

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO
SACARÍDICA DO COPRODUTO DA BIOFERMENTAÇÃO ETANÓLICA DA
BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam).**

Jonas Chaves Alvim

Orientador: Sérgio Donizeti Ascêncio

**PALMAS – TO
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO
SACARÍDICA DO COPRODUTO DA BIOFERMENTAÇÃO ETANÓLICA DA
BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam).**

Jonas Chaves Alvim

Orientador: Sérgio Donizeti Ascêncio

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Tocantins como
parte dos requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Agroenergia.**

**PALMAS – TO
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins

Campus Universitário de Palmas

A475c Alvim, Jonas Chaves
Composição e caracterização química da fração sacarídica do coproduto da biofermentação etanólica da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) / Jonas Chaves Alvim. – Palmas, 2014.
89f.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins, Mestrado em Agroenergia.

Linha de pesquisa: Processos de obtenção de biocombustíveis e avaliação de aproveitamento de seus resíduos.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascênsio.

1. Carboidratos. 2. Caracterização química. 3. Fracionamento. 4. Resíduos agroindustriais. 5. Polissacarídeos. 6. Oligossacarídeos. I. Ascênsio, Sérgio Donizeti. II. Universidade Federal do Tocantins. III. Título.

CDD 612.3

Bibliotecária: Emanuele Santos

CRB-2: 1309

Todos os Direitos Reservados – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do código penal.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO
SACARÍDICA DO COPRODUTO DA BIOFERMENTAÇÃO ETANÓLICA DA
BATATA-DOCE (*Ipomoea batatas* (L.) Lam).

ALUNO: Jonas Chaves Alvim

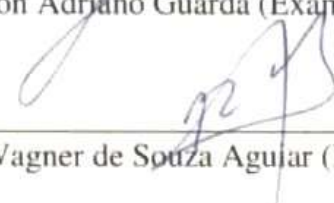
Data da Defesa: 31/03/2017



Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascênsio (Presidente- UFT)



Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda (Examinador Interno - UFT)



Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar (Examinador Externo – UFT)

“If you have an apple and I have an apple and we exchange our apples, we each have one apple. But if you have an idea and I have an idea and we exchange our ideas, we each have two ideas.”

Charles F. Brannan

Dedico este trabalho a minha família por todo o suporte incondicional, em especial ao meu pai, Tarso da Costa Alvim, a minha mãe Heloisa Maria Ganns Chaves Alvim, meu falecido avô Geraldo Martins Chaves e com todo o amor do mundo a minha esposa Fernanda Aparecida Lima Silva Alvim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois sem a sua benção nada pode ser alcançado nesta vida, por ter me dado a oportunidade de estar nesta universidade, trabalhar com as pessoas que trabalhei e crescer mental e espiritualmente durante este período.

Não há palavras para agradecer aos meus pais, Tarso da Costa Alvim e Heloisa Maria Ganns Chaves Alvim, por todas as oportunidades e ajuda ao longo desta caminhada, assim como os meus irmãos Breno Ganns Chaves Alvim e Marcel Chaves Alvim. Um agradecimento especial deve ser feito ao meu falecido avô Geraldo Martins Chaves não somente por toda inspiração, mas por todo apoio.

À Fernanda Aparecida Lima Silva Alvim, minha esposa, por todo apoio, carinho, ensinamentos e momentos vividos, pois tenho certeza que sem você ao meu lado ao longo de todos estes anos não teria alcançado sequer uma fração disto tudo.

Ao meu orientador Professor Sérgio por todos ensinamentos passados.

Aos meus colegas do mestrado pela convivência agradável e debates construtivos.

Aos técnicos de laboratório da Universidade Federal do Tocantins do Complexo de Laboratórios de Medicina e do LASPER e do LEDBIO, por toda paciência e ajuda durante os experimentos.

Ao professor D.Sc. Diogo Ducatti da Universidade Federal do Paraná por disponibilizar seu tempo e laboratório para execução e discussão de experimentos.

A todas as pessoas que em ajudaram ao longo destes anos.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral:.....	20
2.2. Objetivos específicos:.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1. Biocombustíveis e bioetanol	21
3.2. Batata-doce: Características, uso e composição.....	23
3.3. Coprodutos agroindustriais e seu uso no conceito de biorefinarias 25	
3.4. Carboidratos	29
3.4.1. Análise de carboidratos	30
3.4.2. Galactanas	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Preparo e obtenção do material.....	36
4.2. Extração e obtenção dos carboidratos	39
4.3. Purificação e quantificação dos carboidratos.....	40
4.4. Curva de hidrólise e hidrólise ácida total dos carboidratos	41
4.5. Teste qualitativo e quantitativo para proteínas	41
4.6. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	42
4.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	42
4.8. Redução e acetilação	43
4.9. Cromatografia gasosa (CG) e espectrometria da massa (MS)	44
4.10. Análise de ressonância magnética nuclear (RMN).....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Preparo e obtenção do Material.....	46
5.2. Extração e obtenção dos carboidratos	46

5.3. Purificação e quantificação dos carboidratos totais	47
5.4. Curva de hidrólise e hidrólise ácida total dos carboidratos	48
5.5. Teste qualitativo e quantitativo proteínas	48
5.6. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	49
5.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	50
5.8. Redução e acetilação	57
5.9. Cromatografia Gasosa (CG) e espectrometria da massa (MS)	57
5.10. Análise de ressonância magnética nuclear (RMN).....	62
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMO

A crescente demanda de combustível leva a procura por um que seja produzido a partir de uma fonte limpa e renovável. A biofermentação da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) para a produção de biocombustíveis gera um resíduo que muitas vezes é descartado no campo mas por ser rico em proteínas e carboidratos outros usos e aplicações podem e devem ser exploradas. O objetivo deste trabalho foi estudar a composição e estrutura química fina dos carboidratos presentes no coproduto proveniente da biofermentação etanólica de batata-doce. O coproduto foi submetido a duas extrações aquosas consecutivas, extração aquosa fria (AQF) e uma extração aquosa quente (AQQ). Os carboidratos extraídos, fracionados (oligossacarídeos e polissacarídeos), purificados e hidrolisados foram submetidos a diferentes técnicas cromatográficas (Cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas) visando a composição monossacarídica e quantificação destes. A caracterização estrutural dos carboidratos foi feita por meio de ressonância magnética nuclear. Foi possível quantificar e identificar por meio de técnicas de alta precisão (CG e CLAE) os monossacarídeos presentes. Glicose é o principal componente da fração oligossacarídica e a galactose da polissacarídica, foi possível ainda identificar a presença de manose, xilose, ramnose e arabinose em menores quantidades. A análise estrutural mostrou que a fração polissacarídica tem como componente uma possível arabinogalactana do tipo I (com cadeia principal composta de $(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-Galp}$). Estes polímeros são amplamente estudados em virtude dos seus benefícios quando ingeridos, dentre eles combatem diversos vírus prejudiciais, atividade bifidogênica, benefícios relacionados ao sistema imune e relacionadas ao câncer. Assim, faz-se necessário o estudo continuado deste coproduto além de suas possíveis atividades biológicas.

ABSTRACT

The growing in the demand and need for fuels lead to the search for a renewable and clean source. The biofermentation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) for the production of biofuel generates a waste which is in the most times disposable in field, but the characteristics of this waste (rich in protein and carbohydrate) makes it susceptible for being studied and other uses exploited, making it a coproduct of the production. The goal of this work was the study of the composition and chemical structure of the carbohydrates found in the coproduct of the fermentation of sweet potato. Underwent this coproduct to two consecutive water extractions, cold-water extraction (CWE) and hot-water extraction (HWE). The extracted, fractioned (oligosaccharides and polysaccharides), hydrolyzed and purified carbohydrates underwent to different chromatography techniques (Thin layer chromatography, high precision liquid chromatography and gas chromatography with mass spectrometry) to clarify the composition and quantity of monosaccharides. Nuclear magnetic resonance (NMR) was used to the structural characterization of the carbohydrates. With the use of high precision techniques (GC-MS and HPLC) it was possible to identify and quantify the sugars. Glucose is the main component founded in the oligosaccharide fraction and galactose in the polysaccharides, was possible to identify the presence of mannose, xylose, rhamnose and arabinose in fewer quantities. The structural analyses show that the polysaccharide fraction has a type I arabinogalactana (composed by (1→4)- β -Galp as the backbone). Those polymers are highly studied because of the benefits when ingested, for example the combat to virus, bifidogenic activity, related to be beneficial to the immune system and to cancer. Therefore, the continued study of this coproduct is necessary and the possible health benefits.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Conceito de biorefinarias aplicado a produção de bioetanol de batata-doce agregando a obtenção de outros produtos em conjunto com o biocombustível.	27
Figura 2: Ilustração dos sinais químicos de carboidratos de ^1H obtidos por ressonância magnética nuclear (fonte: CUI, 2005).....	32
Figura 3: Ilustração dos sinais químicos de carboidratos de ^{13}C obtidos por ressonância magnética nuclear (fonte: CUI, 2005).....	33
Figura 4: Fluxograma para obtenção do coproduto da biofermentação etanólica da batata doce e posterior liofilização do mesmo.....	37
Figura 5: Fluxograma demonstrando as principais etapas aplicadas ao coproduto visando análise de composição e estrutura dos carboidratos.	38
Figura 6: Teste qualitativo para identificar presença/ausência de proteína nas amostras.	48
Figura 7: Cromatografia em camada delgada das frações sacarídicas do coproduto da biofermentação etanólica da batata-doce.....	49
Figura 8: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQF 100% H_2O , pc. 1 = glicose; pc. 2 = galactose; pc. 3 = não identificado	51
Figura 9: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQF 10% ETOH, pc. 1 = maltose; pc. 2 = glicose; pc. 3 = galactose; pc. 4, 5 e 6 = não identificados.....	51
Figura 10: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQF 20% ETOH, pc. 1 = maltose; pc. 2 = glicose; pc. 3 e 4 = não identificados.	52
Figura 11: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQQ 100% H_2O , pc. 1 = glicose; pc. 2 = galactose; pc. 3 = não identificado	52
Figura 12: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQQ 10% ETOH, pc. 1 = maltose; pc. 2 = glicose; pc. 3 = galactose; pc. 4, 5 e 6 = não identificados. ...	53
Figura 13: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQQ 20% ETOH, pc. 1 = maltose; pc. 2 = glicose; pc. 3 e 4 = não identificados.	53
Figura 14: Cromatograma CLAE polissacarídeos AQF, pc. 1 = melezitose; pc. 2 = não identificado; pc. 3 = maltose; pc. 4 = glicose; pc. 5 = galactose e pc. 6 = não identificado	54

Figura 15: Cromatograma CLAE polissacarídeos AQQ, pc. 1 = melezitose; pc. 2 = não identificado; pc. 3 = maltose; pc. 4 = glicose; pc. 5 = galactose e pc. 6 = não identificado	54
Figura 16: Cromatograma CG polissacarídeos e picos (pc.) identificados pelo tempo de retenção, pc. 1 = ramnose; pc. 2 = arabinose; pc. 3 = xilose; pc. 4 = manose; pc. 5 = glicose, pc. 6 = galactose e espectros de massa pc. 7 = N-acetilglicosamina e pc. 8 = N-acetilgalactosamina	58
Figura 17: Espectro de massa ramnose (pc. 1 figura 16) tempo de retenção 7,887 minutos.....	59
Figura 18: Espectro de massa arabinose (pc. 2 figura 16) tempo de retenção 8,617 minutos.....	59
Figura 19: Espectro de massa xilose (pc. 3 figura 16) tempo de retenção 9,287 minutos.....	59
Figura 20: Espectro de massa manose (pc. 4 figura 16) tempo de retenção 12,491 minutos.....	60
Figura 21: Espectro de massa galactose (pc. 5 figura 16) tempo de retenção 13,096 minutos.....	60
Figura 22: Espectro de massa glicose (pc. 6 figura 16) tempo de retenção 13,564 minutos.....	60
Figura 23: Espectro de massa N-acetilglicosamina (pc. 7 figura 16) tempo de retenção 15,873 minutos.....	61
Figura 24: Espectro de massa N-acetilgalactosamina (pc. 8 figura 16) tempo de retenção 17,211 minutos.....	61
Figura 25: Espectro de RMN 1D ¹ H da porção AQF de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 2,22 ppm (¹ H).....	62
Figura 26: Espectro de RMN 1D ¹ H da porção AQQ de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 2,22 ppm (¹ H)	63
Figura 27: Espectro de RMN ¹³ C da porção AQF de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 30,20 ppm (¹³ C).....	66
Figura 28: Espectro de RMN ¹³ C da porção AQQ de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 30,20 ppm (¹³ C).....	66
Figura 29: Espectro de RMN: 2D (HSQC) da porção AQF de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 2,22 ppm (¹ H) e 30,25 ppm (¹³ C).....	67

Figura 30: Espectro de RMN 2D (HSQC) da porção AQQ de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 2,22 ppm (^1H) e 30,25 ppm (^{13}C)	68
Figura 31: Estrutura proposta para representar o polímero constituído de galactose (1→4)- β na cadeia principal com possíveis ramificações de ramnose e arabinose.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento de carboidratos (polissacarídeos e oligossacarídeos) provenientes das extrações quentes (AQQ) e frias (AQF) aplicadas ao coproduto da biofermentação etanólica da batata-doce.....	47
Tabela 2: Quantificação dos açúcares presentes na porção oligossacarídica das extrações AQF (aquosa fria) e AQQ (aquosa quente). Valores apresentados como porcentagem em relação a massa (mg).	55
Tabela 3: Quantificação dos açúcares presentes na porção polissacarídica das extrações AQF (aquosa fria) e AQQ (aquosa quente). Valores apresentados como porcentagem em relação a massa (mg).	56
Tabela 4: Sinais químicos (coluna 2 e 3) referentes ao hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) obtidos na análise de RMN 2D (HSQC) da porção polissacarídica da extração AQF	63
Tabela 5: Comparação entre sinais químicos calculados pelo programa CASPER e os sinais encontrados para a possível cadeia principal do polímero presente na porção polissacarídica da fração AQF	73

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AQF - Aquosa Fria

AQQ - Aquosa Quente

Polis - Polissacarídeos

Oligo - Oligossacarídeos

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG - Cromatografia Gasosa

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

CO₂ - Dióxido de carbono

H₂O - Água

LASPER - Laboratório de Sistemas de Produção e Energia a partir de

Fontes Renováveis

SSF - *Simultaneous saccharification and fermentation*

α - Alfa

β - Beta

→ - Ligação

NREL - *American National Renewable Energy Laboratory*

IUBMB - *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

ppm - partes por milhão

δ - Sigma

TMS - Tetrametilsilano

Galp - galactopiranosose

Arabf - arabinofuranose

NK - *Natural Killer Cytotoxicity*

AmB - Amphotericin B

kg - quilogramas

g - gramas

mg - miligramas

ml - mililitros

l - litros

° - graus

°C - graus Celsius

pH - potencial hidrogeniônico
p/v - peso/volume
rpm - rotações por minuto
CBMM - carboidratos de baixa massa molecular
ETOH - Etanol
kda - quilodaltons
TFA - Ácido trifluoracético
N - normal
M - molar
NH₄OH - Hidróxido de amônio
NaBH₄ - Boroidreto de sódio
CuSO₄ - Sulfato de cobre
μm - micrometros
CHCl₃ - clorofórmio
BuOH - butanol
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
RID - Índice de refração
D₂O- Água deuterada
HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
DVP - Desvio padrão
CV - Coeficiente de variação
UFT- Universidade Federal do Tocantins
μmol - micromol
pc. - pico
CASPER - *Computer-assisted spectrum evaluation of regular polyssacharides*
I.A.A - Instituto de Açúcar e Alcool
GalNAc - N-acetilgalactosamina
GluNAc - N-acetilglucosamina

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos o mundo vem se deparando com uma crescente demanda por combustível e a conseqüente redução de sua disponibilidade, resultando no aumento do preço dos combustíveis fósseis. Em virtude disso, faz-se necessária a substituição, total ou parcial desses, por fontes renováveis de energia. Deste modo, combustíveis produzidos a partir de fontes limpas e renováveis, há muito, são procurados. Dentre as possibilidades conhecidas, aqueles provenientes da biomassa (biocombustível) se mostram cada vez com maior potencial (OLSSON et al. 1998; KLASS, 2004; HUBER, IBORRA e CORMA, 2006).

O estudo da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), como potencial matéria-prima para a produção de biocombustíveis não é recente. Pode-se citar estudo desenvolvido no Instituto de Açúcar e Alcool (I.A.A) em 1978, quando se obteve até 158 litros, por tonelada de raiz (ARAÚJO et al. 1978). Sua viabilidade está em constante crescimento. Seu uso gera resíduos que muitas vezes são descartados no campo. No entanto, devido à composição de suas biomoléculas (ricos em proteínas e carboidratos), outros usos e aplicações podem e devem ser exploradas (SCHWARTZ, 2008; JIN et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

Carboidratos, principalmente polissacarídeos, são amplamente estudados por apresentarem diversas atividades biológicas como, por exemplo, antitumoral, imonomodulatória, anti-inflamatórias e antiviral (YOO et al., 2004; PARK, LAI e KIM, 2004; OLIVEIRA et al., 2013). Uma vez que isso está diretamente relacionado com a atividade apresentada, faz-se necessário conhecer a estrutura dos carboidratos. Segundo Dimitriu (1998) a análise

estrutural pode oferecer o conhecimento fundamental para entender a função dos polissacarídeos.

Assim, informações acerca da quantidade e das características químicas estruturais dos carboidratos presentes no resíduo obtido do processo de biofermentação etanólica da batata-doce são de extrema importância, principalmente visando entender, de maneira clara, a sua composição sacarídica e avaliar seus possíveis usos. Haja vista que esse vem sendo testado, como fonte nutricional animal e humana, o que agrega valor à cadeia produtiva de bioetanol, a partir da batata-doce (ASSUNÇÃO & ALVIM, 2007; SILVA & ALVIM, 2009; SILVA & ALVIM, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi extrair, isolar, quantificar e elucidar, a composição e estrutura química fina dos carboidratos presentes no coproduto proveniente da biofermentação etanólica de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam).

2.2. Objetivos específicos:

- ❖ Extrair os carboidratos do coproduto de *Ipomoea batatas* (L.) Lam;
- ❖ Fracionar os carboidratos, separando oligossacarídeos de polissacarídeos;
- ❖ Apresentar a composição monossacarídica de ambas as frações e do coproduto como um todo, avaliando-as quantitativamente e qualitativamente;
- ❖ Analisar a estrutura química fina dos carboidratos presentes no coproduto;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Biocombustíveis e bioetanol

Na maioria dos países desenvolvidos a energia utilizada é, em parte, dependente de importação e mais de 90% é proveniente de fontes não renováveis (LEE et al. 2012). Diversos modelos foram criados e discutidos, ao longo dos anos, para mostrar quais os maiores problemas causados por essa dependência em fontes não renováveis, tanto econômicos quanto ambientais. Como exemplos principais pode-se citar a pressão no fornecimento de petróleo, o aumento das emissões de CO₂ em virtude dessa crescente demanda e a poluição ambiental (JEBARAJ & INIYAN, 2006; FARREL et al., 2006).

