

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLAVIA CHRISTINE DOS SANTOS

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE *Solanum diploconos*

CURITIBA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLAVIA CHRISTINE DOS SANTOS

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DE FRUTOS DE *Solanum diploconos*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Bello Baron Maurer

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Santos, Flavia Christine dos

Extração e caracterização química de polissacarídeos de
frutos de *Solanum diploconos* / Flavia Christine dos Santos. –
Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências (Bioquímica).

Orientador: Profª Drª Juliana Bello Baron Maurer.

1. Solanum. 2. Polissacarídeos. 3. Pectina. 4. Galactanas. 5.
Solanaceae. I. Maurer, Juliana Bello Baron. II. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FLAVIA CHRISTINE DOS SANTOS** intitulada: **Extração e caracterização química de polissacarídeos de frutos de *Solanum diploconos***, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA BELLO BARON MAURER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Maio de 2021.

Assinatura Eletrônica

11/08/2021 10:04:08.0

JULIANA BELLO BARON MAURER

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

11/08/2021 14:41:12.0

ADRIANO GONÇALVES VIANA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

12/08/2021 13:51:59.0

CARMEN LUCIA DE OLIVEIRA PETKOWICZ

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meus passos e por me dar sabedoria para enfrentar os desafios que a vida nos apresenta.

Meus pais Laertes e Glacy por terem acreditado em mim, me dado todo apoio e por terem me incentivado a sempre buscar o melhor para mim.

À minha orientadora, professora Juliana Maurer por ter acreditado em mim, pela ajuda nos experimentos e nas escritas e principalmente pela paciência que ela teve comigo nestes anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica pela oportunidade e aos professores por compartilharem o conhecimento e a todos os alunos e funcionários do departamento que colaboraram de alguma forma.

À Sociedade Chauá pela parceria e por fornecer os frutos, especialmente ao diretor executivo Pablo Hoffmann.

Aos meus colegas do laboratório: Luciano pela paciência e excepcional capacidade de ensinar, à professora Selma por me acolher muitas vezes, à Hayanna Santos e à Raquely por me ensinarem os experimentos, à Melina por se deslocar até o laboratório para me socorrer nos experimentos que não estavam dando certo, ao Fernando pela ajuda e incentivo, à Camila que chegou para aprender, mas acabou me ensinando muita coisa.

À técnica Rosane pelas análises do GLC, por toda a dedicação ao seu trabalho e por ter dado atenção especial às minhas amostras.

Ao Arquimedes pelas análises do RMN.

Ao professor Rilton de Freitas do departamento de Química por nos deixar usar o cromatógrafo e à Francine por nos auxiliar.

Ao doutorando Evaldir do departamento de Química por nos acompanhar nas análises de FT-IR.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

À banca examinadora.

“Um pouco de ciência nos afasta de
Deus. Muito, nos aproxima.”
Louis Pasteur

RESUMO

Solanum diploconos, é uma espécie pertencente à Família Solanaceae, nativa da Mata Atlântica e encontrada entre as espécies ameaçadas de extinção. Novos conhecimentos científicos da família Solanaceae possibilitam a implementação em produtos que beneficiem a população, na forma de medicamentos, cosméticos e condimentos. Pectinas são encontradas em grande quantidade nas cascas de frutos vegetais e são comercialmente importantes por serem biocompatíveis, biodegradáveis e apresentarem baixa toxicidade, além de possuírem funções biológicas como a de auxiliarem o trânsito intestinal. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar as frações polissacarídicas obtidas de frutos de *S. diploconos*. Os frutos foram fracionados em casca (exocarpo e mesocarpo), polpa (endocarpo) e semente, e submetidos, separadamente, aos processos de inativação enzimática, deslipidificação, e extração com dimetil sulfóxido aquoso. Após, cada material vegetal foi submetido às extrações sequenciais em diferentes condições de extratores (água, ácido cítrico e hidróxido de sódio) e temperaturas (25 °C, 60 °C e banho fervente), rendendo um total de 11 frações para cada material. Além disso, parte do material vegetal – casca foi submetida a extração tradicional com um ácido mineral (ácido nítrico, HNO₃), o qual é comumente empregado para extração de pectinas comerciais, rendendo a fração CNA, que após tratamento enzimático para remoção de amido originou a fração CNA2. A composição monossacarídica neutra foi determinada por cromatografia gasosa pela análise dos derivados acetatos de alditóis e o teor de ácidos urônicos por método colorimétrico. Para o material vegetal casca, a composição monossacarídica das frações obtidas das extrações aquosas e com ácido cítrico apresentaram Ara, Gal, Glc e ácidos urônicos como açúcares majoritários. Para a polpa, a Glc foi o monossacarídeo majoritário para as frações obtidas tanto para as extrações aquosas como com ácido cítrico, diferentemente para as sementes, que foram Xyl e Glc. As frações extraídas com álcali (tanto para casca, polpa e semente) apresentaram basicamente Xyl, Man, Glc, indicando a presença de hemiceluloses. As frações CNA e CNA2 apresentaram Uro, Gal, Gal na proporção de 34:32:30 e 37:50:<0,5, respectivamente. As frações obtidas das extrações aquosas (CW4, CW90), com ácido cítrico (C1-60, C1f, C5f) e ácido nítrico (CNA e CNA2) foram submetidas à determinação de homogeneidade e da massa molar ponderal média (Mw) por cromatografia de exclusão por tamanho acoplada com detector de índice de refração e espalhamento de luz e aos métodos espectroscópicos de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR) e ressonância magnética nuclear (2D-RMN HSQC e RMN-¹³C). O grau de metil-esterificação (GM) das frações polissacarídicas foi determinado pelos espectros de FT-IR. Assim, considerando a composição monossacarídica das frações analisadas juntamente com os dados das análises de FT-IR e de RMN, e a estimativa do percentual de homogalacturonanas (% HG) e ramnogalacturonanas tipo I (% RG1) pode-se sugerir a presença (em diferentes proporções) de polissacarídeos do tipo homogalacturonana com baixo grau de metoxilação, arabinogalactanas tipo 1, galactanas e glucanas (tipo amido) nas frações analisadas. A fração CNA2 apresentou um maior grau de homogeneidade (perfil unimodal) e com características de homogalacturonana metil-esterificada (ou seja, cadeia principal de GalpA unidas por ligação do tipo α -(1→4) com grupos metil, esterificados em C-6) e galactana (com ligações β -(1→4) e (1→6)), com GM = 45% e MW de $2,58 \times 10^5$ g/mol. A extração com ácido nítrico apresentou-se mais eficiente em diversos aspectos, sendo a melhor escolha de extração para fins experimentais. O uso de frutos de *S. diploconos* como fonte de pectinas se mostrou promissor, tanto pela disponibilidade, quanto pela preocupação ambiental de conservação da espécie.

Palavras Chave: Solanaceae, *Solanum*, polissacarídeos, pectinas, extração, homogalacturonanas, ramnogalacturonanas, galactanas, arabinogalactanas.

ABSTRACT

Solanum diploconos, is a species belonging to the Solanaceae Family, native to the Atlantic Forest and found among endangered species. New scientific knowledge from the Solanaceae family makes it possible to implement products that benefit the population, in the form of medicines, cosmetics and condiments. Pectins are found in large quantities in the fruits and are commercially important because they are biocompatible, biodegradable and have low toxicity, in addition to having biological functions such as helping intestinal transit. The main objective of this work was to characterize the polysaccharide's fractions obtained from fruits of *S. diploconos*. The fruits were fractionated in peel (exocarp and mesocarp), pulp (endocarp) and seed, and submitted, separately, to the processes of enzymatic inactivation, delipidification, and extraction with aqueous dimethyl sulfoxide. Afterwards, each plant material was subjected to sequential extractions in different conditions of extractors (water, citric acid, and sodium hydroxide) and temperatures (25 °C, 60 °C and boiling bath), yielding a total of 11 fractions for each material. In addition, part of the plant material - peel was subjected to traditional extraction with a mineral acid (nitric acid, HNO₃), which is commonly used to extract commercial pectins, yielding the CNA fraction, which after enzymatic treatment to remove starch originated the CNA2 fraction. The neutral monosaccharide composition was determined by gas chromatography by analyzing the alditol acetate derivatives and the content of uronic acids by colorimetric method. For the peel, the monosaccharide composition of the fractions obtained from aqueous extractions and with citric acid showed Ara, Gal, Glc and uronic acids as major sugars. For the pulp, Glc was the major monosaccharide for the fractions obtained both for aqueous extractions and with citric acid, differently for the seeds, which were Xyl and Glc. The fractions extracted with alkali (both for peel, pulp, and seed) showed basically Xyl, Man, Glc, indicating the presence of hemicelluloses. The fractions CNA and CNA2 presented Uro, Gal, Glc with proportion ratio of 34:32:30 and 37:50:<0.5, respectively. The fractions obtained from aqueous extractions (CW4, CW90), with citric acid (C1-60, C1f, C5f) and nitric acid (CNA and CNA2) were subjected to the determination of homogeneity and the average weight molar mass (Mw) by chromatography of size exclusion coupled with refractive index and light scattering detector and spectroscopic methods as infrared coupled to the Fourier transformer (FT-IR) and nuclear magnetic resonance (2D-NMR HSQC and NMR-13C). The degree of methyl esterification (GM) of the polysaccharide's fractions was determined by the FT-IR spectra. Thus, considering the monosaccharide composition of the fractions together with FT-IR and NMR data, and the estimative of the percentage of homogalacturonans (% HG) and type I raminogalacturonans (% RG-I), it can suggest the presence (in different proportions) of types of polysaccharides as homogalacturonan with a low degree of methoxylation, type 1 arabinogalactans, galactans and glucans (starch type) in the fractions. The CNA2 fraction showed a higher degree of homogeneity (unimodal profile), presenting characteristics of a methyl-esterified homogalacturonan (i.e., a main chain with α -(1 $\rightarrow$ 4) GalpA linked and with methyl groups esterified in C-6 position) and galactan (with β -(1 $\rightarrow$ 4) and (1 $\rightarrow$ 6) linkages), with GM = 45% and a MW of 2.58 x10⁵ (g/mol). Extraction with nitric acid proved to be more efficient in several aspects, being the best choice of extraction for experimental purposes. The use of fruits of *S. diploconos* as a source of pectins proved to be promising, both because of the availability and because of the environmental concern for the conservation of the species.

Keywords: Solanaceae, *Solanum*, polysaccharides, pectins, extraction, homogalacturonans, raminogalacturonans, galactans, arabinogalactans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A- Indivíduo adulto de *Solanum diploconos*; B- Folhas; C- Inflorescência; D- Frutos; E- Sementes em germinação; F - Detalhe do fruto de *S. diploconos* cortado ao meio com indicação de seus componentes: casca (exocarpo + mesocarpo), polpa (endocarpo) e semente.

Figura 2: Mapa de ocorrência de *S. diploconos*.

Figura 3: Representações esquemáticas da estrutura básica de pectinas.

Figura 4: Frutos de *S. diploconos* e suas partes: exocarpo e mesocarpo (casca) (1), endocarpo (polpa) (2), sementes e sumo (3 e 4) de *S. diploconos*.

Figura 5: Fluxograma da extração sequencial de polissacarídeos.

Figura 6: Esquema representativo da extração de polissacarídeos com ácido nítrico (HNO_3).

Figura 7: (A) Precipitação etanólica do material obtido da extração com DMSO da polpa de frutos de *S. diploconos*, nos tempos de 2 h, 4 h e 5 h. (B) Resultado do teste com lugol: material obtido da extração com DMSO da polpa de frutos de *S. diploconos* (2 h) (a), amilose (controle positivo) (b) e DMSO (controle negativo) (c).

Figura 8: Precipitado etanólico da extração aquosa 90 °C da casca correspondente à fração CW90

Figura 9: Precipitação etanólica do material submetido à extração com ácido nítrico (HNO_3) (A e B) e após filtração do material (C).

Figura 10: Perfil de eluição das frações CW4 (A), CW90 (B), C1-60 (C), C1f (D), C5f (E), CNA (F) e CNA2 (G) obtidos por SEC-RI.

Figura 11: Espectros de FT-IR das frações CW4 (A), CW90 (B), e C1-60 (C), C1f (D), C5f (E), CNA (F), CNA2 (G).

Figura 12- Espectros de HSQC da fração CW4 em D_2O , a 70°C

Figura 13- Espectros parciais de ^{13}C -RMN (A) e de HSQC (B) da fração CW90 em D_2O , a 70°C

Figura 14- Espectros de RMN- ^{13}C das frações C1-60, C1f e C5f em D_2O , A 70°C

Figura 15- Espectros de RMN- ^{13}C das frações CNA e CNA2 em D_2O , A 70°C

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados sobre estudos de polissacarídeos obtidas de frutos de espécies da família Solanaceae

Tabela 2: Denominações das frações polissacarídicas obtidas a partir dos diferentes materiais vegetais (siglas e respectivos métodos de extração)

Tabela 3: Rendimentos em massa e percentagem das frações polissacarídicas obtidas na extração sequencial

Tabela 4: Rendimentos em massa e percentagem das frações polissacarídicas obtidas na extração com ácido mineral

Tabela 5: Composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas a partir da extração aquosa dos frutos de *S. diploconos*

Tabela 6: Composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas a partir da extração ácida dos frutos de *S. diploconos*

Tabela 7: Composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas a partir da extração alcalina dos frutos de *S. diploconos*

Tabela 8: Composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas a partir da extração com ácido mineral (HNO_3) de cascas de frutos de *S. diploconos*

Tabela 9: Massa molar ponderal média das frações CW4, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 determinada por SEC-RI/RALLS

Tabela 10: Grau de esterificação das frações obtidas pela extração sequencial (CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f) e pela extração com ácido mineral (HNO_3) (CNA e CNA2).

Tabela 11: Assinalamentos (em δ ppm) das frações CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 obtidos por 2D-RMN HSQC e ^{13}C -RMN.

Tabela 12: Estimativa percentual de homogalacturonanas (%HG) e ramnogalacturonanas tipo I (%RG1) e outros polissacarídeos não pécicos nas frações

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -GalpA - ácido galacturônico piranosídico em configuração anomérica alfa

β -GalpA - ácido galacturônico em configuração anomérica beta

AG-I – Arabinogalactana tipo 1

AG-II – Arabinogalactana tipo 2

AGP - Arabinogalactana-proteína

Ara – Arabinose

C1-60 – Fração polissacarídica da casca após extração com ácido cítrico 1 % (m/v), 60 °C, 1h

C1f – Fração polissacarídica da casca após extração com ácido cítrico 1 % (m/v), banho fervente, 1h

C5-60 – Fração polissacarídica da casca após extração com ácido cítrico 5 % (m/v), 60 °C, 1h

C5f – Fração polissacarídica da casca após extração com ácido cítrico 5 % (m/v), banho fervente, 1h

CHA2M – Fração polissacarídica da casca após extração alcalina - NaOH 2 M, obtida após neutralização

CHA4M – Fração polissacarídica da casca após extração alcalina - NaOH 4 M, obtida após neutralização

CHB2M – Fração polissacarídica da casca após extração alcalina - NaOH 2 M, obtida após precipitação etanólica

CHB4M – Fração polissacarídica da casca após extração alcalina - NaOH 4 M, obtida após precipitação etanólica

CNA – Fração polissacarídica da casca após extração com Ácido Nítrico 0,1M

CNA2 – Fração polissacarídica da casca após extração com Ácido Nítrico 0,1M seguido de tratamento com enzima

DA - grau de acetilação

DE - grau de esterificação

Dha - ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNS - Ácido dinitrosalicílico

D₂O - Óxido de deutério

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EtOH - Etanol

FT-IR - Espectrometria de infravermelho acoplado ao transformador Fourier

Fuc - Fucose

Gal - Galactose

GalA - Ácido Galacturônico

Glc – Glucose

GLC - Cromatografia líquido-gasosa

HA - hemicelulose A

HB - hemicelulose B

HG – Homogalacturonana

HM – *High methoxyl pectin*

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence

Kdo - ácido 3 deoxi-mano-2-octulosônico

LALLS - Low Angle Laser Light Scattering

LM – *Low methoxyl pectin*

Man - Manose

MeOH - Metanol

MRB - compostos modificadores da resposta biológica

Mw - massa molecular ponderal média

ONG – organização não governamental

P1-60 – Fração polissacarídica da polpa após extração com ácido cítrico 1 % (m/v), 60 °C

P1f – Fração polissacarídica da polpa após extração com ácido cítrico 1 % (m/v), banho fervente

P5-60 – Fração polissacarídica da polpa após extração com ácido cítrico 5 % (m/v), 60 °C

P5f – Fração polissacarídica da polpa após extração com ácido cítrico 5 % (m/v), banho fervente

PHA2M - Fração polissacarídica da polpa após extração alcalina - NaOH 2 M, obtida após neutralização

PHA4M - Fração polissacarídica da polpa após extração alcalina - NaOH 4 M, obtida após neutralização

PHB2M - Fração polissacarídica da polpa após extração alcalina - NaOH 2 M, obtida após

RG1 – ramnogalacturonanas tipo 1

RG2 – ramnogalacturonanas tipo 2

RMN - ^{13}C - Ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN- ^1H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

S1-60 – Fração polissacarídica da semente após extração com ácido cítrico 1 % (m/v), 60 °C

S1f – Fração polissacarídica da semente após extração com ácido cítrico 1 % (m/v), banho fervente

S5-60 – Fração polissacarídica da semente após extração com ácido cítrico 5 % (m/v), 60 °C

S5f – Fração polissacarídica da semente após extração com ácido cítrico 5 % (m/v), banho fervente

SEC - size exclusion chromatography

SHA2M – Fração polissacarídica da semente após extração alcalina - NaOH 2 M, obtida após neutralização

SHA4M – Fração polissacarídica da semente após extração alcalina - NaOH 4 M, obtida após neutralização

SHB2M – Fração polissacarídica da semente após extração alcalina - NaOH 2 M, obtida após precipitação etanólica

SHB4M – Fração polissacarídica da semente após extração alcalina - NaOH 4 M, obtida após precipitação etanólica

TFA – Ácido trifluoroacético

Xyl - Xilose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Família Solanaceae	3
2.2. <i>Solanum diploconos</i> (Mart.) Bohs	3
2.3. Abordagem quimiotaxonômica e bioprospecção	6
2.4. Compostos bioativos	6
2.4.1. Parede celular vegetal	6
2.4.2. Pectinas	7
2.6. Aplicações das Pectinas	10
2.7. Polissacarídeos família Solanaceae	12
3. JUSTIFICATIVA	13
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivos específicos:	14
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1. Coleta e fracionamento dos frutos	15
5.2. Teor de umidade	16
5.3. Inativação enzimática	16
5.4. Deslipidificação	16
5.5. Extração com dimetilsulfóxido (DMSO)	16
5.6 Extração sequencial de polissacarídeos	17
5.7. Extração de pectinas com ácido mineral	20
5.7.1. Tratamento enzimático para remoção do amido	21
5.8. Determinação da composição monossacarídica neutra e ácida	22
5.9. DOSAGENS COLORIMÉTRICAS	24
5.9.1. Identificação qualitativa de amido pelo teste de lugol	24
5.9.2. Dosagem de fenóis totais	24
5.9.3. Dosagem de grupos acetil	25
5.9.4. Dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS)	25
5.10. Determinação de homogeneidade e da massa molar ponderal média por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada com detector de índice de refração e espalhamento de luz	26
5.11. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS	27
5.11.1. Espectroscopia de Infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)	27
5.11.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28

6.1. Extração sequencial de polissacarídeos	28
6.2. Extração de pectinas com ácido nítrico	32
6.3. Composição monossacarídica neutra e ácida	33
6.4. Análise por cromatografia de exclusão estérica com detector de índice de refração e espalhamento de luz	37
6.5. Caracterização estrutural por espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)	41
6.6. Caracterização estrutural por espectroscopia de ressonância magnética nuclear	45
7. Conclusões	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

A família Solanaceae é conhecida pela sua grande importância econômica, apresentando diversas espécies utilizadas na alimentação humana, a exemplo da batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), berinjela (*Solanum melongena*), pimentão (*Capsicum annum*), e as pimentas (*Capsicum spp*) em geral (HAWKES, 1999). Um representante dessa família, encontrado na Mata Atlântica é o *Solanum diploconos* (sinonímias botânicas *Cyphomandra diploconos* Sendtn; *Witheringia diploconos* Mart), conhecido popularmente como tomatinho do mato, baga de veado, baga de bugre ou maracujá de morcego (HOFFMANN, 2014). *S. diploconos* encontra-se entre as espécies ameaçadas de extinção. (Status: Lower Risk/near threatened), listadas pela União Internacional de Conservação da Natureza (IUCN, 2019). Esta espécie frutífera é nativa da Floresta Ombrófila Mista, presente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (STEHMANN *et al.*, 2009). Os frutos, quando maduros, são comestíveis, porém existem poucos estudos em relação à sua bioprospecção. (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Polissacarídeos do gênero *Solanum* têm sido alvo de estudos devido à grande diversidade da espécie. Colodel *et al.*, (2017) caracterizou pectinas do fruto cubiu (*S. sessiliflorum*) como fonte promissora de pectinas com alto teor de ácido urônico. Do Nascimento *et al.*, (2015) estudou a atividade antinociceptiva de polissacarídeos de frutos de tamarillo (*S. betaceum*). Efeitos antitumoral de polissacarídeos de folhas de *S. nigrum* têm sido estudados por diversos autores (LI *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2014), bem como sua ação prebiótica (YAO *et al.*, 2020)

A bioprospecção apoia-se nos estudos de caracterização química, bem como, de investigação de propriedades biológicas de produtos obtidos na natureza. A abordagem quimiotaxonômica foi escolhida como estratégia para a bioprospecção. Nesta abordagem o estudo fitoquímico da planta é direcionado considerando o conhecimento prévio e as informações da literatura sobre os estudos descritos para os gêneros pertencentes a mesma família em estudo. Desta forma, os compostos alvos do presente trabalho são os pertencentes à classe dos polissacarídeos, destacando-se as pectinas. Pectinas são polissacarídeos presentes na parede celular vegetal comercialmente importantes na indústria

alimentícia e farmacêutica e como excipiente na liberação de fármacos (SRIAMORNSAK, 2003).

