

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**NICOLE DALONSO**

**POLISSACARÍDEOS DAS SEMENTES DE GUARANÁ (*Paullinia cupana* Kunth):  
ANÁLISES ESTRUTURAIS, REOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**CURITIBA**

**2010**

NICOLE DALONSO

POLISSACARÍDEOS DAS SEMENTES DE GUARANÁ (*Paullinia cupana* Kunth):  
ANÁLISES ESTRUTURAIS, REOLÓGICAS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

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

CURITIBA


2010

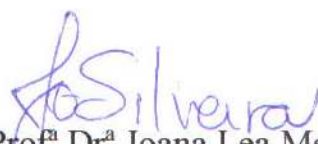
## TERMO DE APROVAÇÃO


NICOLE DALONSO


### **Polissacarídeos das sementes guaraná (*Paullinia cupana Kunth*): análises estruturais, reológicas e atividade antioxidante**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz (Orientadora)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Joana Lea Meira Silveira  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

  
Dr<sup>a</sup> Fernanda Fogagnoli Simas Tosin  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

  
Prof. Dr. Renato Bochicchio  
Setor Litoral - UFPR

Curitiba, 10 de fevereiro de 2010.

Aos meus pais e ao Ju que sempre me deram exemplos de força e perseverança.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ademir e Neiva, por todo incentivo, amor e amizade. Ao Ju, meu namorado, que sempre esteve do meu lado, me apoiando emocionalmente, mesmo quando estava longe. Aos meus familiares, por compreenderem minha ausência durante estes dois anos.

À minha orientadora, professora Carmen, por acreditar em mim, por todos os ensinamentos, pelas ótimas correções e sugestões no trabalho.

Ao Gustavo meu grande amigo e parceiro de todas as horas. Uma pessoa incrível que fez a minha vida ser muito melhor!

Ao pessoal do laboratório de Carboidratos Vegetais pela agradável convivência, especialmente a Lúcia por toda atenção fornecida durante os ensinamentos práticos, a Heide, Nana e Rogério por todo apoio. A todos os meus amigos do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, principalmente a Luciana, a Juliana e a Giovana por toda amizade e incentivo. Ao pessoal dos outros laboratórios de carboidratos, especialmente a Andrea Ruthes, Fernanda Simas, Talles, Elaine, Ana Helena, Fhernanda, pela atenção, ajuda na parte experimental e ensinamentos. Aos meus amigos da turma mestrado pelo companheirismo e boa convivência nestes dois anos.

A todos os meus amigos pelos momentos inesquecíveis.

A banca examinadora, Prof. Dr. Renato, Prof<sup>a</sup> Dra. Joana e Dra. Fernanda pelas excelentes sugestões e correções.

Aos professores que ministraram as disciplinas do mestrado. Ao Prof. Dr. Miguel Nosedá, Prof. Dr. Guilherme Sasaki e aluna de doutorado Luciana pelas análises de RMN. Às funcionárias Rosane e à Elizângela pelas análises em GC-MS, GLC e GPC, e também pela amizade. À Dona Marilza, sempre prestativa e atenciosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao RU pelas ótimas refeições diárias, pelos momentos de alegria e distração com os amigos.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram durante esta etapa.

Muito obrigada!!!

Depois de sentir-me cansado em procurar  
Aprendi a encontrar.  
Depois de um vento ter-me feito resistência  
Navego com todos os ventos.  
(Friedrich Nietzsche)

## RESUMO

O guaraná (*Paullinia cupana*) é um fruto nativo da região Amazônica, rico em amido, metilxantinas, compostos fenólicos e saponinas. Devido ao seu elevado potencial estimulante, seu extrato é utilizado principalmente no preparo de bebidas carbonatadas. No presente trabalho foram obtidas frações extraídas das sementes do guaraná, utilizando-se diferentes solventes. Inicialmente as sementes foram deslipidificadas com tolueno-etanol, tratado com metanol-água, obtendo-se a fração GMW. Posteriormente, o amido das sementes foi extraído com dimetilsulfóxido, obtendo-se as frações GD-I e GD-II, que foram avaliadas quanto ao comportamento reológico em DMSO 90%. A fração GD-II apresentou viscosidade aparente (Pa.s) e módulo de armazenamento ( $G'$ ) superiores aos encontrados para a fração GD-I, caracterizando um comportamento de gel fraco nas concentrações superiores a 15%. Além do amido, outras frações polissacarídicas foram obtidas, utilizando-se água e soluções aquosas de NaOH. Uma fração péctica (GHW-IIETF) foi isolada com água quente, purificada com enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase, e ultrafiltração. Através de análises químicas e RMN-<sup>13</sup>C foi possível identificar uma homogalacturonana com algumas inserções de ramnogalacturonanas, contendo cadeias laterais compostas por arabinose e galactose. O grupo de frações hemicelulósicas extraídas com solução alcalina foi separado em GHA e GHB por métodos diferentes de precipitação dos polissacarídeos. O grupo GHA era composto majoritariamente pelos monossacarídeos Xyl e Glc e o grupo GHB por Glc, Xyl e Ara. Todas as hemiceluloses apresentaram elevados percentuais de proteína. Uma xilana contendo ácido glucurônico foi purificada a partir da fração extraída com NaOH 2M, empregando-se cromatografia de troca iônica para remoção das proteínas, tratamento enzimático para remoção do amido, e diálise. Testes de atividade antioxidante foram realizados com duas frações de interesse, um extrato metanólico (GMW) e uma fração péctica (GHW-IIET). O extrato GMW mostrou elevado potencial antioxidante, tanto no ensaio de seqüestro de radical DPPH quanto de radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). A fração GHW-IIET apresentou maior atividade no ensaio de seqüestro de radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e somente quando testada na maior concentração (10 mg/mL) apresentou considerável atividade seqüestrante de radical DPPH. Os resultados obtidos demonstram que, as sementes de guaraná contêm grande quantidade de amido (39%), além de polissacarídeos pécticos e hemiceluloses, que podem ser obtidos após remoção de componentes de menor massa molar. Amidos com diferentes percentuais de amilose foram obtidos exibindo diferentes características reológicas. A fração contendo componentes de menor massa e uma fração péctica exibiram atividade antioxidante.

Palavras-chave: guaraná, polissacarídeos, reologia, atividade antioxidante

## ABSTRACT

Guarana (*Paullinia cupana*) is a native fruit from the Amazon region, rich in starch, methylxanthines, phenolic compounds and saponins. Because of its high stimulant potential, its extract is used primarily in the preparation of carbonated beverages. In the present study, fractions extracted from the seeds of guarana, using different solvents were obtained. The lipids were removed from the seed with toluene-ethanol and then treated with methanol-water, yielding the fraction GMW. Subsequently, the starch of the seeds was extracted with dimethyl sulfoxide, resulting in fractions GD-I and GD-II, which were evaluated for the rheological behavior in DMSO 90%. Fraction GD-II showed storage modulus ( $G'$ ) and apparent viscosity (Pa.s) higher than those found for the GD-I fraction, showing a weak gel-like behavior at concentrations higher than 15%. In addition to starch, other fractions of polysaccharide were obtained, using water and aqueous NaOH. A pectic fraction (GHW-IIETF) was isolated with hot water and purified by enzymatic treatment with  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase, and ultrafiltration. Using chemical analysis and  $^{13}\text{C}$ -NMR was possible to identify a homogalacturonans with some insertions of rhamnogalacturonans, with side chains containing galactose and arabinose. The fractions of hemicelluloses, extracted with alkaline solutions, were fractionated in GHA and GHB by different methods of precipitation. The GHA group was composed mostly by monosaccharides Xyl and Glc and GHB group by Glc, Xyl and Ara. All the hemicellulosic fractions showed high percentages of protein. A xylan containing glucuronic acid was purified from fraction obtained by 2M NaOH extraction, using ion-exchange chromatography for removal of the proteins, enzymatic treatment for removal the starch, and dialysis. Antioxidant activities tests were performed with two fractions, a methanolic extract (GMW) and a pectic fraction (GHW-IIET). GMW fraction showed high antioxidant activity *in vitro* by the DPPH radical and hydroxyl ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) scavenging experiments. The GHW-IIET fraction showed higher hydroxyl radical scavenging activity, and only when tested at highest concentration (10 mg/mL) showed scavenging activity of DPPH radical. According to the results, a part from starch (39%), guarana seeds contain pectic polysaccharides and hemicelluloses, which can be obtained after removal of lower molecular weight compounds. Starches with different percentages of amylose were obtained showing different rheological properties. The fraction containing lower molar mass compounds and a pectic fraction exhibited antioxidant activity.

Key-words: guarana, polysaccharides, rheology, antioxidant activities



## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - CACHO DE FRUTOS DE GUARANÁ, MOSTRANDO O FRUTO COM SUAS SEMENTES (PARDO-NEGRA) ENTRE A POLPA (BRANCA) (A). SEMENTES ISOLADAS DE GUARANÁ (B).....23
- FIGURA 2 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR VEGETAL PRIMÁRIA DO TIPO I.....28
- FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....39
- FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....41
- FIGURA 5 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC PARA AS FRAÇÕES GD-I (A) E GD-II (B), OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (LS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) .....61
- FIGURA 6 - ESPECTROS DE RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>, 70 °C) DAS FRAÇÕES GD-I (A) E GD-II (B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....63
- FIGURA 7 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA A 25 °C DA FRAÇÃO GD-I, OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, UTILIZANDO DMSO COMO SOLVENTE, NAS TENSÕES DE 0,1 Pa (GD-I NAS CONCENTRAÇÕES 10, 15 E 20%, p/p) E 0,8 Pa (GD-I NA CONCENTRAÇÃO 25%, p/p).....65
- FIGURA 8 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DA FRAÇÃO GD-II A 25 °C, OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, UTILIZANDO DMSO COMO SOLVENTE, NAS TENSÕES DE 0,1 Pa (GD-II NA CONCENTRAÇÃO 10%, p/p) E 3 Pa (GD-II NAS CONCENTRAÇÕES 15, 20 E 25%, p/p)...66
- FIGURA 9 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA A 25 °C, MOSTRANDO APENAS O MÓDULO G' DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II,

	OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, NAS CONCENTRAÇÕES DE 10, 15, 20 E 25% (p/p) .....	67
FIGURA 10 -	INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO NA VISCOSIDADE (25 °C) DAS FRAÇÕES GD-I (A) E GD-II (B), OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, A 10, 15, 20 E 25% (p/p), UTILIZANDO DMSO COMO SOLVENTE .....	68
FIGURA 11 -	CURVAS DE VISCOSIDADE (25 E 50°C) DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, A 20% (p/p), UTILIZANDO DMSO COMO SOLVENTE .....	71
FIGURA 12 -	ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O, 70 °C) DAS FRAÇÕES GHW-I (A) E GHW-IET (B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ .....	74
FIGURA 13 -	ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O, 70 °C) DAS FRAÇÕES GHW-II (A) E GHW-IIET (B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ .....	75
FIGURA 14 -	PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHW-I, GHW-IET, GHW-II E GHW-IIET, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (LS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) .....	76
FIGURA 15 -	PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHW-IIET E GHW-IIETF, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) .....	77
FIGURA 16 -	ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O, 70 °C) DA FRAÇÃO GHW-IIETF OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	80
FIGURA 17 -	PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHA2-I (A- 1), GHA2-II (A-2), GHA4-I (A-3), GHA4-II (A-4), GBA2-I (B-1), GHB2-II (B-2), GHB4-I (B-3), GHB4-II (B-4), OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (LS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA EM 280 nm (UV).....	82

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O, 70 °C) DA FRAÇÃO GHA2-I OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	84
FIGURA 19 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHA2-I, GHA2-IW E GHA2-IWET, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI).....	87
FIGURA 20 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHA2-IW, GHA2-IWET E GHA2-IWETD, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI).....	88
FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O, 70 °C) DAS FRAÇÕES GHA2-I (A) E GHA2-IWETD (B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	89
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN- <sup>13</sup> C (MeOD, 30 °C) DO EXTRATO GMW OBTIDO DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	93
FIGURA 23 - ENSAIO DE ATIVIDADE SEQÜESTRANTE DE RADICAL DPPH PARA AS AMOSTRAS GMW E GHW-IIET, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, ÁCIDO ASCÓRBICO E BHA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES .....	94
FIGURA 24 - ENSAIO DE ATIVIDADE SEQÜESTRANTE DE RADICAL HIDROXILA (OH <sup>•</sup> ) PARA AS AMOSTRAS GMW E GHW-IIET, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES .....	97

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	RENDIMENTO, TEOR DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ .....	55
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	56
TABELA 3 -	TEORES DE AMIOSE E AMILOPECTINA DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ .....	60
TABELA 4 -	VISCOSIDADE APARENTE DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, NAS TAXAS DE CISALHAMENTO 0,18 E 1,18 s <sup>-1</sup> .....	69
TABELA 5 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GHW-I, GHW-IET, GHW-II, E GHW-IIET OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	72
TABELA 6 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GHW-IIET, GHW-IIETF E GHW-IIETR OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	78
TABELA 7 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GHW-IIETF E RGHW-IIETF OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	79
TABELA 8 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, TEOR DE PROTEÍNA E AÇÚCAR TOTAL DAS FRAÇÕES GHA2-I, GHA2-II, GHA2-IIS E GHA2-IIP OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ .....	83
TABELA 9 -	RENDIMENTO, TEOR DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNA DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO FRACIONAMENTO POR COLUNA DE TROCA IÔNICA OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ .....	85

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO FRACIONAMENTO POR COLUNA DE TROCA IÔNICA OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ .....	86
TABELA 11 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GHA2-IW, GHA2-IWET E GHA2-IWETD OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	87
TABELA 12 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO RGHA2-IWETD OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ.....	91
TABELA 13 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXTRATO GMW, OBTIDO DAS SEMENTES DE GUARANÁ, COM E SEM HIDRÓLISE.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$	- Deslocamento químico (ppm)
BSA	- Soro albumina bovina
D <sub>2</sub> O	- Óxido de deutério
DE	- Grau de esterificação
DEPT	- <i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
FID	- Detector de ionização de chama
FT-IR	- Fourier transform-infrared
G'	- Módulo de armazenamento ou módulo de cisalhamento elástico
G''	- Módulo de perda ou módulo de cisalhamento viscoso
GD-I	- Primeira fração de amido extraída com DMSO após etapa de tratamento com metanol-água (4:1)
GD-II	Segunda fração de amido extraída com DMSO após obtenção de GD-I
GD-III	- Terceira fração de amido extraída com DMSO após lavagens com água do resíduo
GHA2-I	- Primeira fração hemicelulósica extraída com NaOH 2M, obtida após neutralização do extrato
GHA2-I0,5NaOH	- Terceira fração eluída da coluna de troca iônica, utilizando NaOH 0,5M como solvente, sendo proveniente de GHA2-I
GHA2-II	- Segunda fração hemicelulósica extraída com NaOH 2M, obtida após neutralização do extrato
GHA2-IIP	- Fração precipitada obtida por congelamento-degelo de GHA2-II
GHA2-IIS	- Fração solúvel obtida por congelamento-degelo de GHA2-II
GHA2-INaCl	- Segunda fração eluída da coluna de troca iônica, utilizando NaCl 2M como solvente, sendo proveniente de GHA2-I
GHA2-INaOH	- Quarta fração eluída da coluna de troca iônica, utilizando NaOH 1M como solvente, sendo proveniente de GHA2-I

GHA2-IW	- Primeira fração eluída da coluna de troca iônica, utilizando água destilada como solvente, sendo proveniente de GHA2-I
GHA2-IWET	- Fração GHA2-IW após tratamento com $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase
GHA2-IWETD	- Fração eluída após diálise de GHA2-IWET em membrana de 1.000 KDa e retida em 16 KDa
GHA4-I	- Primeira fração hemicelulósica extraída com NaOH 4M, obtida após neutralização do extrato
GHA4-II	- Segunda fração hemicelulósica extraída com NaOH 4M, obtida após neutralização do extrato
GHB2-I	- Primeira fração hemicelulósica extraída com NaOH 2M, obtida após neutralização do extrato e precipitação com etanol
GHB2-II	- Segunda fração hemicelulósica extraída com NaOH 2M, obtida após neutralização do extrato e precipitação com etanol
GHB4-I	- Primeira fração hemicelulósica extraída com NaOH 4M, obtida após neutralização do extrato e precipitação com etanol
GHB4-II	- Segunda fração hemicelulósica extraída com NaOH 4M, obtida após neutralização do extrato e precipitação com etanol
GHW-I	- Primeira fração extraída com água quente, obtida após extração sequencial com água a temperatura ambiente
GHW-IET	- Fração GHW-I tratada com $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase
GHW-II	- Segunda fração extraída com água quente
GHW-IIET	- Fração GHW-II tratada com $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase
GHW-IIETF	- Fração eluída após purificação por ultrafiltração, utilizando-se membrana de 0,1 $\mu$ m, oriunda de GHW-IIET
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GMW	- Fração obtida através da extração com metanol-água (4:1) das sementes do guaraná após deslipdificação
GW-I	- Primeira fração extraída com água após extrações sequenciais com DMSO

GW-II	- Segunda fração extraída com água a temperatura ambiente
HG	- Homogalacturonana
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- Peróxido de hidrogênio
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência
LS	- Espalhamento de luz
MALLS	- Detector de espalhamento de luz laser em multiângulos
MeOD	- Metanol deuterado
Me <sub>2</sub> SO	- Dimetilsulfóxido
Me <sub>2</sub> SO- <i>d</i> <sub>6</sub>	- Dimetilsulfóxido deuterado
<i>m/z</i>	- relação entre massa e carga
NaBD <sub>4</sub>	- Boroidreto de sódio deuterado
NaBH <sub>4</sub>	- Boroidreto de sódio
NaN <sub>3</sub>	- Azida de sódio
NaNO <sub>2</sub>	- Nitrito de sódio
p/p	- peso/peso
p/v	- peso/volume
RG	- Ramnogalacturonana
RG-I	- Ramnogalacturonana do tipo I
RG-II	- Ramnogalacturonana do tipo II
RI	- Índice de refração
RGHA2-IWETD	- Fração GHA2-IWETD carboxi-reduzida
RGHW-IIETF	- Fração GHW-IIETF carboxi-reduzida
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RMN- <sup>13</sup> C	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono
	13
TFA	- Ácido trifluoracético
UV	- Ultravioleta
v/v	- volume/volume
XGA	- Xilogalacturonanas



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 <i>Paullinia cupana</i> .....	22
2.1.1 Propriedades químicas e medicinais das sementes do guaraná.....	23
2.2 SEMENTES.....	25
2.3 POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL.....	27
2.3.1 Pectinas.....	29
2.3.2 Hemiceluloses.....	31
2.3 REOLOGIA.....	32
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLISSACARÍDEOS .....	34
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	37
3.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO .....	37
3.2.1 Deslipidificação e inativação enzimática .....	37
3.2.2 Extração com DMSO .....	37
3.2.3 Extrações aquosas.....	38
3.2.4 Extrações alcalinas .....	38
3.3 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	40
3.3.1 Fracionamento e purificação das frações extraídas com água quente.....	40
3.3.1.1 Remoção do amido.....	40
3.3.1.2 Ultrafiltração.....	42
3.3.2 Fracionamento e purificação das frações extraídas com solução alcalina de NaOH 2M .....	42
3.3.2.1 Fracionamento por congelamento e degelo.....	42
3.3.2.2 Precipitação com solução de Fehling .....	42
3.3.2.3 Métodos de remoção de proteínas .....	43

3.3.2.4 Fracionamento por cromatografia de troca iônica.....	43
3.3.2.5 Remoção do amido .....	44
3.3.2.6 Diálise em membranas .....	44
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	45
3.4.1 Determinação da composição monossacarídica .....	45
3.4.2 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos, índice de refração e ultravioleta (HPSEC-MALLS/RI/UV) .....	46
3.4.3 Dosagens colorimétricas.....	46
3.4.4 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) .....	48
3.4.5 Determinação do grau de esterificação da fração pectica .....	48
3.4.6 Carboxi-redução .....	49
3.4.7 Metilação .....	49
3.4.8 Análise dos polissacarídeos carboxi-reduzidos/metilados .....	50
3.5 ANÁLISES REOLÓGICAS .....	51
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	51
3.7 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA.....	53
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ .....	54
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II.....	58
4.2.2 Análise da homogeneidade por HPSEC das frações GD-I e GD-II.....	60
4.2.3 Análises por espectroscopia de RMN- <sup>13</sup> C das frações GD-I e GD-II.....	62
4.2.4 Aspectos reológicos.....	64
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES GHW-I E GHW-II .....	71
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES GHA2-I, GHA2-II, GHA4-I, GHA4-II, GHB2-I, GHB2-II, GHB4-I E GHB4-II.....	81
4.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	91
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A família Sapindaceae abrange 2000 espécies distribuídas entre 140 a 150 gêneros. Esta família apresenta algumas espécies de valor econômico, entre as quais se destacam: Lichia (*Litchi chinensis*), Longan (*Dimocarpus longan*) e o Guaraná (*Paullinia cupana*) (PELEGRINI *et al.*, 2008; CLAUDINO *et al.*, 2009), sendo este último objeto de pesquisa do presente trabalho.

O guaraná foi assim denominado pelos indígenas da tribo Maués que descobriram o fruto antes mesmo da conquista do continente da americano. O guaranazeiro é uma espécie tipicamente brasileira e suas sementes são empregadas principalmente na fabricação de bebidas carbonatadas. Além do interesse das indústrias de bebidas, as sementes são consumidas também na forma em pó para preparo de bebidas, cápsulas ou comprimidos, sendo utilizadas para aumentar a capacidade física e cognitiva, devido ao elevado teor de cafeína (KURI, 2008).

Diversos trabalhos associam as propriedades medicinais do guaraná aos compostos de baixa massa molar existentes, porém, não há nenhum estudo que descreva os polissacarídeos presentes nestas sementes. Este tema mostra-se promissor, visto que em geral os polímeros de carboidratos possuem diversas aplicações industriais, (LIU *et al.*, 2008; RAVI *et al.*, 2008), podendo atuar como agentes espessantes, gelificantes, emulsificantes (EL-NOKALY; SOINI, 1999; TONELI; MURR; PARK, 2005), além de possuírem atividades imunomoduladoras, (SCHEPETKIN; QUINN, 2006; ROSÁRIO *et al.*, 2008), antitumorais e antioxidantes (YANG *et al.*, 2006; NOAMAN *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2008).

Devido ao interesse econômico pelas sementes há crescentes investimentos na cultura do guaraná, e nos últimos 5 anos o Governo do Estado do Amazonas, a AmBev e a Guaraná Antártica aplicaram R\$ 34 milhões na profissionalização do produtor rural e desenvolvimento sustentável da região Amazônica. Estima-se que até 2013 estes investimentos alcancem a margem dos R\$ 70 milhões.

O amido é encontrado como polissacarídeo de reserva nas sementes do guaraná, acumulando-se na forma de grânulos no citoplasma. Nenhuma informação a respeito das propriedades físico-químicas e reológicas deste polímero foi encontrada na literatura.

Em relação aos polissacarídeos presentes na parede celular das sementes do guaraná também não foram encontrados dados na literatura..

O guaraná possui importante atividade antioxidante, associada até o momento aos compostos fenólicos presentes, porém não se sabe ainda se os polissacarídeos teriam ou não alguma influência sobre esta característica. Por este motivo o potencial antioxidante de uma fração polissacarídica foi investigado, bem como de um extrato metanol:água das sementes do guaraná.

Entre as linhas de pesquisa desenvolvidas pelo grupo de química de carboidratos vegetais da Universidade Federal do Paraná está a caracterização estrutural de polissacarídeos de sementes (PETKOWICZ *et al.*, 1998; PETKOWICZ *et al.*, 2001; TEIXEIRA-SÁ *et al.*, 2009). As propriedades físico-químicas dos polímeros, como o comportamento reológico, também têm sido abordadas pelo grupo (BUSATO *et al.*, 2009; KOOP *et al.*, 2009). Assim, considerando à experiência do grupo e a ausência de dados a respeito dos biopolímeros presentes nas sementes do guaraná, neste trabalho este material foi analisada quanto à estrutura e propriedades de seus polissacarídeos.

As aplicações industriais bem como as atividades biológicas dos polissacarídeos estão correlacionadas com algumas características químicas, físico-químicas e estruturais, dentre as quais se destacam a composição monossacarídica, solubilidade, grau de ramificação e tipos de ligações envolvidas. Assim, torna-se imprescindível a elucidação da estrutura química para o direcionamento adequado na utilização destas biomoléculas. Deste modo, justificam-se os estudos visando à elucidação da estrutura, características físico-químicas e atividade antioxidante dos polissacarídeos presentes nas sementes do guaraná.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar os polissacarídeos de sementes de *Paullinia cupana* (guaraná), estudar a estrutura, propriedades reológicas e atividade antioxidante das frações de interesse.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os polissacarídeos das sementes de *Paullinia cupana* (guaraná) através de extrações seqüenciais com dimetilsulfóxido (DMSO), soluções aquosas e alcalinas;
- Determinar a composição monossacarídica, o teor de açúcar total e proteína das frações obtidas;
- Avaliar a homogeneidade das frações através de cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC);
- Purificar as frações de interesse através de cromatografia de troca iônica, sistemas de diálise e ultrafiltração;
- Analisar estruturalmente os polissacarídicos purificados, utilizando métodos químicos (metilação) e espectroscópicos (RMN-<sup>13</sup>C e GC-MS);
- Avaliar o comportamento reológico das frações de amido extraídas com DMSO, através de análises dinâmico-oscilatórias e estáticas;
- Avaliar o potencial antioxidante das frações de interesse.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Paullinia cupana*

*Paullinia* é um gênero pertencente à família Sapindaceae, que inclui 195 espécies distribuídas nos trópicos e subtropicais americanos. Dentre estas espécies, pelo menos nove são provenientes do Brasil, incluindo *Paullinia cupana* (Kunth) variedade *sorbilis* [(Mart.) Ducke]. Esta espécie é nativa da região Amazônica e popularmente conhecida por guaraná (ÂNGELO *et al.*, 2008).

A variedade cultivada do guaraná apresenta em média 2 m de altura e um diâmetro duas vezes superior. Crescendo em “terra firme”, latossolo profundo e ácido, o guaranazeiro é uma trepadeira lenhosa, que busca a direção da luz disponível na parte superior da floresta. As inflorescências começam a se expandir no período menos chuvoso, de maio a junho, sinalizando a época de floração. Os frutos do guaraná apresentam coloração vermelha, com características capsulares, contendo de uma a três sementes (ERICKSON *et al.*, 1984), como mostrado na Figura 1.

O maior interesse pelas sementes do guaraná é da indústria de bebidas carbonatadas, principalmente pelo alto teor de cafeína, sendo que 44% da produção nacional é destinada a este setor. O restante é dividido entre laboratórios e indústrias de beneficiamento, extração e fabricação de xaropes para bebidas, restando 10,5% que é exportado na forma *in natura* (KURI, 2008).

O cultivo do guaraná é exclusivamente brasileiro, e os estados do Amazonas e Bahia possuem a maior área plantada do fruto nas suas respectivas regiões. Juntos, estes dois estados produzem 2.558 toneladas de semente de guaraná por ano (IBGE, 2006).