A pressão no fornecimento de petróleo resulta no decréscimo das reservas mundiais dessa *commoditie* com conseqüente aumento do preço desse o que leva a necessidade de se ter uma opção viável para garantir o fornecimento de energia em uma situação de crise. O aumento das emissões de CO₂ acarreta, principalmente, a alteração do clima na Terra (aquecimento global). Tais problemas, vêm servindo como guias para novas iniciativas governamentais buscando aumentar as alternativas para o fornecimento de energia. Dentre elas, principalmente, o bioetanol é alvo de pesquisas em todo mundo (JEBARAJ & INIYAN, 2006; FARREL et al., 2006).

No Brasil, desde o início na década de 70, em virtude da implantação do Programa Nacional do Alcool, novas fontes de matérias primas começaram a ser testadas. As altas quantidades de amido e a alta adaptabilidade ao clima e solo das tuberosas as colocam como promissoras para manter os estoques de bioetanol, quando comparadas as culturas usuais, por exemplo a cana-de-açúcar (UFT, 2008; SHEN et al. 2012).

A agricultura de energia provém de quatro fontes de biomassa: derivadas de cultivos ricos em carboidratos; derivadas de lipídios (animal e vegetal); a madeira e por fim os resíduos e dejetos (agroindústria e agropecuária). Visando nortear o desenvolvimento desse setor, de maneira ordenada, no ano de 2006 criou-se o Plano Nacional de Agroenergia, destacando assim a importância de alterar-se a matriz energética nacional e propondo maneiras para isso, por meio de diretrizes (BRASIL, 2006). Nesse âmbito, Castro (2009) enfatizou que a agroenergia coloca-se como alternativa econômica e ambientalmente viável na busca por fontes renováveis de energia limpa.

Hill et al. (2006) destacam que, para um biocombustível ser considerado alternativa viável, deve proporcionar um ganho líquido de energia, benefícios ambientais, competitividade econômica e capacidade de produção, sem comprometer o fornecimento de alimentos. A bioenergia, principalmente o bioetanol, é considerada como fonte chave para a energia renovável no futuro, abrangendo tanto benefícios econômicos quanto ambientais (LEE et al., 2012).

Os biocombustíveis podem ser produzidos a partir de diversas matérias primas. Os chamados biocombustíveis de primeira geração são aqueles obtidos de culturas onde os açúcares podem estar livres ou parcialmente livres. Nos Estados Unidos destaca-se o milho, enquanto que no Brasil utiliza-se principalmente a cana-de-açúcar (NEXANT, 2008; HOEKMAN, 2009; GHATAK, 2011). Essas culturas são divididas em dois grupos, as fontes sacarinas, destacando-se a cana-de-açúcar e a beterraba sacarina, e as fontes amiláceas, dentre as quais pode-se citar o milho, a mandioca e a batata. Nessas, o açúcares se encontram na forma de amido (polímero de glicose que os vegetais sintetizam para armazenar energia) (HALFORD, 2010; ZHANG et al., 2010).

Após a colheita e preparo da matéria prima, a produção de etanol em escala industrial, a partir de fontes amiláceas, consiste de três etapas principais. O amido necessita ser hidrolisado enzimaticamente através da adição de enzima liquidificante (α -amilase), no intuito de evitar a gelatinização (etapa de liquefação), e então cozido a altas temperaturas. Na sequência, os fragmentos restantes de amido são hidrolisados até glicose por uma enzima sacarificante (glicoamilase). A essa mistura, microrganismos fermentadores são adicionados (etapa de fermentação), que convertem glicose em etanol (ZHANG et al., 2010; LEE et al., 2012).

Contextualizada com essa nova demanda, a Universidade Federal do Tocantins, através do Laboratório de Sistemas de Produção e Energia a partir de Fontes Renováveis (LASPER/UFT), vem conduzindo pesquisas nesse domínio desde 2000. Dentre essas, ressalta-se a seleção de cultivares de batata-doce com características específicas para produção de etanol. Desde o início desses trabalhos já se obtiveram avanços no manejo da biomassa, melhoramento genético, caracterização química e produção de etanol em escala laboratorial e piloto (TAVARES & SILVEIRA, 2004; UFT, 2008).

As técnicas e tecnologias para o desenvolvimento e melhoramento da produção do bioetanol estão em constante mudança e aprimoramento. Em todo o mundo pesquisas envolvendo melhoramento e engenharia genética buscando: o aumento da produtividade, economia de energia e tempo são desenvolvidas (DIEN, COTTA e JEFFRIES, 2003; TORNEY et al. 2007). Outro exemplo interessante é a produção de etanol, em escala laboratorial, piloto e industrial, apresentadas por Zhang et al. (2011), onde a etapa de sacarificação e fermentação ocorrem em conjunto (SSF). A otimização da produção de etanol a partir de matérias-primas que apresentam alta viscosidade (amiláceas) ocorreu por meio de técnicas recentes conhecidas como *very high gravity* (VHG) que possibilitaram a redução de energia gasta no processo com consequente aumento de produtividade (ZHANG et al. 2010).

3.2. Batata-doce: Características, uso e composição

A batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) é uma dicotiledônea proveniente das regiões tropicais, sendo cultivada e produzida em quase todo o mundo como importante fonte de amido. É uma planta perene que pode ser cultivada ao longo de todo ano, nas regiões tropicais (PETERS, 2006). A produção da Ásia e da África representam aproximadamente 95% da produção mundial (SRICHUWONG et al. 2012). A batata-doce apresenta diversas vantagens agrônomicas, que a tornam ideal para o cultivo em regiões com adversidades, como por exemplo: resistência a seca, alta tolerância a salinidade, pode ser cultivada em solos pobres; além de ser barata e acessível, com maior estabilidade de preço (LEE et al., 2012; LI & HALBRENDT, 2009; SHEN et al. 2012).

A China é o país com maior produção de batata-doce, alcançando no ano de 2012 o equivalente a 73 milhões de toneladas (FAO, 2012). Autores sugerem que a China produz de 77,5% a 85% da produção mundial de batata-doce. Nesse país essa cultivar é principalmente usada na alimentação humana. No entanto, é utilizada também como fonte de carboidratos para produção de bioetanol, com numerosas bases de produção piloto já estabelecidas e com cultivares de alto rendimento (MEI, MU e HAN, 2010; WANG et al., 2013). O Brasil lidera a produção da América Latina com quase 480 mil toneladas no ano de 2012, mesmo com uma queda de 12% em relação a produção de 2011 (FAO, 2012).

Silva et al. (2004), avaliando cultivares melhoradas geneticamente, afirmaram que a batata doce é um alimento energético, que após colhida apresenta cerca de 30% de matéria seca, contendo em média 85% de carboidratos, sendo ainda rica em lipídios, proteínas, cálcio e fibras, se comparada com outras estruturas vegetais amiláceas (Batata Inglesa, Mandioca e Inhame). Além de apresentar rendimento de duas ou três vezes mais carboidratos fermentescíveis em relação ao milho, o que ajuda a justificar o grande interesse por este cultivar (COMIS, 2008; FERRARI, 2013).

Este carboidrato de reserva (amido), armazenado nas raízes da batata-doce, é uma mistura de polissacarídeos, amilose e amilopectina. Ambos formados por uma cadeia linear de glicose com ligações α -(1→4), no entanto a amilopectina apresenta ramificações adicionais do tipo α -(1→6) (PETERS, 2006).

Esta alta concentração de amido, e aproximadamente 80% de sua matéria seca ser constituída de carboidratos, a coloca como uma excelente opção de matéria-prima para conversão anaeróbica tanto em bioetanol quanto em biohidrogênio. Com a tecnologia atual 8 toneladas de batata-doce fresca pode ser convertida em até 1 tonelada de bioetanol (QIU et al. 2010; WANG et al., 2013).

No estado do Tocantins, o cultivo da batata-doce pode ocorrer durante o ano todo, desde que se utilize irrigação. O fato de a temperatura local variar com um mínimo de 22°C e um máximo de 38°C, associado às precipitações médias de 1500 mm anuais, são parâmetros agrônômicos altamente favoráveis para alcançar elevadas produtividades. Isso motivou os estudos e desenvolvimento de 10 cultivares de batata-doce voltadas para a produção de etanol (UFT, 2008).

Esses estudos são de extrema importância haja vista que Jin et al. (2012), ao compararem a produção de etanol de 10 variedades diferentes de batata-doce, afirmaram que fatores como eficiência energética, quantidade de resíduo produzido e custos de produção, fatores de extrema importância, não são constantes entre as variedades. Assim uma variedade melhorada (visando a produção de etanol) é necessária para otimização do processo como um todo.

A cultivar Duda (BDI 112) apresenta a maior produtividade de etanol por hectare sendo considerada a mais produtiva para indústria no Tocantins (UFT, 2008). Em trabalho recente, Martins (2013) demonstra que essa apresenta, quando comparada a outras cultivares, os melhores valores de porcentagem de amido (72,76 %), porcentagem de matéria seca (32,10 %) e produtividade de etanol (7,21 m³/ha) e é também a mais resistente à doença do mal-do-pé (*Plenodomus destruens*);

Ziska et al. (2009) sugerem que a batata-doce, e outras fontes amiláceas, têm grande potencial para serem fontes alternativas ao milho como fonte de amido visando à produção de bioetanol. Para o governo Chinês a batata-doce é de extremo interesse, tanto que já existem diversas usinas piloto para produção de bioetanol, a partir dessa cultivar em funcionamento (WANG et al., 2013).

3.3. Coprodutos agroindustriais e seu uso no conceito de biorefinarias

A biomassa (qualquer matéria orgânica disponível de forma recorrente e renovável) gera interesse e demonstra potencial para ser utilizada como fonte de energia e representa um grande mercado dentro da biotecnologia (YANG, 2007). O termo resíduo é abrangente e é utilizado para designar tanto sólidos quanto efluente líquidos. A agricultura e a indústria geram resíduos que necessitam de destino adequado, além de tratamento para se enquadrarem na legislação, não devendo serem lançados de modo descontrolado no ambiente. Evitando assim poluição, perda de possíveis matérias-primas e energia (AQUARONE, BORZANI e LIMA 1990; TIMOFIECSYK e PAWLOWSKY, 2000).

Os resíduos podem conter diversas substâncias de alto valor e de acordo com: sua composição nutricional, volume e risco de poluição esses podem ser descartados ou reutilizados. Tanto do ponto de vista econômico quanto

ambiental, agregar valor à cadeia produtiva é o ideal. Para isto diversos resíduos, hoje descartados, tem grande potencial inclusive podendo ser usados na alimentação humana ou animal (ULLOA et al. 2004, AGUEDO et al., 2012; LAUFENBERG et al., 2003). Sena e Nunes (2006) a exemplo disso produziram, a partir de diferentes resíduos, formulações de rações para serem usadas na carcinicultura (produção de camarão) e obtiveram resultados promissores a partir de resíduos agroindustriais pouco aproveitados.

A produção de batata-doce, para fins alimentícios, gera resíduos que na maioria das vezes são descartados, esta prática reduz os benefícios econômicos da produção e pode causar poluição ambiental (MEI, MU e HAN, 2010). A produção de ácido cítrico, e estudos visando a produção de hidrogênio (YOKOI et al. 2001), são exemplos de destinação desse resíduo. Existe ainda a possibilidade do seu uso para a produção de biossurfactantes por ser rico em carboidratos e proteínas, assim como o resíduo proveniente da biofermentação etanólica (MERCADÉ & MANRESA, 1994; NITSCHKE et al. 2004). A produção de batata-doce visando a obtenção de etanol, também gera grande quantidade de resíduos que devem receber destinação correta (UFT, 2008).

Biorefinarias são definidas como o processamento sustentável de biomassa em um espectro de produtos vendáveis (alimentos, rações, materiais, químicos) e/ou energia (combustíveis, eletricidade, calor) (IEA BIOENERGY, 2010). Segundo o Laboratório Nacional Americano de Energia Renovável (American National Renewable Energy Laboratory - NREL), biorefinarias são todas as indústrias que convertam a biomassa e que a utilizem para produzir: combustíveis, energia ou produtos químicos (NREL, 2008).

As biorefinarias são análogas as refinarias de petróleo onde múltiplos produtos são obtidos de uma matéria prima em virtude da composição complexa da biomassa, um esquema do conceito de biorefinarias pode ser visualizado na figura 1 (DEMIRBAS, 2009a; KAMM, GRUBER & KAMM, 2012).

Podem ser classificadas de acordo com o tipo de plataforma utilizada, os tipos de produtos a serem produzidos, a matéria-prima e processos de conversão. Dentre os principais fatores de classificação pode-se citar: o tipo de produto, os energéticos (bioetanol, biodiesel e combustíveis sintéticos) e os materiais (químicos, comida, ração, etc); o tipo de biomassa utilizada, como a obtida das culturas energéticas, das culturas alimentares ou ainda dos resíduos

(agroindústrias, florestais ou industriais); os processo de conversão, podendo ser bioquímicos (fermentação e conversão enzimática), termoquímicos (pirólise e gaseificação), químicos (hidrólise acida, transesterificação, etc.) e mecânicos (fracionamento, pressão, etc.). Nota-se então que a classificação das biorefinarias é complicada e com muitas vertentes, deste modo a sobreposição dos fatores citados pode, e deve, ocorrer visando a maior diversidade possível (DEMIRBAS, 2009b; IEA BIOENERGY, 2010).

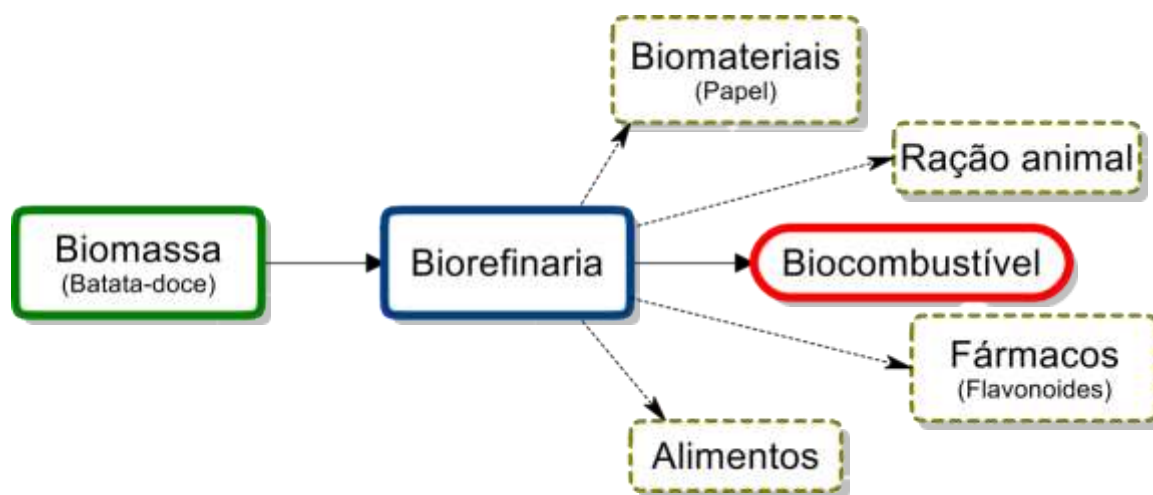


Figura 1: Conceito de biorefinarias aplicado a produção de bioetanol de batata-doce agregando a obtenção de outros produtos em conjunto com o biocombustível.

Este conceito surgiu do princípio de que todos os componentes da biomassa podem ser convertidos em blocos de construção químicos (*chemical building blocks*), podendo originar novos produtos (YANG, 2007). As vantagens das biorefinarias também são amplamente discutidas. Ao produzir diversos produtos, as biorefinarias podem explorar o potencial máximo das biomassas e agregar o maior valor possível a essas, aumentando assim a rentabilidade, reduzindo a demanda energética e reduzindo a emissão de gases do efeito estufa (NREL, 2008).

O amplo espectro de produtos reduz também a dependência da produção de somente um produto, aumentando, assim, a sustentabilidade do uso racional da biomassa, reduzindo a competição existente entre o uso da biomassa para alimentos ou combustíveis (GHATAK, 2011; IEA, 2011). Em suma, o objetivo de uma biorefinaria é otimizar o uso dos recursos, minimizando os gastos e assim maximizando os benefícios e ganhos (KING, 2010).

Para que a produção de bioetanol se encaixe no conceito das biorefinarias, em conjunto a sua produção usual (bicombustíveis), é necessária a obtenção de outros produtos de valor agregado. Devem ter sua produção explorada nas biorefinarias: químicos (adesivos, detergentes, tintas, lubrificantes, ácido e etc.), materiais (fibras, papel, gomas e etc.) ou alimentícios (rações, glúten e etc.) e para que essas sejam economicamente viáveis e sustentáveis, a chave é otimização dos processos além da alta eficiência (GHATAK, 2011; KING, 2010).

Para que as biorefinarias se tornem um conceito real no futuro, são necessários investimentos destacando-se o uso de uma grande gama de matérias-primas para que as oportunidades de preço sejam aproveitadas, além do uso de multiprodutos e coprodutos para maximizar o uso das culturas (KAMM, GRUBER & KAMM, 2012).

Para a batata-doce, o uso consciente da biomassa envolve a obtenção de produtos não usuais dessa cultivar, preferencialmente em conjunto da produção alimentar ou de combustível. Fibras alimentares, complexos polissacarídeos não amídicos resistentes à digestão e absorção, foram extraídas do resíduo (da produção de amido) de dez variedades dessa cultivar (AACC, 2001; MEI, MU e HAN, 2010). Essas fibras solúveis (pectinas, glucanas, etc.) apresentam diversas aplicações nas indústrias alimentares e farmacêuticas (MCPHERSON, 1992).

Trabalho realizado na Universidade Federal do Tocantins mostrou que as folhas da maioria dos cultivares de batata-doce, desenvolvidas pelo LASPER/UFT para produção industrial de etanol, apresentaram, especialmente, flavonoides, o que pode demonstrar o grande potencial dessas partes da planta como fonte de antioxidantes naturais (SOARES, 2013).

Uma vez que essas folhas constituem parte do resíduo agroindustrial e que fibras podem estar presentes no coproduto da biofermentação, alternativas para enquadrar a produção de bioetanol, a partir da batata-doce, no conceito das biorefinarias já existe. Explorar essas potencialidades pode agregar valor à cadeia produtiva.

3.4. Carboidratos

Carboidratos são por definição poli-hidroxialdeídos e poli-hidroxicetonas e seus derivados. Esse nome está ligado ao fato de que os açúcares mais simples são formados por carbono, hidrogênio e oxigênio, seguindo a fórmula básica $C_nH_{2n}O_n$ (onde $n > 3$). São as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza e praticamente todos serem vivos as metabolizam e sintetizam. Apresentam diversas funções biológicas nos organismos importantes no desenvolvimento, funcionamento e sobrevivência. Por esse motivo, um grande ramo de estudos e pesquisas chamado glicobiologia está em constante expansão. Os carboidratos são divididos em 3 grupos, polissacarídeos, oligossacarídeos e monossacarídeos, sendo o último a menor unidade dentre os carboidratos e não pode ser hidrolisada em unidades mais simples (VARKI & SHARON, 2009; GHAZARIAN, IDONI & OPPENHEIMER, 2011).

