tecnologias estudadas (principalmente a alta pressão hidrostática e o ultrassom) foram mais eficientes quando comparadas apenas com a extração convencional que utiliza o emprego de altas temperaturas por prolongados períodos de tempo.

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que a pectina pode ser extraída da casca do maracujá utilizando diferentes técnicas para maximizar o rendimento e diminuir o tempo de extração; porém, a temperatura é um parâmetro chave para a solubilização da pectina e, conseqüentemente, para um aumento no rendimento de extração.

As conclusões gerais do trabalho são apresentadas a seguir.

- As farinhas da casca do maracujá seca a 60 °C e liofilizada apresentam um alto conteúdo de fibras alimentares e pectina, além de serem boas fontes de compostos bioativos e ainda possuem elevada capacidade de retenção de água e óleo. Dessa forma, a farinha da casca do maracujá pode ser utilizada como ingrediente na formulação de alimentos funcionais e, conseqüentemente, pode contribuir para a diminuição do descarte deste resíduo no ambiente.
- A extração convencional da pectina da casca do maracujá é uma técnica eficaz, porém necessita de muito tempo em temperaturas elevadas para a obtenção de rendimentos satisfatórios.
- A tecnologia de campo elétrico moderado tem potencial para a extração da pectina da casca do maracujá.
- As tecnologias de alta pressão hidrostática e ultrassom aumentam o rendimento de extração da pectina da casca do maracujá. Estas tecnologias podem reduzir o tempo extração e, conseqüentemente, a exposição da fibra a altas temperaturas por prolongados períodos de tempo.
- O campo elétrico moderado, a alta pressão hidrostática e o ultrassom, podem ser consideradas tecnologias alternativas para a extração de pectina da casca do maracujá.

Com base nos resultados obtidos, as seguintes sugestões para trabalhos futuros podem ser apresentadas:

- estudar com maior profundidade os aspectos e características da pectina extraída por diferentes tecnologias, tais como: o perfil de massa molar, as propriedades reológicas e o potencial zeta;
- estudar a influência da utilização de diferentes frequências na extração de pectina assistida por campo elétrico moderado; além disto, estabelecer as melhores condições de extração como pré-tratamento para a extração convencional;
- avaliar os custos energéticos das diferentes técnicas de extração;

- estudar diferentes aplicações comerciais para a pectina;
- estudar a extração de carotenoides da casca do maracujá assistida por campo elétrico moderado, alta pressão hidrostática e ultrassom.



## Referencias Bibliográficas

ACIL-Associação Comercial e Industrial de Limeira. Visão Empresarial 2007. CPKelco Brasil S/a. Disponível em <http://www.acil.org.br/site/diadaempresa/2007/encarte01/jornal10.htm>. Acesso em 18/11/2013.

Agra, M.F., Freitas., P.F, Barbosa-Filho, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.114-140, 2007.

Ahmed, J., Ramaswamy, H.S. High pressure processing of fruits and vegetables. *Stewart Postharvest*, v.1, p.1-10, 2006.

Araújo, C.L., Bezerra, I.W.L., Dantas, I.C., Lima, T.V.S., Oliveira, A.S., Miranda, M.R.A., Leite, E.L., Sales, M.P. Biological activity of proteins from pulps of tropical fruits. *Food Chemistry* v.85, p. 107-110, 2004.

Arnous, A., Makris, D. P., Kefalas, P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 49(12), p. 5736–42, 2001.

Arsalan, N. Extraction of pectin from sugar beet pulp and intrinsic viscosity molecular weight relationship of pectin solutions. *Journal of Food Science and Technology Mysore*, v. 32, n. 5, p. 381–385, 1995.

Aymerich, T., Picouet, P.A., Monfort, J.M. Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, v. 78, p. 114-129, 2008.

Bang, W. S., Chung, H. J. Effect of high hydrostatic pressure on the enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *New Biotechnology*, v. 27(4 SI), p. 440–444, 2010.

Bansal, B., Chen, X. D. Effect of temperature and power frequency on Milk fouling in an ohmic heater. *Food and Bioproducts Processing*, v.84, p.286–291, 2006.

