

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS - BIOQUÍMICA

SAMANTHA SHAROL KIENTEKA



**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS  
POLISSACARÍDEOS  
DOS FRUTOS DE *Sicana odorifera***



**CURITIBA  
2014**

**SAMANTHA SHAROL KIENTEKA**

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS  
POLISSACARÍDEOS  
DOS FRUTOS DE *Sicana odorifera***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

**CURITIBA  
2014**

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Kienteka, Samantha Sharol

Extração e caracterização dos polissacarídeos dos frutos de *Sicana odorífera*. / Samantha Sharol Kienteka. – Curitiba, 2014.  
76f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Carmem Lucia de Oliveira Petkowicz  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Polissacarídeos. 2. Galactanas. 3. Frutas. I. Título II. Petkowicz, Carmem Lucia de Oliveira. III Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

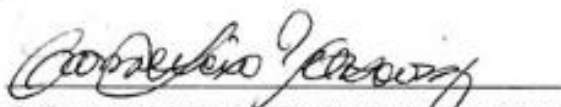
CDD (20. ed.) 574.192

## TERMO DE APROVAÇÃO

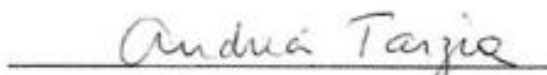
SAMANTHA SHAROL KIENTEKA

### "EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS FRUTOS DE *Sicana odorifera*"

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica - Área de Concentração Química de carboidratos, Linha de Pesquisa em Bioquímica e Biotecnologia de Glicocompostos do Departamento de Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

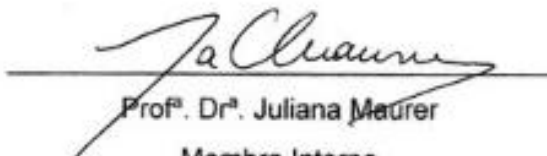


Profª. Drª. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz (Orientadora)



Profª. Drª. Andrea Tarzia

Membro Externo



Profª. Drª. Juliana Maurer

Membro Interno

Curitiba, 27 de março de 2014.

Aos meus pais, Marilson e Cibele  
pelo maior exemplo de amor e  
dedicação com seus filhos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, pela minha saúde, por me abençoar todos os dias.

Aos meus amados pais, Marilson e Cibele, devo muito mais do que agradecimentos, devo parte desta conquista a vocês. Obrigada pelo amor incondicional, carinho, apoio, incentivo, paciência e por acreditarem em mim, por me proporcionar a estudar e chegar até aqui. Obrigada por fazer dos meus dias melhores e mais felizes. Vocês são a base de tudo, meu maior orgulho! Amo vocês!

Ao meu irmão, Guilherme, com quem cresci e aprendi a dividir a atenção de nossos pais, minha infância foi muito feliz ao seu lado!

Ao Aloisio, meu melhor amigo, companheiro, sempre com carinho e atenção, se dedicando para que eu me sentisse amparada. Obrigada por tudo, pelo apoio, pelas palavras de incentivo e principalmente pelo seu amor!

Aos meus familiares, meus tios pelas conversas e carinho, minhas avós por serem tão queridas e pelas suas orações direcionadas a mim e minha família.

À minha orientadora, Professora Carmem, pela ajuda na correção da dissertação e por todos os ensinamentos durante o mestrado.

Às minhas amigas do laboratório de carboidratos vegetais, Marília, Cristiane, Luana, Aline, Ana Mery, pelos momentos felizes e de descontração, por manterem um ambiente tão agradável. Gostaria de fazer um agradecimento especial a Marília, que no ano que completamos 10 anos de amizade, voltamos a conviver juntas, obrigada por toda ajuda no laboratório e principalmente pela sua amizade.

Agradeço aos amigos da turma de mestrado, pelas conversas e cafés na cantina na época das referatas e seminários de teses. Em especial Ester, Djuna, Tati, Shayla, Roberto, Alex, Andressa, Leilane, Melina, pelas risadas, pelos momentos alegres, conviver com vocês foi ótimo. Ester, obrigada por estar sempre presente, você foi muito importante nessa caminhada.

Aos professores do departamento, por transmitirem o conhecimento durante as aulas.

À Eliz e Rosane, pelas análises de HPSEC e GLC.

À dona Irene, por estar sempre pronta a ajudar, e também pelo carinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade do mestrado.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

É muito difícil citar todos os nomes que tiveram importância durante essa caminhada, mas quero agradecer a todos que de alguma forma participaram do desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Tudo aquilo que o homem ignora,  
não existe para ele.  
Por isso o universo de cada um,  
se resume ao tamanho de seu saber.”  
Albert Einstein

## RESUMO

A *Sicana odorifera*, conhecida popularmente como jamelão, é uma espécie nativa brasileira. Seus frutos são usados principalmente na culinária, no preparo de sucos, geléias e compotas. A casca dos frutos pode ter cor laranja-avermelhado, marrom, roxo ou preto e a polpa é amarela. Após ampla revisão bibliográfica, nenhum estudo sobre os polissacarídeos da parede celular dos frutos foi encontrado na literatura. Neste trabalho, foram investigados os polissacarídeos da polpa e da casca dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e preta. Após tratamento com etanol para inativação enzimática, a polpa e a casca foram submetidas a extrações sequenciais com água, solução de ácido cítrico e soluções de hidróxido de sódio. As frações polissacarídicas obtidas tiveram rendimento entre 0,2 e 8,4% em relação ao material bruto. Os polissacarídeos foram hidrolisados e analisados por cromatografia gasosa na forma de acetatos de alditóis para a análise dos monossacarídeos neutros. O conteúdo de monossacarídeos ácidos foi avaliado por método colorimétrico. A composição das frações obtidas por extrações aquosas indicou a presença de pectinas ramificadas principalmente por galactanas. As extrações alcalinas das cascas solubilizaram principalmente xilanas. As frações hemicelulósicas obtidas das polpas dos frutos apresentaram altos teores de xilose, galactose, glucose e arabinose. Apesar de ocorrer pequenas diferenças na composição monossacarídica das frações isoladas dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e preta, os componentes majoritários foram muito semelhantes e não foi possível detectar diferenças entre os polissacarídeos dos dois frutos. Algumas frações foram escolhidas para purificação utilizando procedimentos tais como: congelamento e degelo, tratamento enzimático para remoção de amido e ultrafiltração. Entretanto, apenas uma amostra foi purificada com sucesso. A fração extraída com ácido cítrico da polpa dos frutos de casca vermelha apresentou galactose como monossacarídeo majoritário. Esta fração foi submetida a processo de fracionamento por congelamento e degelo, que resultou no isolamento de uma fração pura. O polissacarídeo isolado apresentou 99% de galactose e a análise de metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear indicou tratar-se de uma  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) galactana. A galactana apresentou uma massa molar de  $1,756 \cdot 10^4$  g/mol, determinada por cromatografia de exclusão estérica de alta performance acoplada a detector de espalhamento de luz. A presença de uma galactana linear na forma livre em frutos é incomum, pois normalmente estes polímeros ocorrem como cadeias laterais de ramnagalacturonanas do tipo I.

**Palavras chaves:** galactana, jamelão, parede celular, polissacarídeos, *Sicana odorifera*.

## ABSTRACT

*Sicana odorifera*, popularly known as jamelão, is a Brazilian native species. Its fruits are mainly used in cooking, for preparation of juices, jellies and jams. The peel of the fruit can be orange-red, brown, purple or black and the pulp is yellow. After extensive literature review, no study was found concerning the cell wall polysaccharides from fruit of *S. odorifera*. In this work, the polysaccharides from pulp and peel from fruits of *S. odorifera* red and black peel were investigated. After treatment with ethanol to inactivating enzyme, pulp and peel were subjected to sequential extractions with water, citric acid and sodium hydroxide solutions. The polysaccharide fractions obtained had yield between 0.2 and 8.4% based on the dried crude material. The polysaccharides were hydrolyzed and analyzed. Neutral monosaccharides were analyzed by gas chromatography as alditol acetates and the content of uronic acids was evaluated by colorimetric method. The composition of the fractions obtained by aqueous extraction indicated the presence of pectins, having mainly galactans as side chains. Alkaline extraction of peels mainly solubilized xylans. The hemicellulose fractions obtained from the pulp of the fruit showed high levels of xylose, galactose, arabinose and glucose. Despite minor differences occur in the monosaccharide composition of the fractions isolated from the fruits of *S. odorifera* red and black peel, the major components were very similar and could not detect differences between the polysaccharides from the two fruits. Some fractions were chosen for purification using procedures such as: freezing and thawing, enzymatic treatment for starch removal and ultrafiltration. However, only one sample was successfully purified. The fraction extracted with citric acid from the fruit pulp of red peel had galactose as the major monosaccharide. This fraction was subjected to fractionation by freezing and thawing process, which resulted in the isolation of a pure fraction. The isolated polysaccharide showed 99% galactose and methylation analysis and nuclear magnetic resonance spectroscopy indicated that it was a  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) galactan. The galactan showed a molar mass of  $1,756 \cdot 10^4$  g/mol, determined by high performance size exclusion chromatography coupled to multiangle laser light scattering. The presence of a linear galactan in free form fruits is unusual because these polymers normally occur as side chains of type I rhamnogalacturonans.

**Keywords:** galactan, jamelão, cell wall, polysaccharides, *Sicana odorifera*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA <i>S. odorifera</i> .....	23
FIGURA 2 -	MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO 1 .....	25
FIGURA 3 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE PECTINAS .....	26
FIGURA 4 -	FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA POLPA E DA CASCA DE <i>S. odorifera</i> .....	32
FIGURA 5 -	FOTO DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA VERMELHA.....	38
FIGURA 6 -	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES PVW, PVHW, PVCA, PV2M e PV6M. A: PVW; B: PVHW; C: PVCA; D: PV2M e E: PV6M .....	41
FIGURA 7 -	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DAS FRAÇÕES CVW, CVHW, CVCA, CV2M e CV6M. A: CVW; B: CVHW; C: CVCA; D: CV2M e E: CV6M.....	44
FIGURA 8 -	FOTO DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA PRETA .....	46
FIGURA 9 -	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DAS FRAÇÕES PPW, PPHW, PPCA, PP2M e PP6M. A: PPW, B: PPHW, C: PPCA, D: PP2M, E: PP6M .....	48
FIGURA 10 -	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DAS FRAÇÕES CPW, CPHW, CPCA, CP2M e CP6M. A: CPW, B: CPHW, C: CPCA, D: CP2M e E: CP6M.....	51
FIGURA 11 -	COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ISOLADAS DA POLPA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA VERMELHA E PRETA.....	54
FIGURA 12 -	COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ISOLADAS DA CASCA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA VERMELHA E PRETA.....	55
FIGURA 13 -	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS SUBFRAÇÕES PVWI, PVWS, PVWA e PVWEL. A: PVWI, B: PVWS, C: PVWA, D: PVWEL.....	57
FIGURA 14 -	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS SUBFRAÇÕES PVHWI E PVHWS. A: PVHWI; B: PVHWS .....	58

FIGURA 15 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO PVCA EM D <sub>2</sub> O A 70 °C .....	59
FIGURA 16 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DA FRAÇÃO PVCAI2.....	61
FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO PVCAI2 EM D <sub>2</sub> O A 70°C .....	62
FIGURA 18 - ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO PVCAI2 EM D <sub>2</sub> O A 70 °C .....	63
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO DE UM SEGMENTO DE CADEIA DE GALACTANA. ....	64
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO CV2M.....	65
FIGURA 21 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DAS SUBFRAÇÕES PPCAI1, PPCAI2 e PPCAS. A: PPCAI1; B: PPCAI2; C: PPCAS .....	68

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA POLPA E CASCA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA VERMELHA .....	39
TABELA 2 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA POLPA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA VERMELHA .....	40
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA POLPA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA VERMELHA .....	41
TABELA 4 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA CASCA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA VERMELHA .....	43
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA CASCA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA VERMELHA .....	45
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA POLPA E CASCA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA PRETA .....	46
TABELA 7 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA POLPA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA PRETA .....	47
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA POLPA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA PRETA .....	49
TABELA 9 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA CASCA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA PRETA .....	50
TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA CASCA DO FRUTO DE <i>S. odorifera</i> DE CASCA PRETA .....	51
TABELA 11 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PVW E DE SUAS SUBFRAÇÕES (PVWS, PVWI, PVWA e PVWEL) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO .....	56
TABELA 12 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PVHW E DE SUAS SUBFRAÇÕES (PVHWI e PVHWS) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO .....	58

TABELA 13 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PVAC E DE SUAS SUBFRAÇÕES (PVCAI1, PVCAI2 e PVCAS) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO.....	60
TABELA 14 - COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>13</sup> C DA GALACTANA PRESENTE NA SUBFRAÇÃO PVCAI2 COM GALACTANAS DESCRITAS NA LITERATURA.....	62
TABELA 15 - COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>13</sup> C E HSQC DA FRAÇÃO PVCAI2 COMPARADOS COM A LITERATURA .....	63
TABELA 16 - COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>13</sup> C DA XILANA PRESENTE NA FRAÇÃO CV2M COM XILANAS DESCRITAS NA LITERATURA .....	66
TABELA 17 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CV2M E DE SUAS SUBFRAÇÕES (CV2MI e CV2MS) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO .....	66
TABELA 18 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PPAC E DE SUAS SUBFRAÇÕES (PPCAI1, PPCAI2 e PPCAS) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO.....	67

## LISTA DE SIGLAS

CH <sub>3</sub> I	- Iodeto de metila
CP2M	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com hidróxido de sódio 2M
CP6M	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com hidróxido de sódio 6M
CPCA	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com ácido cítrico
CPHW	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com água fervente
CPW	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com água a temperatura ambiente
CV	- Casca do fruto de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha
CV2M	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com hidróxido de sódio 2M
CV2MI	- Fração insolúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de CV2M
CV2MS	- Fração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de CV2M
CV6M	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com hidróxido de sódio 6M
CVCA	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com ácido cítrico
CVHW	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com água fervente
CVW	- Polissacarídeos da casca de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com água a temperatura ambiente
D <sub>2</sub> O	- Óxido de deutério
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
FT-IR	- Espectroscopia de infravermelho incorporando transformador Fourier
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa

GLC-MS	- Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa
HG	- Homogalacturonana
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta performance
HSQC	- Heteronuclear single quantum coherence
MALLS	- Espalhamento de luz laser multiângulos
NaBH <sub>4</sub>	- Boroidreto de sódio
NaN <sub>3</sub>	- Azida de sódio
NaNO <sub>2</sub>	- Nitrito de sódio
PP2M	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com hidróxido de sódio 2M
PP6M	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com hidróxido de sódio 6M
PPCA	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com ácido cítrico
PPCAI1	- Fração insolúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de PPCA
PPCAI2	- Fração dois insolúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de PPCA
PPCAS	- Fração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de PPCA
PPHW	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com água fervente
ppm	- Partes por milhão
PPW	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca preta extraídos com água a temperatura ambiente
PV	- Polpa do fruto de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha
PV2M	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com hidróxido de sódio 2M
PV6M	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com hidróxido de sódio 6M
PVCA	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com ácido cítrico

PVCAI1	- Fração insolúvel em água fria resultante do primeiro fracionamento por congelamento e degelo de PVCA.
PVCAI2	- Fração insolúvel em água fria resultante do segundo fracionamento por congelamento e degelo de PVCA.
PVCAS	- Fração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de PVCA.
PVHW	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com água fervente
PVHWI	- Fração insolúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de PVHW.
PVHWS	- Fração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de PVHW.
PVW	- Polissacarídeos da polpa de <i>S. odorifera</i> de casca vermelha extraídos com água a temperatura ambiente
PVWA	- Fração obtida pelo tratamento enzimático com $\alpha$ -amilase a partir do polissacarídeo PVW.
PVWEL	- Fração eluída em membrana 0,1 $\mu\text{m}$ obtida a partir do polissacarídeo PVW.
PVWI	- Fração insolúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de PVW.
PVWS	- Fração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo de PVW.
RG	- Ramnogalacturonanas
RI	- Índice de refração
RMN- <sup>13</sup> C	- Ressonância magnética nuclear de carbono treze
TFA	- Ácido trifluoracético

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1. OBJETIVO GERAL .....	21
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
2.1. <i>Sicana odorifera</i> .....	23
2.2. PAREDE CELULAR VEGETAL .....	24
2.3. POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS .....	27
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1. OBTENÇÃO DOS FRUTOS DE <i>Sicana odorifera</i> .....	30
3.2. PREPARO DA AMOSTRA.....	30
3.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTOS .....	30
3.3.1 Determinação do teor de açúcar total .....	30
3.3.2 Determinação de amido total .....	30
3.3.3 Hidrolise da polpa e da casca dos frutos .....	31
3.4. INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA .....	31
3.5. EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	31
3.6. FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	32
3.6.1 Fracionamento por congelamento e degelo.....	32
3.6.2 Fracionamento por ultrafiltração .....	33
3.6.3 Remoção enzimática do amido.....	33
3.7. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS .....	33
3.7.1 Monossacarídeos neutros.....	33
3.7.2 Monossacarídeos ácidos .....	34
3.8. ANÁLISE DE METILAÇÃO .....	34
3.9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	35
3.9.1 Cromatografia líquida-gasosa (GLC) .....	35

3.9.2 Cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-MS).....	35
3.9.3 Cromatografia de exclusão estérica de alta performance acoplada a detector de espalhamento de luz laser de multiângulos e detector diferencial de índice de refração (HPSEC-MALLS-RI) .....	35
3.10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS .....	36
3.10.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	36
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1. <i>Sicana odorifera</i> DE CASCA VERMELHA.....	38
4.1.1 Isolamento dos polissacarídeos da polpa do fruto de <i>Sicana odorifera</i> de casca vermelha .....	39
4.1.2 Isolamento dos polissacarídeos da casca do fruto de <i>Sicana odorifera</i> de casca vermelha .....	42
4.2. <i>Sicana odorifera</i> DE CASCA PRETA.....	46
4.2.1 Isolamento dos polissacarídeos da polpa do fruto de <i>Sicana odorifera</i> de casca preta.....	47
4.2.2 Isolamento dos polissacarídeos da casca do fruto de <i>Sicana odorifera</i> de casca preta.....	49
4.3 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ISOLADAS DOS FRUTOS DE <i>Sicana odorifera</i> DE CASCA VERMELHA E PRETA .....	52
4.4 PURIFICAÇÃO .....	55
4.4.1 Fração PVW .....	55
4.4.2 Fração PVHW .....	57
4.4.3 Fração PVCA.....	59
4.4.4 Fração CV2M.....	65
4.4.5 Fração PPCA.....	66
<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
5.1. CONCLUSÕES.....	71
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira é considerada a de maior variedade de espécies do planeta, no entanto, está entre os biomas menos explorados e o mais ameaçado de extinção (WANDERLEY *et al.*, 2003). A preservação das espécies nativas que compõe estes biomas depende muito de pesquisas que envolvam a utilização de seus frutos e sementes (SOUZA, 2006), os quais além do uso como alimentos *in natura* podem ter importância farmacêutica (OLIVEIRA; AKISUE, 2005). Entre os diversos ecossistemas encontrados no Brasil, a Amazônia se destaca pela sua grandeza e biodiversidade. Suas áreas inundáveis apresentam uma grande diversidade de espécies que são desconhecidas até mesmo pelos moradores da região. Muitas dessas espécies contribuem de forma direta e indireta como fonte de alimento da população local (MAIA, 2001). Entre estas espécies destacamos, a *Sicana odorífera*, uma espécie nativa ainda pouco conhecida, cujos frutos são consumidos principalmente na forma de geléias e compotas (JARAMILLO *et al.*, 2011).