Este trabalho visa a valorização da espécie *S. diploconos*, agregando informações relevantes sobre seu potencial comercial. Justifica-se a escolha desta espécie, uma vez que é um exemplar nativo, pouco explorado comercialmente, está na lista de espécies ameaçadas de extinção, apresenta potencial de exploração econômica (como produtora de frutos e ornamental), e está na lista de espécies indicadas em ações de restauração ecológica e/ou plantios comerciais (SOCIEDADE CHAUÁ, 2015). Informações científicas acerca dos polissacarídeos de frutos de *S. diploconos* complementam o conhecimento científico desta espécie e contribuem com a sua valorização e seu uso racional e sustentável. Desta forma, o estudo dos polissacarídeos encontrados no fruto desta espécie *S. diploconos* contribuirá para valorizar projetos de conservação e sua introdução em programas para seu uso na alimentação. Além disso, sua amplificação da propagação e cultivo trará um incremento nos programas de restauração e/ou conservação de espécies nativas da Floresta Ombrófila Mista, possibilitando o uso racional e sustentável do patrimônio genético brasileiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Solanaceae

A família Solanaceae é conhecida pela sua grande importância econômica, apresentando diversas espécies utilizadas na alimentação humana, a exemplo da batata (*Solanum tuberosum*), tomate (*S. lycopersicum*), berinjela (*S. melongena*), pimentão (*Capsicum annum*), e as pimentas (*Capsicum* spp) em geral (HAWKES, 1999). Outra espécie menos conhecida a *S. betaceum* Cav., produtor de frutos chamados “tamarillo” é cultivado em escala comercial (CHALAMPUENTE; PRADO, 2005).

Pode-se destacar espécies desta família conhecidas por seus princípios ativos, como, *Atropa beladonna* (beladona, princípio atropina), *Datura stramonium* (trombeta ou erva do diabo, princípio escopolamina), *Nicotiana* spp (tabaco, princípio nicotina) (SOUZA; LORENZI, 2005) e jurubeba (*S. paniculatum*) (princípio do medicamento fitoterápico ierobina) (GOMES; LIMA; FACUNDO, 2017).

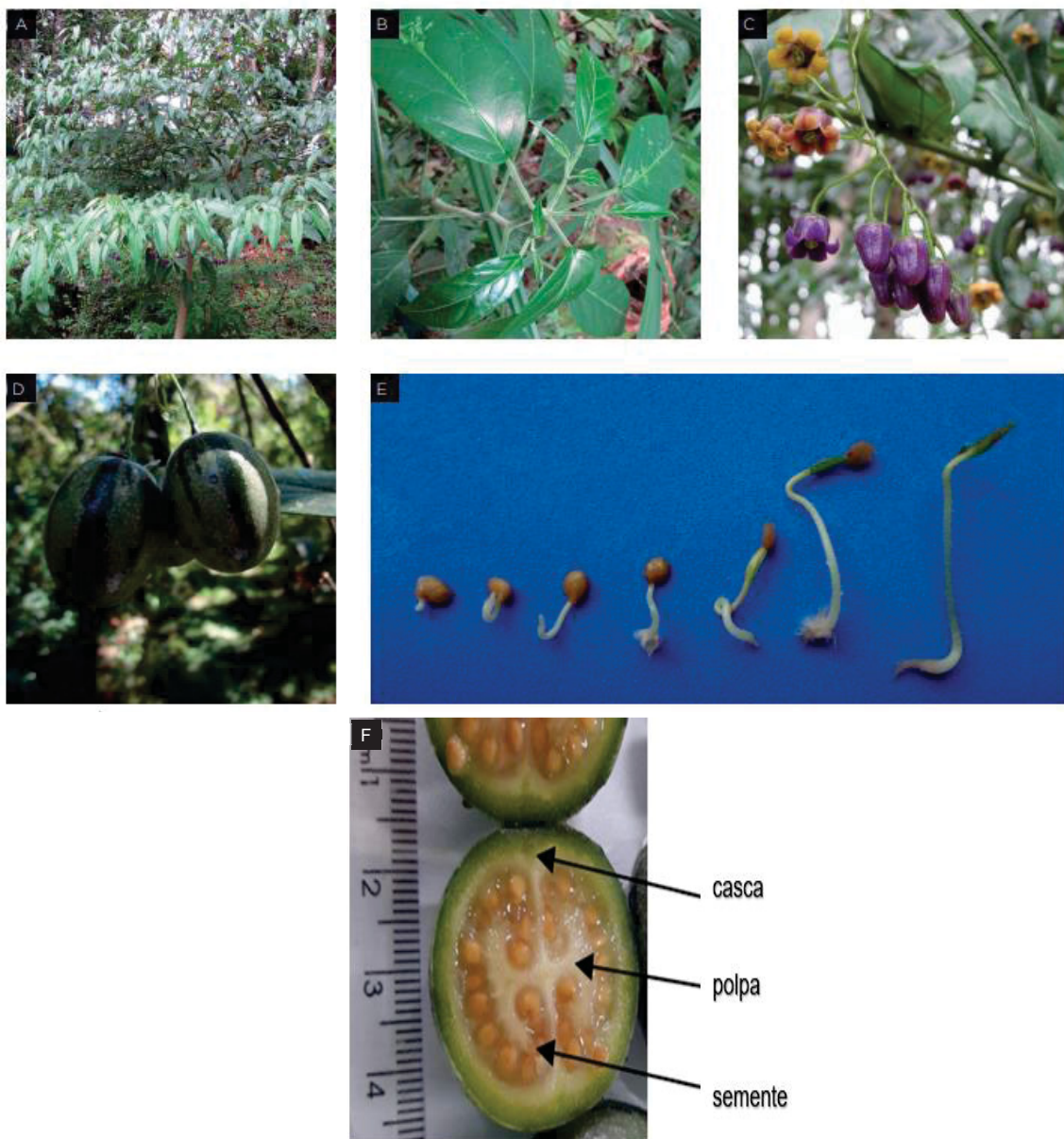
Novos conhecimentos científicos desta família possibilitam a implementação em produtos para auxiliar a população, na forma de medicamentos, cosméticos, condimentos e produtos industrializados. Na área farmacêutica, espécies já estudadas apresentaram efeitos eficazes contra diversas doenças como disfunções gastrointestinais e hepáticas, inflamações, redução do colesterol alto, tratar a diabetes, prevenir o câncer de próstata, dentre outros, além de serem utilizadas no controle biológico de diversos fungos, apresentando uma boa taxa de controle, redução e mortalidade dos mesmos (MESIA-VELA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2020; PERON *et al.*, 2008; PINTO *et al.*, 2011; SILVA-FILHO *et al.*, 1999)

2.2. *Solanum diploconos* (Mart.) Bohs

Dentre os gêneros da família Solanaceae, *Solanum* é considerado o maior e mais complexo gênero desta família (HAWKES, 1999; STEHMANN *et al.*, 2009). Estima-se que este gênero possua cerca de 1500 espécies e 5000 subespécies localizadas nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que a maior diversidade está na América do Sul (HAWKES, 1999). No Brasil, cerca de 350 espécies do gênero *Solanum* foram identificadas, sendo muitas delas endêmicas, incluindo a espécie *Solanum diploconos* (PEREIRA *et al.*, 2016). *S. diploconos* (Mart.) Bohs apresenta-

se como arbusto ou árvoreta de até 4 m de altura (FIGURA 1). A floração ocorre entre outubro e janeiro e a frutificação entre dezembro e maio (HOFFMANN, 2014). Os frutos são elipsoides, de cor verde predominante mesmo no fruto maduro e com tamanho médio de 3 cm de diâmetro (FIGURA 1). Os frutos apresentam consistência carnosa, com casca (composta por exocarpo e mesocarpo) e polpa (endocarpo) membranáceos, distinguíveis pela coloração. O endocarpo (casca) é cartilaginoso com grande quantidade de sementes envoltas por mucilagem (FIGURA 1).

Figura 1: A- Indivíduo adulto de *Solanum diploconos*; B- Folhas; C- Inflorescência; D- Frutos; E- Sementes em germinação; F - Detalhe do fruto de *S. diploconos* cortado ao meio com indicação de



seus componentes: casca (exocarpo + mesocarpo), polpa (endocarpo) e semente.

Fontes: Sociedade Chauá, 2018 (A – E) e a autora (2019) (F).

S. diploconos tem sido estudada em relação às suas características silviculturais com o intuito de possibilitar o desenvolvimento de mudas para ações de restauração e enriquecimento de florestas e/ou plantios comerciais (HOFFMANN, 2014). Esta espécie frutífera é nativa da Floresta Ombrófila Mista – unidade fitoecológica pertencente ao domínio do Bioma Mata Atlântica – presente nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (STEHMANN *et al.*, 2009) e muito frequente é representada em várias Unidades de Conservação ao longo da sua distribuição (CNCFlora, 2012) (FIGURA 2).

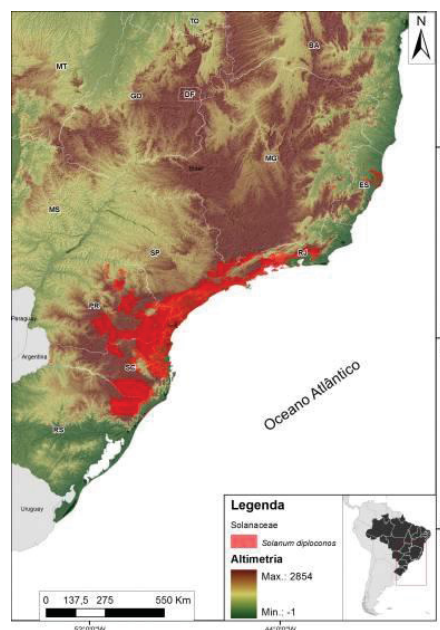


Figura 2: Mapa de ocorrência de *S. diploconos*.
Fonte: CNCFlora, 2012.

Pode-se destacar o potencial de exploração econômica desta espécie por ser uma árvore frutífera, bem como de aplicação ornamental (HOFFMANN, 2014). Os frutos, quando maduros, são comestíveis, porém, poucos estudos em relação às suas características químicas têm sido descritos. Ribeiro e colaboradores (2016) descreveram a composição fitoquímica de frutos de *S. diploconos*. Os resultados obtidos demonstraram que os frutos apresentam compostos fenólicos como ácidos coumárico, ferulico e caféico, bem como rutina. Além disso, verificou-se que os frutos apresentam de moderado a muito alto conteúdo de carotenoides (β -caroteno) e baixo conteúdo de tocoferóis. Nenhuma outra informação sobre estudos de bioprospecção de outras classes de compostos bioativos, como polissacarídeos, foi encontrada na literatura.

2.3. Abordagem quimiotaxonômica e bioprospecção

Para valorização desta espécie, é necessário agregar informações relevantes sobre seu perfil fitoquímico complementando o conhecimento científico sobre seu potencial como fonte de compostos bioativos. Uma vez que nenhuma descrição sobre o uso tradicional desta espécie foi verificada, optou-se por utilizar a abordagem quimiotaxonômica para direcionar a escolha de compostos alvos a serem estudados no processo de bioprospecção (BRANDÃO; PIGNAL; ROMANIUC, 2012; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). Nesta abordagem considera-se informações prévias da literatura sobre os gêneros pertencentes à família em estudo para direcionar o processo de bioprospecção.

2.4. Compostos bioativos

Diferentes partes dos vegetais podem apresentar propriedades medicinais relacionadas com a presença de compostos bioativos, que apresentam distintas características químicas, e que são classificados em metabólitos primários ou secundários (BRISKIN, 2000). Metabólitos secundários desempenham importantes funções na interação entre a planta e o meio ambiente, gerando vantagens na perpetuação da espécie, podendo atuar como atrativos de polinizadores e defensores químicos contra micro-organismos, insetos, predadores maiores e até mesmo outras plantas (BALANDRIN; KLOCKE; WURTELE, 1985). Os metabólitos primários estão relacionados com processos metabólicos, tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Estes compostos, em suma, proporcionam funções essenciais para a sobrevivência, o desenvolvimento e a reprodução das plantas. Dentro desse grupo, incluem-se moléculas de proteínas, nucleotídeos, lipídeos, polissacarídeos e glicoconjugados (BRISKIN, 2000). Destacam-se as pectinas, uma classe de componentes da parede celular vegetal com relevante importância medicinal e nutracêutica (SRIAMORNSAK, 2003).

2.4.1. Parede celular vegetal

A parede celular vegetal é uma rede dinâmica e altamente especializada formada por uma mistura heterogênea de celulose, hemiceluloses e pectinas, proteínas e compostos fenólicos (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012). A composição

molecular e os arranjos dos polímeros de parede celular diferem entre espécies, tecidos de uma única espécie, células individuais e até mesmo regiões da parede (CARPITA; MCCANN, 2015). Também se encontram na parede celular os glicoconjugados, como exemplos, podem ser citadas as arabinogalactana-proteínas (AGPs), moléculas estruturalmente complexas com importantes funções em processos de reconhecimento e sinalização celular (ELLIS *et al.*, 2010).

Entre os polissacarídeos presentes na parede vegetal, as hemiceluloses, representa um grupo heterogêneo de polissacarídeos formados por uma cadeia principal de glucose, manose ou xilose β -(1 $\rightarrow$ 4) ligados (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Hemiceluloses são polissacarídeos solúveis em soluções alcalinas que interagem por ligação de hidrogênio com as microfibrilas de celulose (CAFFALL; MOHNEN, 2009). As hemiceluloses são classificadas de acordo com os monossacarídeos majoritário presente na cadeia principal, como por exemplo: xilanas, glucomananas, mananas, galactomananas, xiloglucanas, calose (β -glucanas com ligações 1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4) β -glucanas (ASPINALL, 1980). As xiloglucanas são as hemiceluloses mais abundantes encontradas em solanáceas (DO NASCIMENTO *et al.*, 2015; DO NASCIMENTO; IACOMINI; CORDEIRO, 2016). Xiloglucanas são formadas por uma cadeia principal de unidades de β -D-Glc ligadas (1 $\rightarrow$ 4), substituídas por unidades de Xyl na posição O-6 (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

2.4.2. Pectinas

Pectinas são encontradas em grande quantidade, principalmente, nas cascas dos frutos e são responsáveis pela capacidade de retenção de água nos tecidos vegetais (OCHOA-VILLARREAL *et al.*, 2012). Frutos de espécies pertencentes a gêneros da família das solanáceas têm sido utilizados como fontes de polissacarídeos, em especial da classe das pectinas (DO NASCIMENTO; IACOMINI; CORDEIRO, 2016). Estruturalmente, as pectinas correspondem a uma família de polissacarídeos ácidos, formados por unidades de ácido galacturônico (GalpA), unidas por ligação do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4) (MOHNEN, 2008). De acordo com as características estruturais, as pectinas são classificadas em três principais grupos: homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas tipo I (RG1) e ramnogalacturonanas tipo II (RG2) (MOHNEN, 2008). As HG são polímeros lineares

formado por GalpA com ligação α -(1 $\rightarrow$ 4) e podem ser metil esterificadas em C-6, e O-acetiladas em O-2 e/ou O-3, dependendo da fonte vegetal. RG1 consiste no dissacarídeo de repetição composto por GalpA α -(1 $\rightarrow$ 4) ligadas e unidades de Rha α -(1 $\rightarrow$ 2) ligadas ao qual uma variedade de cadeias de galactanas, arabinanas e/ou arabinogalactanas estão ligadas a unidades de Rha. As RG2 são uma estrutura complexa, cuja cadeia principal consiste em uma HG com cadeias laterais complexas anexadas a unidades de GalA (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Pode ser considerado o mais complexo dos polissacarídeos pécticos, pois possui cadeias laterais bastante ramificadas, que contém em sua estrutura até 12 monossacarídeos diferentes (incluindo açúcares raros como a apiose, ácido acérico, ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico (Dha) e ácido 3 deoxi-mano-2-octulosônico (Kdo), em 20 tipos diferentes de ligações (MOHNEN, 2008; VORAGEN *et al.*, 2009). Willats e colaboradores (2006) apresentaram uma representação esquemática de estruturas hipotéticas da pectina (FIGURA 3).

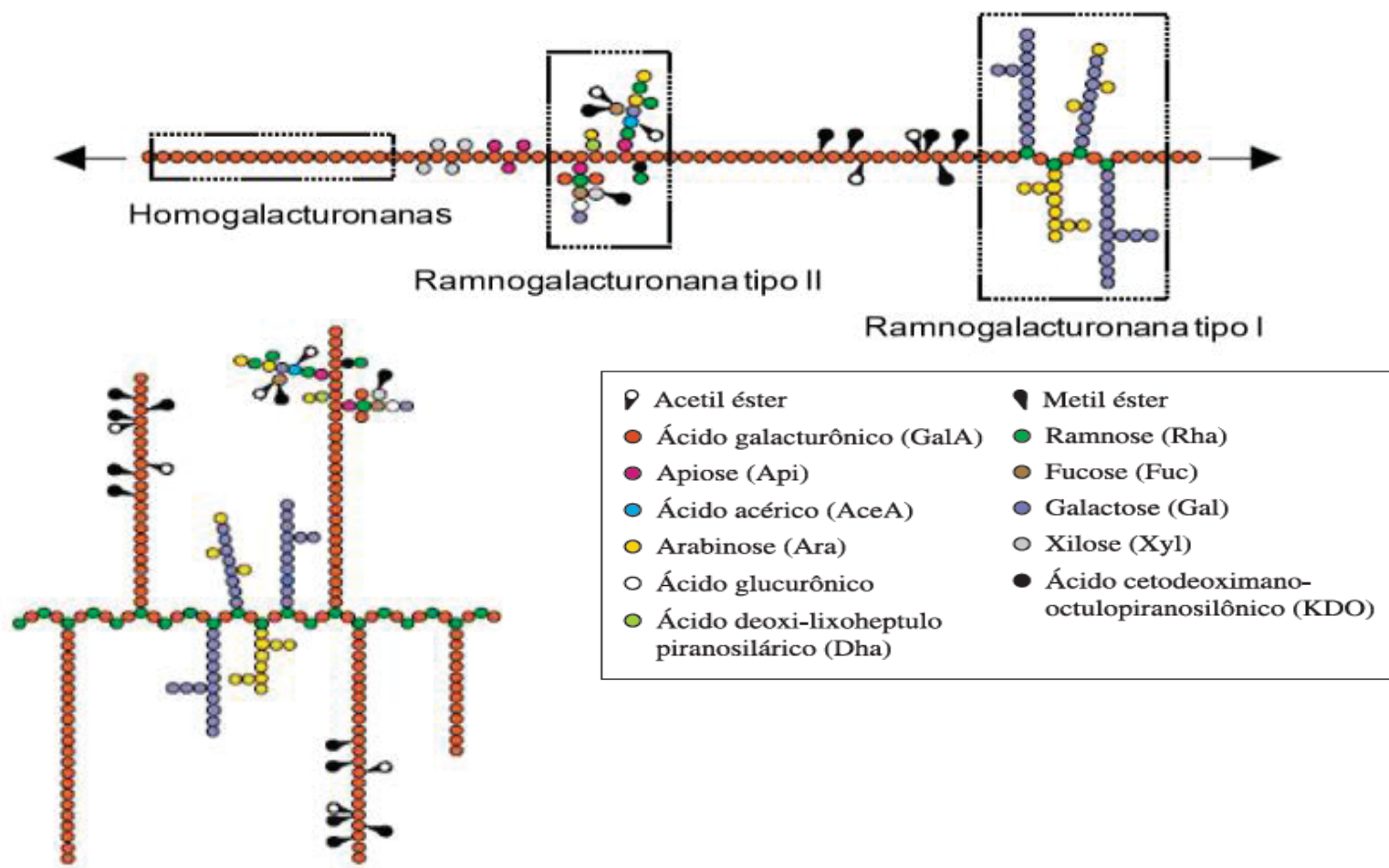


Figura 3: Representações esquemáticas da estrutura básica de pectinas.
Fonte: Adaptado de WILLATS; KNOX; MIKKELSEN (2006).

A proporção de grupos carboxílicos metil-esterificados em relação ao total de grupos carboxílicos nas pectinas é expressa como grau de esterificação (DE). Dependendo do grau de esterificação (DE), as pectinas podem ser classificadas em alta ou baixa metoxilação. As pectinas de alta metoxilação (HM – *High methoxyl pectin*) apresentam 50% ou mais dos seus grupos carboxílicos esterificados, enquanto as de baixa metoxilação (LM – *Low methoxyl pectin*) possuem menos de 50% destes grupos esterificados (ROLIN, 1993). A proporção de grupos O-acetil em relação ao total de unidades de GalpA é denominado grau de acetilação (DA). Geralmente pectinas nativas têm alto DE e baixo DA (VORAGEN *et al.*, 1995).

A estrutura química das pectinas varia de acordo com a fonte, fatores ambientais, condições de extração e técnicas de modificação, que afetam o rendimento da pectina e as características moleculares, como grau de esterificação, teor de ácido galacturônico, massa molar e comportamento reológico. Essa complexidade e variabilidade da estrutura tornam sua caracterização uma tarefa difícil e importante (VENZON, 2015).

Polissacarídeos constituídos por arabinose e/ou galactose têm sido isolados em associação com polissacarídeos pécticos (PAULSEN; BARSETT, 2005). As principais estruturas descritas incluem polissacarídeos do tipo arabinanas, galactanas e arabinogalactanas. As arabinogalactanas são classificadas em arabino-4-galactanas, conhecida como tipo I ou AG-I e arabino-3, 6-galactanas, conhecida como tipo II ou AG-II (PAULSEN; BARSETT, 2005). Arabinanas, AG-I e AG-II são frequentemente encontradas ligadas às pectinas do tipo RG1, ocorrendo a ligação na posição 4 das unidades de ramnose da cadeia principal dessas pectinas (PAULSEN; BARSETT, 2005). As AG-I possuem uma cadeia linear de unidade Galp ligadas β -(1→4) com unidades Araf α -(1→5) presentes em cadeias laterais curtas de conectadas na posição O-3 das unidades de Gal (VORAGEN *et al.*, 1995). As AG-II são estruturas mais complexas e altamente ramificadas com unidades de β -D-Gal unidas por ligações (1→3) nas cadeias internas e (1→6) nas cadeias externas carregando ramificações adicionais de unidades furanosídicas de α -L-Ara em ligações (1→3) e/ou (1→5), que são geralmente terminadas por unidades L-Araf e em algum grau por unidades L-Arap (VORAGEN *et al.*, 1995). AG-II podem estar associadas a proteínas, denominadas de arabinogalactana proteínas (AGPs) (SEIFERT; ROBERTS, 2007).

2.5. Extração de pectinas

A extração de pectinas tem se destacado como alternativa para o aproveitamento de resíduos de certas frutas. As cascas, até então descartadas pela indústria, têm sido usadas como matéria prima para a produção de alguns ingredientes funcionais perfeitamente possíveis de serem incluídos na alimentação humana (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A extração de pectina é um processo de múltiplos estágios físico-químicos, nos quais a hidrólise e extração de macromoléculas do tecido vegetal e sua solubilização sofrem influência de diversos fatores, entre eles, temperatura, pH e tempo de extração. Normalmente as pectinas são extraídas com água acidificada com ácidos fosfórico, acético, sulfúrico, nítrico ou clorídrico em pH variando de 1 a 3 em temperatura entre 80 e 100 °C (PAGÁN *et al.*, 2001). O processo de extração ácida geralmente resulta em pectinas de alto grau de esterificação (alto DE), próximo do grau de esterificação de ocorrência natural, enquanto o processo de extração básica resulta em pectinas de baixo grau de esterificação, como resultado da hidrólise alcalina dos grupos ésteres (JOYE; LUZIO, 2000). As pectinas também podem ser extraídas da parede celular por agentes quelantes de cálcio, como oxalato de amônio e EDTA (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Apesar de muito utilizados na indústria, os ácidos minerais fortes podem apresentar inúmeras desvantagens, como poluição ambiental, corrosão e degradação da pectina extraída, assim, muitos pesquisadores têm se preocupado em identificar condições ideais de extração com ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, para a obtenção de uma pectina de alta qualidade, beneficiando a indústria de alimentos sob o ponto de vista econômico e ambiental (VIRK; SOGI, 2004).