Barbosa-Cánovas, G. V., Rodríguez, J. J. Update on nonthermal food processing technologies, irradiation and ultrasound. *Food Australia*, v. 54, n. 11, 2002.

Barrera, A. M., Ramírez, J. A., González-Cabriales, J. J., Vázquez, M. Effect of pectins on the gelling properties of surimi from silver carp. *Food Hydrocolloids*, v.16, p.441-447, 2002.

- Barrales, F. M., Rezende, C. A., Martínez, J. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 104, p.183–192, 2015.
- Belitz, H.D., Grosch, W. *Química de los Alimentos*. 2<sup>a</sup> ed. Zaragoza: Acribia, p. 1134, 1997.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, v. 54, p. 848-489, 1973.
- Bochek, A. M., Zabivalova, N. M., Petropavlosvskii, G. A. Determination of the esterification degree of polygalacturonic acid. *Russian Journal of Applied Chemistry*, v. 74 (05), p. 775-777, 2001.
- Bowers, J. *Food Theory and Applications*. 2<sup>nd</sup> Edition. New York: Macmillan Publishing Company, p.411, 1992.
- Brandão, E. M, Andrade, C.T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. *Polímeros*, v.9 (3), p. 38-44, 1999.
- Braverman, J. B. S., Berk, Z. *Braverman's Introduction to the Biochemistry of Foods*. Elsevier, 315 p, 1976
- Brites, A., Rosa, F., Rendeiro, J., Gomes, M., Vieira., T. Altas pressões na indústria alimentar. Coimbra. Seminário (Licenciatura em Engenharia de Alimentos) Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra, 2010.
- Brouns, F., Theuwissen, E., Adam, A., Bell, M., Berger, A., Mensink, R.P. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2011.
- Bruckner, C. H., Picanço, M. C. Maracujá: tecnologia de produção, pó colheita, agroindústria e mercado. (C. Continentes, Ed.). Porto Alegre, 2001.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1408, 2000.
- Burgi, R. Utilização de subprodutos agroindustriais na alimentação de ruminantes. Congresso brasileiro de pastagens. Piracicaba. Anais: Piracicaba: FEALQ, p. 101-117, 1986.
- Butz, P., Tausher, B. Emerging technologies: Chemical aspects. *Food Research International*, v. 35, p. 279–284, 2002.

Canteri, M.H.G. Caracterização comparativa entre pectinas extraídas do pericarpo de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. Flavicarpa*) Tese. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

Canteri-Schemin, M.H., Fertoni, H.C.R., Waszczyński, N., Wosiacki, G. Extraction of pectin from Apple pomace. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 48 (2), p. 259-266, 2005.

Carpita, N., McCann, M., Buchanan, B. B., Grisse, W., Jones, R. L. "The cell wall" American Society of Plant Physiologists, Berkeley, 2000.

Carvalho-Okano, R.M., Vieira, M.F., Bruckner, C.H., Picanço, M.C. Maracujá. Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 33, 2001.

Cheftel, J.C. Review: high-pressure, microbial inactivation and food preservation. Food Science and Technology International, v. 1, p. 75-90, 1995.

Chemat, F., Zill-e-Huma., Khan, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics sonochemistry, 18 (4), 813-35, 2011.

Chen. L., Ma. L., Zhou, M., Liu, Y., Zhang, Y. Effects of pressure on gelatinization of collagen and properties of extracted gelatins. Food Hydrocolloids, v. 36, p. 316-322, 2014.

Colin-Henrion, M. De la pomme à la pomme transformée : impact du procédé sur deux composés d'intérêt nutritionnel. Angers., Tese em Ciências Agrônomicas)- École Doctorale D'Angers-Universidade d'Angers, 2008.

Córdova, K. R. V., Gama, T. M. M. T. B., Winter, C. M. G., Kaskantzis, Neto G., Freitas, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá- amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa degener*) obtida por secagem. Boletim do CEPPA. Curitiba, v. 23 (2), p. 221-230, 2005.

