



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA POLPA DE ALFARROBA**

Trabalho submetido por  
**Ana Rita Ferreira Pessoa**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Professora Doutora Patrícia da Silva Moura**

**Outubro de 2013**



## **AGRADECIMENTOS**

*Um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Doutora Patrícia da Silva Moura, pelo apoio, pela orientação e pela disponibilidade que permitiram a realização deste trabalho.*

*Quero agradecer a todas as pessoas que estiveram envolvidas em todo o processo de realização e construção deste trabalho. À Tânia Martins pela ajuda e pela motivação que me foi transmitida em todos os momentos e aos colegas de curso.*

*À família e aos amigos, sem eles tudo isto não teria sido possível.*

*Por último, um agradecimento especial ao Dr. Mário Germano pela oportunidade que me proporcionou e pela confiança depositada em mim.*

## **RESUMO**

A utilização da polpa de alfarroba, que é considerada um sub-produto da indústria da semente da alfarroba, tem despertado um interesse crescente nos últimos anos e mostra-se como sendo uma alternativa interessante e economicamente viável.

Neste trabalho pretendeu-se abordar as evoluções, experimentações, processos biotecnológicos e aplicações mais relevantes realizadas até então dos produtos derivados da alfarroba, tanto da semente mas, principalmente, a polpa de alfarroba.

Os produtos convencionais provenientes da alfarroba são aplicados em diversas indústrias, com mais enfoque na indústria farmacêutica e na indústria alimentar. Atualmente, tem-se a goma de semente de alfarroba (LBG), os xaropes obtidos a partir da polpa de alfarroba, a fibra de polpa de alfarroba, os compostos fenólicos e o pinitol.

A valorização biotecnológica da polpa de alfarroba também passa pelos processos de bioconversão desta e apresentam-se como sendo bastante promissores para o futuro. A produção de bioetanol por fermentação representa um grande avanço para a obtenção e implementação de combustíveis alternativos e renovável, assim como a fermentação de hidrogénio e de ácidos orgânicos. Para além disso, o manitol também representa um importante composto que pode ser isolado a partir da polpa de alfarroba, que apresenta benefícios ao nível da saúde e está amplamente implementado na indústria alimentar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Polpa de alfarroba, goma de semente de alfarroba, xarope de polpa de alfarroba, fibra de polpa de alfarroba, pinitol.



## **ABSTRACT**

The use of the carob pulp, which is considered a byproduct of the carob seed industry has attracted increasing interest in recent years and has shown to be an economically viable and attractive alternative.

In this study we sought to address the developments, trials, biotechnological processes and applications of the most relevant products derived from carob, both seed and carob pulp.

The conventional products obtained from carob are used in various industries, more focused in the pharmaceutical industry and the food industry. Currently, these products are locust bean gum (LBG), syrups obtained from the carob pulp, carob pulp fiber, phenolic compounds and pinitol.

The biotechnological upgrading of carob pulp also passes through bioconversion processes and presents itself as very promising in the future. The production of bioethanol by fermentation represents a major breakthrough for the production of alternative fuels and renewable energy, as well as fermentation for hydrogen and organic acids production. In addition, mannitol is also an important compound which can be obtained from the carob pulp, which has benefits in terms of health and is widely implemented in the food industry.

**KEYWORDS:** Carob pulp, locust bean gum, carob pulp syrup, carob pulp fiber, pinitol.



## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	2
RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	5
ÍNDICE GERAL .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE TABELAS .....	11
LISTA DE ABERVIATURAS .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	15
2. ALFARROBA .....	19
2.1 Alfarroba .....	19
2.2 Semente de alfarroba .....	20
2.3 Polpa de semente de alfarroba .....	20
3. PRODUTOS CONVENCIONAIS PROVENIENTES DA ALFARROBA E SUA VALORIZAÇÃO .....	23
3.1 Goma de semente de alfarroba .....	23
3.1.1 Processo de extração da goma de semente de alfarroba .....	25
3.1.2 Aplicações da goma de semente de alfarroba .....	29
3.2 Xaropes de polpa de alfarroba .....	35
3.2.1 Processo de extração dos açúcares de polpa de alfarroba .....	35
3.2.2 Aplicações do xarope de polpa de alfarroba .....	38
3.3 Fibra de polpa de alfarroba e compostos fenólicos .....	41
3.3.1 Processo de extração dos compostos fenólicos .....	45
3.3.2 Aplicações da fibra de polpa de alfarroba e dos compostos fenólicos .....	47
3.4 Pinitol .....	51
4. PROCESSOS DE BIOCONVERSÃO PARA A VALORIZAÇÃO DA POLPA DE ALFARROBA .....	52
4.1 Fermentação para produção de bioetanol .....	52
4.2 Fermentação para produção de hidrogénio e ácidos orgânicos .....	56
4.3 Produção de manitol .....	58

5. CONCLUSÃO .....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Alfarrobeira.....	10
Figura 2 – Distribuição geográfica do cultivo da alfarroba .....	11
Figura 3 – Constituição da vagem de alfarroba .....	13
Figura 4 – Estrutura molecular da galactomanana .....	18
Figura 5 – Constituintes da semente de alfarroba .....	20
Figura 6 – Processo de extração da LBG .....	22
Figura 7 – Arkocápsulas® de goma de alfarroba .....	27
Figura 8 – Principais etapas do processo de extração do xarope de alfarroba .....	31
Figura 9 – Estrutura química da celulose .....	35
Figura 10 – Unidades fenólicas mais frequentes na estrutura dos taninos hidrolisáveis	38
Figura 11 – Estrutura química do pinitol e D-qui-ro-inositol .....	45
Figura 12 – Diagrama de obtenção de etanol pela utilização da alfarroba .....	48
Figura 13 – Estrutura química do manitol .....	52



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Composição média do embrião da semente de alfarroba .....	14
Tabela 2 – Composição média da polpa de alfarroba .....	15
Tabela 3 – Exemplo da composição de um xarope obtido pela extração da polpa de alfarroba .....	32
Tabela 4 – Classificação dos compostos fenólicos .....	37
Tabela 5 – Produção de manitol por via microbiana: resumo dos estudos realizados tanto em bactérias como em leveduras .....	54



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>DHHDF</b>	Desidro-hexa-hidroxidifénico
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration
<b>GAE</b>	Equivalentes de ácido gálgico
<b>GRAS</b>	Generally Recognized as Safe
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HHDF</b>	Ácido hexa-hidroxidifénico
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de fase gasosa
<b>LBG</b>	Locust Bean Gum
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>MDH</b>	Manitol desidrogenase
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NEFA</b>	Ácidos gordos não esterificados
<b>pH</b>	Potencial de hidrogénio
<b>ROS</b>	Espécies oxigénio reativas
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGI</b>	Trato gastrointestinal



## 1. INTRODUÇÃO

A alfarrobeira comum pertence à família *Fabaceae* (Leguminosae) e tem como nome científico *Ceratonia siliqua L.*. A família *Fabaceae*, para além de ser uma das famílias de plantas mais numerosas, está amplamente distribuída pelo Mundo nas regiões onde o clima é tropical, subtropical ou temperado (Batlle & Tous, 1997).

É uma árvore que apresenta uma robusta coroa semiesférica e um tronco de casca castanha, grosso e áspero, que pode atingir os 10 metros de altura. As suas folhas são de dimensões variadas e esverdeadas, caracterizam-se por apresentarem pequenas flores habitualmente com colorações entre a cor de vinho tinto e o verde e, por apresentarem vagens indeiscentes direitas ou ligeiramente curvadas e de forma alongada. Este fruto é denominado alfarroba. A propagação da planta da alfarrobeira é realizada através de sementes (Batlle & Tous, 1997).



**Figura 1** Alfarrobeira (Biostyle, 2012).

A distribuição geográfica desta árvore situa-se na zona do mediterrâneo. Visto que a alfarrobeira é uma planta xerófita, não é uma planta exigente e, por essa razão, é de fácil adaptação tanto a climas secos como em climas com curtos períodos de chuva anualmente. Prevalece mais em solos arenosos e em solos pouco ricos, como por exemplo, solos calcários. A bacia do mediterrâneo ostenta as características citadas anteriormente e é uma região subtropical o que justifica o evidente desenvolvimento da espécie (Batlle & Tous, 1997). O cultivo da alfarrobeira é muito comum em países como Espanha, Portugal, Itália, Grécia, Marrocos e Turquia. Sendo que Espanha, Itália, Portugal e Grécia foram os países da bacia do mediterrâneo responsáveis por cerca de 75 por cento (%) da produção mundial de alfarroba no ano 2007 (DRAPALG, 2007; Macedo, 2006).



**Figura 2** Distribuição geográfica do cultivo da alfarroba (Batlle & Tous, 1997).

No nosso país, o desenvolvimento da alfarroba abrange principalmente o sul de Portugal e é o barrocal de sotavento algarvio de Portimão a Lagos o local perfeito para o seu cultivo. E os concelhos que detêm a maior área de cultura são Loulé, Silves, Faro, Albufeira, Olhão e São Brás de Alportel (Batlle & Tous, 1997; DRAPALG, 2007). Usualmente, a cultura da alfarrobeira é aliada a culturas de amendoeiras, figueiras e oliveiras (DRAPALG, 2007). Na região algarvia, a alfarrobeira tem assumido um papel

de grande importância ao nível ecológico e económico, principalmente em relação à amendoeira e à figueira, espécies também características daquela região. As variedades Mulata, Galhosa e Canela são as mais comuns no território nacional (Barracosa, Osório, & Cravador, 2007; Macedo, 2006). No ano de 2006, a produção de alfarroba em Portugal atingiu as 44 197 toneladas por ano e tem-se como objectivo aumentar a produção cerca de 8,6% até ao fim de 2013 (DRAPALG, 2007; Macedo, 2006).

Com este trabalho pretende-se estudar a valorização da polpa de alfarroba e explicar os processos biotecnológicos que estão envolvidos nessa valorização. Pretende-se ainda estudar os avanços realizados até ao momento nesse campo e analisar perspectivas futuras.



## 2. ALFARROBA

### 2.1 Alfarroba

A alfarroba é o fruto da alfarrobeira e é, como já referido anteriormente, uma vagem rígida direita ou ligeiramente curvada de forma alongada. A vagem atinge 10-30 centímetros (cm) de comprimento, 1,5 – 3,5 cm de comprimento e aproximadamente 1 cm de espessura. Quando esta vagem está no estado maduro, é constituída pela semente e pela polpa. A semente corresponde a 10% do peso seco do fruto, enquanto a polpa de alfarroba corresponde a 90% (Batlle & Tous, 1997).

Quimicamente, a vagem é constituída por açúcares solúveis, fibra alimentar e uma fração fenólica sendo esta composta essencialmente por taninos condensados, (Batlle & Tous, 1997).

A utilização da alfarroba como matéria-prima revela ser uma área em desenvolvimento no sentido da utilização separadamente da semente e da polpa. Esta utilização da alfarroba advém das diversas propriedades que este fruto apresenta, como por exemplo atividade antioxidante, modulação do perfil lipídico sanguíneo e capacidade antiemética (Batlle & Tous, 1997; Makris & Kefalas, 2004; Zunft *et al.*, 2003).



**Figura 3** Constituição da vagem de alfarroba (Adaptado de Haiat, 2013).

## 2.2 Semente de alfarroba

A semente de alfarroba é constituída pelo invólucro, pelo endosperma e pelo germe ou embrião. Representam em peso seco, 30-33%, 42-46% e 23-25% da semente, respectivamente. O invólucro possui propriedades antioxidantes, o endosperma é rico em galactomananas e o embrião contém uma elevada percentagem de proteínas, cerca de 50% (Batlle & Tous, 1997).

A galactomanana é uma goma com um notório valor comercial visto que consegue atuar como espessante por aumento da viscosidade e também assume propriedades emulsionantes e estabilizantes. Assim, a semente de alfarroba é utilizada ao nível da indústria alimentar (Batlle & Tous, 1997; Dionísio & Grenha, 2012).

Para além da indústria alimentar, a semente de alfarroba apresenta igualmente importância ao nível da indústria farmacêutica, onde é frequente a utilização da farinha de alfarroba na alimentação das crianças, funcionando como um antiemético devido ao espessamento do conteúdo estomacal (Aggett *et al.*, 2002).

**Tabela 1** Composição média do embrião da semente de alfarroba (adaptado de Batlle e Tous, 1997).

<b>Constituinte</b>	<b>Percentagem (%)</b>
Água	7
Lípidos	8
Cinza	6
Proteína (bruta)	52
Hidratos de carbono	27

## 2.3 Polpa de alfarroba

A polpa de alfarroba é o maior constituinte da vagem de alfarroba, representado aproximadamente 90% do peso seco total. A polpa de alfarroba é considerada um sub-produto do aproveitamento da semente, no entanto, devido às suas propriedades e à sua composição química representa uma mais-valia para a valorização da vagem de alfarroba na sua globalidade (Batlle & Tous, 1997).

A constituição química da polpa de alfarroba, ou de qualquer outro material vegetal, depende das condições criadas aquando do cultivo, nomeadamente o local e o

tempo de amadurecimento (Batlle & Tous, 1997; Biner, Gubbuk, Karhan, Aksu, & Pekmezci, 2007). A polpa de alfarroba é quimicamente constituída por açúcares, celulose e hemiceluloses, compostos minerais (potássio, cálcio, magnésio, sódio, cobre, ferro, zinco e manganês) e lípidos. Nos extractos de polpa de alfarroba podemos encontrar a presença de aminoácidos, como por exemplo, alanina, glicina, leucina, tirosina e fenilalanina (Avallone, Plessi, Baraldi, & Monzani, 1997; Batlle & Tous, 1997).

Entre os açúcares que são os constituintes maioritários deste fruto, destacam-se a frutose, a glucose e a sacarose, sendo esta última a que apresenta maior percentagem, correspondendo a cerca de 32 a 38% (p/p) dos açúcares totais (Avallone *et al.*, 1997).

**Tabela 2** Composição média da polpa de alfarroba (tabela adaptada de Batlle e Tous, 1997).

<b>Constituinte</b>	<b>Percentagem (%)</b>
Açúcares totais	48-56
Sacarose	32-38
Glucose	5-6
Frutose	5-7
Pinitol	5-7
Taninos	18-20
Polissacarídeos não amiláceos	18
Cinza	2-3
Lípidos	0,2-0,6

A polpa de alfarroba possui ainda na sua composição compostos fenólicos, porém devido à utilização métodos de extração e devido às diferentes proveniências da alfarroba não há unanimidade entre autores quanto à sua concentração (Avallone *et al.*, 1997; Ayaz *et al.*, 2007; Papagiannopoulos, Wollseifen, Mellenthin, Haber, & Galensa, 2004). Foram realizados vários estudos neste sentido, sendo que Ayaz e a sua equipa determinaram a concentração de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu e chegaram à conclusão que a polpa de alfarroba possui 13 a 19 miligramas (mg) de equivalentes de ácido gálgico (GAE) por g de sólido em peso seco. Outros trabalhos referem uma concentração total de polifenóis de 6,1% (p/p) (Ayaz *et al.*, 2007). O ácido

gálgico assume o papel principal de entre todos os constituintes fenólicos. Foi determinada uma concentração de 174,1 mg de ácido gálgico/kilogramas num estudo onde este constituinte foi quantificado por cromatografia líquida de fase gasosa (HPLC) depois de devidamente extraído da polpa de alfarroba, com água e acetona (Papagiannopoulos *et al.*, 2004). Num outro estudo, onde a extração dos ácidos fenólicos foi realizada com azoto líquido e acetona, são apresentadas concentrações em GAE de 1249,5 mg, 1550,5 mg de ésteres de GAE e 468,3 mg de glicósidos de GAE por kg de peso seco de sólido. Neste mesmo trabalho foram quantificados o ácido siríngico e sinápico (Ayaz *et al.*, 2007). Num estudo de 2004 foram analisadas amostras comerciais de diversos componentes da alfarroba: a LBG, os *kibbles* (pequenos pedaços de polpa de alfarroba que resultam do processo de extração das sementes), polpa de alfarroba (Carobmax®) e um xarope obtido a partir da polpa de alfarroba. A amostra que apresentou maiores resultados foi a polpa de alfarroba e foram determinadas concentrações de 26,3 mg/kg de taninos hidrolisáveis e 14,8 mg/kg de taninos condensados. Para além disso também foi detectada a presença de derivados de quercetina, miricetina e campferol (Papagiannopoulos *et al.*, 2004). Mais recentemente, em 2011, Bernardo-Gil e a sua equipa de trabalho procederam a uma extração supercrítica com CO<sub>2</sub> e identificaram diferentes compostos fenólicos, como é o caso do ácido cumárico, ácido ferúlico, naringenina, ácido cafeico, apigenina, entre outros (Bernardo-Gil *et al.*, 2011).