Os polissacarídeos constituem um diverso grupo de estruturas bem dispersas na natureza, apresentando um grande potencial para variabilidade estrutural, muitas vezes podendo ser encontrados formando complexos com os nucleotídeos dos ácidos nucléicos e os aminoácidos das proteínas (OOI & LIU, 2000). Delattre (2011) comenta que a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*The International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - IUBMB) os define como macromoléculas constituídas de um grande número de resíduos monossacarídicos ligados através de ligações glicosídicas. São também encontrados formando agregados, na maioria dos casos, denominados proteoglicanas, que são formados por polissacarídeos sulfatados. As algas marinhas são fontes naturais, mas também podem ser encontrados em animais, sendo nesse caso denominados de glicosaminoglicanos. O mais conhecido é a heparina que apresenta efetiva ação contra a trombose venosa (NETO et al., 2008).

Monossacarídeos são o constituinte básico dos oligossacarídeos e polissacarídeos. Existem mais de 200 tipos de monossacarídeos naturais. Devida à grande complexidade das diversas estruturas dos carboidratos, não existe um único método eficiente para analisá-los todos. De modo geral os oligossacarídeos são compostos por 2 a 9 unidades de monossacarídeos também unidos por ligações glicosídicas. As análises de composição

monossacarídica permitem a quantificação desses de modo simples, comparado com os polissacarídeos, em virtude de sua estrutura maior e mais complexa (WANG & FANG, 2004; VARKI & SHARON, 2009; HARAZONOA et al. 2011).

Segundo Salvador et al. (2000), a parede celular das plantas é composta em sua maioria por três classes de polissacarídeos e lignina, esses, por sua vez, representam os componentes da fibras alimentares, muito importantes por induzirem diversos efeitos fisiológicos com o seu uso na alimentação.

Nos últimos anos muitos polissacarídeos estão sendo isolados de cogumelos, fungos, algas e plantas, haja vista que a biotecnologia e a medicina tiveram seu interesse despertado, principalmente pelas potencialidades biológicas imunomodulatórias e antitumoral intrínsecas desses compostos (OOI & LIU, 2000), dentre outras, como: redução de açúcar no sangue e anti-inflamatória (WANG & FANG, 2004).

Atualmente, os consumidores têm buscado alimentos mais saudáveis e que possam diminuir o risco de doenças. Com isso muita atenção tem sido dada aos chamados oligossacarídeos não digestíveis, pois esses compostos apresentam propriedades benéficas (baixo valor calórico, anti-carcinogênica e estimulam o crescimento de bactérias benéficas no cólon, dentre outras) (MUSSATTO & MANCILHA, 2007).

3.4.1. Análise de carboidratos

A fitoquímica (química de plantas), apresenta grande importância no avanço da ciência e tecnologia. Esse é o ramo da ciência que estuda e descreve os diversos produtos químicos produzidos pelas plantas (metabólitos primários e secundários), como os carboidratos. A aplicação mais importante da fitoquímica é para a farmacognosia, ramo este, que por sua vez, estuda produtos médicos naturais, em sua maioria derivados de plantas (WAKSMUNDZKA & SHERMA, 2011).

A obtenção dos carboidratos ocorre, mais comumente, através de extração aquosa quente, fria, ácida ou alcalina (BOUAL et al. 2011; TAN et al. 2011; SUN et al. 2011). Existem diferentes técnicas para se analisar os carboidratos (metabólitos primários), com vantagens e desvantagens. As técnicas cromatográficas são reconhecidas por desempenhar um importante

papel tanto nas análises qualitativas quanto quantitativas. Dentre elas podem-se citar: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises de composição monossacarídica são mais simples e rápidas. No entanto, as análises de estrutura demandam técnicas mais apuradas e especializadas. As reações de derivatização (metilação, acetilação) são, muitas vezes, necessárias para complementar os resultados obtidos em algumas análises por cromatográficas. Entretanto, as técnicas já citadas não geram informações sobre a estrutura dos carboidratos, que é fundamental para compreender suas funções. Portanto, faz-se necessário o uso de técnicas diferentes. Nesse caso, a ressonância magnética nuclear (RMN) se tornou a ferramenta mais importante para isso. A análise e interpretação dos resultados dessa técnica deve ser feita com base nos espectros de ^1H e de ^{13}C , ambos são expressos em sinais químicos (δ , ppm) relativos a um padrão interno (TMS, acetona e etc). Os núcleos, de cada carbono e hidrogênio, de um açúcar emitem sinais específicos e, de modo geral, a variação deles pode ser verificada segundo a figura 2 (para ^1H) e figura 3 (para ^{13}C) (DIMITRIU, 1998; CUI, 2005; WAKSMUNDZKA & SHERMA, 2011).

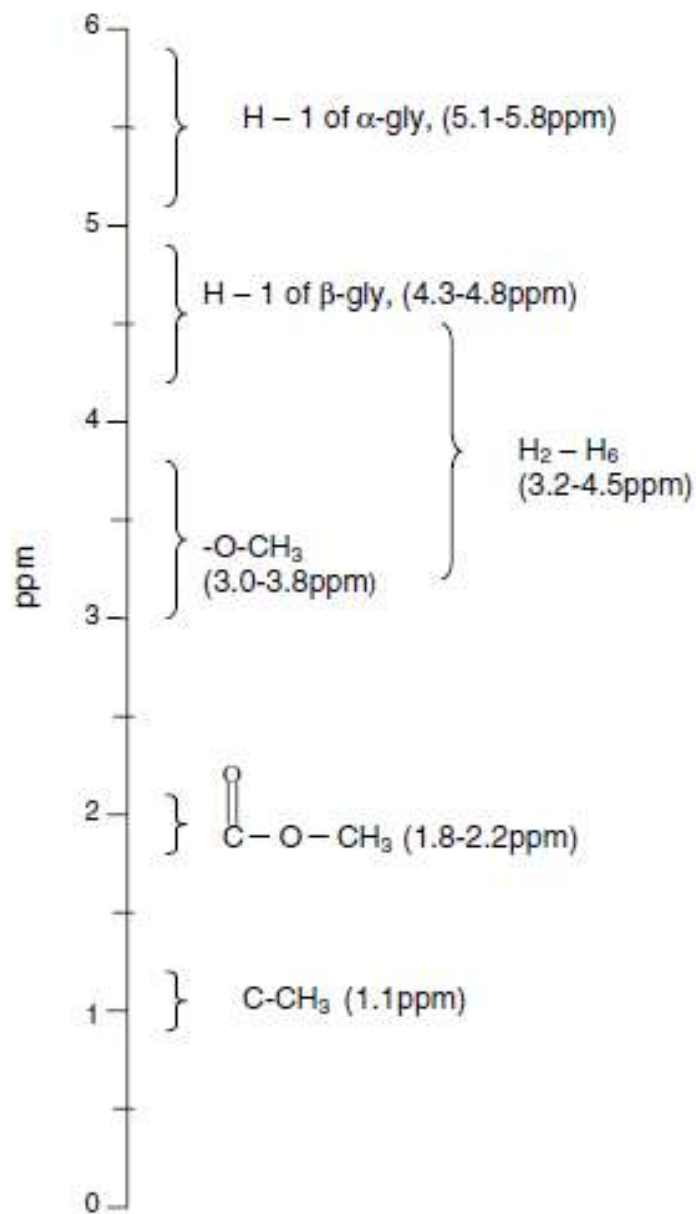


Figura 2: Ilustração dos sinais químicos de carboidratos de ^1H obtidos por ressonância magnética nuclear (fonte: CUI, 2005)

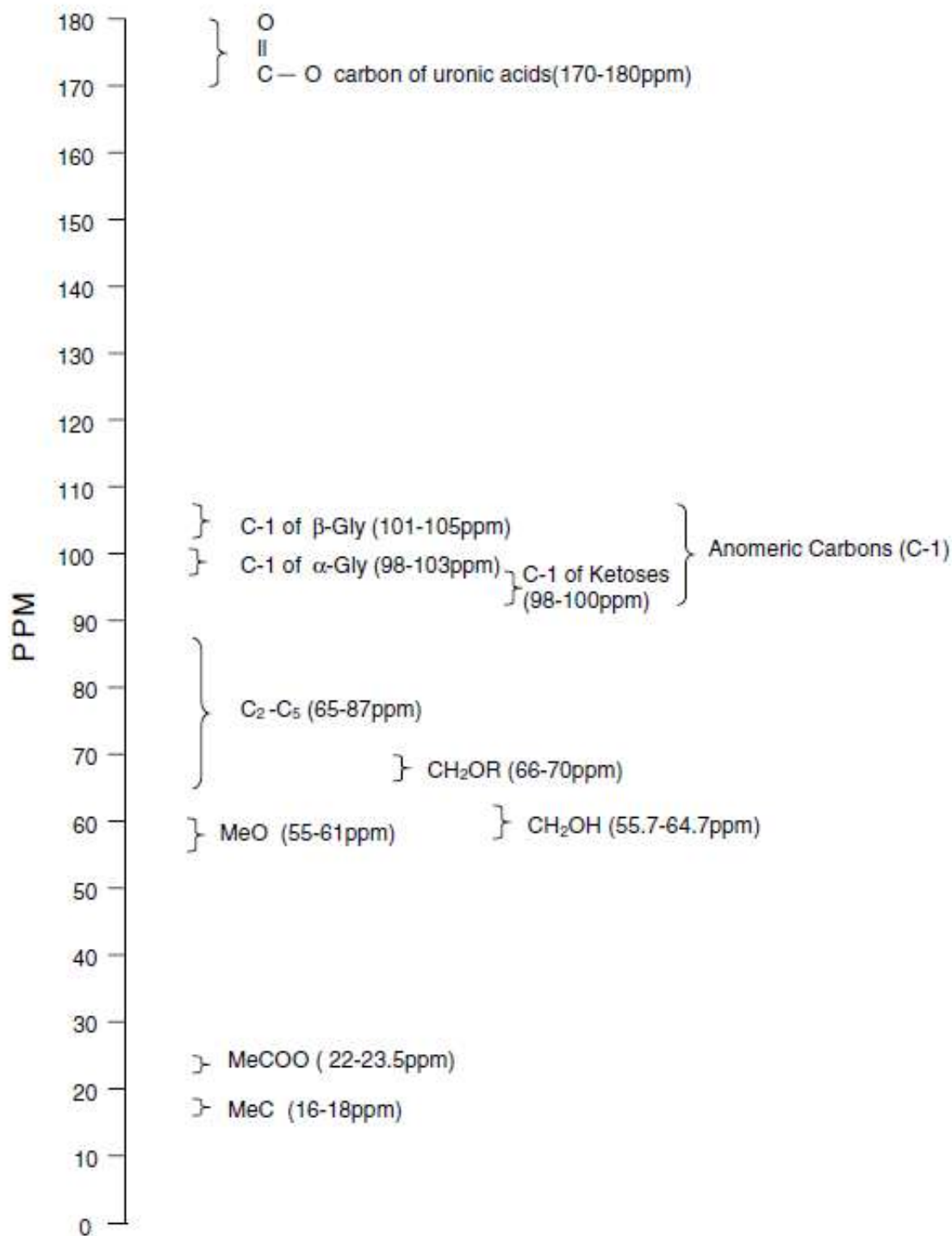


Figura 3: Ilustração dos sinais químicos de carboidratos de ^{13}C obtidos por ressonância magnética nuclear (fonte: CUI, 2005)

3.4.2. Galactanas

Galactanas são polissacarídeos formados por diversas unidades de galactose unidas. Na natureza encontram-se, também, polímeros que contêm galactanas (nesse caso, existem outros monossacarídeos ligados à cadeia

principal). Essas substâncias são amplamente distribuídas, podendo ser encontradas em plantas superiores (30 diferentes famílias e em quase todos órgãos) em algas (galactanas sulfatadas que são amplamente estudadas e apresentam diversas aplicações como estabilizantes, geleificantes e emulsificantes), além de fungos e animais. (ARIFKHODZHAEV, 2000; ESTEVEZ, 2008; DELATTRE, 2011; MENDES, 2014).

As galactanas encontradas em plantas superiores são divididas em 2 grupos: arabinogalactanas I e arabinogalactanas II. O primeiro, mais presente na parede primária, é geralmente composta de uma cadeia principal de (1→4)-β-D-Galp com curtas ramificações. O segundo grupo são polissacarídeos altamente complexos, geralmente associados a proteínas e, de modo geral, apresentam uma cadeia principal de (1→3) e (1→6)-β-D-Galp com pequenas ramificações (FINCHER & STONE, 1974; PEREZ et al., 2000; DELATTRE, 2011).

Galactanas apresentam diversas aplicações tanto na indústria alimentícia quanto farmacêutica. Trabalhos mostram que galactanas isoladas de algas combatem diversos vírus prejudiciais à saúde humana, Mendes et al. (2014) mostram que galactanas têm atividade anti-metapneumovírus humano e citam ainda que outros estudos mostraram ação anti-HIV e anti-Herpes. Estudos com moléculas ricas em galactanas mostram que essas apresentam benefícios relacionados ao sistema imune e relacionadas ao câncer (ao prevenir a metástase). Trabalhos reportam que fibras obtidas da batata-inglesa são compostas de galactanas ricas em ligações β-(1→4) e essas fibras apresentam, dentre outras aplicações, atividade bifidogênica maior que frutoligosacarídeos além de ajudarem na redução do ganho de peso em ratos (KELLY, 1999; MAKKER et al. 2002; LÆRKE et al. 2007; THOMASSEN et al. 2011; KHODAEI & KARBOUNE, 2014).

É notável o reconhecimento como alimento funcional, com propriedades nutracêuticas, que as arabinogalactana alcançaram. O uso dessas moléculas pode ser feito em conjunto com bebidas ou comidas por conta de suas características físico-químicas. Deve-se ainda destacar suas propriedades como prebiótico, ativador imune e ainda protetor do fígado (reduzindo os níveis de amônia) (FITZPATRICK, ROBERTS e WITHERLY, 2004).

Dentre as diversas propriedades o de combate ao câncer ocorre pela estimulação natural de células exterminadoras naturais ou células NK (*Natural*

Killer Cell), linfócitos que controlam diversos tipos de tumores e infecções segundo Vivier et al. (2008) além do efeito anti-metástase, Kelly (1999) cita diversos trabalhos que evidenciam estes benefícios.

Essas substâncias também são extensivamente pesquisadas para sua utilização como veículo para drogas, uma vez que os polímeros comumente utilizados são sintéticos e não biodegradáveis, ao contrário das galactanas. Essa característica é de extrema importância. Trabalhos importantes vêm sendo desenvolvidos nesta área utilizando arabinogalctanas conjugadas com, por exemplo, uma droga comumente utilizada no tratamento de infecções fúngicas (Anfotericina B – AmB) que apresenta, naturalmente problemas de toxicidade e solubilidade. Outro exemplo é o uso para o combate direto de tumores, como já feito em conjugados de arabinogalactanas e ácido fólico, por tumores malignos apresentarem superexpressão de receptores específicos para este ácido (FALK; DOMB e POLACHECK, 1999; KLEINMAN et al. 2002; ELGART et al. 2010; PINHASSI et al. 2010). O uso e pesquisas com esses e outros polímeros, na área farmacêutica se tornou tão grande e vasto que se criou um termo para agrupá-los, esta é a, chamada *Polymer therapeutics* (Terapia com polímeros) (DUNCAN, 2003; VICENT & DUNCAN, 2006;).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo e obtenção do material

A maior parte deste estudo foi conduzido nas dependências da Universidade Federal do Tocantins, campus de Palmas (UFT/Palmas). Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios de Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN/UFT); de Instrumentação Científica do departamento de Engenharia de Alimentos (LABIC/UFT) e; de Sistemas de Produção de Energia a Partir de Fontes Renováveis (LASPER/UFT) do departamento de Engenharia Ambiental. Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia gasosa (CG) foram realizadas na Universidade Federal no Paraná no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

A matéria - prima deste experimento foi proveniente da biofermentação de *Ipomoea batatas* (L.) Lam visando a produção de bioetanol. A cultivar Duda, catalogada como BDI 112, foi utilizada neste trabalho. O coproduto foi obtido diretamente no LASPER (Laboratório de Sistemas de Produção de Energia a partir de Fontes Renováveis). O plantio da batata ocorreu em fevereiro de 2012 e a colheita em agosto do mesmo ano.

A obtenção de etanol e do coproduto seguiu os protocolos descritos em UFT (2008), com modificações na etapa de hidrólise enzimática. O novo protocolo ocorreu da seguinte maneira: após o preparo inicial da matéria-prima (colheita, lavagem e moagem) esta foi encaminhada para a dorna de cozimento na razão de 2:1 (massa/água), iniciando-se a agitação e aquecimento até 80°C. Adicionou-se então, a enzima liquidificante (α -amilase Liquozyme® SC) na proporção de 125 ml para 250 kg de mostro, em pH inicial de 6,4, mantendo nesta condição por 1 hora. Após este período o pH foi corrigido para 5,1 pela

adição de HCl PA concentrado (30 ml) e iniciou-se o resfriamento até 60°C, e 250 ml da segunda enzima (Spirizyme® Fuel) foram adicionados a mistura. Quando o brix chegou a 13° iniciou-se a terceira etapa pela adição de 500 g de levedura aos 250 kg. Procedeu-se a destilação quando o brix medido em sacarímetro chegou a 0°. O protocolo acima é utilizado rotineiramente na usina instalada na Universidade Federal do Tocantins visando a produção de etanol em nível semi-industrial. Fluxograma do processo pode ser visualizado na figura 4.

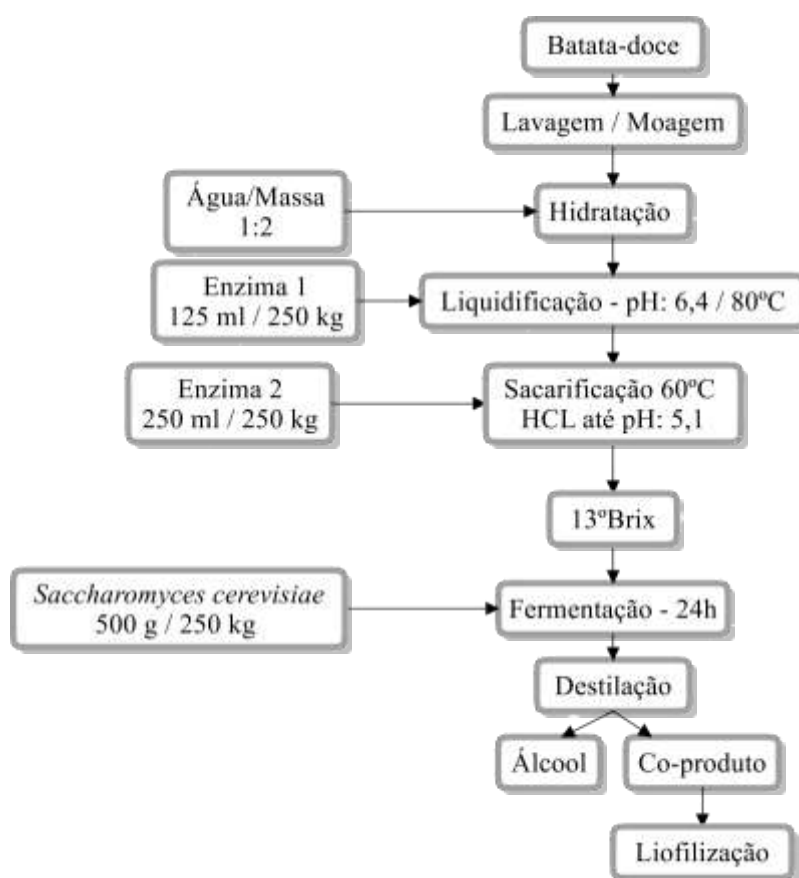


Figura 4: Fluxograma para obtenção do coproduto da biofermentação etanólica da batata doce e posterior liofilização do mesmo.