Corrales, M., Garcia A.F., Butz, P., Tauscher, B. Extraction of anthocyanins from grapeskins assisted by high hydrostatic pressure. Journal of Food Engineering, v. 90, p. 415-421, 2008.

Corredig, M., Kerr, W., Wicker, L. Molecular characterization on commercial pectins by separation with linear mix gel permeation columns in-line with multi angle light scattering detection. Food Hydrocolloids, v.14, p. 41-47, 2000.

D'Addosio, R.D., Páez, G., Marín, M , Mármol, Z., Ferrer, J. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis f. flavicarpa Degener*). Revista de la Facultad de Agronomía, Caracas, v. 22 (3), p. 241-251, 2005.

Dolatowski, Z. J., Stasiak, D. M. Ultrasonically Assisted Diffusion Processes. In: LEBOVKA, N.;VOROBIEV, E., et al (Ed.). Enhancing Extraction Processes in the Food Industry. Estados Unidos: CRC Press, 2012. cap. 4, p.123 - 143. (Contemporary Food Engineering).

Dornenburg, H., Knorr, D. Cellular permeabilization of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. Food Biotechnology, v. 7, p. 35–48, 1993.

Downham, A., Collins, P. Colouring our foods in the last and next millennium. International Journal of Food Science & Technology, v. 35 (1), p. 5-22, 2000.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Agricultura e Pecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. Disponível em <http://www.cnpmf.embrapa.br/>. Acesso em 15/11/2013.

FAO, 2001. Technical Elements of New and Emerging. Non-Thermal Food Technologies. Disponível em [http://www.fao.org/ag/ags/agsi/Nonthermal/nonthermal\\_1.htm#\\_Toc523623854](http://www.fao.org/ag/ags/agsi/Nonthermal/nonthermal_1.htm#_Toc523623854). Acesso em: 11/07/ 2013.

FDA, 2000. Food and Drug Administration. Center For Food Safety And Applied Nutrition. Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. High Pressure Processing. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.vgov/~comm/ift-hpp.html>. Acesso em: 11/07/2013.

Fellows, P. J. Tecnologia do processamento de alimentos: Woodhead Publishing Ltd. 602 p, 2006.

Fenemma, O., Parkin, K.L. Química de Alimentos. 4<sup>nd</sup> ed: Artimed, Porto Alegre, 443 p, 2010.

Ferrari, R.A., Colussi, F., Ayub, R. A. Characterization of by-products of passion fruit industrialization utilization of seeds. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 26, p. 101-102, 2004.

Glinsky, V.V., Raz, A. Modified pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. Carbohydrate Research, v. 344, p. 1788–1791, 2009.

Gross, M., Jaenicke, R. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes. European Journal of Biochemistry, v. 221, p. 617–630, 1994.

Guerrero-Beltran, J. A., Estrada-Giron, Y., Swanson, B. G., Barbosa-Canovas, G. V. Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin inhibitors. Food Chemistry, v. 116 (3), p. 676–679, 2009.

Guertzenstein, S. M. J. Uso da casca de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*, *Deg*) amarelo como fonte de fibra solúvel na alimentação de ratos diabéticos. Rio de Janeiro, 116p. Dissertação de Mestrado – Mestrado em Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998.

Gulfi, M., Arrigoni, E., Amadò, R. In vitro fermentability of pectin fraction rich in hairy regions. *Carbohydrate Polymers*, v. 67 (3), p. 410-416, 2007.

Guo, X., Han, D., Xi., Rao, H., Liao, X., Hu, X., Wu, J. Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 441– 448, 2012.

Guo, X., Zhao, W., Pang, X., Liao, X., Hu, X., Wu, J. Emulsion stabilizing properties of pectins extracted by high hydrostatic pressure, high-speed shearing homogenization and traditional thermal methods: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, v. 35, p. 217-225, 2014.

Handa, A. K., Tieman, D. M., Mishra, K. K., Thakur, B. R., & Singh, R. K. (1996). Pectins and Pectinases, *Proceedings of an International Symposium. Progress in Biotechnology*, v. 14, p. 355–368.