Os frutos são conhecidos como fontes de nutrientes e fibras. Neste último grupo estão incluídos os polissacarídeos da parede celular (BUCKERIDGE; TINE, 2001). Os polissacarídeos são moléculas de grande interesse, pois apresentam diversas aplicações industriais (NISHINARI; TAKAHASHI, 2003). Além disto, trabalhos recentes têm demonstrado que estas moléculas podem estar implicadas em diferentes tipos de atividade biológica (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; NOAMAN *et al.*, 2008; ROSÁRIO *et al.*, 2008). As propriedades, aplicações e atividade biológica dos polissacarídeos estão relacionadas às suas características estruturais. Assim, as informações sobre os polissacarídeos presentes nos frutos de *S. odorífera* podem contribuir para o desenvolvimento de novas aplicações para estes frutos.

## 1.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar os polissacarídeos solúveis do fruto de *S. odorifera*.

## 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os polissacarídeos da polpa e da casca dos frutos do *S. odorifera* de casca vermelha e de casca preta através de extrações sequenciais utilizando diferentes solventes.
- Caracterizar as frações obtidas quanto à composição monossacarídica.
- Avaliar a homogeneidade das frações através de cromatografia de exclusão estérica de alta performance.
- Purificar e caracterizar estruturalmente as frações de interesse.
- Determinar se existe diferença entre os polissacarídeos dos frutos do *S. odorifera* de casca vermelha e de casca preta.

# **CAPÍTULO 2**

---

**REVISÃO DA LITERATURA**

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Sicana odorifera*

A classificação taxonômica da espécie vegetal em estudo, segundo a classificação botânica APG (Angiosperm Phylogeny Group) III (STEVENS, 2012) é:

Reino: Plantae

Clado: Angiospermas

Clado: Eudicotiledôneas

Clado: Rosideas

Clado: Fabidae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Cucurbitales

Família: Cucurbitaceae

Gênero: *Sicana*

Espécie: *Sicana odorifera*

A *S. odorifera* é uma espécie nativa, cuja área de ocorrência compreende as regiões Norte, mais especificamente o estado do Amazonas, Nordeste no estado de Pernambuco, Centro-Oeste no estado de Goiás e na região Sudeste nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (GOMES-KLEIN; LIMA; GOMES-COSTA, 2009). A Figura 1 mostra as principais regiões onde o fruto é encontrado.

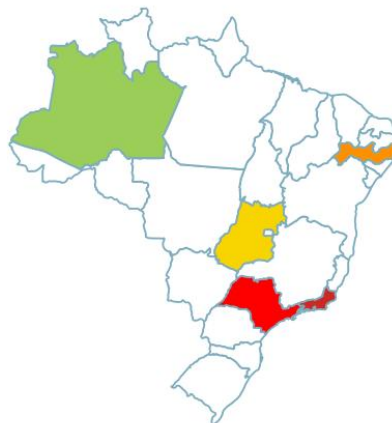


FIGURA 1 – ÁREA DE DISTRIBUIÇÃO DA *S. odorifera*.  
FONTE: GOMES-KLEIN, LIMA, GOMES-COSTA; 2009

É uma espécie perene e de crescimento rápido cujos frutos maduros apresentam aroma intenso e agradável. É conhecida popularmente como melão de caroá, jamelão, cruá amarelo, melão caboclo, melão de odor e cassabanana. O fruto apresenta um formato oval, quase cilíndrico e pode medir entre 30 a 60 cm de comprimento. Sua casca é muito dura, possuindo uma cor escura, laranja-avermelhado, marrom, roxo ou preto e a polpa é amarela. Os frutos são utilizados principalmente para fins culinários como no preparo de geléias e compotas (JARAMILLO *et al.*, 2011).

Os frutos são usados para fazer sucos e geléias, além disso, por apresentarem um perfume intenso e agradável, que lembra o aroma de maçã e de maracujá, e por terem uma durabilidade pós-colheita bastante grande (podem durar mais de seis meses depois de colhidos) os frutos inteiros *in natura* são colocados no interior de guarda-roupas ou em salas que permanecem por muito tempo fechadas, para aromatização do ambiente (BARBIERI *et al.*, 2006).

Em relação à composição dos frutos, poucos trabalhos foram encontrados na literatura. Foi descrita a presença de flavonóis e antocianinas com atividade antioxidante na casca dos frutos (JARAMILLO *et al.*, 2011). Compostos aromáticos livres e na forma de glicoconjugados envolvidos na formação de aroma foram isolados e caracterizados da polpa dos frutos (PARADA; DUQUE; FUJIMOTO, 2000). Entretanto, após ampla revisão bibliográfica, nenhum estudo sobre os polissacarídeos da parede celular dos frutos foi encontrado na literatura.

## 2.2. PAREDE CELULAR VEGETAL

Além do amido, o principal polissacarídeo de reserva das plantas, os vegetais contêm polissacarídeos estruturais, presentes na parede celular. Os polissacarídeos, proteínas e algumas substâncias aromáticas fazem parte de uma estrutura altamente organizada, denominada de parede celular. A parede celular conta com diferentes tipos de polissacarídeos, os quais podem ser divididos em três classes, a celulose, as hemiceluloses e as pectinas, cada uma com sua função, porém interagindo entre si (BUCKERIDGE; TINE, 2001) (Figura 2).

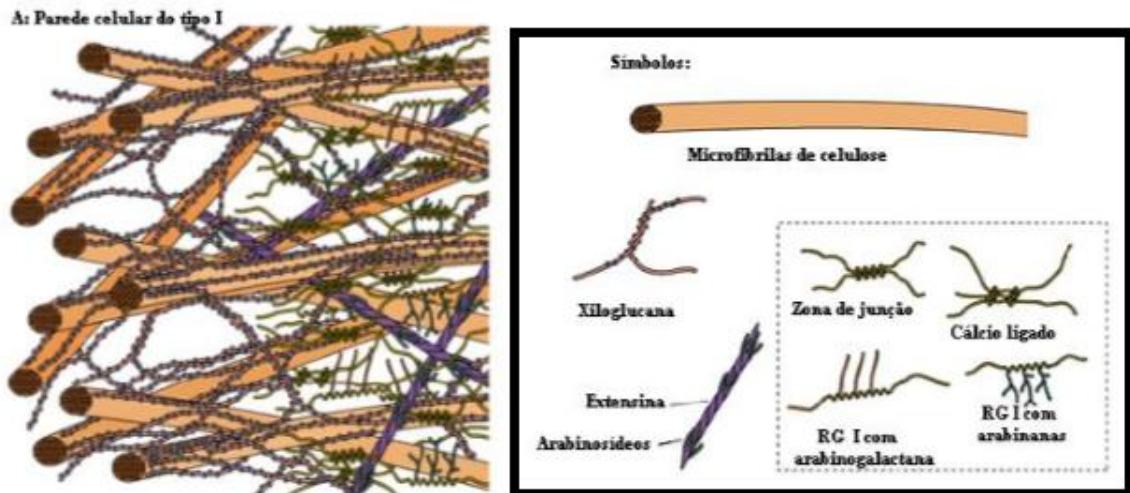


FIGURA 2 – MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO 1

FONTE: ADAPTADO DE: CARPITA, N; Mc CANN, M., 2000, p.81. The cell wall.

É na divisão celular que surge a parede celular primária, que durante a sua expansão aumenta a área de superfície. A lamela média forma uma interface entre a parede primária e as células vizinhas. Na diferenciação, dentro da parede primária, muitas células elaboram a parede celular secundária, construindo uma estrutura complexa que se adéqua a função celular (CARPITA; MCCANN, 2000).

A celulose é o mais abundante polissacarídeo das plantas, contabilizando de 15% a 30% de massa seca da parede celular primária e o mesmo percentual para a parede celular secundária. A celulose existe na forma de microfibrilas, as quais formam conjuntos cristalinos de cadeias de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) glucanas (REID, 1997; CARPITA; MCCANN, 2000).

As hemiceluloses são a classe de polissacarídeos que interagem por ligação de hidrogênio com as microfibrilas de celulose. É um termo usado para aqueles materiais extraídos de parede celular com soluções alcalinas, independentemente da conformação (CARPITA; MCCANN, 2000). Os principais polissacarídeos pertencente à classe das hemiceluloses são as glucoarabinoxilanas e as xiloglucanas. Porém outras hemiceluloses, como galactomananas, glucomananas, galactoglucomananas e mananas também podem ocorrer em menores proporções (REID, 1997; CARPITA; MCCANN, 2000; BUCKERIDGE; TINE, 2001). As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido D-galacturônico e tem sido definido como material extraído da parede celular com água ou agentes quelantes como oxalato de

amônia ou EDTA (REID, 1997). Estes polissacarídeos estão presentes na lamela média e na parede celular primária. As pectinas atuam na regulação da adesão célula-célula na lamela média, determinam a porosidade da parede, definem a modulação do pH, operam no balanceamento iônico, agindo também no reconhecimento molecular (REID, 1997; CARPITA; MCCANN, 2000; BUCKERIDGE; TINE, 2001). São muito usados industrialmente, principalmente em produtos alimentícios devido as suas propriedades espessantes e gelificantes (MOHNEN, 2008).

Dois constituintes fundamentais das pectinas são as homogalacturonanas (HG) e as ramnogalacturonanas (RG), representados na Figura 3. As RG, por sua vez, são divididas em RGI e RGII. A RGI é constituída de uma cadeia linear de ácido galacturônico intercalada com ramnose, ramificada usualmente com galactanas, arabinanas e/ou arabinogalactanas. A RGII é uma estrutura complexa, cuja cadeia principal consiste de uma homogalacturonana com cadeias laterais contendo açúcares raros como apiose, ácido acérico, 2-O-metilfucose, 2-O-metilxilose, ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico (Kdo) e ácido 3-deoxi-D-lixo-heptulosárico (Dha). Em algumas espécies foram identificadas outras homogalacturonanas substituídas, as xilogalacturonanas e apiogalacturonanas (CARPITA; MCCANN, 2000; WILLATS *et al.*, 2000; BUCKERIDGE; TINE, 2001).

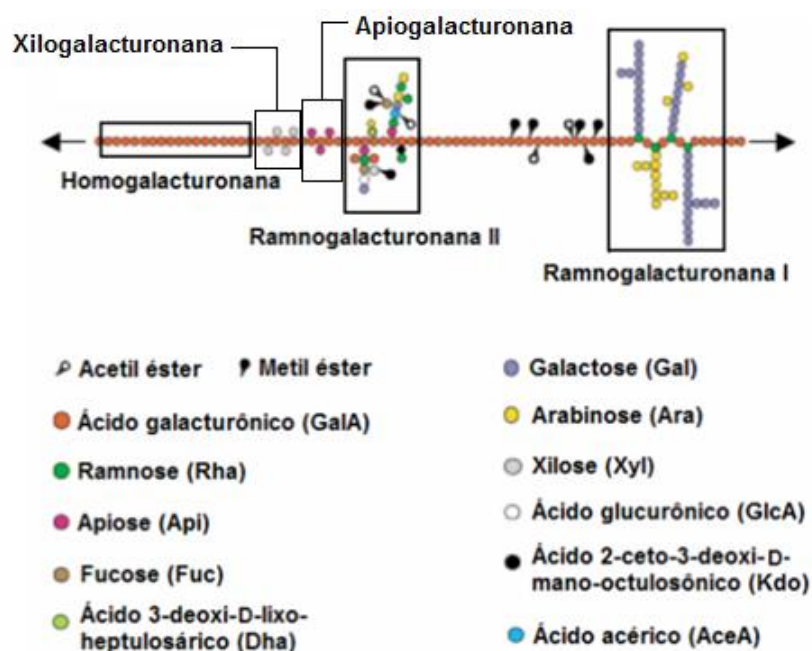


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE PECTINAS.  
 FONTE: Adaptado de WILLATS *et al.*, 2006.

### 2.3. POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS

Polissacarídeos de alguns frutos nativos já foram investigados, tais como: o *Theobroma grandiflorum Schumann* (cupuaçu) (VRIESMANN; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, 2009), *Myrciaria tenella, Berg* (cambuí) (VRIESMANN *et al.*, 2004) e *Campomanesia xanthocarpa* (gabioba) (SANTOS *et al.*, 2010). Destes frutos foram isoladas frações ricas em ácidos urônicos, devido a presença de pectinas.

Dos frutos de *Myrciaria tenella Berg* foram isolados polissacarídeos utilizando diferentes tipos de extrações. As frações extraídas com água e EDTA continham principalmente HG, enquanto que RG foram extraídas com carbonato de sódio (VRIESMANN *et al.*, 2004).

Os polissacarídeos extraídos dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa Berg* com ácido cítrico (0,5 e 5%) e a temperatura (50 e 100°C) apresentaram teores elevados de ácidos urônicos, arabinose, galactose e ramnose caracterizando a presença de pectinas (SANTOS *et al.*, 2010).

Análises do suco do fruto de *Morinda citrifolia* demonstraram que os principais polissacarídeos solúveis presentes neste fruto são HG e RG com cadeias laterais neutras de arabinogalactanas e arabinanas. Também estão presentes em baixos níveis arabinogalactanas-proteínas, além de traços de xiloglucanas, heteroxilanas e heteromananas (BUI; BACIC; PETTOLINO, 2006).

Arabinogalactanas-proteínas também foram encontradas nos frutos de *Prunus domestica L* (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2014).

Os principais polissacarídeos presentes nos frutos de *Citrus sinensis* foram identificados como HG, RGI, arabinogalactanas-proteínas e arabinanas. Porém a HG foi considerada o polissacarídeo predominante. Estes polissacarídeos foram extraídos dos frutos utilizando agentes quelantes e tampão acetato de sódio (PRABASARI *et al.*, 2014).

Em um estudo realizado com o fruto *Mangifera pajang Kort* foram isolados e caracterizados os polissacarídeos da polpa, sendo obtidas quatro frações principais. Uma das frações foi identificada como um polissacarídeo neutro e as demais foram identificadas como polissacarídeos ácidos (AL-SHERAJI *et al.*, 2012).

Dos frutos de *Litchi chinensis Sonn* foram isoladas por extração aquosa a 30°C, frações polissacarídicas neutras, constituídas principalmente por manose,

galactose e arabinose. Diferentes frações de polissacarídeos extraídas e purificadas do fruto em questão exibiram atividade antioxidante (YANG *et al.*, 2006).

Dos frutos de *Citrullus lanatus* (melancia), pertencente família Cucurbitaceae assim como a *S. odorífera*, foram isoladas por extração alcalina, frações pécticas de xilogalacturonana, homogalacturonana e ramnogalacturonana (MORT *et al.*, 2008).

Polissacarídeos da parede celular do fruto de *Lycium ruthenicum*, extraídos com água a 70°C, apresentaram como principais componentes, galactose, glucose e arabinose (PENG *et al.*, 2012). Após fracionamento, os autores isolaram uma arabinogalactana-proteína altamente ramificada, com cadeias laterais contendo arabinose, xilose, manose e glucose (PENG *et al.*, 2012). Já a extração com água a 100°C dos frutos de *Schisandra sphenanthera*, resultou no isolamento de um polissacarídeo contendo glucose, manose e galactose (ZHAO *et al.*, 2014).

# **CAPÍTULO 3**

---

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS FRUTOS de *Sicana odorifera*

Os exemplares dos frutos de *S. odorifera* utilizados neste trabalho foram adquiridos no Mercado Municipal de Curitiba, na loja de comércio de frutas, frutas exóticas e verduras M. Yanasaki Cia LTDA, no mês de outubro de 2012.