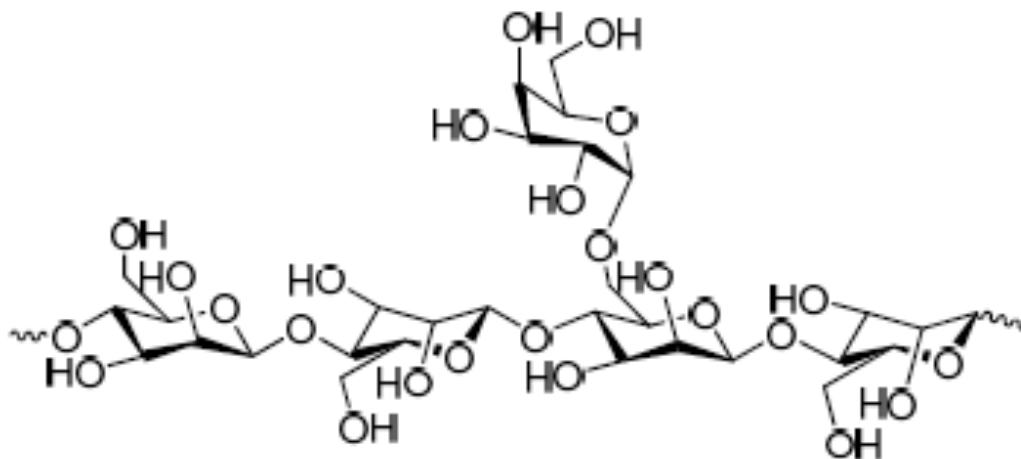
Outro constituinte da polpa de alfarroba é o pinitol, que constitui cerca de 5 a 7% do peso do fruto seco. Este constituinte assume um papel importante na constituição da alfarroba visto que, caso exista uma adulteração na indústria alimentar, o pinitol é utilizado como o principal indicador de uma incorporação de alfarroba (Batlle & Tous, 1997).

### 3. PRODUTOS CONVENCIONAIS PROVENIENTES DA ALFARROBA E SUA VALORIZAÇÃO

#### 3.1 Goma de semente de alfarroba

A goma de semente de alfarroba (em inglês, *locust bean gum* – LBG) é um polímero de origem natural, que tem sido comumente utilizado na indústria farmacêutica e na indústria alimentar (Dey, Sa, & Maiti, 2011). A goma de alfarroba, devido às suas propriedades, como por exemplo capacidade de gelificação e espessamento, é usada como excipiente em múltiplas formulações. A LBG é um polissacarídeo não amiláceo constituído por moléculas de galactose e manose, numa razão de 1:4 (Batlle & Tous, 1997; Dionísio & Grenha, 2012). A goma de semente de alfarroba pertence à classe das galactomananas, que constituem reservas de hidratos de carbono que se encontram facilmente no endosperma das sementes de várias plantas, como por exemplo, *Ceratonia siliqua*, *Cyamopsis tetragonoloba* e *Caesalpinia spinosa* (Dionísio & Grenha, 2012; Mathur & Mathur, 2005).

Quanto à estrutura química, a LBG apresenta-se como sendo um polímero neutro de uma estrutura principal de unidades de D-manose ligadas por ligações  $\beta$ -(1-4) com cadeias laterais de D-galactose ligadas por ligações  $\alpha$ -(1-6) (Beneke, Viljoen, & Hamman, 2009; Mathur & Mathur, 2005). As propriedades físico-químicas das galactomananas são bastante influenciadas pelo conteúdo em galactose e também pela distribuição desta molécula ao longo da cadeia. Assim, a razão entre a molécula de D-galactose e D-manose também varia, e estas oscilações acontecem devido a determinados factores, como por exemplo, o tipo de semente utilizada para a obtenção da goma e igualmente devido às condições de cultivo às quais as plantas são submetidas (Beneke *et al.*, 2009).



**Figura 4** Estrutura molecular da galactomanana (Marianecci *et al.*, 2011).

Apesar das galactomananas serem moléculas hidrofílicas, a sua solubilidade, na maior parte dos casos, encontra-se reduzida e, quando se encontram em solução, os polissacáridos ocupam um volume considerável. Este volume é causado pela conformação estendida da molécula, originando assim soluções com uma viscosidade elevada. Esta viscosidade depende do peso molecular do polímero (Mathur & Mathur, 2005). A viscosidade e a solubilidade deste polímero neutro são pouco afectadas numa escala de pH de 3-11 (Beneke *et al.*, 2009; Yang, Zhou, & Deng, 2003).

A solubilidade da LBG é afectada principalmente pela razão entre as moléculas de manose e de galactose que o constituem. Isto é justificável pela análise destas duas moléculas, uma vez que as moléculas de galactose são mais hidrofílicas e as moléculas de manose são mais hidrofóbicas. Como a molécula de LBG apresenta uma razão de 4:1 de manose relativamente à galactose, considera-se que a LBG apresenta uma solubilidade limitada e tem tendência para formar agregados quando em contacto com água (Picout, Ross-murphy, Jumel, & Harding, 2002; Pollard *et al.*, 2008).

Devido aos factores que fazem variar a constituição da LBG, esta é considerada polidispersa do ponto de vista químico. A polidispersão da LBG é resultante da variação da sua estrutura química, e pode resultar do grau de substituição com galactose, da padronização dos grupos laterais da cadeia de galactose e do comprimento da cadeia ou grau de polimerização (Beneke *et al.*, 2009; Pollard *et al.*, 2008). Considera-se que a LBG é parcialmente solúvel à temperatura ambiente uma vez que, nestas condições se alcança 50% de solubilização. Por outro lado, se a temperatura de solubilização for 80°C conseguem-se percentagens de solubilização entre os 70 e os 85 %, com 30

minutos de agitação. Assim, a temperatura assume um papel fundamental na solubilização (Dakia, Blecker, Robert, Wathélet, & Paquot, 2008; Dionísio & Grenha, 2012). Algumas moléculas de alto peso molecular e as galactomananas com baixo grau de substituição com galactose conseguem ser dissolvidas a temperaturas altas e, pelo contrário, o fenómeno não ocorre a temperaturas baixas. Estes factos suportam a ideia de que a LBG é polidispersa (Dakia *et al.*, 2008; Garcia-Ochoa & Casas, 1992). Com o objectivo de superar problemas relacionados com a solubilidade, vários derivados de carboxilo, hidroxilo e fosfato têm sido adicionados à LBG, sendo que os resultados obtidos trazem melhorias notórias à solubilidade (Garcia-Ochoa & Casas, 1992).

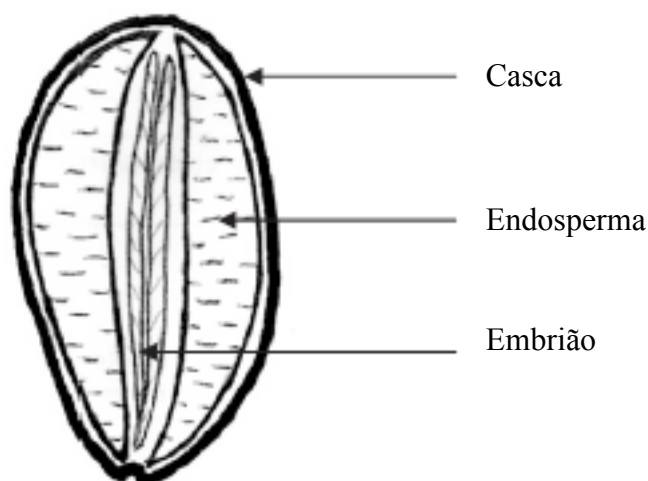
A LBG apresenta um peso molecular situado entre os 50 e os 1000 kDa (Dionísio & Grenha, 2012). Devido ao interesse crescente e à descoberta de novas aplicações industriais desta goma, procedeu-se à investigação e ao desenvolvimento de novas estratégias que permitissem novos e melhores avanços. Assim, uma dessas estratégias centra-se na hidrólise de moléculas de alto peso molecular. A hidrólise ácida e a hidrólise enzimática têm sido muito exploradas; contudo, há uma particularidade da LBG que decide qual o método mais eficaz para esta hidrólise: a LBG, sendo constituída por galactomananas, origina resíduos de manose ligados por ligações de  $\beta$ -(1,4), logo, a enzima  $\beta$ -mananase é a escolha mais evidente e mais explorada (Naganagouda, Salimath, & Mulimani, 2009; Vaheed, Shojaosadati, & Galip, 2011). Esta enzima é extraída e purificada de bactérias e fungos, que demonstraram serem excelentes produtores extracelulares de  $\beta$ -mananase (Naganagouda *et al.*, 2009). Um exemplo desses produtores é o fungo *Aspergillus niger*, que assume um importante papel na produção desta enzima. O fungo é classificado, pela FDA, como sendo um organismo Generally Recognized As Safe (GRAS), o que justifica o facto referido anteriormente (FDA, 2001; Naganagouda *et al.*, 2009).

### 3.1.1 Processo de extração da goma de semente de alfarroba

O processo de extração da LBG tem origem nas sementes de alfarroba que, como já referido anteriormente, representam 10% do peso seco total desta vagem. As sementes são tratadas e processadas industrialmente da seguinte forma: quebra da casca, peneiração e moagem sucessivamente. Estes processos, que preparam as sementes de alfarroba, têm como objectivo principal isolar e moer o endosperma. Este constituinte é

posteriormente recuperado e separado após a quebra da casca e a separação do germe ou embrião, também constituintes da semente. Segue-se a moagem.

A LBG pode ser clarificada ou não. Quando se opta por não clarificar, a goma é embalada e está pronta a ser comercializada. Por outro lado, esta goma pode ser clarificada de forma a obter-se um produto mais puro. Assim, quando se opta pela clarificação, a LBG é submetida a uma dissolução em água quente, seguida de uma filtração onde se descarta a fração insolúvel. Por sua vez, a fração solúvel é submetida a uma precipitação alcoólica, geralmente realizada com etanol ou isopropanol. Depois da precipitação o resíduo é filtrado novamente, seco, moído e, por último, embalado. O produto final desta clarificação é a LBG clarificada (Batal & Hasib, 2013; Kawamura, 2008; Prajapati, Jani, Moradiya, Randeria, & Nagar, 2013).



**Figura 5** Constituintes da semente de alfarroba (Dakia *et al.*, 2007).

Na realização do processo de extração, existem alguns aspectos a ter em conta, nomeadamente, a dificuldade existente em tratar os grãos de alfarroba. Isto acontece pois o tegumento apresenta-se duro, sendo crucial realizar o descasque sem destruição do endosperma e do embrião. Num primeiro método, os grãos são tratados com ácido sulfúrico a determinada temperatura, com a finalidade de hidrolisar o tegumento. Os restantes constituintes são removidos e limpos. Em alternativa à utilização de ácido sulfúrico pode realizar-se uma torragem em forno rotativo, onde o tegumento se destaca

dos restantes constituintes e as metades do endosperma, do qual o embrião já se separou, são resgatadas da casca queimada destes. A principal diferença entre estes dois métodos está relacionada com a cor dos produtos obtidos, visto que com o ácido sulfúrico obtém-se um produto mais claro e mais esbranquiçado e com a torragem o produto obtido apresenta-se mais escuro (Prajapati *et al.*, 2013).

As amostras de LBG usualmente comercializadas têm a seguinte composição: 5-12% de água, 1,7 – 5% cinza solúvel em ácido, 0,4-1% de cinza e 3-7% de proteína. Quando a amostra é a LBG clarificada a sua composição varia, sendo 3-10% de água, 0,1-3% de matéria solúvel em ácido, 0,1%-1% de cinza e 0,1-0,7% de proteína. De todo o processo de extração da LBG pode ainda obter-se produto contaminado com impurezas. As principais impurezas são a casca, o germe, quantidades residuais de etanol ou isopropanol (Prajapati *et al.*, 2013).

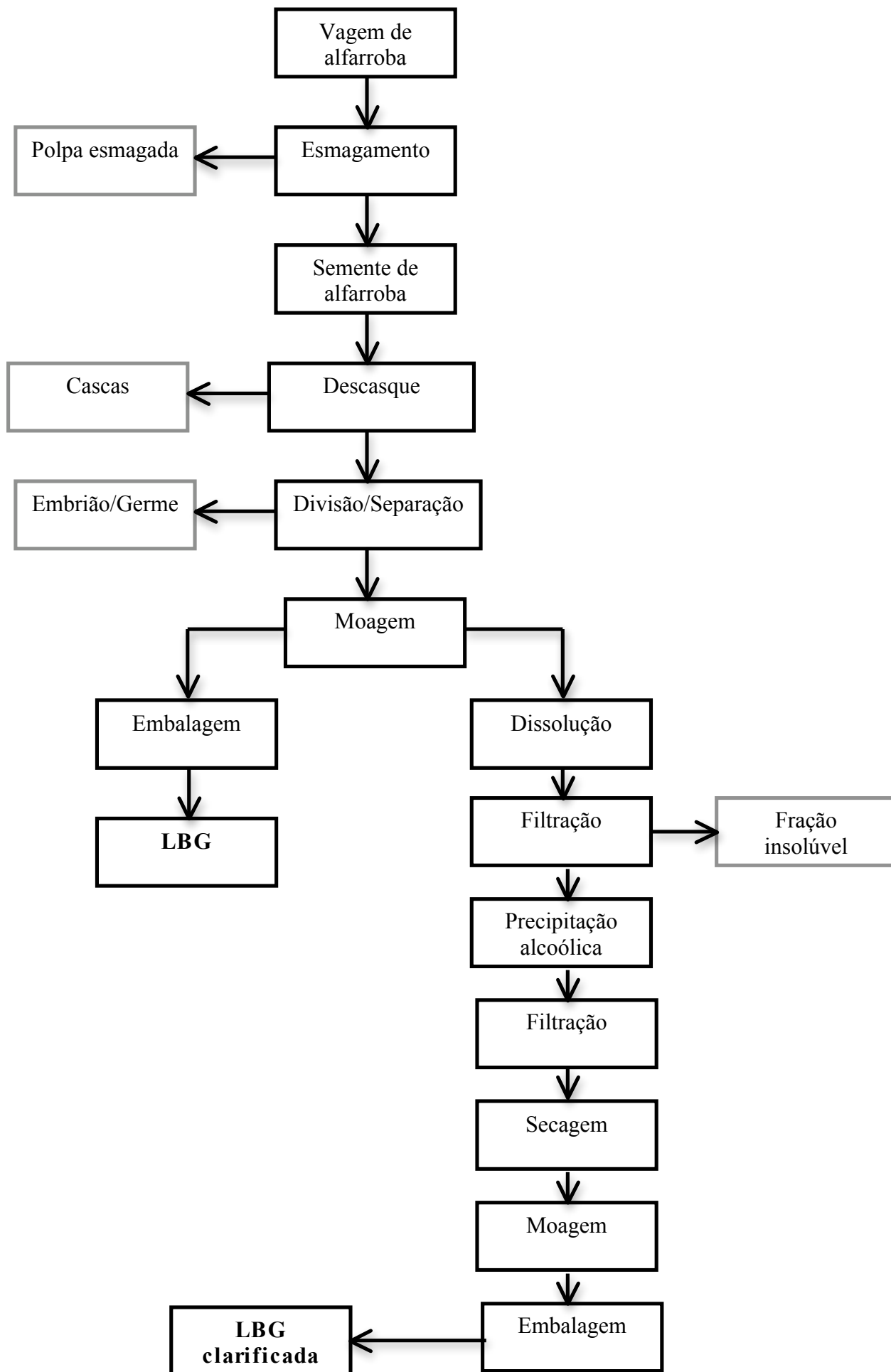


Figura 6 Processo de extração da LBG (Adaptado de Batal & Hasib, 2013; Kawamura, 2008; Prajapati *et al.*, 2013).