Herrick, J. P., Sastry, S. K., Clyde, G. F., Wedral, E. R. On-demand Direct Electrical Resistance Heating System and Method Thereof. *United States Patent*, v. 6(130),p. 990, 2000.

Hite, B. H. The effect of pressure in the preservation of milk. Washington, Va. University, Agriculture Experiment Station, *Bulletin*, v. 58, p.15 –35, 1899.

Hite, B. H., Giddings, N. J., Weakly, C. E. The effects of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. Washington, Va. University, Agriculture Experiment Station, *Bulletin*, v. 146, p. 1 –67, 1914.

Hogan, E., Kelly, A. L., Sun, D.W. High pressure processing of foods: An overview . *Emerging Technologies for food processing*. London: Elsevier Academic Press, v 1, p. 3-32, 2005.

Hokputsa, S., Gerddit, W., Pongsamart, S., Inngjerdigen, K., Heinze, T., Koschella, A., Paulsen, B. S. Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from Durian rinds (*Durio zibethinus* Murr.): isolation, fractionation, characterisation and bioactivity. *Carbohydrate Polymers*, v. 56(4), p. 471–481, 2004.

Hoover, D. G. Ultrasound. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 93-95, 2000.

Huang, H-W., Hsu, C-P Binghuei., Yang, B. B., Wang, C-Y. Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in Food Science &*

Technology, v. 33, p. 54-62, 2013.

Iglesias, M. T., Lozano, J. E., Extraction and characterization of sunflower pectin. Journal of Food Engineering, v. 62, p. 215-223, 2004.

Instituto de Tecnologia de Alimentos. Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: ITAL, 1994.

Instituto Brasileiro de Frutas, 2013. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/detalhe.aspx?id=1>

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – Pesquisa de Orçamentos Familiares (2008-2009) – Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. Rio de Janeiro, 2011.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – Produção Agrícola Municipal 2012. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/defaulttab\\_censoagro.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/defaulttab_censoagro.shtm)

IPPA-Internacional Pectin Producers Association – What is pectin- Discovery and history. Disponível em: <[http://www.ippa.info/what\\_is\\_pectin.htm](http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm)> Acesso em 26/11/2013.

ITDG- Intermediate Technology Development Group. Fruits Wastes Utilization. Disponível em : <[http://www.itdg.org/docs/technical\\_information\\_service/fruit\\_waste\\_utilisation.pdf#search=%22wastes%20fruits%22](http://www.itdg.org/docs/technical_information_service/fruit_waste_utilisation.pdf#search=%22wastes%20fruits%22)>. Acesso em 28/11/2013

Jerman, P., Trebše, B., Mozetic, V. Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. Food Chemistry, v. 123, p. 175–182, 2010.

Joslin, M. A., Deuel, H. The extraction of pectins from apple marc preparations. Journal of Food Science, v. 28 (01), p. 65-83, 1963.

Jovanovic-Malinovska, R., Kuzmanova, S., Winkelhausen, E. Application of ultrasound for enhanced extraction of prebiotic oligosaccharides from selected fruits and vegetables. Ultrasonics Sonochemistry, v. 22, p. 446–453, 2015.

Jun, X., Shuo, Z., Bingbing, L., Rui, Z., Ye, L., Deji, S., Guofeng, Z. Separation of major catechins from green tea by ultra high pressure extraction. International Journal of Pharmaceutics, v. 386, p. 229–231, 2010.

Kaczmarczyk, M. M., Miller, M. J., Freund, G. G. The health benefits of dietary fiber: Beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardio-vascular disease and colon cancer. Metabolism Clinical and Experimental, v. 61, p. 1058–1066, 2012.

Kanduser, M., Miklavci, D. Electroporation in biological cell and tissue: An overview. In: E. Vorobiev e N. Lebovka (Ed.). Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials. New York: Springer, 2008. Electroporation in biological cell and tissue: An overview, p.1-37. (Food engineering series)

Kendall, C. W. C., Esfahani, A., Jenkins, D. J. A. The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids*, v. 24, p. 42–48, 2010.