#### 3.2 PREPARO DA AMOSTRA

A casca dos frutos *in natura* foi removida com o auxílio de uma faca e a polpa foi separada manualmente das sementes, o material foi cortado em pequenos pedaços, congelado e liofilizado. A casca e a polpa dos frutos secos foram trituradas utilizando gral e pistilo até formar um pó e armazenados a 4°C até o momento do uso.

#### 3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FRUTOS

##### 3.3.1 Determinação do teor de açúcar total

Foi utilizado o método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) para quantificar o teor de carboidrato na polpa do fruto, usando padrão de galactose em concentrações de 20-100 µg/ml e a leitura no espectrofotômetro realizada em comprimento de onda de 490 nm.

##### 3.3.2 Determinação de amido total

A determinação de amido total foi feita utilizando o Kit Megazime de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.3.3 Hidrólise da polpa e da casca dos frutos

A hidrólise da polpa e da casca dos frutos foi realizada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% (p/p), durante 1 hora em banho de gelo e agitação, seguido de diluição para 8% a  $100^\circ\text{C}$ , durante 6 horas. Ao final da hidrólise o ácido foi neutralizado com carbonato de bário ( $\text{BaCO}_3$ ) e o sal resultante removido por filtração. Os monossacarídeos foram analisados conforme a metodologia que será descrita no item itens 3.7 e 3.9.1.

### 3.4 INATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

A polpa e a casca foram submetidas à inativação enzimática, utilizando 100 g da polpa em um litro de etanol, em ebulição sob refluxo por 20 minutos. O material foi centrifugado, e o resíduo foi lavado com etanol, e seco em estufa a vácuo. O resíduo seco foi então utilizado para as extrações dos polissacarídeos.

### 3.5 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Após a inativação enzimática da polpa e da casca dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e de casca preta, as amostras foram submetidas a extrações sequenciais conforme o fluxograma indicado na Figura 4. Primeiramente foram realizadas extrações aquosas à temperatura ambiente por 4 horas e sob ebulição, por 2 horas. Na sequência o material residual foi extraído com ácido cítrico 5%, sob ebulição, por 1 hora, seguido das extrações com hidróxido de sódio 2M e 6M na presença de boridreto de sódio, na temperatura de  $60^\circ\text{C}$  durante 2 horas.

Após cada extração, os extratos eram separados por centrifugação e então precipitados com etanol três volumes, permanecendo sob-refrigeração de um dia para o outro. O material era então centrifugado para isolamento dos polissacarídeos, que eram lavados três vezes com etanol e secos em estufa a vácuo à temperatura ambiente. Os polissacarídeos obtidos pelas extrações ácidas e alcalinas foram

ressolubilizados em água e dialisados por 48 horas. Após a diálise, o material era concentrado em evaporador rotatório e liofilizado.

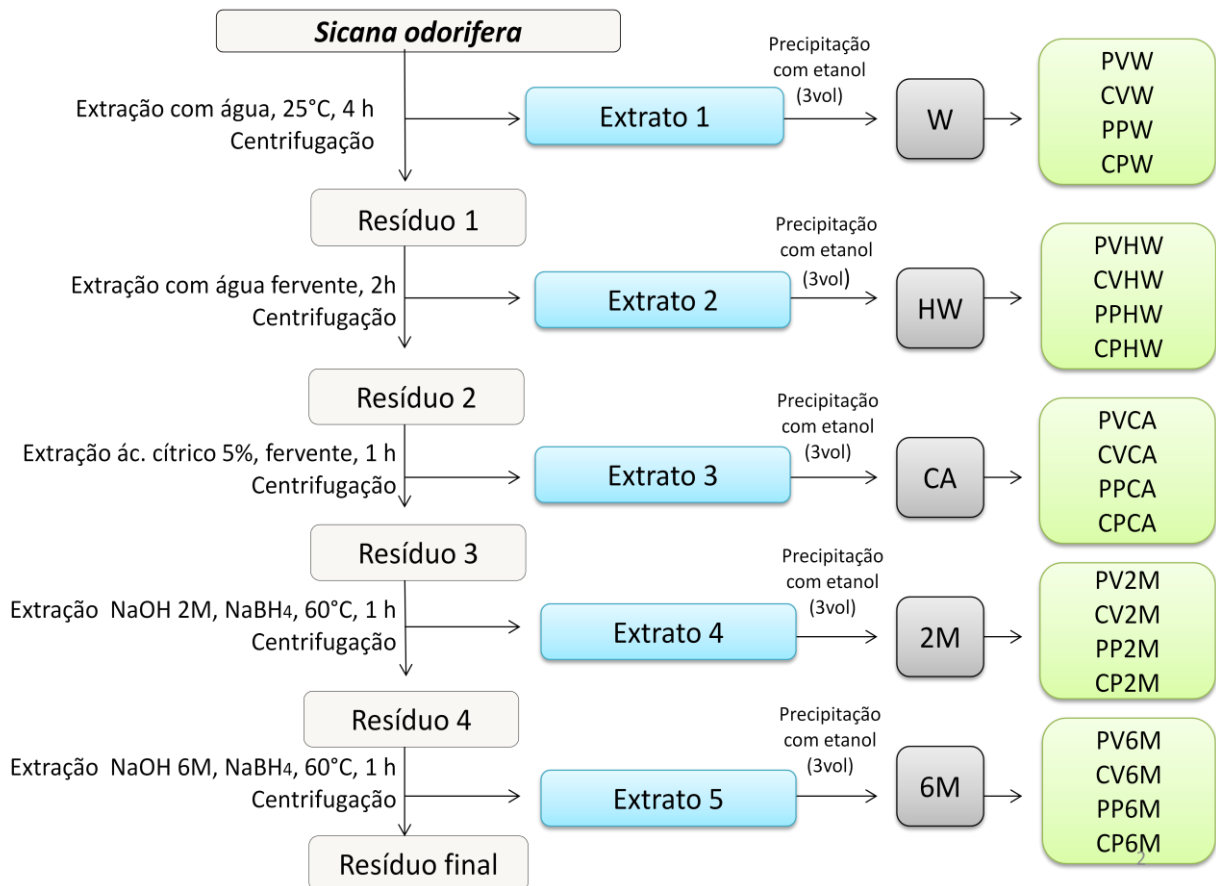


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA POLPA E DA CASCA DE *S. odorifera*.  
 FONTE: O autor (2014).

### 3.6 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

#### 3.6.1 Fracionamento por congelamento e degelo

A amostra PVCA foi solubilizada em água destilada a uma concentração de 5 mg/ml e então congelada. Posteriormente o material foi descongelado a temperatura ambiente, a fração insolúvel (PVCAI1 e PVCAI2) em água fria foi separada do sobrenadante solúvel (PVCAS) por centrifugação (15 min, 4°C, 12000 rpm). O processo foi repetido até que não houvesse mais a formação de precipitado

insolúvel por este procedimento. Esse fracionamento foi realizado também com as frações PVW, PVHW, CV2M e PPCA.

### 3.6.2 Fracionamento por ultrafiltração

A amostra PVW foi solubilizada em água na concentração de 1mg/ml, depois foi filtrada por um sistema de filtração acoplado a um cilindro de ar comprimido, sendo utilizada uma membrana de 0,1  $\mu\text{m}$ . Após o procedimento, a amostra filtrada foi denominada PVWEL.

### 3.6.3 Remoção enzimática do amido

Para remoção do amido, o polissacarídeo da fração PVW foi solubilizado numa concentração de 10 mg/ml de tampão fosfato 20 mM, pH 6,9 contendo 6,7 mM de NaCl. Foram utilizados 40  $\mu\text{l}$  de cada uma das enzimas  $\alpha$ -amilase termoestável (Sigma) e amiloglicosidase (Megazyme). A reação foi mantida em agitação durante duas horas à temperatura de 55°C. Posteriormente, a solução foi fervida por 15 minutos (banho-maria) e o material foi centrifugado e o sobrenadante precipitado com quatro volumes de etanol, ficando sob refrigeração durante 72 horas. Em seguida, foi novamente centrifugado, o resíduo lavado uma vez com etanol, ressolubilizado em água e dialisado por 48 horas em membrana com limite de exclusão de 12000 Da, resultando na fração de polissacarídeo livre de amido PVWA.

## 3.7 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS

### 3.7.1 Monossacarídeos neutros

Para a determinação dos monossacarídeos neutros, os polissacarídeos foram hidrolisados com ácido trifluoracético (TFA) 2M, a 100°C, durante 8 horas. Em

seguida o ácido foi removido por evaporação, e o hidrolisado foi solubilizado em água, e submetido à redução com boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) por 12 horas sob refrigeração (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). A solução foi então tratada com resina catiônica para remoção dos íons sódio, filtrada e seca em evaporador rotatório. Posteriormente, foi lavada com metanol e novamente seca. Os alditois foram acetilados com uma mistura piridina e anidrido acético (1:1 v/v), por 24 h a 25° C (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Essa reação foi interrompida com a adição de gelo picado, e os acetatos de alditois foram extraídos com clorofórmio, sendo essa fase lavada sucessivamente com solução de  $\text{CuSO}_4$  5% (m/v) e água para remoção da piridina residual. Os acetatos de alditol resultantes foram analisados por cromatografia líquido-gasosa.

### 3.7.2 Monossacarídeos ácidos

A dosagem de ácidos urônicos foi realizada pelo método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973), utilizando o ácido galacturônico como padrão nas concentrações de 5-100  $\mu\text{g/mL}$  e a leitura realizada em comprimento de onda de 520 nm.

## 3.8 ANÁLISE DE METILAÇÃO

A amostra PVCAI2 foi metilada duas vezes de acordo com o método desenvolvido por Ciucanu e Kerek (1984). O polissacarídeo (10 mg) foi solubilizado em 1 mL de dimetil-sulfóxido, sob agitação. Foi adicionado 20 mg de NaOH pulverizado e seco, e a seguir acrescentou-se 1 mL de  $\text{CH}_3\text{I}$ . A solução permaneceu sob agitação por 6 minutos e então foi adicionado 1 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio a fim de extrair o metilado, e a fase com clorofórmio foi lavada três vezes com 10 ml de água destilada e evaporada em atmosfera de nitrogênio.

O material metilado foi hidrolisado com 1 mL de ácido fórmico a 90% (v/v), em banho fervente por uma hora. Posteriormente foi adicionado 1 mL de TFA 3 M e a amostra permaneceu por mais duas horas em banho fervente. O ácido foi evaporado

a temperatura ambiente e o metilado foi ressuspenso em água destilada, reduzido com  $\text{NaBH}_4$  e acetilado conforme descrito no item 3.7.1. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GLC-MS e identificados de acordo com seus tempos de retenção e perfis de fragmentação.

### 3.9 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

#### 3.9.1 Cromatografia líquida-gasosa (GLC)

As análises de acetatos de alditóis foram realizadas em cromatógrafo THERMO Trace GC, coluna capilar DB-225, com detector por ionização de chama (FID). A temperatura da coluna foi de 100°C durante a injeção, e então programada para 60°C/min até atingir 230°C (temperatura constante) e a temperatura do injetor de 250°C. Nitrogênio foi usado como gás de arraste a 2 mL/min.

#### 3.9.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (GLC-MS)

As análises foram realizadas em cromatógrafo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN-MAT, com injetor a 50°C e “rampa” de 40°C por minuto até 220°C, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i) revestidas com DB-225 ou DB 210 e Hélio como gás de arraste (1 mL/min).

#### 3.9.3 Cromatografia de exclusão estérica de alta performance acoplada a detector de espalhamento de luz laser de multiângulos e detector diferencial de índice de refração (HPSEC-MALLS/RI)

Para as análises de homogeneidade e massa molar foi utilizado um equipamento constituído por uma bomba (Waters 515), injetor, 4 colunas de ultrahydrogel – 120, 250, 500 e 2000, um detector de espalhamento de luz DAWN DSP Light Scattering (Wyatt Technology) e um detector de índice de refração

diferencial modelo 2410 (Waters). O solvente utilizado foi uma solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 M contendo 200 ppm de  $\text{NaN}_3$ . As amostras foram solubilizadas na concentração de 1,5 mg/ml e filtradas em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . Os cálculos foram efetuados utilizando o programa ASTRA.

### 3. 10. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

#### 3.10.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas em espectrômetro de modelo Bruker Avance DRX400 (Bruker), em frequências base de 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), e em espectrômetro de modelo Bruker Avance III 600 (Bruker Germany), com frequências base de 150 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) e 600 MHz ( $^1\text{H}$ ). A temperatura de análise foi de 70°C. As amostras foram solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$ , a uma concentração de 40 mg/mL para as análises de  $^{13}\text{C}$ , e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro externo. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando acetona como referência interna para as análises de  $^{13}\text{C}$  (30,20 ppm).

# **CAPÍTULO 4**

---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mencionado anteriormente os frutos de *S. odorifera* apresentam uma polpa amarela, mas a casca pode apresentar cor laranja-avermelhado, marrom, roxo ou preto. Para melhor visualização dos resultados, estes foram divididos em duas partes, primeiramente foram apresentados os resultados das extrações realizadas com a polpa e a casca de ambos os frutos e a comparação entre eles, e após isso os resultados dos processos de purificação das amostras.

### 4.1. *Sicana odorifera* DE CASCA VERMELHA

O fruto de *S. odorifera* de casca vermelha com massa inicial de 2,525 Kg era constituído de 18,5% de casca, 73,8 de polpa e 7,7% de sementes. O fruto apresentou um teor de água de aproximadamente 83,4% (FIGURA 5).



FIGURA 5 - FOTO DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA VERMELHA.  
FONTE: O autor (2014).

A polpa do fruto contém 64,4% de carboidratos. A tabela 1 mostra os resultados da composição monossacarídica da polpa (PV) e da casca (CV) dos frutos após a inativação enzimática. A polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha apresentou um elevado conteúdo de glicose (53,1%) o que pode sugerir a presença de amido ou até mesmo celulose, seguido de ácidos urônicos (24,9%) e cerca de 8% de manose e 8 % de galactose. Já para a casca do fruto, o maior

percentual foi para os açúcares ácidos com 43,5% indicando a presença de pectinas, seguido de xilose (23,4%), glucose (13,0%) e galactose (12,4%).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA POLPA E CASCA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA VERMELHA

Amostra	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
PV	0,8	0,3	2,7	1,4	8,4	8,3	53,1	24,9
CV	0,7	0,2	5,0	23,4	2,1	12,4	13,0	43,5

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973) PV – Polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha, CV – Casca do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha.

A dosagem enzimática do amido indicou um conteúdo de 8,0% de amido na polpa do fruto, valor inferior ao encontrado para o fruto de *Cucurbita pepo*, que apresentou 22,6% (SINGH *et al.*, 2007) e pertence a mesma família que a *S. odorifera*.

#### 4.1.1 Isolamento dos polissacarídeos da polpa do fruto de *Sicana odorifera* de casca vermelha

Para isolamento dos polissacarídeos foram realizadas cinco extrações sequenciais, as quais originaram as frações polissacarídicas denominadas: PVW (polissacarídeos extraídos com água a 25°C da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha); PVHW (polissacarídeos extraídos com água fervente da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha); PVCA (polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha); PV2M (polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha); PV6M (polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha). A tabela 2 indica os rendimentos das frações obtidas, com relação à polpa liofilizada.

TABELA 2 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA POLPA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA VERMELHA

Fração	*Rendimento (%)
PVW	8,4
PVHW	5,9
PVCA	1,8
PV2M	0,4
PV6M	0,5

\*em relação à polpa seca por liofilização.

NOTA: PVW – polissacarídeos extraídos com água a 25°C da polpa do fruto de casca vermelha; PVHW - polissacarídeos extraídos com água fervente da polpa do fruto de casca vermelha; PVCA - polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da polpa do fruto de casca vermelha; PV2M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da polpa do fruto de casca vermelha; PV6M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da polpa do fruto de casca vermelha.

As frações aquosas apresentaram os maiores rendimentos, destacando-se a fração extraída com água à temperatura ambiente com rendimento de 8,4%. As frações alcalinas tiveram rendimentos extremamente baixos, em torno de 0,5%. Os rendimentos foram similares aos obtidos para o fruto de *Myrciaria tenella* Berg com valores mais elevados para extrações aquosas e rendimentos baixos para as extrações alcalinas (VRIESMANN *et al.*, 2004).

Todas as amostras provenientes da extração sequencial foram analisadas por HPSEC-MALLS-RI e apresentaram um perfil de eluição polimodal em relação ao índice de refração, conforme mostra a figura 6.