### 3.1.2 Aplicações da goma de semente de alfarroba

Ao longo do tempo, têm-se utilizado os polímeros naturais nos avanços tanto na área da cosmética como na indústria alimentar e farmacêutica. Na área farmacêutica, os avanços científicos têm sido centrados no desenvolvimento de sistemas de entrega do fármaco apropriados. Também é de interesse, no desenvolvimento do fármaco, evitar os possíveis efeitos secundários e aumentar a eficácia terapêutica. Atualmente, o número de formulações existentes para distribuição do fármaco é numeroso e diversificado. Temos, por exemplo, sistemas matriz, implantes, micropartículas, nanopartículas, filmes, sistemas injetáveis, entre outros. A função que os polímeros naturais podem assumir nos sistemas de entrega de fármacos vai estar dependente da formulação farmacêutica. Exemplo dessas funções são a função de ligante, formadores de matriz, espessantes, viscosantes, emulsionantes, gelificantes, bioadesivos (Beneke *et al.*, 2009; Dionísio & Grenha, 2012). A LBG demonstra ser uma goma com várias possibilidades de aplicação e mais-valias no que respeita à distribuição de fármacos e ao desenvolvimento de sistemas com essa função (Prajapati *et al.*, 2013).

Ao nível da indústria farmacêutica, o sistema de libertação controlada numa formulação farmacêutica oral é e continua a ser o sistema mais comum e o mais popular face a outros sistemas de distribuição de fármacos. Nas formulações de libertação prolongada, a LBG assume um papel muito importante na libertação do fármaco da matriz, uma vez que, os polissacarídeos que a constituem apresentam capacidade de inchamento e de libertação do fármaco de forma faseada (Naganagouda *et al.*, 2009). O primeiro registo da utilização da LBG na formulação de um comprimido como excipiente data de 1998, Sujja-areevath e a sua equipa (1998) revelaram que na produção de diclofenac de sódio as mini-matrizes continham 49,5% de LBG (Prajapati *et al.*, 2013). A LBG também foi utilizada no fabrico de um comprimido que possui uma matriz de goma de alfarroba, em que esta incorpora teofilina e mioglobina. Este comprimido foi melhorado com glutaraldeído reticulado na tentativa de a rede assumir um potencial maior para uma libertação prolongada eficaz. Este efeito não foi observado, visto que a taxa de libertação foi semelhante na presença ou ausência do glutaraldeído (80% em 8 horas). Contudo, este facto pode ser justificado pelo número baixo de cadeias laterais e também pelas diminutas ligações cruzadas, que não foram suficientes para efetivar o mecanismo de libertação do fármaco (Coviello, Alhaique, Dorigo, Matricardi, & Grassi, 2007). Mais recentemente, mas assumindo uma função diferente, a LBG tem vindo a ser desenvolvida como agente super-desintegrante, numa

apresentação de comprimidos orodispersíveis de nimesulida. A incorporação de 10% de LBG na formulação resultou num tempo de desintegração de 13 segundos, no entanto não chegou a ser utilizada na formulação final (Dionísio & Grenha, 2012). Outra formulação é o Eudragit®, composto por microesferas utilizadas para preparar comprimidos orodispersíveis de ofloxacina incorporando a LBG. O tempo de desintegração que foi observado variou entre 12 e 20 segundos, aumentando com o aumento da concentração de goma de alfarroba (Malik, Arora, & Singh, 2011). Antes de ser usado na formulação TIMERx® foi usado em conjunto com a goma dexantano, no entanto esta combinação não teve associação de nenhum fármaco. Neste caso, a LBG funcionou como impulsionador no desenvolvimento do sistema TIMERx® que demonstrou ter potencial de libertação controlada, *in vitro* e *in vivo*. O produto encontra-se comercializado atualmente. Concluindo-se assim, que a combinação de LBG com outros polissacarídeos, como por exemplo o xantano ou a goma de caraia, são associações benéficas (Dionísio & Grenha, 2012). Apesar de ser nos comprimidos que existe um maior desenvolvimento e utilização da LBG, outros avanços foram desenvolvidos noutras formas farmacêuticas, como é o caso das dispersões coloidais. Um exemplo disso é a dispersão de LBG e lovastatina. Este tipo de associação foi realizadas com o objectivo de aumentar a solubilidade do fármaco. Assim, a LBG é submetida a um tratamento térmico que faz diminuir a sua viscosidade e assim, não é afectada a sua capacidade de inchamento. Este tratamento térmico permitiu um aumento de solubilidade do princípio ativo, sendo que com LBG não tratada termicamente é de 53%, contra 65% de solubilidade com LBG clarificada. Ao analisarmos os valores obtidos, estes podem ser considerados favoráveis, visto que, a lovastatina por si só tem uma solubilidade de apenas 35% (Patel, Tekade, Gattani, & Surana, 2008). Para além das dispersões coloidais, a LBG também foi utilizada na preparação de hidrogéis, em conjunto com a goma de xantano. Estes dois polissacarídeos foram utilizados em conjunto com o objetivo de controlar a libertação de prednisolona. Verificou-se um aumento da concentração de goma resultou na diminuição da taxa de libertação do fármaco, apontando para que a difusão do fármaco seria essencialmente controlada pela densidade da rede tridimensional da matriz (Dionísio & Grenha, 2012).

Quando falamos de fármacos cuja distribuição do fármaco deva ser realizada na cavidade bucal, estes apresentam duas vantagens que se destacam: permitem evitar a eliminação pré-sistémica no trato gastro-intestinal (TGI) e evitar o efeito de primeira passagem hepática. Logo, a distribuição local de fármaco tenciona melhorar a

biodisponibilidade dos que são pouco absorvidos no TGI, procurando assim, ultrapassar este problema (Mujoriya, Dhamande, Washkhede, & Angure, 2011). Para um sistema de administração oral funcionar um dos aspectos mais importantes a ter em conta, tem a ver com a capacidade de adesão à mucosa. Para que a adesão aconteça e se verifique ação terapêutica, tornou-se frequente a utilização de polímeros. E mais uma vez, a LBG tem sido documentada e apresenta-se como sendo um polímero com perfil para ser um forte mucoadesivo (Sudhakar & Kuotsu, 2006). No seguimento desta vantagem que os polissacarídeos apresentam, comprimidos que contêm LBG ou uma mistura de LBG/goma de xantano na constituição matricial foram produzidos com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade do princípio ativo, metoprolol. A utilização desta associação vai evitar um grande efeito de primeira passagem do fármaco. Experimentalmente, a formulação contendo apenas LBG resultou na libertação progressiva do fármaco; onde 7,5% de polímero dá origem a uma libertação de 98% em 45 minutos. Contudo, a associação LBG/goma de xantano revelou ser mais eficaz para este tipo de formulação, considerando a integridade física, a dureza e a mucoadesão apresentadas. Os comprimidos com LBG/goma de xantano, na proporção 2:1, demonstraram a libertação completa do fármaco em 45 minutos, mas pouca permeabilidade. Esta limitação pode ser superada com lauril sulfato de sódio 1%, que se traduz num aumento da permeabilidade do fármaco pelos poros da mucosa (Yamagar, Kadam, & Hirlekar, 2010).

A LBG é utilizada também na formulação de fármacos em que a distribuição é realizada no cólon, visto que este é conhecido por conter quantidades consideráveis de polissacáridos. Para além disso, o cólon é uma região colonizada por um grande número de bactérias e, conseqüentemente, há a produção de muitas enzimas. A utilização deste tipo de distribuição é proporcionar um efeito terapêutico local, útil em doenças específicas como a doença inflamatória do cólon. No entanto, este tipo de distribuição é utilizada também para um efeito terapêutico sistémico, principalmente no caso dos fármacos cuja absorção se revela insuficiente no TGI superior. A degradação da LBG é assegurada no cólon, que possui, entre outras, a enzima  $\beta$ -mananase (Dionísio & Grenha, 2012; Jain, Gupta, & Jain, 2007). O primeiro estudo em que a LBG foi utilizada para ser distribuída no cólon, teve como base utilização de películas desta como material de revestimento em comprimidos de teofilina. Os filmes de LBG utilizados evidenciaram uma elevada capacidade de inchar (300-500%) que potencializava a entrega do fármaco no cólon, local onde a degradação acontecia. Este

estudo não se revelou muito promissor, visto que foi detectada instabilidade mecânica nos filmes de LBG (Hirsch, Binder, Schehlmann, Kolter, & Bauer, 1999). Outro estudo realizado por Raghavan e a sua equipa, em 2002, investigou o potencial de uma mistura de LBG/quitosano com o objectivo de ser utilizado como material de revestimento. Através deste revestimento, consegue-se uma protecção do ambiente fisiológico do estômago e do intestino delgado mas que não evita uma degradação por enzimas bacterianas existentes no cólon e, assim, permite a libertação do fármaco. Foram testadas e aplicadas várias proporções no comprimido de messalazina, sendo que a proporção 4:1 demonstrou melhores resultados, com uma libertação de fármaco de cerca de 98% após 26 horas de incubação. Este sistema de libertação foi também realizado *in vivo*, e revelou que a libertação do fármaco era iniciada após 5 horas, o que corresponde ao tempo de trânsito intestinal médio (Raghavan, Muthulingam, Jenita, & Ravi, 2002).

Quanto à aplicação da LBG na distribuição de fármaco no sistema ocular, foi investigada uma formulação que consistia em micropartículas de LBG/i-carragenano com gentamicina encapsulada, preparadas por emulsificação. Posteriormente, estas eram incorporadas num gel de álcool polivinílico que era aplicado na superfície ocular. Os resultados revelaram uma diminuição de 50% do tempo de desintegração com a adição de 10% de LBG, sendo que a formulação sem LBG revelava um tempo de desintegração de 6 horas. Apesar dos resultados satisfatórios, não foram feitas mais investigações nem são conhecidos mais desenvolvimentos neste tipo de sistema (Dionísio & Grenha, 2012; Prajapati *et al.*, 2013).

Foram igualmente investigadas formulações para a aplicação tópica usando LBG. A formulação consistia num hidrogel com LBG/goma de xantano numa proporção 1:1 com o objectivo de incorporar niossomas. Os niossomas são vesículas de surfactante não-iónico, que oferecem maior estabilidade química e maior disponibilidade face aos lipossomas convencionais. Nestes niossomas foram incorporados vários fármacos, incluindo calceína, ibuprofeno e cafeína. A incorporação dos niossomas no hidrogel permitiu um efeito protetor sobre a integridade das vesículas e uma libertação lenta do fármaco através do sistema polissacárido (Coviello *et al.*, 2007; Dionísio & Grenha, 2012; Marianecchi *et al.*, 2011; Prajapati *et al.*, 2013).

De um modo geral e do ponto de vista da distribuição de fármacos, a LBG apresenta-se como sendo uma boa escolha. Isto acontece devido a determinadas características que este produto tem, nomeadamente:

- É biocompatível, bioabsorvível e biodegradável na natureza;
- Não é teratogénico ou mutagénico (de acordo com a Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives realizada em Genebra, Abril 1975);
- Tem um tempo de prateleira aceitável;
- Os produtos provenientes da sua degradação são rapidamente excretados (Dey *et al.*, 2011).

A LBG foi deste muito cedo explorada em todas as suas potencialidades. Está descrita e foi referida pela primeira vez em 1983 como tendo um efeito hipocolesterolémico, isto é, diminui o colesterol das LDL devido ao seu alto teor em fibras insolúveis (Zavoral *et al.*, 1983). Este facto foi posteriormente confirmado e demonstraram-se os efeitos da LBG no controlo da hipercolesterolemia (Zunft *et al.*, 2003). Ainda assim, também foi demonstrado que, apesar de não ser tão eficaz como outras galactomananas, a LBG pode reduzir a taxa de colesterol (Evans, Hood, Oakenfull, & Sidhu, 1992). A inclusão de LBG em produtos alimentares é frequente, visto que existe uma elevada capacidade de gelificação inerente, e como esta goma não é assimilada pelo TGI, a sua ingestão provoca uma sensação de saciedade e uma redução na absorção de nutrientes (Dakia, Wathélet, & Paquot, 2007). Existe atualmente no mercado a LBG em cápsulas que são utilizadas para a diminuição do apetite – Arkopharma Arkocápsulas® de goma de alfarroba (Dionísio & Grenha, 2012).



**Figura 7** Arkocápsulas® de goma de alfarroba. (Arkocápsulas, 2011).

Outro campo de biotecnológica do LBG é a engenharia de tecidos. A engenharia de tecidos fornece a combinação de células, biomateriais não celulares, fármacos, genes que podem ser concebidos, especificados, fabricados e administrados simultaneamente ou sequencialmente como agentes terapêuticos. Uma dessas aplicações é suportes de tecido, que são matrizes tridimensionais conectados por poros com porosidade elevada que são utilizados como tecidos de semeadura, reconstrução, reparação ou remodelação. Este tipo de tecidos podem ser naturais ou sintéticos, e ser classificados em implantes permanentes ou temporários. Os permanentes mantêm a sua forma e resistência durante o processo de regeneração/reparação do órgão; os temporários vão-se degradando ao longo do tempo de regeneração/reparação. Os polissacáridos com galactose são utilizados como suportes de tecido e a LBG é utilizada na preparação destes (Prajapati *et al.*, 2013).

### 3.2 Xarope de polpa de alfarroba

A polpa de alfarroba é o maior constituinte do fruto da alfarrobeira e tem na sua composição uma forte componente em açúcares. Como já foi referido anteriormente, cerca de 48 a 56% da polpa de alfarroba é constituída por açúcares solúveis, nomeadamente sacarose, glucose e frutose. Este elevado teor em açúcares confere-lhe um elevado potencial de valorização. A polpa de alfarroba é considerada atualmente, um sub-produto do aproveitamento da semente de alfarroba. Ela é muito utilizada como alimento para animais, como por exemplo para cavalos, devido ao seu elevado valor calórico (Batlle & Tous, 1997). Devido à sua composição tão elevada em açúcares suscitou na comunidade que se debruça sobre o tema um interesse crescente de aproveitamento e inovação. Ao nível industrial encontraram-se formas de extrair os açúcares que constituem a polpa de alfarroba para a obtenção de xaropes e a preparação de meios fermentativos, permitindo a produção de ácidos orgânicos, como por exemplo ácido butírico, e também a produção de biocombustíveis, como o bioetanol. (Ayaz *et al.*, 2007).