Kjoniksen, A.L., Hiorth, M., Nystrom, B. Association under shear flow in aqueous solutions of pectin. *European Polymer Journal*, v.41, p. 761-771, 2005.

Kliemann, E. Extração e caracterização da pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*). Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

Kliemann, E., Simas, K. N., Amante, E. R., Prudêncio, E. S., Teófilo, R. F., Ferreira, M. M. C., Amboni, R. D. M. C. Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 44 (3), p. 476-483, 2009.

Koubala, B. B., Mbome, L. I., Kansci, G., Mbiapo, F. T., Crepeau, M. J., Thibault, J. F. Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chemistry*, v. 106 (3), p.1202–1207, 2008.

Kratchanova, M., Pavlova, E., Panchev, I. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), p 181–185, 2004.

Kulkarni S. G., Vijayanand, P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa L.*). *Food Science and Technology*, v. 43, p. 1026–1031, 2010.

Kulshrestha, S. A., Sastry, S. K. Frequency and voltage effects on enhanced diffusion during moderate electric field (MEF) treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 4 (2), p. 189–194, 2003.

Kulshrestha. S, Sanjay. S, Laleh. L., Sastry. S. Moderate electrothermal treatments of cellular tissues. In: E. Vorobiev e N. Lebovka (Ed.). Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials. New York: Springer, 2008. Pulsed electric fields induced effects in plant tissues: Fundamental aspects and perspectives of applications, p.39-81. (Food engineering series)

Larrauri, J. A., Rupérez, P. and Saura-Calixto, F. Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45(4), p. 1390–1393, 1997.

- Lebovka, N. I., Bazhal, M. I., Vorobiev, E. Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, v.54 (4), p.337- 346, 2002.
- Lebovka, N. I., Shynkaryk, M., Vorobiev, E. Moderate Electric Field Treatment of Sugarbeet Tissues. *Biosystems Engineering*, v.96 (1), p. 47–56, 2007.
- Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F. Enhancing Extraction Process in the Food Industry. CRC Press, Dublin, p. 556, 2011.
- Levigne, S., Ralet, M. C., Thibault, J. F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*, v. 49 (2), p. 145–153, 2002.
- Liew, S. Q., Nyuk Ling Chin, N. L., Yusof, Y. A. Extraction and Characterization of Pectin from Passion Fruit Peels. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v. 2, p. 231 – 236, 2014
- Lillard, H. S. Decontamination of poultry skin by sonication. *Food Technology*, v. 48, p. 72-73, 1994.
- Lopes, M. L. M., Mesquita, V. L. V., Chiaradia, A. C. N., Fernandes, A.A.R., Farnandes, P. M. B. High hydrostatic pressure processing of tropical fruits. Importance for maintenance of the natural food properties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1189, p. 6–15, 2010.
- López-Vargas, J. H, Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Viuda-Martos, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, v. 51, p. 756–763, 2013.
- Macagnan, F. T., Santos, L. R, Roberto, B. S, Moura, F. A., Bizzani, M., Silva, L.P. Biological properties of apple pomace, orange bagasse and passion fruit peel as alternative sources of dietary fibre. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, v. 6, p. 1–6, 2015
- Makkar, H. P. S. Quantification of tannins in tree foliage – A laboratory manual. Joint FAO/IAEA Working Document, Vienna, Austria, 2000.
- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W. In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-products treat. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71 (12), p. 8383–8389, 2005.



Marcon, M. V. Extração e caracterização de pectinas obtidas de farinha do bagaço de maçã. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR, 2004.

May, C. D., Industrial pectins: sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 12, p. 79-99, 1990.

Mason T. J., Lorimer, J. P. *Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of Ultrasound em Chemistry*, Ellis horwood Limited, 228p, 1988.

Mcclements, D. J. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, v. 6, p. 293-299, 1995.

Mercali, G. D. Tratamento térmico da polpa de acerola via aquecimento ôhmico. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2013.

Mesbahi, G., Jamalian, J., Farahnaky, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in foods systems. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 731-738, 2005.