2.6. Benefícios das Pectinas

Pectinas são polissacarídeos comercialmente importantes por terem boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, baixa toxicidade e apresentam benefícios nutricionais (SRIVASTAVA; MALVIYA, 2011). Na indústria farmacêutica é usada como excipiente na liberação de fármacos (SRIAMORNSAK, 2003). Em infusões e decocções, as pectinas, bem como outros polissacarídeos com características mucilaginosas, têm como efeito reduzir a irritação física ou química, desta forma, as pectinas exercem uma ação positiva contra as inflamações das mucosas,

especialmente as das vias respiratórias e digestivas (ALONSO, 2007). Pectinas, arabinogalactanas e AGPs foram encontradas em diferentes espécies medicinais, apresentando efeitos sobre a resposta imune celular e humoral (PAULSEN; BARSETT, 2005; SCHEPETKIN; QUINN, 2006) sendo consideradas compostos modificadores da resposta biológica (DIALLO et al., 2001) e imunomoduladoras (BUSATO et al., 2020). Pectinas são utilizadas na indústria de processamento de alimentos sendo utilizada como aditivo alimentar como agente de gelificação, para dar textura e estabilizar compotas, geleias, marmeladas, leite e produtos de confeitaria (KYOMUGASHO et al., 2015). O grau de metil-esterificação e de acetilação das pectinas tem grande impacto nas suas propriedades funcionais, sendo responsável pelo seu comportamento de gelificação (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Reichembach (2020) comprovou o potencial do café arábica (*Coffea arabica*) como fonte de pectina gelificante para a indústria alimentícia especialmente na presença de sacarose e xilitol em baixo pH. Coloddel (2019) demonstrou a propriedade gelificante de ponkan (*Citrus reticulata*) sugerindo seu uso em alimentos viscosos com néctares e iogurtes. Entre outras propriedades está a estabilização de produtos de panificação e o aumento do volume e na prevenção de flotação (VORAGEN et al., 2009).

Em virtude da sua capacidade de reter líquidos, as pectinas promovem a sensação de saciedade o que diminui o consumo de alimentos auxiliando no emagrecimento (SRIAMORNSAK, 2003). Pode ser uma substituta de gordura e açúcar em alimentos dietéticos melhorando a textura e a viscosidade dos produtos na qual é utilizada (VORAGEN et al., 1995; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Também apresentam possuir efeitos hipocolesterolêmicos e hipoglicemiantes significativos confirmados por vários experimentos clínicos (SRIAMORNSAK, 2003; MOHNEN, 2008). Também atuam indiretamente como laxativos, por absorverem grande quantidade de água, evitando o endurecimento das fezes (ALONSO, 2007).

Pectinas também podem ser utilizadas em vários produtos, isto inclui filmes biodegradáveis e comestíveis, adesivos, substitutos de papel, espumas e plastificantes, agentes de superfície para produtos médicos, materiais para implantes biomédicos e sistemas de liberação de fármacos (MOHNEN, 2008).

2.7. Polissacarídeos família Solanaceae

Polissacarídeos da família Solanaceae têm sido alvo de estudos devido à grande diversidade da espécie. Colodel *et al.*, (2017) caracterizou pectinas do fruto cubiu (*S. sessiliflorum*) como fonte promissora de pectinas com alto teor de ácido urônico (79%). Do Nascimento *et al.*, (2015) estudou a atividade antinociceptiva de polissacarídeos de frutos de tamarillo (*S. betaceum*) no modelo de dor inflamatória visceral de camundongos. Efeitos antitumoral de polissacarídeos de folhas de *S. nigrum* têm sido estudados por diversos autores em diferentes células de ratos (LI *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2014), e sua ação prebiótica foi investigada a partir da análise da microbiota fecal humana (YAO *et al.*, 2020)

Resumidamente, na Tabela 1 estão descritas informações relacionadas com estudos de polissacarídeos obtidas de frutos de espécies da família Solanaceae.

Tabela 1: Dados sobre estudos de polissacarídeos pécnicos obtidos de frutos de espécies da família Solanaceae

Espécie/nome vulgar	Tipos de polissacarídeos	Referência
<i>Solanum lycopersicum</i> tomate	Pectinas com grande linearidade geralmente com baixo grau de ramificação do tipo RG1 e alto grau de metoxilação	HOUBEN <i>et al.</i> (2011)
<i>Solanum betaceum</i> tamarillo	HG altamente metil esterificada, com inserções de RG1 com cadeias laterais de AG-I, arabinana linear (1→5) ligada	DO NASCIMENTO <i>et al.</i> (2015) DO NASCIMENTO; IACOMINI; CORDEIRO (2016)
<i>Capsicum annuum</i> pimentão	HG parcialmente substituída com grupos metil e acetil (denominado <i>capsicuman</i>), arabinogalactana ácida	POPOV <i>et al.</i> (2011) PAIK <i>et al.</i> (2003)
<i>Lycium barbarum</i> Goji	RG; glucana; 4-O-metil-glucuronoxilana; xiloglucana; manana e AGP	REDGWELL <i>et al.</i> (2011)
<i>Physalis alkekengi</i> fisális	fração polissacarídica contendo Ara:Gal:Glc:GalA na proporção de 2,6:3,6:2:1	TONG <i>et al.</i> (2008)
<i>Solanum sessiliflorum</i> Cubiu	Pectinas com elevado teor de ácidos urônicos e presença de Rha, Gal a Ara	COLODEL <i>et al.</i> (2017)

Nota: AGP: Arabinogalactana-proteína, Ara: Arabinose; Gal: Galactose; GalA: Ácido Galacturônico; Glc: Glucose; HG: Homogalacturonana, AG-I: Arabinogalactana tipo 1, AG-II: Arabinogalactana tipo 2, HG: Homogalacturonana, RG: ramnogalacturonana, RG1: ramnogalacturonana tipo 1, Rha: ramnose.

3. JUSTIFICATIVA

S. diploconos é uma espécie frutífera e nativa da Mata Atlântica com potencial para exploração econômica. Estudos relacionados às características silviculturais já foram realizados o que possibilita o desenvolvimento de mudas para ações de restauração e enriquecimento de florestas e/ou plantios comerciais. Diferentemente, poucos estudos de bioprospecção desta espécie têm sido descritos. Os frutos foram estudados em relação ao seu perfil fenólico e de carotenoides (RIBEIRO *et al.*, 2016), porém, nenhuma outra informação sobre estudos de caracterização química ou propriedades biológicas de outras classes de compostos bioativos, como por exemplo polissacarídeos, foi encontrada na literatura. Polissacarídeos vegetais, como as pectinas, apresentam relevância científica devido à potencial aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica. Informações científicas acerca dos polissacarídeos de frutos de *S. diploconos* complementarão o conhecimento científico desta espécie e contribuirão com a sua valorização e seu uso racional e sustentável.

4. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar as frações polissacarídicas obtidas de frutos de *S. diploconos*.

4.1. Objetivos específicos:

- Extrair frações polissacarídicas presentes nos frutos de *S. diploconos* através de extrações sequenciais em diferentes condições (extrator e temperatura) e de diferentes partes do fruto (casca, polpa e semente);
- Obter frações pécicas da casca de frutos, utilizando uma extração tradicional com ácido mineral;
- Caracterizar a composição monossacarídica neutra e ácida das frações polissacarídicas obtidas a partir das extrações sequenciais e da extração tradicional;
- Caracterizar as frações selecionadas considerando os resultados de rendimento, composição monossacarídica neutra e ácida (CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2) por métodos cromatográficos e espectroscópicos;
- Propor a estrutura química da fração extraída com ácido mineral e purificada (CNA2).
- Contribuir com o conhecimento científico da espécie *S. diploconos*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Coleta e fracionamento dos frutos

Os frutos foram coletados em Maio de 2019 e 2020 na Sociedade Chauá – ONG voltada à conservação da natureza localizada no município de Campo Largo/PR, Brasil (25°25'39.9"S 49°29'03.6"W). O peso total dos frutos foi de 2283 g. A identificação taxonômica foi feita pelo MSc Pablo Melo Hoffmann - Diretor Executivo da Sociedade Chauá e Coordenador do Viveiro Chauá de espécies nativas. O cadastro do acesso ao patrimônio genético brasileiro será feito no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Cadastro SisGEN - AD0E3FB). Os frutos foram lavados em água corrente, secos e retirados os pedúnculos. Os frutos foram cortados e fracionados com auxílio de bisturi e espátula, em casca (exocarpo e mesocarpo), polpa (endocarpo), e sementes. As sementes foram centrifugadas (4.300 rpm, por 15 min, a 10 °C) para remoção do sumo (parte líquida do fruto). Todo material vegetal foi liofilizado e mantido a 4 °C (Figura 4). Os frutos podres foram descartados.

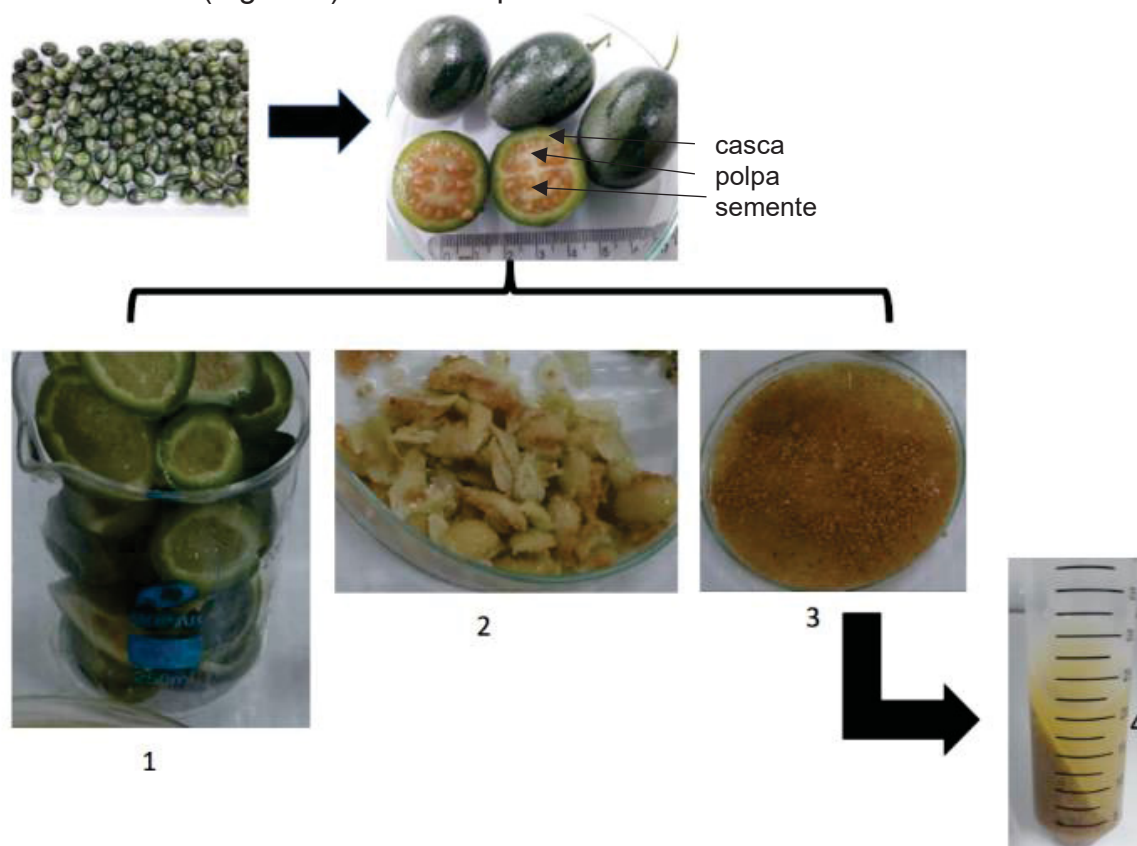


Figura 4: Frutos de *S. diploconos* e suas partes: exocarpo e mesocarpo (casca) (1), endocarpo (polpa) (2), sementes e sumo (3 e 4) de *S. diploconos*.

Fonte: A autora (2019)

5.2. Teor de umidade

Frutos inteiros (n=5) foram utilizados para medir o teor de umidade. Os frutos foram cortados em 4 partes e colocados, cada um, em uma placa de petri na estufa a 100°C. Os frutos foram pesados por 4 dias nos intervalos de 0 h, 24 h, 48 h e 72 h. O resultado foi obtido em percentagem entre o peso da água relacionado à massa.

5.3. Inativação enzimática

O material vegetal (casca, polpa ou semente) liofilizado foi submetido separadamente à inativação enzimática por desnaturação com metanol a fim de conservar o material. Utilizou-se uma solução de metanol:água na proporção de 2:1 (v/v) sob refluxo por 40 min em banho fervente. Após filtração, o material foi seco em capela de exaustão, por 24 h.

5.4. Deslipidificação

O material vegetal inativado foi submetido ao processo de deslipidificação com uma solução de tolueno:etanol (2:1; v/v) sob refluxo por 40 min, a 60 °C. Após filtração em tecido sintético, o material foi seco em capela de exaustão por 2 dias. As cascas foram submetidas a este processo por 2 vezes. Para as extrações o material seco foi pulverizado usando um liquidificador.

5.5. Extração com dimetilsulfóxido (DMSO)

Ao material vegetal (inativado, deslipidificado e moído), sendo 5 g de polpa, 5 g da casca e 10 g da semente, foi adicionado DMSO aquoso 90% (v/v) na proporção 20 mL por g de material e mantido sob agitação por um período de 5 h, a 25 °C . Considerando que o amido é extraído com DMSO aquoso (Colodel *et al.*, 2017), foi feito o monitoramento da presença do amido nos tempos 2 h, 4 h, e 5 h pelo teste do lugol. Desta forma, alíquota de 100 µL do extrato (após centrifugação) foi submetida ao teste do lugol, a qual foi comparada com o controle negativo (DMSO aquoso 90%, v/v) e o controle positivo (solução de amilose na concentração de 20 mg/mL). Ao final do período, o material foi centrifugado (centrífuga MPW Med Instruments, modelo MPW-350R, Warsaw, Polônia), a 4.300 rpm, por 15 min, a 10

°C. O sobrenadante foi precipitado com etanol absoluto (99,5%), centrifugado nas mesmas condições acima descritas e o precipitado foi armazenado no freezer para análises posteriores. O resíduo (material vegetal após extração com DMSO) foi submetido à extração sequencial de polissacarídeos (extrações aquosa, ácida e alcalina).

5.6 Extração sequencial de polissacarídeos

O fluxograma geral realizado para a extração sequencial de polissacarídeos está representado na Figura 5. A metodologia de extração foi realizada de acordo com VRIESMANN; PETKOWICZ (2009) com modificações.

A extração aquosa foi realizada com água ultrafiltrada, mantendo a proporção de 20 mL por g, em 3 condições diferentes, variando a temperatura e o tempo de extração. Na primeira extração aquosa o material foi mantido sob agitação por 4 h a 25 °C. Na segunda extração, o material foi agitado por 2 h a 25 °C e na terceira extração o material foi mantido por 2 h a 90 °C. A cada extração o material foi centrifugado a 4.300 rpm, por 15 min, a 10 °C, e o sobrenadante obtido foi submetido à precipitação etanólica (3 x volume, com etanol absoluto, 99,5%), e mantido por 16-18 h a 4°C. Na sequência, o precipitado foi obtido após centrifugação, nas mesmas condições citadas anteriormente. O precipitado resultante foi solubilizado em água ultrafiltrada, congelado e liofilizado, gerando as frações polissacarídicas da extração aquosa (CW4, CW2, CW90, PW4, PW2, PW90, SW4, SW2, SW90) como indicado na Figura 5 e Tabela 2.

A extração ácida foi realizada, sequencialmente, com ácido cítrico 1 % (m/v) em banho-maria a 60 °C, com ácido cítrico 1 % (m/v) em banho fervente, com ácido cítrico 5% (m/v) em banho-maria a 60 °C e com ácido cítrico 5 % (m/v) em banho fervente. Em todas as condições o material foi mantido sob agitação por 1 h. Após cada extração, o material foi centrifugado a 4.300 rpm, por 15 min, a 10 °C, e o sobrenadante submetido à precipitação etanólica (mesmas condições descritas anteriormente). As frações das extrações ácidas foram dialisadas com o intuito de remover o excesso de sal obtido da reação com o ácido. A diálise foi realizada em membranas de acetato de celulose (limite de exclusão 12-14 KDa) por 48 h em sistema aberto e por 3 h em sistema fechado com trocas regulares de água ultrafiltrada. Posteriormente, as frações foram congeladas e liofilizadas, sendo

denominadas de acordo com o material vegetal e a condição de extração de C1-60, C1f, C5-60, C5f, P1-60, P1f, P5-60, P5f, S1-60, S1f, S5-60 e S5f, como descrito na Figura 5 e Tabela 2.

A extração alcalina foi realizada primeiramente com hidróxido de sódio (NaOH) 2 M, por 2 h, a 25 °C, sob agitação constante e na presença de 10 mg de borohidreto de sódio (NaBH₄). Em seguida, o material foi centrifugado a 4.300 rpm, por 15 min, a 10 °C, e seu resíduo submetido à extração alcalina com NaOH 4 M, mas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante (de ambas as extrações) foi neutralizado com ácido acético 50% (v/v) e mantido a 4°C, por 16 h. Na sequência, o material foi centrifugado a 4.300 rpm, por 15 min, a 10 °C; o precipitado originou a fração hemicelulose A (denominadas CHA2M, PHA2M, SHA2M, CHA4M, PHA4M e SHA4M) (Figura 5 e Tabela 2). O sobrenadante foi submetido à precipitação etanólica (3 x volume, com etanol absoluto, 99,5%), o qual foi mantido por 16 h a 4 °C, e novamente, centrifugado nas mesmas condições, originando a fração hemicelulose B (denominadas CHB2M, PHB2M, SHB2M, CHB4M, PHB4M e SHB4M) (Figura 5 e Tabela 2). As frações das extrações alcalinas também foram dialisadas, nas condições descritas anteriormente, e em seguida, liofilizadas.

O cálculo do rendimento (em %) das frações polissacarídicas obtidas foi determinado como:

$$\text{Rendimento (em \%)} = \frac{\text{fração polissacarídica liofilizada (em g)}}{\text{material vegetal (inativado, deslipificado e moído)(em g)}} \times 100$$

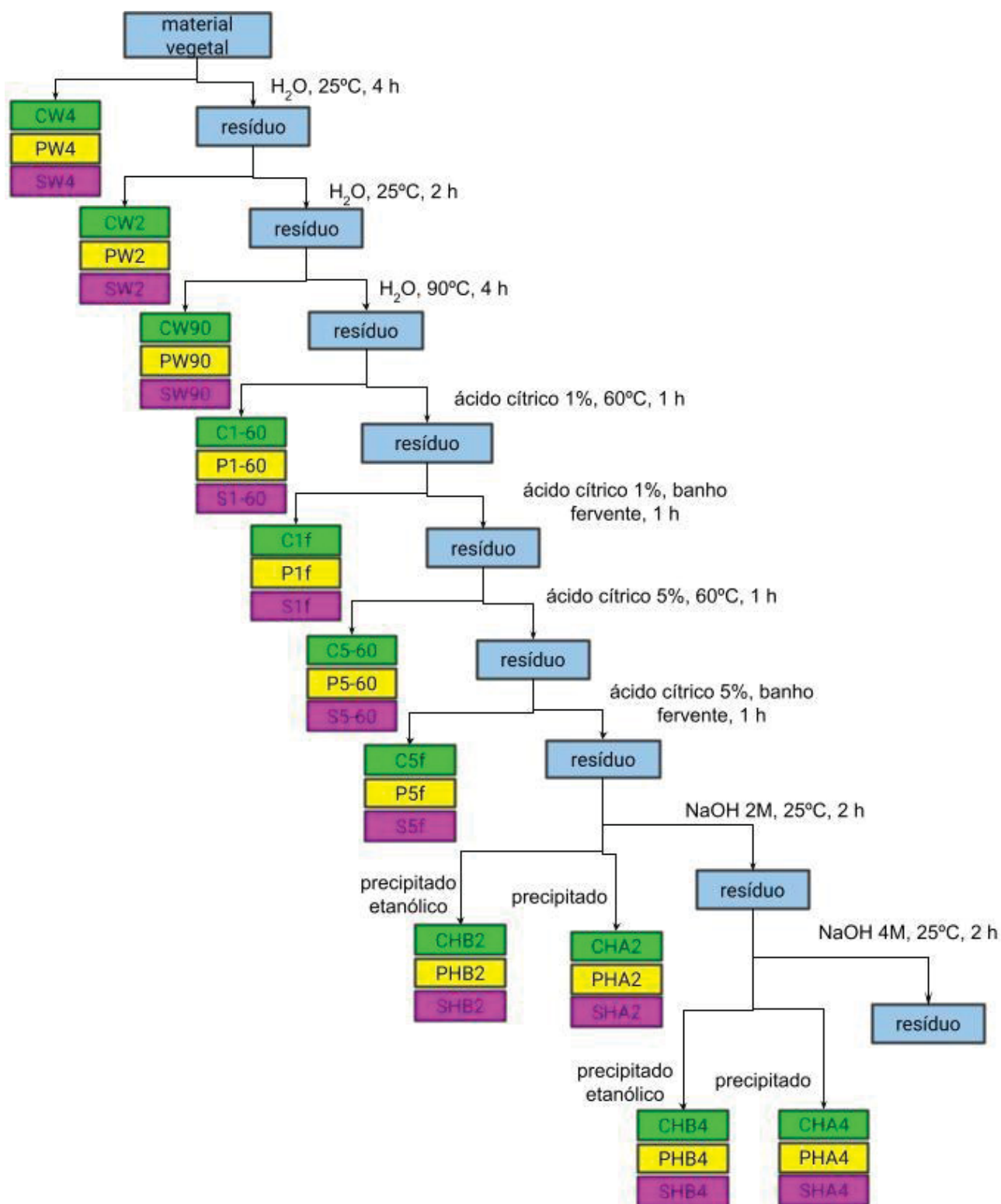


Figura 5: Fluxograma da extração sequencial de polissacarídeos.