#### 3.2.1 Processo de extração dos açúcares da polpa de alfarroba

O processo de extração dos açúcares de alfarroba começa com uma etapa preliminar, à qual podemos chamar de limpeza da alfarroba. Normalmente, quando a alfarroba chega do campo de cultivo vem acompanhada por um conjunto de elementos estranhos, que não interessam para o processo de extração ter continuidade. Assim, esta etapa consiste na separação mecânica e na limpeza do fruto com água, seguida de secagem. O objectivo desta operação é a obtenção de um produto que esteja higienicamente limpo para seguir para a próxima fase. Na segunda etapa deste processo a alfarroba é passada através de um moinho de martelo, que aproveita o facto da vagem de alfarroba apresentar uma fragilidade superior em relação à semente. Dentro do moinho, a alfarroba é esmagada e passa por uma rede de diâmetro entre os 12 a 20 milímetros (mm) (Diaz, 1997). Depois desta passagem obtém-se uma matéria-prima que está pronta a ser utilizada por exemplo para a alimentação. Esta fase é chamada de corte. Seguidamente, a matéria-prima obtida na fase anterior passa por um separador de peneira que separa os restos de semente da polpa e cujo objectivo é obter grânulos inferiores a 10 mm. A granulometria óptima é de cerca de 5/6 mm. A etapa que se segue é a extração dos açúcares. Este processo pressupõe a imersão da matéria-prima

resultante da etapa anterior já seca e fragmentada, num volume de água determinado, a uma dada temperatura e valor de pH, durante um período de tempo já determinado. Quando se acaba a etapa de extração, a polpa de alfarroba tem um elevado conteúdo em água e por esta razão, é necessário proceder-se a uma prensagem com o propósito de remoção da água. Esta água é utilizada na etapa de extração, permitindo assim uma poupança e rentabilização deste processo. A fração resultante da prensagem é adicionada à fração solúvel. Seguidamente, procede-se a uma filtração para eliminar possíveis partículas que ainda existam em suspensão e desta forma é conseguido o extrato aquoso. Este extrato aquoso é caracterizado por uma coloração escura, normalmente castanha, com odor enjoativo e com sabor doce e amargo. Doce devido à presença dos açúcares e amargo devido à presença dos compostos fenólicos. Para obtenção de um produto com a maior pureza possível em termos de açúcares, procede-se a uma descalcificação em que são removidos cálcio e magnésio de forma a prevenir possíveis problemas que possam surgir em fases posteriores do processamento (Diaz, 1997). As etapas seguintes são mais uma filtração e uma evaporação, etapas estas que antecedem a purificação cromatográfica. Esta cromatografia é realizada com resinas catiónicas e posteriormente realiza-se uma desmineralização e uma descoloração do extrato aquoso por cromatografia de troca iónica (Biner *et al.*, 2007; Diaz, 1997). O processo de extração dos açúcares da polpa de alfarroba está sucintamente na figura 8.

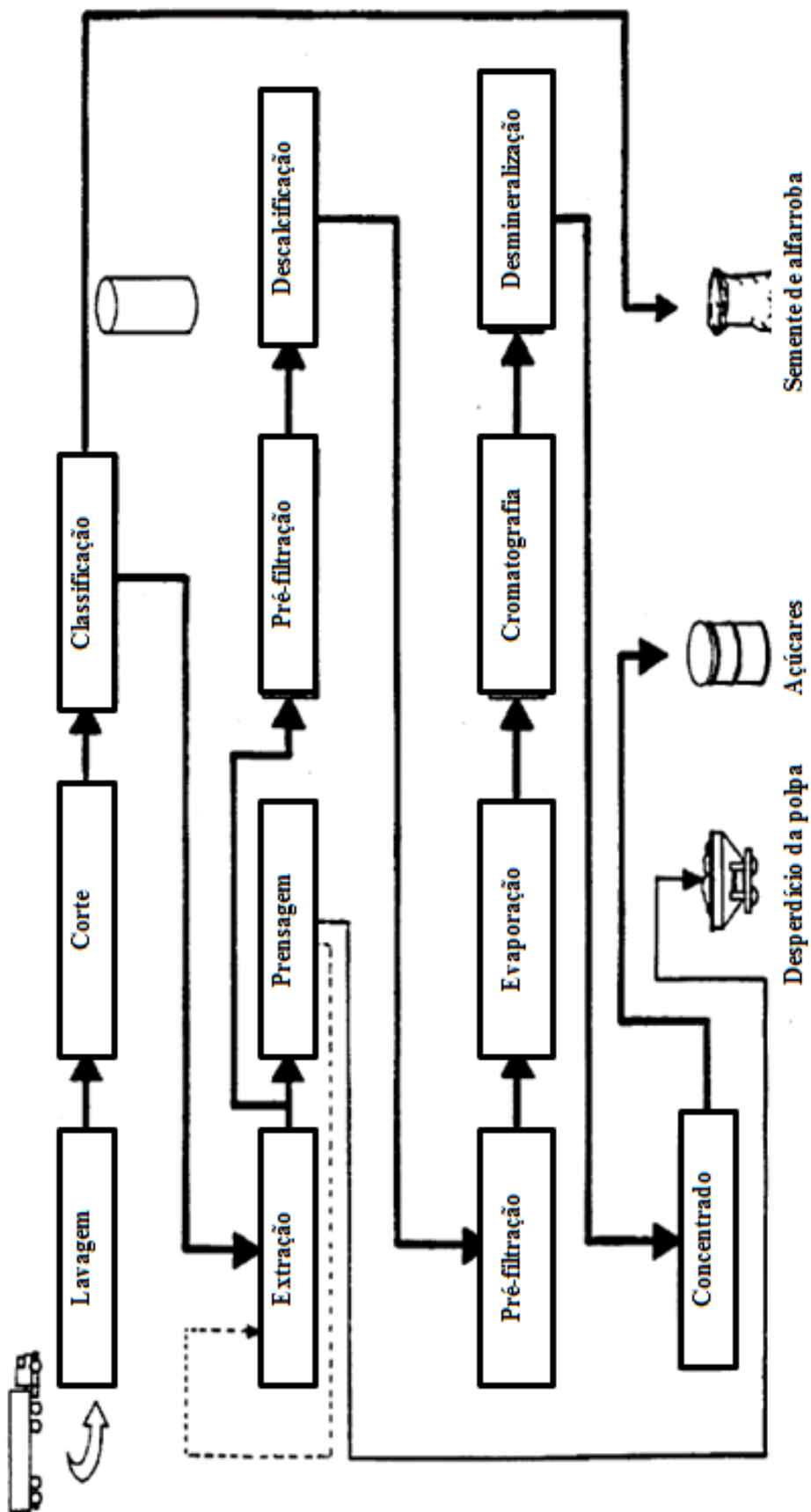


Figura 8 Principais etapas do processo de extração do xarope de alfarroba (Diaz, 1997).

Todos estes processos que tentam purificar o mais possível o extrato aquoso, apesar disso, não permitem que este produto seja comercializado como açúcar natural. Quando o objectivo é a utilização dos açúcares na indústria alimentar opta-se por não realizar a purificação cromatográfica mas sim por se fazerem ajustes no tempo e na temperatura de evaporação para promover, ou não, uma caramelização dos açúcares sempre de acordo com aquilo que se pretende (Cordero, 2008; Diaz, 1997).

Um xarope obtido pela extração dos açúcares naturais da polpa de alfarroba deve apresentar ausência de cor, cheiro e sabor. A sua composição deve ser aproximadamente a que se apresenta na tabela 3 (Diaz, 1997):

**Tabela 3** Exemplo da composição de um xarope obtido pela extração de polpa de alfarroba (Adaptado de Diaz, 1997).

<b>Constituinte</b>	<b>Percentagem (%)</b>
Sacarose	55-75
Frutose	7-15
Glucose	7-16
Outros açúcares	0,5-3
Pinitol	4-14
Impurezas orgânicas e inorgânicas	0,5-2

### 3.2.2 Aplicações do xarope de polpa de alfarroba

Como foi referido anteriormente, pode optar por se fazer a caramelização ou não dos açúcares. Caso se faça essa caramelização, o produto que se obtém no final pode ser submetido a uma fase liquefeita com aporte de água que varia em função do produto e pretendido, que possui sabor doce e textura de mel. Consoante a saída de mercado podemos ter: licor de alfarroba, xarope de alfarroba, mel de alfarroba e caramelo líquido de alfarroba. Se, após a caramelização, o produto for submetido a uma fase de secagem com o objectivo de eliminar a água, obtém-se um produto com grau de humidade a cerca de 5%. Este produto apresenta várias vantagens, entre as quais fácil utilização, conservação e transporte e, para além disso, como a percentagem de água é baixa o risco de contaminação microbiológica é também menor. O produto final pode apresentar-se de várias formas: granulado de xarope de alfarroba, xarope de alfarroba

em pó, xarope de alfarroba liofilizado, comprimidos de xarope de alfarroba. Estes produtos estão prontos a utilizar, isto é, para a sua reconstituição basta ser adicionada a quantidade de água desejada ao produto (Cordero, 2008).

Sendo assim, o xarope obtido através da extração dos açúcares da polpa de alfarroba pode ser utilizado tanto pela indústria farmacêutica mas, principalmente, pela indústria alimentar. As suas utilizações mais comuns são para a preparação de (Cordero, 2008):

- Creme de avelã e alfarroba (50% de pralina de avelã e 50% de xarope de alfarroba);
- Creme de amêndoa e alfarroba (50% de pralina de amêndoa e 50% de xarope de alfarroba);
- Torrão de alfarroba e amêndoas (pasta de amêndoa e alfarroba);
- Bebida energética de alfarroba (bebida de alfarroba com sumo de laranja e sumo de limão);
- Batido de alfarroba (alfarroba e leite);
- Creme de leite e alfarroba;
- Refresco de alfarroba;
- Licor de alfarroba;
- Caramelos de alfarroba;
- Aguardente de alfarroba;
- Iogurte de alfarroba;
- Barritas energéticas de alfarroba;
- Alfarroba liofilizada (em pó);
- Doce de alfarroba;
- Sumo de alfarroba;
- Orchata de alfarroba e amêndoas;
- Manteiga de alfarroba;
- Café de alfarroba;
- Molho de alfarroba;
- Xarope de alfarroba em pó;
- Xarope de alfarroba granulado;
- Xarope de alfarroba liofilizado;
- Xarope de alfarroba em comprimido.

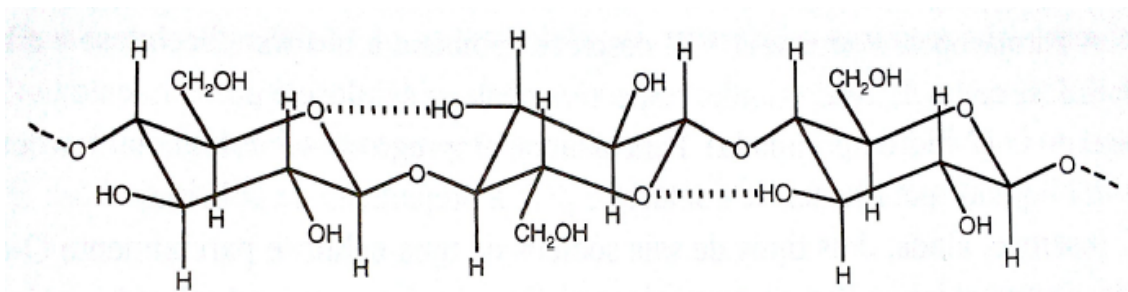
Como se pode verificar, através da extração dos açúcares da polpa de alfarroba são obtidos produtos que podem ser utilizados das mais variadas maneiras, seja em termos da indústria farmacêutica como na indústria alimentar, passando até por produtos destinados à alimentação quotidiana. Por exemplo, é utilizado como aditivo do café ou como seu substituto devido ao elevado teor em açúcar.

### 3.3 Fibra de polpa de alfarroba e compostos fenólicos

A polpa de alfarroba possui na sua constituição química grandes concentrações de fibras e polifenóis (Batlle & Tous, 1997; Zunft *et al.*, 2003). As fibras, tendo em conta a sua solubilidade em água, podem ser de dois tipos: fibras solúveis e fibras insolúveis (Gruendel *et al.*, 2006). As fibras solúveis, como por exemplo, o amido, a inulina e a pectina, aparecem em menor quantidade na polpa de alfarroba. Pelo contrário, as fibras insolúveis encontram-se em maiores quantidades e a polpa de alfarroba contém cerca de 18% de celulose e hemiceluloses (Batlle & Tous, 1997).

A celulose é um polímero linear constituído por unidades de D-glucose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) e é um constituinte da parede celular das plantas superiores. As suas propriedades principais são:

- Insolubilidade nos solventes orgânicos;
- Não cora pelo iodo;
- É solúvel no reagente cupro-amoniacal de Schweizer (Cunha, Batista, & Roque, 2010, p.152).



**Figura 9** Estrutura química da celulose (Cunha & Roque, 2010a).

A definição de compostos fenólicos diz-nos que, os compostos fenólicos são: “todos aqueles que não sendo azotados têm um ciclo ou ciclos aromáticos e são principalmente derivados do metabolismo do ácido siquímico e/ou de um poliacetato” (Cunha & Roque, 2010a, p. 212).

Os compostos fenólicos encontram-se presentes num leque muito variado de diversas espécies vegetais e também se encontram presentes em grande parte dos alimentos. Tal como a uva, a alcachofra e o alecrim, também a polpa de alfarroba revela uma grande presença de compostos fenólicos na sua constituição (Avallone *et al.*, 1997;

Cunha & Roque, 2010c; Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004; Owen *et al.*, 2003). São compostos que se caracterizam por darem coloração aos tecidos vegetais, devido a respostas a reações químicas ou a agressões por agentes patogénicos, e assim, expressam-se na forma de pigmentos (Cunha & Roque, 2010c; Manach *et al.*, 2004). Os compostos fenólicos representam um vasto grupo de compostos pois, como já foi referido anteriormente, agrupam todos os compostos não azotados com um ou mais ciclos aromáticos e que derivam de duas vias metabólicas – a via do ácido siquímico e a via do acetato. No geral, os compostos fenólicos possuem pelo menos um núcleo benzénico ligado a um ou mais grupos hidroxilos. Estes grupos podem apresentar-se livres ou conjugados sob a forma de ésteres ou heterósidos (Cunha & Roque, 2010b). Devido à acidez do hidroxilo fenólico, os compostos fenólicos são caracterizados pela sua reactividade, esta reactividade vai possibilitar a formação de novas moléculas, tanto pela união oxidativa, assim como pela facilidade de oxidação do núcleo aromático (Cunha & Roque, 2010b).

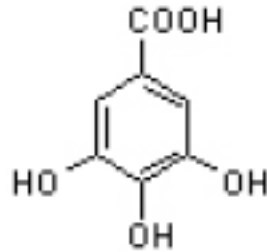
Quanto à classificação dos compostos fenólicos, estes podem ser classificados tendo em conta o número de átomos de carbono e as ligações químicas estabelecidas. Esta classificação agrupa os compostos fenólicos por famílias. As principais famílias de compostos fenólicos são: flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos, linhanos e taninos (Manach *et al.*, 2004).

**Tabela 4** Classificação dos compostos fenólicos (Lima, 2012a; Manach *et al.*, 2004).

<b>Família</b>	<b>Sub-família</b>	<b>Exemplos</b>
<b>Flavonóides</b>	Flavonóis	Quercetina, Campferol, Miricetina, Delfinidina, Cianidina
	Catequinas	(+)-catequina, Epicatequina, Galhocatequina, Epigalhocatequina
	Antocianinas	Cianidina-3-glucósido, Peonidina-3-glucósido, Malvidina-3-glucósido
	Flavanonas	Herperidina, Liquiritigenina, Naringenina
	Flavonas	Apigenina, Luteolina
	Isoflavonóides	Daidzeína, Genisteína
<b>Ácidos Fenólicos</b>		Ácido Vinílico, Ácido Gálico, Ácido Siríngico, Ácido Salicílico, Ácido Cafeico, Ácido Ferúlico
<b>Estilbenos</b>		Pinosilvina, Resveratol, Hidroxiresveratol
<b>Linhanos</b>		Matairesinol
<b>Taninos</b>	Hidrolisáveis	Ácido Tânico, Geranina, Casuarinina
	Condensados	Propelargonidina, Procianidina, Prodilfinidina

Os taninos são constituídos por um conjunto de monómeros. Os taninos possuem um elevado peso molecular e características como a capacidade de se ligarem e precipitarem proteínas e a capacidade de reagir com outros polímeros. Os taninos podem ser distinguidos como dois grupos de taninos diferentes: os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados (Crozier, Clifford, & Ashihara, 2006; Cunha & Batista, 2010). Os taninos hidrolisáveis são resultado da esterificação de um poliol alifático, quase sempre glucose, por um ácido fenólico. Dentro do grupo dos taninos hidrolisáveis temos dois sub-grupos: os galhotaninos (constituídos pelo ácido gálico) e os elagitaninos (constituídos pelo ácido hexa-hidroxidifênico (HHDF)). Os elagitaninos também podem ser constituídos por desidro-hexa-hidroxidifênico (DHHDF), um produto que resulta da oxidação do HHDF. Um exemplo de um elagitanino é a casuarinina (Cunha & Batista,

2010; Lima, 2012b). Os taninos condensados, também podem ser designados proantocianidinas, são oligómeros ou polímeros de catequinas monoméricas e de leucoantocianidinas. Como exemplos deste tipo de taninos temos, por exemplo, a propelargonodona, procianidina e a prodelfinidina (Cunha & Batista, 2010).