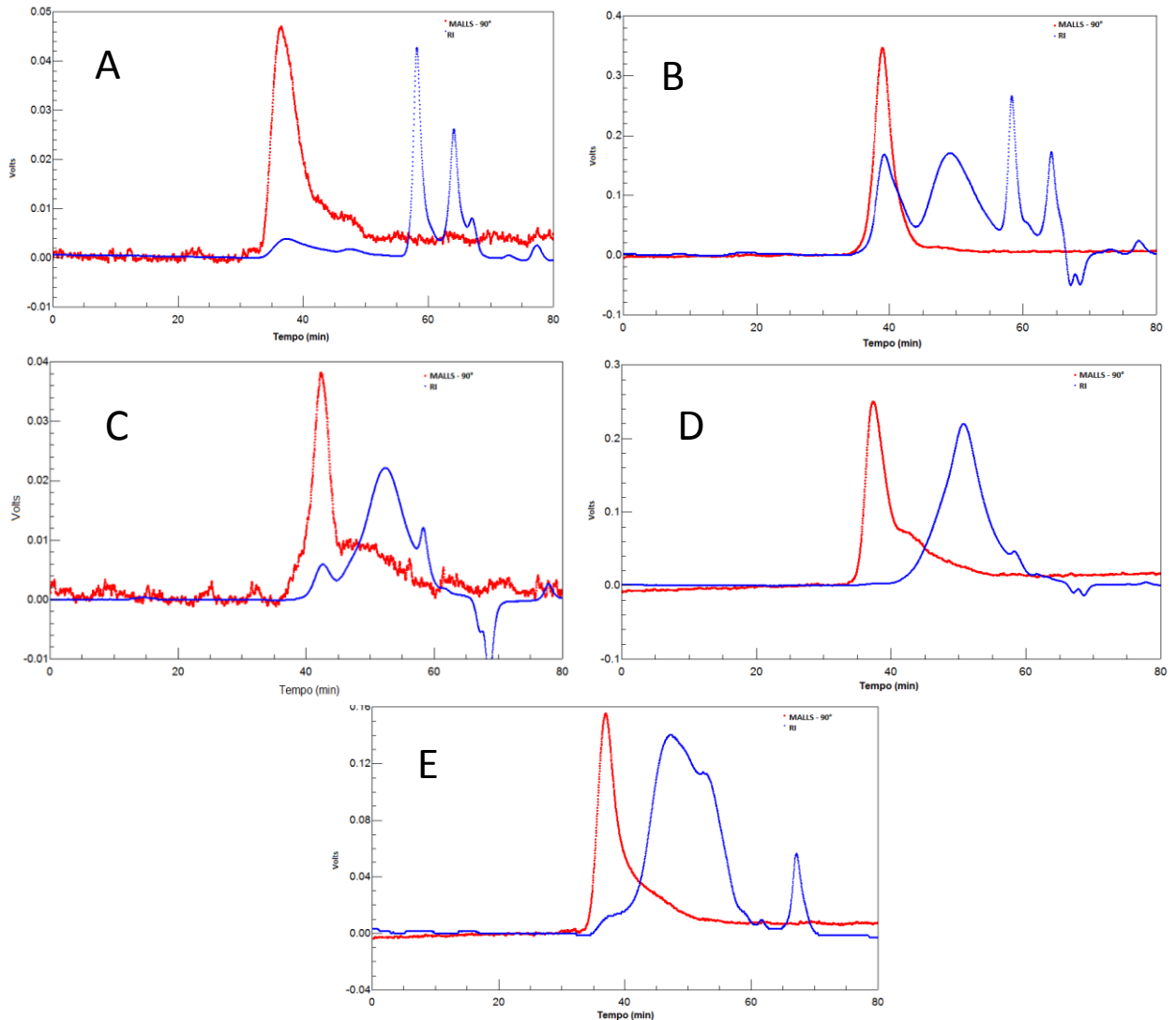


FIGURA 6 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÃO PVW, PVHW, PVCA, PV2M e PV6M. A: PVW; B: PVHW; C: PVCA; D: PV2M e E: PV6M.

NOTA: Detectores de espalhamento de luz laser multiângulos (MALLS) e índice de refração (RI).

A composição monossacarídica das frações provenientes das extrações da polpa do fruto de *S. odorifera* está apresentada na Tabela 3.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA POLPA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA VERMELHA.

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
PVW	2,1	1,1	9,6	0,5	1,6	47,0	16,8	21,3
PVHW	Tr	0,9	3,9	1,08	0,4	44,8	4,5	44,2
PVCA	1,2	Tr	4,3	0,3	0,9	70,0	5,8	17,2
PV2M	1,2	0,9	11,9	37,2	1,0	27,8	14,2	5,6
PV6M	0,2	1,6	2,0	25,4	19,8	12,2	26,5	12,3

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; PVW – polissacarídeos extraídos com água a 25°C da polpa do fruto de casca vermelha; PVHW - polissacarídeos extraídos com água fervente da polpa do fruto de casca vermelha; PVCA - polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da polpa do fruto de casca vermelha; PV2M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da polpa do fruto de casca vermelha; PV6M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da polpa do fruto de casca vermelha.

A fração PVW apresentou elevadas quantidades de galactose, seguida de ácidos urônicos, glucose, arabinose e ramnose. A fração PVHW apresentou quantidades equivalentes de galactose e ácidos urônicos, além da presença de quantidades menores de outros monossacarídeos neutros. Estes resultados sugerem a presença de pectinas nas frações extraídas com água. Estas frações foram posteriormente submetidas a procedimentos de fracionamento a fim de obter polissacarídeos pécticos e neutros isolados.

A fração PVCA destacou-se pela presença de 70% de galactose, seguida de 17 % de ácidos urônicos e 6 % de glucose. O alto percentual de galactose sugere a presença de uma galactana, que pode estar presente como cadeia lateral de uma pectina. Esta fração também foi escolhida para purificação.

As frações hemicelulósicas, PV2M e PV6M, apresentaram elevados percentuais de glucose, xilose e galactose, indicando a presença de xiloglucanas. A presença de fucose em ambas as frações corrobora esta hipótese. As xiloglucanas são as principais hemiceluloses encontradas na parede celular de dicotiledôneas e já foram identificadas em frutos de diferentes espécies (CUTILLAS-ITURRALDE *et al.*, 1998; VIERHUIS *et al.*, 2001; ABOUGHE-ANGONE *et al.*, 2008).

#### 4.1.2 Isolamento dos polissacarídeos da casca do fruto de *Sicana odorifera* de casca vermelha

Para a casca do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha foram realizadas cinco extrações sequenciais seguindo o mesmo protocolo de extração que foi utilizado para a polpa (item 4.1.1). As frações polissacarídicas foram nomeadas da seguinte maneira: CVW (polissacarídeos extraídos com água a 25°C da casca do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha), CVHW (polissacarídeos extraídos com

água fervente da casca do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha), CVCA (polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da casca do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha), CV2M (polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da casca do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha), CV6M (polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da casca do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha).

A tabela 4 mostra os rendimentos das frações obtidas da extração sequencial, com relação ao conteúdo inicial da casca liofilizada do fruto.

TABELA 4 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA CASCA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA VERMELHA

Fração	*Rendimento (%)
CVW	1,6
CVHW	2,6
CVCA	2,4
CV2M	1,4
CV6M	4,5

\*em relação à casca seca por liofilização.

NOTA: CVW – polissacarídeos extraídos com água a 25°C da casca do fruto de casca vermelha; CVHW - polissacarídeos extraídos com água fervente da casca do fruto de casca vermelha; CVCA - polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da casca do fruto de casca vermelha; CV2M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da casca do fruto de casca vermelha; CV6M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da casca do fruto de casca vermelha.

As frações polissacarídicas obtidas da casca dos frutos de *S. odorifera* tiveram rendimentos bem diferentes daqueles obtidos da polpa, nas mesmas condições de extração. Os rendimentos obtidos para os polissacarídeos extraídos da casca por extrações sequenciais variaram de 1,4% a 4,5%. O maior rendimento foi obtido para a fração hemicelulósica obtida por extração com NaOH 6M.

Todas as frações obtidas apresentaram um perfil de eluição polimodal na análise por HPSEC-MALLS/RI. Os cromatogramas estão mostrados na Figura 7.

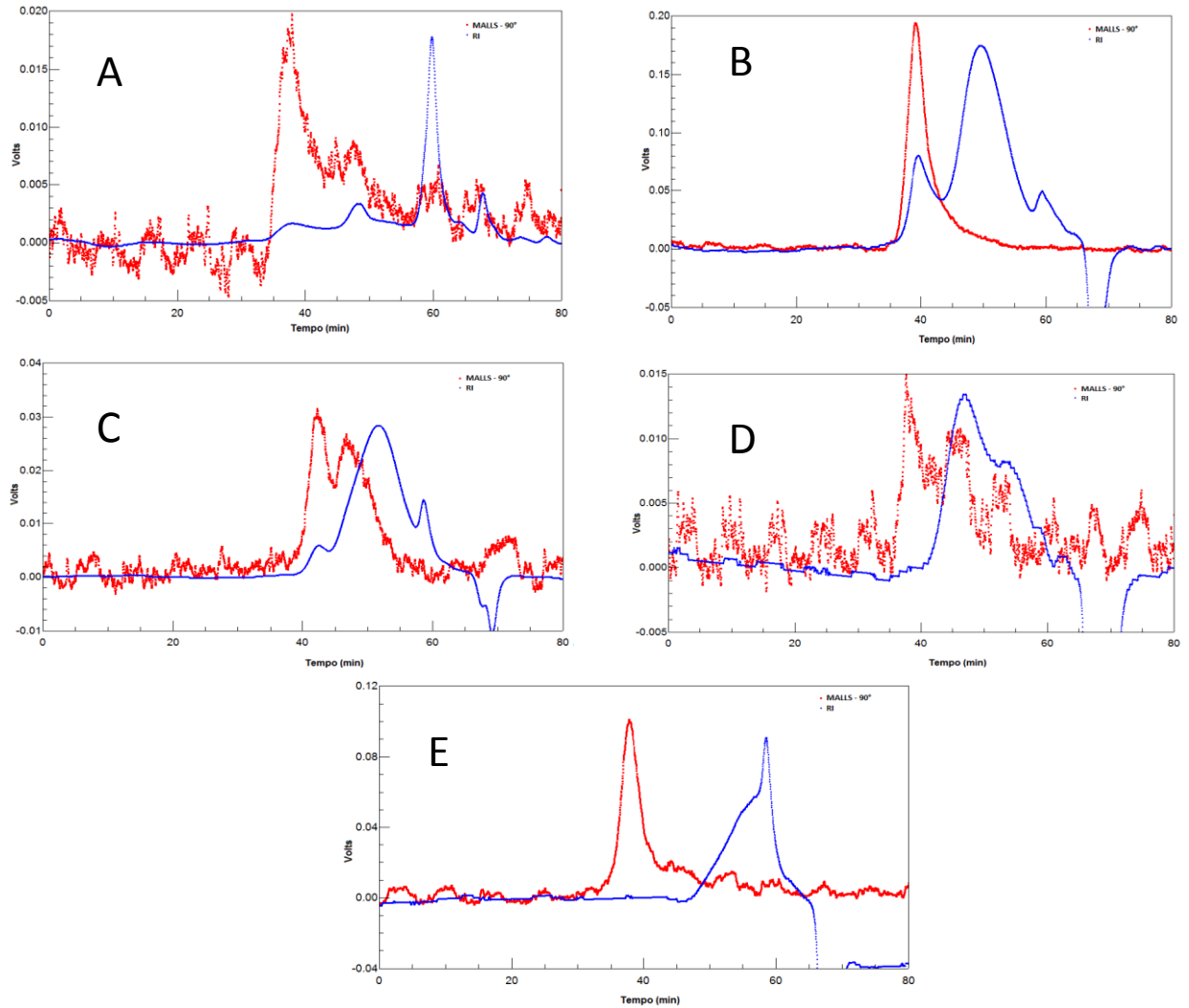


FIGURA 7 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DAS FRAÇÕES CVW, CVHW, CVCA, CV2M e CV6M. A: CVW; B: CVHW; C: CVCA; D: CV2M e E: CV6M.  
 NOTA: Detectores de espalhamento de luz laser multiangulos (MALLS) e índice de refração (RI).

A composição monossacarídica das frações obtidas por extrações sequencias da casca do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha está indicada na Tabela 5.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA CASCA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA VERMELHA.

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
CVW	Tr	Tr	37,9	5,1	1,7	29,9	14,5	10,9
CVHW	1	0,2	5,1	1,6	1,1	32,8	27,4	30,6
CVCA	1,3	0,1	9,9	4,5	1,2	37,1	36,8	9,1
CV2M	Tr	0,5	2	77,3	1,4	6,4	6,8	5,6
CV6M	0,3	Tr	3,8	76,7	0,4	7,1	2,3	9,3

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; CVW – polissacarídeos extraídos com água a 25°C da casca do fruto de casca vermelha; CVHW - polissacarídeos extraídos com água fervente da casca do fruto de casca vermelha; CVCA - polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da casca do fruto de casca vermelha; CV2M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da casca do fruto de casca vermelha; CV6M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da casca do fruto de casca vermelha.

A fração CVW apresentou elevados conteúdos de arabinose e galactose, sugerindo a presença de arabinogalactanas. Já a fração CVHW apresentou quantidades equivalentes de galactose, glucose e ácidos urônicos. A fração obtida com água fervente (CVHW) foi a que apresentou o maior teor de açúcares ácidos, sugerindo uma maior extração de pectinas nestas condições.

A fração extraída com ácido cítrico apresentou glucose e galactose como constituintes principais, em quantidades equivalentes (37% cada). É possível que esta fração também contenha uma galactana, como demonstrado para a fração equivalente da polpa (PVCA).

As frações alcalinas possuem como componente majoritário a xilose, indicando a presença de xilanas. Os valores de ácidos urônicos nestas frações variam de 5,6 a 9,3%. Resultados semelhantes foram encontrados por (DALONSO; PETKOWICZ, 2012) para sementes de guaraná, em que as frações resultantes das extrações alcalinas tiveram a xilose como componente majoritário seguido de ácidos urônicos. Devido ao elevado conteúdo de xilose, a fração CV2M foi escolhida para purificação.

#### 4.2 *Sicana odorifera* DE CASCA PRETA

O fruto de *S. odorifera* de casca preta apresentou uma massa inicial de 2,806 Kg, sendo constituído por 62,2% de polpa, 21,5 de casca e 8,6% de sementes. O fruto apresentou um teor de água de 87,7% (FIGURA 8).



FIGURA 8 - FOTO DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA PRETA.  
FONTE: O autor (2014).

A tabela 6 mostra os resultados da composição monossacarídica da polpa (PP) e da casca (CP) dos frutos após a inativação enzimática. A polpa do fruto de *S. odorifera* de casca preta, de forma semelhante a polpa do fruto de casca vermelha, apresentou um elevado conteúdo de glucose (52%), seguido de ácidos urônicos (34%). A composição da casca do fruto preto também apresentou semelhança com a do fruto de casca vermelha. Nos dois casos, o principal constituinte foram os açúcares ácidos.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARIDICA DA POLPA E CASCA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA PRETA

Amostra	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
PP	0,6	0,7	0,4	0,3	9,8	2,3	52,1	33,8
CP	2,0	6,8	1,8	9,1	11,9	3,5	29,9	34,4

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973) PP – Polpa do fruto de *S. odorifera* de casca preta, CP – Casca do fruto de *S. odorifera* de casca preta.

A fim de verificar se havia diferença entre os polissacarídeos dos frutos de *S. odorifera* com distinção na cor da casca, decidiu-se isolar também os polissacarídeos do fruto de casca preta, utilizando o mesmo protocolo empregado para os frutos de casca vermelha.

#### 4.2.1 Isolamento dos polissacarídeos da polpa do fruto de *Sicana odorifera* de casca preta

A polpa do fruto de *S. odorifera* de casca preta foi extraída conforme descrito no item 4.1.1. As frações polissacarídicas obtidas foram denominadas: PPW (polissacarídeos extraídos com água a 25°C da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca preta), PPHW (polissacarídeos extraídos com água fervente da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca preta), PPCA (polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca preta), PP2M (polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca preta), PP6M (polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca preta).

A tabela 7 mostra os rendimentos das frações obtidas nas extrações sequenciais, com relação ao conteúdo inicial da polpa liofilizada.

TABELA 7 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA POLPA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA PRETA

Fração	*Rendimento (%)
PPW	8,2
PPHW	6,6
PPCA	7,6
PP2M	0,9
PP6M	0,2

\*em relação à polpa seca por liofilização.

NOTA: PPW – polissacarídeos extraídos com água a 25°C da polpa do fruto de casca preta; PPHW - polissacarídeos extraídos com água fervente da polpa do fruto de casca preta; PPCA - polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da polpa do fruto de casca preta; PP2M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da polpa do fruto de casca preta; PP6M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da polpa do fruto de casca preta.

Os rendimentos variaram de 0,2 a 8,2%, sendo semelhante aos observados para a polpa do fruto de casca vermelha (0,4% a 8,4%). A fração extraída com água a 25°C foi a de maior rendimento em ambos os casos. O segundo maior rendimento foi obtido para a fração extraída com ácido cítrico (7,6%). Este resultado difere daquele obtido para as extrações do fruto de casca vermelha, onde os dois maiores rendimentos foram observados para as frações extraídas com água e a fração extraída com ácido cítrico apresentou rendimento de apenas 1,8%. De forma semelhante ao observado para os frutos de casca vermelha, as frações alcalinas tiveram os menores rendimentos.

Todas as frações foram submetidas a análise de homogeneidade por HPSEC-MALLS/RI, mostrando um perfil de eluição multimodal pelo índice de refração (Figura 9).