A determinação do teor de umidade do coproduto seguiu método disponível em IAL (2008), para cada batelada, onde bandejas metálicas foram pesadas, e adicionadas com o resíduo úmido. Após isto foram levadas para secagem em estufa de circulação à 105°C até atingir peso constante.

Após obtido o coproduto (figura 4), este foi congelados a -18°C e posteriormente seco em liofilizador de bancada, por 30 horas, sob vácuo, a -40°C, e em seguida sendo armazenado (-18°C) até o momento de sua utilização.

A figura 5 mostra de forma resumida as principais etapas desenvolvidas neste trabalho visando o entendimento da composição e estrutura dos carboidratos presentes no coproduto.

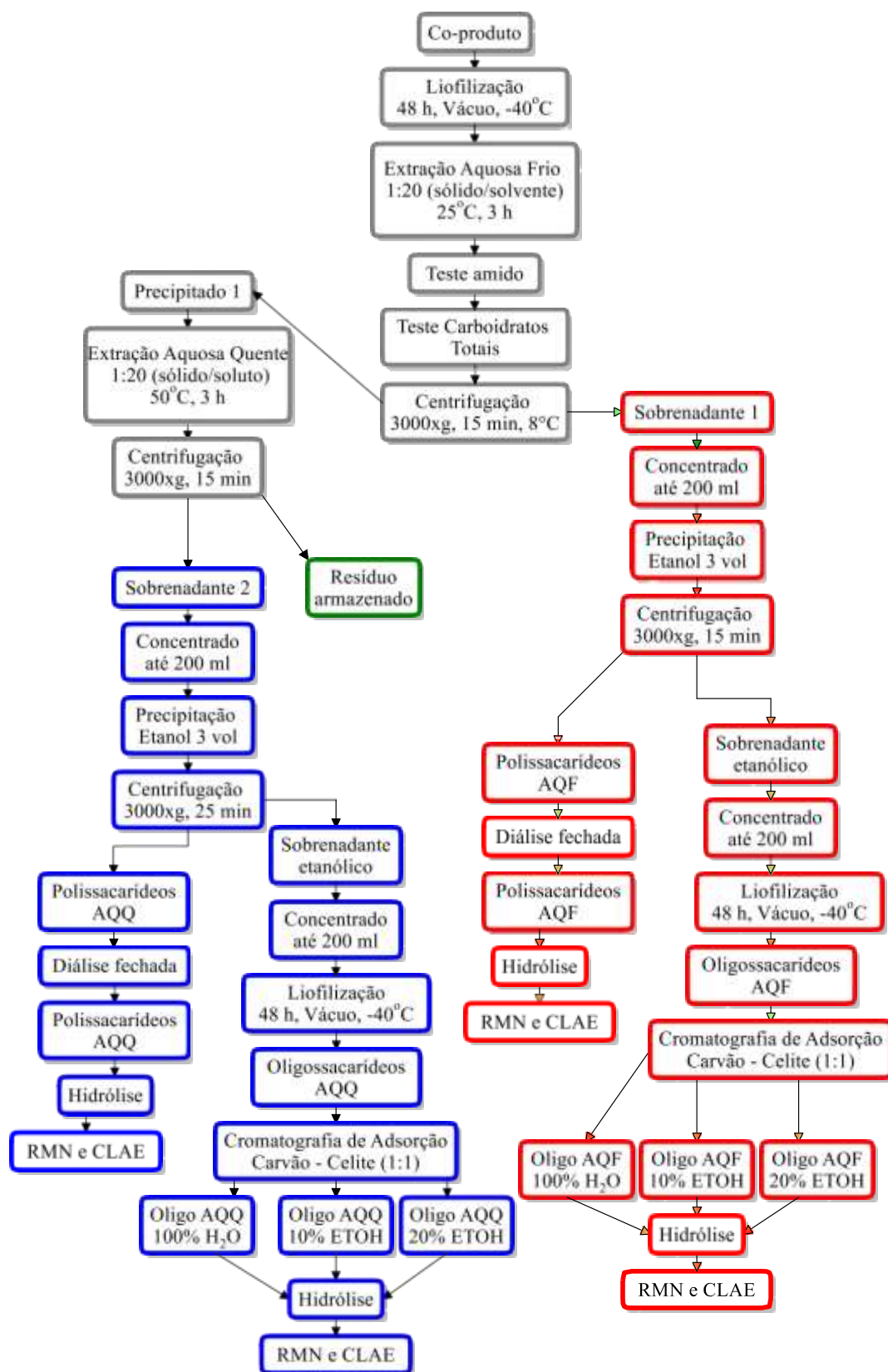


Figura 5: Fluxograma demonstrando as principais etapas aplicadas ao coproduto visando análise de composição e estrutura dos carboidratos.

4.2. Extração e obtenção dos carboidratos

O processo de extração seguiu o protocolo descrito por Zhao et al. (2005), com modificações. Para isto, 55 g do coproduto liofilizado foi submetido a duas extrações aquosas consecutivas; uma extração aquosa fria (AQF) e uma extração aquosa quente (AQQ). Todas as análises foram feitas em triplicatas.

Estas extrações foram conduzidas em três béqueres de 500 ml onde foi adicionada água destilada e deionizada (Milli-Q), de modo a obter uma relação 1:20 sólido/solvente.

Sob agitação magnética ocorreu, primeiramente, a extração fria (AQF), durante 3 horas à temperatura ambiente (25°C). Ao final a amostra foi centrifugada à 3000xg, durante 15 minutos, e temperatura de 8°C. O sobrenadante foi separado e armazenado e a parte sólida úmida foi pesada e completado o volume, alcançando-se o peso inicial. Seguiu-se com a extração a quente (AQQ) que ocorreu no mesmo agitador, durante 3 horas com temperatura de 50°C. Este extrato também foi centrifugado e teve o sobrenadante coletado.

Nos sobrenadantes foi feito teste qualitativo para carboidratos, segundo Dubois et al. (1956), e teste qualitativo para amido, com lugol, segundo IAL (2008). Os sobrenadantes aquosos AQF e AQQ (de ambas as bateladas e repetições) foram nominados de maneira a identificarem-se batelada e repetição. Estes tiveram seu volume reduzido por rotaevaporação a 70°C e vácuo, em rotaevaporador de bancada (60 rpm), até cada amostra atingir o volume de 200 ml.

Visando a separação de polissacarídeos e oligossacarídeos dos sobrenadantes obtidos na primeira etapa, foram adicionados 3 volumes de etanol 99,8% PA, promovendo-se a precipitação dos polissacarídeos. As amostras foram novamente centrifugadas a 3000xg, por 15 minutos, à 8°C, e suas porções foram separadas de modo que no sobrenadante estivesse presente a fração de carboidratos de baixa massa molecular (CBMM), oligossacarídica (Oligo), e os sólidos representaram a fração polissacarídica (Polis).

4.3. Purificação e quantificação dos carboidratos

Após liofilizadas as amostras obtidas na etapa anterior foram submetidas à pesagem de precisão. Os pesos obtidos para cada uma das repetições foram tabelados e a porcentagem final de carboidratos em relação ao peso seco inicial, de 55 g de coproduto, foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de Oligo ou Poli em 1 fração} = \frac{\text{Peso da amostra} * 100}{\text{Peso seco inicial de coproduto}}$$

Este cálculo foi aplicado em cada uma das 12 frações obtidas (6 de AQF e 6 de AQQ). Posteriormente, somaram-se todas essas porcentagens para obtenção do percentual total de carboidratos em relação a massa inicial de coproduto. Para que esse valor fosse representativo e estatisticamente confiável calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação da média do total das repetições.

As diferentes amostras obtidas, Oligo e Polis, foram submetidas a diferentes processos; cromatografia de adsorção e diálise fechada, respectivamente; buscando o maior grau de pureza dos carboidratos pois, são necessários para evitar interferência nos resultados cromatográficos.

Ao sobrenadante que originou a porção Oligo aplicou-se o processo de cromatografia de adsorção (WHISTLER & DURSO, 1952). Esta técnica foi realizada em coluna de vidro (65 x 1,2 cm), equipada com placa porosa, utilizando-se como fase estacionária uma mistura em partes iguais de Carvão-Celite (50/50), tendo um volume total de aproximadamente 150 ml. A montagem deste sistema cromatográfico foi realizada da seguinte forma: primeiramente, uma camada fina de Celite, previamente umedecida, foi adicionada, em seguida o volume da coluna foi preenchido com a fase estacionária, previamente umedecida. A seguir, a amostra foi eluída com fase móvel de forma gradiente por 3 vezes, para cada uma destas foi utilizado 3 vezes o volume da coluna. A primeira fase móvel, constituída por 100% água destilada e deionizada (fração 100% H₂O), a segunda por etanol a 10% (fração 10% ETOH) e a terceira fase móvel constituída por etanol a 20% (fração 20% ETOH), dando origem então a 3 frações diferentes (ASCENCIO, 2002). As frações foram coletadas, liofilizadas e armazenadas a -18°C.

A parte sólida que originou a fração Polis foi submetida à diálise fechada com sacos de diálise (INLAB® 25x16 mm, *cut off* 14,000) em béquero de 1 litro, contra água destilada e deionizada, durante 72 horas. A água foi trocada a cada 24 horas para otimizar a purificação e em cada troca foi feito teste qualitativo fenol/sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) na água a ser descartada para verificar a presença de carboidratos residuais.

4.4. Curva de hidrólise e hidrólise ácida total dos carboidratos

Esta etapa foi realizada visando a quebra dos carboidratos complexos em suas menores frações para posteriores análises visando a composição monossacarídica. Para confecção da curva de hidrólise foram preparadas solução aquosas de 1 mg/ml tanto de polissacarídeos quanto de oligossacarídeos, a estas foi adicionado o volume de 1ml de ácido trifluoracético (TFA) 2N e 1N respectivamente. Os volumes totais foram acondicionados em tubos de hidrólise lacrados, e levados para estufa a 100°C, por diferentes tempos, variando de 1 hora a 6 horas (ASCENCIO, 2006). Ao final de cada hora a hidrólise foi interrompida pela adição de volume igual de água destilada e deionizada e resfriamento a -18°C. O excesso de TFA foi removido por liofilização. Os produtos da hidrólise de cada tubo de ensaio, após liofilizados, foram analisados por CLAE com o objetivo de identificar qual o tempo ótimo de hidrólise, onde obteve-se a maior concentração de glicose.

4.5. Teste qualitativo e quantitativo para proteínas

Para verificação qualitativa e quantitativa de proteínas utilizou-se o reagente de Bradford, este consiste na adição de 100 mg de coomassie blue G-250 em 50 ml de etanol, adicionando-se posteriormente, 100 ml de ácido fosfórico 85% (p/v). Diluiu-se para 1 litro após a dissolução completa do corante e filtrou-se em papel whatman 14 µm até alcançar a coloração marrom claro (BRADFORD, 1976).

Para a análise quantitativa preparou-se soluções-padrão de albumina bovina em uma escala de concentração variando de 5 µg/ml a 100 µg/ml. Em tubos de ensaio, porções de 5 ml do reagente de Bradford foram misturadas a porções de 100 µl de cada uma destas. Em seguida, as respectivas absorbâncias

a 595 nm foram determinadas em espectrofotômetro, utilizando-se água em lugar de solução-padrão para o branco visando a construção da curva de calibração. Da mesma forma soluções de 1mg/ml das amostras foram preparadas, retirando-se uma alíquota de 100µl para análise de suas absorbâncias a 595 nm.

4.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A técnica inicial utilizada para triagem cromatográfica foi a de cromatografia em camada delgada, conforme descrita por Waksmundzka (2008). Consistiu na utilização de placas de sílica gel 60 (ALUGRAM®); previamente ativadas, 110°C por 30 minutos; utilizadas como fase estacionária. Foram aplicadas as diferentes amostras na parte inferior, em diferentes pontos (*spots*), em uma linha à 2,5 cm acima do início da placa, por meio de capilares de vidro. Após isto a base da placa foi imersa na fase móvel, dentro de cuba cromatográfica, e a corrida se deu até a fase móvel alcançar a altura máxima estipulada (2,5 cm abaixo do final da placa).

Para esta análise, tanto padrões quanto amostras foram aplicadas na mesma placa para facilitar a visualização comparativa.

Foram corridas diversas placas para verificação da reprodutibilidade do resultado. A fase móvel utilizada nesta análise consistiu de: Acetato de etila : Álcool Isopropílico : Ácido acético : Água destilada e deionizada (4:2:2:1). A revelação foi feita a 100°C até atingir-se a coloração desejada (aprox. 5 minutos). O revelador consistiu de 250mg de orcinol, solubilizado em 95 ml de etanol e 5 ml de ácido sulfúrico, o qual foi borrifado na placa antes desta ser levada à estufa. Os padrões utilizados foram Glicose, Maltose, Melezitose e Galactose. Todos os reagentes utilizados, assim como os padrões, apresentam graus de pureza elevados.

4.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise foi feita em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10 series Avp, equipado com bomba LC-10AD, desgaseificador DGU-14A, detector de índice de refração (RID) RID-10A e forno de coluna CTO-10A. Equipado com injetor manual Rheodyne (*loop* de 20µl). O protocolo se deu conforme Alvim (2013),

onde a fase móvel utilizada foi composta de 8mM de ácido sulfúrico em água ultrapura, com eluição isocrática. Temperatura do forno e do detector (RID) foi de 40°C, o fluxo utilizado foi de 0,6 ml/min em uma coluna de fase reversa da marca Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H+ (300 x 7,8 mm), com conexão direta a Cartucho de segurança Phenomenex Carbo-H (4 x 3 mm) preenchido com material semelhante ao da coluna principal. Para construção e interpretação dos cromatogramas foi utilizado o programa Shimadzo Class-VP, que acompanha o equipamento. Padrões, de cada substância, foram utilizados para construção da curva de calibração, que forneceu uma equação, utilizada para calcular a concentração. Tanto padrões quanto reagente utilizados apresentavam grau de pureza compatível com esta análise.

4.8. Redução e acetilação

Utilizou-se a metodologia descrita por Ascêncio (2004), com modificações, onde 2 mg de cada amostra foram solubilizadas em 4ml de TFA 1N, levadas para estufa a 100°C por 4 horas visando a hidrólise. Após este tempo foi feita a lavagem das amostras com água e estas foram secas em rotaevaporador rotativo, seguido de lavagens consecutivas com tolueno e levadas a secura novamente. Em seguida o mesmo procedimento foi realizado, desta vez utilizando-se o metanol. Posteriormente, o pH das amostras foi verificado (papel indicador de pH) e adicionou-se 2 ml de NH₄OH (1M) visando a alcalinização até pH 10, para posterior adição de 9 mg de NaBH₄. As amostras foram então deixadas reagindo por doze horas, à temperatura ambiente (25°C), para então serem encaminhadas para liofilização. Procedeu-se então o processo chamado acetilação, onde 1,1 ml de piridina e 1ml de anidrido acético foram adicionados nas amostras completamente livres de água, deixando-se reagir novamente por doze horas (Poli AQF e Poli AQQ), ou por 1h em estufa aquecida a 100°C em frascos lacrados, isto para as três frações de Oligo AQF obtidos anteriormente por cromatografia preparativa carvão:celite. Ao final do processo de acetilação adicionou-se 2 cm de gelo às amostras visando interromper a reação, iniciando-se então, o processo de lavagem das amostras da seguinte maneira: adicionaram-se 4 ml de clorofórmio, agitou-se em vórtex e recolheu-se a fase orgânica (clorofórmio) descartando-se a fase aquosa. Posteriormente, à

fase orgânica, adicionou-se 2ml de CuSO₄ 5% visando a remoção da piridina. Agitou-se em vórtex e repetiu-se este procedimento até que a fase superior (solução aquosa de CuSO₄) não sofresse alteração na coloração; o processo de lavagem foi finalizado pela adição de 6ml de água (3 vezes), agitação em vórtex e descarte da fase aquosa seguido da adição de sulfato de sódio anidro, até não existir turbidez aparente, e filtração com algodão.

Após este procedimento as amostras foram secas à temperatura ambiente e encaminhadas para análise.

4.9. Cromatografia gasosa (CG) e espectrometria da massa (MS)

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas na Universidade Federal do Paraná no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Todos os experimentos seguiram os protocolos descritos por Ferreira et al. (2012), sendo descritos a seguir.

Estas análises foram executadas em cromatógrafo Varian 3800, conectado a um espectrômetro (*ion-trap*) Varian, modelo Saturn 2000R. O gás de arraste utilizado foi hélio e o fluxo de 1 ml/min. Foi utilizada uma coluna capilar DB-225 (30m x 0.25mm) (J&W), aplicando-se um gradiente linear de temperatura de 50 a 250°C (40°C min) para análise qualitativa. Os espectros foram construídos e analisados com o programa próprio da Varian (Varian MS Workstation, versão 6.9, 2007), sob orientação técnica do Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento em Biomassa e Biocombustíveis da Universidade Federal do Tocantins (LEDBIO).

Os carboidratos reduzidos e acetilados foram comparados e identificados pela sua fragmentação e tempo de retenção em relação aos seguintes padrões: Ramnose, Fucose, Arabinose, Xilose, Manose, Galactose e Glicose.

4.10. Análise de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear foram conduzidas na Universidade Federal do Paraná, no departamento de Bioquímica. Todos os

experimentos seguiram os protocolos descritos por Ferreira et al. (2012), com modificações.

As amostras liofilizadas foram diluídas em D₂O, razão de 2:1 (amostras e água), e liofilizadas e posteriormente resolubilizadas em D₂O. Após este procedimento inicial todas as amostras foram encaminhadas para análise em aparelho Espectrômetro Bruker Advance DRX 400, equipado com um *probe* de detecção invertida de 5mm. A frequência base foi de 400,13 MHz para ¹H e de 100,63 MHz ¹³C. As análises foram feitas à 50°C. Foram feitos experimentos de 1D ¹H, ¹³C e 2D HSQC, com tempo de aquisição de 0,16 segundos. Os sinais químicos foram expressos em relação ao padrão interno de acetona fixada em 2,22 ppm (¹H), e 30,20 ppm (¹³C). Os espectros foram construídos e analisados com o programa *ACD/NMR Processor Academic Edition*¹, versão 12.01 (Março/2010).