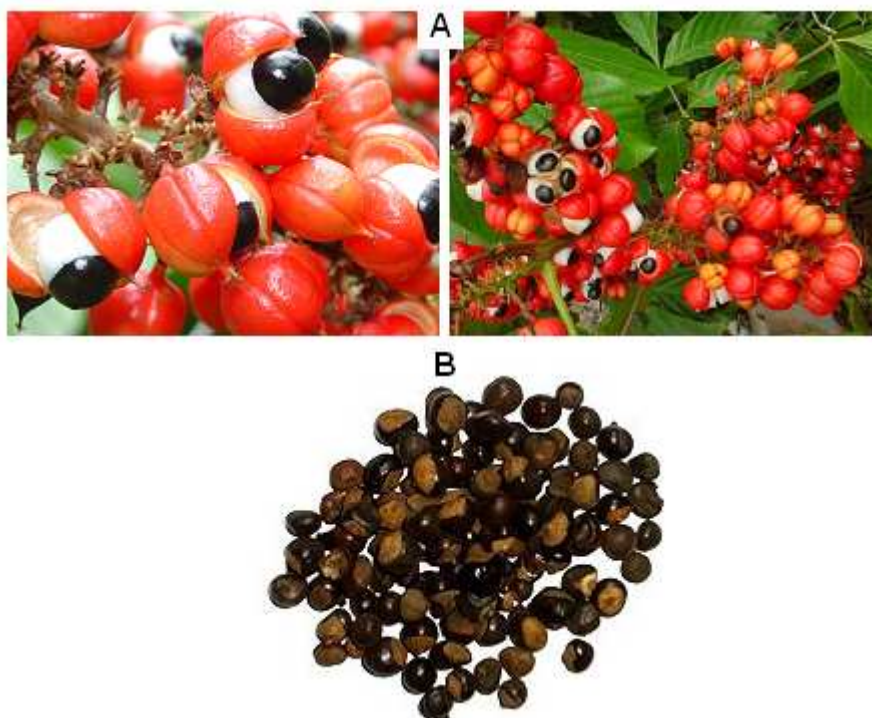


FIGURA 1 - CACHO DE FRUTOS DE GUARANÁ, MOSTRANDO O FRUTO COM SUAS SEMENTES (PARDO-NEGRA) ENTRE A POLPA (BRANCA) (A). SEMENTES ISOLADAS DE GUARANÁ (B)

### 2.1.1 Propriedades químicas e medicinais das sementes do guaraná

O percentual de cafeína presente nas sementes do guaraná varia de 3,2 a 7%, sendo cerca de 6 vezes superior ao encontrado nas sementes do café (PAGLIARUSSI *et al.*, 2002). A cafeína é a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, sendo classificada entre os compostos com bases purínicas metiladas (metilxantinas), estruturalmente identificada como 1,3,7-trimetilxantina (TFOUNI *et al.*, 2007). Foi isolada pela primeira vez das sementes de café em 1819 por Friedlieb Ferdinand Runge (WALDVOGEL, 2003). Este alcalóide aumenta o estado de alerta do indivíduo, melhorando a capacidade cognitiva e a resistência ao cansaço físico (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

As metilxantinas não são os únicos compostos responsáveis pelas propriedades terapêuticas do guaraná. A atividade antioxidante, por exemplo, está associada às elevadas concentrações de compostos fenólicos, como taninos, e a atividade antiinflamatória à presença de saponinas. A presença de teobromina e a teofilina nas sementes do guaraná justificam o efeito broncoprotetor, atividade imunomodulatória e antiinflamatória, além do melhoramento da circulação sanguínea e do retardo no envelhecimento precoce (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Diversas pesquisas sobre as propriedades medicinais do guaraná têm sido realizadas, principalmente nas últimas três décadas. Dentre as atividades verificadas destacam-se a inibição da agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo* (BYDLOWSKI *et al.*, 1988; SUBBIAH; YUNKER, 2008), efeito protetor contra lesão gástrica induzida *in vivo* por etanol e indometacina (CAMPOS *et al.*, 2003), ações antigênotoxicas *in vivo* (FUKUMASU *et al.*, 2006), antibacteriana e antioxidante *in vitro* (BASILE *et al.*, 2005).

Espinola *et al.* (1997) administraram oralmente em camundongos machos Swiss, uma suspensão de 0,3 e 3,0 mg/mL do pó das sementes de guaraná e verificaram que na menor concentração houve um aumento significativo da capacidade física, quando os animais foram submetidos à natação forçada após 100 e 200 dias de tratamento. Os autores também avaliaram os efeitos do guaraná sobre a memória e observaram reversão parcial dos efeitos amnésicos induzidos por escopolamina. Estes autores determinaram apenas a quantidade de taninos (16,0%), cafeína (2,1%), cinzas (1,5%) e umidade (8,8%) das sementes do guaraná.

Fukumasu *et al.* (2008) trataram camundongos diariamente com guaraná em pó (2 mg/g) e no sétimo dia deste tratamento, células de melanoma foram injetadas na calda dos animais, por via intravenosa. Após 21 dias de tratamento, os animais foram sacrificados e avaliados. Os resultados mostraram que os animais tratados com o guaraná apresentaram 68,6% de redução da área tumoral e um aumento de 4,85 vezes do índice apoptótico, quando comparados aos animais do grupo controle sem tratamento. Estes autores associam os resultados observados à catequinas, epicatequinas, ent-epicatequinas, e procianidinas presentes nas sementes do guaraná (YAMAGUTI-SASAKI *et al.*, 2007).



Além dos compostos já citados e das atividades biológicas associadas, as sementes do guaraná possuem outras substâncias que ainda não foram estudadas quanto as suas propriedades medicinais, entre estas, estão os cianolipídios (AVATO *et al.*, 2003; LAGO *et al.*, 2000). Avato *et al.* (2003) encontraram percentuais de cianolipídios e acilgliceróis, de 3% e 28%, respectivamente, em relação ao total de lipídios presentes nas sementes. Os ácidos graxos predominantes dentre os cianolipídios, lipídios derivados do aminoácido leucina, foram cis-11-octadecenóico, cis-11-eicosanóico, cis-13-eicosenóico e ácido oléico. Já entre os acilgliceróis, os ácidos graxos mais abundantes foram ácido oléico, cis-11-octadecenóico, ácido linoléico e cis-11-eicosanóico. Os autores sugerem que esta classe de lipídios esteja presente somente entre as espécies da família Sapindaceae.

Dentre os carboidratos presentes nas sementes do guaraná foram descritos apenas os conteúdos de carboidratos totais (73,6%), fibras (11%), amido (40%) e açúcares redutores (4,4%) (KURI, 2008), não sendo encontrados dados a respeito da caracterização dos polissacarídeos presentes na parede celular. Quanto ao teor de amido, há controvérsias nos percentuais encontrados, sendo descritos valores entre 40 e até 60% (PAGLIARUSSI *et al.*, 2002; BARRETO; RIBEIRO, 2005; KURI, 2008).

## 2.2 SEMENTES

A reprodução sexual das angiospermas e também das gimnospermas resulta na formação da semente que é proveniente do óvulo fertilizado. A semente contém um embrião que consiste num eixo simples (radícula/ hipocótilo) no qual os cotilédones são ligados. Em muitas angiospermas o embrião na semente madura é cercado pelo endosperma (semente de mamona, por exemplo), ou este tecido pode estar mais desenvolvido lateralmente, como nos cereais. O endosperma pode ser ausente nas sementes maduras das angiospermas (ervilhas, feijões), ou até apresentar-se reduzido a poucas camadas da célula (alface, pepino, tomate) (BLACK, 2001).

O tegumento torna-se rígido e mais abundante na porção externa das sementes (testa), formando um complexo de camadas celulares. A dureza é conferida pela presença de fibras lignificadas e a parede celular pode ser impregnada de cutina e fenóis (INGROUILLE, 2002).

Em algumas espécies de sementes ocorre armazenamento de hemiceluloses no interior da parede celular dos tecidos extra-embriônicos de estocagem (endosperma ou perisperma) (NONOGAKI, 2008). Dentre os principais polissacarídeos de reserva de parede estocados pelas sementes estão as mananas, glucomananas, galactomananas, xiloglucanas e galactanas (BUCKERIDGE; DOS SANTOS; TINÉ, 2000). Enzimas responsáveis pela hidrólise destes polissacarídeos liberam unidades monossacarídicas que são transportadas para o embrião, sendo então fosforiladas e convertidas a sacarose, quando há necessidade de suporte no crescimento das mudas. A produção excessiva de sacarose leva a síntese temporária de amido no cotilédone, que é recrutado quando o conteúdo de açúcar está reduzido na célula. O amido, por sua vez, é o carboidrato de reserva mais comumente encontrado no citoplasma de sementes (NONOGAKI, 2008).

Poucos estudos relatam os polissacarídeos existentes na parede celular das sementes da família do guaraná (Sapindaceae). De Oliveira *et al.* (2001) estudaram a estrutura e a composição química das diferentes camadas da casca de sementes de *Magonia pubescens*, pertencente a esta família. Foram encontrados principalmente celulose, polissacarídeos ácidos, compostos fenólicos, taninos e lignina. Estes compostos foram detectados através de métodos de coloração específicos, empregando-se microscopia eletrônica de varredura e histoquímica, além de RMN de sólido.

### 2.3 POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL

Os principais componentes presentes na parede celular vegetal são carboidratos, embora proteínas e compostos fenólicos também possam estar presentes. Existem dois tipos de parede celular, primária e secundária, as quais possuem composições químicas e períodos de surgimento diferentes nas células vegetais. A parede celular primária é uma matriz extracelular flexível que se deposita enquanto as células estão se expandindo. Quando a expansão cessa, uma parede celular secundária é por vezes estabelecida no interior da parede primária, tornando-a mais resistente. Entre as paredes celulares primárias das células vizinhas está a lamela média, que é rica em pectinas (COSGROVE, 2005).

Entre os polissacarídeos da parede celular primária encontram-se a celulose, as hemiceluloses e as pectinas. A celulose, polímero rígido e linear de glucose ligada  $\beta$ - $(1\rightarrow4)$ , compreende aproximadamente 30-60% da parede celular das gimnospermas e aproximadamente 60-65% da parede celular das angiospermas (BeMILLER, 2001b). As hemiceluloses são polissacarídeos fisicamente associados com a celulose, contendo uma cadeia principal de glucose, xilose ou manose, normalmente contendo ramificações com arabinose, xilose, galactose, fucose ou ácido glucurônico (BeMILLER, 2001a; FRY, 2001). Estes polissacarídeos correspondem de 15-35% da parede celular, embora o percentual possa exceder 40% em algumas espécies de angiospermas (BeMILLER, 2001b).

A Figura 2 representa a estrutura da parede celular primária do tipo I. A rede de microfibrilas de celulose interconectadas com as hemiceluloses está embebida numa matriz de polissacarídeos carregados negativamente, denominados pectinas, que correspondem 1 a 4% da parede celular (DAVIES, 2001). As microfibrilas de celulose são sintetizadas por grandes complexos hexaméricos na membrana plasmática, enquanto hemiceluloses e pectinas, que compõem a matriz polissacarídica, são sintetizadas no aparato de Golgi, sendo depositadas na superfície da parede por vesículas. Na maioria das espécies (dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas-não comelinóides) a principal hemicelulose é a xiloglucana, caracterizando assim a parede

celular primária do tipo I, enquanto que arabinoxilanas e outras hemiceluloses são encontradas em menores quantidades. As monocotiledôneas-comelinóides possuem parede celular do tipo II, que apresenta em sua composição celulose interligada principalmente com glucuronoarabinoxilanas ao invés de xiloglucanas (COSGROVE, 2005; CARPITA; GD-IBEAUT, 1993; BeMILLER, 2001a).

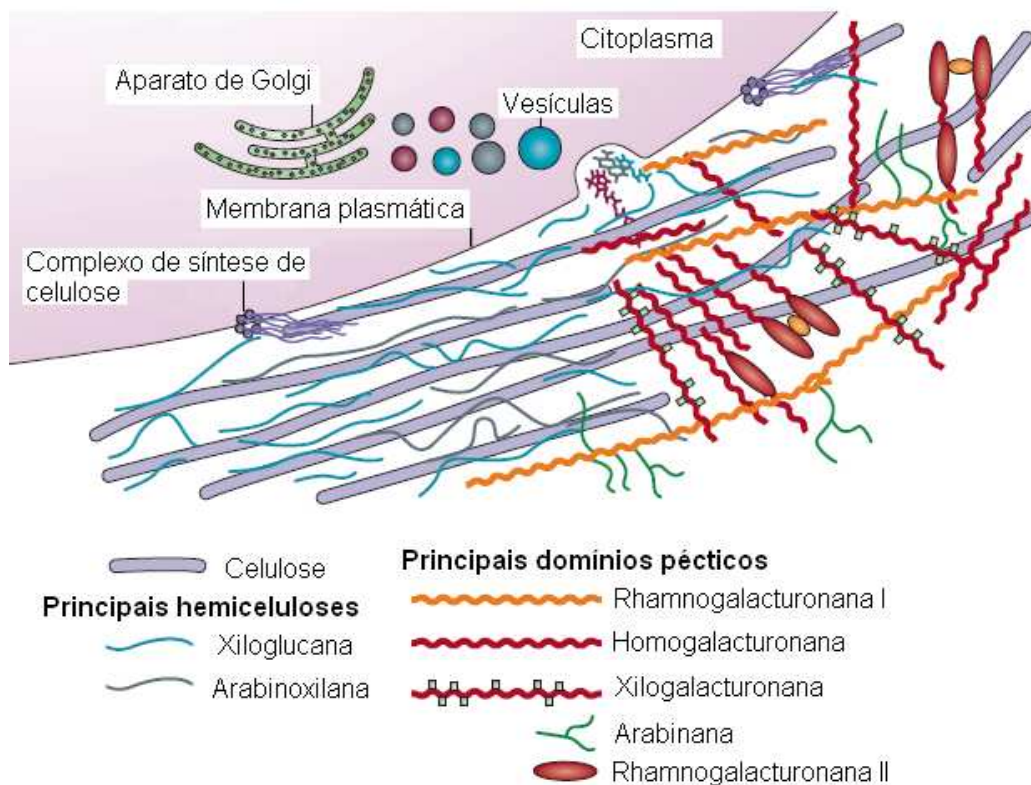


FIGURA 2 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR VEGETAL PRIMÁRIA DO TIPO I

FONTE: Adaptado de Cosgrove (2005)

A parede celular secundária apresenta celulose, hemiceluloses e lignina como componentes majoritários. Neste tipo de parede celular as hemiceluloses formam uma rede juntamente com a celulose e desta forma a lignina se mantém associada através de ligações cruzadas, tornando esta estrutura mais rígida e hidrofóbica. As hemiceluloses presentes na parede celular secundária são as xilanas e as glucomanas. Nas

angiospermas há predomínio de xilanas, enquanto as gimnospermas apresentam principalmente galactoglucomananas (ZHONG; YE, 2009).

### 2.3.1 Pectinas

As pectinas são estruturalmente e funcionalmente os polissacarídeos mais complexos presentes na parede celular vegetal. Desempenham funções relacionadas com crescimento, morfologia, desenvolvimento, adesão, expansão, porosidade, sinalização e respostas de defesa contra patógenos (MOHNEN, 2008). Na indústria de alimentos e cosméticos as pectinas são utilizadas como gelificantes e estabilizantes, além de apresentarem efeitos positivos sobre a saúde humana (WILLATS *et al.*, 2006), incluindo a redução dos níveis de colesterol, glucose sérica, prevenção ao câncer e estimulação da resposta imune. Além destas aplicações, as pectinas vêm sendo utilizadas na produção de biomateriais, filmes, adesivos, plastificantes e sistemas de liberação controlada de fármacos (MOHNEN, 2008).

As pectinas pertencem a uma família de polissacarídeos ácidos, ricos em ácido galacturônico ( $\alpha$ -D-GalpA), incluindo homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas I (RG-I), ramnogalacturonanas II (RG-II), xilogalacturonanas (XGA) e apiogalacturonanas (MOHNEN, 2008).

As homogalacturonanas são constituídas de unidades de  $\alpha$ -D-GalpA (1 $\rightarrow$ 4). Estas unidades podem estar metil-esterificadas em C-6, bem como *O*-acetiladas em *O*-2 ou *O*-3 (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

Nas pectinas a proporção de grupos metil-ésteres presentes no C-6 do ácido galacturônico, usualmente representada pelo grau de esterificação (DE), influenciam na sua utilização comercial. Dependendo do grau esterificação, as pectinas são divididas em dois grupos, pectinas com alto grau de esterificação, com um DE superior a 50%, e pectinas com baixo grau de esterificação, com um DE inferior a 50% (MORRISON, 2001).

A formação do gel em pectinas com alto grau de esterificação ocorre por ligações cruzadas das homogalacturonanas, através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os grupos metoxila, ambos promovidos por pH baixo e alta concentração de açúcar. Em pectinas com baixo grau de esterificação, íons divalentes como o cálcio interagem com grupos carboxílicos livres (C-6) formando um complexo entre duas cadeias (WILLATS *et al.*, 2006). Um alto grau de esterificação é de considerável importância na indústria de alimentos, visto que o processamento de frutas na fabricação de geléias requer baixo pH e altas concentrações de sacarose (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001).

Ramnogalacturonanas do tipo I (RG-I) apresentam em sua composição uma cadeia principal de unidades repetitivas de  $[\rightarrow 4) \alpha\text{-D-GalpA (1}\rightarrow 2) \alpha\text{-L-Rhap (1}\rightarrow ]_n$ . Esta estrutura, quando isolada de sementes, apresenta-se majoritariamente não ramificada, já quando isolada de parede celular, aproximadamente metade das unidades de ramnose estão substituídos. As substituições estão presentes no C-4 da ramnose e geralmente são compostas de  $\alpha\text{-(1}\rightarrow 5)\text{-L-arabinana}$ ,  $\beta\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-D-galactana}$ , e arabinogalactanas, ocorrendo variações no grau de substituição destas cadeias (CAFFALL; MOHNEN, 2009). Outras unidades glicosídicas podem estar presentes, incluindo  $\alpha\text{-L-fucose}$ , ácido  $\beta\text{-D-glucurônico}$ , ácido 4-*O*-metil- $\beta\text{-D-glucurônico}$  e ácidos fenólicos como o ácido ferúlico. As RG-I podem apresentar cadeias laterais, com mais de 20 unidades, ou até mesmo com uma simples unidade glicosídica. (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001).

Nas xilogalacturonanas, apiogalacturonanas e ramnogalacturonanas do tipo II (RG-II) a cadeia principal é composta de ácido galacturônico ligado  $\alpha (1\rightarrow 4)$  e o que as tornam diferentes são seus substituintes. As xilogalacturonanas são substituídas em *O*-3 por  $\beta\text{-D-xilose}$ . Esta unidade pode ligar-se a outra unidade de *D*-xilose através de ligação  $\beta (1\rightarrow 2)$  (CAFFALL; MOHNEN, 2009). As apiogalacturonanas são substituídas em *O*-2 na cadeia principal e estão ligadas a uma unidade ou a um dissacarídeo de apiose,  $[\beta\text{-D-Apif (1}\rightarrow 3) \beta\text{-D-Apif (1}\rightarrow ]$  (O'NEILL; DARVILL; ALBERSHEIM, 2001). As RG-II possuem estruturas altamente complexas. Apresentam como seus substituintes oligossacarídeos contendo 12 tipos diferentes de açúcares, dentre eles os mais raros: apiose, 2-*O*-metil xilose, 2-*O*-metil fucose, ácido

acérico (3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose), Dha (ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico) e Kdo (ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosônico). As cadeias de RG-II formam dímeros através de ligações ésteres entre as unidades de apiose e o elemento Boro (ISHII; MATSUNUGA, 1996).

### 2.3.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são freqüentemente descritas como polímeros de parede celular solúveis em soluções alcalinas. São constituídos de unidades de glucose, xilose ou manose piranosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ligadas, com *O*-4 na posição equatorial. Estas características imprimem numa conformação semelhante a da celulose, o que resulta na tendência a formação de pontes de hidrogênio entre estas duas estruturas (CAFFALL; MOHNEN, 2009).

As xilanas são uma classe de polissacarídeos ligados por unidades de xilose  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), podendo conter ramificações com outros açúcares, sendo denominadas heteroxilanas, ou serem lineares como as homoxilanas. A maioria das heteroxilanas são substituídas em *O*-2 ou *O*-3, geralmente se apresentam como L-arabino-D-xilanas, D-glucurono-D-xilana ou D-glucurono-L-arabino-D-xilanas. Dependendo da fonte vegetal estas estruturas podem representar de 7% a 30% da matéria orgânica (MORRISON, 2001). Algumas unidades de arabinose podem apresentar ferulato esterificado em *O*-5. Dependendo da fonte as unidades de xilose da cadeia principal podem exibir grupamentos acetil em *O*-2 ou *O*-3 (FRY, 2001).

As xiloglucanas são polissacarídeos constituídos de uma cadeia principal de  $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4) ligadas, substituídas em *O*-6 por  $\alpha$ -D-Xylp. As unidades de xilose podem estar substituídas em *O*-2 por  $\beta$ -D-Galp, e estas por sua vez podem ser substituídas por  $\alpha$ -L-Fucp em *O*-2. As xiloglucanas correspondem em média a 25% da parede celular primária das dicotiledôneas (MORRISON, 2001).

O grupo das mananas inclui galactomananas e galactoglucomananas constituídas por uma cadeia principal de  $\beta$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 4), substituída em *O*-6 por  $\alpha$ -

D-Galp, no caso de uma galactomanana. Já para galactoglucomananas a cadeia principal apresenta-se intercalada com  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4) (MORRISON, 2001; CAFFALL; MOHNEN, 2009).

### 2.3 REOLOGIA

A reologia pode ser definida como a ciência da deformação e do escoamento da matéria, ou seja, é o estudo da maneira, segundo a qual os materiais respondem à aplicação de uma determinada tensão ou deformação (TONELLI; MURR e PARK, 2005).

A reologia clássica considera o comportamento de dois sistemas: um sólido elástico e o um líquido viscoso. O sólido elástico é um material com forma definida, que ao ser deformado por uma tensão externa, dentro de certos limites, irá retornar à sua forma original após remoção destas forças. Já o líquido viscoso não apresenta uma forma definida e irá escoar, irreversivelmente, com aplicação de uma força externa (STANLEY; GOFF; SMITH, 1996).

Os fluidos ideais seguem a Lei de Newton e são chamados fluidos newtonianos. Neste caso a tensão de cisalhamento gerada é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento e a resistência que o fluido oferece ao escoamento é caracterizada como a sua viscosidade. Neste caso a tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) é igual à viscosidade ( $\eta$ ) multiplicado pela taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ).

$$\tau(\text{Pa}) = \eta(\text{Pa.s}) \cdot \dot{\gamma} (\text{s}^{-1})$$

Os fluidos não-newtonianos são definidos como aqueles cuja viscosidade depende da taxa de cisalhamento, dentre eles destacam-se os fluidos dilatantes, plásticos e pseudoplásticos, (SCHRAMM, 2006).

Diversas substâncias como emulsões, suspensões ou dispersões de alta importância técnica ou comercial pertencem ao grupo dos fluidos pseudoplásticos.



Estes se caracterizam pela diminuição na viscosidade aparente com o aumento da taxa de cisalhamento. Em repouso, as partículas ou cadeias poliméricas mantêm uma ordem interna irregular, caracterizadas por uma considerável resistência interna ao fluxo, ou seja, uma alta viscosidade. Com o aumento das taxas de cisalhamento a viscosidade diminui devido à mudança de orientação e alinhamento das partículas ou moléculas em direção ao fluxo. Este fato se deve ao rompimento de agregados e entrelaçados moleculares, que por sua vez permitirão um escoamento mais rápido (SCHRAMM, 2006).

Fluidos viscoelásticos não-newtonianos apresentam tanto propriedades de fluidos (viscosas) quanto de sólidos (elásticas). Para avaliar soluções poliméricas é necessário verificar o comportamento reológico em sistemas dinâmicos onde a amostra é submetida a tensões oscilatórias. O caráter de sólido e de líquido é verificado através dos valores de  $G'$  (módulo de armazenamento) e  $G''$  (módulo de perda), respectivamente. Estes módulos são expressos em Pascal (Pa), onde  $G'$  significa que a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste, porém pode ser recuperada posteriormente, e  $G''$  indica que a energia usada para iniciar o fluxo é irreversivelmente perdida, sendo transformada em calor de cisalhamento (SCHRAMM, 2006).

Se uma substância for puramente viscosa seu módulo de armazenamento ( $G'$ ) será igual a zero, e se ela for puramente elástica seu módulo de perda ( $G''$ ) será igual a zero. Porém a maioria das substâncias apresenta o módulo das duas componentes. (SCHRAMM, 2006).

Polissacarídeos normalmente são ótimos espessantes e quando dissolvidos num solvente adequado aumentam a viscosidade da solução. Esta característica depende da concentração do polímero, massa molar, falta de flexibilidade, temperatura, taxa de cisalhamento adotada, bem como peculiares do solvente (RINAUDO, 2005).

Devido à elevada massa molar do amido, a baixa solubilidade em água e também a sua tendência para formação de agregados, algumas propriedades funcionais são de difícil avaliação em solução aquosa (CHAMBERLAIN; RAO, 1999). Por este motivo o comportamento reológico do amido tem sido investigado empregando DMSO como solvente (CHAMBERLAIN; RAO, 1999; DE VASCONCELOS;

PEREIRA; FONSECA, 2001; SHON; LIN; YOO, 2005). A influência de alguns parâmetros como inchamento ou retrogradação são fortemente reduzidos quando o amido é solubilizado em DMSO ou soluções aquosas do mesmo (COOREMAN, RENSBURG; DELCOUR, 1995).

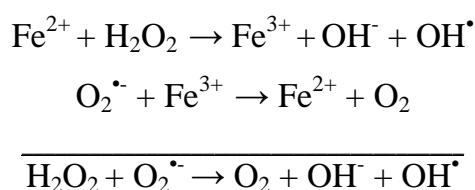
#### 2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE POLISSACARÍDEOS

Espécies reativas de oxigênio são produzidas sob condições celulares normais e desempenham funções importantes, como por exemplo, na sinalização celular, em resposta imunológica, além de terem um papel essencial na morte celular. Porém, quando presentes em altas concentrações, estas espécies reativas de oxigênio podem danificar proteínas, carboidratos e lipídeos celulares ou formarem adutos de DNA que por sua vez podem promover atividade carcinogênica. As espécies reativas de oxigênio mais comuns são peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (KARDOŠOVÁ; MACHOVÁ, 2006; SEIFRIED *et al.*, 2007).

O radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) é considerado uma das espécies mais reativas devido a sua instabilidade química. Este radical está envolvido no processo de iniciação da peroxidação lipídica das membranas biológicas, bem como na oxidação e danos às proteínas, ao DNA nuclear e mitocondrial. Carboidratos e os ácidos ribonucléicos (RNA) também são alvos do radical  $OH^{\bullet}$ . Este radical participa da origem ou agravamento de múltiplas doenças e patologias humanas, dentre as quais estão o câncer, desordens neurológicas, doenças crônico-inflamatórias, aterosclerose, infarto de miocárdio, doenças relacionadas à sobrecarga de ferro, até mesmo na fadiga muscular em exercício atenuante. Além disso, o radical  $OH^{\bullet}$  está envolvido também no processo de envelhecimento natural provocado pelo acúmulo de danos no DNA e nas proteínas celulares (HERMES-LIMA, 2004).

A reação do  $H_2O_2$  com  $Fe^{2+}$ , conhecida como reação de Fenton, gera radical  $OH^{\bullet}$ . Henry J. H. Fenton nunca mencionou a formação do radical  $OH^{\bullet}$ , mas foi ele quem em 1894 descobriu o forte poder oxidante da mistura de  $Fe^{2+} + H_2O_2$ . Em 1934

Haber e Weiss propuseram que o radical  $\text{OH}^\bullet$  era formado através da reação do ânion superóxido com peróxido de hidrogênio na presença de ferro. Nesta reação o ânion superóxido reduz o  $\text{Fe}^{3+}$  e desta forma há geração de  $\text{Fe}^{2+}$  e oxigênio. Para a reação de Fenton continuar o  $\text{Fe}^{3+}$  precisa ser convertido em  $\text{Fe}^{2+}$  por agentes redutores como o ânion superóxido e o ascorbato (HERMES-LIMA, 2004). As equações seguintes exemplificam as reações descritas.



O uso de antioxidantes pode reduzir a formação ou sequestrar os radicais livres gerados na reação de Fenton (QI *et al.*, 2006). A finalidade de um antioxidante em condições fisiológicas é prevenir que o excesso de espécies reativas de oxigênio atinja os alvos onde os danos celulares possam ocorrer. Dentre os antioxidantes existentes nos sistemas biológicos, as enzimas celulares glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase compõem os principais sistemas de defesas contra os radicais livres (DJORDJEVIĆ, 2004). Além disso, algumas vitaminas (E e C), minerais, fibras e compostos fitoquímicos presentes nos alimentos, desempenham importantes funções relacionadas às defesas antioxidantes (BLASA *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante de metabólitos secundários derivados de plantas, tais como compostos fenólicos, glicosinolatos e carotenóides são amplamente descritas (LAKO *et al.*, 2007; MAJHENIČ; ŠKERGET; KNEZ, 2007; VIG *et al.*, 2009), porém nos últimos anos, pesquisas envolvendo polissacarídeos também têm despertado interesse dos pesquisadores (YANG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2008; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2010).

O mecanismo pelo qual os polissacarídeos teriam atividade antioxidante ainda não é bem esclarecido. Alguns autores sugerem que estas macromoléculas podem doar átomos de hidrogênio, e estes ao se combinarem com radicais livres formariam um radical mais estável, interrompendo a reação. Outra possibilidade é que os

polissacarídeos podem se combinar com elementos necessários para a reação radicalar, encerrando a reação (CHEN; ZHANG; XIE, 2005).

Para o  $\text{OH}^\bullet$  existem dois tipos de mecanismos antioxidantes. Um deles suprime a geração do radical, e o outro remove os radicais gerados. No primeiro caso, a atividade antioxidante pode estar associada a complexos formados com íons metálicos, impedindo a reação destes com o peróxido de hidrogênio, que conseqüentemente dariam origem aos radicais  $\text{OH}^\bullet$  pela reação de Fenton (UEDA *et al.*, 1996). Alguns autores acreditam que a atividade antioxidante de polissacarídeos pode estar relacionada com a capacidade destas moléculas quelarem ferro, impedindo assim que a reação de Fenton ocorra (QI *et al.*, 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O pó das sementes de guaraná (*Paullinia cupana*) (nº lote - 8656A8) foi fornecido pela empresa HERBARIUM LABORATÓRIO BOTÂNICO LTDA.