Michel, F., Thibault, J. F., Mercier, C. Extraction and characterization of pectins from sugar beet pulp. *Journal of Food Science*, v. 50, p. 1499–1502, 1985.

Minolta. Comunicação precisa da cor: controle de qualidade da percepção à instrumentação. Japão: Minolta Corporation, p. 59, 1998.

Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, M. C., Meza-Velázquez, J. A., Simal, S., Rosselló, C. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: a response surface methodology approach. *Carbohydrate polymers*, v. 106, p. 179–89, 2014.

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

Morris, G. A.; Torre, J. G., Ortega, A., Castile, J., Smith, A., Harding, S. E. Molecular flexibility of citrus pectins by combined sedimentation and viscosity analysis. *Food Hydrocolloids*, v. 22, p. 1435-1442, 2008.

Myers, R. H., Montgomery, R. C. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, Wiley, New York, 2002.

Narain, N., Almeida, J. N., Galvão, M. S., Madruga, M. S., Brito, E. S. Volatile compounds in passion fruit (*Passiflora edulis* forma *Flavicarpa*) and yellow mombin (*Spondias mombin* L.) fruits obtained by dynamic headspace technique. *Food Science Technology*, 24 (2), 2004.

Oliveira, C. F., Giordani, D., Gurak, P. D., Cladera-Olivera, F., Marczak, L. D. F. Extraction of pectin from passion fruit peel using moderate electric field and conventional heating extraction methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 29, p. 201–208, 2015.

Oliveira, L. F., Nascimento, M. R. F., Borges, S.V., Ribeiro, P. C. N., Ruback, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 259-262, 2002.

Otagaki, K. K., Matsumoto, H. Nutritive values and utility of passion fruit by products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 6 (1), p. 54-57, 1958.

Owens, H. S., Lotzkar, H., Schultz, T. H., Maclay, W. D. Shape and size of pectinic acid molecules deduced from viscometric measurements. *Journal of American Chemical Society*. New York, , v. 68 (08), p. 1628-1632, 1946.

Pagán, J., Ibarz, A. Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. *Journal of Food Engineering*, v. 39, p. 193-201, 2001.

Penna, A. L. B. Hidrocolóides: usos em alimentos. *Food Ingredients*, v. 17, p. 58-64, 2002.

Pflanzer, S. B., Cruz, A. C., Hatanaka, C. L., Gigante, M. L. Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11 (4), p. 241-251, 2008.

Pinheiro, E. R. Pectina da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa): Otimização da extração com ácido cítrico e caracterização físico-química. Dissertação. Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

Poudel, P. R., Tamura, H., Kataoka, I., Mochioka, R. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native to Japan. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 21, p. 622-625, 2008.

Prasad, N. K., Yang, B., Zhao, M., Ruenroengklin, N., Jiang, Y. Application of ultrasonication or high pressure extraction of flavonoids from litchi fruit pericarp. *Journal of Food Process Engineering*, v. 32, p. 828–843, 2009.

Prasad, K. M. N., Ismail, A., Shi, J., Jiang, Y. High pressure - assisted extraction. In: *Enhancing extraction processes in the food industry: CRC Press*, 2011. High pressure - assisted extraction, p.303-322. (Contemporary food engineering)

Ramos, A. M., Teixeira, L. J. Q., Stringheta, P. C., Chaves, J. B. P., Gomes, J. C. Aplicação de campos elétricos pulsados de alta intensidade na conservação de alimentos. *Revista Ceres*, v. 53 (308) p. 425-438, 2006.

Ramos, A. T., Cunha, M. A. L., Sabaa-Srur, A. U. O., Pires, V. C. F., Cardoso, M. A. A., Diniz, M. F. M, Medeiros, C. C. M. Uso de *Passiflora edulis flavicarpa* na redução do colesterol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, p. 592-597, 2007.

Robertson, J. A., de Monredon, F. D., Dysseleer, P., Guillon, F., Amado, R., Thibault, J.-F. Hydration Properties of Dietary Fibre and Resistant Starch: a European Collaborative Study. *LWT - Food Science and Technology*, v. 33 (2), p. 72–79, 2000.

Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. ILSI PRESS.

Rostagno, M. A., Barroso, C. G. Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, v. 597, p. 265–272, 2007.

Salgado, J. M., Bombarde, T. A. D., Mansi, D. N., Piedade, S. M. S., Meletti, L. M. M. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*Passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic mice. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 784-789, 2010.

Sant'Ana, A. de S., Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., and García-Villanova, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), p. 2047–2053, 2011.

Sastry, S. Ohmic Heating and Moderate Electric Field Processing. *Food Science and Technology International*, v.14, p.419-422, 2008.

Scabio, A., Fertonani, H. C. R., Canteri-Schemin, M. H. Petkowicz, C. L. O., Carneiro, E. B. B., Nogueira, A., Wosiacki, G., 2007. A model for pectin extraction from apple pomace. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 10, p. 259-265, 2007.

Sensoy, I., Sastry, S.K. Extraction using moderate electric fields. *Journal of Food Science*, v. 69 (1), p. 7-13, 2004.

Smelt, J. P. P. M. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Techology*, v. 9, p. 152-158, 1998.

Shirsath, S., S. Sonawane, and P. Gogate, Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2012. v. 53, p. 10-13.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), p. v. 144–158, 1965.

Soliva-Fortuny, R. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 20, p. 544-556, 2009.

Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. *Food Composition and Nutrition Tables*, 7ed. MedPharm Scientific Publishers, Taylor & Francis, CRC Press Book, 2008.

Somkut, J., Smeller, L. High pressure effects on allergen food proteins. *Biophysical Chemistry*, v. 2, p. 301-328, 2013.

Sriamornsak, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. *Silpakorn University International Journal*, v. 3, p. 206-228, 2003.

Strati, I. F., Gogou, E., Oreopoulou, V. Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and Bioproducts Processing*, v. 94, 668–674, 2015.

Suntornsuk, L., Gritsanapun, W., Nilkamhank, S., Paochom, A. Quantification of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 1, p. 849–855, 2001.

Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez Lamela, C., Vasquéz, M., Simal Gándara, J. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, v. 3(2), p. 66-80, 2001.

Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A.V. Chemistry and uses of pectin – A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.37, n.1, 1997.

Thibault, J. F., Petit, R. Les substances pectiques: généralités et domaine d'application dans les industries alimentaires. *Industries alimentaires et agricoles*. v. 96 (12), 1979.

Thibault, J. F.-“Les substances pectiques”, *in*: *Les polymeres vegetaux*, Monties B. Gauthier-Vilars, Paris, 1980.

Thibault, J. F., Saulnier, L., Axelos, M. A. V., Renard, C. M. G. C. Difficultés expérimentales de l'étude des macromolécules pectiques. *Bulletin de la Societé Botanique Française*, n. 314, p. 319-337, 1991.

Thibault, J. F., Petit, R. Les substances pectiques: généralités et domaine d'application dans les industries alimentaires. *Industries alimentaires et agricoles*, v. 96 (12), 1979.

Thibault, J. F. Les substances pectiques. *In*: *MONTIES B. Les polymeres vegetaux*. Paris: Gauthier-Vilars, p. 233-251, 1980.

Thibault, J. F., Saulnier, L., Axelos, M. A. V., Renard, C. M. G. C. Difficultés expérimentales de l'étude des macromolécules pectiques. *Bulletin de la Societé Botanique Française*, v. 314, p. 319-337, 1991.