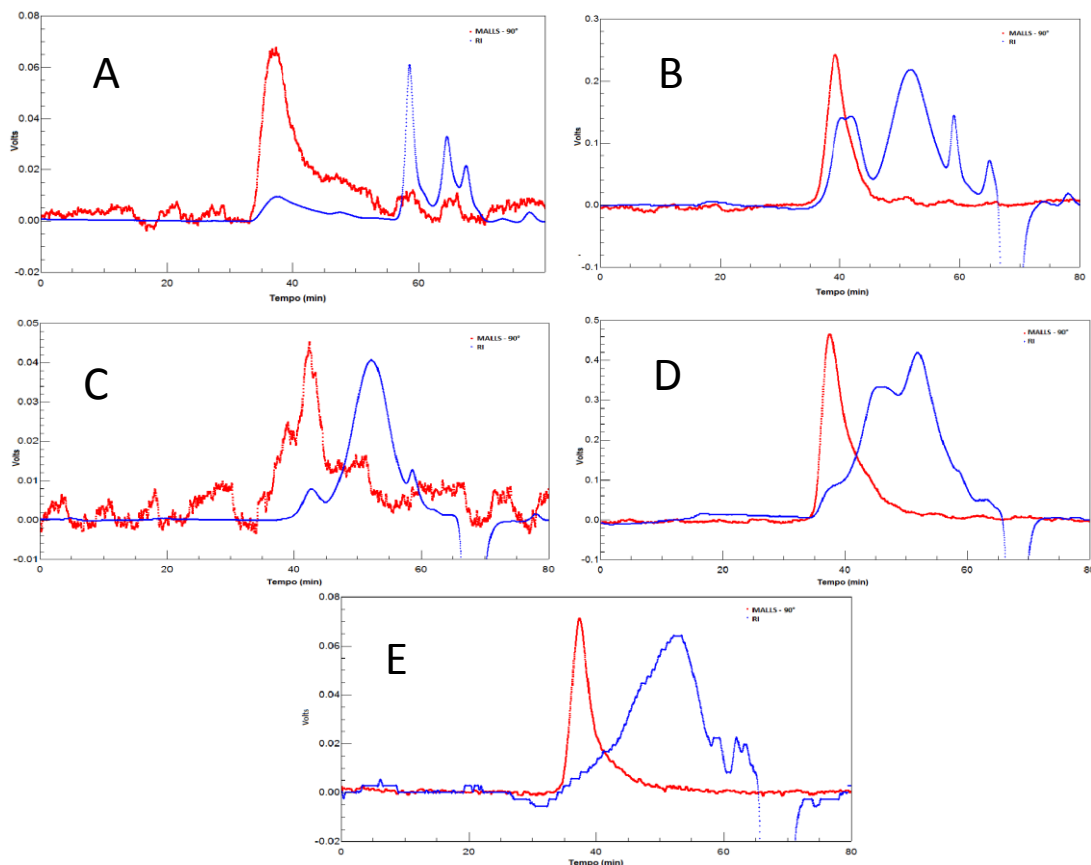


FIGURA 9 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DAS FRAÇÕES PPW, PPHW, PPCA, PP2M e PP6M. A: PPW, B: PPHW, C: PPCA, D: PP2M, E: PP6M.

NOTA: Detectores de espalhamento de luz laser multiangulos (MALLS) e índice de refração (RI).

O material obtido nas extrações foi hidrolisado e analisado por GLC na forma de acetatos de alditois, e os resultados estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA POLPA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA PRETA.

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
PPW	1	Tr	11,3	2	3,8	21,4	37,8	22,6
PPHW	0,7	0,5	11,8	2,4	1,7	26,2	5,8	50,7
PPCA	Tr	Tr	4,3	0,2	Tr	56,3	9,9	29,7
PP2M	1	1,6	11,3	37,1	1	27,9	9,5	10,7
PP6M	Tr	2,3	4,7	26,6	23,5	11,6	26,4	4,8

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; PPW – polissacarídeos extraídos com água a 25°C da polpa do fruto de casca preta; PPHW - polissacarídeos extraídos com água fervente da polpa do fruto de casca preta; PPCA - polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da polpa do fruto de casca preta; PP2M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da polpa do fruto de casca preta; PP6M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da polpa do fruto de casca preta.

A análise da Tabela 15 permite observar que as frações aquosas possuem como componentes majoritários galactose, ácidos urônicos e a fração extraída com água (25°C) possui quantidades consideráveis de glucose. A fração PPHW apresenta 51% de ácidos urônicos, indicando que é constituída de pectinas. A fração extraída com ácido cítrico apresenta galactose como componente majoritário (56%), seguida de ácidos urônicos (30%). As frações alcalinas apresentaram a xilose como componente principal, seguido de galactose, glucose e manose.

#### 4.2.2 Isolamento dos polissacarídeos da casca do fruto de *Sicana odorifera* de casca preta

Para a casca do fruto de *S. odorifera* de casca preta, foram realizadas as cinco extrações sequenciais da mesma forma que foi feito para o fruto de casca vermelha. As frações polissacarídicas obtidas foram: CPW (polissacarídeos extraídos com água a 25°C da casca do fruto de *S. odorifera* de casca preta), CPHW (polissacarídeos extraídos com água fervente da casca do fruto de *S. odorifera* de casca preta), CPCA (polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da

casca do fruto de *S. odorifera* de casca preta), CP2M (polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da casca do fruto de *S. odorifera* de casca preta), CP6M (polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da casca do fruto de *S. odorifera* de casca preta).

A tabela 9 mostra os rendimentos das frações obtidas nas extrações sequenciais, com relação ao conteúdo inicial da polpa liofilizada.

TABELA 9 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA CASCA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA PRETA

Fração	*Rendimento (%)
CPW	2,0
CPHW	2,5
CPCA	1,5
CP2M	4,9
CP6M	2,3

\*em relação à casca seca por liofilização.

NOTA: CPW – polissacarídeos extraídos com água a temperatura de 25°C da casca do fruto de casca preta; CPHW - polissacarídeos extraídos com água fervente da casca do fruto de casca preta; CPCA - polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da casca do fruto de casca preta; CP2M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da casca do fruto de casca preta; CP6M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da casca do fruto de casca preta.

Os rendimentos das extrações da casca do fruto preto variaram de 1,5 a 4,9%. Estes valores são semelhantes aos obtidos para o fruto de casca vermelha. Entretanto, a fração de maior rendimento para o fruto de casca preta foi a fração hemicelulósica extraída com NaOH 2M (CP2M), enquanto que para o fruto de casca vermelha, o maior rendimento foi obtido para a fração extraída com concentração mais elevada de álcali (NaOH 6M).

Para verificar a homogeneidade das frações foram realizadas análises em HPSEC-MALLS-RI. Como mostra a Figura 10, mais uma vez as frações se mostraram heterogêneas.

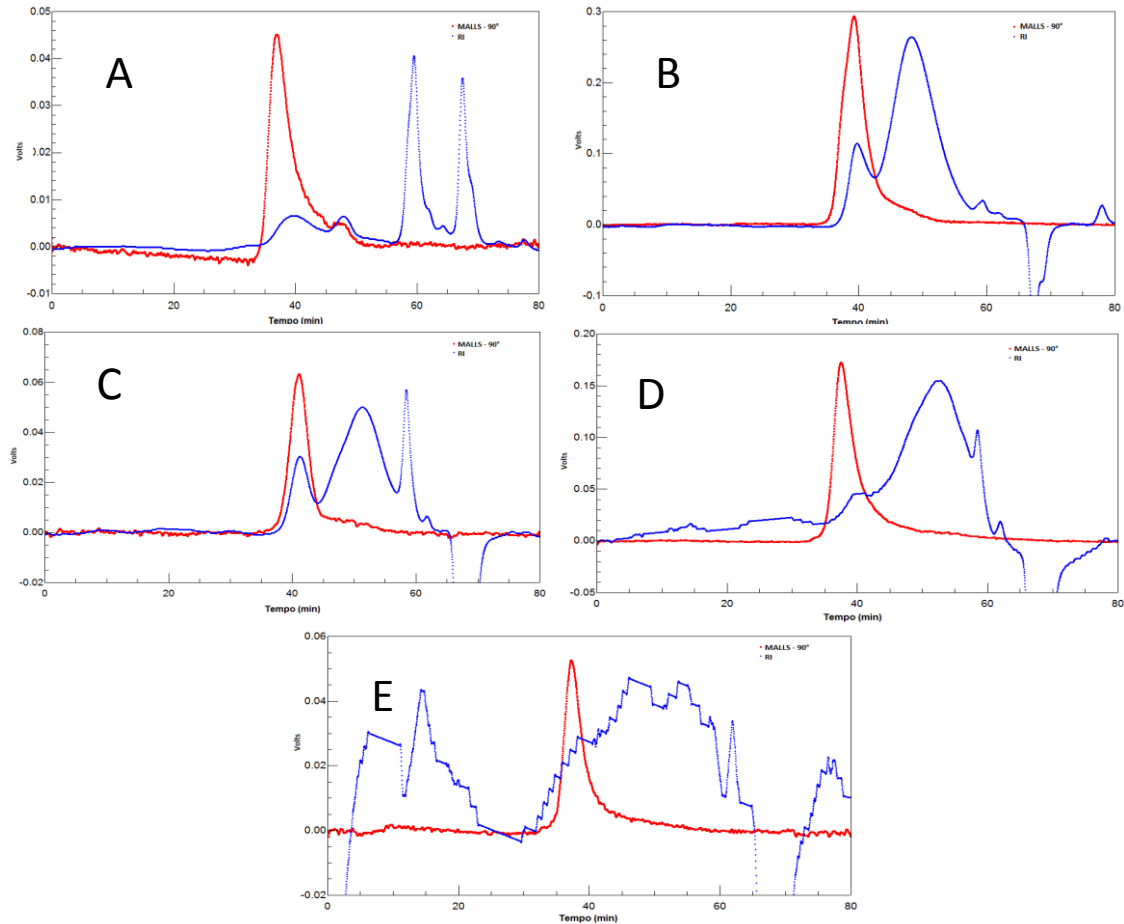


FIGURA 10 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DAS FRAÇÕES CPW, CPHW, CPCA, CP2M e CP6M. A: CPW, B: CPHW, C: CPCA, D: CP2M e E: CP6M.  
 NOTA: Detectores de espalhamento de luz laser multiangulos (MALLS) e índice de refração (RI).

O material obtido nas extrações foi hidrolisado e analisado por GLC na forma de acetatos de alditos e os resultados estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA CASCA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA PRETA.

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
CPW	Tr	2,48	20,9	17,1	0,1	36,2	7,3	15,9
CPHW	3,8	0,1	6,9	3,9	0,3	30,5	4,9	49,5
CPCA	1,4	0,9	8,4	1,4	2,3	61,8	1,7	22,1
CP2M	0,7	3,5	4,6	74,7	1	2,7	0,5	12,2
CP6M	0,6	2,1	2,8	86,6	0,2	2,9	0,9	3,7

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; CPW – polissacarídeos extraídos com água a temperatura de 25°C da casca do fruto de casca preta; CPHW - polissacarídeos extraídos com água fervente da casca do fruto de casca preta; CPCA - polissacarídeos extraídos com ácido cítrico 5% a 60°C da casca do fruto de casca preta; CP2M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 2M a 60°C da casca do fruto de casca preta; CP6M - polissacarídeos extraídos com hidróxido de sódio 6M a 60°C da casca do fruto de casca preta.

A fração CPW extraída com água a 25°C apresentou galactose como componente principal (36%), seguida de arabinose (21%) e ácidos urônicos (16%). Este resultado difere da fração obtida nas mesmas condições da casca do fruto de casca vermelha, que apresentou arabinose como principal constituinte (38%), seguida de galactose (30%) e glucose (15%).

Da mesma forma que observado para o fruto de casca vermelha, a fração extraída com água fervente, foi a que apresentou o maior conteúdo de açúcares ácidos, indicando uma maior extração de pectinas. A presença de elevados percentuais de galactose também foi observada em ambas as frações.

A fração extraída com ácido cítrico da casca dos frutos de casca preta (CPCA) apresentou 62% de galactose, diferindo da fração equivalente obtida dos frutos de casca vermelha que apresentou galactose e glucose na mesma proporção (37% cada).

As frações hemicelulósicas isoladas da casca dos frutos de casca preta se destacam pela presença de xilanas, conforme observado também para os frutos de casca vermelha.

#### 4.3 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ISOLADAS DOS FRUTOS DE *Sicana odorifera* DE CASCA VERMELHA E PRETA

Como mostra as figuras 11 e 12, as frações extraídas, da polpa e da casca dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e preta com água a 25°C (PVW, CVW, PPW e CPW), apresentaram composição semelhante, tendo como componentes principais a galactose, arabinose, glucose e ácidos urônicos. Porém, em alguns casos algumas diferenças nos percentuais destes constituintes foram observadas. A fração CVW teve como componente majoritário a arabinose, diferente da CPW onde o principal monossacarídeo foi a galactose. Já a fração PVW apresentou a galactose como monossacarídeo principal, diferente da PPW onde o principal monossacarídeo foi a glucose.

As frações extraídas da polpa e da casca dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e preta com água a temperatura de 100°C tiveram como componente majoritário, ácidos urônicos seguido de galactose, com bastante semelhança entre

os percentuais individuais, apenas a fração CVHW apresentou glucose em quantidades mais elevadas.

As frações obtidas com ácido cítrico da polpa e da casca dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e preta extraíram principalmente galactanas, mas os percentuais de galactose foram bastante variáveis entre as frações.

As frações hemicelulósicas apresentaram maiores similaridades, as frações isoladas da polpa dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e preta exibiram como principais monossacarídeos a xilose, galactose, glucose e arabinose. Já para as frações da casca, de ambos os frutos, de casca vermelha e de casca preta, o componente majoritário foi a xilose.

As pequenas diferenças percebidas entre a composição monossacarídica dos frutos pode ter sido devido às condições das extrações em função da temperatura do ambiente externo a extração. Diferenças no estágio de maturação dos frutos também poderiam gerar diferenças nos resultados.

Apesar de algumas diferenças nas frações extraídas, os componentes majoritários das frações são muito semelhantes, não permitindo detectar diferenças na composição dos polissacarídeos dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e preta.

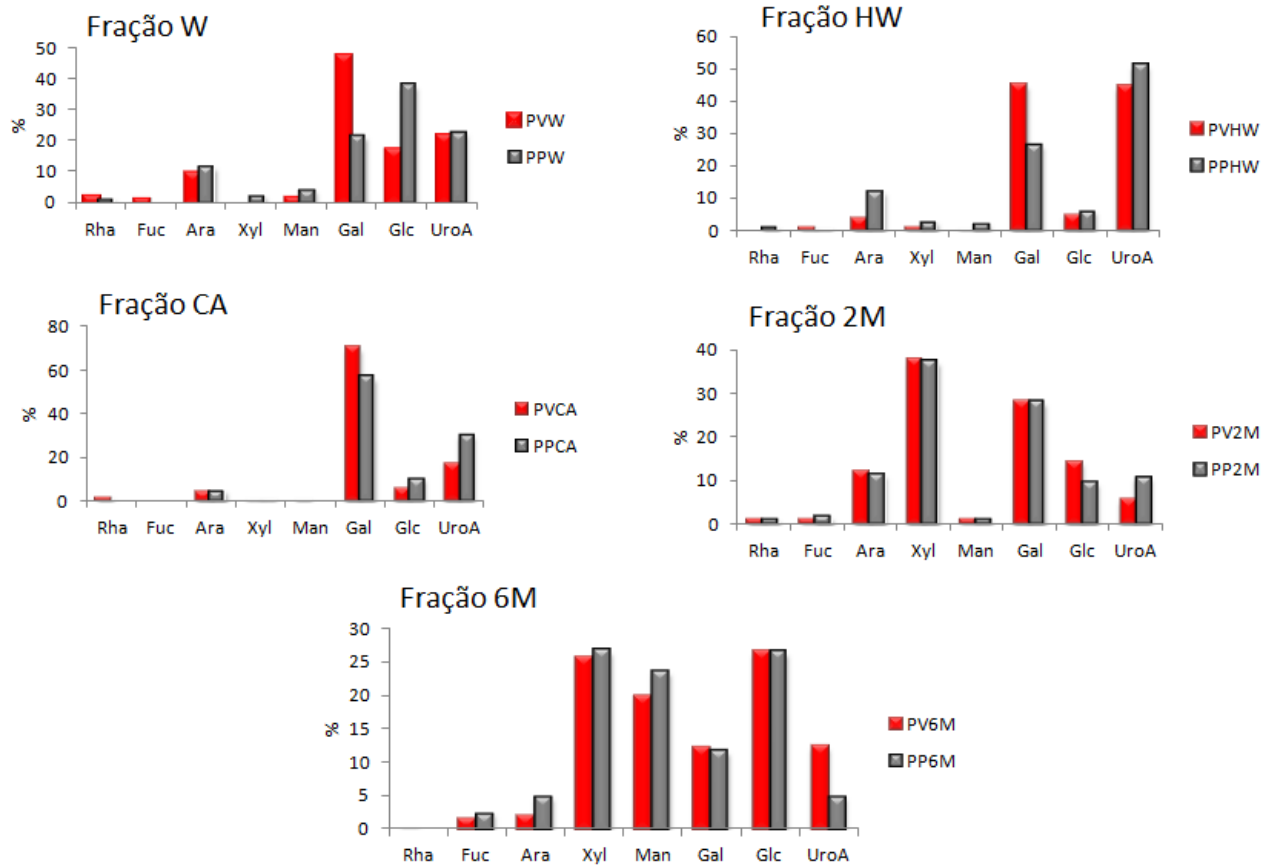


FIGURA 11 – COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ISOLADAS DA POLPA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA VERMELHA E PRETA.