#### 3.2 PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

##### 3.2.1 Deslipidificação e inativação enzimática

O pó do guaraná (450 g) foi deslipidificado em aparelho Soxhlet usando uma mistura de tolueno:etanol (2:1), até a remoção total da porção apolar (~8 dias). Para inativação enzimática a amostra (396,1 g) foi tratada com metanol-água 4:1 (v/v) por 20 minutos sob refluxo.

##### 3.2.2 Extração com DMSO

Após deslipidificação e inativação enzimática do pó de guaraná, o material (373,6 g) foi submetido a duas extrações seqüenciais com DMSO (24 h e 120 h). As extrações foram realizadas utilizando-se um *shaker* com agitação circular (120 rpm). Após cada extração o material foi centrifugado, e os extratos resultantes foram precipitados com três volumes de etanol 96%, permanecendo sob refrigeração por 24 horas. Posteriormente, os polissacarídeos precipitados foram separados por centrifugação (12.500 g, 20 min), e então lavados com etanol 96% (3x) e secos em

estufa a vácuo a temperatura ambiente, gerando as frações GD-I (extração de 24 h) e GD-II (extração de 120 h).

O resíduo das extrações com DMSO foi lavado com água várias vezes para remoção do DMSO, e a porção extraída foi separada, concentrada e precipitada como já descrito para as outras duas frações. A fração resultante deste procedimento foi chamada de GD-III. A nomenclatura das frações tem a letra inicial do guaraná e do solvente (DMSO). Os números romanos indicam a seqüência em que foi extraído.

### 3.2.3 Extrações aquosas

Com o resíduo da extração feita com DMSO foram realizadas duas extrações aquosas seqüenciais a 25 °C, sob agitação mecânica por 4 horas, obtendo-se as frações GW-I e GW-II. Com o resíduo da extração aquosa, outras duas extrações foram realizadas a 90 °C por 4 horas, com a finalidade de se obter frações pécticas, dando origem as frações GHW-I e GHW-II. Os extratos obtidos foram concentrados e adicionados a três volumes de etanol 96%, sendo então mantidos sob refrigeração por 24 horas, seguidos de centrifugação (12.500 g, 20 min). Os precipitados obtidos foram lavados com etanol 96% e secos em estufa a vácuo a temperatura ambiente. Para estas frações a letra “W” indica o solvente empregado (*w*ater) e a letra “H” a condição (*h*ot). Os números romanos indicam a seqüência em que foi extraído.

### 3.2.4 Extrações alcalinas

O resíduo da extração aquosa a quente foi utilizado para obtenção das hemiceluloses A e B, com diferentes concentrações de álcali, na presença de NaBH<sub>4</sub> (PETKOWICZ *et al.*, 1998). Inicialmente o material foi extraído seqüencialmente (2x) com uma solução de NaOH 2M, por 4 horas, em sistema de agitação mecânica. O

mesmo procedimento foi repetido com o resíduo desta extração, porém empregando-se NaOH 4M. Os extratos alcalinos foram neutralizados com ácido acético e o material precipitado nestas condições foi separado por centrifugação (12.500 g, 20 min), lavado com etanol 96% (3x), seco em estufa a vácuo, e denominado de hemicelulose A. Já o sobrenadante resultante deste procedimento foi concentrado, dialisado e então precipitado com etanol 96% (3 volumes). O material precipitado foi separado por centrifugação (12.500 g, 20 min), lavado com etanol 96% (3x), seco em estufa a vácuo, sendo então denominado de hemicelulose B. Para identificação destas frações utilizou-se as letras “GHA” para hemicelulose A e “GHB” para hemicelulose B, seguido dos números 2 ou 4 que indicam a concentração de álcali empregada (2 ou 4M). Desta forma foram obtidas as frações GHA2-I, GHA2-II, GHB2-I, GHB2-II, GHA4-I, GHA4-II, GHB4-I e GHB4-II. O resíduo final (*final residue*) obtido após extrações alcalinas foi então denominado de FRG (~60 g).

A Figura 3 apresenta o fluxograma de extração das sementes do guaraná, descritos nos itens 3.2.1 a 3.2.4, com seus respectivos rendimentos.

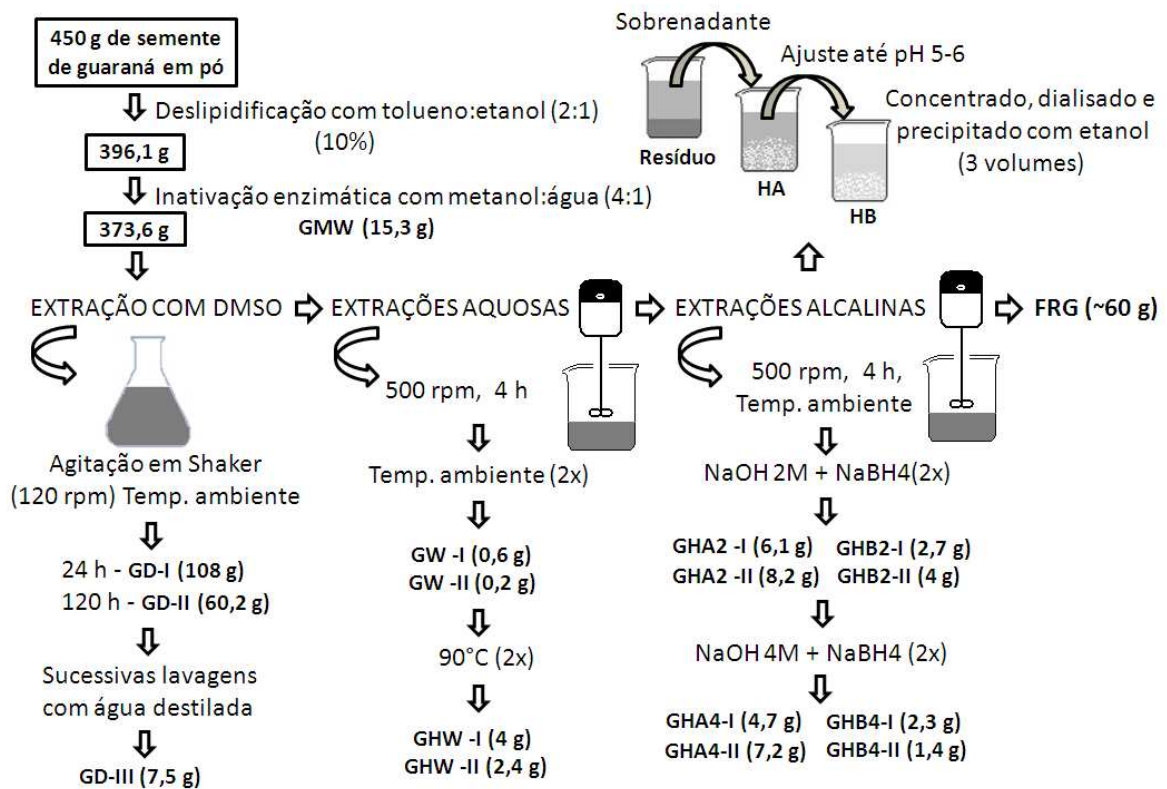


FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DAS SEMENTES DE GUARANÁ

### 3.3 FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos extraídos com água quente e solução alcalina de NaOH 2M foram selecionados para purificação, com a finalidade de se obter frações de pectina e hemicelulose, respectivamente. O fluxograma da Figura 4 apresenta os rendimentos e a estratégia experimental empregada para a purificação das frações GHW-I, GHW-II, GHA2-I e GHA2-II, que serão posteriormente descritas nos itens 3.3.1 até 3.3.2.6.

#### 3.3.1 Fracionamento e purificação das frações extraídas com água quente

##### 3.3.1.1 Remoção do amido

As frações GHW-I (2,62 g/262 mL) e GHW-II (1,9 g/190 mL) foram tratadas com as enzimas amiloglucosidase (0,4 mL) (MEGAZYME) e  $\alpha$ -amilase termoestável (0,2 mL) (SIGMA), para remoção do amido remanescente. A mistura permaneceu sob baixa agitação a 40 °C, pH 4,5, conforme indicação dos fabricantes. A digestão foi controlada pelo teste de lugol, até que este apresentasse resultado negativo. Em seguida a mistura foi submetida à fervura por 15 min, para promover desnaturação das enzimas, sendo posteriormente centrifugada (12.500 g, 10 min), descartando-se o precipitado. O sobrenadante foi dialisado para remoção dos produtos da hidrólise enzimática (24 h), liofilizado e as frações geradas foram denominadas GHW-IET e GHW-IIET, de acordo com o tratamento recebido, “*enzymatic treatment*”.



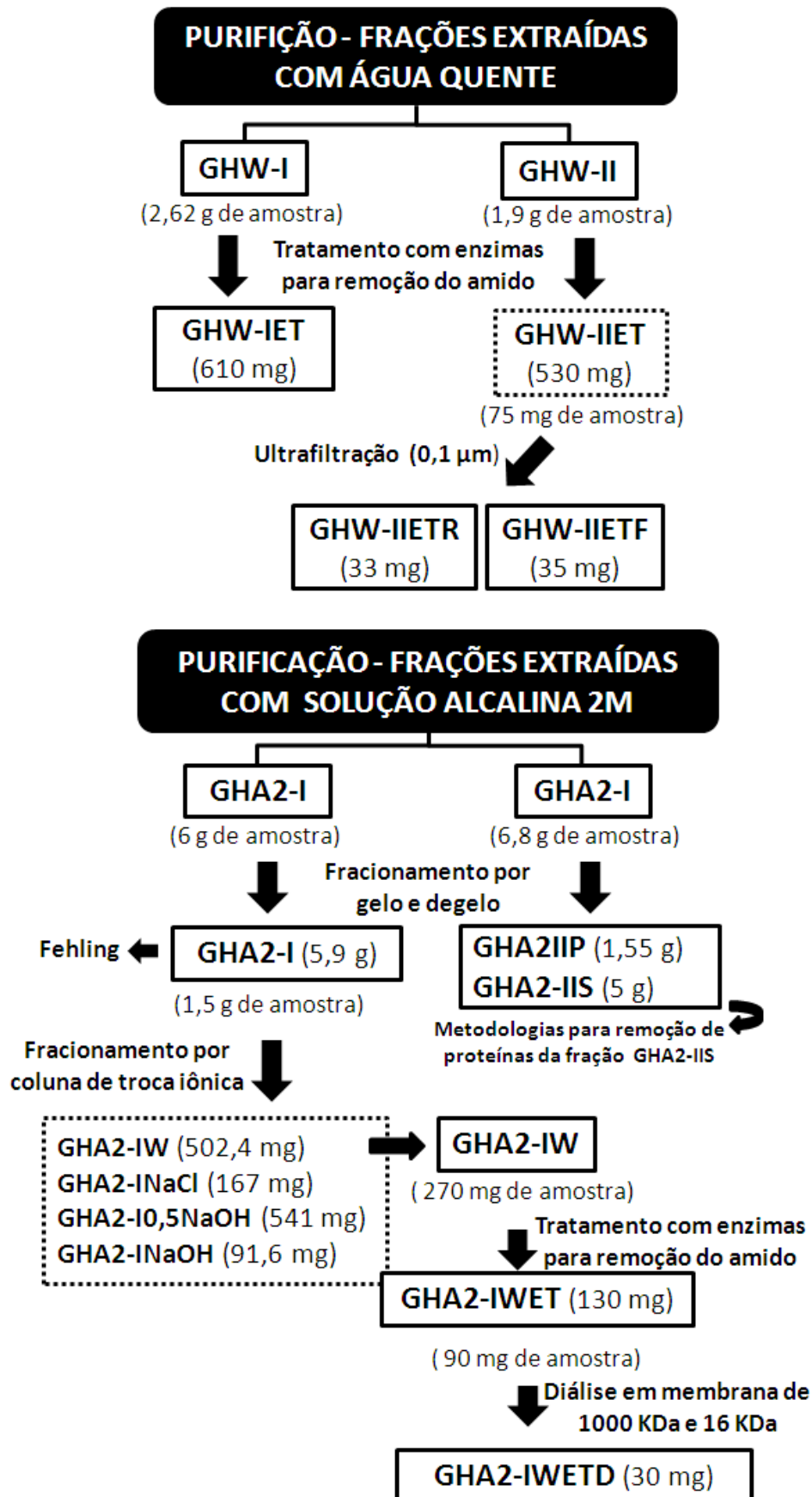


FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

### 3.3.1.2 Ultrafiltração

A fração GHW-IIET (75 mg) foi submetida à ultrafiltração empregando-se uma membrana de 0,1  $\mu\text{m}$  (Millipore®). A membrana foi inserida num aparato de ultrafiltração, acoplado a um cilindro de gás comprimido, e desta forma foram obtidas duas frações, uma retida (GHW-IIETR) e a outra filtrada (GHW-IIETF).

### 3.3.2 Fracionamento e purificação das frações extraídas com solução alcalina de NaOH 2M

#### 3.3.2.1 Fracionamento por congelamento e degelo

As frações polissacarídicas GHA2-I e GHA2-II foram solubilizadas em água destilada e submetida a congelamento. Em seguida o material foi descongelado a temperatura ambiente e a porção insolúvel foi separada por centrifugação (12.500 g por 15 min). O sobrenadante foi novamente congelado e a porção precipitada foi separada por centrifugação. Este procedimento foi repetido até que não se observasse mais a formação de precipitado (GORIN; IACOMINI, 1985).

#### 3.3.2.2 Precipitação com solução de Fehling

A fração GHA2-I (300 mg) foi solubilizada num volume mínimo de solução A de Fehling e adicionada do mesmo volume de solução B de Fehling. A solução A consistia em 173 g de tartarato de sódio e potássio e 125 g de hidróxido de potássio e volume suficiente de água para 500 mL. Já a solução B era composta de 55,74 g de sulfato de cobre pentahidratado em volume de água suficiente para 500 mL (JONES;

STOODLEY, 1965). Após agitação do material por aproximadamente uma hora, este foi mantido sob refrigeração por 12 horas. O precipitado formado foi separado por centrifugação (12.500 g, 15 min), sendo as duas porções, precipitado e sobrenadante, neutralizadas com ácido acético. Posteriormente as frações foram dialisadas contra água corrente (~48 horas), tratadas com resina catiônica fortemente ácida e novamente dialisadas (~24 horas). Estas frações foram concentradas em rotaevaporador, congeladas e liofilizadas.

### 3.3.2.3 Métodos de remoção de proteínas

Três metodologias de precipitação de proteínas foram utilizadas com a finalidade de purificar a fração polissacarídica GHA2-IIS. Empregando-se TCA (ácido tricloroacético) em diferentes concentrações (8, 15, 20 e 25%), tratamento com tripsina e também o método de Sevag (OLIVEIRA; MARQUES; AZEREDO, 1999; WANG; LI; JIANG, 2008).

### 3.3.2.4 Fracionamento por cromatografia de troca iônica

Para o fracionamento por cromatografia de troca iônica foi utilizando um gel de DEAE-Trisacryl<sup>®</sup> Plus M. A fração GHA2-I (1,5 g/200 mL) foi aplicada numa coluna de 30 cm de altura por 5 cm de diâmetro interno. A primeira eluição foi realizada com água destilada e o controle era realizado com o teste fenol-sulfúrico. Assim que o teste apresentou resultado negativo o eluente foi trocado por uma solução de NaCl 2M. Após eluição completa desta fração, a coluna foi lavada com água destilada, para remoção do sal, até que o teste com nitrato de prata apresentasse resultado negativo para cloreto. Após este procedimento o eluente foi trocado para NaOH 0,5M, e posteriormente NaOH 1M.

### 3.3.2.5 Remoção do amido

A fração GHA2-IW foi submetida ao tratamento enzimático para remoção do amido contaminante. Foram utilizados 100  $\mu$ L da enzima amiloglucosidase (MEGAZYME) e 50  $\mu$ L da enzima  $\alpha$ -amilase termoestável (SIGMA), seguindo o mesmo protocolo descrito no item 3.3.1.1. Ao final do procedimento foi obtida a fração GHA2-IWET.

### 3.3.2.6 Diálise em membranas

A fração GHA2-IWET foi selecionada para purificação por diálises em membranas com diferentes limites de exclusão (Spectra/Por<sup>®</sup> Biotech). As membranas de diálise utilizadas foram de 1.000 KDa e 16 KDa. A diálise em membrana de 1.000 KDa ocorreu em sistema fechado com água MiliQ, em sala refrigerada (4 °C) e agitação magnética. Após 24 h o material eluído da membrana de diálise era concentrado, congelado, e um novo solvente (água MiliQ) era adicionado ao sistema. Este procedimento foi realizado até que não fosse mais observada reação positiva para açúcar total no material eluído (~6 dias). Posteriormente, o material total eluído da membrana de 1.000 KDa foi concentrado, dialisado contra água MiliQ em membrana de 16 KDa, e o material retido nesta membrana foi liofilizado e denominado GHA2-IWETD (*dialysis*).

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

#### 3.4.1 Determinação da composição monossacarídica

As frações polissacarídicas (1mg) foram hidrolisadas com 0,5 mL de TFA 3M, 100 °C, por 2 horas. Em seguida o ácido foi evaporado até a secura e ao material resultante adicionado 0,5 mL de água e NaBH<sub>4</sub> (~5 mg, 16 h, sob repouso) para promover a redução dos açúcares. Após esta etapa as amostras foram tratadas com 0,5 mL de ácido acético e em seguida evaporadas até a secura utilizando um Speed vac (Savant Speed Vac® PLUS SC210A). Posteriormente acrescentou-se 1 mL de metanol (2 a 3 x) para promover a remoção do borato de trimetila por evaporação até a secura. As amostras foram submetidas à acetilação com 0,5 mL de anidrido acético, mantidas a 100 °C por 30 min, sendo em seguida evaporadas em Speed vac. Ao produto final foi adicionado 1 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio com posterior agitação em Vórtex. Após separação das fases, os acetatos de alditol foram extraídos da fase clorofórmica, lavados com água destilada (5x) e posteriormente analisados por cromatografia líquido-gasosa (VINOGRADOV; WASSER, 2005).

A hidrólise ácida total do resíduo final (1 mg) foi efetuada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (p/p) em banho de gelo por uma hora, com agitações, seguido de diluição para 8%, permanecendo durante 15 h a 100°C. Após a hidrólise, o ácido sulfúrico foi neutralizado com BaCO<sub>3</sub> e o sal resultante foi removido por filtração (SAEMAN *et al.*, 1954). Após secura os monossacarídeos foram reduzidos e acetilados conforme descrito no parágrafo anterior.

A composição monossacarídica das amostras na forma de acetatos de alditol foi analisada em cromatógrafo gasoso (GLC) THERMO ELETRONIC CORPORATION, modelo Trace GC Ultra, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno) modelo DB-225. As injeções nas colunas foram realizadas com a temperatura inicial de 40 °C (mantida por 1 min), com uma rampa de aquecimento de 40 °C/min até 215 °C, num tempo de corrida 15 min, mantendo-se

isotermicamente até o final da análise. O hélio foi utilizado como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL/min e a detecção feita por FID.

### 3.4.2 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos, índice de refração e ultravioleta (HPSEC-MALLS/RI/UV)

Para avaliar a homogeneidade das frações estas foram solubilizadas em solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 M contendo 200 ppm de  $\text{NaN}_3$  em uma concentração de polissacarídeo de 1 mg/mL. As amostras foram filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,2  $\mu\text{m}$ .

As análises foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 (RI), detector de ultravioleta Pharmacia LKB, Unicord modelo VW 2251 (UV) e detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 canais acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação ultrahidrogel 2000, 500, 250 e 120, em série (WATERS) com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  g/mol respectivamente. O eluente utilizado foi uma solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 M contendo  $\text{NaN}_3$  200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min.

### 3.4.3 Dosagens colorimétricas

→ A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método de fenol – ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando padrão de glucose em concentrações de 20-100  $\mu\text{g/mL}$  para obtenção da curva de calibração. As leituras em espectrofotômetro foram realizadas no comprimento de onda de 490 nm.

→ Os ácidos urônicos foram dosados pelo método do m-hidroxibifenil modificado por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), com as leituras efetuadas em 525 nm, utilizando como padrão ácido galacturônico, em concentrações de 20-100 µg/mL.

→ Para a dosagem de proteína foi empregada a metodologia descrita por Peterson (1977), utilizando uma curva de BSA 10-100 µg/mL, onde a proteína é inicialmente precipitada, solubilizada e posteriormente quantificada em 750 nm.

→ A dosagem dos teores de amilose e amilopectina foi realizada somente para as frações GD-I e GD-II, conforme o método descrito por Chrastil, (1987). As amostras foram solubilizadas em NaOH 1M e aquecidas em banho a 95 °C por 30 min. Posteriormente, 0,1 mL de amostra foi adicionado a 5 mL de TCA 5%, agitando-se os tubos. Em seguida foi adicionado 0,05 mL de solução de I<sub>2</sub>-KI (1,27 g de I<sub>2</sub>/L e 3 g de KI/L) e os tubos foram agitados imediatamente. A curva de calibração continha amilose (10-80%), sendo a diferença completada com amilopectina, ambas com alto grau de pureza (Sigma). As leituras foram efetuadas a 620 nm.

→ O percentual de compostos fenólicos presentes nas hemiceluloses brutas (A e B) foi estimado pela diferença entre os dois métodos de dosagem de proteínas descritos por Hartree (1972) e Peterson (1977) (BOCHICCHIO; REICHER, 2003). Para ambas as dosagens foram utilizadas uma curva de BSA 10-100 µg/mL.

→ Os compostos fenólicos presentes nas frações submetidas ao ensaio de atividade antioxidante (GMW e GHW-IIET) foram dosados conforme o método proposto por Singleton e Esau (1969). Os tubos permaneceram em repouso por uma hora e as leituras foram conduzidas a 765 nm. O ácido gálico foi utilizado como padrão, empregando-se uma curva de 1-100 µg/mL.

→ O teor de açúcar redutor do extrato metanólico das sementes de guaraná (GMW) foi determinado pelo método colorimétrico Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1952).

Todas as dosagens colorimétricas foram realizadas em triplicata e a média dos valores das absorbâncias foi utilizada nos cálculos para determinação dos respectivos percentuais. As absorbâncias foram medidas num espectrofotômetro SP-22 Biospectro.

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

As determinações de RMN foram realizadas num aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400, utilizando temperaturas de 30 ou 70 °C, sendo solubilizadas em D<sub>2</sub>O (óxido de deutério), Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> (dimetilsulfóxido deuterado) ou MeOD (metanol deuterado), dependendo da característica da amostra. Os deslocamentos químicos relativos aos sinais de <sup>13</sup>C foram expressos em  $\delta$  (ppm) utilizando-se padrões internos referentes aos <sup>13</sup>C da acetona ( $\delta$  30,2) no caso de amostras solubilizadas em D<sub>2</sub>O, do Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$  39,4) ou MeOD ( $\delta$  49,15), para as amostras solúveis nestes solventes.

#### 3.4.5 Determinação do grau de esterificação da fração péctica

O grau de esterificação da fração GHW-IIETF foi determinado conforme Vriesmann, (2008), através de espectroscopia de infravermelho (FT-IR - Fourier transform-infrared), num espectrofotômetro BOMEM MB-100 (Hartman & Braun, Canadá). O espectro de FT-IR foi coletado no modo absorbância (4000-400 cm<sup>-1</sup>) e a pastilha foi preparada usando uma proporção de 90:10 (p/p) de KBr:amostra. Calculou-se a razão da área da banda dos grupos carboxílicos metil-esterificados (1749 cm<sup>-1</sup>- COO-R) e à área total dos grupos carboxílicos [soma das áreas de 1749 cm<sup>-1</sup> (COO-R) e 1630 cm<sup>-1</sup> (COO-)]. O grau de esterificação (DE) da amostra foi determinado através de uma curva de calibração, realizada com padrões de pectinas (SIGMA) contendo diferentes graus de esterificação. O experimento foi realizado em duplicata.



### 3.4.6 Carboxi-redução

Para determinar a identidade do ácido urônico os grupos carboxílicos foram reduzidos às unidades glicosídicas correspondentes de 6,6 dideutério através do método de Taylor e Conrad (1972), modificado por Stone e Anderson (1985).

Inicialmente as frações GHW-IIETF e GHA2-IWETD (~20 mg) foram dissolvidas em 0,5 mL de tampão MES 0,2M (ácido 2-(*N*-morfolina)-etanossulfônico), pH 4,75. Conforme o teor de ácido urônico de cada amostra foi adicionado cuidadosamente quantidades suficientes de carbodimida (CMC) [ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida] para reduzir as unidades carboxílicas (423,6 mg de CMC reduz 100 µEq de COOH). O sistema permaneceu sob agitação por duas horas e então foi adicionado tampão TRIS (ácido *N*-tris[hidroximetil]metil-2-aminioetanossulfônico) 2 mol/L (pH 7,0) até ser atingido pH 7,0. O volume de tampão TRIS utilizado para cada amostra foi anotado e somado ao volume inicial de tampão MES utilizado. O volume total foi utilizado no cálculo de molaridade, para determinação da massa necessária de NaBD<sub>4</sub> ou NaBH<sub>4</sub> para concentração final de 2 mol/L. Esta reação perdurou por 16 h, sendo interrompida com adição de ácido acético, em banho de gelo, até que o pH 5 fosse atingido. Após diálise (48 h) em membrana de 1KDa o material foi liofilizado, obtendo-se as frações RGHW-IIETF e RGHA2-IWETD (*reduced*).

### 3.4.7 Metilação

As frações carboxi-reduzidas RGHW-IIETF e RGHA2-IWETD foram metiladas pelo método de Ciucanu e Kerek (1984). Cerca de 5-10 mg de polissacarídeo foram solubilizados em DMSO (0,5 mL), e posteriormente 200 mg de NaOH seco e pulverizado foram adicionados. O sistema foi agitado durante 10 min em aparelho Vortex, adicionando-se em seguida 0,5 mL de iodeto de metila, repetindo-se a agitação por 10 min. O sistema permaneceu sob agitação magnética, *overnight*, e em

seguida a reação foi interrompida pela adição de gelo e ácido acético. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e lavado com água. Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados com ácido fórmico 45% por 15 h (100 °C), sendo posteriormente diluídos, congelados e liofilizados. Após liofilização o material foi ressolubilizado com água, congelado e liofilizado novamente para garantir a eliminação do ácido. A redução dos açúcares foi realizada com NaBD<sub>4</sub>, *overnight*, sendo posteriormente adicionada de 0,5 mL de ácido acético. Após evaporação até *secura* (Speed vac), 3 lavagens com metanol foram realizadas para remover o borato de trimetila por evaporação. O material seco foi acetilado com anidrido acético (0,5 mL), *overnight*, e os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram extraídos com 1 mL de clorofórmio, lavados com água (5x) para remover os demais produtos gerados e analisados por GC-MS.

#### 3.4.8 Análise dos polissacarídeos carboxi-reduzidos/metilados

Após hidrólise, redução e acetilação, as análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS) VARIAN-SATURN 2000, com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), modelo DB-225-MS. A temperatura inicial da injeção foi realizada a 50 °C, mantendo-se por 1 min, com uma rampa de aquecimento de 40°C/min, até 210 °C (acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados) ou 220 °C (acetatos de alditóis), sendo mantida isotermicamente até o final da análise. O hélio 5.0 analítico foi utilizado como gás de arraste, num fluxo de 1,0 mL/min. Os acetatos de alditóis (provenientes dos polissacarídeos carboxi-reduzidos) e acetatos de alditóis parcialmente *O*-metilados (provenientes dos polissacarídeos carboxi-reduzidos e metilados) foram analisados (CG-MS) e identificados pelos seus tempos de retenção e perfis de fragmentação (CARPITA; SHEA, 1989; SASSAKI *et al.*, 2005).

### 3.5 ANÁLISES REOLÓGICAS

As frações GD-I e GD-II foram avaliadas quanto ao comportamento reológico empregando-se solução de DMSO 90% (v/v) como solvente (CHAMBERLAIN; RAO, 1999). Foram preparadas soluções de amido nas concentrações 10, 15, 20 e 25%, p/p, obtidas após agitação mecânica por ~16h na temperatura de 22 °C.

Os testes reológicos foram conduzidos num reômetro Haake RS 1 acoplado a um banho circulante (HAAKE DC5), utilizando o sensor de placas paralelas PP35Ti (35 mm de diâmetro). Todas as análises foram conduzidas a 25 °C, exceto a viscosidade das frações GD-I e GD-II a 20% que também foram analisadas a 50 °C. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

As curvas de viscosidade foram obtidas empregando-se as taxas de cisalhamento contínuas (500 s) no modo CR (taxa de cisalhamento controlada). O sensor foi ajustado para permitir o aumento gradual da taxa de cisalhamento (0,1 a 500 s<sup>-1</sup>).