**Figura 10** Unidades fenólicas mais frequentes na estrutura dos taninos hidrolisáveis (Cunha & Batista, 2010).

### 3.3.1 Processo de extração dos compostos fenólicos

O processo de extração dos compostos fenólicos revela alguma complexidade, visto que a maioria dos compostos não se encontra na sua forma livre. Para que se consiga o isolamento de determinado composto é necessária a quebra de ligações pré-existentes, logo, para que isto aconteça, pode ser necessário a realização de tratamento térmico, hidrólise ácida, hidrólise alcalina ou hidrólise enzimática. Na hidrólise ácida e alcalina são utilizados, normalmente o ácido clorídrico e o hidróxido de sódio e na hidrólise enzimática são utilizados enzimas específicas para o tipo de ligação que se pretende quebrar (Cunha & Batista, 2010; Cunha & Roque, 2010a; Lima, 2012b). Para se obter uma eficiência máxima no processo de extração, o sistema de solventes de extração deve ter a polaridade semelhante ao composto que se pretende extrair. Assim, os compostos fenólicos apresentam-se maioritariamente na forma de conjugados com polissacarídeos, que são sobretudo solúveis em solventes aquosos/alcoólicos. Os compostos fenólicos na forma não conjugada, por sua vez, têm mais afinidade para solventes orgânicos (Cunha & Roque, 2010b; Hajaji *et al.*, 2010). Têm sido descritos vários sistemas de extração e existem vários factores a considerar no processo de extração. De um modo geral, os sistemas de extração podem ser compostos por um só solvente ou por uma mistura de solventes. Solventes como o metanol, etanol e acetona assumem o papel de solventes mais comuns e utilizados na extração dos compostos fenólicos (Avallone *et al.*, 1997; Bonoli, Verardo, Marconi, & Caboni, 2004; Kumazawa *et al.*, 2002; Makris & Kefalas, 2004). No entanto, também foi descrita a utilização de outros solventes, como por exemplo água, acetato de etilo ou diclorometano (Hajaji *et al.*, 2010; Makris & Kefalas, 2004). Foi ainda relatada a utilização de acetonitrilo não só para a extração mas também como estabilizador da solução extratada (Makris & Kefalas, 2004). Factores como a concentração do solvente, a temperatura, a granulometria do sólido a ser extratado, a duração do processo e a secagem devem ser tidos em conta porque os polifenóis são susceptíveis de sofrer alterações. A concentração que se traduziu em resultados mais eficientes foi a solução aquosa de metanol a 80% proposta por Makris e Kefalas (Bonoli *et al.*, 2004; Makris & Kefalas, 2004). Num estudo realizado em 1964, Henis e sua equipa, em 1964, realizaram um processo de extração com água e concluíram que, quanto maior a temperatura, maior será a eficiência da extração. Em relação à duração do processo, os autores concluíram que a extração era superior com uma duração de 40 minutos (Henis, Tagari & Volcani, 1964). Quanto à granulometria, já foram realizados processos de

extração em que a polpa de alfarroba se apresentava na forma de farinha ou na forma de *kibbles* (pequenos pedaços fragmentados de polpa) (Hajaji *et al.*, 2010; Kumazawa *et al.*, 2002; Makris & Kefalas, 2004). Têm sido realizados vários estudos no sentido de tentar otimizar cada vez mais os parâmetros que influenciam a extração de polifenóis. Em 2013, Roseiro e seus colaboradores (Roseiro, Tavares, Roseiro, & Rauter, 2013) realizaram uma extração por decocção de *kibbles* com carbonato de cálcio, em tempos de extração entre 8 e 20 minutos e temperaturas entre os 80 e os 100°C. Os valores ótimos desta experiência foram obtidos para uma temperatura de 98,5°C durante 17 minutos (Roseiro *et al.*, 2013). Um sistema de extração de compostos fenólicos alternativo consiste na adsorção destes compostos a uma superfície, podendo esta superfície ser barro poroso ou até mesmo carvão ativado. Este sistema de extração só pode ser utilizado no caso de amostras aquosas, o que constitui uma desvantagem deste método (Arellano-Cárdenas, Gallardo-Velázquez, Osorio-Revilla, López-Cortéz, & Gómez-Perea, 2005; Tancredi *et al.*, 2004).

### 3.3.2 Aplicações da fibra de polpa de alfarroba e dos compostos fenólicos

Tanto as fibras como os compostos fenólicos presentes na polpa de alfarroba apresentam determinadas características e propriedades que tornam a polpa de alfarroba uma mais-valia para a saúde do ser humano.

A hipercolesterolemia contribui para um elevado risco associado à doença cardiovascular. Para tentar controlar este aumento descontrolado dos valores de colesterol recomenda-se, numa primeira fase, a mudança de hábitos alimentares, uma vez que o consumo de alimentos com determinadas propriedades pode trazer benefícios para a saúde. Pensa-se que a introdução de fibras, especialmente insolúveis, tenha efeitos benéficos na saúde humana (Gruendel *et al.*, 2006; Gruendel, Otto, *et al.*, 2007). Ao longo do tempo, foram realizados vários estudos para perceber qual a relação que existe entre o consumo destas fibras e o efeito nos valores de colesterol. Como a polpa de alfarroba contém concentrações elevadas de fibras e de polifenóis, têm sido realizados alguns estudos para perceber se a polpa de alfarroba representa um benefício para o ser humano e se deve ser introduzida na dieta habitual (Gruendel, Garcia, *et al.*, 2007; Zunft *et al.*, 2003). Num estudo realizado por Zunft e seus colaboradores (Zunft *et al.*, 2003), foram investigados os efeitos da introdução na alimentação de uma preparação de polpa de alfarroba rica em fibra insolúvel sobre o colesterol no sangue. Este ensaio clínico consistiu numa intervenção de seis semanas em 58 voluntários. Nesse mesmo estudo concluiu-se que o consumo de fibra de polpa de alfarroba reduziu os níveis de colesterol total e do colesterol LDL; o rácio LDL:HDL diminuiu no grupo que consumiu fibra de polpa de alfarroba e foi inferior ao grupo de controlo. Também se observou uma redução mais pronunciada dos valores de colesterol nas mulheres do que nos indivíduos do sexo masculino. Pensa-se que o mecanismo de diminuição do colesterol no sangue é da responsabilidade da fibra solúvel: esta terá influência na solubilização dos lípidos, adsorvendo os ácidos biliares, e assim diminuindo as concentrações de colesterol (Zunft *et al.*, 2003). Em 2006 Gruendel e a sua equipa (Gruendel *et al.*, 2006) fizeram um estudo em que o objectivo final era a avaliação pós-prandial dos níveis lipídicos e de triglicéridos (TG) plasmáticos, e os níveis de ácidos gordos não esterificados (NEFA) após a ingestão de fibra dietética insolúvel. Neste estudo foi utilizada polpa de alfarroba como fonte de fibra insolúvel e polifenóis, e concluiu-se que o consumo de polpa de alfarroba diminuiu a concentração dos NEFA e dos TG. Os NEFA são solubilizados, visto que a fibra solúvel é capaz de adsorver os

ácidos gordos. No entanto, o mecanismo pelo qual o nível de TG diminui ainda não é conhecido e pensa-se não estar relacionado com o consumo de alfarroba (Gruendel *et al.*, 2006).

A Diabetes mellitus e a obesidade também são doenças que merecem especial atenção (Gruendel, Otto, *et al.*, 2007). A resistência à insulina é caracterizada por uma capacidade reduzida que o músculo esquelético apresenta para oxidar os ácidos gordos. E, neste âmbito, alimentos funcionais que diminuam os NEFA circulantes e que aumentem a oxidação da gordura podem ser interessantes para uma prevenção e, possivelmente, tratamento da diabetes e da obesidade. Num estudo realizado em 2007 investigou-se os efeitos retardados do consumo de fibra de polpa de alfarroba, em duas situações: a) jejum e b) pós-prandial, verificando os níveis de glucose, de insulina, de NEFA e de leptina (Gruendel, Garcia, *et al.*, 2007). A leptina é uma hormona predominantemente produzida no tecido adiposo e está relacionada com a supressão do apetite. A amostra utilizada foi fibra de polpa de alfarroba. Este estudo concluiu que existiu o consumo de fibras está relacionado com o metabolismo lipídico, no entanto também foram relatados efeitos adversos que se pensa serem causados pelos compostos fenólicos (Gruendel, Garcia, *et al.*, 2007). Ainda em 2007, Gruendel e sua equipa investigaram os efeitos dose-dependentes da fibra de polpa de alfarroba na glucose pós-prandial, quando administrada em conjunto com uma carga de glucose (Gruendel, Otto, *et al.*, 2007). Os resultados deste estudo apontam para a ingestão de fibra causar um aumento da concentração da glucose pós-prandial, assim como da concentração de insulina. No entanto, os mecanismos que suportam esta ideia ainda continuam a ser investigados.

Como já foi referido anteriormente, a polpa de alfarroba é rica em compostos fenólicos e esses compostos apresentam atividades terapêuticas. Os compostos fenólicos possuem um poder antioxidante elevado. Este facto é justificável pela estrutura dos compostos fenólicos, isto é, os compostos fenólicos têm uma estrutura que é propícia a que sejam os aceitadores e neutralizadores de radicais livres. O poder antioxidante destes compostos pode ser utilizado para o estudo da neutralização e prevenção de reações que podem desenvolver inúmeras patologias, como doenças cardiovasculares, cancro, osteoporose, doenças neurodegenerativas e Diabetes mellitus. Este poder antioxidante tem sido comparado com antioxidantes-padrão, como por exemplo a vitamina C, vitamina E, quercetina, ácido gálgico, ácido cafeico, ácido tânico e

catequinas (Anesini, Ferraro, & Filip, 2008; Cheynier, 2005; Klenow, Jahns, Pool-Zobel, & Gleis, 2009; Makris & Kefalas, 2004; Quiles, Rami, Go, & Huertas, 2002).

O ácido gálgico é um dos constituintes fenólicos maioritários da polpa de alfarroba. O ácido gálgico exibe ação farmacológica e através da formação de espécies de oxigénio reativas (ROS) é induzido o estado de apoptose e/ou necrose, impedindo o desenvolvimento destas células (Locatelli *et al.*, 2008). Um estudo realizado em ratos diabéticos testou se a administração de ácido gálgico tem uma ação hipoglicémica pela estimulação das células de Langerhen's à produção de insulina, que originará a diminuição da glucose (Punithavathi, Prince, Kumar, & Selvakumari, 2011). Foi ainda relatada uma ação protetora contra o stress lipídico característico da diabetes pela sua capacidade de captar radicais livres (Lima, 2012b; Punithavathi *et al.*, 2011). Pal e Ghosh demonstraram em células bacterianas a ação protetora do ADN contra a radiação, sendo o ácido gálgico o responsável pela prevenção da atividade mutagénica da célula (Pal & Ghosh, 2011). Apesar de todas estas ações positivas, o ácido gálgico em excesso pode ser prejudicial. Foi realizado um estudo em que se verificou que a ingestão de ácido gálgico leva a distúrbios sanguíneos, como a anemia (Lima, 2012b).

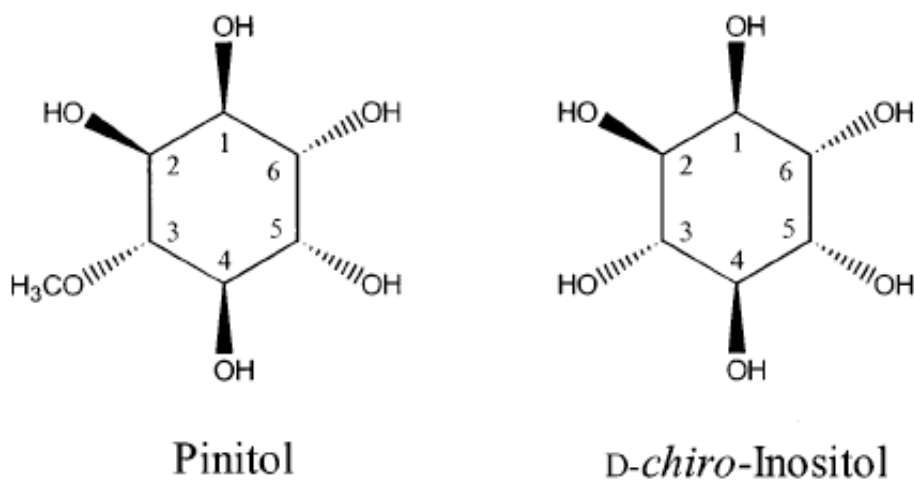
Outro constituinte da polpa de alfarroba são os taninos, que revelaram ter algumas funções ao nível do organismo humano. Num estudo em 2006, os taninos foram utilizados como base de alimentação do mesmo. Os resultados deste estudo demonstraram que existiu uma diminuição dos níveis de colesterol com a inclusão na dieta de taninos (Silanikove, Landau, Or, & Kababya, 2006). Os taninos também possuem características antidiarreicas e atividade antimicrobiana (Batlle & Tous, 1997; Cunha & Batista, 2010). A atividade antimicrobiana é devida à capacidade dos taninos condensados precipitarem as proteínas, e tem suscitado um interesse crescente no tratamento e prevenção de úlceras pépticas (Cunha & Batista, 2010; Henis *et al.*, 1964; Lima, 2012b). Existem compostos fenólicos que possuem uma atividade de fitoestrogénios. Estes são compostos que mimetizam a atividade das hormonas de estrogénios. Compostos como a apigenina, quercetina, naringenina, daidzeina e resveratrol assumem essa função (Rice & Whitehead, 2006). Estudos com ravesratrol e apigenina têm demonstrado uma ação protetora do cancro (Rice & Whitehead, 2006; Scalbert, Manach, Morand, & Em, 2005). Tanto as fibras como os compostos fenólicos que estão presentes na fibra de polpa de alfarroba são apontados como sendo benéficos, sobretudo na saúde humana. Diminuem o colesterol, suprimem o apetite, têm efeito

antioxidante, ação protetora do cancro, propriedades antidiarreicas, atividade antimicrobiana, entre outros.

Todas estas funções propiciaram um desenvolvimento da indústria na elaboração de diversos produtos tendo por base fibras e compostos fenólicos da polpa de alfarroba. Um exemplo deste tipo é um produto baseado em alfarroba que tem propriedades antidiarreicas. Todo o processo foi patenteado e é obtido um produto antidiarreico por altas temperaturas (superiores a 120°C), sem que exista a solubilização dos taninos. O produto é submetido a uma secagem e a uma pasteurização – cujo seu nome comercial é Arobon® (Thomas, 1992). Noutra invenção, são obtidos produtos naturais com propriedades antioxidantes a partir da polpa de alfarroba, por extração supercrítica. Neste caso são obtidos dois produtos sólidos, ricos em compostos fenólicos e fibras. As suas propriedades antioxidantes fazem com que estes produtos sejam utilizados em preparações industriais, principalmente tendo em vista a indústria alimentar, a indústria farmacêutica e a indústria cosmética. Este produto encontra-se patenteado desde 2010 (Esteves *et al.*, 2010). Ainda em 2010, foi patenteada uma bebida polifuncional não alcoólica obtida por fermentação do extrato aquoso da polpa de alfarroba triturada e soro de leite, por uma mistura de microrganismos diferentes e sua respectiva preparação (Gil *et al.*, 2010). Esta bebida contém compostos fenólicos, na sua maioria representados por ácido gálgico, pinitol, além de microrganismos com potencial probiótico. Esta bebida contribuiu para a valorização da polpa de alfarroba que constitui um subproduto da indústria da semente, abrindo novas perspectivas de mercado (Gil *et al.*, 2010).