¹ Disponível em: http://www.acdlabs.com/resources/freeware/nmr_proc/

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparo e obtenção do Material

As bateladas que originaram o coproduto da biofermentação utilizado neste experimento geraram quantidades de etanol dentro do esperado para esta cultivar de batata-doce. Segundo dados fornecidos pelo LASPER, as duas bateladas utilizadas tiveram rendimento de 163,76 e 165,44 litros de etanol produzidos, por tonelada de batata. Estes valores representaram valores próximos a 90% de taxa de conversão quando considerado o teor de amido inicial de 70% (base seca) das batatas utilizadas neste experimento, segundo experimentos anteriores (MARTINS, 2013). Segundo boletim da UFT (UFT, 2008) a cultivar Duda apresenta média de 161,04 litros de etanol por tonelada de batata-doce utilizada e 24% de amido (base úmida).

Quanto a umidade do resíduo utilizado, este apresentou média de 95,10% e 95,15% de umidade (batelada 1 e 2, respectivamente) com desvio padrão (DVP) de 0,099 e 0,03 e coeficiente de variação (CV) de 0,10% e 0,04%, respectivamente.

5.2. Extração e obtenção dos carboidratos

O processo utilizado, mostrou-se eficiente tendo em vista que foi possível obter quantidades satisfatórias de carboidratos, conforme valores apresentados na seção 5.3. - Purificação e quantificação dos carboidratos totais. Os testes para presença de amido e carboidratos totais se mostraram extremamente úteis como procedimento inicial para nortear a pesquisa.

É importante destacar que em nenhuma repetição e/ou batelada foi possível identificar a presença de amido pelo teste com lugol, indicando boa eficiência das enzimas utilizadas nas etapas prévias.

5.3. Purificação e quantificação dos carboidratos totais

A quantificação dos carboidratos totais foi feita nas repetições da primeira batelada, tendo em vista que ambas bateladas apresentaram rendimento muito próximo. Os valores finais obtidos de carboidratos na primeira batelada são apresentados na tabela 1 assim como os valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação. O percentual total apresentado é em relação à massa inicial de resíduo liofilizado utilizado, neste caso 55 gramas para cada repetição.

Tabela 1: Rendimento de carboidratos (polissacarídeos e oligossacarídeos) provenientes das extrações quentes (AQQ) e frias (AQF) aplicadas ao coproduto da biofermentação etanólica da batata-doce.

Amostra	Oligo (g)	% (massa Soma (%))		% (massa Soma (%))		
		inicial) Oligo	extrações Oligo	inicial) Polis (g)	extrações Polis	
AQF rep. 1	8,40	15,28	20,92	7,35	13,37	16,48
AQQ rep. 1	3,1	5,64		1,71	3,11	
AQF rep. 2	10,4	18,91	24,34	7,43	13,51	16,25
AQQ rep. 2	2,98	5,43		1,50	2,74	
AQF rep. 3	9,95	18,10	22,92	7,25	13,18	15,91
AQQ rep. 3	2,65	4,82		1,5	2,73	

Repetição	% Total (Oligo+Poli)	Média	DVP	CV
AQF+AQQ rep. 1	37,39			
AQF+AQQ rep. 2	40,59	38,94	1,60	4,12
AQF+AQQ rep. 3	38,83			

Analisando-se estes dados é importante notar que em todas as extrações (AQF e AQQ) a parte oligossacarídica foi maior, variando de 20,92 a 24,34% dos carboidratos. A porcentagem final de carboidratos foi, em média, de 38,94% em relação ao peso seco das amostras.

5.4. Curva de hidrólise e hidrólise ácida total dos carboidratos

Os hidrolisados obtidos e analisados por CLAE mostraram que a maior concentração de glicose foi obtida com quatro horas de hidrólise, nas condições utilizadas, determinando-se assim o tempo ótimo de hidrólise. Após isto, novas quantidades de amostra foram submetidas a esta mesma metodologia de hidrólise, apresentada no item 4.4. - Curva de hidrólise e hidrólise ácida total dos carboidratos, para posteriores análises.

5.5. Teste qualitativo e quantitativo proteínas

O teste qualitativo foi possível em função das reações que ocorreram quando o reagente coomasie blue G-250 ligou-se a proteínas, pois interações hidrofóbicas e iônicas estabilizaram as formas aniônicas do corante causando uma mudança visível de coloração (BRADFORD, 1976).

Tanto para a amostra de polissacarídeos quanto para a de oligossacarídeos ficou evidente o resultado qualitativo positivo (figura 6) pela mudança na coloração.

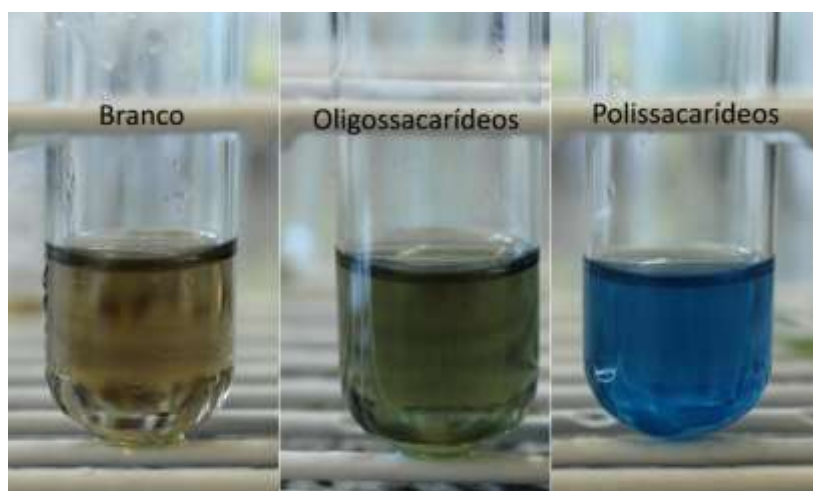


Figura 6: Teste qualitativo para identificar presença/ausência de proteína nas amostras.

Não foi possível ser feita a dosagem quantitativa das proteínas, em virtude da baixa quantidade presente, que está fora da linearidade do método (sensibilidade entre 5 a 100 µg de proteínas); então, para o teste qualitativo foi utilizada amostra em excesso para ambos (oligossacarídeos e polissacarídeos) somente com o intuito de se demonstrar, qualitativamente, a presença de

proteínas, mas enfatizando-se que as quantidades foram mínimas, á nível de traços.

Esta análise é importante, pois elevadas quantidades de proteína poderiam influenciar nas análises seguintes, principalmente ressonância magnética nuclear e cromatografia gasosa, onde estas seriam detectadas (SASSAKI et al., 2008; ASCENCIO, 2004) . Isto então, implicaria em uma etapa de desproteinização das amostras, o que não foi necessário.

5.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os resultados obtidos podem ser visualizados na figura 7. Nesta, pode-se notar que os oligossacarídeos foram fracionados de maneira eficiente pela cromatografia preparativa de carvão:celite, pois ocorreram diferenças nas revelações para as três fases (Aquosa, 10% etanol e 20% etanol), nos pontos G/H/I e J/K/L. Observa-se também que a hidrólise dos polissacarídeos foi eficiente por esta triagem inicial, tendo em vista que antes desta (pontos identificados como AQF pré-hidro e AQQ pré-hidro na legenda da figura 7) não houve separação.

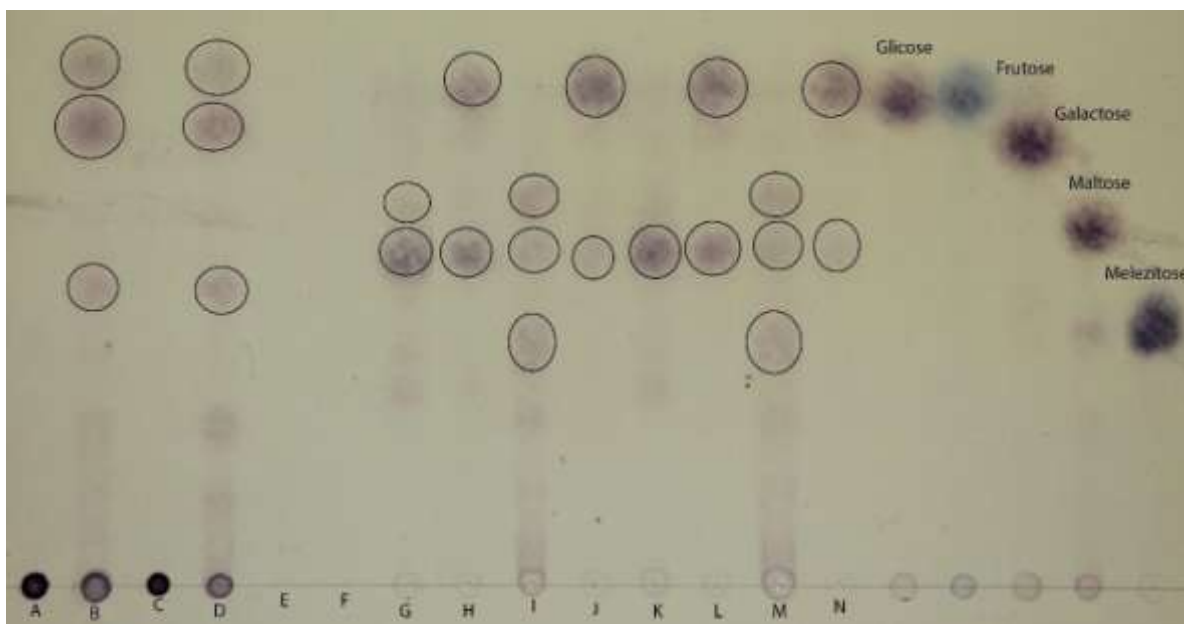


Figura 7: Cromatografia em camada delgada das frações sacarídicas do coproduto da biofermentação etanólica da batata-doce. A – Poli AQF pré-hidrólise; B - Poli AQF pós-hidrólise; C - Poli AQQ pré-hidrólise; D - Poli AQF pós-hidrólise; E – Oligo AQF fração 100% H₂O; F – Oligo AQQ fração 100% H₂O; G – Oligo AQF fração 10% ETOH pré-hidrólise; H – Oligo AQF fração 10% ETOH pós-hidrólise; I – Oligo AQF fração 20% ETOH pré-hidrólise; J – Oligo AQF fração 20% ETOH pós-hidrólise; K – Oligo AQQ fração 10% ETOH pré-hidrólise; L – Oligo AQQ fração 10% ETOH pós-hidrólise; M – Oligo AQQ fração 20% ETOH pré-hidrólise; N – Oligo AQQ fração 20% ETOH pós-hidrólise.

Notou-se que não existiram grandes diferenças entre AQQ e AQF, levando-se a acreditar que as diferentes temperaturas de extração não modificaram qualitativamente a composição de carboidratos, somente quantitativamente. Os pontos E e F não apresentaram revelação, pois parte dos carboidratos desta fração se mostram insolúveis após passarem pelo processo de diálise e liofilização.

Pela análise desta placa cromatográfica pode-se inferir que ao se comparar a porção oligossacarídica hidrolisada com os padrões aplicados, as revelações indicaram compostos similares à maltose e glicose. Já a porção polissacarídica hidrolisada apresentou revelações que indicam compostos similares à galactose e glicose.

5.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Após a triagem inicial por cromatografia em camada delgada (CCD) as frações AQQ e AQF de polissacarídeos e oligossacarídeos foram encaminhadas para análise por CLAE. Em virtude da utilização do detector de índice de refração (RID) ao invés de detecção por UV-VIS, não se fez necessária a modificação das moléculas de carboidratos por derivatização.

Comparando-se os cromatogramas obtidos com curvas de calibração para os padrões de glicose, maltose, galactose e melezitose, foi possível aferir qualitativamente e quantitativamente a composição destes carboidratos. Outros picos (pc.) podem ser visualizados nos cromatogramas mas em virtude da falta de padrões não foi possível a identificação e quantificação desses.

Nas porções oligossacarídicas de AQF (figuras 8, 9 e 10) foi possível identificar três açúcares, fermentescíveis por *Sacharomyces cerevisiae*, sendo estes: Glicose, maltose, e galactose.

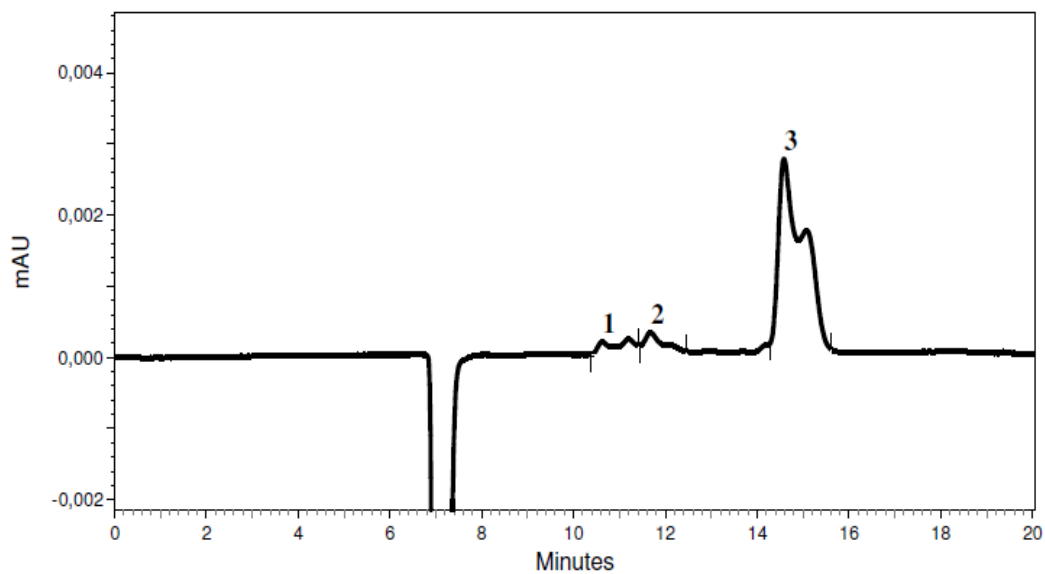


Figura 8: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQF 100% H₂O, pc. 1 = glicose; pc. 2 = galactose; pc. 3 = não identificado.

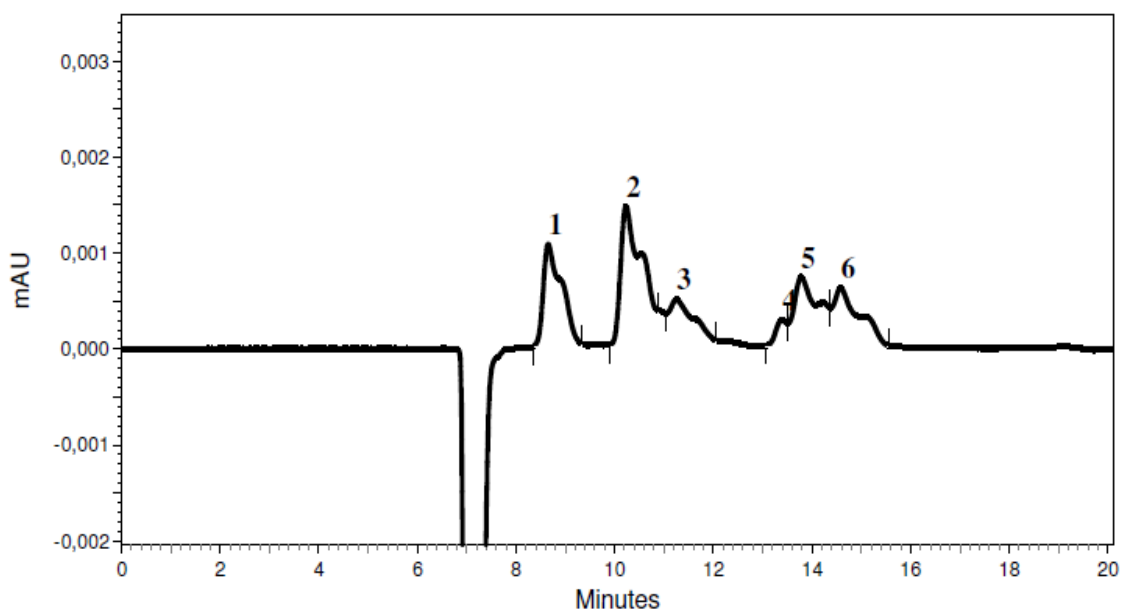


Figura 9: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQF 10% ETOH, pc. 1 = maltose; pc. 2 = glicose; pc. 3 = galactose; pc. 4, 5 e 6 = não identificados.

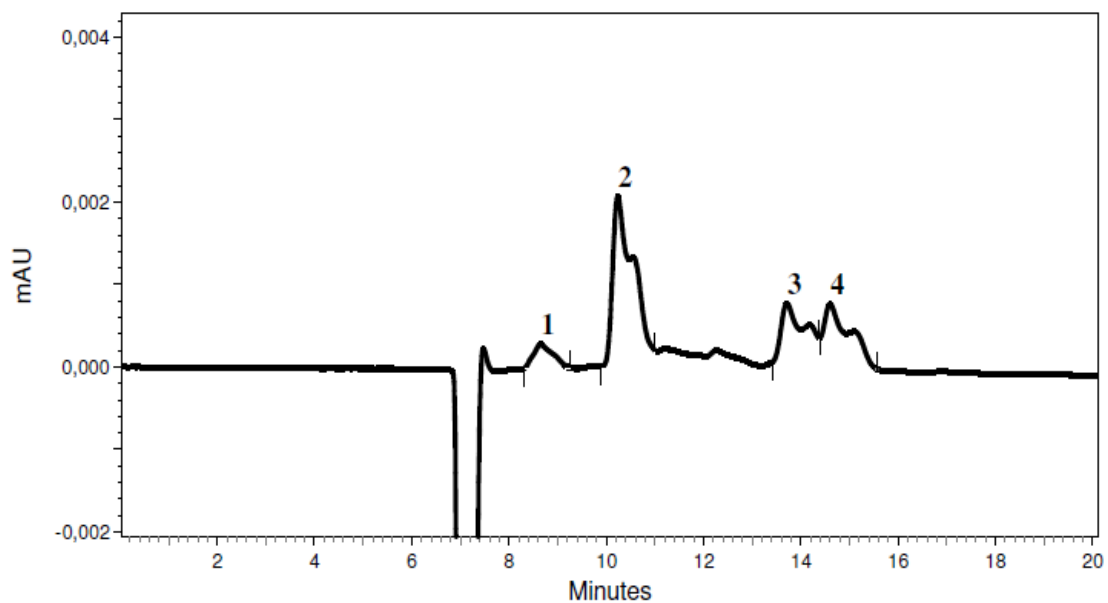


Figura 10: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQF 20% ETOH, pc. 1 = maltose; pc. 2 = glicose; pc. 3 e 4 = não identificados.