Para as análises oscilatórias dinâmicas, inicialmente foram realizadas varreduras de tensão nas frequências de 0,1, 1 e 10 Hz, para verificar a faixa viscoelástica linear dos polissacarídeos. Após esta verificação foram feitas análises de varredura de frequência (0,1 a 1,47 ou 3,16 Hz), empregando-se as tensões pré-determinadas.

### 3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A fração GMW, extraída com metanol-água e a fração pécica GHW-IIET, extraída com água quente e purificada com enzimas para remoção do amido, foram escolhidas para realização de testes de atividade antioxidante. Dois métodos com pequenas adaptações foram empregados, um para quantificar a capacidade de

seqüestro do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e outro de radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) (Yang *et al.*, 2006).

O ensaio de atividade seqüestrante de DPPH foi conduzido em tubos cobertos com folha de alumínio contendo 1 mL de amostra (0,1 a 10.000  $\mu\text{g/mL}$ ) e 2 mL de DPPH (0,2 mM em etanol absoluto). Após agitação os tubos permaneceram em repouso por 20 min e em seguida as absorbâncias foram medidas, utilizando um espectrofotômetro (SP-22 Biospectro) no comprimento de onda de 517 nm. O tubo branco era composto de uma mistura contendo água e etanol absoluto (1:2). No branco da amostra, para descontar a coloração da mesma, 1 mL de amostra foi adicionado a 2 mL de etanol absoluto. O valor encontrado foi descontado da absorbância do tubo teste. O tubo controle da reação continha 1 mL de água destilada e 2 mL de solução etanólica de DPPH.

A atividade seqüestrante de radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) foi realizada através da incubação (10 min a 37 °C) dos tubos contendo 0,1 mL de amostra (0,1 a 10 mg/mL), 0,8 mL de tampão de reação, 0,1 mL de ácido ascórbico (1 mM) e 0,1 mL de peróxido de hidrogênio (10 mM). O tampão de reação mencionado anteriormente continha deoxiribose (1,75 mM), sulfato de amônio ferroso (0,1 mM), EDTA (0,1 mM) e tampão fosfato (pH 7,4).

Após incubação foram adicionados 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (1%) e 1 mL de ácido tricloroacético (2,8%), sendo os tubos submetidos a banho fervente (10 min) e posterior resfriamento em banho de gelo. O branco para zerar o equipamento continha todos os reagentes exceto a amostra e o peróxido de hidrogênio, que iniciava a reação, e como substituintes, as mesmas quantidades de água foram adicionadas. O branco da amostra, para descontar a coloração da mesma, era preparado sem adição de peróxido de hidrogênio e em seu lugar 0,1 mL de água eram adicionados. O controle foi preparado adicionando-se todos os reagentes, mas em vez de 0,1 mL de amostra eram adicionados 0,1 mL de água. As leituras das absorbâncias foram realizadas num espectrofotômetro (SP-22 Biospectro), no comprimento de onda de 532 nm.

Os cálculos referentes aos percentuais de atividade antioxidante (seqüestro de radical DPPH e  $\text{OH}^\bullet$ ) estão apresentados na equação a baixo, onde Abs A corresponde

à absorvância da amostra, Abs B é o valor do branco da amostra e Abs C é referente ao controle.

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = \left( 1 - \frac{\text{Abs A} - \text{Abs B}}{\text{Abs C}} \right) \times 100$$

### 3.7 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0, sendo expressas com a média e desvio padrão de três repetições. A avaliação estatística foi executada através de análises de variâncias (ANOVA), fator único ou duplo com repetição, dependendo do tipo de comparação entre os resultados. Os dados foram analisados pelo teste Bonferroni, considerando nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

A Tabela 1 apresenta as frações obtidas com seus respectivos rendimentos, teores de açúcar total e proteína. Os rendimentos variaram de 0,1% a 28,9 %, sendo os maiores rendimentos obtidos para as frações extraídas com DMSO, 28,9 e 16,1%, para as frações GD-I e GD-II, respectivamente. Estas frações também apresentaram os mais altos teores de açúcar total: GD-I, 96,6% e GD-II, 96,3%.

As frações extraídas com água apresentaram rendimentos bem inferiores aos observados para as frações extraídas com DMSO e aquelas extraídas com água quente tiveram rendimentos superiores aos encontrados para as frações extraídas com água a 25 °C. Os teores de açúcar total para estas frações foram elevados, variando de 79,6% a 93,5%.

As frações extraídas sob condições alcalinas apresentaram baixos rendimentos (0,4% a 2,2%) e a maior extração de hemiceluloses foi obtida com NaOH 2M. As frações de hemicelulose A apresentaram rendimentos superiores as hemiceluloses B. O conteúdo de açúcar total das frações hemicelulósicas variou de 26,2% (GHA4-II) a 63,8% (GHB2-I). Todas as frações apresentaram-se ricas em proteína, com valores entre 22,6 a 36,4%, determinado pelo método de Peterson (1977). Este fato demonstra que o tratamento alcalino promoveu o rompimento das ligações cruzadas e covalentes presentes na parede celular e promoveu a liberação de proteínas estruturais (FRY, 2001; MORRISON, 2001).

Todas as hemiceluloses apresentaram coloração marrom escura, dificultando de modo geral as análises colorimétricas, bem como o teste de lugol. Neste caso poderia ter sido utilizado um método para remoção de lignina e fenólicos, na tentativa de amenizar estes efeitos, visto que a parede celular da casca das sementes é impregnada por estes compostos (INGROUILLE, 2002).

TABELA 1 - RENDIMENTO, TEOR DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rendimento <sup>a</sup>	Açúcar Total <sup>b</sup>	Proteína <sup>c</sup>	Proteína <sup>d</sup>
	(%)			
GD-I	28,9	96,6	nd	nd
GD-II	16,1	96,3	nd	nd
GD-III	2,0	78,3	nd	nd
GW-I	0,2	89,0	0,5	0,2
GW-II	0,1	93,5	1,4	1,8
GHW-I	1,0	87,8	1,3	1,7
GHW-II	0,6	79,6	2,5	4,9
GHA2-I	1,6	53,6	30,8	46,1
GHA2-II	2,2	26,5	35,0	73,4
GHB2-I	0,6	63,8	22,6	33,5
GHB2-II	1,0	36,5	27,4	47,5
GHA4-I	1,3	27,8	32,8	47,7
GHA4-II	1,7	26,2	26,1	46,8
GHB4-I	0,6	47,7	36,4	45,2
GHB4-II	0,4	38,6	29,9	61,4
Resíduo final	16,0	nr	nr	nr

<sup>a</sup> Em relação a massa seca de material deslipidificado e inativado.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Dubois *et al.* (1956).

<sup>c</sup> Determinado por método colorimétrico de Peterson (1977).

<sup>d</sup> Determinado por método colorimétrico de Hartree (1972).

<sup>nd</sup> Não detectado.

<sup>nr</sup> Não realizado.

As frações obtidas nas extrações seqüenciais das sementes de guaraná foram analisadas quanto à composição monossacarídica. Os dados obtidos por GLC para as amostras na forma de acetatos de alditol estão mostrados na Tabela 2.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rha <sup>a</sup>	Fuc <sup>a</sup>	Ara <sup>a</sup>	Xyl <sup>a</sup>	Man <sup>a</sup>	Gal <sup>a</sup>	Glc <sup>a</sup>	Ácido Urônico <sup>b</sup>
	(% )							
GD-I	0,6	nd	tr	tr	tr	tr	98,0	0,6
GD-II	1,0	nd	tr	tr	nd	nd	97,3	0,7
GD-III	0,7	nd	0,9	tr	tr	0,6	92,4	4,4
GW-I	0,7	nd	0,9	tr	tr	tr	95,1	2,1
GW-II	0,7	nd	0,9	tr	tr	tr	95,5	1,4
GHW-I	1,0	tr	4,0	tr	tr	1,5	80,6	11,9
GHW-II	1,5	tr	9,7	1,5	tr	2,2	59,7	23,0
GHA2-I	0,6	tr	5,5	65,6	tr	3,4	24,1	tr
GHA2-II	0,6	tr	8,2	56,8	0,6	4,8	28,7	tr
GHB2-I	1,3	1,8	18,7	25,4	2,7	11,5	35,5	2,9
GHB2-II	1,3	1,4	10,9	34,0	2,9	11,1	35,6	2,3
GHA4-I	0,6	0,8	11,4	55,6	3,0	5,6	22,8	tr
GHA4-II	0,8	0,7	13,1	50,1	1,3	5,4	24,9	3,6
GHB4-I	1,0	2,5	12,3	27,9	8,6	10,5	35,4	1,4
GHB4-II	1,6	1,2	20,9	26,3	7,5	9,4	29,4	3,7
Resíduo final <sup>c</sup>	1,5	0,6	23,8	32,6	2,0	7,5	31,8	nr

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

<sup>c</sup> Hidrolisado pelo método de Saeman *et al.* (1954).

<sup>nr</sup> Não realizado.

<sup>nd</sup> Não detectado.

<sup>tr</sup> Traços (< 0,5%).

As frações GD-I, GD-II e GD-III apresentaram glucose como componente majoritário, sugerindo a presença de amido, conforme já era esperado devido à grande quantidade deste polissacarídeo nas sementes do guaraná, de acordo com dados encontrados na literatura (PAGLIARUSSI *et al.*, 2002; BARRETO; RIBEIRO, 2005; KURI, 2008). A presença de amido foi confirmada pelo teste do lugol.



O grupo das frações extraídas com água também apresentou percentuais elevados de glucose e teste de lugol positivo, indicando que as extrações realizadas com DMSO não foram efetivas na remoção total do amido. Após a glucose, o ácido urônico foi o principal componente das frações aquosas, sendo maior nas extrações a 90 °C, indicando que o emprego de alta temperatura favoreceu a extração de polissacarídeos pécnicos. Entre as frações aquosas, a fração GHW-II foi a que apresentou maior conteúdo de ácido urônico (23%), seguido de arabinose (9,7%), galactose (2,2%) e ramnose (1,5%), monossacarídeos estes característicos de pectinas.

Entre as frações hemicelulósicas, as frações de hemicelulose A se destacaram pelos elevados percentuais de xilose: 65% para GHA2-I, 56,8% para GHA2-II, 55,6% para GHA4-I e 50,1% para GHA4-II. O segundo monossacarídeo mais abundante no grupo das hemiceluloses A foi a glucose, que variou entre 22,8 e 28,7%. As hemiceluloses A extraídas com NaOH 2M apresentaram menores conteúdos de arabinose (5,5 e 8,2%) do que as frações extraídas nas condições de NaOH 4M (11,4 e 13,1%). Outros monossacarídeos neutros foram encontrados em menores proporções, tais como a galactose, ramnose, manose e também fucose, este último apenas nas frações obtidas com a maior concentração de álcali.

As hemiceluloses B se diferenciaram das hemiceluloses A pelos maiores teores de glucose, variando entre 29,4 a 35,6%, seguidos de xilose (25,4 a 34%), arabinose (10,9 a 20,9%) e galactose (9,4 a 11,5%). Os conteúdos de fucose para as frações de hemicelulose B foram bem mais elevados do que aqueles encontrados para as frações de hemicelulose A. Outros monossacarídeos como ramnose, manose e ácido urônico também foram encontrados, porém em menores percentuais.

Busato, Vargas-Rechia e Reicher (2001), utilizando folhas de *Hymenaea courbaril*, empregaram o método de separação de hemiceluloses A e B. Os autores verificaram o predomínio de xilanas nas frações de hemicelulose A e xiloglucanas nas frações de hemicelulose B. A composição monossacarídica das hemiceluloses extraídas das sementes de guaraná sugere que as frações de hemicelulose A podem conter principalmente xilanas, enquanto que as frações de hemicelulose B podem conter principalmente arabinoxilanas, arabinogalactanas e xiloglucanas. Porém o elevado percentual de glucose em ambas as hemiceluloses indica contaminação das

frações por amido, confirmado pela redução no teor de glucose após testes isolados com as enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase. No entanto seria necessário realizar extrações exaustivas com DMSO para assegurar que todo amido foi extraído das sementes do guaraná.

A composição do resíduo final insolúvel mostrou a presença de quantidades equivalentes de glucose e xilose (~32%), além de ~24% de arabinose. As condições de extração utilizadas não foram eficientes na solubilização de uma boa parte das hemiceluloses, já que se esperava encontrar um predomínio de glucose no resíduo final, devido às microfibrilas de celulose presentes na parede celular.

As frações GD-I e GD-II, por se tratarem de amido e apresentarem os maiores rendimentos entre as frações obtidas, as frações GHW-I e GHW-II, devido à presença polissacarídeos pécticos, e as frações GHA2-I e GHA2-II, pelo bom rendimento e alto conteúdo de xilose entre as hemiceluloses, foram então selecionadas para uma melhor caracterização.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II

O amido é o principal carboidrato de reserva das plantas superiores, e após a celulose é a substância mais abundante dentre os polissacarídeos. Encontrado nas folhas, sementes, frutas, raízes, rizomas, talos e tubérculos, o amido se acumula na forma de grânulos no citoplasma da célula vegetal (BeMILLER, 2001a).

De acordo com a literatura (PAGLIARUSSI *et al.*, 2002; BARRETO; RIBEIRO, 2005; KURI, 2008), as sementes do guaraná contêm de 40 a 60% de amido. Neste trabalho, o amido das sementes de guaraná foi extraído com DMSO, fornecendo as frações GD-I, GD-II e GD-III, que correspondem a 47% da massa seca das sementes deslipídicas e inativadas, ou 39% em relação à massa inicial utilizada.

É bastante conhecido que o amido consiste de uma mistura de polissacarídeos, um altamente ramificado (amilopectina) e outro linear (amilose). A amilose é uma

glucana linear  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e a amilopectina é uma glucana  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) contendo de 5 a 6% de cadeias laterais  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) (MUKERJEA; MUKERJEA; ROBYT, 2009).

O teor de amilose e amilopectina foi determinado para os amidos GD-I e GD-II, obtidos das sementes de guaraná. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 3. Observa-se que as frações GD-I e GD-II diferem na relação amilose:amilopectina. A fração GD-II apresentou teores de amilose e amilopectina semelhantes aos descritos para amidos comerciais. De acordo com Chung e Liu (2009), a maior parte dos amidos comerciais contém teores de amilose entre 20 e 30% e de amilopectina entre 70 a 80%, mas esta proporção varia de acordo com a fonte vegetal.

Já a fração GD-I apresentou teor de amilose superior, com uma relação amilose:amilopectina de 1,1:1. Os amidos considerados de alto teor de amilose possuem relações amilose:amilopectina superiores a 1:1 (MUKERJEA; MUKERJEA; ROBYT, 2009). Desta forma o amido isolado na fração GD-I seria classificado como um amido com alto teor de amilose.

O teor de amilose de um amido está entre as características estruturais que podem estar relacionadas a eventos associados com a gelatinização e retrogradação, tais como inchamento do grânulo, lixiviação de amilose e/ou amilopectina, perda da estrutura radial (birrefringência), supramolecular (cristalinidade), molecular e recristalização (DENARDIN; SILVA, 2009).

Devido à maior importância da amilopectina na cristalinidade do grânulo de amido, a presença da amilose pode reduzir o ponto de fusão das regiões cristalinas e a energia necessária para o início da gelatinização, uma vez que mais energia é necessária para iniciar a fusão na ausência de regiões amorfas ricas em amilose (DENARDIN; SILVA, 2009). Portanto os diferentes teores de amilose e amilopectina das frações GD-I e GD-II podem refletir em suas propriedades físico-químicas e reológicas, como por exemplo, a capacidade de formação de gel e viscosidade.

TABELA 3 - TEORES DE AMILOSE E AMILOPECTINA DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

<b>Fração</b>	<b>Amilopectina<sup>a</sup></b>	<b>Amilose<sup>a</sup></b>
GD-I	46,6%	51,4%
GD-II	64,3%	33,0%

<sup>a</sup> Determinado por método colorimétrico de Chrastil (1987).

#### 4.2.2 Análise da homogeneidade por HPSEC das frações GD-I e GD-II

As frações de amido, extraídas com DMSO, foram avaliadas quanto à homogeneidade por HPSEC. No sistema utilizado as colunas de gel permeação estão acopladas em série a detectores de índice de refração (RI), que oferece dados proporcionais à concentração, espalhamento de luz laser multiângulos (MALLS), que detecta massa molar e também detector de ultravioleta (UV), que em 280 nm detecta a presença de proteínas ou compostos fenólicos.

A Figura 5 (A e B) apresenta os perfis de eluição das frações de amido GD-I e GD-II obtidos por HPSEC, onde o traço azul representa o detector de índice de refração (RI) e o traço vermelho o detector de espalhamento de luz no ângulo de 90° (LS). O detector de UV não apresentou resposta para as amostras analisadas e por esta razão não foi mostrado.

Dois picos principais são observados no detector de índice de refração (RI) para a fração GD-I (Figura 5A). Um pico bastante intenso aparece próximo a 45 min, coincidindo parcialmente a detecção do espalhamento de luz (LS), indicando a elevada massa do polissacarídeo. Em 48 min observa-se sobreposição de outro pico, provavelmente pelo fato do amido ser constituído de dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, com massas molares diferentes, caracterizando-se como uma amostra heterogênea e polidispersa.

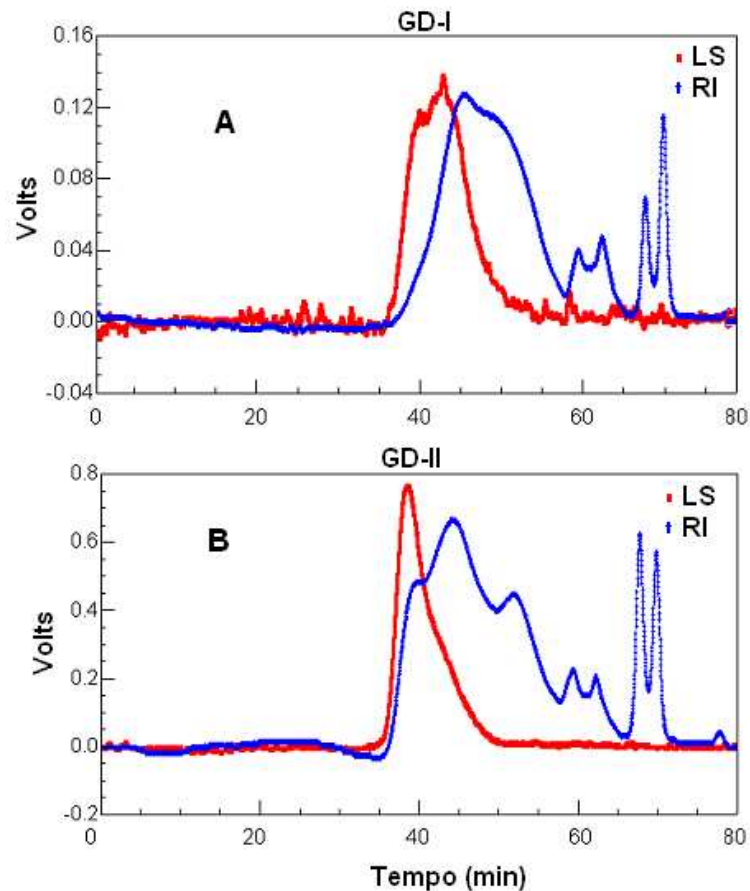


FIGURA 5 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC PARA AS FRAÇÕES GD-I (A) E GD-II (B), OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (LS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI)

Para a fração GD-II (Figura 5B) também se observa uma distribuição de massas multimodal. Em torno de 40 min observa-se um pico que é detectado simultaneamente pelo índice de refração (RI) e espalhamento de luz (LS), indicando que se trata de uma molécula de alta massa molar. Também foi possível identificar por RI um pico em 44 min, sendo este de maior intensidade, e outro pico em 52 min, mostrando desta forma maior polidispersão existente na mesma molécula.

#### 4.2.3 Análises por espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C das frações GD-I e GD-II

A Figura 6 (A e B) apresenta o espectro de RMN-<sup>13</sup>C (DEPT) obtido para a fração GD-I e GD-II. Foi possível identificar os sinais tanto da amilopectina quanto da amilose.

Além do fato de haver  $\alpha$ -D-Glcp (1→4) ligada com substituições no C-6, na estrutura ramificada da amilopectina existe um maior número de terminais não redutores de  $\alpha$ -D-Glcp, e segundo Falk e Stanek (1997) é exatamente esta característica que diferencia seu espectro de RMN-<sup>13</sup>C do espectro da amilose.

A cadeia da amilose composta por  $\alpha$ -D-glucose (1→4) ligada da fração GD-I está evidenciada na Figura 6A pelo sinal em  $\delta$  100,7 (C-1) e em  $\delta$  79,4 (C-4). Demais sinais,  $\delta$  72,2, 72,5 e 73,9 correspondem aos outros carbonos (C-5, C-2 e C-3), respectivamente e os sinais menos intensos em  $\delta$  70,7 (C-4) e 73,0 (C-2) referem-se aos terminais não redutores de glucose da amilopectina. Os sinais de baixa intensidade em  $\delta$  101,1 (C-1), 79,6 e 79,9 (C-4) são indicativos das unidades de  $\alpha$ -D-Glcp (1→4) ligadas e substituídas em O-6 da amilopectina. Os sinais em  $\delta$  61,3 e  $\delta$  61,7, invertidos no experimento de DEPT, caracterizam o C-6 livre das unidades de  $\alpha$ -D-Glcp (1→4) ligada e dos terminais não redutores de glucose, respectivamente (FALK; STANEK, 1997).

A Figura 6B mostra o espectro de RMN-<sup>13</sup>C-DEPT da fração GD-II. Nota-se que na região anomérica aparecem sinais indicativos do C-1 das unidades de Glcp 4,6-di-O-substituídas da amilopectina ( $\delta$  100,4 e  $\delta$  100,2), além de extremidades não redutoras ( $\delta$  100,6). Também se observa com maior intensidade ( $\delta$  100,0) unidades de  $\alpha$ -D-Glcp (1→4) ligadas da amilose. Sinais em baixa intensidade estão presentes para a glucose substituída (1→4,6) da amilopectina: 71,8 (C-5), 79,5 e 79,3 (C-4), assim como em  $\delta$  70,3 (C-4), 72,6 (C-2) e 73,4 (C-3/C-5) aparecem os sinais referentes aos terminais não redutores. Os sinais mais intensos em  $\delta$  78,9 (C-4), 73,2 (C-3), 72 (C-2) e 71,6 (C-5) podem ser atribuídos aos carbonos da amilose. Os sinais invertidos no experimento de DEPT referem-se ao C-6 livres em  $\delta$  60,6 da amilose e em  $\delta$  61,1 do terminal não redutor da amilopectina.

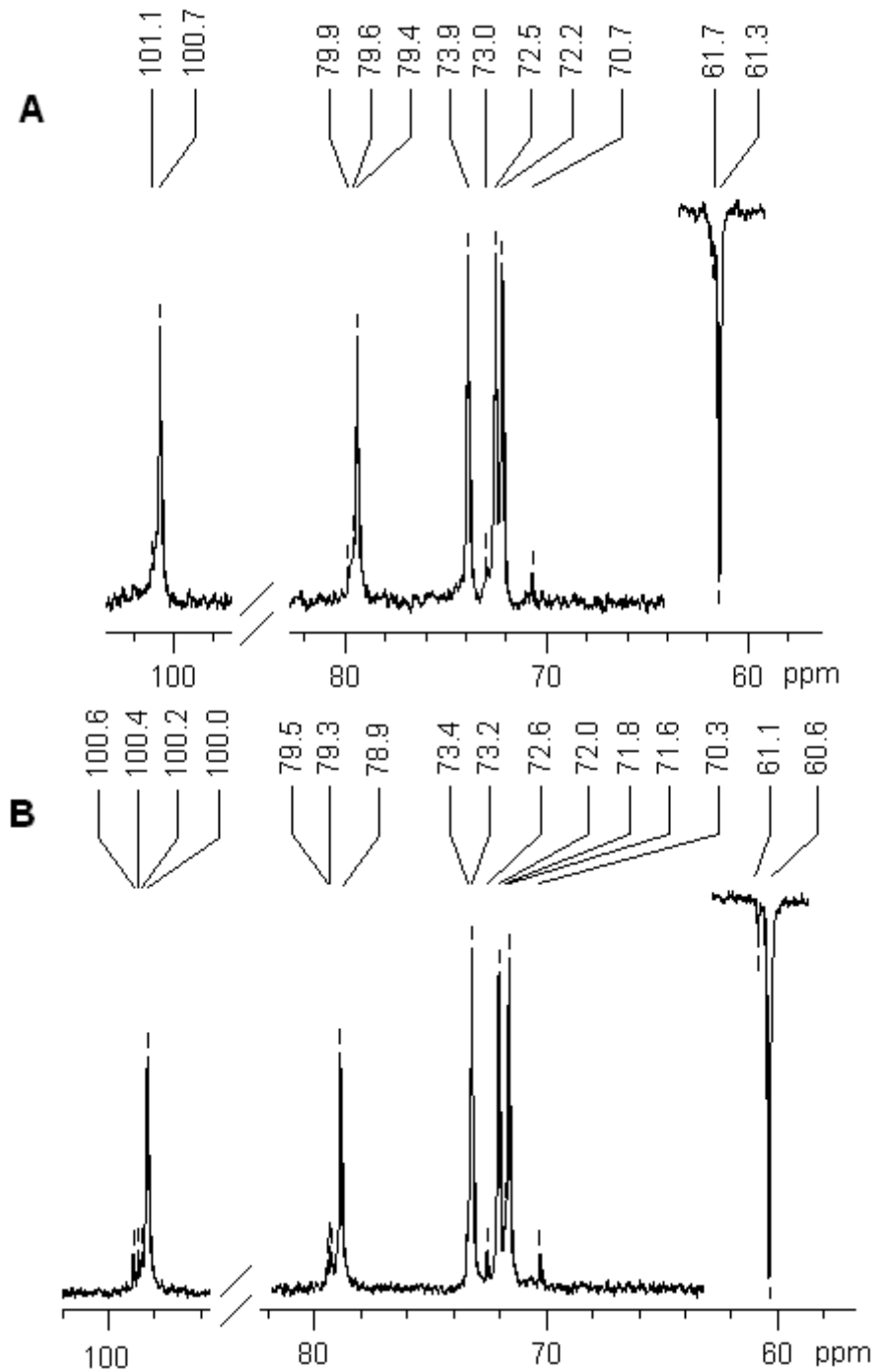


FIGURA 6 - ESPECTROS DE RMN-<sup>13</sup>C-DEPT (Me<sub>2</sub>SO-*d*<sub>6</sub>, 70 °C) DAS FRAÇÕES GD-I (A) E GD-II (B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

As atribuições dos sinais de RMN foram baseadas em um estudo completo realizado por Falk e Stanek, (1997) sobre a estrutura da amilose e da amilopectina. Os autores utilizaram RMN bidimensional com correlações homo e heteronucleares (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H e <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C).

#### 4.2.4 Aspectos reológicos

Inicialmente, as frações de amido (GD-I e GD-II) extraídas das sementes de guaraná com DMSO foram solubilizadas em água até fervura (30 min) e resfriadas a temperatura ambiente. Entretanto, observou-se que o método não foi efetivo devido à formação de aglomerados e materiais insolúveis.

Além de suas aplicações na indústria de alimento, o amido e seus derivados podem ser utilizados em formulações de produtos para adesivos, detergentes, cerâmicas, polimentos, explosivos, revestimentos de papel, indústria têxtil e em operações para recuperação de óleos (KAPOOR; BHATTACHARYA, 2001). Desta forma, as frações GD-I e GD-II, foram solubilizadas em DMSO e avaliadas quanto ao comportamento reológico.

O comportamento viscoelástico das frações GD-I e GD-II foi avaliado por análises oscilatórias dinâmicas. A finalidade deste experimento é obter informações a respeito do caráter sólido da amostra, através do seu módulo de armazenamento ( $G'$ ) e do caráter líquido, através do módulo de perda ( $G''$ ) (SCHRAMM, 2006).

As varreduras de frequência da amostra GD-I nas concentrações 10, 15, 20 e 25% (p/p) estão demonstradas na Figura 7. Em todas as concentrações testadas os valores de  $G''$  foram superiores aos de  $G'$ . Para a concentração de 25% (p/p) os valores de  $G'$  e  $G''$  se cruzaram em frequências mais baixas, mas com o aumento da frequência o módulo  $G''$  tornou-se superior ao módulo  $G'$ . Este comportamento indica que a fração GD-I em DMSO possui um comportamento mais viscoso que elástico nas condições analisadas. Também foi possível verificar o aumento da concentração da amostra promoveu um aumento de ambos os módulos, ( $G'$ ) e ( $G''$ ).