Fonte: A autora (2020).

Nota: Material vegetal refere-se ao material após inativação enzimática, deslipidificação e extração com DMSO aquoso 90% (v/v). A cada extração o material foi centrifugado a 4.300 rpm, por 15 min, a 10 °C, e o sobrenadante submetido à precipitação etanólica (3 x volume, com etanol 99,5%), o qual foi mantido por 16 h a 4 °C, e novamente, centrifugado nas mesmas condições.

Na Tabela 2 estão descritas as denominações das frações polissacarídicas obtidas a partir dos diferentes materiais vegetais, indicadas por suas siglas e seus respectivos métodos de extração.

Tabela 2: Denominações das frações polissacarídicas obtidas a partir dos diferentes materiais vegetais (siglas e respectivos métodos de extração)

Casca (exocarpo e mesocarpo)	Polpa (endocarpo)	Sementes	Condições de extração
CW4	PW4	SW4	Aquosa, 25 °C, 4 h
CW2	PW2	SW2	Aquosa, 25 °C, 2 h
CW90	PW90	SW90	Aquosa, 90 °C, 2 h
C1-60	P1-60	S1-60	Ácido cítrico 1 % (m/v), 60 °C, 1 h
C1f	P1f	S1f	Ácido cítrico 1 % (m/v), banho fervente, 1 h
C5-60	P5-60	S5-60	Ácido cítrico 5 % (m/v), 60 °C, 1 h
C5f	P5f	S5f	Ácido cítrico 5 % (m/v), banho fervente, 1 h
CHA2M	PHA2M	SHA2M	Alcalina com NaOH 2 M, 25 °C, 2 h, após neutralização
CHB2M	PHB2M	SHB2M	Alcalina com NaOH 2 M, 25 °C, 2 h, após precipitação etanólica
CHA4M	PHA4M	SHA4M	Alcalina com NaOH 4 M, 25 °C, 2 h, após neutralização
CHB4M	PHB4M	SHB4M	Alcalina com NaOH 4 M, 25 °C, 2 h, após precipitação etanólica

Fonte: A autora (2020).

5.7. Extração de pectinas com ácido mineral

Além do protocolo de extração sequencial de polissacarídeos, foi realizado também a extração de pectinas pelo método tradicional que utiliza soluções de ácidos minerais, com por exemplo o ácido nítrico (HNO_3), em temperatura entre 80 e 100 °C. O método tradicional é comumente empregado para extração de pectinas comerciais (PAGÁN *et al.*, 2001).

Assim, considerando a disponibilidade de material vegetal, as cascas dos frutos de *S. diploconos* foram selecionadas para esta etapa e a extração com HNO_3 foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Colodel *et al.* (2019).

A extração com HNO_3 foi realizada com 20 g da casca, previamente, inativada, deslipidificada, liofilizada e moída. A este material foram adicionados 500 mL de HNO_3 0,1 M na proporção sólido – líquido 1:25 (m/v), e mantido sob refluxo por 60 min. Posteriormente, o material foi filtrado a vácuo utilizando um tecido sintético. O resíduo obtido foi congelado e o filtrado foi submetido à precipitação

etanólica (3x vol) e mantido a 4 °C por 18 h. O precipitado foi separado por filtração a vácuo, solubilizado em água ultrafiltrada e liofilizado, rendendo a fração **CNA** (Figura 6). O rendimento foi calculado como descrito anteriormente para as frações obtidas pela extração sequencial.

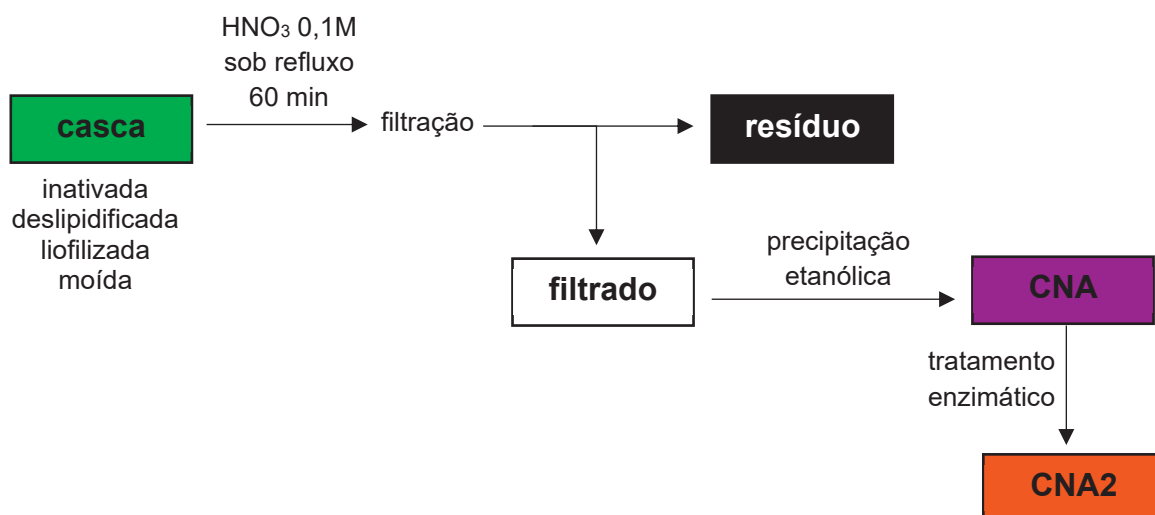


Figura 6: Esquema representativo da extração de polissacarídeos com ácido nítrico (HNO₃).

Fonte: A autora (2021).

5.7.1. Tratamento enzimático para remoção do amido

A fração CNA foi submetida ao tratamento com as enzimas amiloglucosidade (Megazyme, Bray, Irlanda), e α -amilase termoestável (Sigma Aldrich.CO, St. Louis, MO, EUA) por ter apresentado valor considerável de Glc na composição monossacarídica. A fração CNA (0,9 g) foi solubilizada em 45 mL de H₂O (20 mg/mL) e o pH foi ajustado a. A solução permaneceu sob agitação por 16 h, a 25 °C. Após, a solução foi mantida a temperatura de 55 °C (banho-maria), e então foram adicionados 10 μ L (0,000022 U/mL) de amiloglucosidase e 10 μ L (0,134 U/mL) de α -amilase. A solução ficou sob agitação suave durante 4 h. A reação enzimática foi monitorada nos tempos de 30 min, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h pela presença de glicose quantificada pelos métodos da glicose oxidase usando o kit Glicose Liquiform (Glicose PAP Liquiform – Labtest Diagnóstica S.A., MG, Brasil) e por dosagem de açúcares redutores pelo método ácido dinitrosalicílico (DNS) e pela identificação qualitativa do amido pelo teste do lugol. Após 4 h, a solução foi colocada em banho fervente por 15 min para desnaturação das enzimas. A solução

foi centrifugada a 4.300 rpm, por 15 min, a 10 °C, dialisada em membranas de acetato de celulose (limite de exclusão 12-14 KDa) por 48 h em sistema aberto e por 3 h em sistema fechado com trocas regulares de água ultrafiltrada. A fração obtida foi congelada e liofilizada, e denominada CNA2. O rendimento da fração CNA2 foi calculado em relação a massa da fração CNA.

5.8. Determinação da composição monossacarídica neutra e ácida

A composição monossacarídica neutra das frações (CW4, CW2, CW90, C1-60, C1f, C5-60, C5f, CHA2M, CHB2M, CHA4M, CHB4M, PW4, PW2, PW90, P1-60, P1f, P5-60, P5f, PHA2M, PHB2M, PHA4M, PHB4M, SW4, SW2, SW90, S1-60, S1f, S5-60, S5f, SHA2M, SHB2M, SHA4M, SHB4M, CNA e CNA2) foi determinada por cromatografia líquido-gasosa (GLC) na forma de derivados de acetato de alditóis, de acordo com a metodologia descrita por Pettolino *et al.* (2012). Inicialmente foi realizada uma hidrólise ácida total em alíquotas de 100 µL de amostra na concentração de 1 mg/mL com a 100 µL ácido trifluoracético (TFA) 5 M mantidas por 2 h e 30 min, a 100 °C em estufa. Em seguida foi realizada a redução e acetilação dos produtos de hidrólise (PETTOLINO *et al.*, 2012).

A redução foi realizada com a adição de 50 µL de boroidreto de sódio em meio básico (NaBH₄ 0,5 M em NH₄OH 2 M) mantida por 2 h e 30 min em temperatura ambiente (25 °C). Após o período de redução, o excesso do agente redutor foi removido com 20 µL de ácido acético concentrado seguido de secagem em fluxo de nitrogênio comercial. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 250 µL de ácido acético 5% (v/v) em metanol, e mais duas lavagens com 250 µL de metanol (PETTOLINO *et al.*, 2012).

A acetilação foi realizada com a adição de 250 µL de anidrido acético mantida por 2 h e 30 min em estufa a 100 °C. Após este período, o excesso de anidrido acético foi removido com adição de 1 mL de água destilada, seguida de agitação vigorosa e repouso de 10 min. Foi adicionado 1 mL de clorofórmio resultando na separação da solução em duas fases: uma fase do clorofórmio (fase inferior - mais densa), aonde os acetatos de alditóis formados estavam solubilizados; e uma aquosa (fase superior), contendo resíduos e sais de sódio. A fase do clorofórmio foi lavada por 2 vezes com 1 mL de água destilada e evaporada com fluxo de nitrogênio comercial (PETTOLINO *et al.*, 2012).

As análises por GLC foram realizadas em cromatógrafo a gás (TRACE ULTRA, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, EUA), em coluna capilar DB-225 (30 mm x 0,25 mm d.i.) (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA) , aquecido a 100 °C durante a injeção e então programada a 60 °C/min até 230 °C (constante).As porcentagens relativas dos monossacarídeos foram calculadas por comparação com os tempos de retenção dos acetatos de alditóis padrões [ramnose (Rha), fucose (Fuc), arabinose (Ara), xilose (Xyl), galactose (Gal), manose (Man), glucose (Glc)].

Ácidos urônicos presentes nas frações (CW4, CW90, C1-60, C1f, C5-60, C5f, CHA2M, CHB2M, CHA4M, CHB4M, PW4, PW90, P1-60, P1f, P5-60, P5f, PHA2M, PHB2M, PHA4M, PHB4M, SW4, SW90, S1-60, S1f, S5-60, S5f, SHA2M, SHB2M, SHA4M, SHB4M, CNA e CNA2) foram quantificados através do método do m-hidroxibifenil descrito por FILISETTI-COZZI; CARPITA (1991) com adaptações. As amostras foram previamente solubilizadas em H₂O destilada na concentração de 1 mg/mL, 100 µL foram pipetados em microtubos em triplicata e branco para cada amostra. Foram adicionados 10 µL de sulfamato de potássio (4 M, pH 1,6) e os tubos. Em seguida foram adicionados 600 µL de tetraborato de sódio (75 mM em H₂SO₄) seguido de agitação em vórtex. Os tubos foram aquecidos em estufa a 100 °C por 15 min, e resfriados em banho de gelo a fim de parar a reação. Nas triplicatas foram adicionados 10 µL de m-hidroxibifenil (0,15 % m/v em hidróxido de sódio aquoso a 0,5 % m/v) e nos brancos 10 µL de NaOH 0,5 % (m/v) seguido novamente de agitação. Após 10 min, 200 µL do conteúdo dos tubos foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato. A leitura foi feita espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) na absorbância de 525 nm. A percentagem de ácido urônico foi calculada a partir de uma curva analítica utilizando ácido D-galacturônico como padrão (1 to 100 µg/mL).

Para as frações selecionadas a partir dos dados de rendimento e composição monossacarídicas (neutra e teor de ácidos urônicos - Uro) (CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2) foi estimado o percentual de homogalacturonanas (%HG) e ramnogalacturonanas tipo I (%RG1), pelas fórmulas abaixo descritas (M'SAKNI *et al.*, 2006). A relação HG/RG1 foi determinada com o intuito de analisar a predominância dos tipos de pectinas (M'SAKNI *et al.*, 2006). A estimativa de outros polissacarídeos (denominados não pécticos) foi feita considerando a soma do percentual de Fuc, Xyl, Man e Glc.

$$\%HG = Uro(\%)/Rha(\%)$$

$$\%RG1 = [Uro(\%) - HG\%] + Rha(\%) + Gal\% + Ara(\%)$$

5.9. DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

5.9.1. Identificação qualitativa de amido pelo teste de lugol

A solução de lugol é composta por iodeto de potássio e iodo dissolvidos em água. O teste de lugol consiste em verificar a presença de amido na amostra caracterizada pela formação de coloração azul intensa a castanha devido à complexação do iodo com os polissacarídeos formadores do amido, a amilose (glucana linear, com ligações do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4)) e a amilopectina (glucana ramificada, com ligações do tipo α -(1 $\rightarrow$ 4) e α -(1 $\rightarrow$ 6)) (SOUZA; NEVES, 2006).

Em microtubos foram colocados 100 μ L de amostra e 100 μ L de solução iodo-iodetada (lugol). As amostras foram comparadas com tubos contendo DMSO (controle negativo) e tubos contendo amilose 20 mg/mL (controle positivo). Frações que continham amido formaram uma coloração azul intensa a castanha.

5.9.2. Dosagem de fenóis totais

O teor de fenol total foi determinado através de um microensaio utilizando o reagente de Folin Ciocalteu, adaptado de MORAIS e colaboradores (2009). O princípio do método é a reação entre o reagente de Folin-Ciocalteu, que possui coloração amarelo-esverdeada, e fenóis, com subsequente oxidação dos fenóis e formação de um complexo azul. Essa reação é favorecida com o meio em pH alcalino, obtido pela adição de carbonato.

As amostras, na concentração de 1 mg/mL em H₂O, foram adicionadas em microtubos (20 μ L, em triplicata para cada amostra). Em seguida, foram adicionados 100 μ L do reagente de Folin Ciocalteu (10% v/v em H₂O ultrafiltrada). Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos, e em seguida, 80 μ L de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 7,5 % (m/v) foram misturados às soluções, que foram novamente agitadas. Após aquecimento em banho-maria a 50 °C durante 5 min, a absorbância foi lida a 760 nm utilizado espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek, modelo

EPOCH, Winooski, EUA). A curva padrão foi preparada utilizando soluções de ácido gálico nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL.

5.9.3. Dosagem de grupos acetil

A dosagem de grupos acetil foi realizada utilizando o método descrito por HESTRIN (1949). Alíquotas de 125 µL das frações (10 mg/mL diluídos em cloreto de sódio 1%, m/v). Foram adicionados 250 µL da mistura hidróxido de sódio: cloreto de hidroxilamina (1:1; NaOH 3,5 M; cloreto de hidroxilamina 2 M) e permaneceram em repouso por 1 min. A seguir, foram adicionados 125 µL de ácido clorídrico: água (1:3) e 125 µL de cloreto férrico (0,185 M). A absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 540 nm. A porcentagem de grupos acetil foi calculada a partir de uma curva padrão de glucose pentacetato (100 a 800 µg/mL).

5.9.4. Dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS)

O método utilizado foi descrito por SUMMER SISLER (1944) e modificado por MILLER (1959). Este método baseia-se na formação de um complexo de cor castanho-alaranjado, por redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a 3-amino-5-nitrosalicílico pelos açúcares redutores. A concentração desse complexo corado é proporcional à concentração de açúcares redutores. A partir de valores conhecidos da concentração de glucose (ou outro monossacarídeo) é possível traçar uma curva de calibração da absorbância em função da concentração de glucose em equivalentes de açúcares redutores. Foram adicionados 50 µL de amostra a 50 µL de DNS em banho fervente por 5 min. Após foram adicionados 500 µL de H₂O ultrafiltrada e lidos em espectrofotômetro de microplacas (marca BioTek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 540nm. Para a curva analítica foi utilizada o padrão de glucose, nas concentrações de 20 a 200 µg e o tubo branco foi preparado com água no lugar da amostra.

5.9.5. Dosagem de glucose livre (método de ponto final)

A glucose livre foi dosada mais especificamente através de um kit comercial (Glicose Liquiform – Labtest, MG, Brasil), que consiste em um sistema enzimático para a determinação de glucose em fluidos. A glucose oxidase (GOD) catalisa a

oxidação da glucose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glucose na amostra. O ensaio de ponto final foi realizado de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, 10 µL da fração foi adicionado em microtubo, seguidos de 1 mL do reagente 1. Após agitação, os tubos foram incubados em banho a 37 °C por 10 min. As absorbâncias das soluções foram lidas em placas de 96 poços (100 µL) em 505 nm. O padrão utilizado foi o reagente 2 (glucose %) e o branco preparado com H₂O no lugar da amostra. A concentração de glucose nas amostras foi calculada através do cálculo:

$$Glucose\ (mg/mL) = (Absorbância\ do\ teste)/(Absorbância\ do\ padrão) \times 100$$

5.10. Determinação de homogeneidade e da massa molar ponderal média por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada com detector de índice de refração e espalhamento de luz

A determinação do perfil de homogeneidade das frações selecionadas (CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2) foi realizada por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). As frações (1 mg/mL) foram solubilizadas em uma solução de nitrato de sódio 0,1 M e azida sódica 0,2 mg/mL. As soluções foram filtradas em filtro com membranas acetato de celulose de porosidade 0,22 µm (Millipore, Massachusetts - EUA) acoplado a uma seringa. A solução de nitrito de sódio 0,1 M e azida sódica 0,2 mg/mL foi utilizada como eluente, com um fluxo controlado de 0,6 mL/min.

As análises de homogeneidade foram executadas em cromatógrafo líquido da marca VISCOTEK com sistema múltiplo de detecção, injetor manual, detectores UV-Vis (VE3210), índice de refração (VE3580) e espalhamento de luz (270 dual detector) de baixo ângulo 7° (LALLS) e ângulo reto 90° (RALLS), utilizando a pré-coluna Shodex OH-pack SB-G e coluna Shodex OH-pack SB-806M HQ (8 mm x 300 mm; Shodex Showa Denko K.K., Tóquio, Japão), com limite de detecção de 2×10^7 g/mol . disponível no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os resultados foram analisados pelo software OmniSEC (Malvern.

Co., USA) e os tempos de retenção dos picos da eluição das amostras detectados pelo RI, LALLS e RALLS foram usados para os cálculos da massa molar ponderal média (Mw).

5.11. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

5.11.1. Espectroscopia de Infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)

Aproximadamente 2 mg de amostras das frações CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 liofilizadas foram maceradas com ~100 mg de brometo de potássio (KBr) anidro, grau espectroscópico (Sigma Aldrich.Co, St. Louis, MO, EUA) e prensadas a 8 ton, por 60 s, formando pastilhas translúcidas. As pastilhas foram analisadas no Departamento de Química da UFPR em um aparelho Bruker Vertex 70 (Bruker; Karlsruhe, Alemanha), em modo de transmissão, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 8 cm^{-1} e aquisição de 32 varreduras. A função de apodização da Transformada de Fourier (FT) usada foi a Blackman-Harris 3 – Term. Os dados foram processados em *software* “Bio-rad Laboratories”. A partir dos dados adquiridos pelos espectros de FT-IR foi possível determinar o grau de metil esterificação (DE) das frações polissacarídicas, considerando a seguinte fórmula (FILIPPOV *et al.*, 1976):

$$\text{DE \%} = \frac{\text{área da banda dos grupos carboxílicos metil esterificados (COO - R)}}{\text{área total dos grupos carboxílicos (COO - R e COO-)}} \times 100$$

5.11.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Amostras das frações selecionadas CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 foram solubilizadas em água deuterada (D_2O) (CIL, Massachussets, USA), em uma concentração de aproximadamente 15 mg/mL e foram analisadas por experimentos unidimensional de carbono treze (RMN- ^{13}C) e bidimensional de correlação próton (^1H) e ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Coherence, HSQC), utilizando espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance (Bruker; Karlsruhe, Alemanha), em tubos de 5 mm de diâmetro, a 70°C. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm), utilizando acetona como padrão interno (δ 2,222 e 30,222 para ^1H e ^{13}C , respectivamente). Os espectros foram analisados no programa TOPSPIN.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção dos frutos foi feita visando um padrão de maturação, frutos não maduros ou podres foram descartados. Após a seleção e o fracionamento dos frutos, dos 2283 g obtidos inicialmente, obteve-se 104,5 g de polpa, 108,7 g de semente, 866 g de casca, 120 mL de sumo e 670 g de frutos inteiros, o restante configurou-se como descarte. O fracionamento foi feito em casca (exocarpo e mesocarpo), polpa (endocarpo), e sementes por estarem, estas estruturas, facilmente destacáveis. Optou-se por manter exocarpo e mesocarpo unidos devido à característica de *S. diploconos* conter estas estruturas unidas, não distinguíveis facilmente pela textura, apenas pela cor (HOFFMANN, 2014) (FIGURA 2). Deve-se a esta característica o maior rendimento da casca. Esta característica não é comum às solanáceas, outros autores que trabalharam com frutos desta família conseguiram destacar facilmente estas estruturas (COLODEL *et al.*, 2017).

O teor de umidade dos frutos inteiros foi de 82 %, demonstrando assim, o grande conteúdo de água presente no fruto, o que determina um menor rendimento em peso seco. O rendimento do material, após liofilização, foi de 15,5 g (0,7%) de polpa, 39,2 g (1,7%) de semente, 79 g (3,5%) de casca.

6.1. Extração sequencial de polissacarídeos

Previamente à extração sequencial, o material vegetal foi submetido à extração com DMSO. O DMSO aquoso é um solvente comumente utilizado em laboratório para remoção de amido (COLODEL *et al.*, 2017). O amido é o polissacarídeo de reserva mais amplamente distribuído nas plantas (BUCKERIDGE *et al.*, 2000), sendo interessante a sua remoção prévia para obter frações isentas deste polímero. O material vegetal inativado, deslipidificado e moído, foi submetido à extração com DMSO, e o material extraído apresentou resultado positivo no teste de lugol, confirmando a presença de amido no material (FIGURA 7).

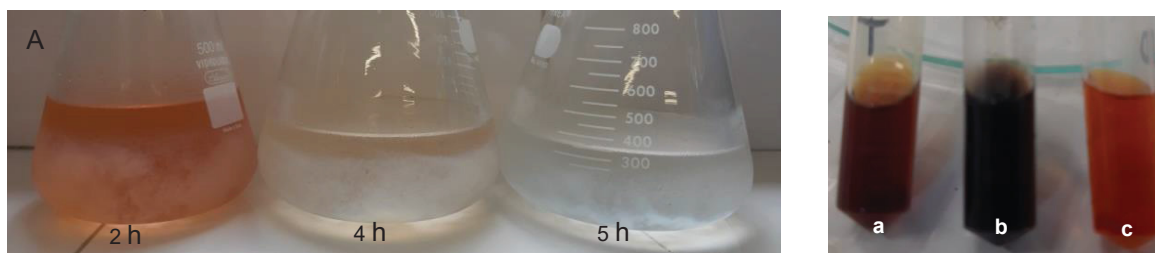


Figura 7: (A) Precipitação etanólica do material obtido da extração com DMSO da polpa de frutos de *S. diploconos*, nos tempos de 2 h, 4 h e 5 h. (B) Resultado do teste com lugol: material obtido da extração com DMSO da polpa de frutos de *S. diploconos* (2 h) (a), amilose (controle positivo) (b) e DMSO (controle negativo) (c).