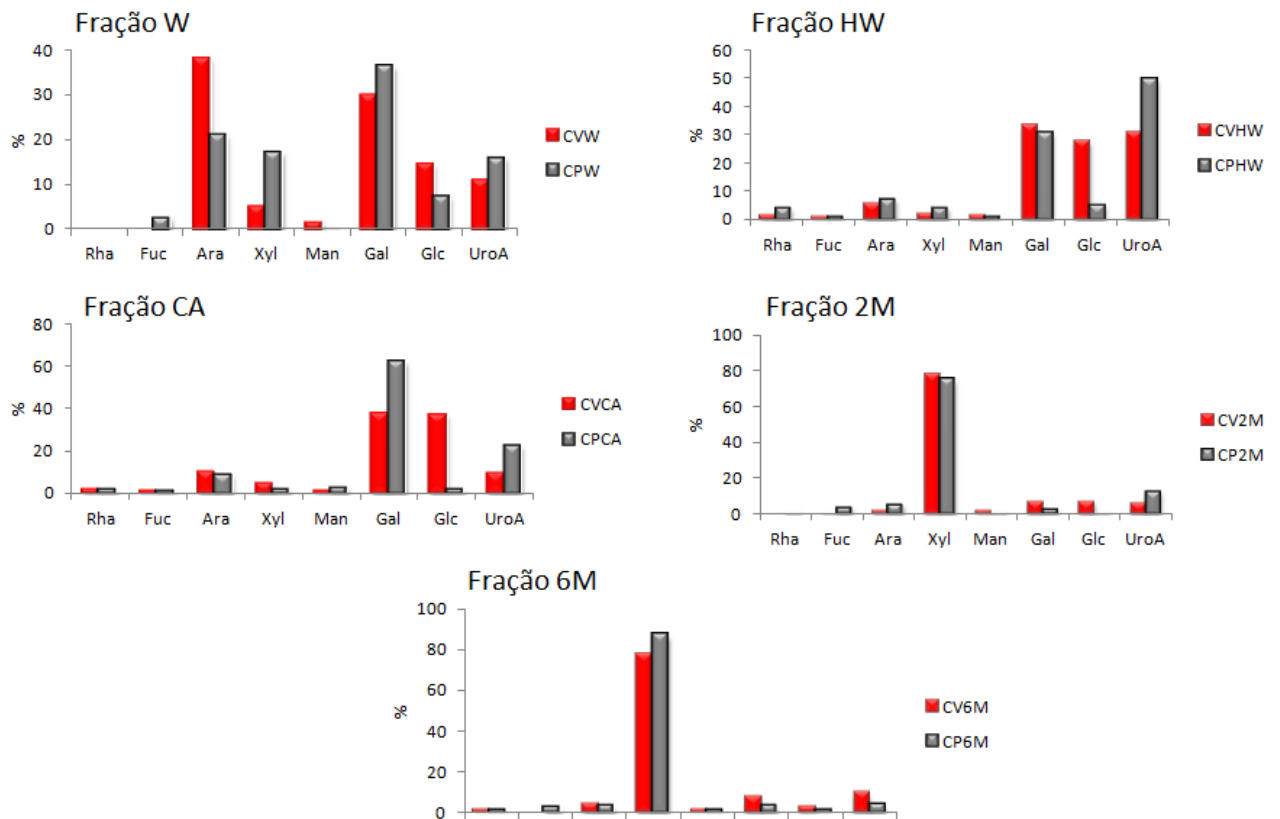


FIGURA 12 – COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ISOLADAS DA CASCA DO FRUTO DE *S. odorifera* DE CASCA VERMELHA E PRETA.

#### 4.4 PURIFICAÇÃO

Algumas frações foram escolhidas para o processo de fracionamento por diferentes tipos, devido à presença de compostos em maiores quantidades. A fração PVW foi escolhida, pois contém altos teores de galactose (47,0%) e ácidos urônicos (21,3%). A fração PVHW devido as quantidades significativas de galactose (44,8%) e ácidos Urônicos (44,2%). A fração PVCA pela elevada quantidade de galactose (70,0%), a fração CV2M devido ao alto teor de xilose (77,3%) e a PPCA pelo alto teor de galactose (56,3%).

##### 4.4.1 Fração PVW

A fração PVW foi submetida ao fracionamento por congelamento/degelo, resultando em um material insolúvel em água fria (PVWI), e um material solúvel em

água fria (PVWS). O teor de glucose aumentou significativamente nas duas subfrações, já o teor de galactose diminuiu quase que pela metade, e os açúcares ácidos não tiveram grandes alterações, como pode ser visto na tabela 11. O perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI (Figura 13 A e B) demonstrou que o procedimento não foi eficiente para a purificação das amostras. Assim, partiu-se para uma nova tentativa de fracionamento, dessa vez com tratamento enzimático a fim de eliminar o amido. A fração PVW foi submetida ao tratamento enzimático, resultando na subfração PVWA. A composição monossacarídica desta subfração (Tabela 11) demonstra que o tratamento enzimático foi eficiente para remoção do amido. PVWA apresentou um teor reduzido de glucose e conteúdo de ácidos urônicos aumentado. Entretanto, conforme demonstrado pelo perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI, a fração ainda não se encontra pura (Figura 13 C). Uma última tentativa de purificação foi feita utilizando ultrafiltração em membrana de 0,1 µm. A amostra filtrada foi denominada PVWEL, e apresentou relativamente pouca variação na composição monossacarídica em relação a fração de origem (Tabela 11). O cromatograma obtido por HPSEC-MALLS/RI para a fração PVWEL (Figura 13 D) apresentou um perfil de eluição polimodal. Desta forma, não foi possível isolar um polissacarídeo puro a partir da fração PVW.

TABELA 11 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PVW E DE SUAS SUBFRAÇÕES (PVWS, PVWI, PVWA e PVWEL) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
PVW	2,1	1,1	9,6	0,5	1,6	47	16,8	21,3
PVWS	1,2	Tr	12,6	0,5	2,6	24,8	58,1	20
PVWI	4,9	0,9	27,8	0,9	2,7	22,1	40,4	16,6
PVWA	3,1	Tr	14	13,9	5,4	13,6	5,1	44,8
PVWEL	2,7	0,9	16,9	2,5	1,7	23,9	9,4	42

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; PVW: fração bruta extraída com água a 25°C da polpa do fruto de casca vermelha; PVWS – subfração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo da fração PVW; PVWI - subfração insolúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo da fração PVW; PVWA – subfração resultante do tratamento enzimático com α-amilase da fração PVW; PVWEL – subfração eluída resultante da filtração em membrana de 0,1 µm da fração PVW.

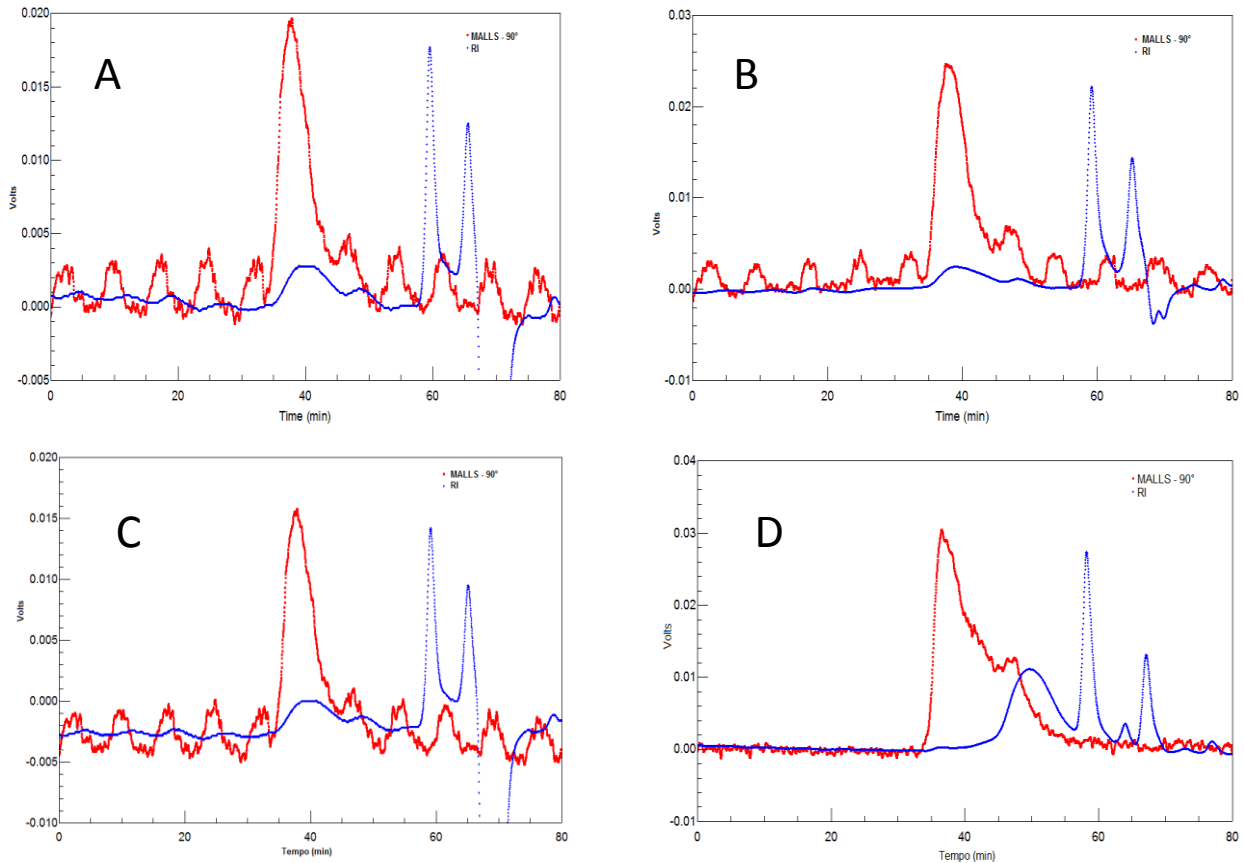


FIGURA 13 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS SUBFRAÇÕES PVWI, PVWS, PVWA e PVWEL. A: PVWI, B: PVWS, C: PVWA, D: PVWEL.

NOTA: Detectores de espalhamento de luz laser multiângulos (MALLS) e índice de refração (RI).

#### 4.4.2 Fração PVHW

Devido aos altos teores de ácidos urônicos e galactose, a fração PVHW foi escolhida para purificação por congelamento e degelo, dando origem as subfrações PVHWI (polissacarídeos insolúveis em água fria) e PVHWS (polissacarídeos solúveis em água fria). A subfração PVHWI apresentou conteúdo de galactose aumentado em relação a PVHW, enquanto que os ácidos urônicos diminuíram consideravelmente (Tabela 5). Para a subfração PVHWS ocorreu o contrário, houve um aumento dos teores de ácidos urônicos e redução dos valores da galactose o que pode sugerir a presença de uma homogalacturonana, dados que podem ser vistos na Tabela 12.

TABELA 12 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PVHW E DE SUAS SUBFRAÇÕES (PVHWI e PVHWS) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
PVHW	Tr	0,9	3,9	1,08	0,4	44,8	4,5	44,2
PVHWI	3,2	Tr	2,1	0,7	Tr	74,4	2,5	16,8
PVHWS	5,8	Tr	5	5,1	3,4	16,6	6	58,1

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; PVHW: fração bruta extraída com água fervente da polpa do fruto de casca vermelha; PVHWS- subfração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo da fração PVHW; PVHWI – subfração insolúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo da fração PVHW.

Para avaliar se as amostras eram homogêneas, as subfrações PVHWI e PVHWS foram analisadas por HPSEC-MALLS/RI (Figura 14). Os cromatogramas obtidos revelam que as subfrações continuam heterogêneas, devido ao perfil de eluição polimodal de ambas as amostras.

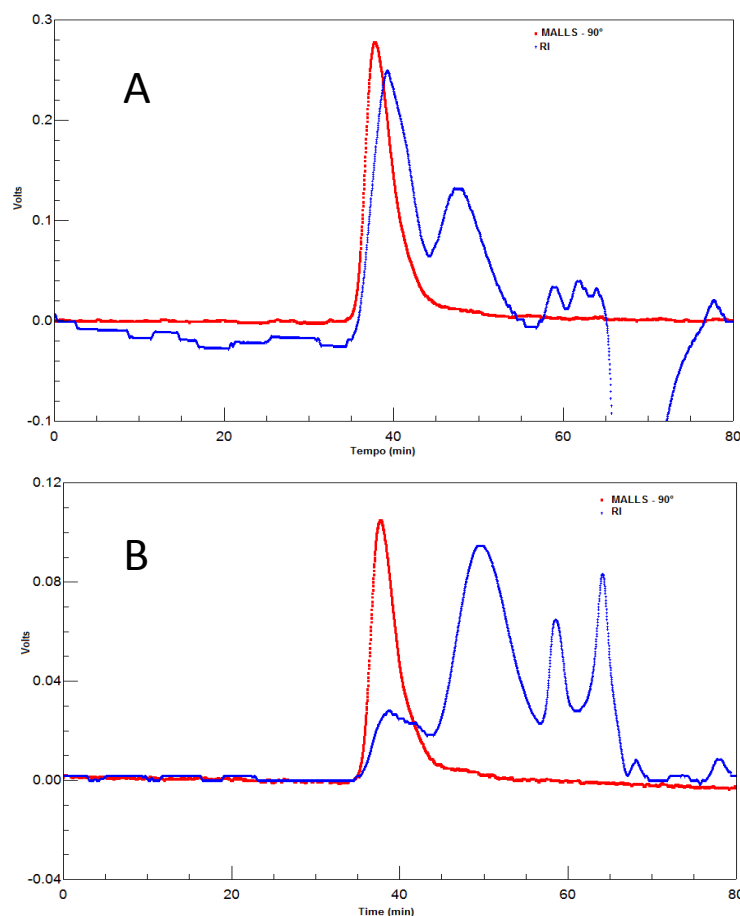


FIGURA 14 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS SUBFRAÇÕES PVHWI E PVHWS. A: PVHWI; B: PVHWS.

NOTA: Detectores de espalhamento de luz laser multiangulos (MALLS) e índice de refração (RI).

#### 4.4.3 Fração PVCA

Os principais componentes da fração PVCA foram: galactose (70%), ácidos urônicos (17%) e glucose (6%). Esta fração foi analisada por espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 15). O espectro mostra a presença de seis sinais principais de alta intensidade, os quais correspondem a uma galactana, quando comparados com a literatura (NAVARRO; CERESO; STORTZ, 2002). Entretanto, o espectro apresenta sinais de menor intensidade, que indicam a presença de outros componentes, conforme já esperado pelo perfil de eluição polimodal na análise de HPSEC-MALLS/RI, onde três picos foram detectados (Figura 6C).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da fração PVAC, o sinal em  $\delta$  100,4 ppm poderia ser atribuído ao C-1 das unidades  $\alpha$ -GalpA (1 $\rightarrow$ 4) proveniente das pectinas, enquanto que o sinal em  $\delta$  53,5 ppm poderia ser devido a presença de grupamentos O-metil esterificando as unidades de GalpA (DALONSO, 2010).

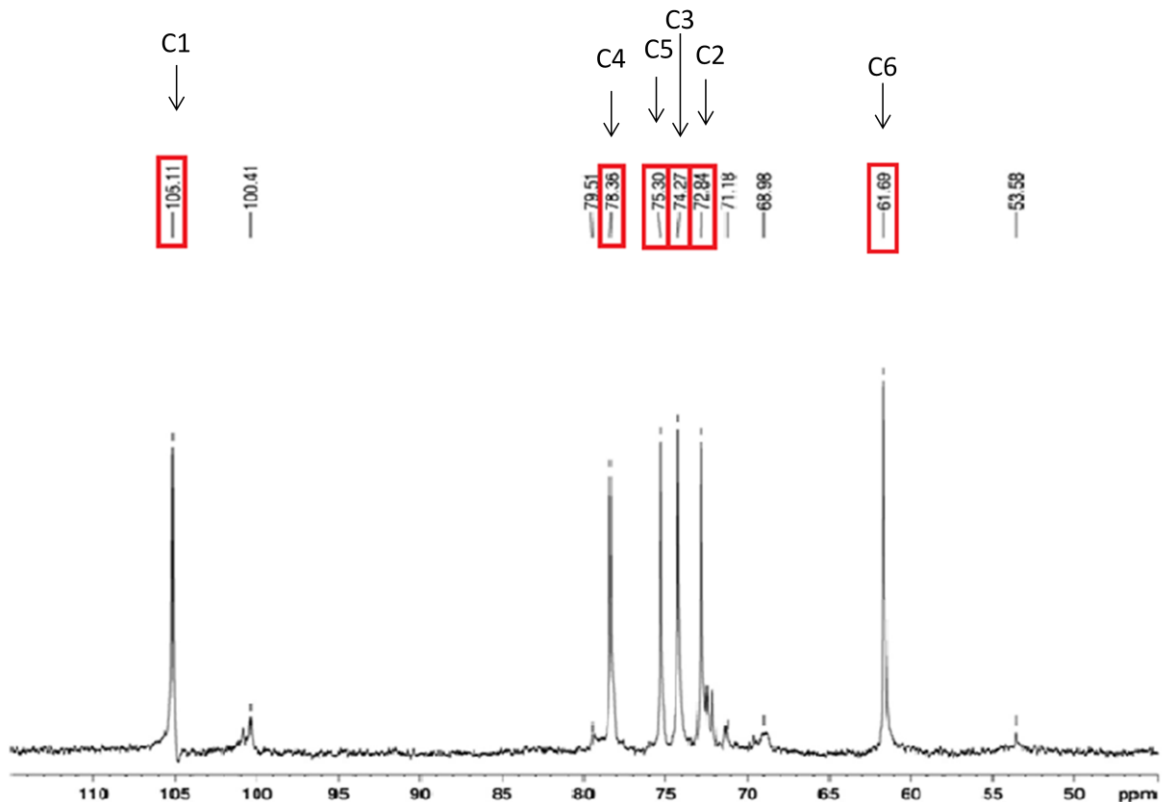


FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO PVCA EM  $\text{D}_2\text{O}$  A 70 °C.

A fração PVCA foi submetida a fracionamento por congelamento e degelo, resultando em uma fração solúvel e duas frações insolúveis (o procedimento foi repetido), PVCAS, PVCAI1 e PVCAI2, respectivamente.

Pela análise da composição monossacarídica (Tabela 13) é possível notar que o procedimento resultou na purificação de uma galactana na fração PVCAI2, com 98,7% de galactose.