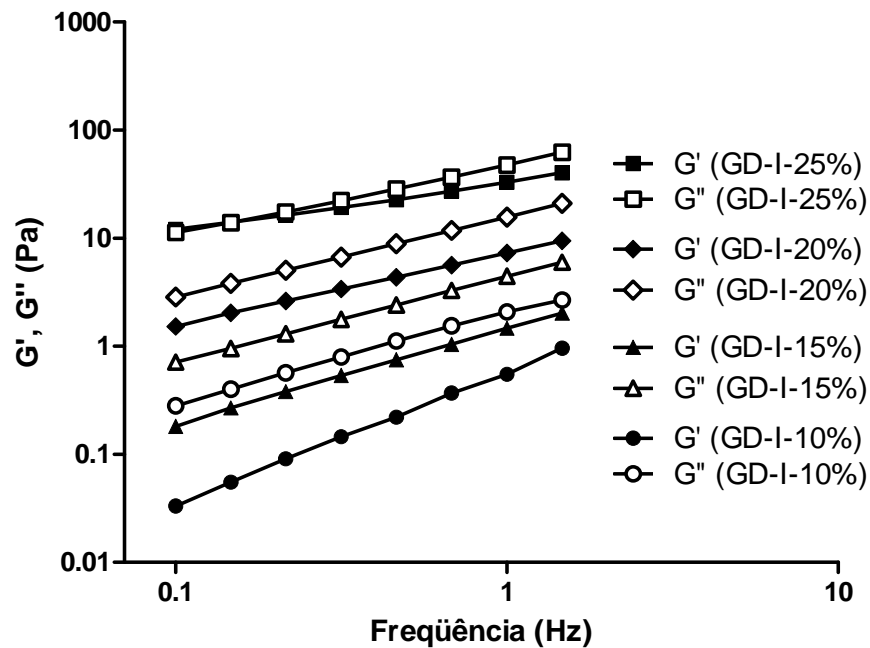


FIGURA 7 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA A 25 °C DA FRAÇÃO GD-I, OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, UTILIZANDO DMSO COMO SOLVENTE, NAS TENSÕES DE 0,1 Pa (GD-I NAS CONCENTRAÇÕES 10, 15 E 20%, p/p) E 0,8 Pa (GD-I NA CONCENTRAÇÃO 25%, p/p)

A Figura 8 apresenta as varreduras de frequência para a amostra GD-II em diferentes concentrações (10, 15, 20 e 25%, p/p). Para as concentrações maiores que 10% (p/p), os valores de  $G'$  mostram-se superiores aos de  $G''$ , porém, com o aumento da frequência,  $G''$  atinge valores superiores aos de  $G'$ . Os resultados indicam que, nas condições utilizadas, GD-II comportou-se como um gel fraco quando em concentrações superiores a 10%.

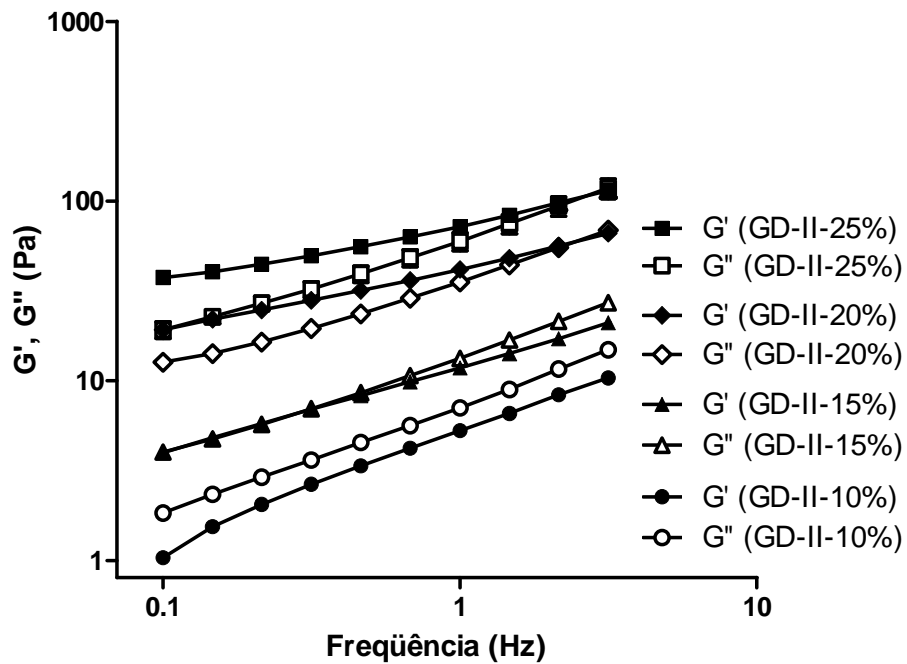


FIGURA 8 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA DA FRAÇÃO GD-II A 25 °C, OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, UTILIZANDO DMSO COMO SOLVENTE, NAS TENSÕES DE 0,1 Pa (GD-II NA CONCENTRAÇÃO 10%, p/p) E 3 Pa (GD-II NAS CONCENTRAÇÕES 15, 20 E 25%, p/p)

Resultados semelhantes foram obtidos por Shon, Lin e Yoo (2005) para amostras de amido de arroz (7, 8, 9 e 10%, p/p) solubilizados em solução de DMSO 90%. Quando avaliadas quanto ao comportamento viscoelástico (0,1 a 10 Hz), as amostras de amido de arroz apresentaram aumento dos valores de  $G'$  e  $G''$  com o aumento da frequência. Os valores de  $G'$  foram maiores que os valores de  $G''$  em todas as concentrações testadas, porém com o aumento da frequência, houve inversão deste comportamento (*crossover*). As frequências em que ocorreram *crossover* no amido de arroz foram 2,16 Hz (7%, p/p), 1,8 Hz (8%, p/p), 6,47 Hz (9%, p/p) e 7,2 Hz (10%, p/p). Em comparação com os dados de Shon, Lin e Yoo (2005), a fração GD-II apresentou inversão de comportamento viscoelástico (*crossover*) na frequência de 0,68 Hz (15%, p/p) e 3,16 Hz (20 e 25%, p/p).

Em frequências superiores a 3,16 Hz (dado não mostrado) os valores de  $G'$  e  $G''$  mostraram-se pouco confiáveis, apresentando grande variação.

A Figura 9 apresenta apenas o módulo de armazenamento ( $G'$ ) para as duas frações, GD-I e GD-II, a fim de comparar o caráter sólido de ambas. Nota-se que em todas as concentrações testadas o valor de  $G'$  da fração GD-II é superior ao da fração GD-I. Este comportamento é possivelmente influenciado pela diferença dos teores de amilose e amilopectina na composição destas frações, sendo que a fração GD-II apresentou 64,3% de amilopectina, enquanto a fração GD-I apontou 46,6%.

Kapoor e Bhattacharya (2001) ao avaliarem três composições de amido de milho em DMSO 90% (v/v), também verificaram maiores valores de  $G'$  para os amidos com maiores teores de amilopectina. Este fato pode ser justificado pela formação de ligações cruzadas entre as cadeias de amilopectina, favorecida devido ao uso do DMSO. Esta informação pode ser útil tanto para prever as propriedades de fluxo de processos, onde o amido em solventes orgânicos é empregado, bem como para propor novas aplicações.

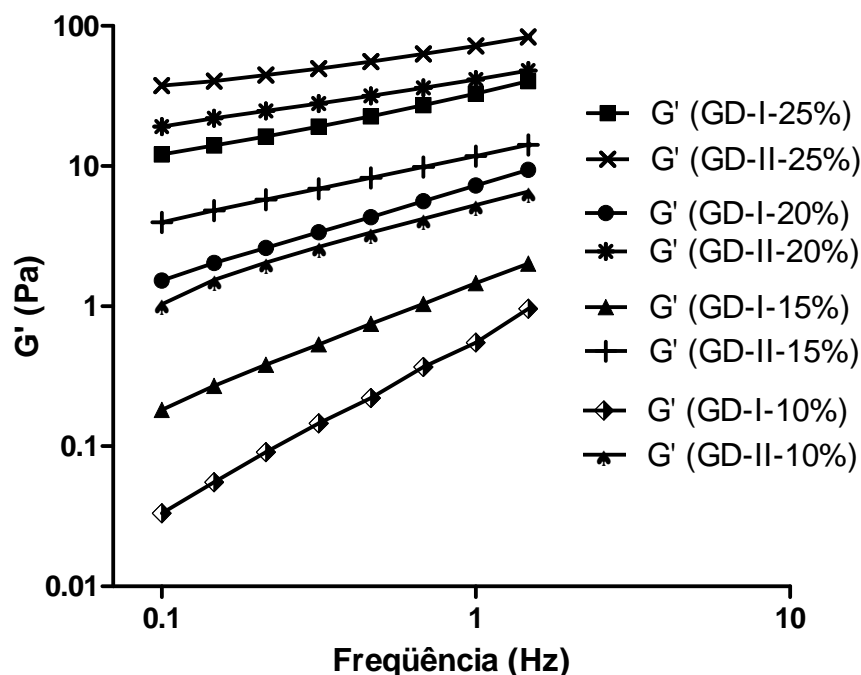


FIGURA 9 - VARREDURAS DE FREQUÊNCIA A 25 °C, MOSTRANDO APENAS O MÓDULO  $G'$  DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, NAS CONCENTRAÇÕES DE 10, 15, 20 E 25% (p/p)

A Figura 10 (A e B) mostra as curvas de viscosidade (25 °C) obtidas para a fração GD-I e GD-II nas concentrações de 10, 15, 20 e 25% (p/p). Em todas as concentrações de GD-I e GD-II observam-se reduções na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, caracterizando um comportamento pseudoplástico (SCHRAMM, 2006) nas condições de análise.

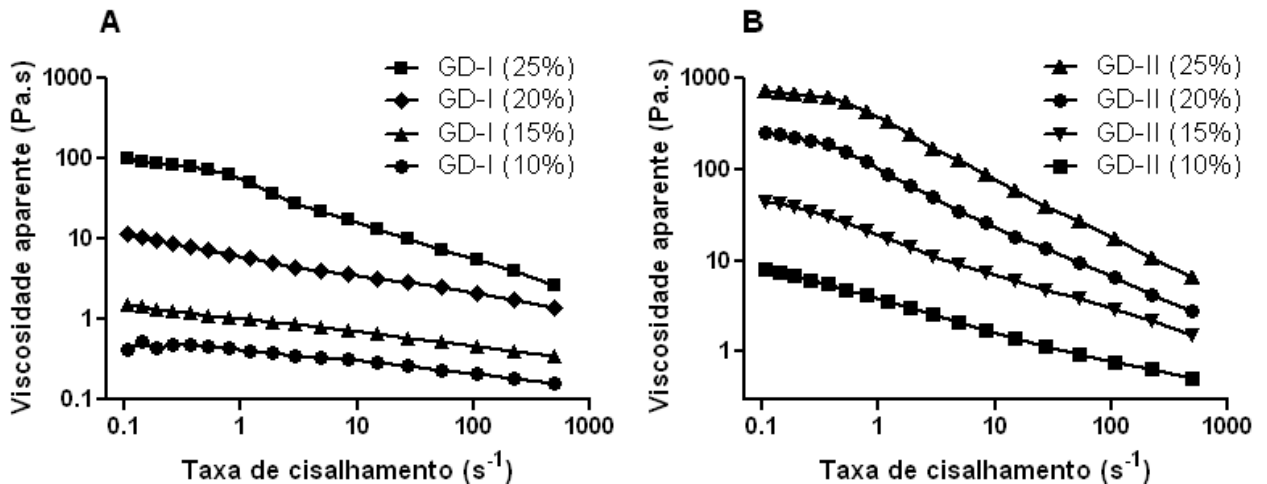


FIGURA 10 - INFLUÊNCIA DA TAXA DE CISALHAMENTO NA VISCOSIDADE (25 °C) DAS FRAÇÕES GD-I (A) E GD-II (B), OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, A 10, 15, 20 E 25% (p/p), UTILIZANDO DMSO COMO SOLVENTE

Segundo Chamberlain e Rao (1999) em altas taxa de cisalhamento, a taxa de formação de emaranhados moleculares é excedida, rompendo-se as redes poliméricas, e conseqüentemente a viscosidade da solução é reduzida, o que caracteriza um comportamento pseudoplástico.

Solorza-Feria *et al.* (2002) também observaram um comportamento pseudoplástico para o amido de semente de *Okenia hypogaea* (3 e 7% p/v), quando avaliaram a viscosidade do polissacarídeo em DMSO. Outros autores (SHON; LIN e YOO, 2005) ao avaliarem o amido de arroz em solução de DMSO verificaram um comportamento pseudoplástico mais pronunciado em altas concentrações (9 e 10% p/v) do que o observado para concentrações menores (7 e 8% p/v).

A viscosidade das soluções aumentou com o aumento da concentração de polissacarídeo, sendo notável a diferença entre as concentrações de 20 e 25% (p/p) na fração GD-I (Figura 10A), onde há diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de cisalhamento 0,1 a 8,4  $s^{-1}$ . Para a fração GD-II (Figura 10B) há diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações 15 e 20% p/p (0,1 a 1,18  $s^{-1}$ ) e entre a concentração de 20 e 25% p/p (0,1 a 8,4  $s^{-1}$ ).

A Tabela 4 apresenta as médias das viscosidades aparente, juntamente com os desvios padrão, das frações GD-I e GD-II, em diferentes concentrações, nas taxas de cisalhamento de 0,18 e 1,18  $s^{-1}$ .

TABELA 4 - VISCOSIDADE APARENTE DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, NAS TAXAS DE CISALHAMENTO 0,18 E 1,18  $s^{-1}$

Concentração (%)	Taxa de cisalhamento 0,18 $s^{-1}$		Taxa de cisalhamento 1,18 $s^{-1}$	
	Viscosidade (Pa.s) <sup>a</sup>		Viscosidade (Pa.s) <sup>b</sup>	
	GD-I	GD-II	GD-I	GD-II
10	0,43±0,08	6,82±0,90	0,40±0,04	3,61±0,23
15	1,35±0,10	39,1±15,40	0,99±0,08	17,80±5,17
20	9,77±0,83*	226,50±46,91*	5,67±0,40*	87,83±14,64*
25	87,81±15,50*	666,85±34,70*	49,62±6,94*	343,70±29,47*

<sup>a</sup> Média e desvio padrão das viscosidades de GD-I e GD-II na taxa de cisalhamento 0,18  $s^{-1}$ .

<sup>b</sup> Média e desvio padrão das viscosidades de GD-I e GD-II na taxa de cisalhamento 1,18  $s^{-1}$ .

\* Na concentração e taxa de cisalhamento analisadas há diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as viscosidades das frações GD-I e GD-II.

Comparando-se as mesmas concentrações das frações GD-I e GD-II (10, 15, 20 e 25%, p/p), tanto na taxa de cisalhamento de 0,18  $s^{-1}$  quanto 1,18  $s^{-1}$ , há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) nas concentrações de 20 e 25%. Isto indica que há uma superioridade de GD-II quanto aos aspectos que influenciam na viscosidade. De acordo Lefebvre e Doublier (2005), o principal fator que afeta a viscosidade é a massa molar. Assim a maior viscosidade observada para GD-II poderia ser atribuída ao maior

conteúdo de amilopectina nesta fração quando comparado a GD-I. A amilopectina apresenta massa molar superior a da amilose (LOFTY, 2009; CHUNG; LIU, 2009; CHEN *et al.*, 2009).

Solorza-Feria *et al.* (2002) compararam seus resultados para o amido de semente de *Okenia hypogaea* com amidos de batata e milho em solução aquosa (9:1) de DMSO, cuja viscosidade também diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento. O amido de batata (80% de amilopectina) apresentou a maior viscosidade aparente, seguido do amido de semente de *Okenia hypogaea* (74% de amilopectina) e milho (70% de amilopectina).

Kapoor e Bhattacharya (2001) investigaram a influência da taxa de cisalhamento na viscosidade de três composições de amido de milho, com diferentes teores de amilose e amilopectina, nas concentrações 2, 4, 6, 8% p/v. Em todas as concentrações avaliadas, empregando-se DMSO 90% como solvente, os autores verificaram que a viscosidade aparente aumentou com o aumento do percentual de amilopectina (99% > 75% > 30%). Estes dados demonstram que o teor de amilopectina aumenta a viscosidade do amido e segundo os autores este fato se deve a maior tendência de formação de redes poliméricas.

A influência da temperatura sobre viscosidade das frações GD-I e GD-II foi avaliada pela comparação das curvas de fluxo a 25 °C e 50 °C, na concentração de 20% (Figura 11). Conforme esperado, observa-se uma redução nos valores de viscosidade para as amostras analisadas a 50 °C.

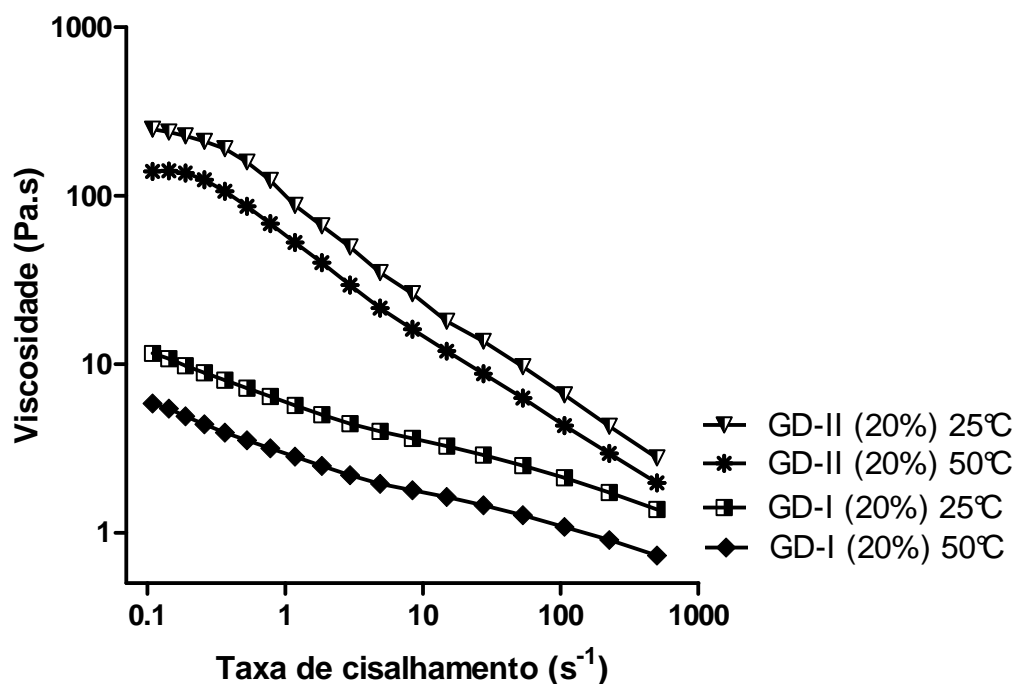


FIGURA 11 - CURVAS DE VISCOSIDADE (25 E 50°C) DAS FRAÇÕES GD-I E GD-II, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, A 20% (p/p), UTILIZANDO DMSO COMO SOLVENTE

#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES GHW-I E GHW-II

As frações extraídas com água quente, GHW-I e GHW-II, apresentaram rendimentos de ~1%, altos teores de açúcar total, conteúdos elevados de glucose e ácido urônico (12 e 23%, respectivamente). A composição destas frações indica a presença de pectinas, porém ambas as frações apresentaram-se contaminadas por amido, confirmado após teste com lugol, o que justifica o percentual de glucose.

Assim, com a intenção de isolar polissacarídeos pécnicos, as frações GHW-I e GHW-II foram submetidas a tratamento com  $\alpha$ -amilase e amilogucosidase a fim de remover o amido contaminante. Após a remoção do amido observou-se uma perda em massa de aproximadamente 76,7% para GHW-IET e 71,9% para GHW-IIET, em relação às frações polissacarídicas brutas (GHW-I e GHW-II).

A Tabela 5 apresenta a composição monossacarídica das frações extraídas com água quente, antes e após tratamento para remoção do amido.

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GHW-I, GHW-IET, GHW-II, E GHW-IIET OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rha <sup>a</sup>	Fuc <sup>a</sup>	Ara <sup>a</sup>	Xyl <sup>a</sup>	Man <sup>a</sup>	Gal <sup>a</sup>	Glc <sup>a</sup>	Ácido Urônico <sup>b</sup>
	(% )							
GHW-I	1	tr	4	tr	tr	1,5	80,6	12
GHW-IET	2	tr	22,2	3,8	2,0	10,5	6,0	53
GHW-II	1,5	tr	9,7	1,5	tr	2,2	59,7	23
GHW-IIET	1,9	tr	16,8	2,7	0,6	5,6	2,4	70

<sup>a</sup> Determinado por método GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

As frações GHW-IET e GHW-IIET, resultantes do tratamento enzimático, apresentaram uma redução dos teores de glucose em relação às frações brutas de 93,3% e 95,7%, respectivamente (Tabela 5). Isso mostra que o emprego das enzimas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase foi eficiente na remoção do amido, visto que os teores de ácido urônico também tiveram um aumento significativo.

A Figura 12A apresenta o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração nativa GHW-I, onde é possível identificar sinais referentes ao amido em  $\delta$  99,7(C-1),  $\delta$  77,6 (C-4),  $\delta$  73,4 (C-3),  $\delta$  71,7 (C-2),  $\delta$  71,4 (C-5),  $\delta$  69,7 (C-6 substituído) e  $\delta$  60,8 (C-6 livre) (FALK; STANEK, 1997; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2009). Além disso, foi possível verificar alguns sinais característicos de  $\alpha$ -D-GalA (1 $\rightarrow$ 4) ligado, dentre os quais estão  $\delta$  99,7 (C-1),  $\delta$  70,5 (C-3),  $\delta$  68,3 (C-2) e  $\delta$  52,8 (O-Me), que ficaram mais evidentes na fração purificada (GHW-IET). Novos sinais aparecem para o ácido  $\alpha$ -D-galacturônico na fração GHW-IET (Figura 12B). Dentre estes se destacam  $\delta$  172,0 e  $\delta$  170,5 referentes aos grupamentos -COOH e -COOCH<sub>3</sub>, respectivamente, das unidades de GalA. Os sinais em  $\delta$  100 e  $\delta$  99,7 correspondem ao C-1 das unidades de GalA



esterificadas e não esterificadas, respectivamente. Em  $\delta$  78,6 aparece o sinal de C-4,  $\delta$  70,5 de C-3,  $\delta$  68,1 de C-2 (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009),  $\delta$  57,4 (SUN *et al.*, 2005) e  $\delta$  52,8 de O-CH<sub>3</sub> (C-6) das unidades de GalA. Os sinais em  $\delta$  107,6 e  $\delta$  16,9 referem-se a C-1 de  $\alpha$ -L-Araf e C-6 (CH<sub>3</sub>) da  $\alpha$ -L-Rhap, respectivamente (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009).

A Figura 13 apresenta os espectros de RMN-<sup>13</sup>C da fração nativa GHW-II (Figura 13A) e da fração tratada enzimaticamente para remoção do amido (GHW-IIET) (Figura 13B), onde foi possível observar o desaparecimento de alguns sinais referentes ao amido, dentre estes  $\delta$  99,3,  $\delta$  78,4,  $\delta$  77,6,  $\delta$  73,4,  $\delta$  72,8,  $\delta$  71,8,  $\delta$  71,4,  $\delta$  69,7,  $\delta$  68,9,  $\delta$  68,3 e  $\delta$  60,8. Também foi possível identificar a cadeia principal do ácido  $\alpha$ -D-galacturônico (1 $\rightarrow$ 4) ligado (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009) e o espectro desta fração (Figura 13B) apresenta-se muito semelhante ao da fração GHW-IIET (Figura 12B). No entanto, alguns sinais adicionais entre  $\delta$  81 e 82,4 estão evidenciados para a fração GHW-IIET na Figura 13B, os quais podem ser atribuídos aos C-2 e C-4, respectivamente, das unidades de  $\alpha$ -L-Araf. O sinal em  $\delta$  61,4 pode ser atribuído ao C-5 dos terminais não redutores das unidades de  $\alpha$ -L-Araf, que também podem participar das ramificações nas pectinas (CARDOSO; SILVA; COIMBRA, 2002; BUSHNEVA *et al.*, 2002). O sinal em  $\delta$  20,1 pode ser referente a grupos acetil de unidades do  $\alpha$ -D-GalpA e em  $\delta$  16,9 está presente também o sinal de C-6 (CH<sub>3</sub>) da  $\alpha$ -L-Rhap (YU *et al.*, 2009).

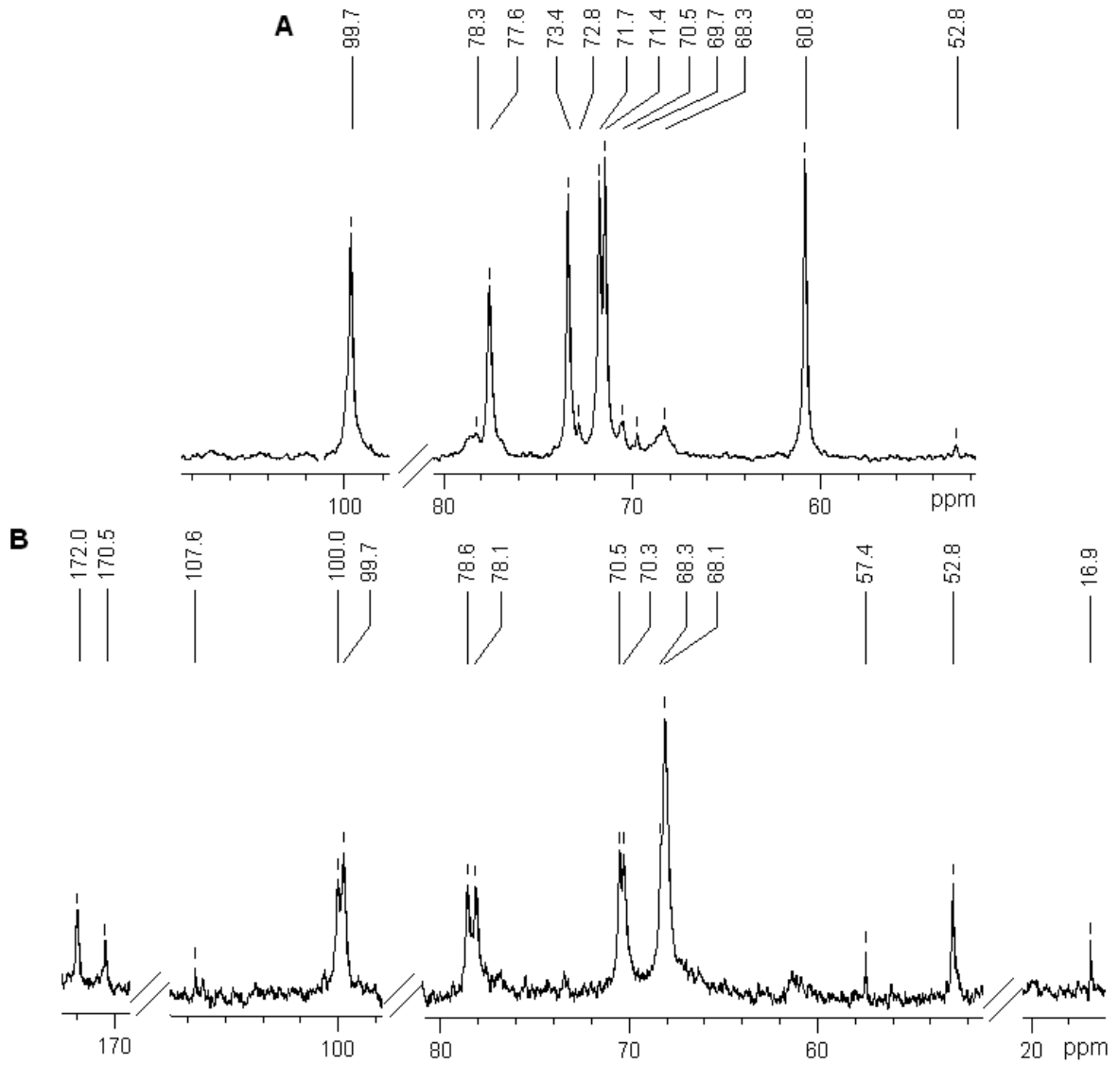


FIGURA 12 - ESPECTROS DE RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 70 °C) DAS FRAÇÕES GHW-I (A) E GHW-IET (B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

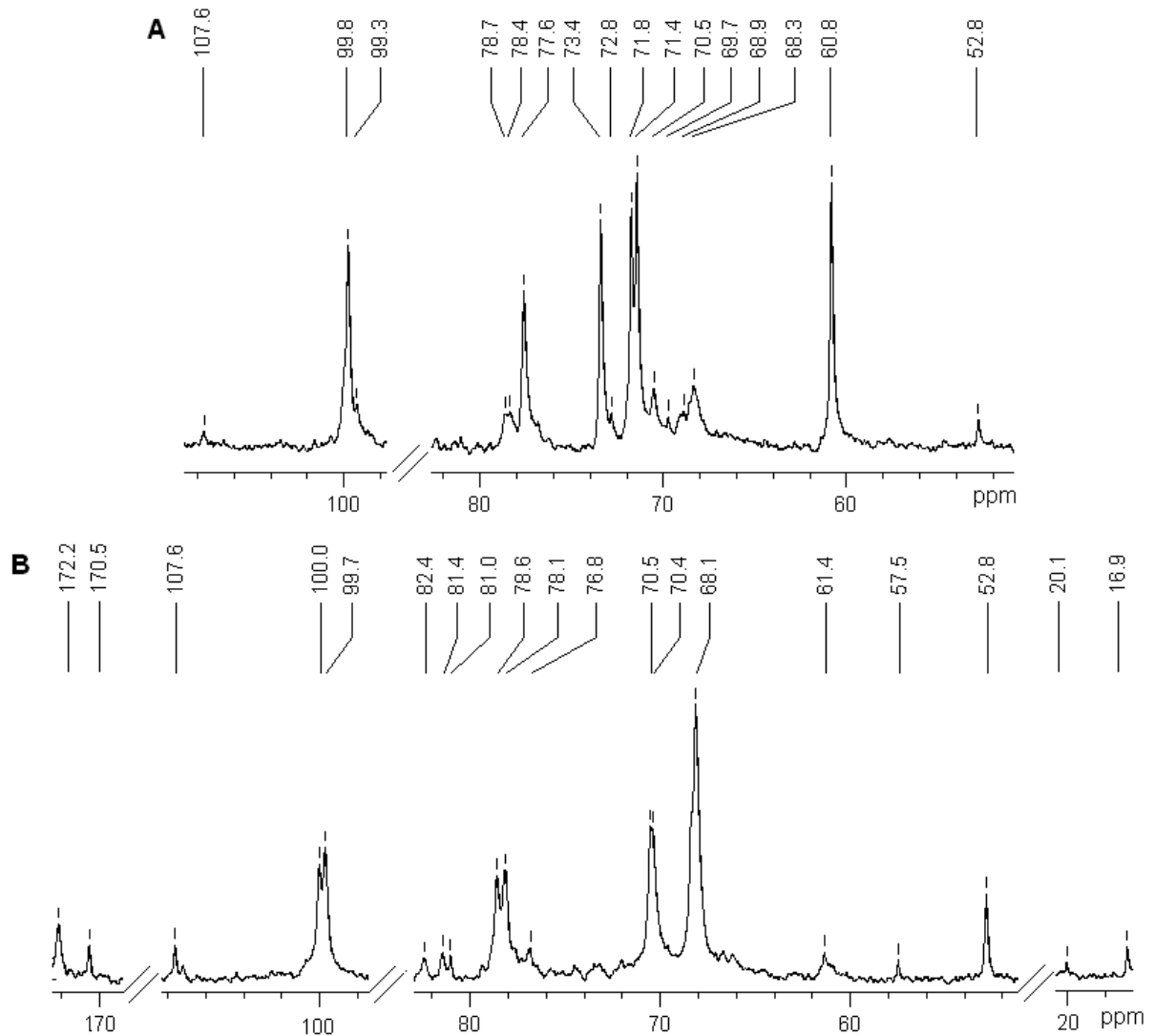


FIGURA 13 - ESPETROS DE RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 70 °C) DAS FRAÇÕES GHW-II (A) E GHW-IIET (B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

Os perfis de eluição por HPSEC das frações resultante do tratamento enzimático para remoção do amido (GHW-IET e GHW-IIET) estão apresentados na Figura 14, sendo comparados com aqueles das frações brutas (GHW-I e GHW-II).