AQQ (figuras 11, 12 e 13) também apresentou os mesmos açúcares, e a grande similaridade entre os cromatogramas, deste modo podendo-se afirmar que a diferença estará somente nas concentrações.

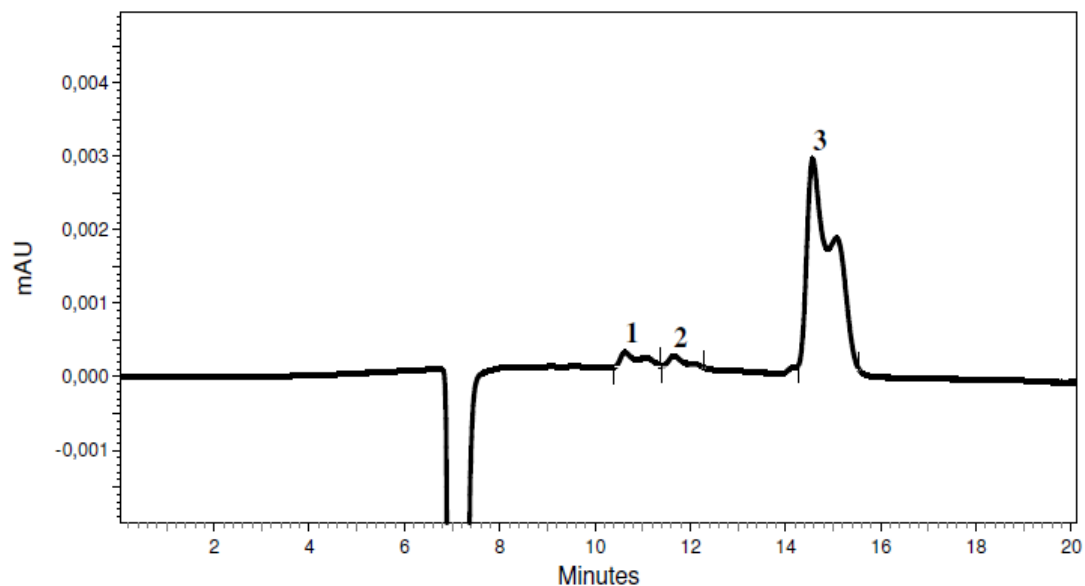


Figura 11: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQQ 100% H₂O, pc. 1 = glicose; pc. 2 = galactose; pc. 3 = não identificado.

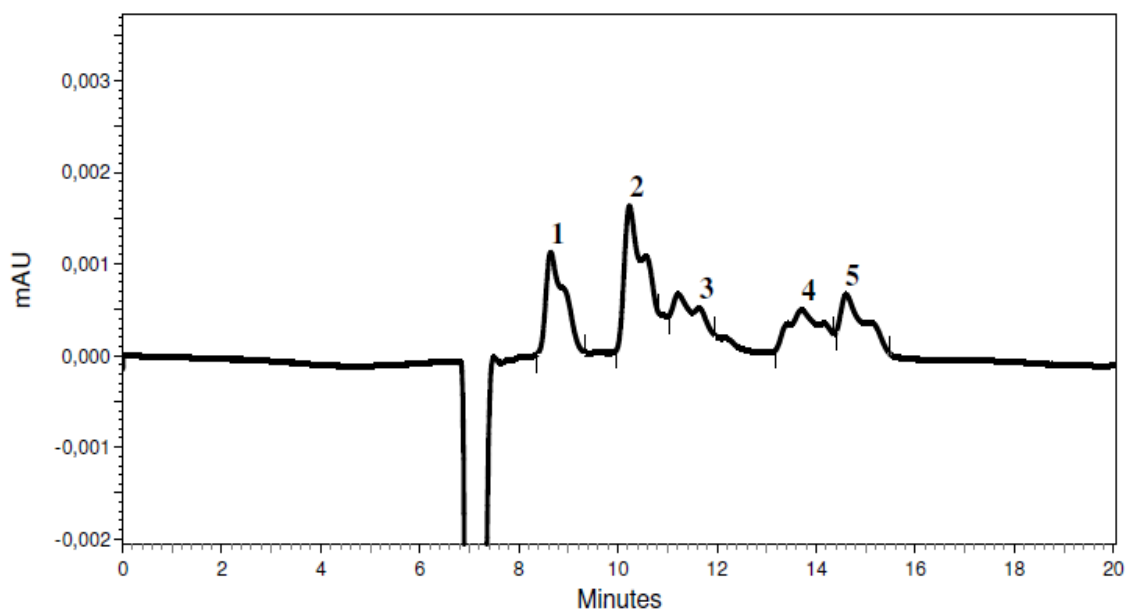


Figura 12: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQQ 10% ETOH, pc. 1 = maltose; pc. 2 = glicose; pc. 3 = galactose; pc. 4, 5 e 6 = não identificados.

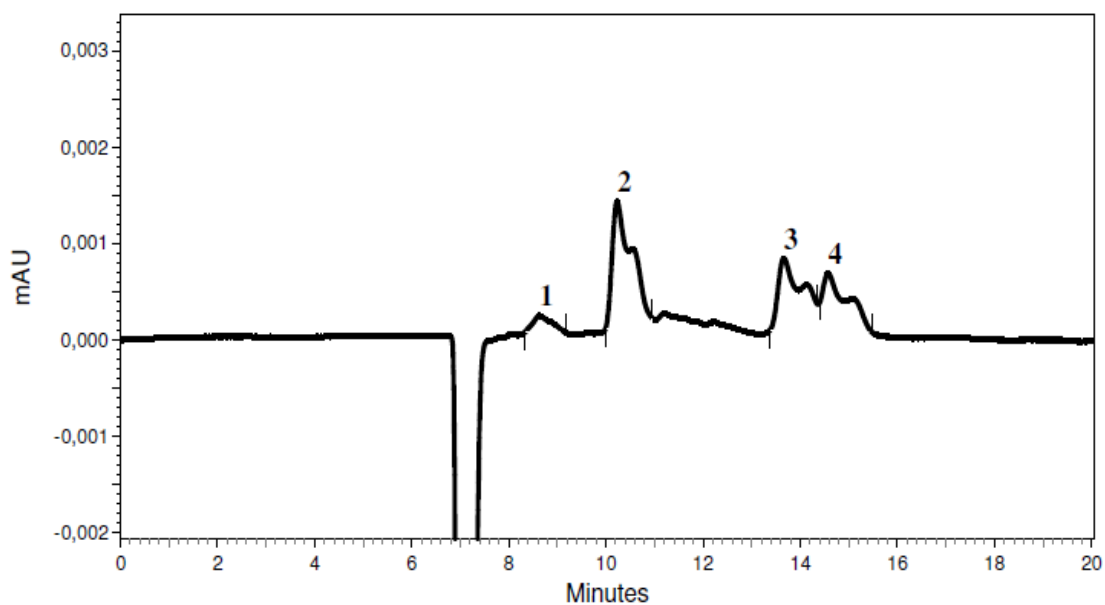


Figura 13: Cromatograma CLAE oligossacarídeos AQQ 20% ETOH, pc. 1 = maltose; pc. 2 = glicose; pc. 3 e 4 = não identificados.

Ao analisarmos os dados dos polissacarídeos de AQF e AQQ (figuras 14 e 15), assim como ocorreu nos oligossacarídeos, ambas extrações apresentaram os mesmos açúcares e grande similaridade nos cromatogramas. Identificando-se quatro açúcares, sendo estes melezitose, glicose, maltose e galactose.

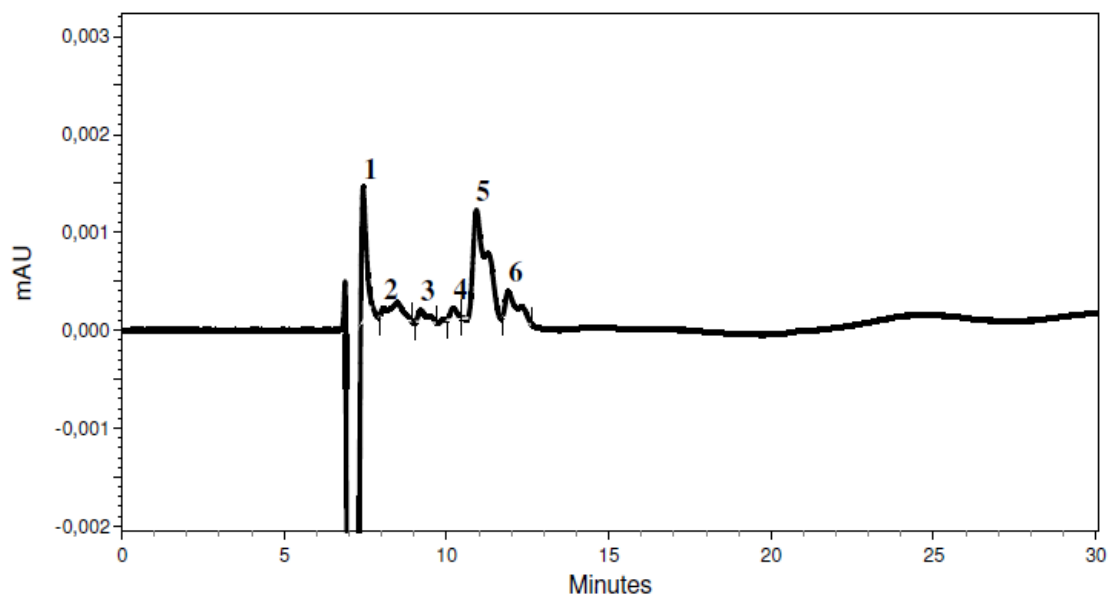


Figura 14: Cromatograma CLAE polissacarídeos AQP, pc. 1 = melezitose; pc. 2 = não identificado; pc. 3 = maltose; pc. 4 = glicose; pc. 5 = galactose e pc. 6 = não identificado.

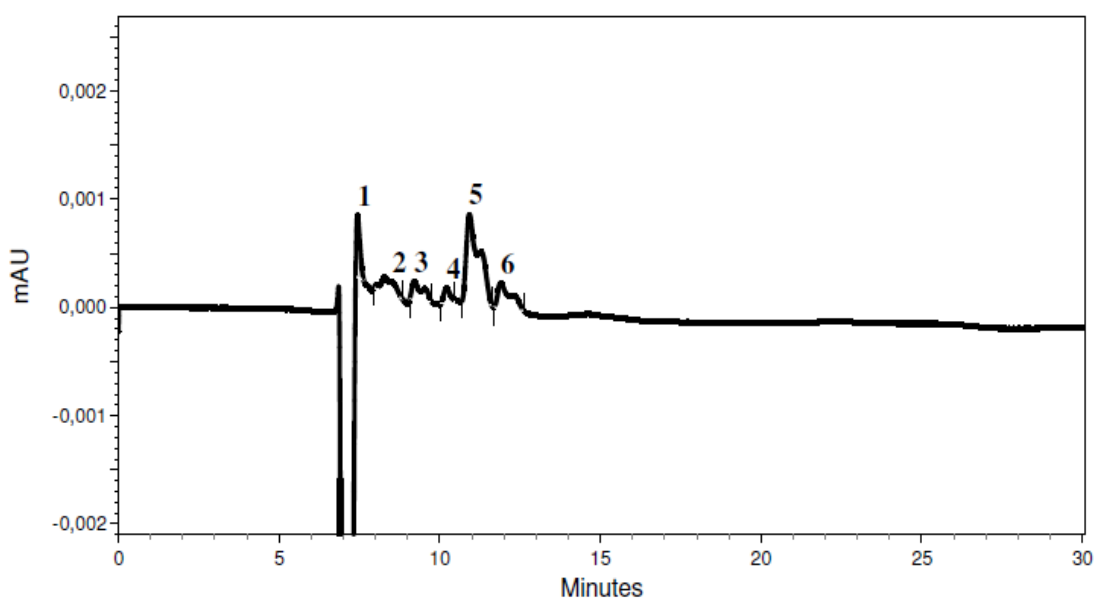


Figura 15: Cromatograma CLAE polissacarídeos AQQ, pc. 1 = melezitose; pc. 2 = não identificado; pc. 3 = maltose; pc. 4 = glicose; pc. 5 = galactose e pc. 6 = não identificado.

Quanto à quantificação dos açúcares de interesse, os dados encontrados estão dispostos na tabela 2, para a porção oligossacarídica de AQP e AQQ. Esta tabela foi dividida de modo que fosse possível visualizar a porcentagem de cada açúcar em relação as frações, estas preparadas em soluções de 1mg/ml então as porcentagem são relativas a esta massa de 1 mg, e também em relação ao total um extração, representada pela soma das três frações, então as porcentagens são relativas a soma da massa dessas frações (total de 3 mg).

Tabela 2: Quantificação dos açúcares presentes na porção oligossacarídica das extrações AQF (aquosa fria) e AQQ (aquosa quente). Valores apresentados como porcentagem em relação a massa (mg).

Extrações	Frações	Glicose (%)	Maltose (%)	Galactose (%)	
AQF	100 % água	7,5	-	3,4	
	10% ETOH	49,6	12,9	7,2	
	20% ETOH	70,3	4,2	-	
Total da extração AQF		42,5¹	5,7¹	3,5¹	51,7²
AQQ	100 % água	5,5	-	1,2	
	10% ETOH	52,3	13,3	9,7	
	20% ETOH	41,3	2,6	-	
Total da extração AQQ		33,0¹	5,3¹	3,6¹	41,9²

¹Porcentagem calculada pela soma das porcentagens de cada fração e dividida pela soma das massas (mg) das frações. ²Soma das porcentagens totais de cada monossacarídeo em uma extração.

Observando-se os dados da tabela 2 pode-se verificar que quando comparadas as diferentes porções oligossacarídicas da extração AQF, a terceira (20% ETOH) apresentou a maior quantidade de glicose, onde 70,3% da massa inicial, de 1 mg (solução de 1mg/ml), foi relativa a este açúcar. Nota-se também que para a extração AQF, do total de 3 mg (soma da massa das 3 frações), 42,5% dos açúcares totais eram glicose, sendo este o açúcar mais presente nos oligossacarídeos. Na segunda extração (AQQ), glicose também foi o açúcar mais presente. Note-se a diferença quanto a fração que apresentou à maior quantidade de glicose, que foi 10% ETOH (52,3%).

Os dados de quantificação da porção polissacarídica estão apresentados na tabela 3. Segundo estes dados os polissacarídeos têm composição muito diferente dos oligossacarídeos.

Destaca-se também que, após os processos de diálise e liofilização, parte dos polissacarídeos tornaram-se insolúveis em água. Isto pode ter ocorrido em virtude da perda de sais que aumentavam a solubilidade do polímero e também pela perda de moléculas de água internas pela liofilização. Deste modo, os dados apresentados a seguir são referentes somente a parte que se manteve solúvel pois, quando se prepararam as soluções de 1mg/ml para aplicação no cromatógrafo a parte insolúvel, por haver precipitado não foi analisada.

Tabela 3: Quantificação dos açúcares presentes na porção polissacarídica das extrações AQF (aquosa fria) e AQQ (aquosa quente). Valores apresentados como porcentagem em relação a massa (mg).

Extrações	Galactose (%)	Glicose (%)	Maltose (%)	Melezitose (%)
AQF	11,7	0,1	1,6	6,0
AQQ	8,7	0,6	2,3	2,5
Total das extrações	10,2¹	0,3¹	1,9¹	4,3¹

¹Porcentagem calculada pela soma das porcentagens de cada extração e dividida pela soma das massas (mg) das extrações.

Em ambas as extrações foram obtidas concentrações gerais de açúcares fermentescíveis inferiores, principalmente, de glicose. O açúcar em maior concentração foi a galactose, com 11,7% e 8,7%, em AQF e AQQ, respectivamente, e com porcentagem total de 10,2% pelo somatório de ambas.

Os valores percentuais dos monossacarídeos encontrados nas diferentes porções (oligossacarídica e polissacarídica) estão de acordo com os valores encontrados em análise da composição das fibras alimentares e de pectina em variedades de batata-doce, onde foram encontrados valores variando de 8 a 30% de galactose, até 65% de glicose. Isto é um bom indicio já que estas fibras trazem diversos benefícios à saúde quando ingeridas (NODA et al. 1994; MEI, MU e HAN, 2010). Khodaei e Karboune (2014), em seu estudo com a batata-inglesa, obtiveram, por via enzimática, polímeros ricos em galactose (galactanas) provenientes da parede celular, pois estas moléculas apresentam diversos benefícios quando utilizadas na alimentação. A quantidade de galactose obtida neste trabalho (599,42 $\mu\text{mol/g}$) está abaixo do mínimo obtido pela ação enzimática (639,5 $\mu\text{mol/g}$), mas está próximo. No entanto, vale ressaltar que parte dos polissacarídeos não puderam ser analisados por CLAE em virtude da perda de solubilidade, podendo subestimar a presença de galactose. Estes dados mostram que é possível que coproduto da biofermentação possa ter o seu uso futuro na alimentação despertado por este apresentar boas quantidades desses monossacarídeos.

O somatório de ambas as partes, oligossacarídica e polissacarídica, das duas extrações (AQF e AQQ), apresentaram uma concentração final de açúcares fermentescíveis de 3,06 mg, de um total de 8 mg de amostra, ou seja, os açúcares fermentescíveis representaram 38,25% dos carboidratos totais.

Destes, a glicose foi o mais representativo, principalmente na porção oligossacarídica, seguido da galactose.

A presença de glicose, na porção oligossacarídica e de galactose na polissacarídica, mesmo que em baixas quantidades, pode indicar a presença de Glucanas e Galactanas, respectivamente.

Salvador et al. (2000) estudaram a composição monossacarídica das fibras e da parede celular de batata-doce. Estas, por sua vez, são de interesse por serem componentes do coproduto da biofermentação etanólica. Neste estudo foram encontradas quantidades significativas de galactose nos resíduos de amido, após hidrólise. Nesse mesmo trabalho, a extração destas fibras se deu por extração aquosa quente, utilizando-se temperatura de 100°C por 20 minutos.

Não foi possível a determinação e quantificação dos picos com maior tempo de retenção nas porções oligossacarídicas (14,5 min), no entanto ao compararmos o tempos de retenção com dados disponíveis na literatura (ASCENCIO, 2004) é possível que estes picos indiquem a presença de açúcares aaminados (N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina e N-acetilmanosamina).

5.8. Redução e acetilação

Os carboidratos previamente derivatizados foram analisados por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa. A derivatização visou a transformação dos carboidratos em alditois de acetato, para que estes se tornassem voláteis. As comparações foram feitas com base na fragmentação característica de cada alditol provocada pelo impacto de elétrons por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS), e pelo tempo de retenção obtido por cromatografia gasosa (CG).