Fonte: A autora (2019)

A extração sequencial foi realizada para fracionamento de polissacarídeos da parede celular, considerando a solubilidade nas diferentes condições: tipo do agente extrator e temperatura. O agente extrator – água e temperatura ambiente (25 °C) favorece a extração de polissacarídeos de menor grau de polimerização, carregados e/ou que estão associados à parede celular por interações fracas. Nesta condição são extraídas, por exemplo, pectinas esterificadas e arabinogalactanas ácidas e ramificadas presentes na matriz extracelular (VORAGEN *et al.*, 1995). Com a condição de aumento de temperatura, há o favorecimento da extração de polissacarídeos que estariam mais fortemente associados à parede celular. Além disso, temperatura alta (90 °C) também pode favorecer a extração de polissacarídeos com alta massa molar como o amido. A utilização de extrator ácido com temperatura maior de 60 °C favorece remoção de polissacarídeos ácidos como as pectinas que estariam ancoradas fortemente à parede celular (VORAGEN *et al.*, 1995). No caso, o ácido cítrico foi utilizado como extrator, por ser um ácido orgânico, é eficaz na extração de pectina em termos de rendimento e propriedades físico-químicas (VIRK; SOGI, 2004). O ácido cítrico também é vantajoso do ponto de vista econômico e ambiental, uma vez que é um aditivo alimentar natural e seguro e, portanto, mais atraente do que os ácidos minerais fortes comumente usados (ácido nítrico, clorídrico ou sulfúrico) para a extração de pectinas comerciais (CANTERISCHMIN, *et al.*, 2005). A extração de pectina é um processo de múltiplos estágios físico-químicos influenciados por diversos fatores, entre eles, temperatura, pH e tempo de extração (PAGÁN, 2001; MUNHOZ; SANJINEZ-ARGANDONA; SOARES-JUNIOR, 2010).

Condições mais drásticas como extrator alcalino, torna-se eficiente para obtenção de frações polissacarídicas do tipo hemicelulose, que em geral são mais

insolúveis em água, uma vez que estes polímeros apresentam estrutura pouco ramificada com uma conformação estrutural (em função as ligações glicosídicas na configuração β) que provoca maior interação entre os polímeros levando à agregação (WHISTLER, 1973). Assim os materiais vegetais de *S. diploconos* passaram por extrações sequenciais aquosas, ácidas e alcalinas. A partir das extrações aquosas foi observado a formação de géis após precipitação etanólica (FIGURA 8) característica também detectada na extração ácida.



Figura 8: Precipitado etanólico da extração aquosa 90 °C da casca correspondente à fração CW90
Fonte: A autora (2020)

A tabela 3 mostra os rendimentos das frações polissacarídicas obtidas na extração sequencial. O maior rendimento foi da fração CW90 de 20,4% seguida de PW90 com 15%. Apenas duas frações obtiveram rendimento entre 10% e 5% (CW4 e SW4). A maior parte das frações tiveram rendimento abaixo de 10% (CW2, C1-60, C1f, C5f, CHA2M, CHB2M, CHA4M, PW2, PW4, PHA2M, PHB2M, PHA4M, PHB4M, SW2 e SHA2M) e abaixo de 1% (C5-60, P1-60, P1f, P5-60, P5f, S1-60, S5f, SHB2M, SHA4M, SHB4M e SW90).

Tabela 3: Rendimentos em massa e percentagem das frações polissacarídicas obtidas na extração sequencial

Fração	Condições de extração	Rendimento em g	Rendimento em %
CW4	Aquosa, 25 °C, 4 h	0,35	7,0
CW2	Aquosa, 25 °C, 2 h	0,16	3,2
CW90	Aquosa, 90 °C, 2 h	1,02	20,4
C1-60	Ácido cítrico 1 % (m/v), 60 °C	0,22	4,5
C1f	Ácido cítrico 1 % (m/v), banho fervente	0,22	4,4
C5-60	Ácido cítrico 5 % (m/v), 60 °C	0,04	0,7
C5f	Ácido cítrico 5 % (m/v), banho fervente	0,09	1,7
CHA2M	Alcalina com NaOH 2 M, 25 °C, 2 h, após neutralização	0,05	1,1
CHB2M	Alcalina com NaOH 2 M, 25 °C, 2 h, após precipitação etanólica	0,08	1,5
CHA4M	Alcalina com NaOH 4 M, 25 °C, 2 h, após neutralização	0,10	2,0
CHB4M	Alcalina com NaOH 4 M, 25 °C, 2 h, após precipitação etanólica	0,10	2,0
PW4	Aquosa, 25 °C, 4 h	0,16	3,2
PW2	Aquosa, 25 °C, 2 h	0,14	2,9
PW90	Aquosa, 90 °C, 2 h	0,75	15,0
P1-60	Ácido cítrico 1 % (m/v), 60 °C	0,97	0,9
P1f	Ácido cítrico 1 % (m/v), banho fervente	0,04	0,7
P5-60	Ácido cítrico 5 % (m/v), 60 °C	0,03	0,6
P5f	Ácido cítrico 5 % (m/v), banho fervente	0,03	0,6
PHA2M	Alcalina com NaOH 2 M, 25 °C, 2 h, após neutralização	0,16	3,3
PHB2M	Alcalina com NaOH 2 M, 25 °C, 2 h, após precipitação etanólica	0,14	2,7
PHA4M	Alcalina com NaOH 4 M, 25 °C, 2 h, após neutralização	0,14	2,8
PHB4M	Alcalina com NaOH 4 M, 25 °C, 2 h, após precipitação etanólica	0,14	2,8
SW4	Aquosa, 25 °C, 4 h	0,53	5,3
SW2	Aquosa, 25 °C, 2 h	0,14	1,4
SW90	Aquosa, 90 °C, 2 h	0,06	0,6
S1-60	Ácido cítrico 1 % (m/v), 60 °C	0,09	0,1
S1f	Ácido cítrico 1 % (m/v), banho fervente	0,01	0,1
S5-60	Ácido cítrico 5 % (m/v), 60 °C	0,09	0,9
S5f	Ácido cítrico 5 % (m/v), banho fervente	0,09	0,9
SHA2M	Alcalina com NaOH 2 M, 25 °C, 2 h, após neutralização	0,30	3,0
SHB2M	Alcalina com NaOH 2 M, 25 °C, 2 h, após precipitação etanólica	0,02	0,2
SHA4M	Alcalina com NaOH 4 M, 25 °C, 2 h, após neutralização	0,02	0,2
SHB4M	Alcalina com NaOH 4 M, 25 °C, 2 h, após precipitação etanólica	0,07	0,7

Fonte: A autora (2020).

Nota: As frações foram, previamente, dialisadas para remoção de excesso de sal, e o rendimento foi calculado como descrito em Material e Métodos.

6.2. Extração de pectinas com ácido nítrico

Optou-se por realizar a extração de pectinas com ácido nítrico (HNO_3) por ser o método comumente usado na extração de pectinas comerciais (PAGÁN *et al.*, 2001). Nesta extração ácida, o tratamento com ácido e temperatura alta (entre 70 e 100°C), por tempos curtos (1 h) favorece a obtenção de quantidades de pectinas, que reproduzam condição de extração exaustiva com poucas alterações da estrutura química da pectina. A redução do pH inicial de extração permite obter melhores rendimentos, por isso é a forma mais utilizada para aplicação em escala industrial (CANTERI *et al.*, 2012).

A extração realizada com HNO_3 foi feita a partir de 20 g da casca inativada, deslipidificada, liofilizada e moída, obtendo-se 4,24 g da fração CNA (rendimento de 21,2%), conforme descrito na Tabela 4. O teste de lugol indicou a presença de amido na fração CNA. Desta forma, procedeu-se a remoção enzimática do amido a fim de obter uma fração com maior perfil péctico. Para a tratamento enzimático foram utilizados 0,9 g da amostra CNA e obteve 0,616 g de CNA2 ou seja, rendimento de 68,4 % (Tabela 4). O monitoramento do tratamento enzimático foi realizado tanto pelo desaparecimento do substrato (amido) pelo teste lugol, como, pelo aparecimento do produto (glicose e oligossacarídeos redutores), pela dosagem de glicose (kit Glicose Liquiform) e de açúcares redutores (método do DNS). Após 4 h, verificou-se uma estabilização na concentração de glicose e açúcares redutores e uma reação negativa pelo teste de lugol. A figura 9 mostra a precipitação etanólica do material submetido à extração com ácido nítrico.

Tabela 4: Rendimentos em massa e percentagem das frações polissacarídicas obtidas na extração com ácido mineral

Casca (exocarpo e mesocarpo)	Condições de extração	Rendimento em g	Rendimento %
CNA	Ácido Nítrico 0,1 M, sob refluxo, 60 min	4,24 g	21,2
CNA2	Ácido Nítrico 0,1 M, sob refluxo, 60 min, seguido de tratamento enzimático	0,616 g	68,4

Fonte: A autora (2021).

Nota: As frações foram, previamente, dialisadas, e o rendimento foi calculado como descrito em Material e Métodos



Figura 9: Precipitação etanólica do material submetido à extração com ácido nítrico (HNO_3) (A e B) e após filtração do material (C).

Fonte: A autora (2020).

6.3. Composição monossacarídica neutra e ácida

Os dados da determinação da composição monossacarídica das frações obtidas por extração aquosa da casca, polpa e sementes de frutos de *S. diploconos* estão apresentados na Tabela 5. A quantificação de ácidos urônicos foi realizada em todas as frações, exceto nas extrações aquosas realizadas a 25 °C por 2 h e 4 h devido ao seu baixo rendimento.

A fração CW4 apresentou como monossacarídeos majoritários Gal (45%) e Ara (21%), e ácidos urônicos (11%) sugerindo a presença de arabinogalactanas ácidas (PAULSEN; BARSETT, 2005). A fração CW90, por sua vez, apresentou Glc (51%) como monossacarídeo majoritário, além de Gal (16%), Ara (11%) e teor de ácido urônico (9%). Apesar da extração prévia com DMSO aquoso, esta quantidade de Glc pode indicar a presença de amido (de alta massa molar), uma vez que este é solúvel em água quente. A presença de polissacarídeos pécnicos também pode estar presente devido a presença dos outros monossacarídeos (Gal, Ara, ácidos urônicos). No caso das frações PW4, PW2 e PW90, todas apresentaram alta

concentração de Glc (~ 80%), sugerindo a presença de glucanas (amido, por exemplo). Em relação às frações SW4, SW2 e SW90, a presença de Xyl e Glc é evidenciada nestas frações, sugerindo a presença de polissacarídeos como, por exemplo, xiloglucanas, (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Tabela 5: Composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas a partir da extração aquosa dos frutos de *S. diploconos*

Composição Monossacarídica (%) ^{a,b}								
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácidos urônicos
CW4	2	7	21	3	3	45	8	11
CW2	5	3	3	11	29	30	19	Nd
CW90	2	2	10	7	3	16	51	9
PW4	3	1	3	2	tr	tr	82	9
PW2	tr	4	8	4	tr	3	81	nd
PW90	3	2	2	tr	tr	3	84	6
SW4	2	1	8	13	7	8	49	12
SW2	2	2	4	38	15	3	36	nd
SW90	1	tr	16	27	18	20	17	1

Fonte: A autora (2020).

Nota: ^a Percentual relativo dos monossacarídeos neutros determinado por cromatografia líquido-gasosa (GLC) na forma de derivados de acetato de alditóis, de acordo com a metodologia descrita por PETTOLLINO *et al.* (2012); ^b Quantificação do teor de ácidos urônicos foi determinada pelo método colorimétrico do m-hidroxibifenil descrito por FILISETTI-COZZI; CARPITA (1991); tr – traços (< 0,5 %); nd: não determinado.

A Tabela 6 mostra a composição monossacarídica das frações obtidas pela extração com ácido cítrico. As frações C1-60, C1f, C5-60 e C5f, apresentaram a Gal como monossacarídeo majoritário, e em menor proporção Ara, Glc e urônicos. As frações C5-60 e C5f, apresentaram ambas, 6% Rha. Gal, Ara e Rha são monossacarídeos neutros típicos de pectina do tipo ramnogalacturonanas (RG1), sendo que a presença de Gal e Ara sugere a presença de arabinanas, galactanas e arabinogalactanas, polissacarídeos estes, que são encontrados associados às pectinas (formando as cadeias laterais das RG1) (PAULSEN; BARSETT, 2005). Como verificado para PW4 e PW90, as frações P1-60 e P1f apresentaram Glc em torno de 90%, indicativo de glucanas (amido, por exemplo). Este resultado sugere que o tempo de extração com DMSO foi insuficiente para remoção de amido. As frações S1-60, S5-60 e S5f apresentaram como monossacarídeos majoritários Glc, Man e Xyl, os quais são tipicamente encontrados em polissacarídeos do tipo glucomanana, mananas e xiloglucanas.

Tabela 6: Composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas a partir da extração ácida dos frutos de *S. diploconos*

Composição Monossacarídica (%) ^{a,b}								
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácidos urônicos
C1-60	3	tr	13	1	1	60	12	10
C1f	3	tr	22	tr	tr	35	23	17
C5-60	6	tr	22	1	1	50	7	13
C5f	6	tr	9	1	2	68	2	12
P1-60	1	tr	2	tr	tr	1	90	6
P1f	1	tr	2	1	tr	3	86	7
S1f	1	tr	3	3	21	2	66	4
S5-60	6	tr	9	18	13	10	28	16
S5f	5	tr	5	5	63	11	4	7

Fonte: A autora (2020/ 2021).

Nota: ^a Percentual relativo dos monossacarídeos neutros determinado por cromatografia líquido-gasosa (GLC) na forma de derivados de acetato de alditóis, de acordo com a metodologia descrita por PETTOLLINO *et al.* (2012); ^b Quantificação do teor de ácidos urônicos foi determinada pelo método colorimétrico do m-hidroxibifenil descrito por FILISETTI-COZZI; CARPITA (1991); tr – traços (< 0,5 %).

A Tabela 7 mostra a composição monossacarídica das frações extraídas com NaOH. Como esperado, as frações apresentaram como monossacarídeos majoritários Xyl, Man e Glc, os quais são encontrados em polissacarídeos do tipo hemicelulose que são tipicamente solúveis em soluções alcalinas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; CAFFALL; MOHNEN, 2009).

Tabela 7: Composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas a partir da extração alcalina dos frutos de *S. diploconos*

Composição Monossacarídica (%) ^{a,b}								
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácidos urônicos
CHA2M	2	15	3	70	3	tr	1	6
CHB2M	tr	Tr	6	41	18	9	23	3
CHA4M	13	2	6	42	12	5	16	4
CHB4M	tr	Tr	3	19	30	10	36	2
PHA2M	1	Tr	12	23	17	12	32	3
PHA4M	tr	Tr	1	75	tr	1	5	18
SHA2M	1	Tr	1	5	83	4	5	1
SHB2M	2	Tr	19	23	26	19	4	7
SHA4M	3	Tr	14	28	19	16	7	13
SHB4M	1	Tr	1	3	83	3	6	3

Fonte: A autora (2020).

Nota: ^a Percentual relativo dos monossacarídeos neutros determinado por cromatografia líquido-gasosa (GLC) na forma de derivados de acetato de alditóis, de acordo com a metodologia descrita por PETTOLLINO *et al.* (2012); ^b Quantificação do teor de ácidos urônicos foi determinada pelo método colorimétrico do m-hidroxibifenil descrito por FILISETTI-COZZI; CARPITA (1991); tr – traços (< 0,5 %).

Em função dos resultados obtidos em relação: (a) aos rendimentos das frações obtidas pelo método sequencial e da composição monossacarídica das frações da casca (Ara, Gal e urônico), (b) do alto conteúdo de Glc nas frações do material polpa e (c) do perfil monossacarídico (Xyl, Glc e Man) encontrado para as frações obtidas a partir da semente de frutos de *S. diploconos*, o material vegetal casca foi selecionado para obtenção de pectinas utilizando outro método. O método escolhido para a extração de pectinas foi o método tradicional (com ácido mineral) na tentativa de obter pectinas, como maior teor de urônicos e maior rendimento.

A composição monossacarídica neutra da fração CNA apresentou como monossacarídeo majoritário ácidos urônicos (34%), além de Gal (32%) e Glc (30%). Uma vez que no protocolo utilizado a etapa de extração com DMSO aquoso não foi realizada, este teor de Glc indica a presença de um polímero de Glc, como o amido. O teor de Ara foi de 4% e a presença de Rha foi menor que 0,5%. O baixo teor de Ara, comparado com o teor de Ara de 9 a 22% observado para as frações da casca submetidas à extração com ácido cítrico, pode indicar que as condições mais drásticas de extração tradicional provocaram a remoção das unidades de Ara, uma vez que este monossacarídeo é o mais lábil dentre àqueles encontrados em pectinas (VORAGEN *et al.*, 1995). Além disso, o baixo teor de Rha e o conteúdo de ácidos urônicos parece indicar a presença predominante de HG na fração CNA.

A fração CNA foi submetida ao tratamento enzimático para remoção do amido, uma vez que apresentou grande quantidade de Glc na composição monossacarídica. CNA2 apresentou Gal (50%) como monossacarídeo majoritário e em segundo lugar ácidos urônicos (37%). O conteúdo de Ara foi de 11% e a presença de Rha foi menor que 0,5%, assim como o teor de Glc, demonstrando que o tratamento enzimático foi eficiente. O teor de ácidos urônicos encontrado para a fração CNA2 está abaixo do recomendado para pectinas comerciais, que é 65% (OVODOV, 2009). Por outro lado, a extração tradicional, foi mais rentável em relação a obtenção de pectinas comparada à extração com ácido cítrico.

Tabela 8: Composição monossacarídica das frações polissacarídicas obtidas a partir da extração com ácido mineral (HNO₃) de cascas de frutos de *S. diploconos*

Composição Monossacarídica (%) ^{a,b}								
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácidos urônicos
CNA	tr	tr	4	tr	tr	32	30	34
CNA2	tr	1	11	tr	1	50	tr	37

Fonte: A autora (2021).

Nota: ^a Percentual relativo dos monossacarídeos neutros determinado por cromatografia líquido-gasosa (GLC) na forma de derivados de acetato de alditóis, de acordo com a metodologia descrita por PETTOLLINO *et al.* (2012); ^b Quantificação do teor de ácidos urônicos foi determinada pelo método colorimétrico do m-hidroxibifenil descrito por FILISETTI-COZZI; CARPITA (1991); tr – traços (< 0,5 %).

Em relação ao teor de grupos acetil, a fração CNA2 apresentou 0,09%, valor este considerado desprezível. O grau de acetilação (DA), assim como o de metil-esterificação das pectinas tem grande impacto nas suas propriedades funcionais, sendo responsável pelo seu comportamento de geleificação (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Pectinas com HG parcialmente substituídas com grupos metil e acetil foram encontradas no pimentão (*C. annuum*) por Popov *et al.* (2011) e Paik *et al.* (2003).

Em relação à dosagem de fenólicos todas as frações apresentaram percentual abaixo de 1%, exceção de C5-60, que foi quantificado em 1,43%.

Considerando os resultados de rendimento, composição monossacarídica e teor de ácidos urônicos, as frações CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 foram selecionadas para as análises adicionais (cromatográficas e espectroscópicas) para caracterização estrutural.

6.4. Análise por cromatografia de exclusão estérica com detector de índice de refração e espalhamento de luz

A homogeneidade das frações CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 foi determinada por SEC-RI/RALLS. Os perfis cromatográficos das 7 frações estão mostrados na Figura 10. O detector de índice de refração (RI) resulta em um pico proporcional às concentrações de polissacarídeo presentes na amostra, enquanto o detector de espalhamento de luz (RALLS) indica a massa molar dos compostos (VRIESMANN; TEÓFILO; PETKOWICZ, 2012). Os compostos que são eluídos

primeiro são aqueles que possuem massa molar maior, seguidos da eluição de compostos com massa molar menor (PETKOWICZ *et al.*, 1999).

Os perfis das frações CW4 e CW90 (FIGURA 10) apresentaram um pico predominante em 20 min, sugerindo compostos de semelhante massa molar. CW4 apresentou um segundo pico em 25 min demonstrando ser uma fração heterogênea, enquanto CW90 apresenta um perfil de maior homogeneidade devido à presença de um pico majoritário e um de menor intensidade analisados tanto no RI quanto no RALLS (PETKOWICZ, *et al.*, 1999).

Todas as frações extraídas com ácido cítrico apresentaram perfil heterogêneo e polidisperso (FIGURA 10). C1-60 apresentou 3 picos, C1f 5 picos e C5f 4 picos, demonstrando apresentarem moléculas eluídas em tempos diferentes apresentando um perfil heterogêneo.

CNA apresentou 4 picos correspondendo a famílias de moléculas com massa molecular diferentes, demonstrando a heterogeneidade da fração. CNA2 apresentou polissacarídeos eluídos em 18,7 min e em 20 min indicando uma fração de maior massa molar, demonstrada pelo RALLS e uma menor massa molar, respectivamente. A presença de um único pico por espalhamento de luz coincidente com o pico de índice de refração sugere a presença de uma população isolada. A comparação efetuada entre CNA e CNA2 demonstram que os processos enzimáticos e de diálise removeram parte das moléculas de menor massa molar.