Na fração GHW-I o pico detectado pelo índice de refração (RI), que tem sua eluição iniciada em 36 min, coincide parcialmente com o pico do espalhamento de luz (LS), que neste caso mostra-se bastante alargado provavelmente devido à presença do amido. Após o tratamento enzimático, o pico detectado pelo espalhamento de luz torna-se mais agudo e a detecção simultânea pelo índice de refração é praticamente nula, indicando que o tratamento com as enzimas foi eficiente na purificação da

amostra. O principal pico da fração GHW-IET, que deve corresponder à pectina, aparece em 48 min no detector de índice de refração e não é detectado no espalhamento de luz, indicando que se trata de uma molécula de menor massa molar.

A fração GHW-IIET, após o tratamento para remoção do amido apresentou uma notável redução do pico detectado pelo índice de refração (RI), em torno de 38 min, quando comparada a amostra nativa GHW-II. O principal pico da fração GHW-IIET aparece em 48 min no detector de índice de refração e não é detectado no espalhamento de luz. Este pico deve corresponder à pectina.

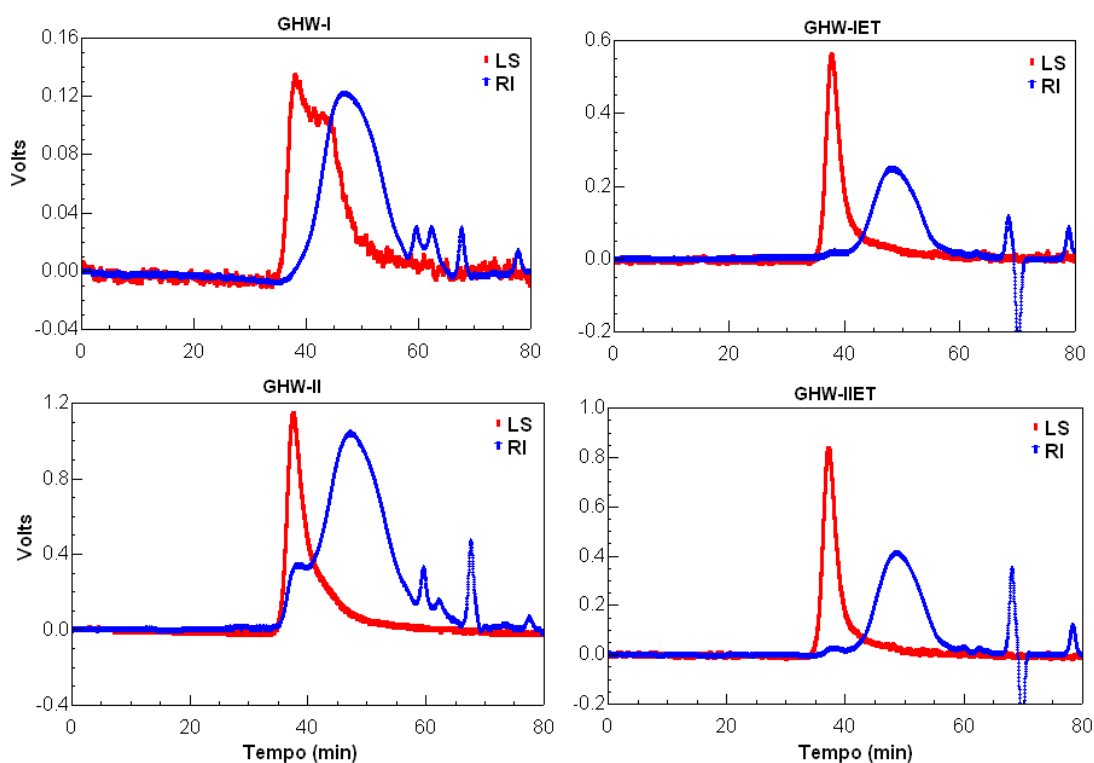


FIGURA 14 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHW-I, GHW-IET, GHW-II E GHW-IIET, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (LS) E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI)

Uma pectina isolada da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) contendo 65,4% de ácido urônico foi submetida a tratamento enzimático para remoção do amido contaminante. O teor de glucose da fração nativa foi de 7,1%, e após o tratamento enzimático houve redução deste percentual em aproximadamente 89%. O teor de ácido

urônico para a fração purificada foi de 81,9%. O perfil de eluição em HPSEC da fração purificada foi semelhante ao encontrado no presente trabalho, apresentando um pico principal em torno de 50 min. (VRIESMANN; PETKOWICZ, 2009; VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2010).

A fração GHW-IIET apresentou o maior teor de ácido urônico (70%) e menor conteúdo de glucose (2,4%) e por isso foi submetida à ultrafiltração, utilizando membrana de 0,1  $\mu\text{m}$ , no intuito de purificar esta fração pécica. O tratamento enzimático deu origem às frações GHW-IIETF (*filtrated*) e GHW-IIETR (*retained*). A Figura 15 apresenta os perfis de eluição por HPSEC da fração GHW-IIET (antes da ultrafiltração) e GHW-IIETF (após ultrafiltração), mostrando apenas o detector de índice de refração (RI).

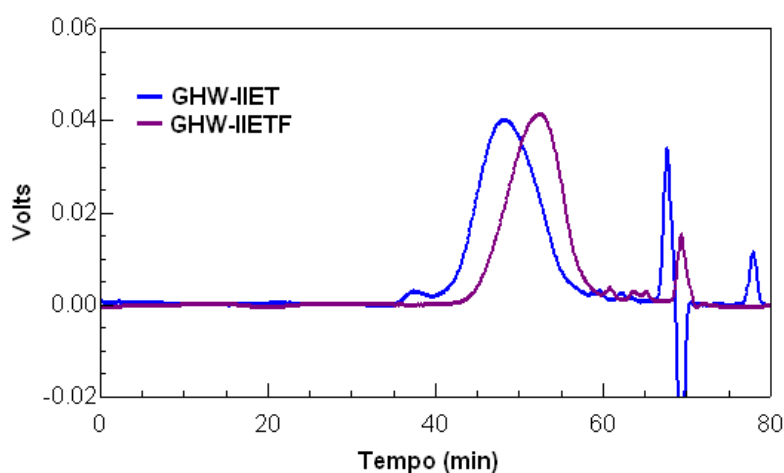


FIGURA 15 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHW-IIET E GHW-IIETF, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI).

A ultrafiltração foi eficiente na remoção do pico próximo a 38 min, existente no perfil de eluição da fração GHW-IIET, e a amostra GHW-IIETF apresentou um perfil praticamente homogêneo no detector de índice de refração, não havendo detecção no espalhamento de luz (dado não mostrado). Uma diferença nos tempos de retenção dos picos principais indica que após ultrafiltração houve uma separação por tamanho dos polissacarídeos pécicos, dando origem a uma fração com massa molar menor. Já a

fração retida (GHW-IIETR), apresentou perfil de eluição multimodal por HPSEC (dado não mostrado).

A Tabela 6 apresenta a composição monossacarídica das frações GHW-IIET, GHW-IIETF e GHW-IIETR. Foi possível perceber a diferença de composição das frações filtrada (GHW-IIETF) e retida (GHW-IIETR), indicando que houve separação de polissacarídeos na ultrafiltração.

Os principais açúcares neutros da fração GHW-IIETF foram arabinose e galactose, conforme esperado para as cadeias laterais de pectinas, que são compostas principalmente por arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas (CAFFALL; MOHNEN, 2009; HABIBI *et al.*, 2004).

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GHW-IIET, GHW-IIETF E GHW-IIETR OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rha <sup>a</sup>	Fuc <sup>a</sup>	Ara <sup>a</sup>	Xyl <sup>a</sup>	Man <sup>a</sup>	Gal <sup>a</sup>	Glc <sup>a</sup>	Ácido Urônico <sup>b</sup>
	(% )							
GHW-IIET	1,9	tr	16,8	2,7	0,6	5,6	2,4	70
GHW-IIETF	2,3	tr	18,6	3,2	1	6,1	2,6	67
GHW-IIETR	0,6	-	4,7	4,3	8	3,6	8,9	69

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

Os grupos carboxílicos das unidades de ácido urônico da fração GHW-IIETF foram submetidos ao processo de carboxi-redução com NaBD<sub>4</sub> para obtenção das unidades glicosídicas neutras correspondentes a fim de confirmar a identidade do açúcar ácido. Deste processo foi obtida a fração RGHW-IIETF (*reduced*), que após um ciclo de carboxi-redução apresentou 13% de ácido urônico. Após hidrólise e derivatização o teor de galactose aumentou cerca de 7x em relação à fração GHW-IIETF, confirmando a presença do ácido galacturônico, como esperado para pectinas. A confirmação da presença do ácido galacturônico também foi obtida pela análise dos

perfis de fragmentos de massa gerados após carboxi-redução, hidrólise, redução, acetilação e análise em GC-MS. Na amostra carboxi-reduzida alguns fragmentos de massa referentes à galactose ( $m/z$  170, 273 e 375) apresentaram-se com duas unidades de massa a mais ( $m/z$  172, 275 e 377), indicando que houve a entrada de dois deutérios durante a redução com  $\text{NaBD}_4$  na etapa de carboxi-redução (CARPITA; SHEA, 1989).

A Tabela 7 mostra a composição da fração carboxi-reduzida, onde é possível visualizar os demais açúcares neutros que compõe a fração RGHW-IIETF. Proporcionalmente foi possível verificar um aumento dos açúcares neutros tais como ramnose, arabinose, xilose e glucose. A baixa relação Rha:GalA sugere que a fração pectica isolada tem predomínio de regiões lineares. Entretanto, as regiões ramificadas apresentam, provavelmente, cadeias laterais de arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GHW-IIETF E RGHW-IIETF OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rha <sup>a</sup>	Ara <sup>a</sup>	Xyl <sup>a</sup>	Man <sup>a</sup>	Gal <sup>a</sup>	Glc <sup>a</sup>	Ácido Urônico <sup>b</sup>
	(% )						
GHW-IIETF	2,4	14,6	2,9	1,6	8	3,2	67
RGHW-IIETF	3,6	17,2	3,0	1,5	56,3	5,2	13

<sup>a</sup> Determinado por GC-MS.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

A fração obtida após ultrafiltração (GHW-IIETF) apresentou um espectro de RMN-<sup>13</sup>C bastante complexo (Figura 16), com sinais característicos de pectinas em  $\delta$  174,7-170,6, referentes aos grupos carboxílicos (C-6) livres e metil-esterificados das unidades de  $\alpha$ -D-GalpA, respectivamente (TANG *et al.*, 1999). Os principais sinais, referentes à cadeia principal de  $\alpha$ -GalpA (1→4) ligada, aparecem em  $\delta$  100,0 (C-1 das unidades esterificadas),  $\delta$  99,3 (C-1 das unidades não esterificadas),  $\delta$  78,5 (C-4),  $\delta$  71,6 (C-5),  $\delta$  70,5 (C-3),  $\delta$  68,2 (C-2) e  $\delta$  52,8 (O-CH<sub>3</sub> do C-6) (VRIESMANN;

PETKOWICZ, 2009). Em  $\delta$  107,6 e 107,2 aparecem os sinais correspondentes as unidades de  $\alpha$ -L-Araf indicando que estas unidades podem estar ligadas de duas diferentes formas, ou estarem substituídas (SIMAS-TOSIN *et al.*, 2009). O sinal correspondente ao C-1 de  $\beta$ -D-Galp mostra-se com baixa intensidade em  $\delta$  104,3. A região de  $\delta$  81-84 é característica de C-2, C-3 e C-4 de  $\alpha$ -L-Araf e na região de  $\delta$  60-64 estão presentes os sinais de C-5 de terminais não redutores de  $\alpha$ -L-Araf ( $\delta$  61,3) e também de C-6 livre de  $\beta$ -D-Galp ( $\delta$  60,9) (HABIBI *et al.*, 2004). Em  $\delta$  20,2 observa-se um sinal referente a grupos acetil que devem estar ligados às unidades  $\alpha$ -D-GalA e em  $\delta$  16,6 o CH<sub>3</sub> (C-6) das unidades de  $\alpha$ -L-Rha.

Os resultados obtidos sugerem que a fração GHW-IIETF é constituída principalmente de uma homogalacturonana contendo inserções de ramnogalacturonana. As cadeias laterais da ramnogalacturonana são formadas principalmente por arabinose e galactose.

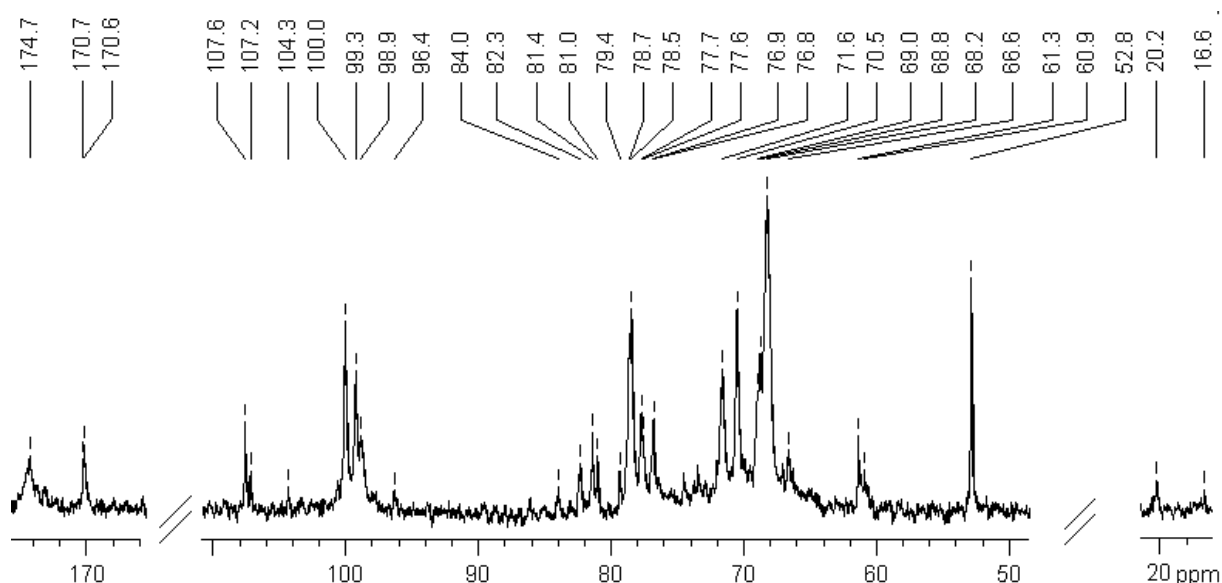


FIGURA 16 - ESPETRO DE RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 70 °C) DA FRAÇÃO GHW-IIETF OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ

A fração GHW-IIETF apresentou grau de esterificação de 33%, indicando se tratar de uma fração péctica com baixo grau de esterificação. Embora a fração GHW-IIETF tenha sido metilada duas vezes pelo método de Ciucanu e Kerek (1984), os



dados obtidos não foram satisfatórios, sugerindo que possa ter ocorrido degradação ou submetilação, o que impossibilitou a interpretação dos resultados.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES GHA2-I, GHA2-II, GHA4-I, GHA4-II, GHB2-I, GHB2-II, GHB4-I E GHB4-II

Na Figura 17 estão apresentados os perfis de eluição por HPSEC das hemiceluloses A e B, extraídas sob duas condições alcalinas (NaOH 2M e 4M). Todas as hemiceluloses mostraram-se heterogêneas.

A fração principal de cada amostra eluiu entre 50 a 55 min e foi detectada simultaneamente tanto pelo índice de refração (RI) quanto pelo ultravioleta em 280 nm (UV). Este fato pode ser justificado pelos elevados índices de proteína, entre 22,6 e 36%, determinados pelo método de Peterson (1977), bem como a presença de compostos fenólicos, com teores de 8 a 15,6% para as Hemiceluloses A/B – I, e 20,8 a 38% para as Hemiceluloses A/B – II, estimados pela diferença entre as dosagens de proteína (Tabela 1) por Hartree (1972) e Peterson (1977), conforme descrito no item 3.4.3 para hemiceluloses brutas (WU; HWANG, 2005; TAO; ZHANG, 2008).

Inicialmente as frações GHA2-I e GHA2-II foram selecionadas para fracionamento por gelo e degelo, devido ao maior conteúdo de xilose (65,6%) e maior rendimento (2,2%) entre as hemiceluloses, respectivamente.

A fração GHA2-I praticamente não apresentou material precipitado após vários ciclos de congelamento e degelo, já a fração GHA2-II originou uma porção solúvel, GHA2-IIS (*supernatant*) e uma porção precipitada, GHA2-IIP (*precipitated*). Os rendimentos em relação à fração bruta foram de aproximadamente 77% para GHA2-IIS e 23% para GHA2-IIP.

Na Tabela 8 estão mostrados os teores de açúcar total, proteínas e composição monossacarídica das frações submetidas ao processo de congelamento e degelo e as frações resultantes. A fração GHA2-IIS apresentou predomínio de xilose (69,4%), enquanto a fração GHA2-IIP mostrou composição rica em glucose (62,8%).

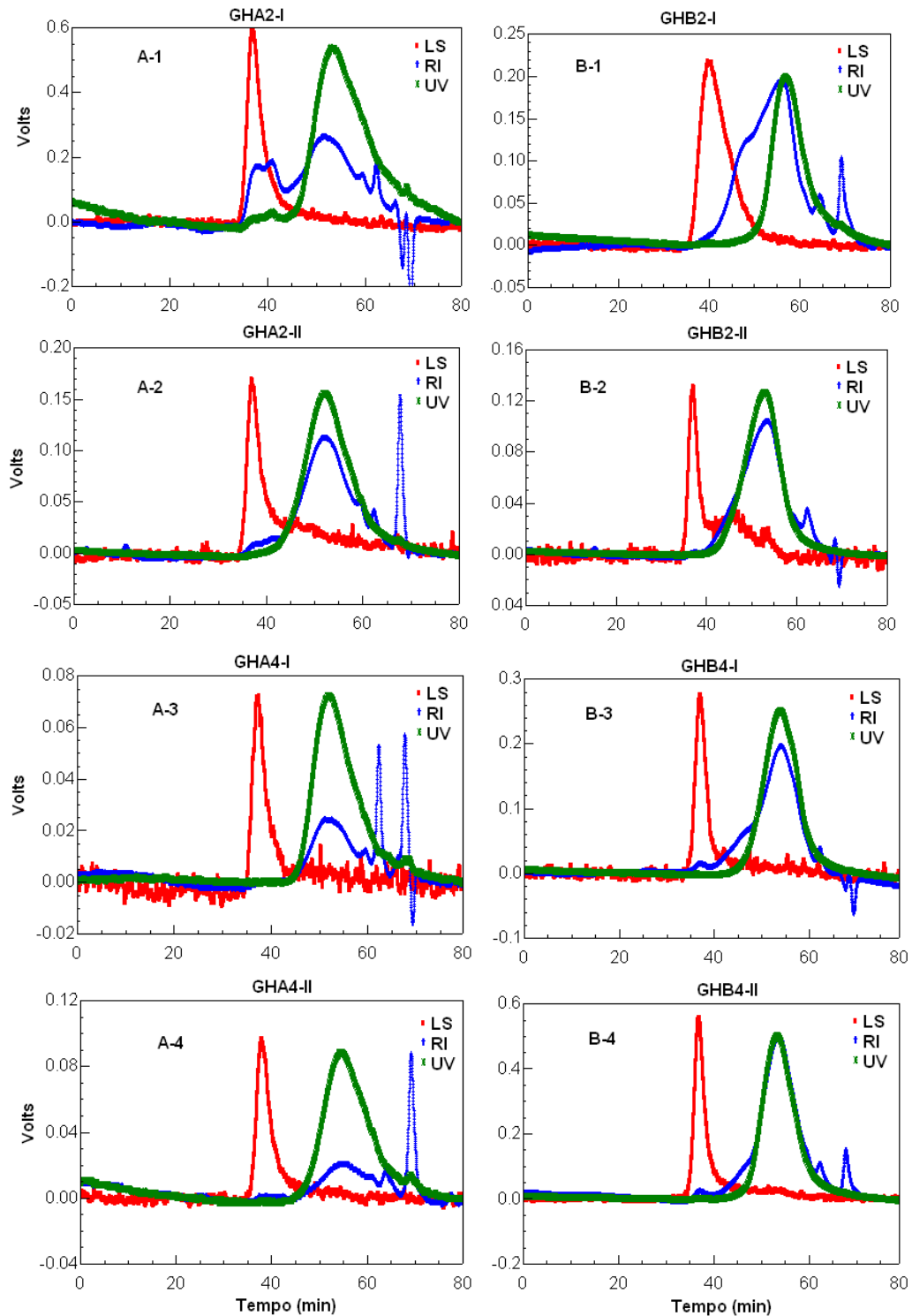


FIGURA 17 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHA2-I (A-1), GHA2-II (A-2), GHA4-I (A-3), GHA4-II (A-4), GBA2-I (B-1), GHB2-II (B-2), GHB4-I (B-3), GHB4-II (B-4), OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTORES DE ESPALHAMENTO DE LUZ (LS), ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ULTRAVIOLETA EM 280 nm (UV).

Um fato interessante é que o procedimento de fracionamento por gelo e degelo proporcionou a separação de proteínas, que se concentraram na fração solúvel GHA2-IIS, cujo rendimento em massa foi maior, enquanto a fração insolúvel (GHA2-IIP) apresentou apenas 0,3% de proteína. Vale ressaltar que a dosagem colorimétrica de açúcar total é conduzida através de uma curva de glucose, e que, dependendo da composição monossacarídica das frações este valor pode estar subestimado. O fato da fração GHA2-IIP ser insolúvel também pode justificar o baixo teor de açúcar total detectado.

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA, TEOR DE PROTEÍNA E AÇÚCAR TOTAL DAS FRAÇÕES GHA2-I, GHA2-II, GHA2-IIS E GHA2-IIP OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rha <sup>a</sup>	Ara <sup>a</sup>	Xyl <sup>a</sup>	Man <sup>a</sup>	Gal <sup>a</sup>	Glc <sup>a</sup>	Ácido urônico <sup>b</sup>	Proteína <sup>c</sup>	Açúcar Total <sup>d</sup>
	(% )							(%)	(%)
GHA2-I	0,6	5,5	65,6	tr	3,4	24,1	tr	30,8	53,6
GHA2-II	0,6	8,2	56,8	0,6	4,8	28,7	tr	35	26,5
GHA2-IIS	0,5	7,7	69,4	0,7	4,6	12,7	3,9	72,5	18,8
GHA2-IIP	0,7	7,6	17,8	tr	4,7	62,8	5,4	0,3	28,3

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

<sup>c</sup> Determinado por método colorimétrico de Peterson (1977).

<sup>d</sup> Determinado por método colorimétrico de Dubois *et al.* (1956).

Dentre as metodologias utilizadas na tentativa de remover as proteínas da fração GHA2-IIS (descritas no item 3.3.2.3) nenhuma foi completamente eficiente, e a redução dos percentuais de proteína não passou de 25%. A precipitação com TCA (20 e 25%) não foi seletiva para as proteínas, promovendo também a precipitação dos polissacarídeos. Portanto, devido ao alto teor de proteína da fração GHA2-IIS e à insolubilidade da fração GHA2-IIP, nenhuma destas frações foi selecionada para estudos posteriores.

A Figura 18 apresenta o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração GHA2-I. É possível observar a presença de sinais que correspondem a uma cadeia de β-D-xilose (1→4) ligada, representada pelos sinais em δ 101,6 (C-1), δ 76,4 (C-4), δ 73,8 (C-3), δ 72,8 (C-2) e δ 63,0 (C-5) (HABIBI; MAHROUZ; VIGNON, 2002; MELLINGER *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2008). Demais sinais em δ 99,7 (C-1), δ 77,6 (C-4), δ 73,4 (C-3), δ 71,7 (C-2), δ 71,4 (C-5) e δ 60,8 (C-6) podem ser atribuídos ao amido, presente nesta fração (VRIESMANN; SILVEIRA; PETKOWICZ, 2009).