- Tiwari, B. K. Ultrasound: a clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015.
- Trujillo, A. J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R., Guamis, B. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 3, p. 295–307, 2002.
- Turano, W., Louzada, S. R. N., Derevi, S. C. N., Mendez, M. H. M. Estimativa de consumo diário de fibra alimentar na população adulta, em regiões metropolitanas do Brasil. *Revista de Nutrição Brasil*, v. 3, p. 130-135, 2002.
- Turquois, T., Rinaudo, M., Taravel, F. R., Heyraud, A. Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids*, v. 13, p. 255-262, 1999.
- Tsong, T. Y. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*, v.60(2), p.297-306, 1991.
- Uribe, E., Delgadillo, A., Giovagnoli-Vicuña, C., Quispe-Fuentes, I., Zura-Bravo, L. Extraction Techniques for Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity Determination of Chilean Papaya (*Vasconcellea pubescens*) Fruit. *Journal of Chemistry*, v. 2015, p. 34 – 42, 2015.
- Vidal, S., Doco, T., Williams, P., Pellerin, P., York, W.S., O'NEIL, M.A. Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate Research*, v. 326, p. 277 - 294, 2000.
- Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R. J., Mccann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, v. 132(4), p. 1781-1789, 2003.
- Voragen, A. G. J., Coenen, G- J., Verhoef, R. P., Schols, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, v. 20, p. 263–275, 2009.
- Voragen, G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V., Renard, C. M. G. C. “Pectins”, in: *Food polysaccharides and their applications*, cap. 10, Stephen A. M. (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 1995.
- Vorobiev, E., Lebovka, N. Enhanced Extraction from Solid Foods and Biosuspensions by Pulsed Electrical Energy. *Food Engennering Review*, v. 2, p. 95-108, 2010.
- Vorobiev, E., Lebovka, N (Ed.). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials*. New York: Springer 2008.

Wai W. W., Alkarkhi A. F. M., Easa A. M. Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. *Food and bioproducts processing*, v. 88, p. 209–214, 2010.

Wan, J. Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety e pulsed electric field and low temperature plasma. *Trends in Food Science and Technology*, v. 20, p. 414-424, 2009.

Wang, L., C.L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), p. 300-312, 2006.

Wang, S. J., Chen, F., Wu, J. H., Wang, Z. F., Liao, X. J., Hu, X. S. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 78 (2), p. 693–700, 2007.

Watson, R. R., Zibadi, R., Rafatpanah, H., Jabbari, F., Ghasemi, R., Ghafari, J., Afrasiabi, H., Foo, L.Y., Faridhosseini, R. Oral administration of the purple passion fruit peel extract reduces wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. *Nutrition Research*, v. 28, p. 166-171, 2008.

Willats, W. G. T., Knox, J. P., Mikkelsen, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, v. 17, p. 97-104, 2006.

Wu, J. H., Peng, K., Zhang, Y., Hu, X. S., Liao, S. T., Chen, F. Comparison of quality of apple pectin between conventional solution extraction and microwave-assisted extraction. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, v. 25 (9), p. 350–355, 2009.

Xi, J., Shen, D. J., Zhao, S., Lu, B. B., Li, Y., Zhang, R. Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 382, p. 139–143, 2009.

Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibaul, T. J.-F., Ralet, M.-C. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, v. 69, p. 426 – 435, 2007

Yapo, B. M. Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*, v. 42 (8), p. 1197–1202, 2009a.

Yapo, B. M. Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3147 –3151, 2009b.

Yapo, B. D., Koffi, K. L. K. Yellow passion fruit rind a potential source of low-methoxyl pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 2738-2744, 2006.

Yeoh, S., Shi, J., Langrish, T. A. G. Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, v. 218, p. 229-237, 2008.

Zhang, S., Junjie, Z., Changzhen, W. Novel high pressure extraction technology. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 78, p. 471-474, 2004.

Zhang, Q. H., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering*, v.25 (2), p. 261-281, 1995.

Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4): 555-559, 1999.

Zibadi, S., Watson, R. R. Passion fruit (*Passiflora edulis*): composition, efficacy and safety (Review). *Evidence-Based Integrative Medicine*, v. 3, p. 183-187, 2004.

Zimmerman, F., Bergman, C. Isostatic high-pressure equipment for food preservation. *Food Technology*, v.47(6), p. 162-163, 1993.

Zouambia, Y., Moulai-Mostefa, N., Krea, M. Structural characterization and surface activity of hydrophobically functionalized extracted pectins. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 841-846, 2009.

Webster, E. Cavitation. *Ultrasonics*, v. 1(1), p. 39-48, 1963.

Weaver, J. C. e Chizmadzhev, Y. A. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v.41(2), p.135-160, 1996.