## 3.4 Pinitol

O pinitol, ou 3-metil-D-qui-ro-inositol, é um dos constituintes da polpa de alfarroba, está presente em cerca de 5 a 7% (p/p) na polpa e apresenta elevada solubilidade em água (Batlle & Tous, 1997). O interesse crescente no pinitol fez com que alguns estudos tenham sido direcionados neste sentido. O pinitol tem sido identificado como tendo um efeito hipoglicemiante que imita os efeitos da insulina. A ingestão de D-pinitol é a principal fonte metabólica de D-qui-ro-inositol uma vez que este é um precursor daquele *in vivo* (Davis *et al.*, 2000). A administração do composto D-qui-ro-inositol demonstrou uma diminuição da concentração de glucose no sangue de ratos diabéticos. A glucose e o D-qui-ro-inositol podem competir pela absorção em vias específicas, e assim este composto pode ser bastante importante no tratamento pré-diabético em alguns pacientes (Davis *et al.*, 2000).



**Figura 11** Estrutura química do pinitol e do D-qui-ro-inositol (Davis *et al.*, 2000).

O pinitol é frequentemente encontrado em leguminosas, nos citrinos e na soja (Davis *et al.*, 2000). Num estudo realizado por Davis e seus colaboradores, foi testado se uma alimentação à base de pinitol conseguia melhorar a sensibilidade à insulina e ao metabolismo lipídico, em doentes obesos com diabetes tipo 2 ou intolerantes à glucose (Davis *et al.*, 2000). As conclusões deste estudo não foram muito esclarecedoras sobre a existência de uma relação direta entre a suplementação de pinitol e a concentração de

glucose no organismo. Serão necessários mais estudos para definir quais os efeitos terapêuticos do pinitol (Davis *et al.*, 2000; Kim, Kim, Joo, Jung, & Kim, 2005; Tetik, Turhan, Oziyici, & Karhan, 2011).

As propriedades anti-inflamatórias do pinitol foram descritas em estudos realizados em ratinhos. O D-pinitol era indicado como eficaz na prevenção das cataratas e edema da córnea. O D-pinitol pode ter ainda efeito antioxidante e hepatoprotetor (Kim *et al.*, 2005; Tetik *et al.*, 2011). Como existem poucos dados sobre a concentração de D-pinitol no xarope de alfarroba, em 2011 foi realizado um estudo para determinar o teor daquele composto no xarope de polpa de alfarroba (Tetik *et al.*, 2011). Tetik e a sua equipa mostraram que o xarope de alfarroba é uma fonte de D-pinitol quando em comparação com outras fontes conhecidas, como por exemplo a soja (Tetik *et al.*, 2011). O pinitol apresenta ainda outra particularidade. Caso exista adulteração pela adição de polpa de alfarroba a um produto alimentar, esta pode ser detetada pela análise da composição, sendo que o pinitol é um dos principais indicadores de adulteração (Tetik *et al.*, 2011).

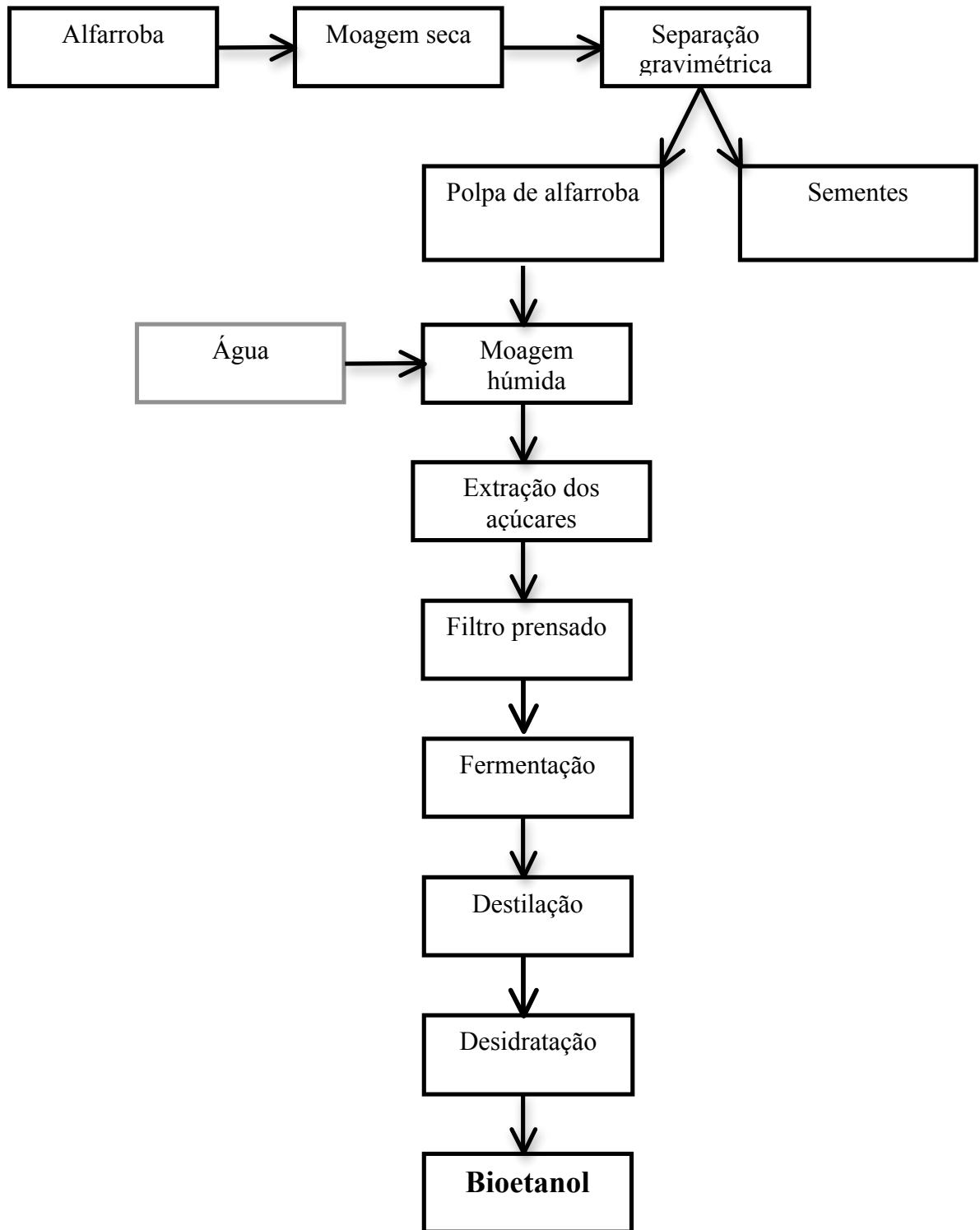
## 4. PROCESSOS DE BIOCONVERSÃO PARA A VALORIZAÇÃO DA POLPA DE ALFARROBA

### 4.1 Fermentação para produção de bioetanol

A utilização de biocombustíveis, como o bioetanol, apresenta várias vantagens ao nível do ambiente face à utilização de combustíveis fósseis, nomeadamente a diminuição das emissões dos gases que provocam o efeito de estufa e consequentemente melhorar a qualidade da atmosfera. A produção de bioetanol para utilização como combustível tem apresentado, nos últimos anos, um interesse crescente. As principais fontes de produção de etanol são: matérias-primas ricas em açúcares fermentescíveis; matérias-primas ricas em polissacáridos que podem ser hidrolisados em açúcares; e matérias-primas de biomassa lenhocelulósica que têm na sua constituição lenhina e celulose. No entanto, a produção de etanol apresenta-se dispendiosa ao nível da produção (Sánchez *et al.*, 2010; Sánchez-Segado *et al.*, 2012).

A polpa de alfarroba moída pode ser utilizada para consumo humano e através da fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* consegue-se produzir etanol. Na tentativa de desenvolver este método Sánchez e a sua equipa (2010) estudaram a produção de bioetanol a partir da utilização da vagem de alfarroba e da levedura de *S. cerevisiae*. Na figura 16 está um diagrama a explicar todo o processo proposto por Sánchez e pelos seus colaboradores para a produção de bioetanol. A alfarroba é considerada uma boa aposta para a produção mundial de bioetanol e, desta forma pode tornar este processo uma alternativa viável à produção de combustíveis. Pensa-se que a polpa de alfarroba enquanto matéria-prima possa produzir cerca de 0,320 L/kg, sendo apenas ultrapassadas por duas matérias-primas, o milho e o trigo (Balakumar & Arasaratnam, 2009; Sánchez *et al.*, 2010). A polpa de alfarroba apresenta também características importantes que se tornam vantagens em relação a outras matérias-primas que são:

- A polpa de alfarroba não compete com o consumo de alimentos, uma vez que é considerada um sub-produto da semente;
- Os custos de produção esperados são idênticos aos processos realizados com cana-de-açúcar;
- A produção é realizada tendo em conta a redução da emissões de gases associados à utilização de fertilizantes e a sua fixação me solos minerais;
- E a hidrólise ácida pode ainda melhorar a produção de etanol (Sánchez *et al.*, 2010).



**Figura 12** Diagrama de obtenção de etanol pela utilização de alfarroba (Adaptado de Sánchez-Segado *et al.*, 2012).

Mais recentemente, foi apresentada uma hipótese para a produção de bioetanol também utilizando como matéria-prima a polpa de alfarroba. Sánchez-Segado e seus colaboradores, em 2012, apresentaram a proposta de produção juntamente com uma análise económica para mostrar a rentabilidade deste processo. Então, este processo foi concebido compreendendo as seguintes etapas para obtenção do bioetanol: Armazenamento, extração dos açúcares, fermentação, recuperação do etanol e secagem. Este processo foi pensado para se ter um custo de produção de 0,55 €/L e podendo representar uma alternativa aos combustíveis fósseis. É estimado que o investimento necessário para este processo seja de 39,61 milhões de euros, contudo, prevê-se que os retornos deste investimento se situem na ordem dos 7% (Balakumar & Arasaratnam, 2009; Sánchez-Segado et al., 2012).

#### 4.2 Fermentação para produção de hidrogénio e ácidos orgânicos

A molécula de hidrogénio é composta por dois átomos de hidrogénio ( $H_2$ ), à temperatura ambiente é um gás incolor, inodoro e insípido. Este gás tem sido alvo de estudos que demonstram que o hidrogénio tem potencial para ser a fonte de energia, já que têm uma elevada eficiência na conversão em energia útil assim como, um elevado nível energético com uma entalpia de combustão de 120-142 KJ/g. Para além disto, este gás apresenta vantagem ao nível ambiental pois produzem-se poucos compostos poluentes durante a sua combustão (Hallenbeck & Ghosh, 2009; Kotay & Das, 2008).

O biohidrogénio corresponde ao hidrogénio produzido através de processos biológicos. Um desses processos biológicos pode ser realizado por fermentação anaeróbia escura. Esta fermentação é realizada por bactérias anaeróbias, em condições de anóxia, ausência de luz e num meio rico em hidratos de carbono. Tanto o hidrogénio como os ácidos orgânicos, como por exemplo o ácido butírico, acético, láctico, e até álcoois como o etanol podem ser produtos resultantes deste processo fermentativo, uma vez que, podem ser sintetizados facilmente na presença de açúcares como por exemplo, glucose, xilose, arabinose e celobiose (Argun, Kargi, Kapdan, & Oztekin, 2008). A optimização da fermentação escura tem em consideração diversos aspectos:

- As características do inócuo, isto é, se este é constituído por uma cultura pura, por uma mistura de culturas ou por consórcios bacterianos. A ausência de microrganismos metanogénicos faz com que a utilização de culturas puras apresente vantagens sobre as restantes opções. No caso de existirem estes agentes metanogénicos, torna-se necessário o seu tratamento, sujeitando os inócuos a uma acidificação. Este processo de fermentação tem vindo a ser realizado principalmente por microrganismos pertencentes ao género *Clostridium sp.*, que apresentam os rendimentos mais elevados;
- A disponibilidade dos substratos como fonte de carbono, como por exemplo, na produção de hidrogénio por via fermentativa, torna-se muito mais eficaz quando é realizada a partir do amido hidrolisado do que do amido em bruto. No caso de estarmos perante substratos lenhocelulósicos, para serem utilizados como substrato têm que sofrer algum tipo de tratamento. Podem sofrer acidificação, alcalinização ou aquecimento. Estes pré-tratamentos apresentam desvantagens visto que podem originar compostos de ação inibitória;

- A concentração inicial do substrato e dos metabolitos produzidos durante o processo. Estas duas características são muito importantes pois tanto uma como outra podem levar a uma ação inibitória e conseqüentemente diminuir o rendimento do processo. O controlo dos metabolitos formados torna-se importante na medida em que a sua acumulação no meio leva a uma redução do valor de pH (Argun *et al.*, 2008; Pan, Zhang, Fan, & Hou, 2010).

O biohidrogénio representa atualmente, uma grande aposta para o futuro, como sendo uma fonte de energia inesgotável e que trás consigo, vantagens ao nível ambiental. No entanto, a incompleta conversão do substrato traduz-se numa diminuição do rendimento e que constitui o maior obstáculo para o biohidrogénio se tornar uma energia renovável (Hallenbeck & Ghosh, 2009; Kotay & Das, 2008). A glucose é necessária para ser utilizada como substrato e, numa tentativa de colmatar esta necessidade, os resíduos lenhocelulósicos representam uma boa aposta, são matérias-primas não dispendiosas, estão abundantemente distribuídas e constituem uma potencialidade na produção biológica. Os resíduos lenhocelulósicos sofrem hidrólise química ou enzimática e dão origem a misturas de açúcares simples, que conseguem ser utilizadas por bactérias. À semelhança do hidrogénio, a produção de ácido butírico e acético também acontece aquando a realização do processo de fermentação escura. Seja o interesse o biohidrogénio ou a produção de ácidos orgânicos, a valorização de subprodutos agrícolas e agro-alimentares pode representar uma aplicação rentável deste tipo de matérias-primas (Lo, Huang, Fu, Chen, & Chang, 2009; Panagiotopoulos *et al.*, 2002).

### 4.3 Produção de manitol

O manitol é um composto que possui várias propriedades que demonstram ser benéficas para a saúde, nomeadamente o baixo valor calórico, o efeito antioxidante e o facto de o seu metabolismo no organismo humano não ser mediado pela insulina. O manitol, quando se apresenta na forma cristalizada é muito pouco higroscópico e quimicamente inerte. O manitol apresenta propriedades físico-químicas melhores que o sorbitol, o seu estereoisómero e como tal, apresenta maior valor comercial. O isómero óptico do D-manitol é o L-manitol, este último composto não ocorre naturalmente na natureza, por sua vez, o D-manitol existe em diversas frutas e legumes (Korakli & Vogel, 2003; Saha & Racine, 2011; Soetaert, Vanhooren, & Vandamme, 1999).

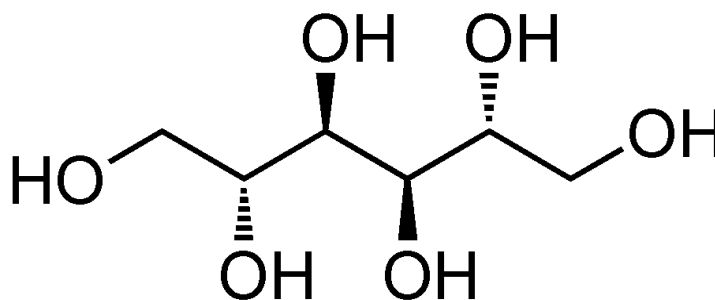


Figura 13 Estrutura química do manitol (Bickel, 2010).