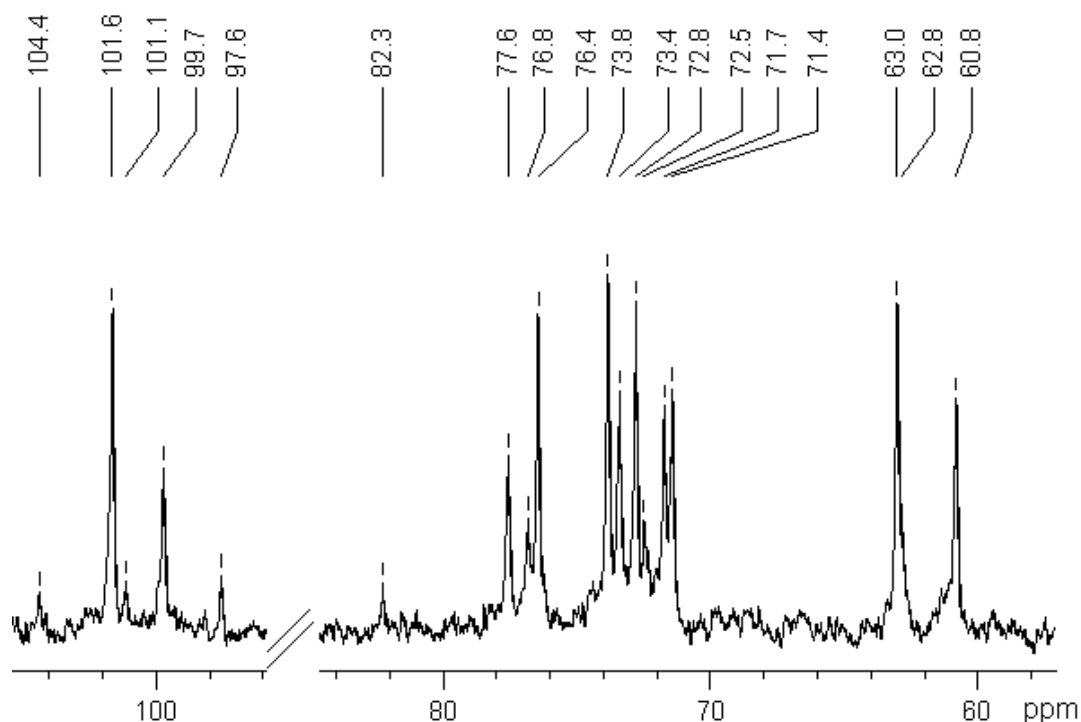


FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 70 °C) DA FRAÇÃO GHA2-I OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ

A fração GHA2-I que apresentou o maior conteúdo de xilose (65,5%) e um dos maiores conteúdos de açúcar total (53,6%) (Tabela 1 e 2) dentre as hemiceluloses foi então submetida a fracionamento com solução de Fehling, na tentativa de isolar uma xilana. As frações obtidas apresentaram-se heterogêneas quando analisadas por HPSEC (não mostrado). A fração precipitada com reagente de Fehling apresentou menor conteúdo de xilose que a fração bruta (40,6%), além de conter amido como contaminante (confirmado pelo teste de lugol). Mesmo após tratamento desta fração

com  $\alpha$ -amilase e amiloglicosidase a fração se manteve heterogênea por HPSEC e foi descartada.

Uma nova tentativa de purificação foi adotada para a fração GHA2-I, empregando-se uma coluna cromatográfica de troca iônica (DEAE Trisacryl<sup>®</sup> Plus M), a fim de remover as proteínas presentes. A partir deste procedimento foram obtidas quatro frações: a fração eluída com água, nomeada GHA2-IW (*water*); a fração eluída com NaCl 2M, chamada de GHA2-INaCl; e as frações eluídas com solução de NaOH (0,5 e 1M) que foram denominadas GHA2-I0,5NaOH e GHA2-INaOH. O rendimento, teor de proteína e açúcar total das frações obtidas por fracionamento em coluna de troca iônica estão apresentados na Tabela 9. A composição monossacarídica está mostrada na Tabela 10.

TABELA 9 - RENDIMENTO, TEOR DE AÇÚCAR TOTAL E PROTEÍNA DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO FRACIONAMENTO POR COLUNA DE TROCA IÔNICA OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rendimento <sup>a</sup>	Açúcar Total <sup>b</sup>	Proteína <sup>c</sup>
		(%)	
GHA2-IW	33,5	65,3	nd
GHA2-I-NaCl	11,1	24,4	nd
GHA2-I0,5NaOH	36	21,3	54,5
GHA2-INaOH	6,1	15,3	19,5

<sup>a</sup> Calculado com relação à quantidade de material aplicado na coluna.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Dubois *et al.* (1956).

<sup>c</sup> Determinado por método colorimétrico de Peterson (1977).

<sup>nd</sup> Não detectado.

As frações eluídas com água (GHA2-IW) e NaCl (GHA2-I-NaCl) apresentaram-se livres de proteínas, sendo estas recuperadas nas frações eluídas com álcali. A xilose foi o principal monossacarídeo para todas as frações obtidas. A glucose também foi um componente quantitativamente importante para todas as frações e sua presença foi atribuída à contaminação por amido, que foi confirmada no teste de lugol.

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES ORIUNDAS DO FRACIONAMENTO POR COLUNA DE TROCA IÔNICA OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rha <sup>a</sup>	Fuc <sup>a</sup>	Ara <sup>a</sup>	Xyl <sup>a</sup>	Man <sup>a</sup>	Gal <sup>a</sup>	Glc <sup>a</sup>	Ácido Urônico <sup>b</sup>
	(%)							
GHA2-I	0,6	tr	5,5	65,6	tr	3,4	24,1	tr
GHA2-IW	tr	tr	1	52,8	tr	1,9	33,3	10,6
GHA2-I-NaCl	0,9	0,5	10,8	56,6	0,7	7,9	7,9	14,5
GHA2-I0,5NaOH	0,5	tr	6,1	66,6	0,7	3,9	13,1	8,2
GHA2-INaOH	0,9	0,9	24,8	36,2	2,2	11,9	18,8	4,2

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

<sup>tr</sup> Traços (< 0,5%).

Percebe-se que as proteínas que interagiram com a coluna de troca iônica eluíram apenas sob condições drásticas (NaOH 0,5 e 1M), indicando forte interação com a coluna. A passagem de polissacarídeos ácidos, evidenciados pela presença de ácido urônico na fração eluída com água (GHA2-IW) sugere que houve uma saturação da coluna nas condições utilizadas.

A fração GHA2-IW foi submetida a tratamento enzimático para remoção do amido, resultando na fração GHA2-IWET (*enzymatic treatment*). Após este procedimento, observou-se uma redução de aproximadamente 87% no conteúdo de glucose, indicando remoção considerável do amido. A Figura 19 mostra os perfis de eluição por HPSEC, mostrando apenas o detector de índice de refração das frações GHA2-I (bruta), GHA2-IW e GHA2-IWET, apresentando a evolução obtida após purificação. As frações GHA2-IW e GHA2-IWET apresentam-se semelhantes entre si, exibindo distribuição de massa multimodal.

Com a finalidade de purificar a fração GHA2-IWET, esta foi submetida a um sistema de diálise fechada contra água MiliQ, empregando-se membranas com limites de exclusão de 1.000 e 16 KDa.

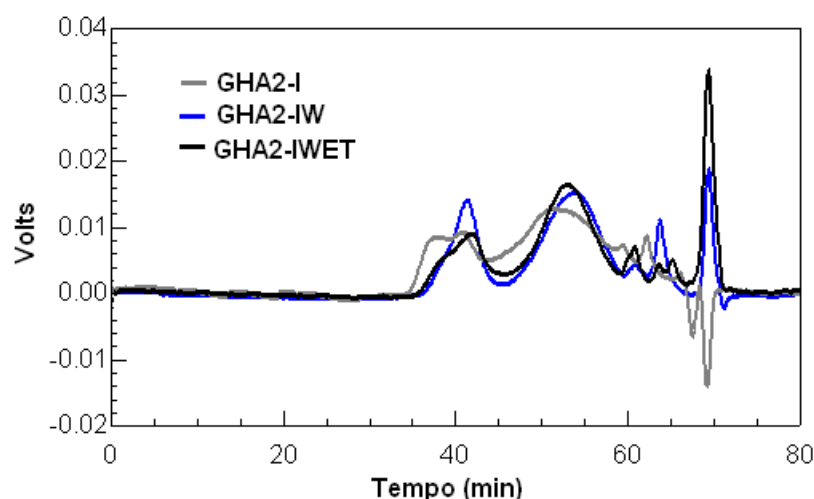


FIGURA 19 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHA2-I, GHA2-IW E GHA2-IWET, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI).

A Tabela 11 apresenta a composição monossacarídica das frações GHA2-IW, GHA2-IWET e GHA2-IWETD.

TABELA 11 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES GHA2-IW, GHA2-IWET E GHA2-IWETD OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

FRAÇÃO	Rha <sup>a</sup>	Fuc <sup>a</sup>	Ara <sup>a</sup>	Xyl <sup>a</sup>	Man <sup>a</sup>	Gal <sup>a</sup>	Glc <sup>a</sup>	Ácido Urônico <sup>b</sup>
	(% )							
GHA2-IW	tr	tr	1	52,8	tr	1,9	33,3	10,6
GHA2-IWET	tr	tr	tr	75,8	1,6	3,6	4,3	13,7
GHA2-WETD	tr	nd	1,5	75,7	1,4	3,1	4,1	13,8

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

<sup>b</sup> Determinado por método colorimétrico de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

<sup>nd</sup> Não detectado.

A seguir (Figura 20) estão mostrados os perfis de eluição por HPSEC das amostras GHA2-IW, GHA2-IWET e GHA2-IWETD, mostrando apenas o detector de índice de refração.

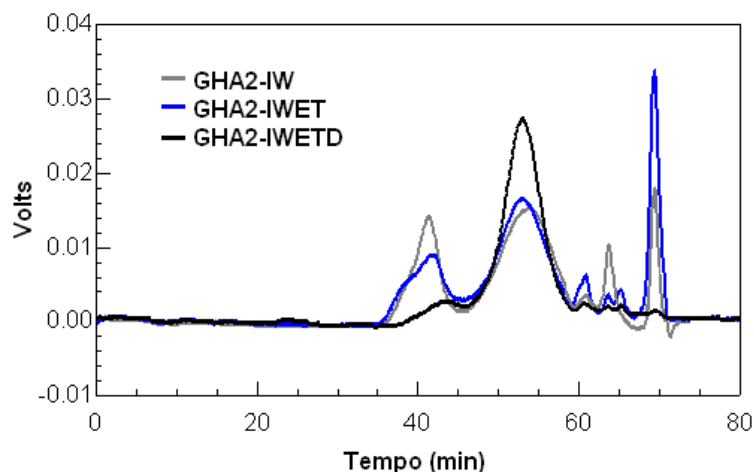


FIGURA 20 - PERFIS DE ELUIÇÃO POR HPSEC DAS FRAÇÕES GHA2-IW, GHA2-IWET E GHA2-IWETD, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI)

Analisando o perfil de eluição da fração GHA2-IWETD, observa-se que após a filtração na membrana de 1.000 KDa houve redução do pico em torno de 40 min, já a diálise usando membrana de 16 KDa, auxiliou na redução dos picos com tempos de retenção superiores a 60 min. Vale destacar que esta fração não apresentou detecção simultânea no ultravioleta (280 nm), mostrando desta forma que a cromatografia de troca iônica foi eficiente na remoção de proteínas anteriormente associadas.

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração bruta GHA2-I (A) e purificada GHA2-IWETD (B), obtida após fracionamento por cromatografia de troca iônica, tratamento enzimático, filtração e diálise, está apresentado na Figura 21.



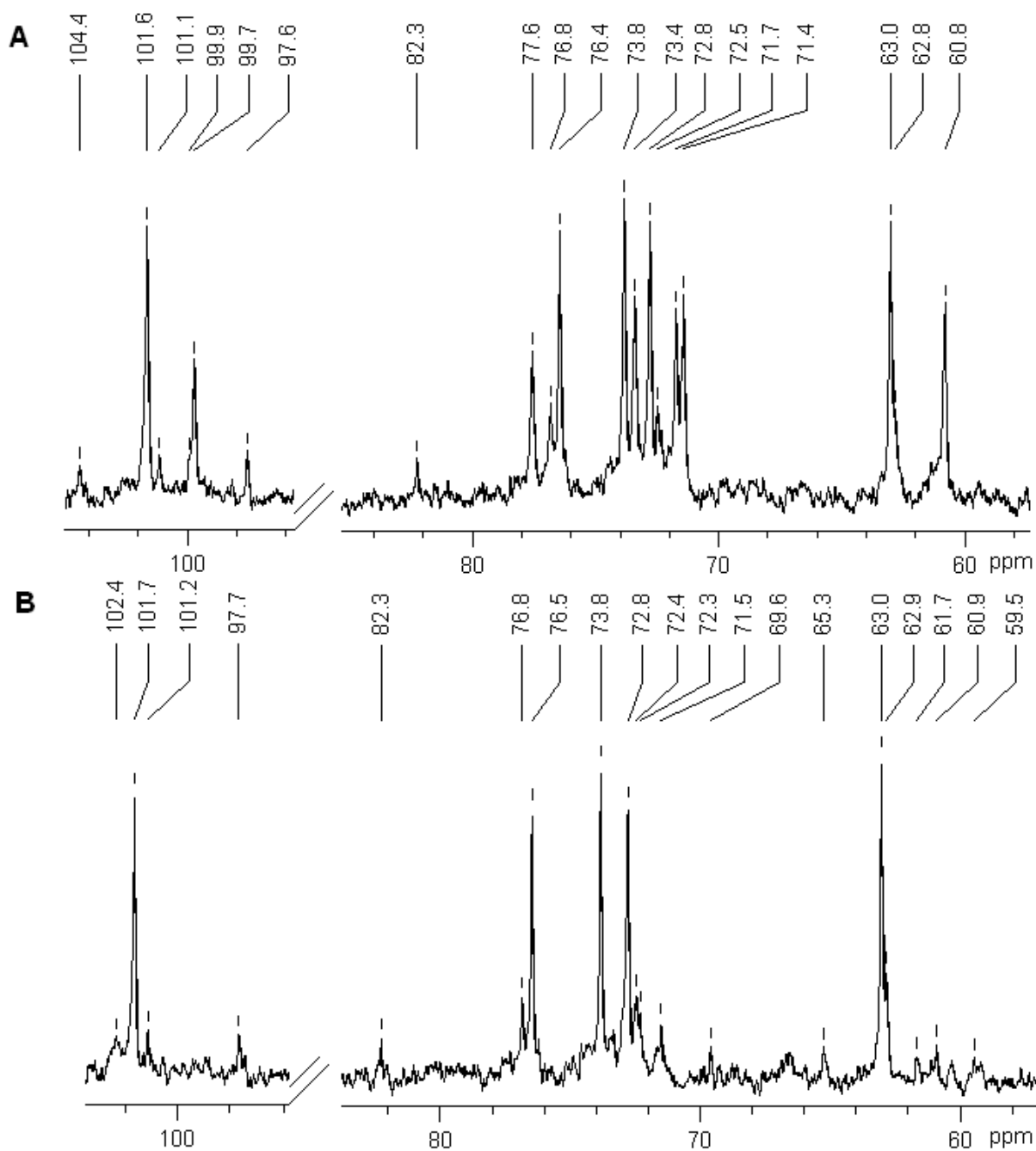


FIGURA 21 - ESPECTROS DE RMN-<sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 70 °C) DAS FRAÇÕES GHA2-I (A) E GHA2-IWETD (B) OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ

No espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração GHA2-IWETD (Figura 21B), os cinco sinais principais são característicos de β-D-xilose 1→4 ligada, sendo estes δ 101,7 (C-1), δ 76,5 (C-4), δ 73,8 (C-3), δ 72,8 (C-2) e δ 63,0 (C-5) (MELLINGER *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2008). Em δ 102,4 observa-se um pequeno sinal referente ao terminal não redutor de β-D-xilose e em δ 101,2 às unidades 2,4-di-*O*-substituídas

(CIPRIANI *et al.*, 2008). Em  $\delta$  97,7 está presente o sinal do C-1 das unidades não redutoras de 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA (CIPRIANI *et al.*, 2008) ou  $\alpha$ -D-GlcpA (MELLINGER *et al.*, 2005). Alguns sinais podem ser atribuídos aos carbonos das substituições por 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA como em  $\delta$  82,3 (C-4),  $\delta$  76,8 (C-3),  $\delta$  72,3 (C-5) e  $\delta$  71,5 (C-2) (VIGNON; GEY, 1998; HABIBI, MAHROUZ; VIGNON, 2002). Sinais em  $\delta$  61,7 e  $\delta$  60,9 podem ser atribuídos a C-6 livres de hexoses (Glc, Gal ou Man). O sinal em  $\delta$  59,5 é referente ao grupo -OCH<sub>3</sub> das unidades de 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA (HABIBI, MAHROUZ; VIGNON, 2002; MELLINGER *et al.*, 2005; CIPRIANI *et al.*, 2008). Quando se comparam os espectros da fração GHA2-I (Figura 21A) e GHA2-IWETD (Figura 21B) é possível verificar o desaparecimento dos sinais referentes ao amido e o aparecimento de novos sinais característicos de uma D-glucurono-D-xilana, contendo unidades de 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA.

Vignon e Gey (1998) e Habibi, Mahrouz e Vignon (2002) ao estudarem xilanas extraídas de sementes de outros vegetais, como marmelo (*Cydonia oblonga*) e figo (*Opuntia ficus-indica*) respectivamente, observaram deslocamentos químicos muito semelhantes para 4-*O*-metil-D-glucurono-D-xilanas.

Após carboxi-redução, seguida de derivatização até acetatos de alditol, a fração resultante RGHA2-IWETD foi avaliada por GC-MS. A presença de 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-Glc foi confirmada pelo perfil de fragmentação ( $m/z$  86, 87, 99, 129, 159, e 189) e tempo de retenção, indicando a presença de 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA (7%) na fração RGHA2-IWETD. A glucose aumentou cerca de duas vezes o percentual original, atingindo 8,5%, confirmando assim a identidade do ácido glucurônico. A análise de metilação (Tabela 12) da amostra carboxi-reduzida mostrou a presença dos derivados 2,3-Me<sub>2</sub>-Xyl (54%), 3-Me-Xyl (10%) e 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Xyl (8%), confirmando os dados de RMN. A presença de Xyl (5%) não metilada pode indicar que há porções totalmente substituídas, ou que a amostra foi submetilada. O derivado 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc (12%) indica o terminal não redutor de  $\alpha$ -D-GlcA ou 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-Glc, e outros derivados observados como 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc (5%) e 2,3-Me<sub>2</sub>-Glc (3%) podem indicar contaminação por amido. Segundo Morrison (2001) as xilanas podem conter pequenas proporções de galactose, confirmado pelo derivado 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal (3%), que pode sugerir substituições nas cadeias laterais.

TABELA 12 - ANÁLISE POR METILAÇÃO DA FRAÇÃO RGHA2-IWETD  
OBTIDA DAS SEMENTES DE GUARANÁ

Acetatos de alditóis <sup>a</sup>	Tipo de ligação	%
2,3,4 –Me <sub>3</sub> -Xyl	Xylp-(1→	8
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	→4)-Xylp-(1→	54
3-Me-Xyl	→2,4)-Xylp-(1→	10
Xyl	→2,3,4)-Xylp-(1→	5
2,3,4,6 –Me <sub>4</sub> -Glc	Glc p-(1→	12
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	→4)-Glc p-(1→	5
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	→4,6)-Glc p-(1→	3
2,3,4,6- Me <sub>4</sub> -Gal	Gal p-(1→	3

<sup>a</sup>Determinado por GC-MS.

#### 4.5 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Embora a atividade antioxidante esteja normalmente associada aos compostos de baixa massa (LAKO *et al.*, 2007), diversos autores têm investigado a atividade antioxidante de polissacarídeos (YANG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2008; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2010). A fração GHW-IIET, extraída com água quente e purificada através de tratamento enzimático, apresentou o maior teor urônico (70%) dentre as frações pécticas, além de um rendimento em massa satisfatório (530 mg). Esta fração apresentou-se rica em ácido galacturônico, estando presente também arabinose (17,4%), galactose (5,7%), xilose (2,9%), glucose (2,4%) e manose (1%). Também foram detectados, em pequena quantidade, compostos fenólicos (2%) e proteínas (2%). Portanto, como polissacarídeos ácidos já foram descritos por apresentarem potencial antioxidante (KARDOŠOVÁ; MACHOVÁ, 2006; QI *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2010), neste trabalho a fração péctica GHW-IIET foi selecionada para realização de ensaios contra radicais livres.

Sabendo que o guaraná tem sua atividade antioxidante associada aos compostos fenólicos (KUSKOSKI *et al.*, 2005) e que o emprego dos solventes como metanol/água (4:1) promovem a extração destes compostos (SPAGOLLA *et al.*, 2009), o extrato GMW, obtido através destas condições, cujo rendimento em massa foi bastante elevado (15,33 g), também foi utilizado nos ensaios de atividade antioxidante. O extrato GMW apresentou um elevado conteúdo de compostos fenólicos (37,5%), além de conter 17% de açúcares redutores e 26,7% de açúcar total.

A Tabela 13 mostra a composição monossacarídica do extrato com e sem hidrólise prévia com TFA. Os açúcares livres mais comumente encontrados em material de origem vegetal são a glucose, frutose e sacarose. No extrato GMW, a glucose está presente em maior proporção tanto no extrato submetido à hidrólise como naquele não hidrolisado, indicando a presença de glucose livre. A presença de manose, detectada por GLC como manitol hexa-acetato é provavelmente resultante da derivatização da frutose. A frutose, por ser uma cetose, ao ser reduzida na forma de alditol produz uma mistura de manitol e glucitol, que após acetilação geram manitol e glucitol hexa-acetato, este último contribuindo para elevar os níveis de glucose. A presença de outros monossacarídeos, como Rha, Ara e Gal, cujos percentuais aumentam após a hidrólise indica a presença de oligossacarídeos na fração GMW.

TABELA 13 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DO EXTRATO GMW, OBTIDO DAS SEMENTES DE GUARANÁ, COM E SEM HIDRÓLISE

GMW	Rha <sup>a</sup>	Ara <sup>a</sup>	Xyl <sup>a</sup>	Man <sup>a</sup>	Gal <sup>a</sup>	Glc <sup>a</sup>
	(%)					
Sem Hidrólise	-	2,9	1	12,4	-	83,6
Com Hidrólise	0,9	8,8	1	4,4	1,7	83

<sup>a</sup> Determinado por GLC.

Na Figura 22 está apresentado o espectro de RMN-<sup>13</sup>C do extrato GMW indicando a complexidade da composição da amostra. Os principais grupos funcionais

relacionados ao carbono estão indicadas com as letras **A** (Alquila - 0 a 45 ppm), **B** (Metoxila - 45 a 60 ppm), **C** (Carboidratos - 60 a 94 ppm), **D** (Di-O-alquila - 94 a 110 ppm), **E** (Arila - 110 a 142 ppm) e **F** (Fenólico - 142 a 160) (MATHERS *et al.*, 2003).

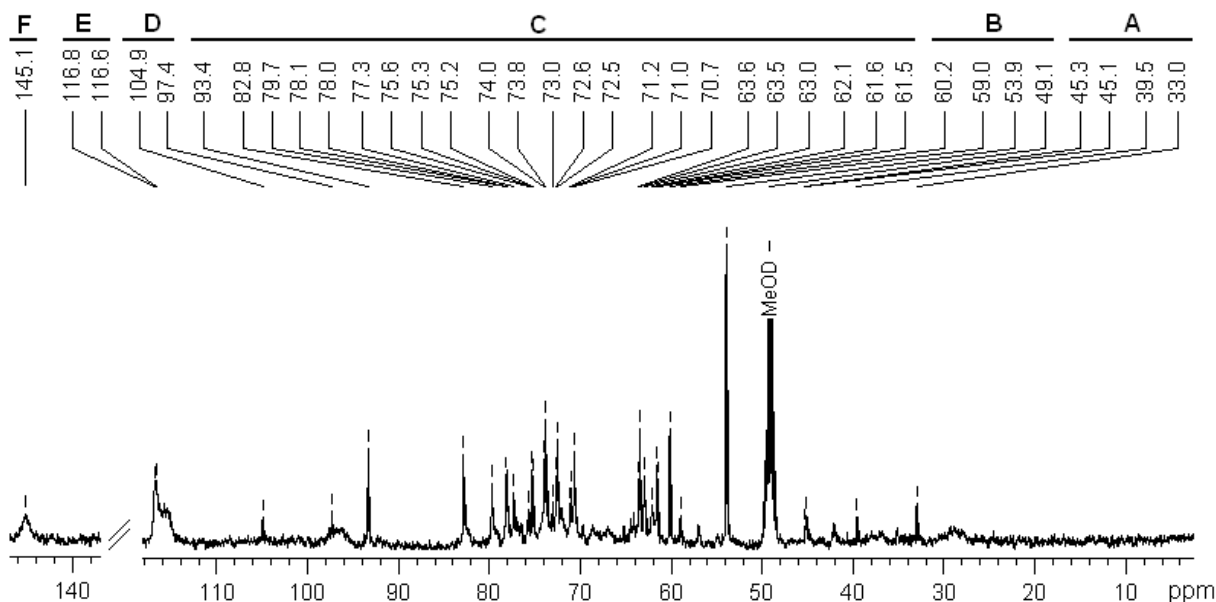


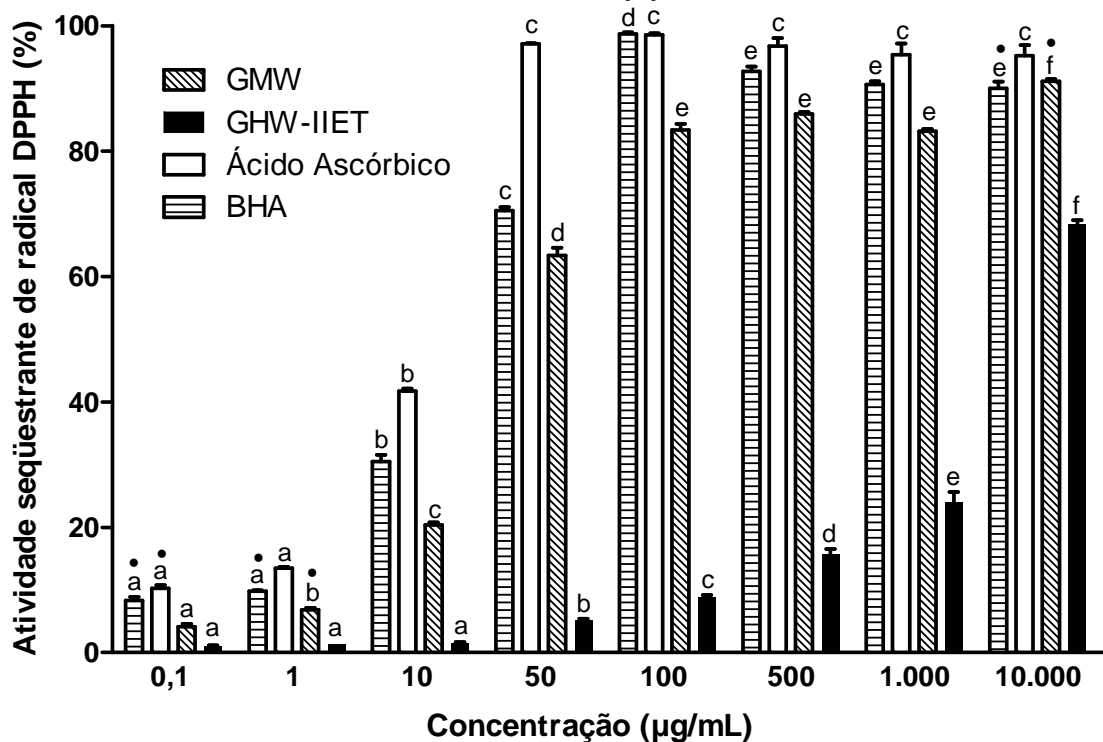
FIGURA 22 - ESPECTRO DE RMN-<sup>13</sup>C (MeOD, 30 °C) DO EXTRATO GMW OBTIDO DAS SEMENTES DE GUARANÁ

Inicialmente, as frações GMW e GHW-IIET foram utilizadas em um ensaio de seqüestro de radical DPPH, empregando-se oito concentrações diferentes (0,1-10.000 µg/mL). Ácido ascórbico (AA) e o butil hidroxianisol (BHA), que são antioxidantes freqüentemente aplicados em alimentos, foram utilizados como controles. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 23.

É possível verificar a atividade antioxidante depende da concentração de amostra empregada. Outros autores também observaram um comportamento similar (YANG *et al.*, 2006; GE *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009).

Em baixas concentrações a fração GHW-IIET praticamente não apresentou atividade antioxidante, atingindo apenas 15% de seqüestro de radical DPPH na concentração de 500 µg/mL. Enquanto isso, nesta mesma concentração, o extrato GMW, o ácido ascórbico e o BHA apresentaram atividade de 85,9; 96,7 e 92,7 %, respectivamente.

Nas concentrações de 1.000 e 10.000  $\mu\text{g/mL}$  o polissacarídeo testado (GHW-IIET) apresentou atividade seqüestrante de DPPH de 24 e 68,4% respectivamente. Na maior concentração testada ocorreu forte descoloração da solução de DPPH, reduzindo consideravelmente sua absorbância, porém houve precipitação do polissacarídeo devido ao uso do etanol necessário para solubilização do DPPH. Concentrações mais elevadas não puderam ser testadas devido a esta limitação.