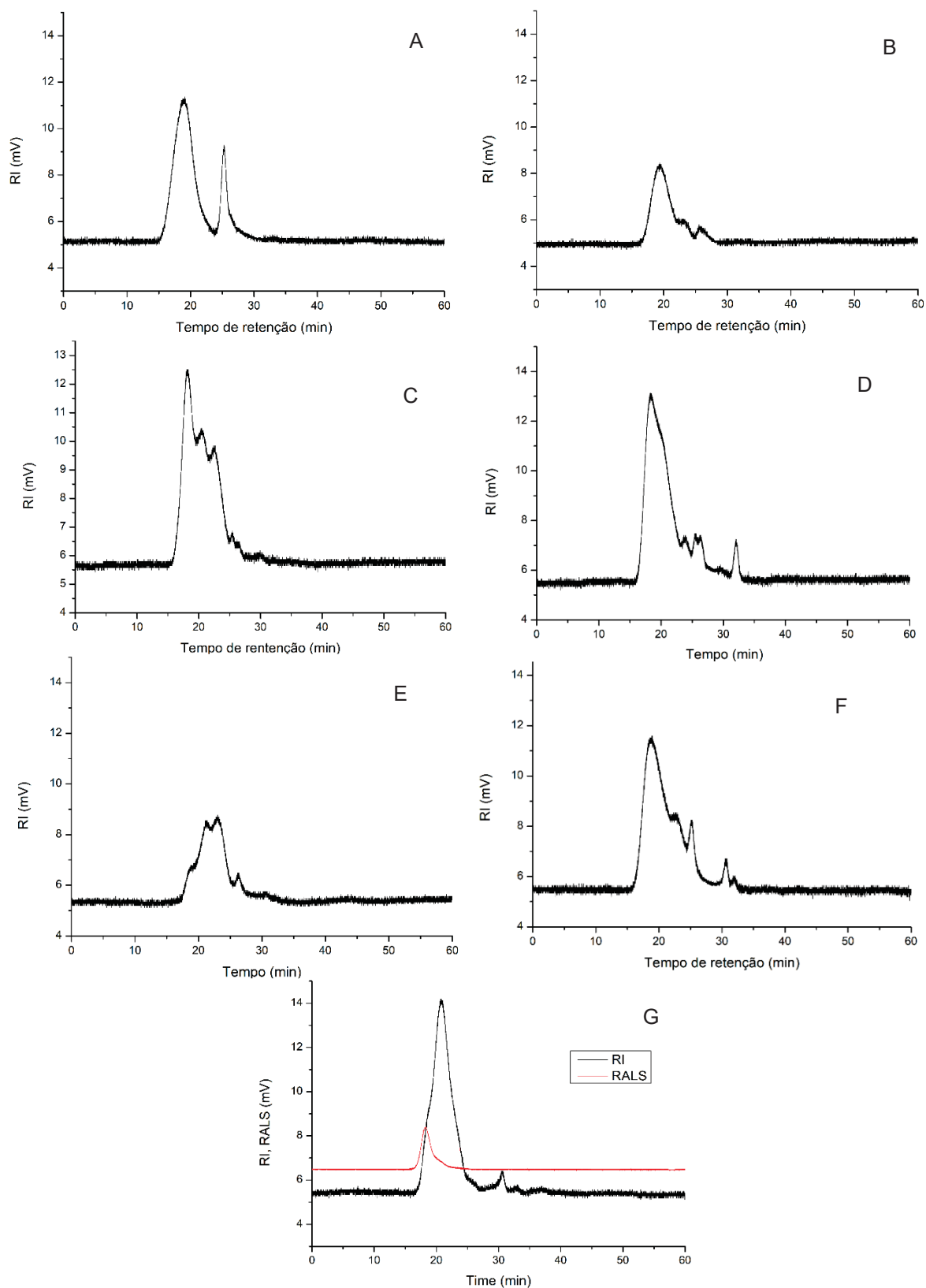


Figura 10: Perfil de eluição das frações CW4 (A), CW90 (B), C1-60 (C), C1f (D), C5f (E), CNA (F) e CNA2 (G) obtidos por SEC-RI.

NOTA: No eixo y está representada a detecção pelo índice de refração em milivolts (mV) e no eixo x estão representados os tempos de retenção em minutos (min). RALLS – espalhamento de luz a 90°

A massa molar das pectinas pode ser variável de acordo com a fonte vegetal, matéria-prima e condições de extração. Os valores citados na literatura variam entre 20.000 e 360.000 g/mol para pectinas nativas e entre 35.000 e 120.000 g/mol para amostras comerciais. A variação da massa molar pode ser explicada pela utilização de métodos diferentes de extração ou de determinação da massa molar (CANTERI; WOSIACKI; SCHEER, 2012; KAR; ARSLAN, 1999).

Para os cálculos da massa molar ponderal média, os perfis de eluição foram analisados pelo software OmniSEC e as massas molares calculadas relativas ao padrão externo de massa molar definida. Os resultados do perfil de eluição da fração CW90 não puderam ser integrados pelo software. Os dados dos valores de massa molar ponderal média das frações CW4, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 estão apresentados na Tabela 9. O pico majoritário de CW4 apresentou menor massa molar igual a $8,09 \times 10^4$ g/mol. Comparando os valores de Mw das frações obtidas com ácido cítrico, observa-se uma diminuição da Mw para a fração C5f. Este resultado pode indicar que a condição de extração provocou uma diminuição do grau de polimerização, verificado pelo valor de Mw. Há relatos na literatura que em condições sinérgicas entre temperatura ($> 55\text{ }^{\circ}\text{C}$) e pH ($\sim 4,0$) podem provocar diminuição do grau de polimerização (e de redução do grau de metil esterificação) (CANTERI; WOSIACKI; SCHEER, 2012; KAR; ARSLAN, 1999). As massas molares das frações CNA e CNA2 foram “praticamente” idênticas, indicando que o tratamento enzimático não alterou a Mw da fração CNA.

Tabela 9: Massa molar ponderal média das frações CW4, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 determinada por SEC-RI/RALLS

Fração	Mw (g/mol)
CW4	$8,09 \times 10^4$
C1-60	$3,66 \times 10^5$
C1f	$4,12 \times 10^5$
C5f	$1,01 \times 10^5$
CNA	$2,56 \times 10^5$
CNA2	$2,58 \times 10^5$

Fonte: A autora

Nota: Mw: Massa molar média ponderal. Para os cálculos de Mw, os perfis de eluição foram analisados pelo software OmniSEC e as massas molares calculadas relativas ao padrão externo de massa molar definida.

6.5. Caracterização estrutural por espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)

FT-IR é um método para análise estrutural e quantitativa da pectina, principalmente para a determinação do grau de esterificação, um importante fator de sua caracterização (KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001). Uma pequena diferença na estrutura e composição de uma molécula podem causar alterações significativas na intensidade das bandas de absorção do FT-IR. Por ser uma ferramenta confiável e de alta sensibilidade, esta técnica vem sendo utilizada para a elucidação de estruturas, propriedades físicas e interações de carboidratos (KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001). Tais elucidações são possíveis devido à formação de bandas características para cada grupo funcional. Desta forma, através da análise dos espectros e pesquisa na literatura é possível identificar as estruturas presentes nas moléculas estudadas (ŠANDULA *et al.*, 1999). Os polissacarídeos são caracterizados pela presença das bandas de -OH e -CH, em 3500 cm^{-1} e 2950 cm^{-1} , respectivamente. A região entre 2000 e 400 cm^{-1} representa, no caso de polissacarídeos, as diferenças entre um polissacarídeo e outro, sendo considerada como a região de “*fingerprint*” dos carboidratos (FILIPPOV, 1992). As ligações glicosídicas (C-O-C) são representadas pelas bandas que aparecem entre 1200 a 900 cm^{-1} (KACURÁKOVÁ *et al.*, 2000). A banda em torno de 1750 cm^{-1} é atribuída a vibrações de estiramento do C=O nos grupos carboxil metil-esterificado (-COOCH₃), e entre 1630 - 1600 cm^{-1} , que representa os grupos carboxílicos livres (-COOH). As bandas aproximadamente em 1620 e 1420 cm^{-1} são atribuídas a absorbância da função carboxílica desprotonada (COO⁻) (MARIQUE; LAJOLO, 2002).

A Figura 11 mostra os espectros de FT-IR das frações CW4 (A), CW90 (B), C1-60 (C), C1f (D), C5f (E), CNA (F) e CNA2 (G). As frações se mostraram semelhantes em relação a presença das bandas de -OH e -CH (3500 e 2950 cm^{-1}) características para polissacarídeo (MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001). Também é possível observar a presença da banda em 1070 cm^{-1} , que representa os grupamentos C-O-C (MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001). A banda identificada entre 1760 - 1730 cm^{-1} representa o grupamento carboxílico esterificado (-COOCH₃). Outra banda intensa no espectro está entre 1630 - 1600 cm^{-1} que representa grupos carboxílicos livres (-COOH) (SINGTHONG *et al.*, 2004;

VRIESMANN; TEÓFILO; PETKOWICZ, 2012). Por exemplo, comparando os espectros das frações CW4 e CW90 (Figura 11A e 11B), pode-se observar uma pequena diferença entre as áreas das bandas dos grupos carboxílicos esterificados e livres.

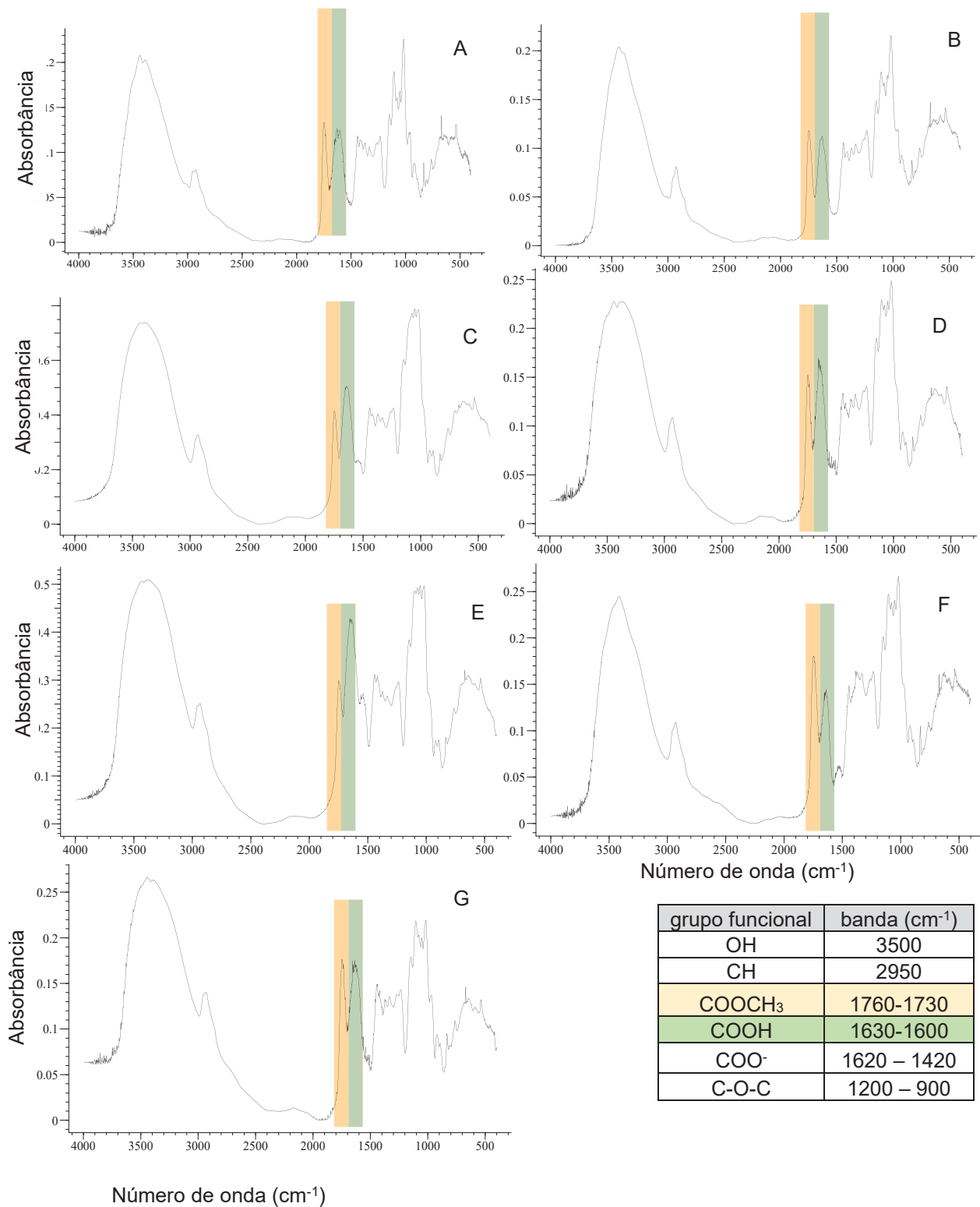


Figura 11: Espectros de FT-IR das frações CW4 (A), CW90 (B), e C1-60 (C), C1f (D), C5f (E), CNA (F), CNA2 (G).

Fonte: A autora (2021).

Nota: Amostras anidras analisadas em pastilhas de KBr.

A maior diferença entre as bandas dos grupos carboxílicos esterificados e livres pode ser observada nas frações extraídas com ácido cítrico (FIGURAS 11C, 11D e 11E), sendo, mais intensa a banda na região 1600 cm^{-1} . Para as frações CNA e CNA2 maior intensidade foi observada para a banda correspondente ao grupamento carboxílico esterificado ($-\text{COOCH}_3$). Há uma relação entre estes dois grupamentos que determina o grau de esterificação dos compostos analisados. Esta relação diz que com o aumento do grau de esterificação a intensidade da banda dos grupos carboxílicos esterificados aumenta enquanto a intensidade da dos grupamentos carboxílicos livres tende a diminuir. De maneira semelhante, a intensidade da banda dos grupos carboxílicos livres aumenta com o decréscimo do grau de esterificação (SINGTHONG *et al.*, 2004).

O grau de metil esterificação (DE) foi calculado a partir dos espectros obtidos nas análises de FT-IR, como mostrado na Tabela 10. Para o cálculo foram obtidas e quantificadas as áreas das bandas correspondentes aos grupos carboxílicos esterificados (1749 cm^{-1}) e não esterificados (1630 cm^{-1}) utilizando o software do equipamento. As substituições metil esterificadas dos ácidos urônicos permitem classificar as pectinas com baixo DE, ou seja $< 50\%$, ou pectina com alto DE ($\geq 50\%$). Assim, as frações CW4 (37,0%), CW90 (42,1%), C1-60 (40,5%), C5f (32,6%) e CNA2 (45%) apresentaram características de pectinas baixo grau de esterificação, enquanto a CNA (59%) de pectina com alta grau de esterificação. A literatura relata que pectinas nativas geralmente apresentam DE maior que 50% e baixo DA (VORAGEN *et al.*, 1995), o que foi observado, por exemplo, para a fração CNA2.

Comparando os valores de DE das frações obtidas com ácido cítrico, observa-se uma diminuição deste parâmetro para a fração C5f, sugerindo que a condição de extração causou remoção dos grupos metila, além da diminuição do grau de polimerização (CANTERI; WOSIACKI; SCHEER, 2012; KAR; ARSLAN, 1999). Analisando os valores de DE das frações CNA e CNA2, observa-se uma redução de 14% do grau de metil esterificação. Condições utilizadas em tratamento enzimático podem provocar remoção de grupos metila e β -eliminação, com concomitante degradação da cadeia polissacarídica (diminuição Mw) (RENARD; THIBAUT, 1996). Como no caso de CNA2 não ocorreu diminuição de Mw, apesar

da diminuição do grau de esterificação, o que provocou esta redução precisa ser esclarecido.

Tabela 10: Grau de esterificação das frações obtidas pela extração sequencial (CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f) e pela extração com ácido mineral (HNO₃) (CNA e CNA2).

Frações	Grau de esterificação (%)*
CW4	37,0
CW90	42,1
C1-60	40,5
C1f	41,0
C5f	32,6
CNA	59,0
CNA2	45,0

Nota: O grau de esterificação foi determinado a partir da relação das áreas das bandas correspondentes aos grupos carboxílicos esterificados e não esterificados utilizando o software do equipamento

O processo de extração (tipo de ácido, tempo e temperatura) influencia no tipo de pectina obtida, como descrito pela literatura (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). As extrações com ácido cítrico obtiveram pectinas com baixo DE, diferentemente, da extração tradicional com ácido mineral que extraiu pectinas de maior DE. Pectinas extraídas de maçã por VIRK; SOGI (2004) também apresentaram baixo grau de esterificação (33,44%) quando comparada com as extraídas com o ácido mineral, no caso o ácido clorídrico. Kliemann *et al.*, (2009) extraiu pectina da casca de maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) e encontrou valores referentes ao grau de esterificação mais baixos para amostras extraídas com ácido cítrico do que as extraídas com ácido clorídrico.

O grau de metil-esterificação (bem como de acetilação) das pectinas tem grande impacto nas suas propriedades funcionais, sendo responsável pelo seu comportamento de geleificação associado com outras variáveis interdependentes, como a massa molar, heterogeneidade, pH, presença de açúcares e outros solutos (CANTERI; WOSIACKI; SCHEER, 2012; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Pectinas nativas geralmente possuem alto DE e baixo DA (VORAGEN *et al.*, 1995), fato também observado nas pectinas da casca de *S. diploconos* quando comparamos os resultados do grau de metilação e acetilação.

Quanto à função medicinal, pectinas com um baixo teor de esterificação e menor massa molar (<10 kDa) mostraram-se mais eficiente para a prevenção de metástases do câncer e redução do colesterol (LIU *et al.*, 2010).

6.6. Caracterização estrutural por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As frações CW4 e CW90 foram investigadas por 2D-RMN HSQC e C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 por RMN-¹³C. Nenhuma informação sobre análises de RMN de polissacarídeos de frutos de *S. diploconos* foi encontrada na literatura. Os sinais foram assinalados baseando-se em dados de deslocamentos químicos de polissacarídeos de frutos como cubiu (*S. sessiliflorum*) pertencente à família Solanaceae (COLODEL *et al.*, 2017), e frutos de outras famílias como jambo (*Syzygium jambos*) (TAMIELLO *et al.*, 2018) e guaraná (*Paullinia cupana*) (DALONSO; PETKOWICZ, 2012), e outras referências (DELGOBO *et al.*, 1999; OVODOVA *et al.*, 2005; ZHU *et al.* 2021).

O espectro HSQC da fração CW4 (FIGURA 12) apresentou na região anomérica as correlações (C1/H1) em δ 99,8/5,37, 100,1/4,96, 104,4/4,62 e 107,8/5,08, atribuídos, respectivamente, às unidades de α -D-Glcp, α -D-6MeGalpA, β -D-Galp, α -L-Araf. Outras correlações de baixa intensidade também foram obtidas em δ 92,2/5,42, 99,1/5,13, 99,4/5,11. A correlação em δ 99,4/5,11 pode ser atribuída ao C1/H1 das unidades de α -D-GalpA (não metil esterificadas) e δ 99,1/5,13 pode ser atribuída ao C1/H1 das unidades de α -L-Rhap. Para as unidades de α -D-GalpA (metil esterificadas e não esterificadas) as correlações em δ 68/3,74, 68,2/3,99 e 78,7/4,46 podem ser atribuídas, respectivamente, para C-2/H-2, C-3/H-3 e C-4/H-4. As correlações em δ 70,5/5,05 e 71,5/3,65 podem ser atribuídas ao C-5 das unidades metil esterificadas e não esterificadas, respectivamente. O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ -C6 das unidades de α -D-6MeGalpA apareceu em 52,8/3,81. Não foram observados os sinais de C6 da carboxila esterificada nem da livre.

Correlações das unidades de α -L-Araf, para C-3/H3 e C-4/H-4 foram atribuídas em δ 76,9/4,00 e 81,1/4,13. Para C-5/H-5 foram assinaladas as correlações em δ 67,3/3,88 e 61,7/3,70, respectivamente, para unidades O-5 substituídas e não substituídas. Sinais de β -D-Galp foram encontrados em δ 71,7/3,64, 73,4/3,76, 77,7/4,15, 74,5/3,70 e 60,8/3,82 referentes a C-2/H-2, C-3/H3,

C-4/H-4, C-5/H-5 e C-6/H-6, respectivamente. Para as unidades de α -D-Glcp foram observadas as correlações em δ 71,6/3,65, 73,4/3,76, 77,6/3,64, 71,4/3,5, 60,6/3,72, respectivamente, para C-2/H-2, C-3/H-3, C-4/H-4, C-5/H-5 e e C-6/H-6. Estes sinais são típicos da amilose, glucana linear α -1 $\rightarrow$ 4 ligada (DALONSO; PETKOWICZ, 2012). Sinais em δ 39,0, 44,2 e 44,3 podem ser indicativos da presença de proteínas (WISHART; SYKES, 1994). Nenhum outro sinal referente a unidades de α -L-Rhap pode ser assinalado.

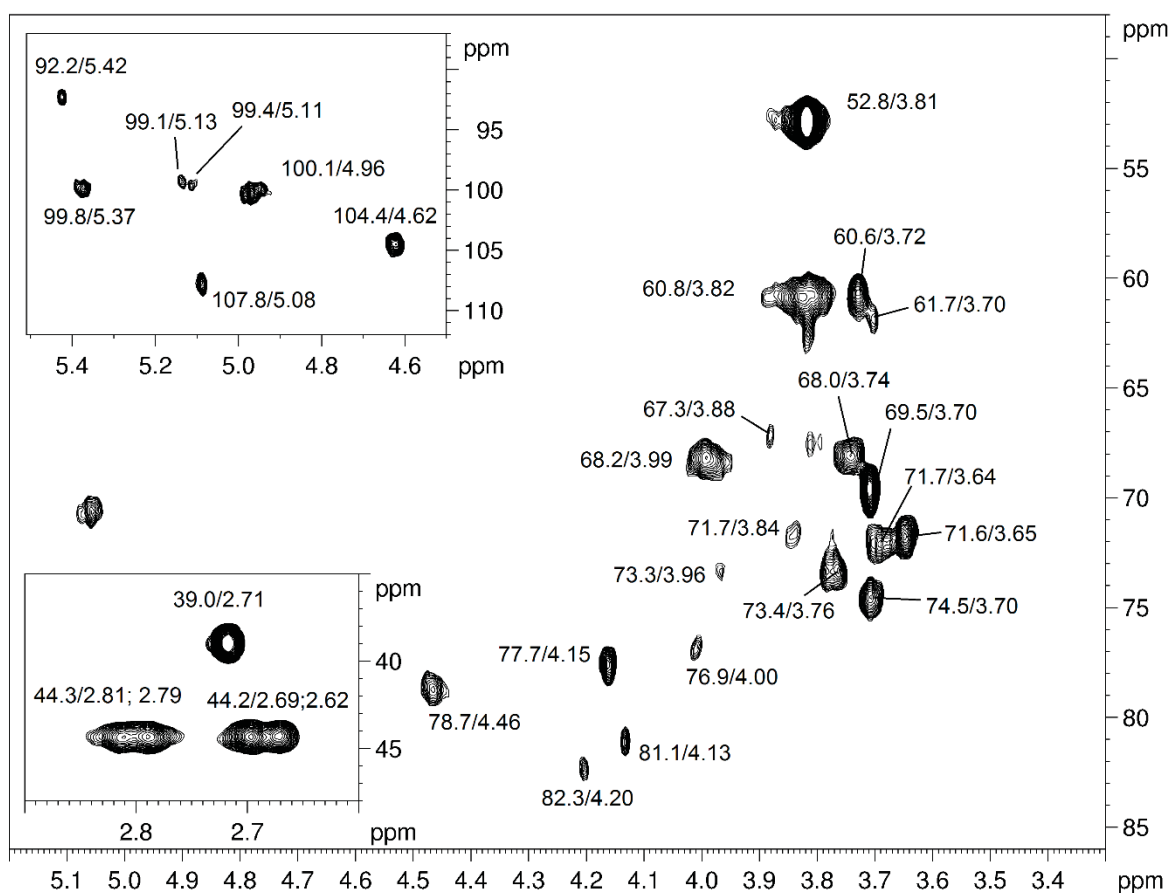


Figura 12- Espectros de HSQC da fração CW4 em D₂O, a 70°C

Fonte: A autora (2021)

Nota: Valores numéricos em δ (ppm)

O espectro de HSQC da fração CW90 (FIGURA 13) apresentou na região anomérica as correlações (C1/H1) em δ 99,8/5,36, 100,1/4,96, 104,4/4,62 e 107,8/5,08. Esses sinais foram semelhantes aos descritos para fração CW4, indicando a presença de unidades de α -D-Glcp, α -D-6MeGalpA, D-GalpA, β -D-Galp, e α -L-Araf. Outra correlação de baixa intensidade foi obtida em δ 99,6/5,13, poderia ser atribuída a unidades de D-GalpA (não metil esterificadas) ou L-Rha. Para as

unidades de D-GalpA, as correlações em δ 68/3,74 referem-se a C-2/H-2 e C-3/H-3 e em 78,7/ 4,64 a C-4/H-4. O C-5 das unidades esterificadas e não esterificadas foram, respectivamente, atribuídos em δ 70,5/506 e 71,6/64. Além disso, pode-se observar a presença do grupo O-metil (COOCH_3) em δ 52,8 e do C6 referente ao COOCH_3 em 170,8 ppm, corroborando com os resultados do FT-IR. Os sinais referentes as unidades de α -L-Araf foram assinalados em δ 82,3/4,20, 76,9/4,0, 81,1/4,13 e 67,3/3,88, respectivamente, para C-2/H-2, C-3/H-3, C-4/H-4 e C-5/H-5. Para as unidades de β -D-Galp, foram atribuídos os assinalamentos em δ 71,7/3,64, 73,4/3,76, 77,7/4,15, 74,5/3,70 para C-2/H-2, C-3/H-3, C-4/H-4 e C-5/H-5, respectivamente. As correlações C-6/H-6 em δ 60,8/3,82 e 69,5/3,70 correspondem aos C-6 não substituídos (livres) e substituídos. Os sinais das correlações C/H dos carbonos 2 a 6 das unidades de α -D-Glcp foram encontrados, respectivamente, em δ 71,7/3,64, 73,4/3,76, 77,6/3,64, 71,4/3,89 e 60,7/3,72. Como para CW4, nenhum outro sinal referente a unidades de α -L-Rhap pode ser assinalado.