A produção de manitol tem sido desenvolvida ao longo do tempo e, este pode ser obtido por hidrogenação química ou conversão biológica. A hidrogenação química tem início numa molécula de frutose e, normalmente são os xaropes a fonte deste açúcar, e é realizada a temperatura e pressões elevadas, na presença de um catalisador metálico. A hidrogenação da frutose dá origem a manitol e sorbitol numa proporção 50:50 e constitui um processo de obtenção do manitol não específico. No entanto, a utilização de apenas moléculas de frutose pura é economicamente pouco viável e, são utilizadas misturas de glucose e frutose numa proporção de 50:50. Assim, a utilização destas misturas resulta num pior rendimento, apenas originando 25% de manitol contra 75% de sorbitol. Separa-se ainda o manitol do sorbitol, o que se revela difícil e que se traduz num aumento de custo deste processo (Gil *et al.*, 2011; Yun, Kang, & Song, 1996). A alternativa à hidrogenação química é a utilização de processos biotecnológicos, isto é, a tecnologia enzimática e a tecnologia microbiana. A tecnologia enzimática tem como

base a produção enzimática de manitol com a enzima manitol desidrogenase (MDH), que usa NAD(P)H como cofactores, estes últimos revelaram-se dispendiosos e representam a limitação deste processo. Como alternativa a este problema considerou-se a utilização de análogos artificiais do NAD(P)H e a sua regeneração independente de processos bioquímicos. Esta alternativa foi pouco explorada visto que, ao nível industrial a sua utilização é complexa e cara. A tecnologia microbiana tem por base a utilização de microrganismos para a conversão de frutose em manitol e existem diversos processos descritos e utilizam tanto bactérias como leveduras. É relatada a utilização em maior quantidade de misturas balanceadas de frutose e glucose como substrato, no entanto, substratos obtidos a partir de inulina ou de melaços e seguidamente suplementados com fontes de azoto (como por exemplo, extractos de carne, peptonas de soja) também têm merecido especial atenção visto que são mais baratos que os comumente utilizados (Korakli & Vogel, 2003; Saha, 2006a, 2006b; Wisselink, Weusthuis, Eggink, Hugenholtz, & Grobber, 2002). Os principais estudos e principais patentes que utilizam a tecnologia microbiana como base para a produção de manitol são descritos sucintamente na tabela 5.

**Tabela 5** Produção de manitol por via microbiana: estudos realizados, tanto em bactérias como em leveduras.

<b>Autores e ano do estudo</b>	<b>Microrganismo utilizado</b>	<b>Observações</b>
Itoh et al. (1992)	<i>Lactobacillus sp.</i> B001	Produção simultânea de manitol, ácido acético e ácido láctico. Utilização de misturas de glucose e frutose. Patente EP0486024A2.
Yun, Kang e Song(1996)	<i>Lactobacillus sp.</i> KY-107	Produção de manitol.
Saha (2002)	<i>Lactobacillus intermedius</i> NRRL B-30560	Frutose utilizada como principal substrato e, glucose, maltose, manose e galactose utilizados como fontes de carbono secundárias. Patente US6855526.
Ojamo et al. (2003)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> ATCC 12291	Produção de manitol recorrendo à utilização de células imobilizadas. Mistura de glucose e frutose constituiu a fonte principal de carbono. Patente US6602691B1.
Saha e Bothast (2006)	<i>Lactobacillus intermedius</i> NRRL B-3693	Produção de manitol utilizando como substrato a inulina e na presença de inulinases por um processo de sacarificação e fermentação simultâneas ou após hidrólise ácida.
Saha, Racine e Terentieva (2006)		Produção de manitol em modo semi-descontínuo utilizando xaropes de frutose como base do meio de cultura. Patente WO 044608/2006.
Racine e Saha (2007)	<i>Lactobacillus intermedius</i> NRRL B-3693	Produção de manitol em modo semi-descontínuo utilizando um meio suplementado com peptona de soja e manganês.
Song et al. (2001)	<i>Candida magnoliae</i>	Levedura produtora de manitol. Patente US6528290.

Tanto a hidrogenação química como a conversão biológica são processos que apresentam algumas desvantagens. No entanto, a conversão biológica é a alternativa mais promissora que, em comparação com a síntese química, apresenta conversão completa da frutose em manitol, uma grande especificidade e a possibilidade de utilizar substratos de baixo grau de pureza, como por exemplo, os xaropes. Contudo, os estudos referidos na tabela 5 continuam a apresentar alguns aspectos a melhorar, são processos morosos, e que utilizam meios de cultura base dispendiosos e provenientes de substratos alimentares. Para além disso, estes estudos utilizam suplementos de elevado custo e técnicas de cultivo complexas e exigentes (Gil *et al.*, 2011; Wisselink *et al.*, 2002).

Recentemente, foi apresentada uma nova forma de produção de manitol que tenta resolver muitas das desvantagens anteriormente referidas. Trata-se de um processo fermentativo inovador, em que é obtido um hexitol ( $C_6H_{14}O_6$ ) que tem várias utilizações, principalmente ao nível da indústria alimentar mas também com aplicações no campo da medicina e nas indústrias farmacêutica e química. Este processo segue a via microbiológica e é realizado a partir da fração solúvel que se obtém após a extração da polpa da vagem triturada da alfarroba com água. As estirpes microbianas utilizadas têm a capacidade de converter os açúcares presentes no extrato aquoso, que pode ser hidrolisado com ácidos ou enzimas e suplementado com nutrientes, tendo em vista a sua utilização como meio de cultura para a produção de manitol. Este processo foi patenteado (PT 104633) e apresenta vantagens em relação aos estudos anteriormente realizados, entre as quais:

- Obtenção de manitol através de uma matéria-prima de baixo valor comercial (polpa de alfarroba);
- Extractos aquosos obtidos por um processo simples e económico;
- Rendimentos mais elevados comparativamente ao processo químico;
- Possibilidade de recuperação da biomassa microbiana produzida no processo e sua utilização para outros fins;
- Vantagens económico-ambientais, isto é, como se utiliza um produto proveniente da polpa de vagem de alfarroba, que por si só é considerada um subproduto da alfarroba representa valor acrescentado e perspectiva novas possibilidades de mercado (Gil *et al.*, 2011).

O manitol tem uma aplicação ampla na indústria alimentar, é um produto usado como aditivo alimentar (E21), é usado para dar um sabor doce e como agente de texturização. Aumenta o prazo de validade dos produtos alimentares uma vez que, reduz a cristalização. Como referido anteriormente, é muito pouco higroscópico e quimicamente inerte, o manitol é útil para tornar produtos estáveis com alta humidade. É, em conjunto com produtos como o sorbitol e o xilitol, utilizado em pastilhas de mascar, produtos com poucas calorias. O manitol tem ainda aplicações na indústria farmacêutica, na formulação de comprimidos e granulados, aqui o manitol absorve a humidade, não interage com outros componentes das formulações e, como tem um sabor doce, mascara o gosto menos agradável de muitos fármacos. Na medicina, o manitol assume funções de diurético osmótico, em cirurgia podem ser utilizadas soluções de manitol parentéricas para prevenir a insuficiência renal e nas cirurgias realizadas ao cérebro podem ser uma mais-valia na redução do edema cerebral. O hexanitrato de manitol é utilizado na hipertensão, já que tem funções vasodilatadoras. O manitol também é utilizado em investigação, principalmente em microbiologia, onde é uma fonte de carbono frequente (Gil *et al.*, 2011; Soetaert *et al.*, 1999; Wisselink *et al.*, 2002).

## 5. CONCLUSÃO

O objectivo deste trabalho baseou-se no aprofundar do conhecimento científico das características que a alfarroba apresentava, e em especial a polpa de alfarroba.

A alfarrobeira é uma árvore que está distribuída um pouco por todo o globo terrestre, com incidência principal no sul da Europa – zona do mediterrâneo –, América do Sul e até no continente australiano. Esta árvore dá um fruto, a alfarroba que desde cedo suscitou muito interesse, principalmente ao nível da indústria alimentar. A alfarroba, como referido anteriormente neste trabalho, é constituída pela semente e pela polpa. Existiu sempre uma maior tendência para a indústria se focar mais na valorização da semente do que a polpa de alfarroba. Por esse motivo, a indústria baseada na semente de alfarroba está mais desenvolvida do que a utilização da polpa de alfarroba, sendo mesmo até agora considerada um subproduto.

A semente de polpa de alfarroba dá origem a uma goma, a LBG. Esta goma é um polímero neutro com determinadas características que fazem com que a utilização deste seja diversificada, desde a sua utilização na indústria alimentar como espessante, passando pela indústria farmacêutica e cosmética. A LBG revelou-se uma mais valia no desenvolvimento farmacêutico ao nível da distribuição de medicamentos, e na utilização alimentar sendo que é um produto que apresenta benefícios ao nível da redução do colesterol e até é utilizado como antiemético em leites para bebés pelas suas já referidas capacidades espessantes.

A polpa de alfarroba é constituída por um grande teor em açúcares. Estes são facilmente extractáveis para a obtenção de xaropes mas também para, a preparação de meios fermentativos que vão servir de base para o desenvolvimento de outros produtos alternativos. A partir dos xaropes podem ser produzidos inúmeros outros compostos e produtos que podem fazer parte da alimentação do quotidiano, como por exemplo, licores de alfarroba, doce de alfarroba, manteiga de alfarroba, café de alfarroba.

As fibras e os compostos fenólicos também são constituintes importantes da polpa de alfarroba. Estes compostos podem assumir um papel muito importante para a saúde humana em geral. Devido às suas propriedades, a polpa de alfarroba quando introduzida na dieta, pode influenciar no sentido de uma diminuição do valor de colesterol e pensa-se que também possa ter influência no tratamento da Diabetes mellitus. Os compostos fenólicos têm uma poderosa ação antioxidante e podem neutralizar facilmente os radicais livres. Todas estas características levaram a um desenvolvimento industrial, em

que foram reconhecidos inúmeros novos produtos que na sua constituição tivessem fibras e compostos fenólicos com origem na polpa de alfarroba.

A polpa de alfarroba tem ainda na sua constituição outro produto de interesse, o pinitol. Este composto tem sido promovido como sendo um composto bioactivo com influência na sensibilidade à insulina e ao metabolismo lipídico. Revela-se ainda como tendo propriedades anti-inflamatórias e muito útil aquando a realização de testes de adulteração.

Para existir, de facto, uma valorização da polpa de alfarroba é necessário perceber quais são os processos de bioconversão que podem ser desenvolvidos e que tipo de vantagens estes podem trazer. Pela utilização da polpa de alfarroba podemos realizar a fermentação dos açúcares na sua constituição a fim de produzir etanol e tornando o bioetanol como um biocombustível a desenvolver e a apostar no futuro. Esta fermentação deu origem a um interesse crescente principalmente ao nível dos biocombustíveis tendo já sido realizadas propostas industriais para começar a produção, a partir de polpa de alfarroba. Da mesma maneira, a produção de hidrogénio e de compostos orgânicos pode ser realizada por via biológica, utilizando a fermentação anaeróbia escura como o modo de obtenção destes dois compostos que, mais tarde se pensa poderem ser utilizados também como uma forma de substituição dos combustíveis atuais, com diversas mais-valias, como por exemplo, o facto de se poderem tornar numa fonte de energia inesgotável.

Outro composto que exhibe diversas propriedades benéficas e que pode ser obtido através da polpa de alfarroba é o manitol. Este apresenta baixo valor calórico, efeito antioxidante e o seu metabolismo no organismo humano não é mediado pela insulina. A produção deste composto pode ser realizada por hidrogenação química ou biológica. E a utilização de processos biotecnológicos representa a melhor alternativa para a sua produção. Recentemente foi apresentada uma alternativa de produção deste composto com várias vantagens que vinham superar os estudos já realizados até então, como por exemplo, o facto de o processo não ser dispendioso, os rendimentos elevados e com vantagens económico-ambientais. O manitol é utilizado em grande escala na indústria alimentar, como aditivo alimentar, na indústria farmacêutica, ajudando na formulação de comprimidos e granulados e fisiologicamente assume o papel de diurético osmótico.

Tanto a alfarroba e principalmente a polpa de alfarroba, representam uma boa aposta futura e de desenvolvimento cada vez mais ao nível da investigação. A polpa de alfarroba tem um grande potencial de valorização, em Portugal. No futuro pensa-se que

## 5. CONCLUSÃO

a produção de biocombustíveis vai ser uma das áreas mais desenvolvidas e trabalhadas tendo como base a polpa de alfarroba.

*6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggett, P.J., Agostoni, C., Goulet, O., Hernell, O., Koletzko, B., Lafeber, H.L., Michaelsen, K.F., Milla, P., Rigo, J. e Weaver, L.T. (2002) "Antireflux or antiregurgitation milk products for infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition", *J. Pediatr. Gastr. Nutr.*, **34**, pp. 496–8.
- Anesini, C., Ferraro, G., e Filip, R. (2008) "Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina", *J. Agric. Food Chem.*, **56**, pp. 9225–9.
- Arellano-Cárdenas, S., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G., López-Cortéz, M. S., e Gómez-Perea, B. (2005) "Adsorption of phenol and dichlorophenols from aqueous solutions by porous clay heterostructure (PCH)", *J. Mex. Chem. Soc.*, **49**, pp. 287–291.
- Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I., & Oztekin, R. (2008) "Batch dark fermentation of powdered wheat starch to hydrogen gas: effects of the initial substrate and biomass concentrations" *Int. J. of Hydrogen Energ.*, **33**, pp. 6109–6115.
- Arkocápsulas (2011) "Arkocápsulas de goma de alfarroba". Consultado em [17.08.2013], disponível em [http://arkocapsulas.pt/detalhe\\_produto.php?id=13](http://arkocapsulas.pt/detalhe_produto.php?id=13)
- Avallone, R., Plessi, M., Baraldi, M., & Monzani, A. (1997) "Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): protein, fat, carbohydrates and tannins" *J. Food Comp. Anal.*, **10**, pp. 166–172.
- Ayaz, F.A., Torun, H., Ayaz, S., Correia, P.J., Alaiz, M., Sanz, C., Grúz, J. e Strnad, M. (2007) "Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds" *J. Food Quality*, **30**, pp. 1040–1055.
- Balakumar, S., e Arasaratnam, V. (2009) "Comparison of industrial scale ethanol production from a palmyrah-based carbon source by commercial yeast and a mixed culture from palmyrah toddy" *J. Inst. Brewing*, **115**, pp. 105–110.
- Barracosa, P., Osório, J., e Cravador, A. (2007) "Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region" *Scientia Horticulturae*, **114**, pp. 250–257.
- Batal, H. El, e Hasib, A. (2013) "Optimization of extraction process of carob bean gum purified from carob seeds by response surface methodology" *Chem Process Engineering Research*, **12**, pp. 1–9.
- Battle, I., e Tous, J. (1997) "*Carob tree: Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*" Roma, Itália: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research.
- Beneke, C. E., Viljoen, A. M., e Hamman, J. H. (2009) "Polymeric plant-derived excipients in drug delivery" *Molecules*, **14**, pp. 2602–20.

- Bernardo-Gil, M. G., Roque, R., Roseiro, L. B., Duarte, L. C., Gírio, F., e Esteves, P. (2011) "Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.)" *J. Supercritical Fluids*, **59**, pp. 36–42.
- Bickel, S. (2010) Mannitol. Consultado em [20.10.2013], disponível em <http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/zucker/sugar/mannit.html>
- Biner, B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M., e Pekmezci, M. (2007) "Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey" *Food Chemistry*, **100**, pp. 1453–1455.
- Biostyle (2012) "Carob". Consultado em [02.09.2012], disponível em [http://biostylebg.com/?page\\_id=229&lang=en](http://biostylebg.com/?page_id=229&lang=en)
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., e Caboni, M. F. (2004) "Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds" *J. Agric. Food Chem.*, **52**, pp. 5195-5200.
- Cheynier, V. (2005) "Polyphenols in foods are more complex than often thought" *Am J Clin Nutr*, **81**, pp. 223–229.
- Cordero, S.G. (2008) "Procedimiento de obtención de sirope de algarroba" Solicitação de patente espanhola n. 2303765. 7 páginas.
- Coviello, T., Alhaique, F., Dorigo, A., Matricardi, P., e Grassi, M. (2007) "Two galactomannans and scleroglucan as matrices for drug delivery: preparation and release studies" *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, **66**, pp.200-209.
- Crozier, A., Clifford, M. N., e Ashihara, H. (2006) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing. EUA.
- Cunha, P. A. e Batista, M. T. (2010) "Taninos", in Cunha, A.P. (Ed.). *Farmacognosia e Fitoquímica*, 3ª Edição, pp. 292–316, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Portugal.
- Cunha, P. A., Batista, M. T., e Roque, O. R. (2010) "Glúcidos", in Cunha, A.P. (Ed.) *Farmacognosia e Fitoquímica*, 3ª Edição, pp. 128–172, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Portugal.
- Cunha, P. A., & Roque, O. R. (2010a) "Produtos resinosos" In Cunha, A.P. (Ed), *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp. 422–431, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Portugal.
- Cunha, P. A., & Roque, O. R. (2010b) "Compostos fenólicos: características e origem biossintética", in Cunha, A.P. (Ed.) *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp. 211–215, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Portugal.