5.9. Cromatografia Gasosa (CG) e espectrometria da massa (MS)

O cromatograma (figura 16) e os espectros de massa (figuras 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24) apresentados evidenciaram a presença de ramnose, arabinose xilose, manose, galactose e glicose na fração polissacarídica hidrolisada, tanto pela comparação com o tempo de retenção de padrões, como pela comparação dos respectivos espectros de massa. Quando comparados

com dados da literatura os espectros e cromatograma obtidos estiveram de acordo com os dados apresentados por Sasaki e Souza (2013) e Sasaki et al. (2008), confirmando-se, portanto, a presença destes açúcares no coproduto. Foram conduzidas análises qualitativas, não sendo possível quantificar os açúcares presentes.

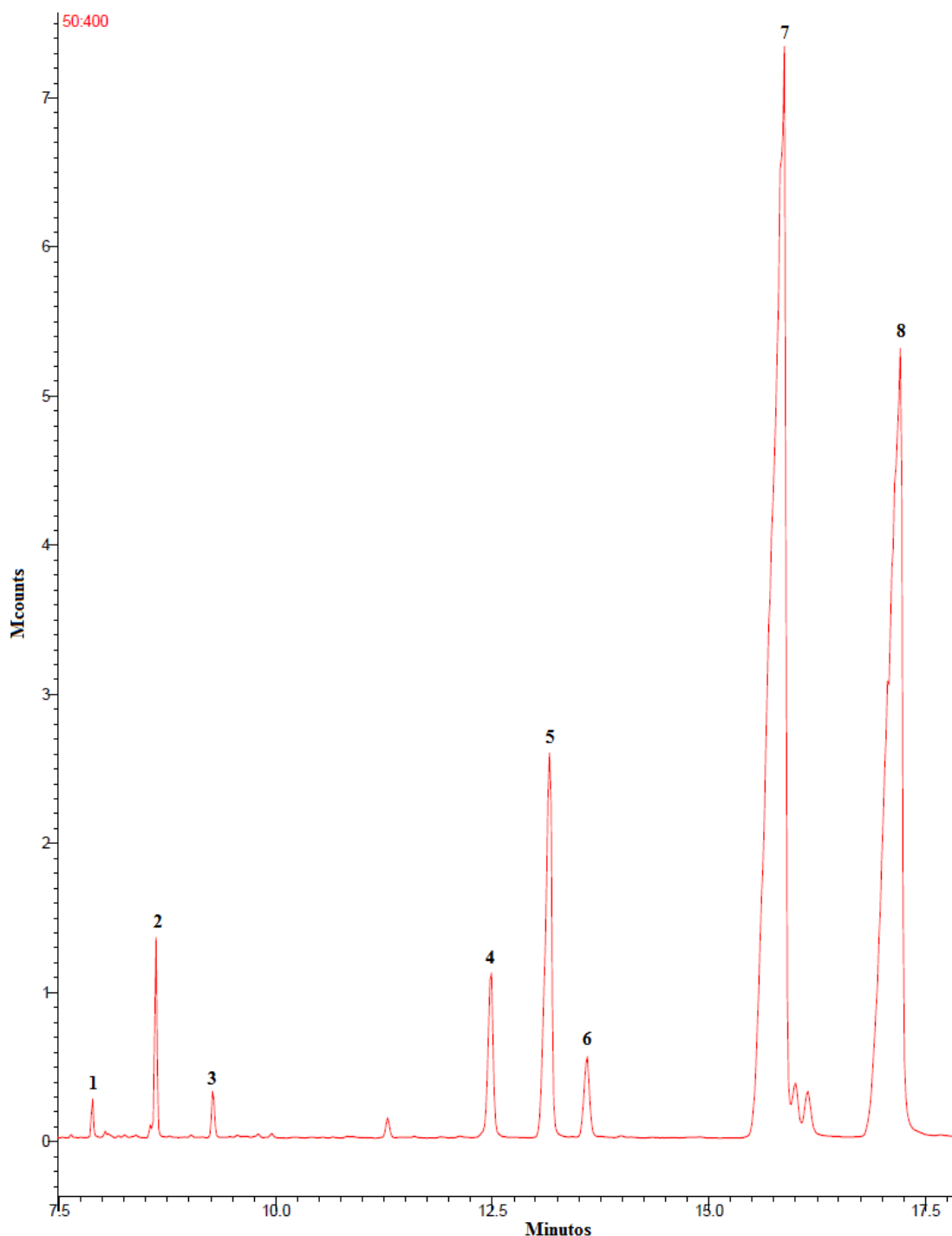


Figura 16: Cromatograma CG polissacarídeos e picos (pc.) identificados pelo tempo de retenção, pc. 1 = ramnose; pc. 2 = arabinose; pc. 3 = xilose; pc. 4 = manose; pc. 5 = glicose, pc. 6 = galactose e espectros de massa pc. 7 = N-acetilglicosamina e pc. 8 = N-acetilgalactosamina.

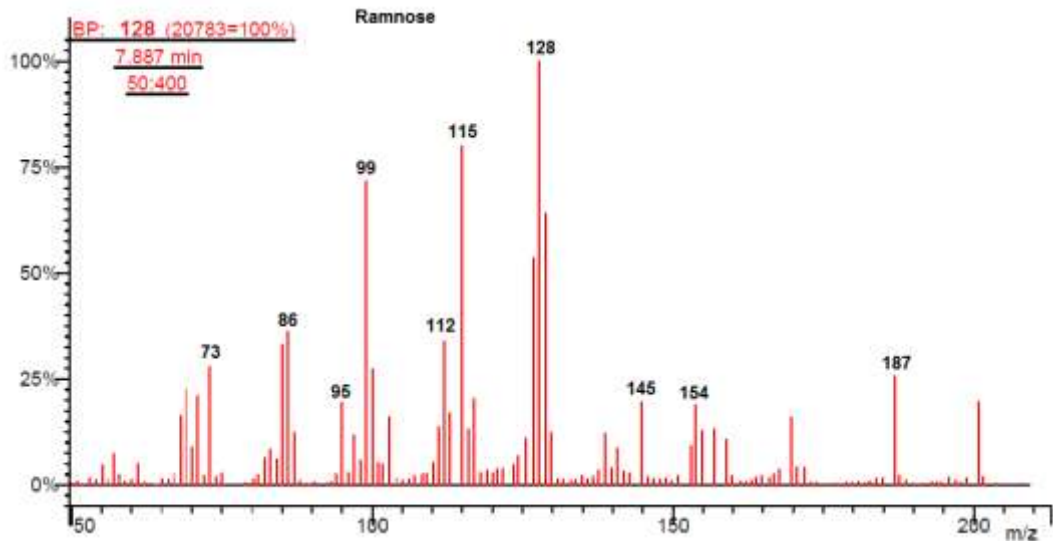


Figura 17: Espectro de massa ramnose (pc. 1 figura 16) tempo de retenção 7,887 minutos.

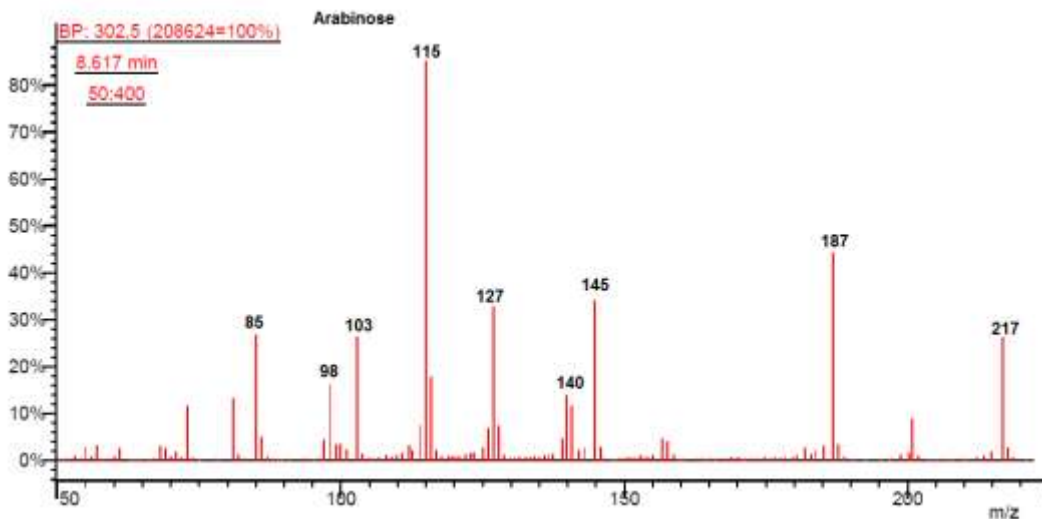


Figura 18: Espectro de massa arabinose (pc. 2 figura 16) tempo de retenção 8,617 minutos.

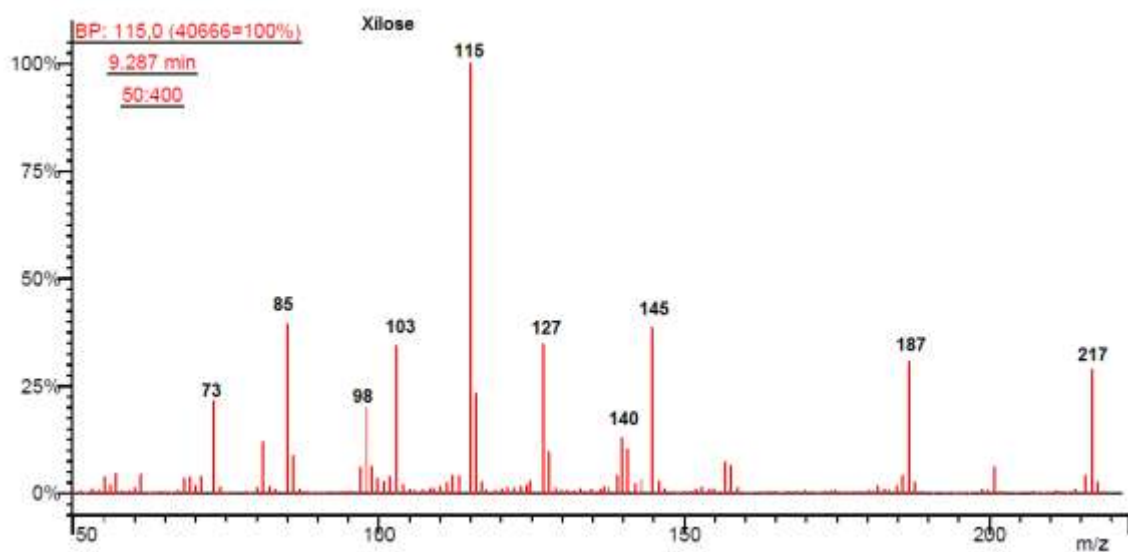


Figura 19: Espectro de massa xilose (pc. 3 figura 16) tempo de retenção 9,287 minutos.

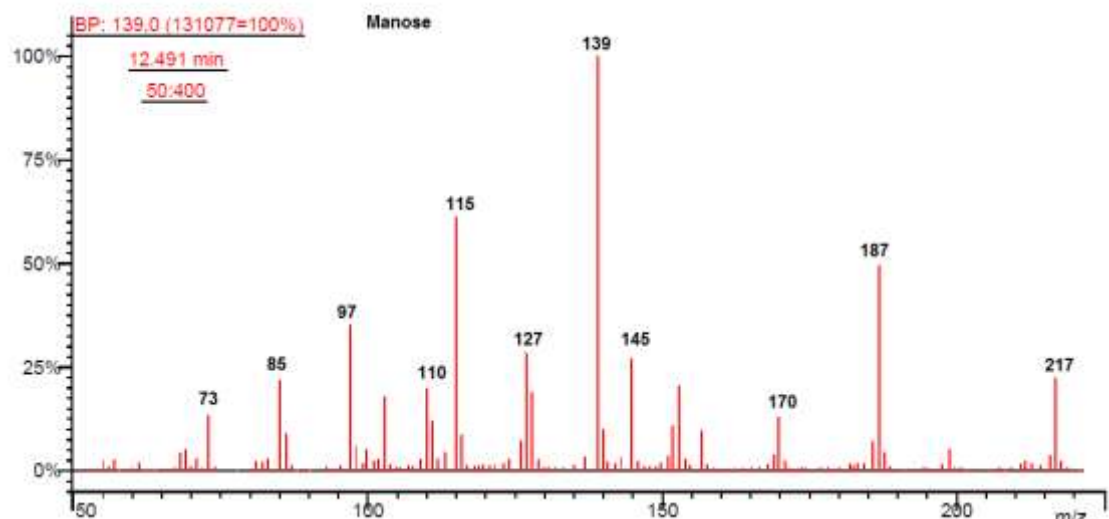


Figura 20: Espectro de massa manose (pc. 4 figura 16) tempo de retenção 12,491 minutos.

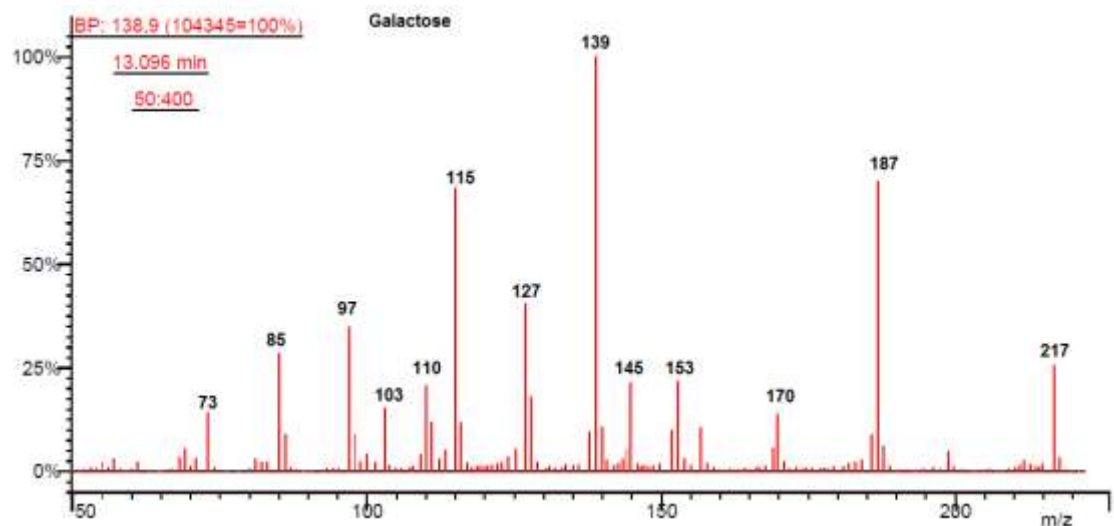


Figura 21: Espectro de massa galactose (pc. 5 figura 16) tempo de retenção 13,096 minutos.

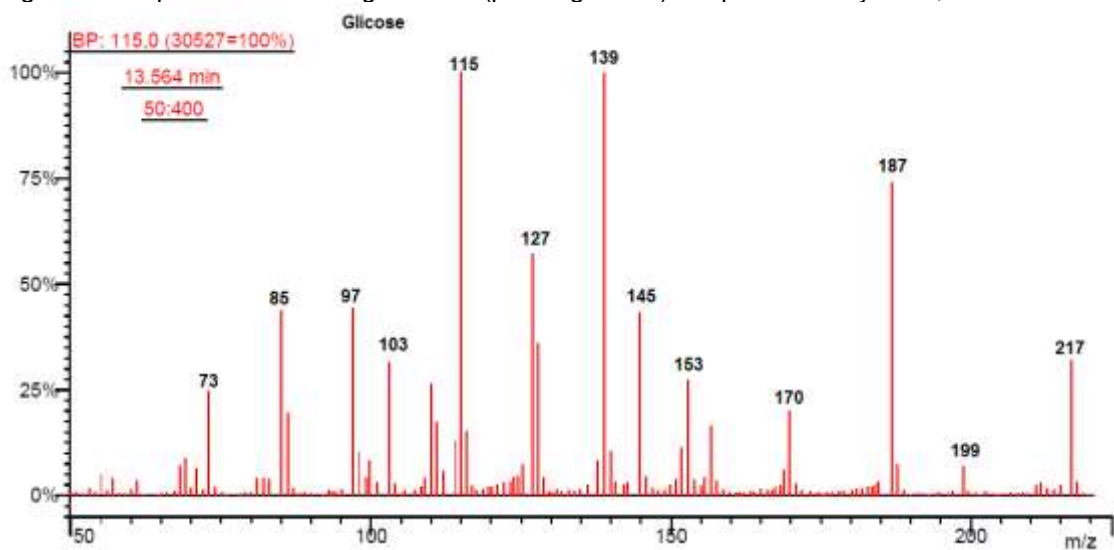


Figura 22: Espectro de massa glicose (pc. 6 figura 16) tempo de retenção 13,564 minutos.

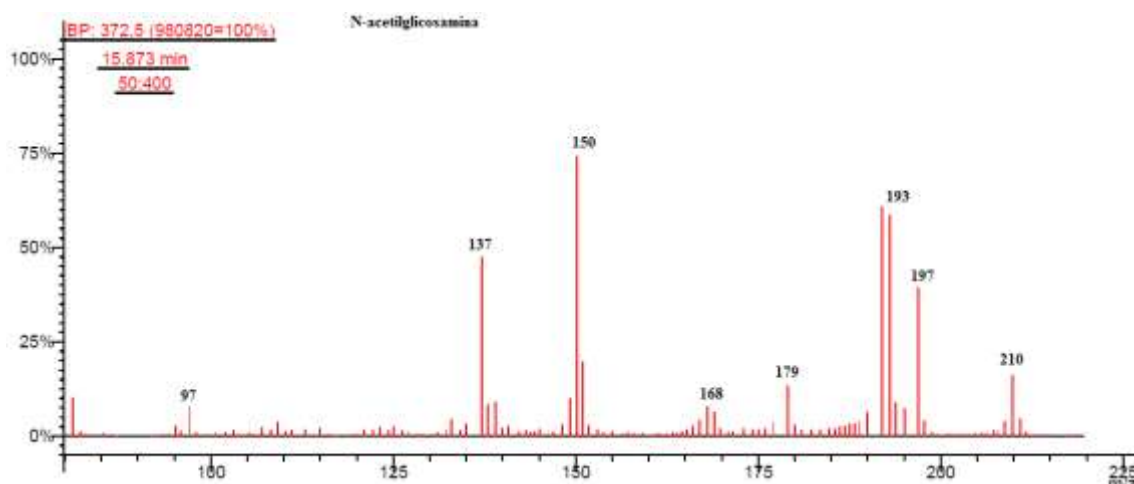


Figura 23: Espectro de massa N-acetilglicosamina (pc. 7 figura 16) tempo de retenção 15,873 minutos.