TABELA 13 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PVAC E DE SUAS SUBFRAÇÕES (PVCAI1, PVCAI2 e PVCAS) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO

Fração	Monossacarídeos (%)							Ac. Urônicos
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
PVCA	1,2	Tr	4,3	0,3	0,9	70,0	5,8	17,2
PVCAI1	2,0	Tr	8,4	Tr	Tr	45,6	18,9	25,0
PVCAI2	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	98,7	Tr	1,3
PVCAS	9,0	2,8	4,8	3,3	Tr	20,5	8,3	51,4

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; PVCA - fração bruta extraída com ácido cítrico da polpa do fruto de casca vermelha; PVCAS - subfração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo da fração PVCA; PVCAI1 - subfração insolúvel em água fria resultante do primeiro fracionamento por congelamento e degelo da fração PVCA; PVCAI2 - subfração insolúvel em água fria resultante do segundo fracionamento por congelamento e degelo da fração PVCA.

O perfil de eluição da subfração PVCAI2 por HPSEC-MALLS/RI está indicado na Figura 16. Entre 35 e 45 minutos, foi detectada a presença de um composto de alta massa molar somente pelo detector de espalhamento de luz, podendo tratar-se de um agregado molecular. Entre 45 e 55 minutos, observa-se a presença de um pico detectado simultaneamente pelo índice de refração e espalhamento de luz, que corresponde a galactana. Após a determinação do valor de  $dn/dc$  (0,192), foi calculado pelo programa ASTRA o valor da massa molar do polímero, que foi de  $1,756 \cdot 10^4$  g/mol.

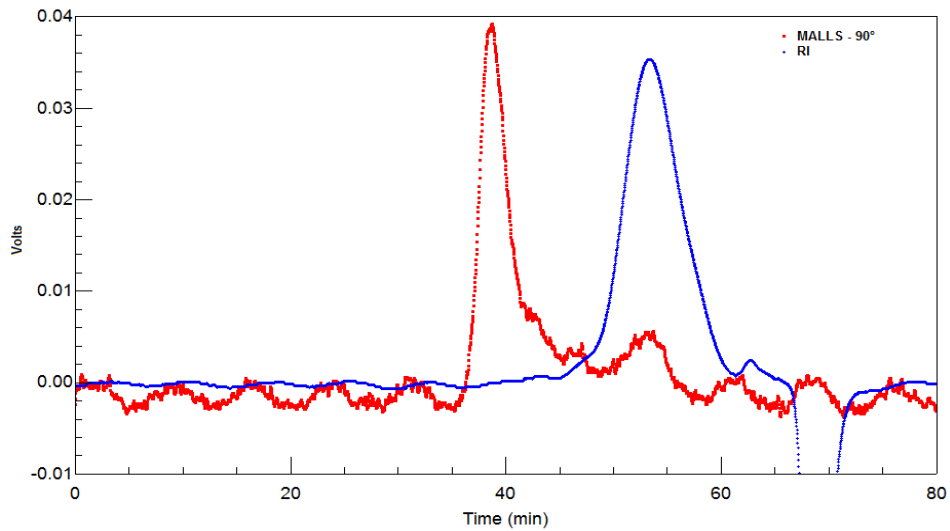


FIGURA 16 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DA FRAÇÃO PVCAI2.  
 NOTA: Detectores de espalhamento de luz laser multiangulos (MALLS) e índice de refração (RI).

A Figura 17 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  obtido para a subfração PVCAI2. Comparando-se com a literatura, foi possível identificar que os seis sinais do espectro são característicos de uma  $\beta$ -D-galactana (1 $\rightarrow$ 4) ligada (NAVARRO; CERZO; STORTZ, 2002; NISHINARI; TAKAHASHI, 2003; HA *et al.*, 2005; HABIBI; MAHROUZ; VIGNON, 2005; MIKSHINA *et al.*, 2012; MAKAROVA *et al.*, 2013). A atribuição dos sinais comparada a literatura está indicada na Tabela 14.

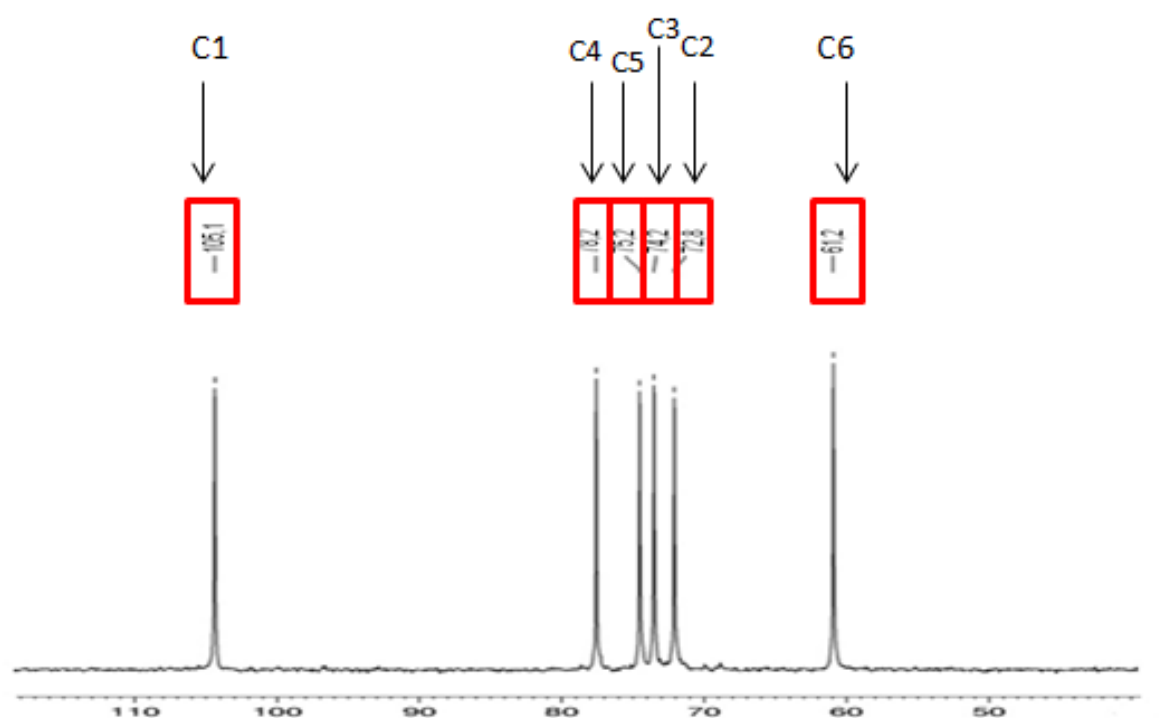


FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN-  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO PVCAI2 EM  $\text{D}_2\text{O}$  A  $70\text{ }^\circ\text{C}$

TABELA 14 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN-  $^{13}\text{C}$  DA GALACTANA PRESENTE NA SUBFRAÇÃO PVCAI2 COM GALACTANAS DESCRITAS NA LITERATURA.

Unidade	Presente estudo	Ha et al., 2005	Habibi; Mahrouz; Vignon, 2005	Navarro; Cerezo; Stortz, 2002	Mikshina; et al., 2012	Makarova et al., 2013
C1	105,1	105,1	105,1	105,1	105,9	105,2
C2	72,8		72,7	72,7	72,8	72,6
C3	74,2		74,2	74,2	74,9	74,5
C4	78,2	78,4		78,5	78	78,8
C5	75,2		75,3	75,3	75,9	76,0
C6	61,2	61,5	61,7	61,6	62,6	62,1

NOTA: deslocamentos em ppm.

O espectro de HSQC da galactana PVCAI2 está mostrado na Figura 18. Foram correlacionados os hidrogênios com os seus respectivos sinais  $\delta$  H-1 (4,63), H-2 (3,71), H-3 (3,78), H-4 (4,17), H-5 (3,72), H-6 (3,84/3,82) (MAKAROVA *et al.*, 2013). Os resultados estão de acordo com dados da literatura para outras galactanas (Tabela 15).

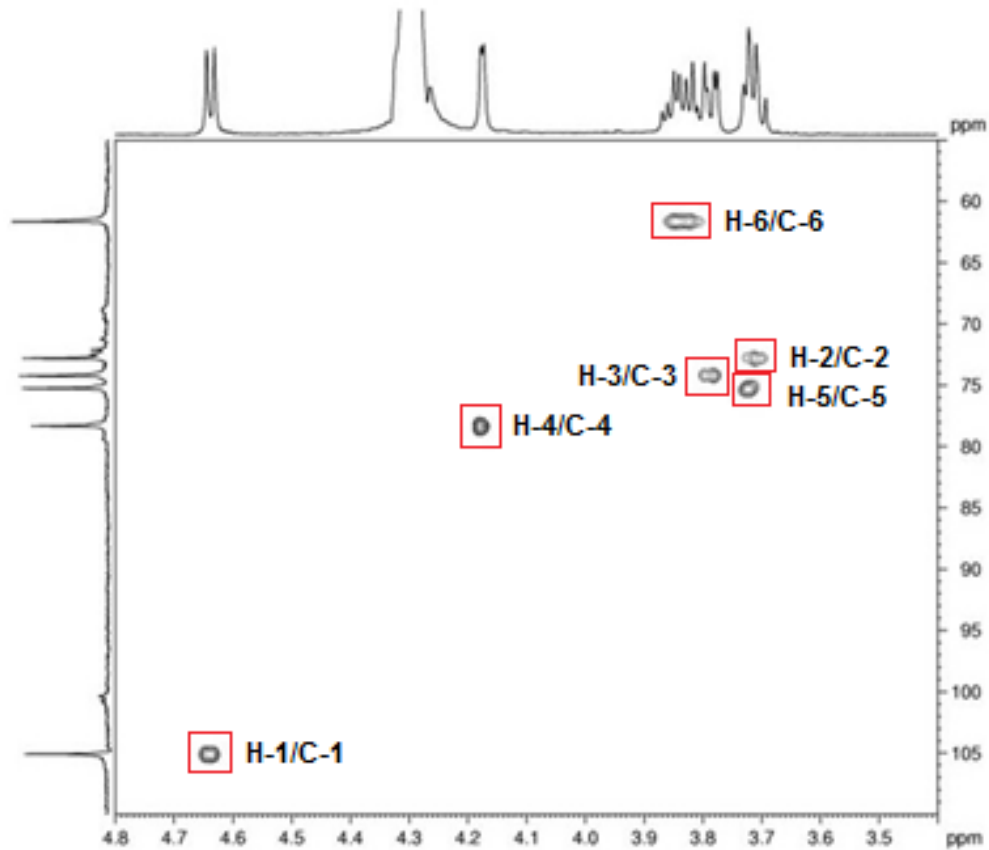


FIGURA 18 – ESPECTRO DE HSQC DA FRAÇÃO PVCAI2 EM D<sub>2</sub>O A 70 °C

TABELA 15 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN <sup>13</sup>C E HSQC DA FRAÇÃO PVCAI2 COMPARADOS COM A LITERATURA

Unidade →4)-β-D-Galp-1→	Presente estudo		Makarova et al., 2013	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
H-1/C-1	4,63	105,1	4,63	105,2
H-2/C-2	3,71	72,8	3,68	72,6
H-3/C-3	3,78	74,2	3,8	74,5
H-4/C-4	4,17	78,2	4,15	78,8
H-5/C-5	3,72	75,2	3,70	76
H-6/C-6	3,84/3,82	61,2	3,81/3,78	62,1

NOTA: deslocamentos em ppm.

A amostra PVCAI2 foi analisada pelo método de metilação (CIUCANU; KEREK, 1984). A análise de metilação confirmou que as unidades de galactose estão unidas por ligação (1→4), devido a presença majoritária do derivado 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilhexitol.

Os resultados obtidos indicam que a fração PVCAI2 proveniente da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha contém uma galactana linear cuja estrutura está representada na Figura 19.

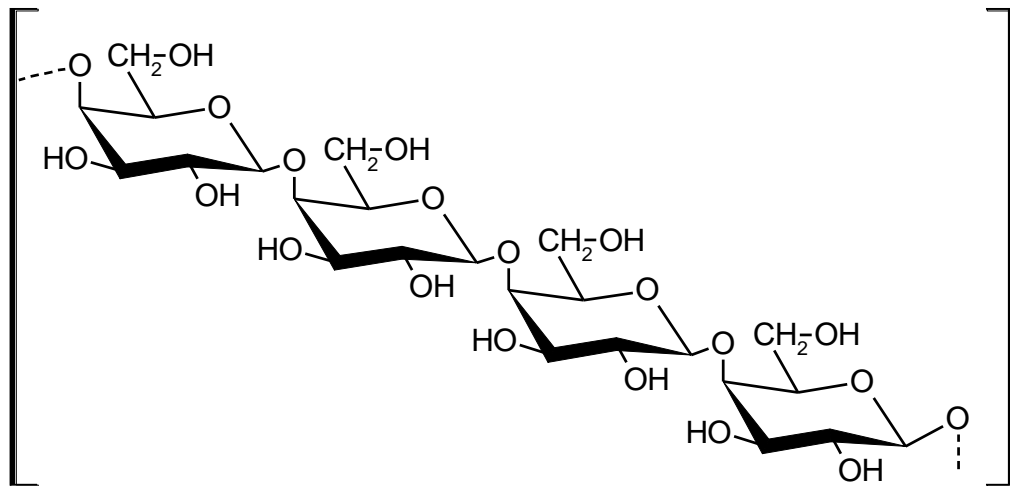


FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO DE UM SEGMENTO DE CADEIA DE GALACTANA  
 FONTE: O autor (2014).

As D-galactanas lineares ligadas  $\beta(1 \rightarrow 4)$  são encontradas como cadeias laterais de RGI de diferentes fontes (KHODAEI; KARBOUNE, 2013). Entretanto, algumas sementes podem conter galactanas com função de reserva (BRICKELL *et al.*, 1996).

Da beterraba, foram isoladas por extração alcalina, pectinas com alto grau de ramificação por galactana. De acordo com os autores, existe uma forte associação das cadeias de galactana com a superfície de celulose (ZYKWINSKA *et al.*, 2006).

Em estudo realizado com frutos de *Lycopersicon esculentum*, foi encontrado que as galactanas estão diretamente ligadas ao processo de amadurecimento. Quanto maior o nível de maturação dos frutos, menor é a quantidade de galactanas encontrada nas ramificações de RGI. A perda significativa de pectina rica em galactose no fruto maduro mostra que esse polissacarídeo é metabolizado rapidamente durante o amadurecimento dos frutos (SEYMOUR *et al.*, 1990). Esta perda das galactanas associada ao processo de maturação dificultaria o isolamento destes polissacarídeos a partir de frutos.

A galactana isolada no presente trabalho foi obtida na extração com ácido cítrico, sob ebulição. Este procedimento poderia ter causado a hidrólise da cadeia de

galactana de um segmento de RGI. Assim, não é possível precisar se na polpa do fruto a galactana linear ocorre na forma livre ou ligada a RGI.

#### 4.4.4 Fração CV2M

A amostra CV2M contendo 77% de xilose, foi analisada por espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 20).

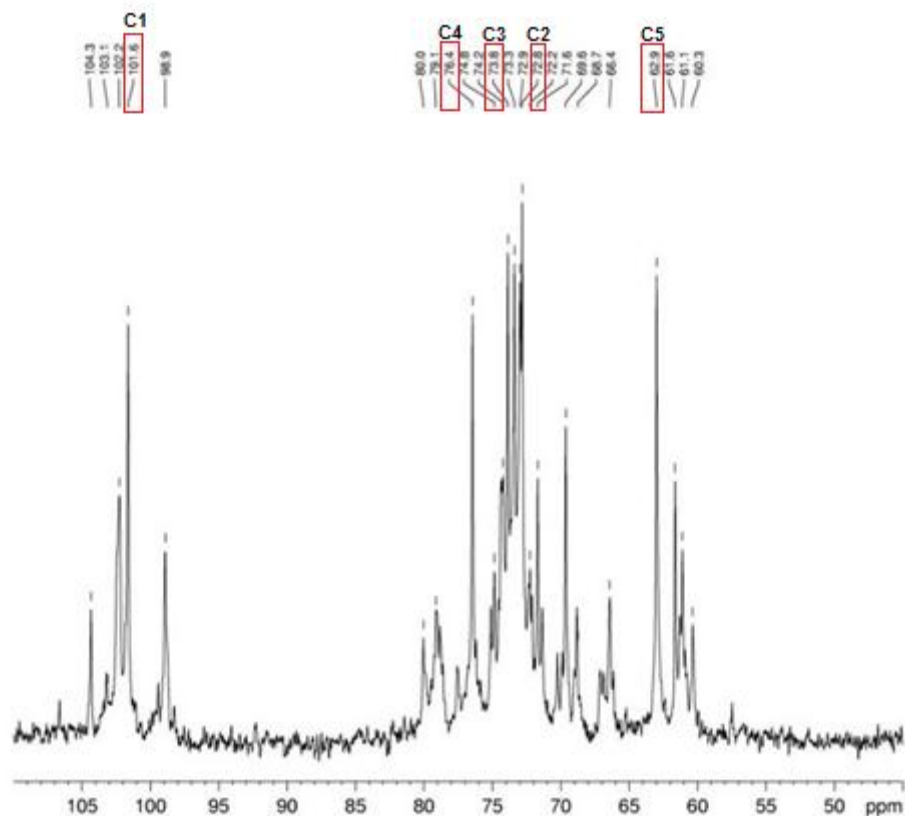


FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO CV2M

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração CV2M mostra cinco sinais que correspondem a uma cadeia de  $\beta$ -D-xilana (1 $\rightarrow$ 4) ligada. Na Tabela 16, consta a atribuição destes sinais em comparação com dados da literatura (DALONSO; PETKOWICZ, 2012). Entretanto, o espectro apresenta diversos sinais adicionais que indicam a presença de outros polissacarídeos na fração CV2M, conforme já indicado pelo perfil de eluição por HPSEC-MALLS/RI e pela composição monossacarídica.