Os espectros de RMN- ^{13}C das frações C1-60, C1f e C5f (FIGURA 14), apresentaram o assinalamento de O-metil em δ 52,8 ppm e os assinalamentos dos C-1 e C-4 das unidades de α -D-GalpA em 100,1 e 78,7 (ou 78,6). Para os carbonos 2 e 3 ocorreu sobreposição dos assinalamentos em δ 68,2. Os assinalamentos em δ 70,5 e 71,7 correspondem aos C-5 das unidades metil esterificadas e não metil esterificadas, respectivamente. A fração C1f apresentou o sinal de carboxila metil esterificada (C-6) em 170,8 ppm. Para as frações C1-60, C1f e C5f, os sinais de β -D-Galp foram atribuídos em δ 104,4, 71,7, 73,4, 77,6, 74,6 (ou 74,5) para os carbonos 1 a 5, respectivamente. Os sinais de C-6 livres e 6-O substituídos de β -D-Galp foram atribuídos em δ 60,9 e 69,6, respectivamente. C1f também apresentou para as unidades de α -L-Araf, os assinalamentos em δ 107,6 e 110,2 (C-1), 82,3 (C-2), 81,0 (C4), 67,0 (C5). A fração C1-60 apresentou somente o assinalamento de C-1 para as unidades de α -L-Araf em δ 107,6. Os assinalamentos das unidades de α -D-Glc foram assinalados somente na fração C1f, sendo em δ 99,9 (C-1), 71,7 (C-2), 73,4 (C-3), 77,6 (C-4). Para a fração C1f foram assinalados na região anomérica os sinais em δ 98,1 e 98,5, para unidades de α -L-Rha. Outros sinais referentes a esse monossacarídeo não foram observados.

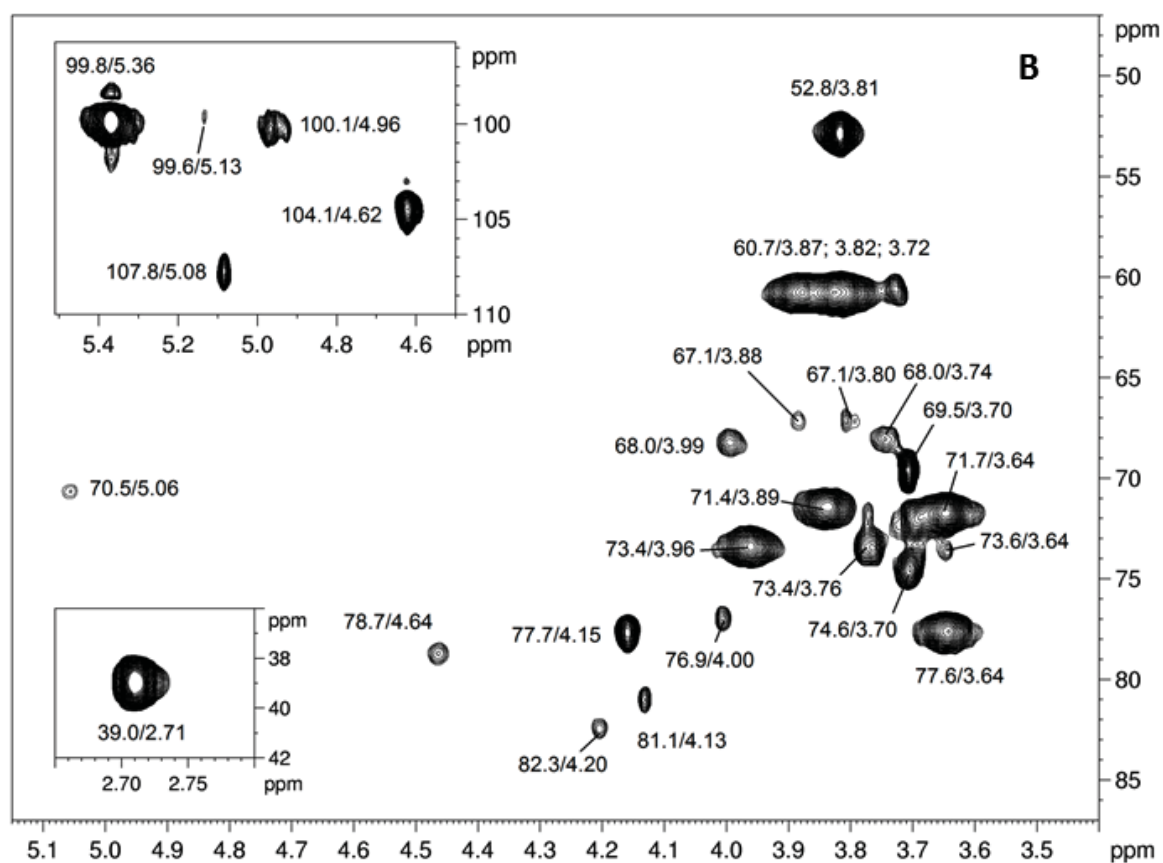
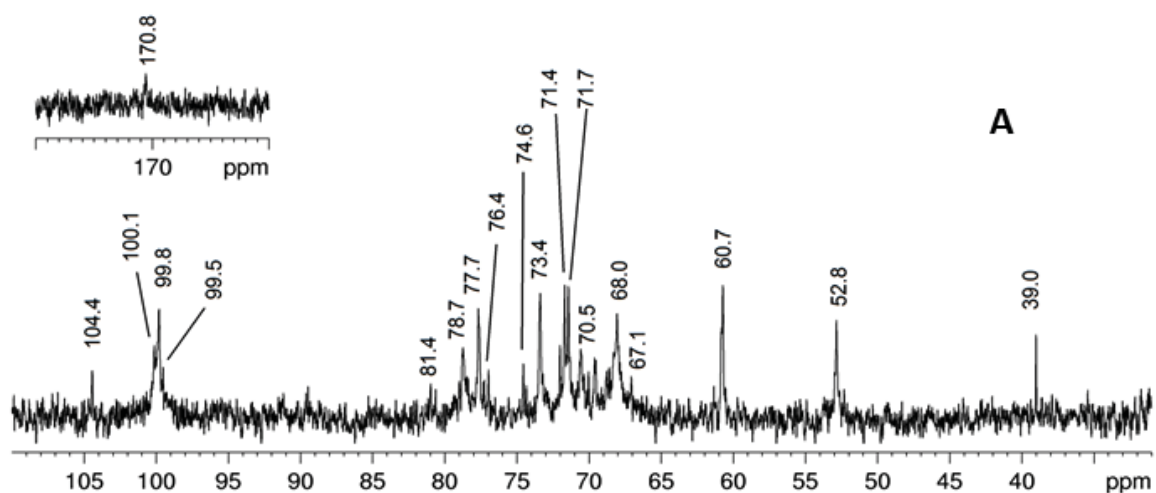


Figura 13- Espectros parciais de ^{13}C -RMN (A) e de HSQC (B) da fração CW90 em D_2O , a 70°C

Fonte: A autora (2021)

Nota: Valores numéricos em δ (ppm)

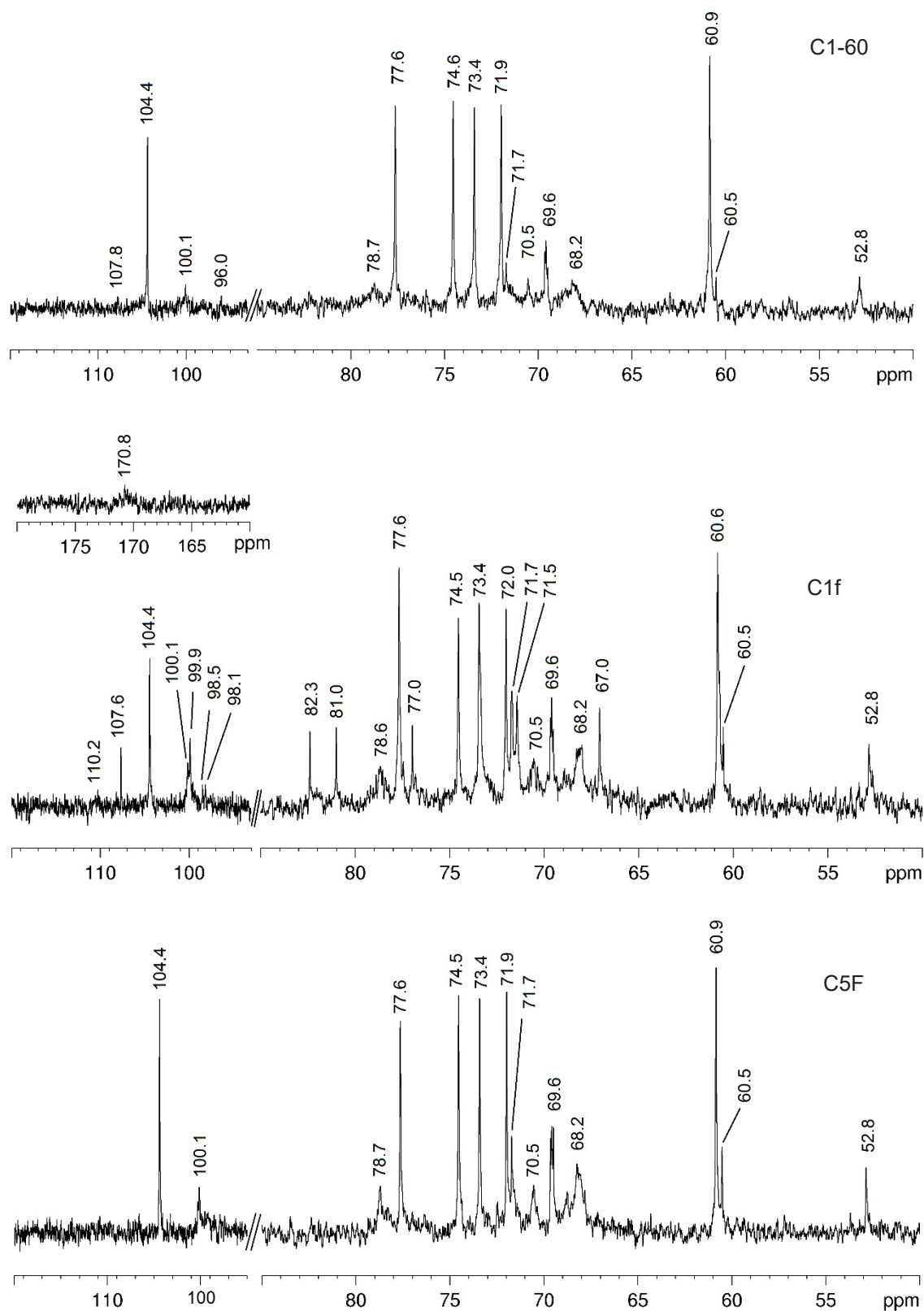


Figura 14- Espectros de RMN- ^{13}C das frações C1-60, C1f e C5f em D_2O , A 70°C

Fonte: A autora (2021)

Nota: Valores numéricos em δ (ppm)

Os espectros de RMN-¹³C das frações CNA e CNA2 estão mostrados na FIGURA 15. Para o carbono do grupamento O-metil, foram atribuídos os assinalamentos em δ 52,8 e 52,6 para a fração CNA e 52,8 para a CNA2. Para a CNA, os carbonos de α -D-GalpA foram assinalados em δ 100,1 (e 99,0) (C1), 68,0 (C2 e C3), 78,7 (C4), 70,5 e 71,7 (C5 das unidades metil esterificadas e não metil esterificadas), e 170,5 (COOCH_3). Para a CNA2, os assinalamentos para α -D-GalpA foram atribuídos em δ 100,1 (e 99,3) (C1 de unidades metil esterificadas e não metil esterificadas), 68,2 (C2 e C3), 78,7 (C4), 70,5 e 71,7 (C5), e 170,5 (C6). Para ambas as frações (CNA e CNA2) foram atribuídos os assinalamentos em δ 104,4, 71,7, 73,4, 77,7, 74,5, referentes aos carbonos 1 a 5 das unidades de β -D-Galp. CNA também apresentou o sinal em δ 103,6 de C1 de unidades de extremidades não redutoras de β -D-Galp. Sinais de carbono anomérico de unidades de α -L-Araf foram assinalados em 109,6 (CNA) e em 106,7, 109,8 (CNA2). Os sinais de α -D-Glc somente foram encontrados para a fração CNA, corroborando com os resultados de composição monossacarídica e reforçando que o tratamento enzimático para remoção do amido foi eficiente.

Os assinalamentos obtidos a partir das análises de RMN das frações CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 foram compilados na Tabela 11.

Outras pectinas encontradas na literatura, como de frutos de outras solanáceas, como pimentão (*Capsicum annum*) (DO NASCIMENTO; IACOMINI; CORDEIRO, 2017) e tamarillo (*S. betaceum*) (DO NASCIMENTO; IACOMINI; CORDEIRO, 2016) apresentaram assinalamentos similares ao descrito para as de *S. diploconos*.

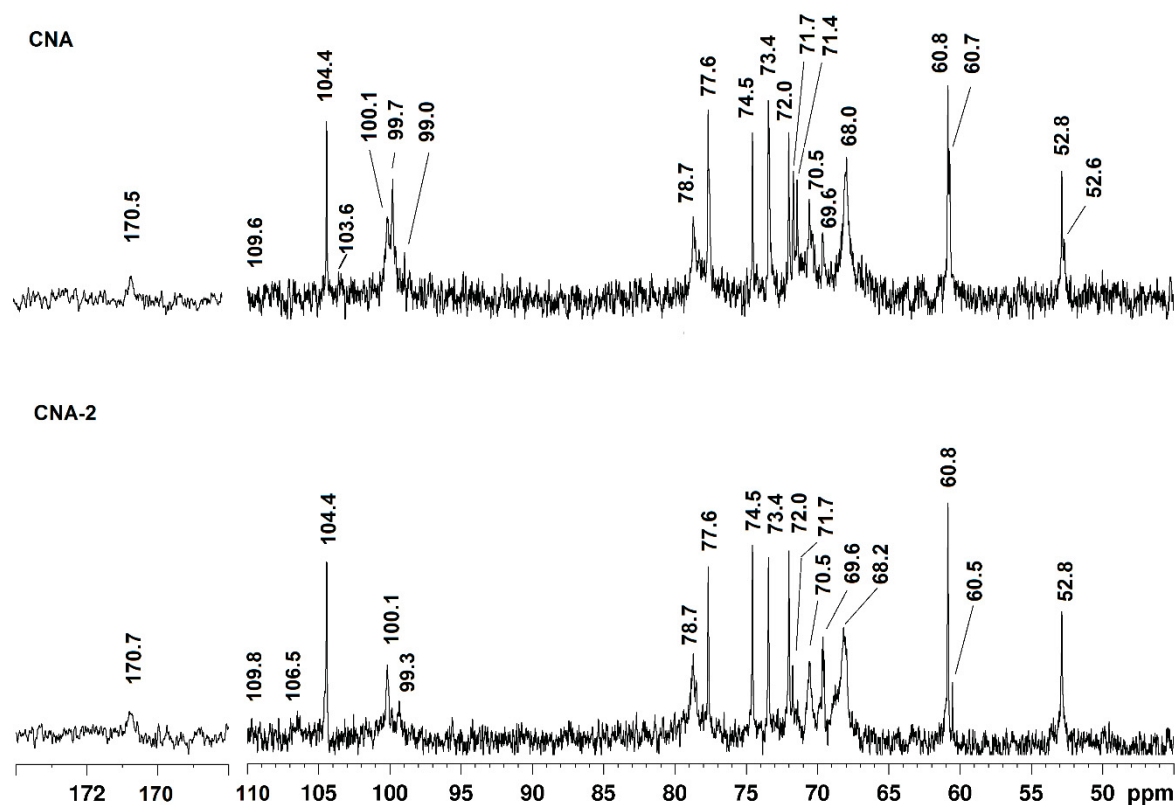


FIGURA 15- Espectros de RMN- ^{13}C das frações CNA e CNA2 em D_2O , A 70°C

FONTE: A autora (2021)

NOTA: Valores numéricos em δ (ppm)

Tabela 11: Assinalamentos (em δ ppm) das frações CW4, CW90, C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2 obtidos por 2D-RMN HSQC e ^{13}C -RMN.

Unidades	Tipos de ligação	CW4	CW90	C1-60	C1f	C5f	CNA	CNA2
α -D-GalpA	$\rightarrow$ 4)-D-6MeGalpA (1 $\rightarrow$	100,1/4,96	100,1/4,96	100,1	100,1	100,1	100,1	100,1
	$\rightarrow$ 4)-D-GalpA(1 $\rightarrow$	99,4/5,11(sob)	99,6/5,13 (sob)		99,9 (sob)		99,0	99,3
	C-1/H-1	68,3/3,74	68/3,74	68,2	68,2	68,2	68,0	68,2
	C-2/H-2	68,2/3,99	68/3,74	68,2	68,2	68,2	68,0	68,2
	C-3/H-3	78,7/4,46	78,7/4,64	78,7	78,6	78,7	78,7	78,7
	C-4/H-4	70,5/5,06	70,5	70,5	70,5	70,5	70,5	70,5
	4)-D-6MeGalpA(1 $\rightarrow$	71,6/3,65	71,6/3,64 (sob)	71/7 (sob)	71,7	71,7	71,7	71,7
	$\rightarrow$ 4)-D-GalpA(1 $\rightarrow$		170,8		170,8		170,5	170,7
	C-6 - $\text{C}(\text{OO}-\text{CH}_3$						52,8	52,8
	O- CH_3	52,8/3,80	52,8/3,81	52,8		52,8	52,8	52,8
α -L-Araf	$\rightarrow$ 5)-L-Araf(1 $\rightarrow$ ou $\rightarrow$ 3,5)-L-Araf(1 $\rightarrow$	107,8/5,08	107,8/5,08	107,8	107,6			
	C-1/H-1							
	C-1/H-1				110,2		109,6	106,5
	α -L-Araf (1 $\rightarrow$				82,3			109,8
	C-2/H-2	76,9/4,00	82,3/4,20					
	C-3/H-3	81,1/4,13	76,9/4,00					
	C-4/H-4	67,3/3,88	81,1/4,13		81,0			
	$\rightarrow$ 5)-L-Araf(1 $\rightarrow$	61,7/3,70	67,3/3,88		67,0			
	C-5/H-5							
	C-5/H-5							

Unidades	Tipos de ligação	CW4	CW90	C1-60	C1f	C5f	CNA	CNA2
β-D-Galp	→4)-D-Galp(1→ ou →4,6)-D-Galp(1→	104,4/4,62	104,4/4,62	104,4	104,4	104,4	104,4	104,4
	β-D-Galp(1→						103,6	
	β-D-GalpOH			96,0				
		71,7/3,64	71,7/3,64 (sob)	71,7 (sob)	71,7	71,7	72,0	72,0
		73,4/ 3,76	73,4/ 3,76	73,4	73,4	73,4	73,4	73,4
	→4)-D-Galp(1→	77,7/ 4,15	77,7/ 4,15	77,6	77,6	77,6	77,6 (sob)	77,6
		74,5/3,70	74,6/3,70	74,6	74,5	74,5	74,5	74,5
		60,8/3,82	60,8/3,82	60,9		60,9	60,8	60,8
	→6)-D-Galp(1→		69,5/3,70	69,6	69,6	69,6	69,6	69,6
		99,8/5,37	99,8/5,36	99,9 (sob)			99,7	
α-D-Glcp		71,6/3,65	71,7/3,64 (sob)		71,7		71,7	
		73,4/3,76	73,4/3,76		73,4		73,4 (sob)	
	→4)-D-Glcp(1→	77,6/3,64	77,6/3,64		77,6		77,6 (sob)	
		71,4/3,84	71,4/3,89				71,4	
		60,6/3,72	60,7/3,72				60,7	
α-L-Rhap		99,4/5,11(sob)	99,6/5,13 (sob)		98,1			
					98,5			

Fonte: A autora

Nota: Valores numéricos em δ (ppm). 2D-RMN HSQC para as frações CW4 e CW90 e ¹³C-RMN para C1-60, C1f, C5f, CNA e CNA2. Assinalamentos baseados em comparação com COLODEL *et al.*, 2017; DALONSO; PETKOWICZ, 2012 e TAMIELLO *et al.*, 2018; DELGODO *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 2021.