- Cunha, P. A., & Roque, O. R. (2010c) "Ácidos fenólicos, fenóis e seus derivados", in Cunha, A.P. (Ed.). *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp. 217–235, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Portugal.
- Dakia, P. A., Blecker, C., Robert, C., Wathelet, B., e Paquot, M. (2008) "Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment" *Food Hydrocolloids*, **22**, pp. 807–818.
- Dakia, P. A., Wathelet, B., e Paquot, M. (2007) "Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ". *Food Chemistry*, **102**, pp. 1368–1374.
- Davis, A., Christiansen, M., Horowitz, J., Klein, S., Hellerstein, M., e Ostlund Jr, R. (2000). "Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance". *Diabetes care*, **23**, pp. 1000-1005.
- Dey, P., Sa, B., & Maiti, S. (2011) "Carboxymethyl ethers of locust bean gum", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **3**, pp. 4–7.
- Diaz, C. S. (1997) "Syrup of natural carob sugars and a process for its production" Patente Americana n. 5624500, EUA, 9 páginas.
- Dionísio, M., & Grenha, A. (2012) "Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications". *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, **4**, pp. 175-185.
- DRAPALG. (2007) "Programa de desenvolvimento rural: fileira da alfarroba e amêndoa". [Consultado em 10.09.2013]. Disponível em <http://www.drapalg.min-agricultura.pt/downloads/pdralgarve/fileira-estrat/PDRrFileirAlf-Amen.pdf>
- Esteves, M. P., Gil, M. G., Amaro, F., Girio, F., Duarte, L., Roseiro, M., e Roque, R. (2010) "Produtos naturais antioxidantes obtidos por extração supercrítica aplicada à fracção insolúvel que fica após a extração com água da polpa de alfarroba triturada e seu método de produção" Patente Portuguesa n. 104631, Portugal, 14 páginas.
- Evans, A. J., Hood, R. L., Oakenfull, D. G., e Sidhu, G. S. (1992) "Relationship between structure and function of dietary fibre: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat", *The British journal of nutrition*, **68**, pp. 217–29.
- FDA, U. (2001) *Aspergillus niger*. Consultado em [07.07.2013], disponível em [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras\\_notices/grn0089.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn0089.pdf)
- Garcia-Ochoa, F., e Casas, J. (1992) "Viscosity of locust bean gum solutions". *J Sci Food Agric*, **59**, pp.97–100.
- Gil, M. G., Amaro, F., Girio, F., Duarte, L., Roseiro, M., Moura, P., Pereira, J. (2010). "Bebida funcional não alcoólica obtida por fermentação do extracto aquoso da polpa de alfarroba triturada e processo para sua obtenção" Patente Portuguesa n. 104632. Portugal, 21 páginas.

- Gil, M. G., Amaro, F., Girio, F., Duarte, L., Roseiro, M., Moura, P., e Pereira, J. (2011) "Processo para a produção de manitol por fermentação de um extracto aquoso da polpa de alfarroba triturada" Patente Portuguesa n. 104633, Portugal, 23 páginas.
- Gruendel, S., Garcia, A. L., Otto, B., Mueller, C., Steiniger, J., Weickert, M. O., Speth, M., Katz, N. e Koebnick, C. (2006) "Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans". *Journal of nutrition*, **January**, pp.1533–1538.
- Gruendel, S., Garcia, A. L., Otto, B., Wagner, K., Bidlingmaier, M., Burget, L., Weickert, M.O., Dongowski, G., Speth, M., Katz, N. e Koebnick, C. (2007) "Increased acylated plasma ghrelin, but improved lipid profiles 24-h after consumption of carob pulp preparation rich in dietary fibre and polyphenols" *The British journal of nutrition*, **98**, pp.1170–7.
- Gruendel, S., Otto, B., Garcia, A. L., Wagner, K., Mueller, C., Weickert, M. O., Heldwein, W. e Koebnick, C. (2007) "Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fibre and polyphenols increases plasma glucose and serum insulin responses in combination with a glucose load in humans" *The British journal of nutrition*, **98**, pp.101–5.
- Haiat,P.D.(2013). "Alfarroba". Consultado em [19.09.2013], disponível em <http://patriciadavidson.com.br/?s=alfarroba>
- Hajaji, H. El, Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., Bali, B. Ele Lachkar, M. (2010) "Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties of carob tree leaves from Morocco" *Academy of Chemistry of Globe Publications*, **4**, pp.193–204.
- Hallenbeck, P. C., & Ghosh, D. (2009) "Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?" *Trends in biotechnology*, **27**, pp.287–97.
- Henis, Y., Tagari, H., e Volcani, R. (1964). "Effect of water extracts of carob pods, tannic acid, and their derivatives on the morphology and growth of microorganisms". *Appl. Microbiol.*, **12**, pp.204-209.
- Hirsch, S., Binder, V., Schehlmann, V., Kolter, K., e Bauer, K. H. (1999) "Lauroyldextran and crosslinked galactomannan as coating materials for site-specific drug delivery to the colon" *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **47**, pp.61–71.
- Jain, A., Gupta, Y., e Jain, S. K. (2007) "Perspectives of biodegradable natural polysaccharides for site-specific drug delivery to the colon" *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences:a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences*, **10**, pp.86–128.
- Kawamura, Y. (2008). "Carob Bean Gum chemical and technical assessment (CTA) draft".

- Kim, J., Kim, J., Joo, H., Jung, S., e Kim, J. (2005) "Determination of total chinositol content in selected natural materials and evaluation of the antihyperglycemic effect of pinitol isolated from soybean and carob" *Food Science and Biotechnology*, **14**, pp.441-445.
- Klenow, S., Jahns, F., Pool-Zobel, B., e Gleis, M. (2009). "Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua* L.) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells?" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, pp.2999–3004.
- Korakli, M., e Vogel, R. F. (2003) "Purification and characterisation of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*" *FEMS Microbiology Letters*, **220**, pp.281–286.
- Kotay, S., e Das, D. (2008) "Biohydrogen as a renewable energy resource: prospects and potentials" *International Journal of Hydrogen Energy*, **33**, pp.258–263.
- Kumazawa, S., Taniguchi, M., Suzuki, Y., Shimura, M., Kwon, M.-S., e Nakayama, T. (2002) "Antioxidant activity of polyphenols in carob pods" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, pp.373–7.
- Lima, M. (2012a). Valorização da polpa de alfarroba extractada como substrato fermentativo: extracção de compostos fenólicos e avaliação da toxicidade. Monografia apresentada no âmbito da Unidade Curricular de Introdução à Investigação Científica II. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. 64pp.
- Lima, M. (2012b). *Valorização da polpa de alfarroba como substrato para a produção biológica de metabolitos de interesse industrial: Fermentação de açúcares vs extração de compostos fenólicos*. Dissertação de Monografia para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica. 91pp.
- Lo, Y. C., Huang, C.Y., Fu, T.N., Chen, C.Y., e Chang, J.S. (2009) "Fermentative hydrogen production from hydrolyzed cellulosic feedstock prepared with a thermophilic anaerobic bacterial isolate". *International Journal of Hydrogen Energy*, **34**, pp.6189–6200.
- Locatelli, C., Rosso, R., Santos-Silva, M. C., Souza, C., Licínio, M., Leal, P., Bazzo, M., Yunes, R. e Creczynski-Pasa, T. B. (2008) "Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells" *Bioorganic & medicinal chemistry*, **16**, pp. 3791–9.
- Macedo, R. (2006). *Anuário Vegetal: Crop production Yearbook*. Castel. Lisboa, Portugal.
- Makris, D. P., e Kefalas, P. (2004) "Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidants" *Food Technol. Biotechnol.*, **42**, pp.105–108.

- Malik, K., Arora, G., e Singh, I. (2011) "Taste masked microspheres of ofloxacin: formulation and evaluation of orodispersible tablets" *Scientia pharmaceutica*, **79**, pp.653–72.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., e Jiménez, L. (2004) "Polyphenols: food sources and bioavailability". *The American journal of clinical nutrition*, **79**, pp.727–47.
- Marianecci, C., Carafa, M., Marzio, L., Rinaldi, F., Meo, C., Alhaique, F., Matriacardi, P.e Coviello, T. (2011) A new vesicle-loaded hydrogel system suitable applications: preparation and characterization for topical. *J Pharm Pharmaceut Sci*, **14**, pp.336–346.
- Mathur, V., e Mathur, N. K. (2005) "Fenugreek and other lesser known legume galactomannan-polysaccharides: Scope for developments" *Journal of Scientific & Industrial Research*, **64**, pp.475–481.
- Mujoriya, R., Dhamande, K., Washkhede, U., e Angure, S. (2011) "A review on study of buccal drug delivery system" *Innovative Systems Design and Engineering*, **2**, pp.24-35.
- Naganagouda, K., Salimath, P. V, e Mulimani, V. H. (2009) "Purification and characterization of endo-  $\beta$  -1, 4 mannanase from *Aspergillus niger* gr for application in food processing industry". *J Microbiol Biotechnol*, **19**, pp.1184–1190.
- Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Erben, G., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., e Haber, B. (2003) "Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre". *Food and Chemical Toxicology*, **41**, pp. 1727–1738.
- Pal, A., e Ghosh, M. (2011) "Radio-protective activity of gallic acid in a bacterial system". *Journal of Natural Pharmaceuticals*, **2**, pp.210.
- Pan, C., Zhang, S., Fan, Y., e Hou, H. (2010) "Bioconversion of corncob to hydrogen using anaerobic mixed microflora". *International Journal of Hydrogen Energy*, **35**, pp.2663–2669.
- Panagiotopoulos, I., Dakker, R., Vrije, T., Niel, E., Koukios, E., e Claassen, P. (2002) "Exploring critical factors for fermentative production from various types of lignocellulosic biomass" *Journal of the Japan Institute of Energy*, **41**, pp.173–178.
- Papagiannopoulos, M., Wollseifen, H. R., Mellenthin, A., Haber, B., e Galensa, R. (2004) "Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn" *Journal of agricultural and food chemistry*, **52**, pp. 3784–91.
- Patel, M., Tekade, A., Gattani, S., e Surana, S. (2008) "Solubility enhancement of lovastatin by modified locust bean gum using solid dispersion techniques". *AAPS PharmSciTech*, **9**, pp.1262–9.

- Picout, D. R., Ross-murphy, S. B., Jumel, K., e Harding, S. E. (2002) "Pressure cell assisted solution characterization of polysaccharides" *Biomacromol*, **3**, pp.761–767.
- Pollard, M. a., Kelly, R., Fischer, P. a., Windhab, E. J., Eder, B., e Amadó, R. (2008) "Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples" *Food Hydrocolloids*, **22**, pp.1596–1606.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., & Nagar, B. J. (2013) "Locust bean gum: a versatile biopolymer". *Carbohydrate polymers*, **94**, pp.814–21.
- Punithavathi, V. R., Prince, P. S. M., Kumar, R., e Selvakumari, J. (2011) "Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats" *European journal of pharmacology*, **650**, pp. 465–71.
- Quiles, L., Ramı, M. C., Go, J. A., e Huertas, R. (2002) "Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying". *Food Chemistry*, **76**, pp. 461–468.
- Raghavan, C. V., Muthulingam, C., Jenita, J. A. J. L., e Ravi, T. K. (2002) "An *in vitro* and *in vivo* investigation into the suitability of bacterially triggered delivery system for colon targeting" *Chemical & pharmaceutical bulletin*, **50**, pp. 892–5.
- Rice, S., e Whitehead, S. A. (2006) "Phytoestrogens and breast cancer – promoters or protectors?" *Endocrin Related Cancer*, **13**, pp. 995–1015.
- Roseiro, L. B., Tavares, C. S., Roseiro, J. C., e Rauter, A. P. (2013). "Antioxidants from aqueous decoction of carob pods biomass (*Ceretonia siliqua* L.): Optimisation using response surface methodology and phenolic profile by capillary electrophoresis" *Industrial Crop and Products*, **44**, pp.119-126.
- Saha, B. C. (2006a) "Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693". *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, pp. 991–995.
- Saha, B. C. (2006b) "A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693" *Applied microbiology and biotechnology*, **72**, pp.676–80.
- Saha, B. C., e Racine, F. M. (2011) "Biotechnological production of mannitol and its applications" *Applied microbiology and biotechnology*, **89**, pp. 879–91.
- Sánchez, S., Lozano, L. J., Godínez, C., Juan, D., Pérez, a., & Hernández, F. J. (2010) "Carob pod as a feedstock for the production of bioethanol in Mediterranean areas" *Applied Energy*, **87**, pp.3417–3424.

- Sánchez-Segado, S., Lozano, L. J., Los Ríos, P., Hernández-Fernández, F. J., Godínez, C., e Juan, D. (2012) "Process design and economic analysis of a hypothetical bioethanol production plant using carob pod as feedstock". *Bioresource technology*, **104**, pp. 324–8.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., e Em, C. R. (2005) "Dietary Polyphenols and. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **306**, pp. 287–306.
- Silanikove, N., Landau, S., Or, D., e Kababya, D. (2006) "Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids" *Livestock Science*, **99**, pp. 29–38.
- Soetaert, W., Vanhooren, P. T., e Vandamme, E. J. (1999) "The production of mannitol by fermentation" *Carbohydrate biotechnology protocols*, **10**, pp. 261–275.
- Sudhakar, Y., e Kuotsu, K. (2006) "Buccal bioadhesive drug delivery - a promising option for orally less efficient drugs". *Journal of controlled release:official journal of the Controlled Release Society*, **114**, pp.15–40.
- Tancredi, N., Medero, N., Möller, F., Piriz, J., Plada, C., e Cordero, T. (2004) "Phenol adsorption onto powdered and granular activated carbon, prepared from Eucalyptus wood". *Journal of colloid and interface science*, **279**, pp. 357–63.
- Tetik, N., Turhan, I., Oziyici, H. R., e Karhan, M. (2011) "Determination of D-pinitol in carob syrup". *International journal of food sciences and nutrition*, **62**, pp.572–6.
- Thomas, R. (1992) "Process for the production of an anti-diarrhoeic product based on carob" Patente 5330755, USA, 5 páginas.
- Vaheed, H., Shojaosadati, S. A., e Galip, H. (2011) "Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology" *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **38**, pp.101-111
- Wisselink, H. ., Weusthuis, R. ., Eggink, G., Hugenholtz, J., e Grobben, G. (2002) "Mannitol production by lactic acid bacteria: a review" *International Dairy Journal*, **12**, pp.151–161.
- Yamagar, M., Kadam, V., e Hirlekar, R. (2010). "Design ang evaluation of buccoadhesive drug delivery system of metoprolol tartrate" *International Journal of PharmaTech Research*, **2**, pp. 453–462.
- Yang, H., Zhou, S., e Deng, X. (2003) "Preparation and properties of hydrophilic – hydrophobic chitosan derivatives" *Journal od Applied Polyjmer Science*, **92**, pp. 8–15.
- Yun, J. W., Kang, S. C., e Song, S. K. (1996) "Microbial transformation of fructose to mannitol by *Lactobacillus* sp. KY-107" *Biotechnology Letters*, **18**, pp. 35–40.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Zavoral, J. H., Hannan, P., Fields, D. J., Hanson, M. N., Frantz, I. D., Kuba, K., ... Jacobs, D. R. (1983) "The hypolipidemic effect of locust bean gum food products in familial hypercholesterolemic adults and children" *The American journal of clinical nutrition*, **38**, pp.285–94.
- Zunft, H. J. F., Lüder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H. J., Koebnick, C., e Grünwald, J. (2003) " Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic patients". *European journal of nutrition*, **42**, pp. 235–42.