TABELA 16 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN  $^{-13}\text{C}$  DA XILANA PRESENTE NA FRAÇÃO CV2M COM XILANA DESCRITA NA LITERATURA.

Unidade	Presente estudo	Dalonso e Petkowicz (2012)
C1	101,6	101,7
C2	72,8	72,8
C3	73,8	73,8
C4	76,4	76,5
C5	62,9	63,0

NOTA: deslocamentos em ppm.

Foi realizado um fracionamento por congelamento e degelo da fração CV2M, resultando em uma subfração solúvel (CV2MS) e uma subfração insolúvel (CV2MI). A composição monossacarídica destas frações está indicada na Tabela 17.

TABELA 17 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CV2M E DE SUAS SUBFRAÇÕES (CV2MI e CV2MS) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
CV2M	Tr	0,5	2	77,3	1,4	6,4	6,8	5,6
CV2MI	0,1	0,1	0,3	90,7	0,4	0,4	1,6	6,3
CV2MS	Tr	7,2	Tr	31,4	5,9	21,5	34,1	Tr

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; CV2M - fração bruta extraída com hidróxido de sódio 2M da casca do fruto de casca vermelha; CV2MI - subfração insolúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo da fração CV2M; CV2MS - subfração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo da fração CV2M.

A subfração CV2MI apresentou 91 % de xilose, indicando que o procedimento foi eficiente para a purificação da xilana. A subfração CV2MS apresentou quantidades equivalentes de glucose e xilose, além da presença de 22% de galactose e 6% de manose.

#### 4.4.5 Fração PPCA

A fração PPCA, obtida por extração com ácido cítrico, assim como a fração equivalente extraída da polpa do fruto de casca vermelha, apresentou a galactose como componente majoritário. A fim de verificar se uma galactana linear também

estava presente nesta fração, a amostra PPCA foi submetida ao processo de fracionamento por congelamento e degelo. A composição monossacarídica das subfrações solúvel (PPCAS) e insolúvel (PPCAI1 e PPCAI2), resultantes pode ser vista na Tabela 18.

TABELA 18 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO PPAC E DE SUAS SUBFRAÇÕES (PPCAI1, PPCAI2 e PPCAS) OBTIDAS APÓS PROCEDIMENTOS DE PURIFICAÇÃO

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ac. Urônicos
PPCA	Tr	Tr	4,3	0,2	Tr	56,3	9,9	29,7
PPCAI1	10,8	Tr	13,6	3,2	3,2	31,2	31,7	6,3
PPCAI2	2,6	2,9	10	Tr	Tr	76,2	8,3	Tr
PPCAS	Tr	Tr	3,9	Tr	1,8	51,4	6,1	36,7

NOTA: Carboidratos neutros determinados por GLC na forma de acetatos de alditol; ácidos urônicos determinados por método colorimétrico (BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN, 1973); Tr = traços; PPCA - fração bruta extraída com ácido cítrico da polpa do fruto de casca preta; PPCAS - subfração solúvel em água fria resultante do fracionamento por congelamento e degelo da fração PPCA; PPCAI1 - subfração Insolúvel em água fria resultante do primeiro fracionamento por congelamento e degelo da fração PPCA; PPCAI2 - subfração insolúvel em água fria resultante do segundo fracionamento por congelamento e degelo da fração PPCA.

A subfração PPCAI2 apresentou um conteúdo de galactose superior a fração PPCA, porém quantidades consideráveis de arabinose e glucose também estão presentes. Estes resultados diferem daqueles obtidos para a fração equivalente isolada do fruto de casca vermelha. A homogeneidade das amostras obtidas após o procedimento de fracionamento foi investigada por HPSEC-MALLS/RI (Figura 21).

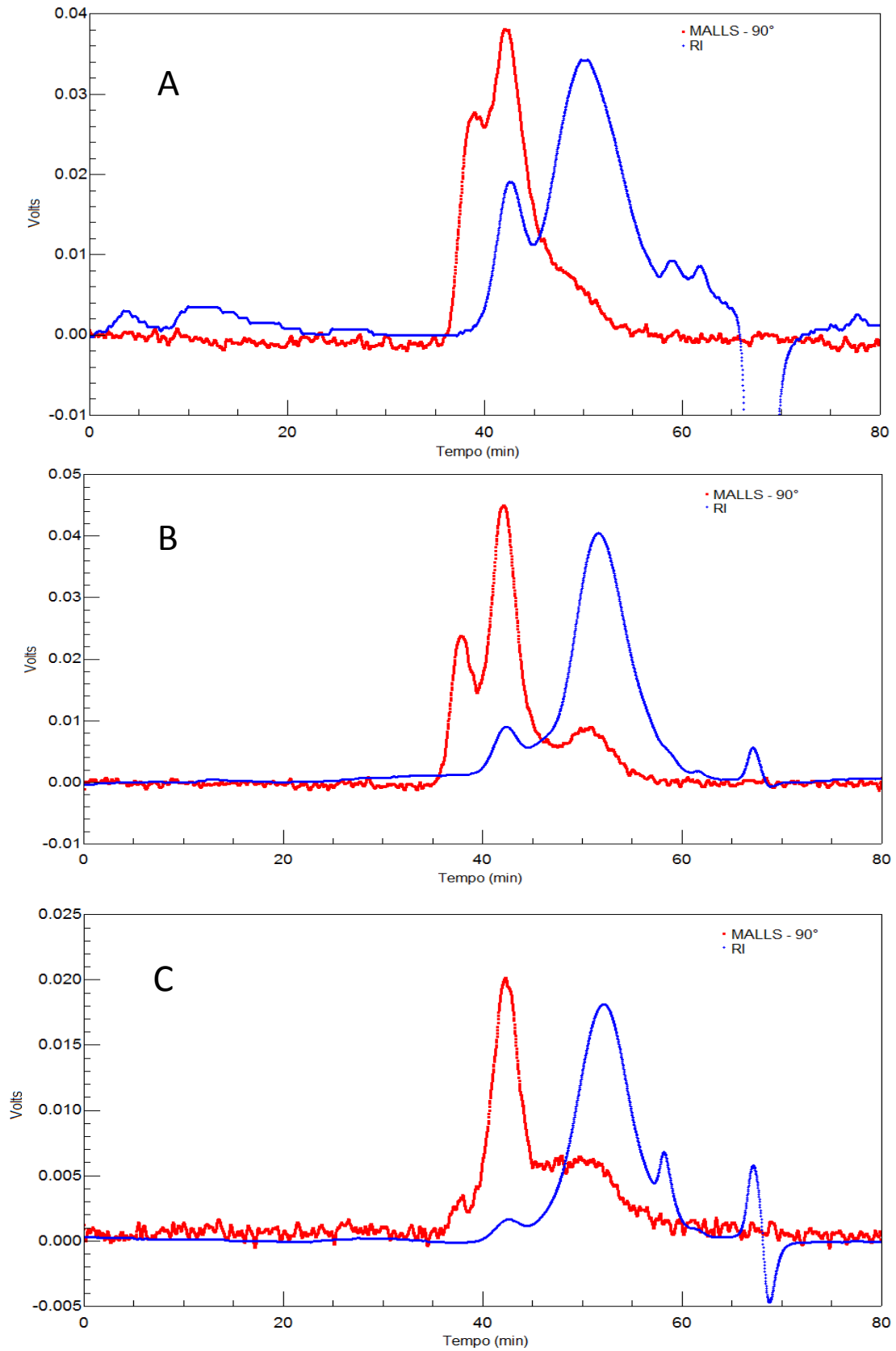


FIGURA 21 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC – MALLS/RI DAS SUBFRAÇÕES PPCAI1, PPCAI2 e PPCAS. A: PPCAI1; B: PPCAI2; C: PPCAS.  
NOTA: Detectores de espalhamento de luz laser multiangulos (MALLS) e índice de refração (RI).

Os cromatogramas demonstram que nenhuma das subfrações isoladas foi adequadamente purificada pelo procedimento de congelamento e degelo. A fração PPCAI2 mostra um perfil de eluição polimodal, diferente do que aconteceu com a mesma fração proveniente do fruto de casca vermelha. O cromatograma da amostra PPCAI2 indica a presença de polímeros com diferentes massas molares.

---

# CAPÍTULO 5

---

CONCLUSÃO

## 5. CONCLUSÃO

A composição monossacarídica das frações isoladas por extrações sequenciais dos frutos de *S. odorifera* de casca vermelha e preta mostrou que os componentes majoritários são muito semelhantes, não permitindo detectar diferenças estruturais na composição dos polissacarídeos dos frutos de casca vermelha e preta.

A composição das frações extraídas com água da polpa dos frutos de *S. odorifera* sugere a presença de pectinas ramificadas principalmente por galactanas.

As frações extraídas com ácido cítrico da polpa dos frutos de *S. odorifera* apresentaram como componente majoritário a galactose. A partir da polpa do fruto de *S. odorifera* de casca vermelha foi purificada e caracterizada uma galactana ligada  $\beta(1\rightarrow4)$ .

As frações hemicelulósicas isoladas da casca dos frutos de *S. odorifera* apresentam xilose como componente principal indicando a presença de xilanas.

## REFERÊNCIAS

ABOUGHE-ANGONE, S.; NGUEMA-ONA, E.; GHOSH, P.; LEROUGE, P.; ISHII, T.; RAY, B.; DRIOUICH, A. Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 1, p. 67-72, 2008.

AL-SHERAJI, S. H.; ISMAIL, A.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R. M.; HASSAN, F. A. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from the fibrous pulp of *Mangifera pajang* fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 291-296, 2012.

BARBIERI, R. L.; HEIDEN, G.; NEITZKE, R. S.; GARRASTAZU, M. C.; SCHWENGBER, J. E. Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas da Embrapa Clima Temperado. **Embrapa**, p. 5-10, 2006.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal Biochem**, v. 54, n. 2, p. 484-9, 1973.

BRICKELL, L. S.; GRANT REID, J. S.; VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. Biosynthesis in vitro of pectic (1-4)-B-D-galactan. **Progress in Biotechnology**, v. 14, p. 127-134, 1996.

BUCKERIDGE, M. S.; TINE, M. A. S. Composição polissacéridica: Estrutura da Parede Celular e Fibras alimentares. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; PENNA, E.W.; MENEZES, E.W. Fibras Dietéticas em Iberoamérica: tecnologia y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación em alimentos. **Varela Editora**, p. 44-53, 2001.

BUI, A. K. T.; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1271-1275, 2006.

CANTU-JUNGLES, T. M.; MARIA-FERREIRA, D.; DA SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. D. P.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M. C. Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food Chemistry**, v. 146, p. 492-499, 2014.

CARPITA, N.; MCCANN, M. The Cell Wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). In: (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p.52-98.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, n. 2, p. 209-217, 1984.

CUTILLAS-ITURRALDE, A.; PEÑA, M. J.; ZARRA, I.; LORENCES, E. P. A xyloglucan from persimmon fruit cell walls. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 607-610, 1998.

DALONSO, N. **Polissacarídeos das sementes de guaraná (*Paullinia cupana Kunth*): Análises estruturais, reológicas e atividade antioxidante**. 2010. 110 f (Dissertação Mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

DALONSO, N.; PETKOWICZ, C. L. O. Guarana powder polysaccharides: Characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1804-1812, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

GOMES-KLEIN, V. L.; LIMA, L. F. P.; GOMES-COSTA, G. A. Cucurbitaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: < [www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB82152](http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB82152) >. Acesso em: 22/01/2014.

HA, M.-A.; VIETOR, R. J.; JARDINE, G. D.; APPERLEY, D. C.; JARVIS, M. C. Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin. **Phytochemistry**, v. 66, n. 15, p. 1817-1824, 2005.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Arabinan-rich polysaccharides isolated and characterized from the endosperm of the seed of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 3, p. 319-329, 2005.

JARAMILLO, K.; DAWID, C.; HOFMANN, T.; FUJIMOTO, Y.; OSORIO, C. Identification of antioxidative flavonols and anthocyanins in *Sicana odorifera* fruit peel. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 3, p. 975-83, 2011.

KHODAEI, N.; KARBOUNE, S. Extraction and structural characterisation of rhamnogalacturonan I-type pectic polysaccharides from potato cell wall. **Food Chemistry**, v. 139, p. 617-623, 2013.

MAIA, L. M. A. Frutos da Amazônia. Fonte de alimento para Peixes. **Co-Edição SEBRAE**, 2001.

MAKAROVA, E. N.; PATOVA, O. A.; SHAKHMATOV, E. G.; KUZNETSOV, S. P.; OVODOV, Y. S. Structural studies of the pectic polysaccharide from Siberian fir (*Abies sibirica Ledeb.*). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1817-1826, 2013.

MIKSHINA, P. V.; GURJANOV, O. P.; MUKHITOVA, F. K.; PETROVA, A. A.; SHASHKOV, A. S.; GORSHKOVA, T. A. Structural details of pectic galactan

from the secondary cell walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) phloem fibres. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 853-861, 2012.

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

MORT, A.; ZHENG, Y.; QIU, F.; NIMTZ, M.; BELL-EUNICE, G. Structure of xylogalacturonan fragments from watermelon cell-wall pectin. Endopolygalacturonase can accommodate a xylosyl residue on the galacturonic acid just following the hydrolysis site. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 7, p. 1212-1221, 2008.

NAVARRO, D. A.; CEREZO, A. S.; STORTZ, C. A. NMR spectroscopy and chemical studies of an arabinan-rich system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 3, p. 255-263, 2002.

NISHINARI, K.; TAKAHASHI, R. Interaction in polysaccharide solutions and gels. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 8, p. 396-400, 2003.

NOAMAN, E.; BADR EL-DIN, N. K.; BIBARS, M. A.; ABOU MOSSALLAM, A. A.; GHONEUM, M. Antioxidant potential by arabinoxylan rice bran, MGN-3/biobran, represents a mechanism for its oncostatic effect against murine solid Ehrlich carcinoma. **Cancer Letters**, v. 268, n. 2, p. 348-359, 2008.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de Farmacobotânica. **Atheneu**, v. 2. Ed, 2005.

PARADA, F.; DUQUE, C.; FUJIMOTO, Y. Free and bound volatile composition and characterization of some glucoconjugates as aroma precursors in melon de olor fruit pulp (*Sicana odorifera*). **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 12, p. 6200-4, 2000.

PENG, Q.; LV, X.; XU, Q.; LI, Y.; HUANG, L.; DU, Y. Isolation and structural characterization of the polysaccharide LRGP1 from *Lycium ruthenicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 95-101, 2012.

PRABASARI, I.; PETTOLINO, F.; LIAO, M.-L.; BACIC, A. Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 484-494, 2014.

REID, J. S. G. Carbohydrate Metabolism: Structural Carbohydrate. In: DEY, P. M. e HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant Biochemistry**. Estados Unidos: Academic Press, 1997. p.205-236.

ROSÁRIO, M. M. T.; NOLETO, G. R.; BENTO, J. F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 464-472, 2008.

SANTOS, M. D. S.; PETKOWICZ, C. L. O.; HAMINIUK, C. W. I.; CÂNDIDO, L. M. B. Polissacarídeos extraídos da gabioba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg): propriedades químicas e perfil reológico. **Polímeros**, v. 20, p. 352-358, 2010.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int Immunopharmacol**, v. 6, n. 3, p. 317-33, 2006.

SEYMOUR, G. B.; COLQUHOUN, I. J.; DUPONT, M. S.; PARSLEY, K. R.; R. SELVENDRAN, R. Composition and structural features of cell wall polysaccharides from tomato fruits. **Phytochemistry**, v. 29, n. 3, p. 725-731, 1990.

SINGH, J.; MCCARTHY, O. J.; SINGH, H.; MOUGHAN, P. J.; KAUR, L. Morphological, thermal and rheological characterization of starch isolated from New Zealand Kamo Kamo (*Cucurbita pepo*) fruit - A novel source. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 2, p. 233-244, 2007.

SOUZA, L. A. Anatomia do fruto e de semente. **Ponta Grossa: UEPG**, 2006.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. 2012. Disponível em: <[www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/](http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/)>. Acesso em: 10/12/2013.

VIERHUIS, E.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv *koroneiki*). **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 1, p. 51-62, 2001.

VRIESMANN, L. C.; PETROWSKI, C. L. O.; CARNEIRO, P. I. B.; CARNEIRO, E. B. B. Polissacarídeos de frutos do Cambuí (*Myrciaria Tenella*, Berg.). **UEPG Ci. Exatas Terra**, v. 10, p. 41-45, 2004.

VRIESMANN, L. C. C.; DE OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. C. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 72-79, 2009.

WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica**, 2003.

WILLATS, W. G. T.; STEELE-KING, C. G.; MCCARTNEY, L.; ORFILA, C.; MARCUS, S. E.; KNOX, J. P. Making and using antibody probes to study plant cell walls. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 27-36, 2000.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

YANG, B.; WANG, J.; ZHAO, M.; LIU, Y.; WANG, W.; JIANG, Y. Identification of polysaccharides from pericarp tissues of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in

relation to their antioxidant activities. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 5, p. 634-638, 2006.

ZHAO, T.; MAO, G.; FENG, W.; MAO, R.; GU, X.; LI, T.; LI, Q.; BAO, Y.; YANG, L.; WU, X. Isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from *Schisandra sphenanthera*. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 26-33, 2014.

ZYKWINSKA, A.; RONDEAU-MOURO, C.; GARNIER, C.; THIBAUT, J.-F. O.; RALET, M.-C. Alkaline extractability of pectic arabinan and galactan and their mobility in sugar beet and potato cell walls. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 4, p. 510-520, 2006.