As correlações encontradas corroboram com os monossacarídeos encontrados nas análises de RMN. As análises de RMN foram importantes para identificação do tipo de ácido urônico, pelos assinalamentos característicos de unidade de GalpA. Por outro lado, a presença de Rha, pelos sinais apresentados não foi devidamente esclarecida pelos experimentos realizados. Assim, experimentos adicionais para fracionamento e purificação, bem como, para melhor caracterização da estrutura química dos polissacarídeos presentes nas frações serão necessários.

A partir dos dados de composição monossacarídicas (neutra e teor de ácidos urônicos) foi estimado o percentual de homogalacturonanas (% HG) e ramnogalacturonanas tipo I (% RG1), para as frações analisadas por SEC-RI-RALLS, FT-IR e RMN (TABELA 12). Pela estimativa da relação HG/RG1 é possível inferir sobre a predominância dos tipos de pectinas (HG e RG1) (M'SAKNI *et al.*, 2006). A estimativa de outros polissacarídeos (denominados não pécticos), como glucanas (amido) e outros também pode ser avaliada.

Tabela 12: Estimativa percentual de homogalacturonanas (%HG) e ramnogalacturonanas tipo I (%RG1) e outros polissacarídeos não pécticos nas frações

FRAÇÕES	%HG	%RG1	HG/RG1	DE	% Polissacarídeos não pécticos
CW4	9	70	0,13	37	21
CW90	7	30	0,23	42,1	63
C1-60	7	79	0,09	40,5	14
C1f	14	63	0,22	41	23
C5f	6	89	0,07	32,6	5
CNA	33,5	37	0,91	59	30
CNA2	36,5	62	0,59	45	2

Nota: Percentuais calculados de acordo com a metodologia de M'SAKNI *et al.*, 2006.

Para as rações CNA e CNA2 o teor de Rha foi considerado 0,5% (traços). DE: grau de metil esterificação, calculado por FT-IR.

De acordo com as estimativas de HG/RG1 as frações extraídas com ácido cítrico apresentam maior proporção de RG1 e a fração CW90 é a que tem maior % de polissacarídeos não pécticos, que neste caso seria o amido (considerando os dados de composição monossacarídica e RMN). Apesar das análises de RMN não demonstrarem a presença de Rha, mostraram de maneira concisa a presença de Ara e Gal, que são monossacarídeos neutros típicos presentes nas cadeias laterais de RG1, indicando presença de arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (PAULSEN; BARSETT, 2005). Diferentemente, as frações obtidas com ácido

nítrico, apresentaram maior quantidade de HG, e CNA tem também 30% de polissacarídeos não pécnicos (amido), corroborando os dados de composição monossacarídica.

Considerando a composição monossacarídica das frações analisadas (*vide* TABELA 5 e 6), juntamente com os dados das análises de FT-IR e de deslocamentos químicos obtidos nas análises de RMN, e a estimativa de HG/RG1 (TABELA 12) pode-se sugerir a presença de:

- Homogalacturonana com baixo grau de metoxilação: cadeia principal de GalpA unidas por ligação do tipo α -(1→4) com grupos metil, esterificados em C-6;
- arabinogalactanas tipo 1: cadeia principal de β -D-Galp unidas por ligação do tipo β -(1→4), substituídas em O-6 por unidades de α -L-Araf ou cadeias laterais de α -L-Araf unidas por ligação do tipo α -(1→5) ou por cadeias laterais de β -D-Galp unida por ligação do tipo β -(1→6);
- galactanas: β -D-Galp unidas por ligação do tipo β -(1→4) ou tipo β -(1→6);
- glucanas: cadeia principal de α -D-Glcp unidas por ligação do tipo α -(1→4).

Quando comparamos com outras espécies de frutos, mesmo os pertencentes à família Solanaceae, podemos encontrar polissacarídeos diferentes. Houbel *et al.* (2011) encontrou em frutos de tomate (*S. lycopersicum*) pectinas com grande linearidade geralmente com baixo grau de ramificação do tipo RG1 e alto grau de metoxilação. Do Nascimento *et al.*, (2015) e Do Nascimento; Iacomini; Cordeiro (2016) encontraram em frutos de tamarillo (*S. betaceum*) homogalacturonanas altamente metil esterificada, com inserções de RG1 com cadeias laterais de AG-I, arabinana linear (1→5) ligada. Popov; Paik (2003) encontraram nos frutos de pimentão (*Capsicum annuum*) HG parcialmente substituída com grupos metil e acetil (denominado *capsicuman*) e arabinogalactana ácida. Redgewell (2011) encontraram em frutos de Goji berry (*Lycium barbarum*) RG, glucana, 4-O-metil-glucuronoxilana, xiloglucana, manana e AGP. Tong *et al.* (2008) encontrou em frutos de fisális (*Physalis alkekengi*) uma fração polissacarídica contendo Ara, Gal, Glc e GalpA. Colodel *et al.*, (2017) encontrou em frutos de cubiu (*S. sessiliflorum*) pectinas com elevado teor de ácidos urônicos e presença de Rha, Gal e Ara. Esta variedade se dá pelo fato que a composição

molecular e os arranjos dos polímeros de parede celular diferem entre espécies, tecidos de uma única espécie, células individuais e até mesmo regiões da parede (CARPITA; MCCANN, 2015). Até mesmo entre as diferentes formas de extrações podemos notar diferença na composição dos polissacarídeos de *S. diploconos*, como já descrito por Pagán *et al.* (2001) e Buchanan; Gruissem; Jones (2000) a forma de extração influencia no polissacarídeo obtido. Segundo Fracasso (2017) a diminuição do ácido urônico se dá devido à β -eliminação química, reação que cliva e desesterifica o esqueleto de HG por meio de uma degradação enzimática das pectinas que ocorre principalmente em condições alcalinas.

No caso de frutos de *S. diploconos*, pode-se dizer que há potencial a ser explorado com o intuito de aprimorar a extração com ácido nítrico para aumentar o teor de ácidos urônicos. Apesar deste método ter menores vantagens ambientais, a extração com ácido nítrico se mostrou mais eficiente em diversos aspectos, sendo a melhor escolha para extração para fins de obtenção de polímero do tipo homogalacturonana metil esterificada, não excluindo a necessidade de aprimoramento de técnicas de extração com ácido cítrico para fins comerciais a fim de manter as características sustentáveis deste trabalho.

7. Conclusões

Frutos de *S. diploconos* apresentaram pectinas com diferentes características dependendo das condições de extração. A extração com ácido nítrico apresentou-se mais eficiente em diversos aspectos, sendo a melhor escolha de extração para fins experimentais, apesar de ser, o ácido cítrico a melhor escolha para fins comerciais visando as características sustentáveis deste trabalho. Extrações aquosas apresentam bom rendimento, porém também podem extrair grande quantidade polissacarídeos não pécticos.

Os dados da composição monossacarídica juntamente com os resultados das análises SEC-RI-RALLS, FT-IR e RMN sugerem a presença de homogalacturonanas e ramnogalacturonanas tipo I nas frações extraídas com ácido cítrico. Apesar das análises de RMN não demonstrarem a presença de Rha, mostraram de maneira concisa a presença de Ara e Gal, que são monossacarídeos neutros típicos presentes nas cadeias laterais de RG1, indicando presença de arabinanas, galactanas e arabinogalactanas. As frações obtidas com ácido nítrico, apresentaram maior quantidade de homogalacturonana metil esterificada.

Comparando variadas espécies de frutos da família Solanaceae, podemos encontrar na literatura polissacarídeos diferentes, enfatizando a necessidade da exploração científica destas espécies. O uso de frutos de *S. diploconos* como fonte de pectinas se mostrou promissor, tanto pela disponibilidade, quanto pela preocupação ambiental de conservação da espécie.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. 2.ed. Argentina: **Corpus Editorial y Distribuidora**, p. 1144, 2007.

ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P. K. e CONN, E. E. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, v.3, 1980. p.473-500.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S. Natural plants chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p.1154-1160, 1985.

BRISKIN, D.P. Medicinal plants and phytomedicines - Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, v.124, p. 507- 514, 2000.

BRANDÃO, M. G. L.; PIGNAL, M; ROMANIUC, S.; GRAEL, C. F. F; D, FAGG, C. W. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 488-500, 2012.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, 2000.1408 p.

BUCKERIDGE, M. S.; DIETRICH, S. M. C.; LIMA, D. U. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. In: Gupta, A.K., Kaur, N. (Eds.), Synthesis and Regulation of a Range of Carbohydrate Reserves in Plants of Commercial Value. Elsevier, London, p. 283–315, 2000.

BUSATO, B.; ABREU, E. C. A.; PETKOWICZ, C. L. O.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G. R. Pectin from *Brassica oleracea* var. *italica* triggers immunomodulating effects *in vivo*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 431-440, 2020.

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

CARPITA, N.; MCCANN, M. The Cell Wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). In: (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, 2015.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CANTERI-SCHEMIN, M.H.; FERTONANI, H.C.R.; WASZCZYNSKY, N.; WOSIACKI, G. Extraction of pectin from apple pomace, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 259-266, 2005.

CHALAMPUENTE, D., PRADO, P. Caracterización morfoagronómica y molecular de la colección de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) del banco de

germoplasma del INIAP, Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, Ibarra. (2005).

CNC Flora. *Solanum diploconos* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Solanum diploconos](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Solanum_diploconos)>. Acesso em 7 março 2021.

COLODEL, C., BAGATIN, R. M. G., TAVARES, T. M., PETKOWICZ, C. L. O. Cell wall polysaccharides from pulp and peel of cubiu: A pectin-rich fruit. **Carbohydrate Polymers**, n. 174, p. 226-234, 2017.

COLODEL, C.; PETKOWICZ, C. L. O. Acid extraction and physicochemical characterization of pectin from cubiu (*Solanum sessiliflorum* D.) fruit peel. **Food Hydrocolloids**, n. 86, p. 193-200, 2019.

COLODEL, C.; VRIESMANN, L. C.; PETKOWICZ, C. L. O. Rheological characterization of a pectin extracted from ponkan (*Citrus reticulata* blanco cv. ponkan) peel. **Food Hydrocolloids**, v. 94, p. 326-332, 2019.

CHEN, H.; QI, X. Study on the effect of polysaccharides from *Solanum nigrum* Linne on cellular immune function in tumour-bearing mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative**, n. 4, p. 10-41, 2013.

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.

DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; LILJEBÄCK, T. H.; MICHAELSEN, T. E. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.159-171, 2001.

DO NASCIMENTO, G. E.; CORSO, C. R.; PAULA WERNER, M. F.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 300-306, 2015.

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

ELLIS, M; EGELUND, J.; SCHULTZ, C. J.; BACIC, A. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? **Plant Physiology**, v.153, p.403-419, 2010.

FILIPPOV, M. P.; SHKOLENKO, G. A.; KOHN, H. R. Determination of the esterification degree of the pectin of different origin and composition by the method of infrared spectroscopy. **Esterification degree of pectin**, n. 32(2), p. 218-222, 1978.

FILIPPOV, M.P. Practical infrared spectroscopy of pectic substances. **Food Hydrocolloids**, v. 6, n.1, p.115-142, 1992.

FILISSETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v.197, p.157-160, 1991.

FRACASSO, A. F.; PERUSSELLO, C. A.; CARPINÉ, D.; PETKOWICZ, C. L. O. HAMINIUK, C. W. I. Chemical modification of citrus pectin: Structural, physical and rheological implications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 784-792, 2018.

GOMES, A.D.; LIMA, R.A.; FACUNDO, V.A. Identification of the class of secondary metabolites of fruit extract ethanolic *Solanum acanthodes* Hook and its potential on fungicidal candida albicans *in vitro*. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v.18, n.2, p.736-744, 2014.

HAWKES, J. G. The economic importance of the family Solanaceae. In: NEE, M.; SYMON, D. E.; A.L., E. (Ed.). **Solanaceae IV: advances in Biology and utilization**. Kew: The Royal Botanic Gardens. London: The Linnean Society of London. p.1-8, 1999.

HESTRIN, S. Analytical application hydroxylamine, and its derivatives with and other carboxylic acid the reaction of acetylcholine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p. 249-261, 1949.

HOFFMANN, P. M. **Morfologia, ecofisiologia da germinação e desenvolvimento de *Solanum diploconos* (Mart.) Bohs (SOLANACEAE)**. 185 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2014.

HOUBEN, K.; JOLIE, R. P.; FRAEYE, I.; VAN LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot, and tomato: structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 9, p. 1105-1111, 2011

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCES. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Versão 2019-1. Disponível em: < <https://www.iucnredlist.org/species/36211/9988148>>. Acesso em: 24/06/2019

KACURÁKOVÁ, M.; SMITH, A.C.; GIDLEY, M.J.; WILSON, R.H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, p.1147-1153, 2002.

KAR, F.; ARSLAN, N. Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, p. 277–284, 1999.

KLIEMAN, E; SIMAS, K.N.; AMANTE, E.R.; PRUDÊNCIO, E.S.; TEÓFILO, R.F.; FERREIRA M.M.C.; AMBONI, R.M.C. Optimisation of pectin acid extraction from

passion fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) using response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 476-483, 2009.

KYOMUGASHO, C.; CHRISTIAENS, S.; SHPIGELMAN, A.; LOEY, A. M. V.; HENDRICKX, M. E. FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit-and vegetable-based matrices. **Food Chemistry**, v. 176, p. 82-90, 2015.

LI, J.; LI, Q. W.; GAO, D. W.; HAN, Z. S.; LU, W. Z. Antitumor and immunomodulating effects of polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne. **Phytotherapy Research**, n. 11(23), p. 1524-1530, 2009.

LIU, L.; CAO, J.; HUANG, J., CAI, Y.; YAO, J. Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3268–3273. 2010.

M'SAKNI, N.H., MAJDOUB, H., ROUDESLI, S., PICTON, L., LE CERF, D., RIHOUEY, C. AND MORVAN, C. Composition, structure, and solution properties of polysaccharides extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 786-795, 2006.

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.25, p.99–107, 2002.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M. T.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. **Phytomedicine**, v.9, n.6, p.508-514, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINQIAN ZHU, RIMING HUANG, PENG WEN, YA SONG, BAOLIN HE, JIALING TAN, HUILI HAO, HONG WANG, Structural characterization, and immunological activity of pectin polysaccharide from kiwano (*Cucumis metuliferus*) peels, **Carbohydrate Polymers**, v. 254,117371, 2021

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008

MONSOOR, M.A; KALAPATHY, U; PROCTOR, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**. v. 74, p. 233-238, 2001.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1B, p. 315-320, 2009.

MUNHOZ, C. L.; SANJINEZ-ARGANDONA, E. J.; SOARES-JUNIOR, M. S.Extraction of pectin from dehydrated guava. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. [online]. vol.30, n.1, pp.119-125, 2010.

OCHOA-VILLARREAL, M.; AISPURO-HERNÁNDEZ, E.; VARGAS-ARISPURO, I AND MARTÍNEZ-TÉLLEZ, M. A. Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. **Polymerization**, v.4, p. 63-86, 2012.

OLIVEIRA, L.F.; NASCIMENTO, M.R.F.; BORGES, S.V.; RIBEIRO, P.C.N.; RUBACK, V.R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259-262, 2002.

OLIVEIRA, M. L. B; FRANÇA, T. A. R.; CAVALCANTE, F. S.; LIMA, R. A. Uso, classificação e diversidade de *Solanum* L. (SOLANACEAE). **Biodiversidade**, v.19, n.3, p.142-159, 2020.

OVODOV, Y. S. Current views on pectins substances. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 293-310, 2009.

OVODOVA R. G.; BUSHNEVA O. A.; SHASHKOV A. S.; CHIZHOV A. O.; OVODOV Y. S. Structural studies on pectin from marsh cinquefoil *Comarum palustre* L. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 8, p. 867-77, 2005.

PAGÁN, J., IBARZ, A., LLORCA, M., PAGÁN, A., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. **Food Research International**, v. 34, p. 605-612, 2001.

PAIK, S. Y.; RA, K. S.; CHANG, I. S.; PARK, Y. C.; PARK, H. S.; BAIK, H. S.; YUN, J. W.; CHOI, J. W. Purification and characterization of complement-activating acidic polysaccharides from the fruits of *Capsicum annuum*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research**, n. 36 (2), p. 230-236, 2003.

PAULSEN, B.S.; BARSETT, H. Bioactive pectic polysaccharides. *Advances in Polymer Science*, Berlin;Heidelberg: Springer, 186, 69-101, 2005.

PETTOLINO, F. A, WALSH, C, FINCHER, G. B, BACIC, A. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1590-1607, 2012.

PETKOWICZ, C.L.O.; MILAS, M; MAZEAU, K.; BRESOLIN, T.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S.; RINAUDO, M. Conformation of galactomannan: experimental and modelling approaches. **Food Hydrocolloids**, v.13, p. 263–266, 1999.

PEREIRA, I. S. P.; RODRIGUES, V. F.; VEGA, M. R. G. Flavonoides do gênero *Solanum*. **Revista Virtual de Química**, v. 8 Nº 1, p. 4-26, 2016.

PERON, A. P.; FELIPES, J.; MATTGE, G. I.; CANTAGALLI, L. B.; MARIUCCI, R. G.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L., em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, n.2, p.127-130, 2008

PINTO, F. D. C. L.; UCHOA, D. E. D. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, F. M.; ESPINDOLA, L. S. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, v.34, n.2, p.284-288, 2011.

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOVA, G. Y.; VIATYASEV, F. V.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 309-315, 2011.

REDGWELL, R. J.; CURTI, D.; WANG, J.; DOBRUCHOWSKA, J. M.; GERWIG, G. J.; KAMERLING, J. P.; BUCHELI, P. Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 2. Characterisation of arabinogalactan-proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 3, p. 1075-1083, 2011.

REICHEMBACH, L. H.; PETKOWICZ, C. L. O. Extraction and characterization of a pectin from coffee (*Coffea arabica* L.) pulp with gelling properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 245, p. 116473, 2020.

RENARD, C.; THIBAULT, J. Degradation of pectins in alkaline conditions: kinetics of demethylation. **Carbohydrate Research**, v. 286, p. 139-150, 1996.

ROLIN, C. Pectin. In: WHISTLER, R. L. B., J. N. (Ed.). Industrial Gums. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 10, p.257-293.

RIBEIRO, A. B.; CHISTÉ, R. C.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. *Solanum diploconos* fruits: profile of bioactive compounds and *in vitro* antioxidant capacity of different parts of the fruit. **Food & Function**, p. 1-32, 2016

ŠANDULA, J.; KOGAN, G.; KACURÁKOVÁ, M.; MACHOVA, E. Microbial (1→3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, V.38, p.247-253, 1999.

SEIFERT, G.J.; ROBERTS, K. The biology of arabinogalactan proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 137-161, 2007.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263, 2010.

SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p.317-333, 2006.

SILVA FILHO, D. D.; ANDRADE, J. S.; CLEMENT, C. R.; MACHADO, F. M.; NODA, H. Correlações fenotípicas, genéticas e ambientais entre descritores morfológicos e químicos em frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazônia. **Acta Amazônica**, v.29, n.4, p.503-511, 1999.

SILVA, M. L., CECHINEL FILHO V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química nova**, v. 25, p. 449-454, 2002

SINGTHONG, J. CUI, S.W.; NINGSANOND, S.; GOFF, H.D. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krue Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. **Carbohydrate Polymers**. v. 58, p. 391-400, 2004.

SOCIEDADE CHAUÁ. Cadastro de matrizes de espécies raras e ameaçadas da Floresta com Araucária. Disponível em <https://www.sociedadechaua.org/cadastros-de-matrizes-subprojeto-1>. 2015. Acesso em: 24/06/2019

SOCIEDADE CHAUÁ. Boletim Chauá: Manual de cultivo - Solanum diploconos (Solanaceae) (Mart.) Bohs. Campo Largo, 2018. Disponível em: <http://www.conexaoambiental.pr.gov.br/sites/conexaoambiental/arquivos_restritos/files/documento/2019-07/solanum_diploconos_-_boletim_chaua_002.pdf>. Acesso em: 24/06/2019

SOUZA, K. A. F.; NEVES, V. A. Pesquisa de polissacarídeos: reação com o iodo. Experimentos em Bioquímica 2006. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_ch/teste_amido.htm> Acesso em 23/03/2021.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; DA COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 516, 2009.

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

SRIVASTAVA, P.; MALVIYA, R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry e na overview. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, p. 10-18, 2011.

SUMMER, J.B.; SISLER, E.B. A simple method for blood sugar. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 4, p. 333-336, ISSN 0003-9861, 1944.

TAMIELLO, C. S.; ADAMI, E. R.; NATALIA MULINARI TURIN DE OLIVEIRA, N. M. T. O.; ACCO, A.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M. C.; Structural features of polysaccharides from edible jambo (*Syzygium jambos*) fruits and antitumor activity of extracted pectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1414-1421, 2018.

TONG, H.; LIANG, Z.; WANG, G. Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 316-323, 2008.

VENZON, S. S.; CANTERI, M. H. G.; GRANATO, D.; JUNIOR, B. D.; MACIEL, G. M.; STAFUSSA, A. P.; HAMINIUK, C. W. I. Physicochemical properties of modified

citrus pectins extracted from orange pomace. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4102-4112, 2015.

VIRK, B.S.; SOGI, D.S. Extraction and characterization of pectin from apple pomace (*Malus pumila* Cv Amri) peel waste. **International Journal of Food Properties**, v.7, n. 03, p.1-11, 2004.

VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263-275, 2009.

VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W.; THIBAUT, J. F.; AXELOS, M. A. V.; RENARD, C. M. G. C. Pectins. In: STEPHEN, A. M. (Ed.). Food polysaccharides and their applications. New York: Marcel Dekker, p. 287- 340, 1995.

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

VRIESMANN, L. C.; TEOFILO, R. F.; PETKOWICZ, C. L. O. Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie / Food Science & Technology**, v. 49, p. 108-116, 2012.

YAO, H.; WANG, L.; TANG, X.; YANG, Z.; LI, H.; SUN, C.; WU, X.; XU, D. Two novel polysaccharides from *Solanum nigrum* L. exert potential prebiotic effects in an in vitro fermentation model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 648-658, 2020.

YUAN, H. L.; LIU, X. L.; LIU, Y. J. *Solanum Nigrum* polysaccharide (SNL) extract effects in transplanted tumor-bearing mice-erythrocyte membrane fluidity and blocking of functions. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 23, p. 10469-10473, 2014

WHISTLER, R.L. Solubility of polysaccharides and their behavior in solution. In: Isbell HS, editor. Carbohydrate in Solution. Washington, DC: American Chemical Society Press; 1973. p. 242-255.

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

WISHART, D.S., SYKES, B.D. The ¹³C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 4, p. 171–180, 1994.