Observação: O símbolo (\*) em cima da letra indica que dentro daquela concentração as amostras não diferem estatisticamente entre si. Letras iguais, dentro da análise da mesma fração ou amostra, nas diferentes concentrações testadas, indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes, dentro da análise da mesma fração ou amostra, nas diferentes concentrações testadas, indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

FIGURA 23 - ENSAIO DE ATIVIDADE SEQÜESTRANTE DE RADICAL DPPH PARA AS AMOSTRAS GMW E GHW-IIET, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, ÁCIDO ASCÓRBICO E BHA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Yang *et al.* (2006) pesquisaram a atividade antioxidante de polissacarídeos extraídos do pericarpo do fruto da lichia, pertencente a mesma família do guaraná

(Sapindaceae). Os autores testaram duas concentrações de polissacarídeo, 50 e 100 µg/mL, e verificaram percentuais de 40,6 e 54,1% de atividade seqüestrante de radical DPPH para uma fração que apresentava 65% de manose, 33% de galactose e 1,4% de arabinose.

Ge *et al.*, (2009) determinaram o poder antioxidante dos polissacarídeos do cálice do fruto *Physalis alkekengi*, tipicamente utilizado na medicina chinesa como agente terapêutico. Os autores obtiveram 4 frações de polissacarídeos, PAVF I, PAVF II-a, PAVF II -b e PAVF III com 107, 500, 170 e 420 KDa, respectivamente. A fração PAVF I, constituída principalmente de arabinose, apresentou o maior potencial antioxidante contra o radical DPPH. Utilizando-se três concentrações de PAVF I (0,5; 1 e 1,5 mg/mL) os percentuais de seqüestro de radical foram 37,2; 46,1 e 53,3 % respectivamente.

Um polissacarídeo extraído do pericarpo de longan, outro fruto pertencente à família do guaraná, composto de 32,8% de arabinose, 33,7% de galactose, 17,6% de glucose e 15,9% de ácido galacturônico (YANG *et al.*, 2009) foi testado quanto ao seu potencial antioxidante, tanto na sua forma original quanto metilada. O percentual de atividade seqüestrante de radical DPPH obtido para o polissacarídeo na concentração de 100 µg/mL foi de 22% e de 53% para a atividade contra o radical superóxido. Os autores verificaram que o grau de metilação diminuiu tanto a capacidade de seqüestro de radical DPPH quanto de anion superóxido. Os autores concluem que as hidroxilas presentes nos polissacarídeos são essenciais na atividade antioxidante (YANG *et al.*, 2010).

Segundo Yang *et al.*, (2010) a arabinose e a galactose desempenham um importante papel na capacidade seqüestrante de radical DPPH. Considerando-se esta afirmação, sabendo que a fração péctica GHW-IIET apresentou 16,4 e 5,5% destes monossacarídeos, respectivamente, pode-se sugerir que, a atividade observada seja em parte proveniente desta característica.

Majhenič, Škerget e Knez, (2007) obtiveram extratos de guaraná em pó utilizando como solventes água, metanol, etanol e acetona em temperatura ambiente e fervura. O extrato metanólico a quente apresentou 17,6% de compostos fenólicos, 3,9% de procianidinas, além de cafeína, catequinas e epicatequinas. Utilizando uma

única concentração de amostra (1 mg/mL), a menor atividade seqüestrante de radical DPPH foi observada para o extrato aquoso, enquanto o extrato metanólico a quente apresentou atividade antioxidante superior a 85%.

O extrato GMW obtido no presente trabalho apresentou percentuais de seqüestro de radical DPPH de 83,1 e 91,1%, para as concentrações de 1 e 10 mg/mL (1.000 e 10.000 µg/mL). Estes dados são semelhantes aqueles observados por Majhenič, Škerget e Knez (2007) para a concentração de 1 mg/mL.

A seguir está apresentado (Figura 24) o resultado referente ao ensaio de atividade seqüestrante de radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), para as amostras GMW e GHW-IIET, em diferentes concentrações. Neste caso foram selecionadas as concentrações que melhor expressaram atividade antioxidante no ensaio com DPPH (100-10.000 µg/mL ou 0,1-10 mg/mL).

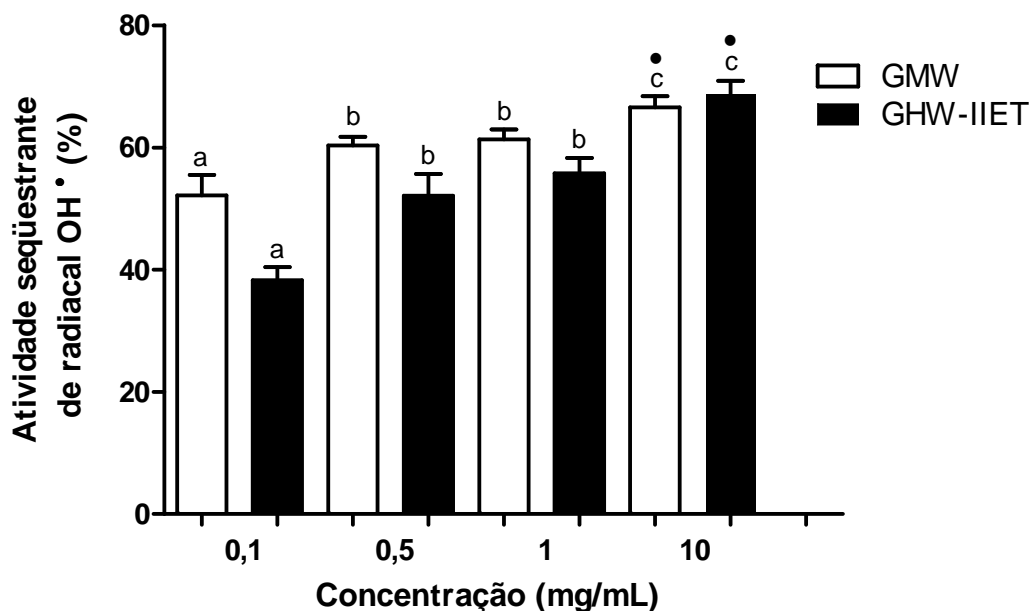
Nota-se maior dependência com relação à concentração testada para a fração GHW-IIET do que para a o extrato GMW, onde para este último a diferença de atividade entre a concentração mais baixa e a mais alta foi de 14,4%, enquanto esta diferença para a fração polissacarídica foi de 30,5%.

A fração GMW exibiu 52, 60, 61,3 e 66,5% de atividade antioxidante no teste de seqüestro do radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), para as respectivas concentrações testadas (0,1; 0,5; 1 e 10 mg/mL). Já a fração péctica (GHW-IIET) mostrou 38,2% (0,1 mg/mL), 52,1% (0,5 mg/mL); 55,8% (1 mg/mL) e 68,7% (10 mg/mL) de atividade antioxidante neste mesmo teste. Vale ressaltar que na maior concentração testada (10 mg/mL) os valores de atividade antioxidante não diferem estatisticamente entre as duas amostras. Os polissacarídeos presentes no pericarpo do fruto da lichia foram testados quanto à sua capacidade seqüestrante de radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ). A menor concentração testada (50 µg/mL) mostrou atividade de 46,8% e a maior concentração (100 µg/mL) de 53,1% (Yang *et al.*, 2006).

Frações polissacarídicas isoladas do cálice do fruto *Physalis alkekengi* apresentaram elevado potencial antioxidante no teste de seqüestro de radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ). Nas concentrações testadas (0,05; 0,1 e 0,15 mg/mL) a fração composta principalmente por arabinose apresentou percentuais de atividade de 61,8; 72,5 e 80,5%, respectivamente. Outra fração, composta por xilose, frutose e glucose também



mostrou forte atividade seqüestrante de radical hidroxila, atingindo até 68,1% quando testada na maior concentração (0,15 mg/mL) (GE *et al.*, 2009).



Observação: O símbolo (•) em cima da letra indica que dentro daquela concentração as amostras não diferem estatisticamente entre si. Letras iguais, dentro da análise da mesma fração ou amostra, nas diferentes concentrações testadas, indicam que não há diferença estatística. Letras diferentes, dentro da análise da mesma fração ou amostra, nas diferentes concentrações testadas, indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

FIGURA 24 - ENSAIO DE ATIVIDADE SEQÜESTRANTE DE RADICAL HIDROXILA (OH•) PARA AS AMOSTRAS GMW E GHW-IIET, OBTIDAS DAS SEMENTES DE GUARANÁ, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Qi *et al.* (2006) verificaram que grupamentos acetil e benzoil proporcionam aumento da atividade antioxidante de polissacarídeos, quando comparados a sua forma natural. No teste de seqüestro de radical hidroxila os autores verificaram maior redução (30,8-70,2%) para o polissacarídeo acetilado (testado nas concentrações 0,25-1,52 g/mL). Segundo os autores o grupamento acetil pode favorecer a ativação do átomo de hidrogênio do carbono anomérico, promovendo a doação deste a um radical, o que promove a interrupção da reação em cadeia.

Sabendo que a fração pécica GHW-IIET possui grupamento acetil em sua estrutura, confirmado pelo sinal em 20,1 ppm no espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 13B,

página 74), é possível que esta característica tenha contribuído para o percentual de atividade seqüestrante de radical hidroxila (QI *et al.*, 2006).

Basicamente existem dois mecanismos envolvidos na atividade antioxidante. Um deles ocorre devido à capacidade que alguns compostos exibem em doar hidrogênio ao radical, e o outro pela habilidade de quelar íons catalíticos envolvidos na reação radicalar (HU; ZHANG; KITTS, 2000). A fração péctica apresentou maior atividade antioxidante contra o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) do que contra o radical DPPH, nas menores concentrações de polissacarídeo testadas (0,1-10  $\mu\text{g/mL}$ ). Isso sugere que dependendo da concentração do polissacarídeo, diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos no seqüestro de radicais.

O extrato GMW, mesmo em concentrações mais baixas, apresentou forte atividade antioxidante, tanto contra o radical DPPH como contra o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ). A partir destes dados, pode-se dizer que os extratos da semente do guaraná podem ser potenciais antioxidantes naturais nas indústrias de alimento, cosmética e farmacêutica (MAJHENIČ; ŠKERGET; KNEZ, 2007). Além disso, pode-se inferir que não somente os compostos de baixa massa presentes no guaraná atuam como antioxidantes, mais que os polissacarídeos também podem desempenhar esta função, conforme demonstrado no presente trabalho.

## 5 CONCLUSÕES

O guaraná apresentou alto rendimento com relação às frações de amido extraídas com DMSO, obtendo-se uma fração com alto teor de amilose e uma segunda fração de amido contendo majoritariamente amilopectina. Estas frações apresentaram comportamento reológico distinto quando analisadas em DMSO 90%. A fração com maior teor de amilopectina apresentou maior viscosidade e maior caráter elástico do que a fração rica em amilose.

As frações pécticas extraídas com água quente apresentaram-se contaminadas por amido, demonstrando que a extração com DMSO não foi totalmente efetiva. Após tratamento com enzimas específicas uma fração péctica foi obtida e caracterizada. Os dados obtidos indicaram que a fração isolada corresponde a uma homogalacturonana com poucas inserções de ramnogalacturonanas e cadeias laterais compostas de arabinose e galactose.

As hemiceluloses apresentaram altos percentuais de xilose, glucose e arabinose e todas as frações mostraram elevados teores de proteínas, removidas por cromatografia de troca iônica, visto que outros métodos testados não foram totalmente eficientes. Após várias etapas de fracionamento, uma D-glucurono-D-xilana, contendo unidades de 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-GlcpA foi isolada e caracterizada a partir do extrato alcalino obtido com NaOH 2M.

Os testes de atividade antioxidante mostram-se promissores para estudos futuros com polissacarídeos do guaraná, já que a fração péctica testada exibiu atividade contra o radical hidroxila, assim como o extrato metanólico rico em compostos fenólicos, que também apresentou forte atividade contra o radical DPPH.

## REFERÊNCIAS

- ÂNGELO, P. C. S. *et al.* Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon rain forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 117–124, 2008.
- AVATO, P.; PESANTE, M. A.; FANIZZI, F. P.; AIMBIRÉ DE MORAIS SANTOS, C. Seed oil composition of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Lipids**, v. 38, n. 7, p. 773-780, 2003.
- BARRETO, D. W.; RIBEIRO, B. D. Evaluation of Oxidation Processes of Guarana Tannins. In: 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering, 2005, Angra dos Reis. **Proceedings of the 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering**, 2005.
- BASILE, A.; FERRARA, L.; PEZZO, M. D.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32-36, 2005.
- BeMILLER, J. N. **Plant Cell Walls: Economic Significance**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 5 p., 2001b.
- BeMILLER, J. N. **Polysaccharides**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 7 p., 2001a.
- BLACK, M. **Seeds**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 6 p., 2001.
- BLASA, M.; GENNARI, L.; ANGELINO, D.; NINFALI, P. Fruit and Vegetable Antioxidants in Health (Chapter 3). In: **Bioactive Foods in Promoting Health**. Tucson, London: Elsevier, 2010. p. 37-58.
- BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. Are hemicelluloses from *Podocarpus lambertii* typical of gymnosperms? **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 2, p. 127-136, 2003.
- BUSATO, A. P.; REICHER, F.; DOMINGUES, R.; SILVEIRA, J. L. M. Rheological properties of thermally xyloglucan gel from the seeds of *Hymenaea courbaril*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 410-414, 2009.
- BUSATO, A. P.; VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*, **Phytochemistry**, v. 58, n. 3, p. 525-531, 2001
- BUSHNEVA, O. A.; OVODOVA, R. G.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Structural studies on hairy region of pectic polysaccharide from campion *Silene vulgaris* (*Oberna behen*). **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 4, p. 471-478, 2002.

BYDLOWSKI, S.P., YUNKER, R.L., SUBBIAH, M.T.R. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 535–538, 1988.

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.

CAMPOS, A. R.; BARROS, A. I. S.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199–1202, 2003.

CARDOSO, S. M.; SILVA, A. M. S.; COIMBRA, M. A. Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 10, p. 917–924, 2002.

CARPITA, N. C.; GD-IBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, v. 3, p. 1–30, 1993.

CARPITA, N. C.; SHEA, E. M. Linkage structure of carbohydrates by gaschromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMAN, C. J.; MCGINNIS, G. D. **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. CRC Press: Florida, 1989, p. 157–217.

CHAMBERLAIN, E. K.; RAO, M. A. Rheological properties of acid converted waxy maize starches in water and 90% DMSO/10% water. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, n. 4, p. 251–260, 1999.

CHATTOPADHYAY, N.; GHOSH, T.; SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, K.; KARMAKAR, P.; RAY, B. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 823–829, 2010.

CHEN, H.; ZHANG, M.; XIE, B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1–2, p. 17–21, 2005.

CHEN, P.; YU, L.; SIMON, G.; PETINAKIS, E.; DEAN, K.; CHEN, L. Morphologies and microstructures of cornstarches with different amylose–amylopectin ratios studied by confocal laser scanning microscope. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 2, p. 241–247, 2009.

CHRASTIL, J. Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. **Carbohydrate Research**, v. 159, n. 1, p. 154–158(1987).

CHUNG, H.; LIU, Q. Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. **Carbohydrate Research**, v. 77, n. 4, p. 807-815, 2009.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; DE SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acid heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 2, p. 274-278, 2008.

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

CLAUDINO, G. P.; SIMÕES, J. B.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R.; MATHIAS, L. Chemical constituents and lethality of *Paullinia weinmanniaefolia* (Sapindaceae) against *Artemia salina* Leach. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19 n. 1A, p. 26-28, 2009.

COOREMAN, F. L.; VAN RENSBURG, H.; DELCOUR J. A. Pasting Profiles and Solubility of Native and Cross-Linked Corn Starch in Dimethylsulfoxide-Water Mixtures. **Journal of Cereal Science**, v. 22, n. 3, p. 251–257, 1995.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. Nature Reviews. **Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

DAVIES, J. M. **Extracellular Matrix**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 11 p., 2001.

DE OLIVEIRA, C. M.; IACOMINI, M.; ALQUINI, Y.; GORIN, P. A. J. Microscopic and NMR analysis of the external coat from seeds of *Magonia pubescens*. **New Phytologist**, v. 152, p. 501–509, 2001.

DE VASCONCELOS, C. L.; PEREIRA, M. R.; FONSECA, J. L. C. Solvent Composition and Rheology of Starch–DMSO–Water Solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 80, n. 8, p. 1285–1290, 2001.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p. 945-954, 2009.

DJORDJEVIĆ, V. B. Free Radicals in Cell Biology. **International Review of Cytology**, v. 237, p. 57-89, 2004.

DUBOIS, M.; GD-ILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EL-NOKALY, M. A.; SOINI, H. A. (eds). Polysaccharide Applications: Cosmetics and Pharmaceuticals. Washington, DC: **American Chemical Society**, 347 p., 1999.

ERICKSON, H. T.; CORRÊA, M. P. F.; ESCOBAR, J. R. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a commercial crop in Brazilian Amazonia. **Economic Botany**, v. 38, n. 3, p. 273-286, 1984.

ESPINOLA, E. B.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 55, p. 223–239, 1997.

FALK, H.; STANEK, M. Two-Dimensional  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy and the Structural Aspects of Amylose and Amylopectin. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly**, v. 128, n. 8-9, p. 777-784, 1997.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, n. 1, p. 157–162, 1991.

FRY, S. C. **Plant Cell Walls**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 11 p., 2001.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; HEIDOR, R.; SILVA, T. C.; ATROCH, A.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Protective effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 862–867, 2006.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; NAGAMINE, M. K.; BARBUTO, J. A.; RAO, K. V.; DAGLI, M.L.Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 305-310, 2008.

GE, Y.; DUAN, Y.; FANG, G.; ZHANG, Y.; WANG, S. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: Isolation, purification, structural features and antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 188-193, 2009.

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. **Carbohydrate Research**, v. 142, n.2, p. 253-267, 1985.

GORIN, P. A. J.; TEIXEIRA, A. Z. A.; TRAVASSOS, L. R.; LABOURIAU, M. L. S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydrate Research**, v. 282, n. 2, p. 325–333. 1996.

HABIBI, Y.; HEYRAUD, A.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R. Structural features of pectic polysaccharides from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 6, p. 1119-1127, 2004.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. R Isolation and structure of D-xylans from pericarp seeds of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. **Carbohydrate Research**, v. 337, n. 17, p. 1593-1598, 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals (Chapter 12). In: **Functional Metabolism Regulation and Adaptation**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. p. 319-368.

HU, C.; ZHANG, Y.; KITTS, D. D. Evaluation of Antioxidant and Prooxidant Activities of Bamboo *Phyllostachys nigra* Var. *Henonis* Leaf Extract in Vitro. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 510-517, p. 3170-3176, 2000.

**IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**, 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 01 dez, 2008.

INGROUILLE, M. **Fruit**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 3 p., 2002.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 284, n. 1, p. 1-9, 1996.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydrate Chemistry**. v. 5, p. 36-38, 1965.

KAPOOR, B.; BHATTACHARYA, M. Steady shear and transient properties of starch in dimethylsulfoxide. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 3, p. 217-231, 2001.

KARDOŠOVÁ, A.; MACHOVÁ, E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. **Fitoterapia**, v. 77, n. 5, p. 367-373, 2006.

KOOP, H. S.; PRAES, C. E. O.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C. L. O.; SILVEIRA, J. L. M. Rheological behavior of gel of xanthan with seed galactomannan: Effect of hydroalcoholic-ascorbic acid. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 559-563, 2009.

KURI, C. M. B. The Guaraná Industry in Brazil. **International Business & Economics Research Journal**, v. 7, n. 5, p. 87-98, 2008.

KUSKOSKI, E. M.; ROSEANE, F.; GARCÍA, A. A.; TRONCOSO G. A. M. Chemical and pharmacological properties of the fruit Guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae**, v. 12, n. 2, p. 45-52. 2005.



LAGO, R. C. A.; SIMONE, M. P. S. C.; PINTO, A. On the Occurrence of Cyanolipids in *Paullinia* carpopodea Cambess and *P. cupana* Kunth Seed Oils. **Acta Amazônica**, v. 30, n. 1, p. 101–105, 2000.

LAKO, J.; TRENERRY, V.C.; WAHLQVIST, M.; WATTANAPENPAIBOON, N.; SOTHEESWARAN, S.; PREMIER, R. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1727-1741, 2007.

LEFEBVRE, J.; DOUBLIER, J.L. Rheological behavior of polysaccharides aqueous systems. In: **Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility**. Marcel Dekker: New York, 2005, p. 357-394.

LIU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; ZHOU, C.; ZHANG, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008.

LOFTY, S. Controlling degradation of low-molecular-weight natural polymer “dextrin” using gamma irradiation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 1, p. 57–63, 2009.

LUO, A.; HE, X.; ZHOU, S.; FAN, Y.; LUO, A.; CHUN, Z. Purification, composition analysis and antioxidant activity of the polysaccharides from *Dendrobium nobile* Lindl. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 1014-1019, 2010.

MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MATHERS, N. J.; XU, Z.; BLUMFIELD, T. J.; BERNERS-PRICE, S. J.; SAFFIGNA P. G. Composition and quality of harvest residues and soil organic matter under windrow residue management in young hoop pine plantations as revealed by solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. **Forest Ecology and Management**, v. 175, p. 467-488, 2003.

MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Xylans from the Medicinal Herb *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 1, p. 129-132, 2005.

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

MORRISON, I. M. **Polysaccharides: Plant Noncellulosic**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 7 p., 2001.

MUKERJEA, R.; MUKERJEA, R.; ROBYT, J. F. Starch biosynthesis: experiments on how starch granules grow in vivo. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 1, p. 67–73, 2009.

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

NONOGAKI, H. **Seed Germination and Reserve Mobilization**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 9 p., 2008.

O'NEILL, M. A.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. **Pectic Substances**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, p. 1-11, 2001.

OLIVEIRA, R.; MAQUES, F.; AZEREDO, J. Purification of polysaccharides from a biofilm matrix by selective precipitation of proteins. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 391–393, 1999.

PAGLIARUSSI, R. S.; FREITAS, L. A. P.; BASTOS, J. K. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 371-374, 2002.

PELEGRINI, D. D.; TSUZUKI, J. K.; AMADO, C. A. B.; CORTEZ, D. A.G.; FERREIRA, I. C. P. Biological Activity and Isolated Compounds in *Sapindus saponaria* L. and other Plants of the Genus *Sapindus*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 922-227, 2008.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.

PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpiniaceae. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 737-743, 1998.

PETKOWICZ, C. L. O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F. R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Research**, v. 44, n. 2, p. 107-112, 2001.

QI, H.; ZHANG, Q.; ZHAO, T.; HU, R.; ZHANG, K.; LI, Z. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 9, p. 2441–2445, 2006.

RAVI, V.; SIDDARAMAIAH; PRAMOD KUMAR, T. M. Influence of natural polymer coating on novel colon targeting drug delivery system. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, p. 2131–2136, 2008.

RINAUDO, M. Advances in Characterization of Polysaccharides in Aqueous Solution and Gel State. In: **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**, Marcel Dekker: New York, 2005, p. 237-252.

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

SAEMAN, J. F. *et al.* Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi Journal**, v. 37, p. 336-343, 1954.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially *O*-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Review: Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 317– 333, 2006.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos teóricos e práticos**. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora Ltda., 2006, 233 p.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SHON, K. J.; LIN, S. T.; YOO, B. Rheological Properties of Rice Starch Dispersions in Dimethyl Sulfoxide. **Starch**, v. 57, n. 8, p. 363–369, 2005.

SIMAS-TOSIN, F. F.; WAGNER, R.; SANTOS, E. M. R.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharide of nectarine gum exudate: Comparison with that of peach gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 485-487, 2009.

SINGLETON, V. L.; ESAU, P. Phenolic substances in grapes and wine and their significance. **Advance in Food Research**, v. 1, p. 1–282, 1969.

SOLORZA-FERIA, J.; JIMÉNEZ-APARICIO, A.; ARENAS-OCAMPO, M. L.; BELLO-PÉREZ, L. A. Rheology of *Okenia hypogaea* Starch Dispersions in Aqueous Solution of DMSO. **Starch – Stärke**, v. 54, n. 5, p. 198-202, 2002.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p.19-23, 1952.

SPAGOLLA, L. C.; SANTOS, M. M.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 59-64, 2009.

STANLEY, D. W.; GOFF, H. D.; SMITH, A. K. Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions. **Food Research International**. v. 29, n. 1, p. 1-33, 1996.

STONE, B. A.; ANDERSON, M. A. A radiochemical approach to the determination of carboxylic acid groups in polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, n. 2, p. 115-129, 1985.

SUBBIAH, M. T.; YUNKER, R. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guarana (*Paullinia cupana*). **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 78, n. 2, p. 96-101, 2008.

SUN, X.; SUN, R.; FOWLER, P.; BAIRD, M. S. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 860–870, 2005.

TANG, H.; BELTON, P. S.; NG, A.; RYDEN, P.  $^{13}\text{C}$  MAS NMR Studies of the Effects of Hydration on the Cell Walls of Potatoes and Chinese Water Chestnuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 510-517, 1999.

TAO, Y.; ZHANG, L. Characterization of polysaccharide–protein complexes by size-exclusion chromatography combined with three detectors. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 13, p. 2251-2257, 2008.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric Depolymerization of Polyuronides and Glycosaminoglycuronans to Monosaccharides following Reduction of Their Carbodiimide-Activated Carboxyl Groups. **Biochemistry**, v. 11, n. 8, p. 1383–1389, 1972.

TEIXEIRA-SÁ, D. M. A.; REICHER, F.; BRAGA, R. C.; BELTRAMINI, L. M.; MOREIRA, R. A. Isolation of a lectin and a galactoxyloglucan from *Mucuna sloanei* seeds. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17-18, p. 1965-1972, 2009.

TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P.; MENEGÁRIO, T. F.; TOLEDO, M. C. F. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 63-68, 2007.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, E. X.; PARK, K. J. Review: Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n.2, p.181-204, 2005.

UEDA, J.; SAITO, N.; SHIMAZU, Y.; OZAWA, T. A Comparison of Scavenging Abilities of Antioxidants against Hydroxyl Radicals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 2, p. 377-384, 1996.

VIG, A. P.; RAMPAL, G.; THIND, T. S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates – A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1561–1572, 2009.

VIGNON, M. R.; GEY, C. Isolation,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR studies of (4-*O*-methyl-D-glucurono) - D-xylans from luffa fruit fibres, jute bast fibres and mucilage of quince tree seeds. **Carbohydrate Research**, v. 307, n. 1-2, p. 107-111, 1998.

VINOGRADOV, E.; WASSER, S. P. The structure of a polysaccharide isolated from *Inonotus levis* P. Karst. mushroom (Heterobasidiomycetes). **Carbohydrate Research**, v. 340 p. 2821-2825, 2005.

VRIESMANN, L. C. **Extração, Caracterização e Aspectos Reológicos de Polissacarídeos da Polpa dos Frutos de *Theobroma Grandiflorum* (Cupuaçu)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L.M; PETKOWICZ, C. L. O. Chemical and rheological properties of a starch-rich fraction from the pulp of the fruit cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 2, p. 651-656, 2009.

VRIESMANN, L. C.; SILVEIRA, J. L.M; PETKOWICZ, C. L. O. Rheological behavior of a pectic fraction from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 312-317, 2010.

WALDVOGEL, S. R. Caffeine - A Drug with a Surprise. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 6, p. 604 – 605, 2003.

WANG, F.; LI, J.; JIANG, Y. Polysaccharides from mulberry leaf in relation to their antioxidant activity and antibacterial ability. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 2008.

WILLATS, W. G.T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

WU, P. W.; HWANG, L. S. Determination of soluble persimmon tannin by high performance gel permeation chromatography. **Food Research International**, v. 35, n. 8, p. 793-800, 2002.

XU, W.; ZHANG, F.; LUO, Y.; MA, L.; KOU, X.; HUANG, K. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 2, p. 217-222, 2009.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L.A.; CANTELI, V.C.; USHIROBIRA, T.M.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; PALAZZO DE MELLO, J.C. Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1950-1963, 2007.

YANG, B.; JIANG, Y.; ZHAO, M.; CHEN, F.; WANG, R.; CHEN, Y.; ZHANG, D. Structural characterisation of polysaccharides purified from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 609-614, 2009.

YANG, B.; WANG, J.; ZHAO, M.; LIU, Y.; WANG, W.; JIANG, Y. Identification of polysaccharides from pericarp tissues of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit in relation to their antioxidant activities. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 5, p. 634-638, 2006.

YANG, B.; ZHAO, M.; PRASAD, N.; JIANG, G.; JIANG, Y. Effect of methylation on the structure and radical scavenging activity of polysaccharides from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 364-368, 2010.

YANG, B.; ZHAO, M.; SHI, J.; YANG, N.; JIANG, Y. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 685-690, 2008.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 428-432, 2008.

YU, L., ZHANG, X., LI, S., LIU, X., SUN, L., LIU, H., ITEKU, J., ZHOU, Y., TAI, G. Rhamnogalacturonan I domains from ginseng pectin, **Carbohydrate Polymers** (2009), doi: 10.1016/j.carbpol.2009.08.028.

ZHONG, R.; YE, Z. **Secondary cell walls**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, 9 p., 2009.