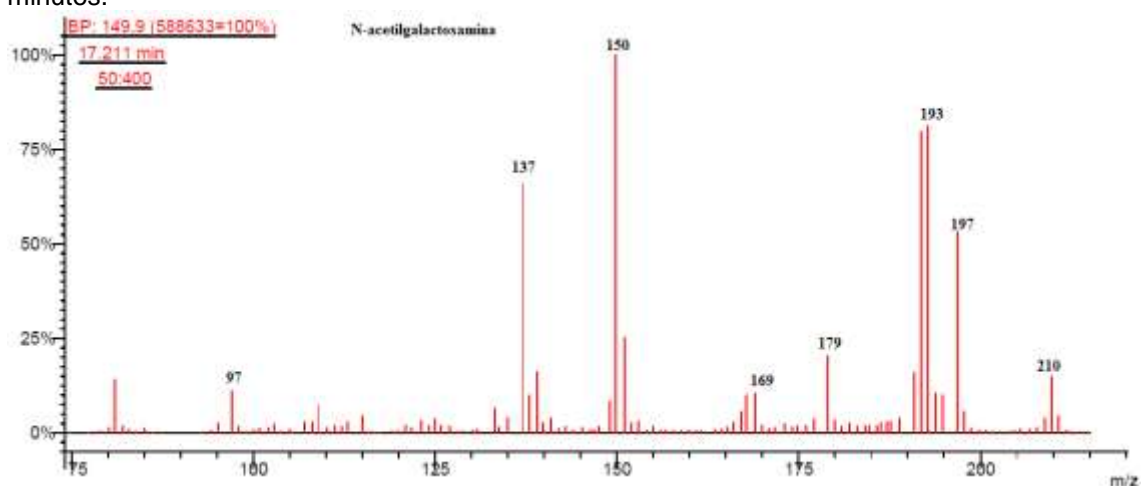


Figura 24: Espectro de massa N-acetilgalactosamina (pc. 8 figura 16) tempo de retenção 17,211 minutos.

É importante destacar que os dados apresentados mostraram a presença de açúcares já identificados anteriormente por CCD e CLAE (glicose e galactose), e de açúcares que anteriormente não haviam sido identificados (manose, ramnose, arabinose e xilose).

No cromatograma desta fração foi possível identificar a presença de picos referentes a açúcares aminados pelos seus espectros de fragmentação característico em relação a literatura (SASSAKI et al. 2008). Possivelmente estes açúcares sejam N-acetilgalactosamina (GalNAc) e N-acetilglicosamina (GlcNAc). Em virtude da metodologia empregada para a derivatização a parte antes insolúvel dos polissacarídeos pôde ser analisada por cromatografia gasosa, podendo então ser composta por estes açúcares. Estes monossacarídeos são comumente encontrados em glicoproteínas.

5.10. Análise de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros obtidos no experimento de ^1H dos polissacarídeos de AQF e de AQQ são apresentados nas figura 25 e figura 26, respectivamente. Nestes, pode-se verificar a presença de sinais anoméricos na região de 4,5 a 5,5 ppm, além de sinais na região de 1,44 e 1,26 característicos de grupamentos metil ($-\text{CH}_3$). A região de 3,7~3,8 ppm é onde ocorre a sobreposição dos sinais de diversos carbonos (C2 – C5 de vários monossacarídeos) e é em virtude disto a grande intensidade do sinal.

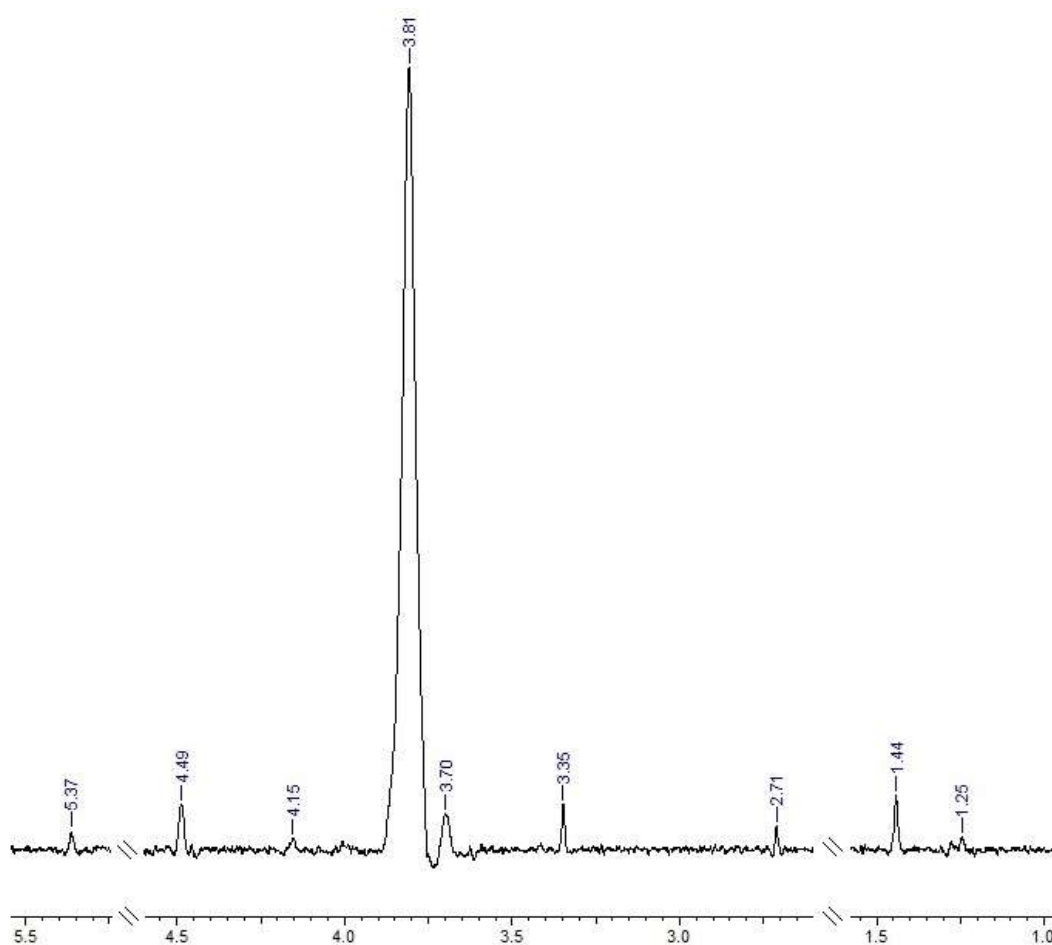


Figura 25: Espectro de RMN 1D ^1H da porção AQF de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 2,22 ppm (^1H).

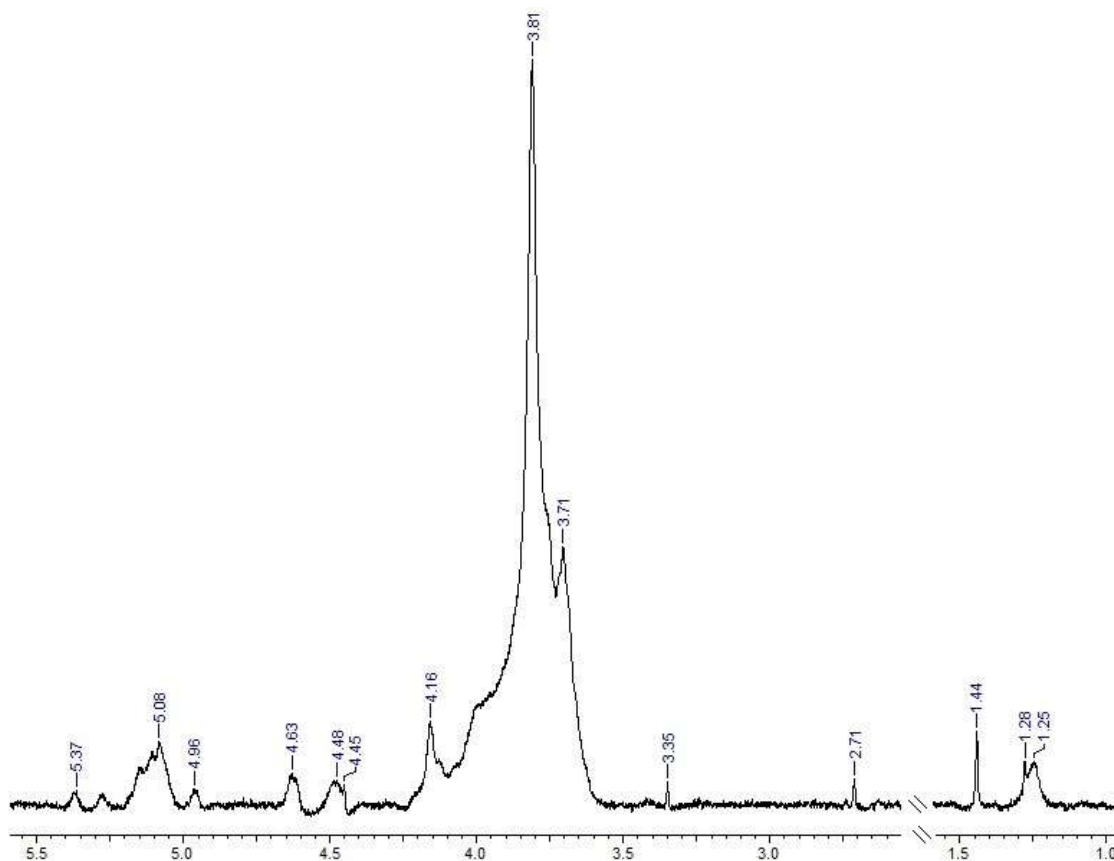


Figura 26: Espectro de RMN 1D ^1H da porção AQQ de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 2,22 ppm (^1H).

Para maior entendimento, experimentos 2D HSQC, relacionando os hidrogênios com sinais de ^{13}C , foram conduzidos. Os principais sinais identificados em ambos os experimentos assim, como os seus possíveis assinalamentos, podem ser visualizados na tabela 4.

Tabela 4: Sinais químicos (coluna 2 e 3) referentes ao hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) obtidos na análise de RMN 2D (HSQC) da porção polissacarídica da extração AQF. Na primeira coluna pode-se identificar a qual hidrogênio ou carbono (Hx/Cx) e a qual açúcar (Ram = Ramnose;

Ac.Gal = Ácido galacturônico; Gal = Galactose; GalNAc = N-acetilgalactosamina e Ara = Arabinose) os sinais foram atribuídos. Todos os valores expressos em partes por milhão (ppm).

Atribuição dos sinais	¹ H	¹³ C	Referência
H6/C6 (Ram)	1,27	16,94	Colquhoun et al. (1990), Tanaka et al. (2010), Mikshina (2012), Neiwert, Holst e Duda (2014).
Acetona	2,22	30,25	-
-OCH ₃ (Ac.Gal) C2 GalNAc	3,82	52,91	Nurdjanah et al. (2013), Ha et al. 2005, Jovyn et al. (2014), Zykwinska et al. (2006), Ascencio (2004)
H6/C6 (Gal)	3,82	60,95	Mikshina (2012), Usov (1997), Colquhoun et al. (1990)
H5/C5 (Ara)	3,81	66,52	Liang et al. (2013)
H2-H5/C2-C5 (Ac.Gal)	3,75	67,98	Nurdjanah et al. (2013), Ha et al. 2005, Jovyn et al. (2014), Zykwinska et al. (2006)
H2-H5/C2-C5 (Ac.Gal)	4,00	68,21	Nurdjanah et al. (2013), Ha et al. 2005, Jovyn et al. (2014), Zykwinska et al. (2006)
H3/C3 (Ram)	4,09	70,24	Neiwert, Holst e Duda (2014), Mikshina (2012), Colquhoun et al. (1990)
Não Definido	5,10	70,24	-
H4/C4 (Ram) e H2/C2 (Gal)	3,70	71,97	Neiwert, Holst e Duda (2014), Colquhoun et al. (1990), Mikshina (2012), Usov (1997).
H3/C3 (Gal)	3,78	73,40	Mikshina (2012), Usov (1997), Colquhoun et al. (1990)
H5/C5 (Gal)	3,72	74,55	Mikshina (2012), Usov (1997), Colquhoun et al. (1990)
H3/C3 (Ara)	4,02	76,91	Zykwinska et al. (2006), Ha et al. (2005), Liang et al. (2013)
H4/C4 (Gal)	4,18	77,51	Mikshina (2012), Usov (1997), Colquhoun et al. (1990)
H2/C2 (Ram) e H4/C4 (Ac.Gal)	4,47	78,63	Nurdjanah et al. (2013), Ha et al. 2005, Jovyn et al. (2014), Zykwinska et al. (2006)
H2/C2 (Ara)	4,14	81,08	Zykwinska et al. (2006), Ha et al. (2005), Liang et al. (2013), Jovyn et al. (2014)
H4/C4 (Ara)	4,22	82,29	Zykwinska et al. (2006), Ha et al. (2005), Liang et al. (2013), Jovyn et al. (2014)
H1/C1 (Ram) e H1/C1 (Ac.Gal)	4,97	100,07	Nurdjanah et al. (2013), Ha et al. 2005, Jovyn et al. (2014), Zykwinska et al. (2006)
H1/C1 (Gal)	4,64	104,36	Mikshina (2012), Usov (1997), Colquhoun et al. (1990), Tanaka et al. (2010), Jovyn et al. (2014)
H1/C1 (Ara)	5,10	107,52	Zykwinska et al. (2006), Ha et al. (2005), Liang et al. (2013), Tanaka et al. (2010), Jovyn et al. (2014)

Os espectros do experimento de ^{13}C (figuras 27 e 28) e de HSQC (figuras 29 e 30) tanto para os polissacarídeos de AQF quanto para AQQ, respectivamente, apresentaram um sinal com grande intensidade próximo de 53 ppm.

Segundo Zykwinska et. al (2006) e Jovyn (2014) este sinal é característico de grupos éster-metil ($-\text{OCH}_3$) e metóxi (MeO); e segundo Ha et al. (2005) este sinal é característico do grupo metoxil péctico (pectina). Nesse mesmo trabalho os pesquisadores descreveram uma galactana presente em variedades de maçãs. Segundo eles é característico que estas estruturas químicas apresentem um sinal em 105 ppm característico do C1, e os outros sinais entre 72 e 79 ppm, o que também representaria a estrutura identificada neste trabalho, seguindo a calibração usada pelo pesquisador (equivalente ao sinal anomérico em 104 ppm deste trabalho). Sinais entre 52 e 57 ppm também são relacionados com carbonos amino-substituídos provenientes de açúcares aminados (AGRAWAL, 1992; ASCENCIO, 2004). Jovyn et al. (2014) também indicaram que este sinal de 53 ppm deve ser designado ao grupamento éster-metil de ácido galacturônicos e, em seu trabalho, afirmaram que este sinal quando dominante, como é o caso, pode estar diretamente ligado a alto grau de esterificação, ou em virtude do tipo de análise feita este sinal se torna mais aparente (*decoupling sequence*).

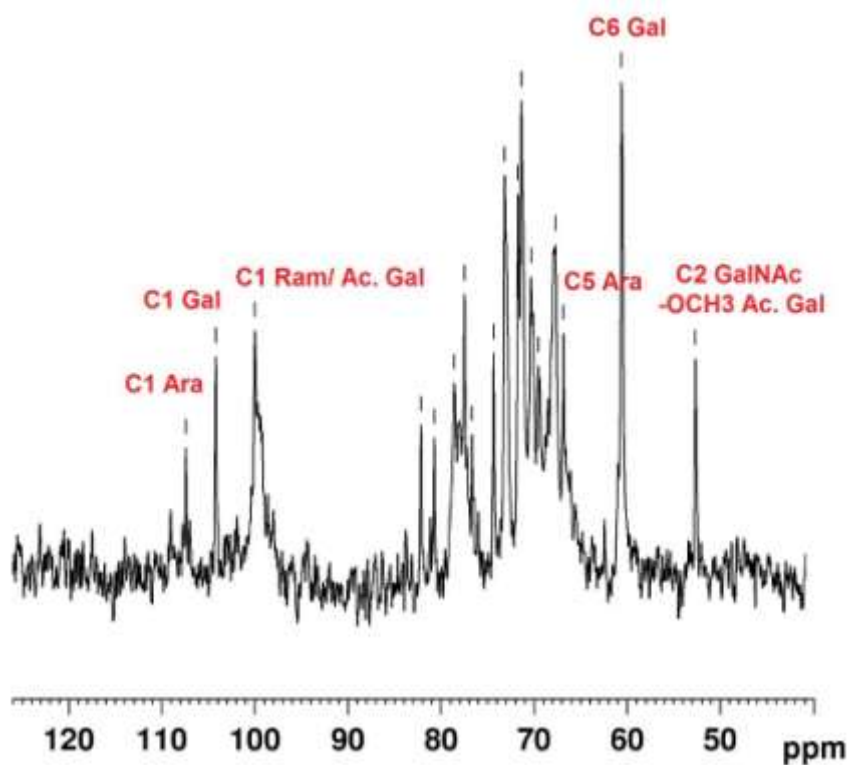


Figura 27: Espectro de RMN ^{13}C da porção AQP de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 30,20 ppm (^{13}C).

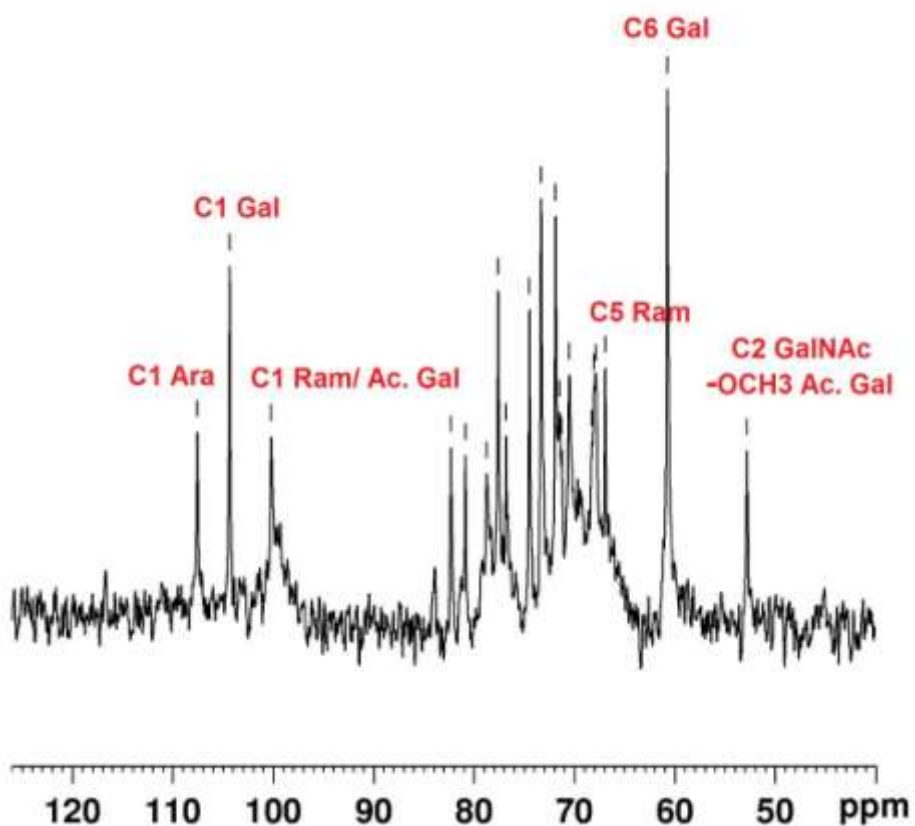


Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C da porção AQQ de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 30,20 ppm (^{13}C).

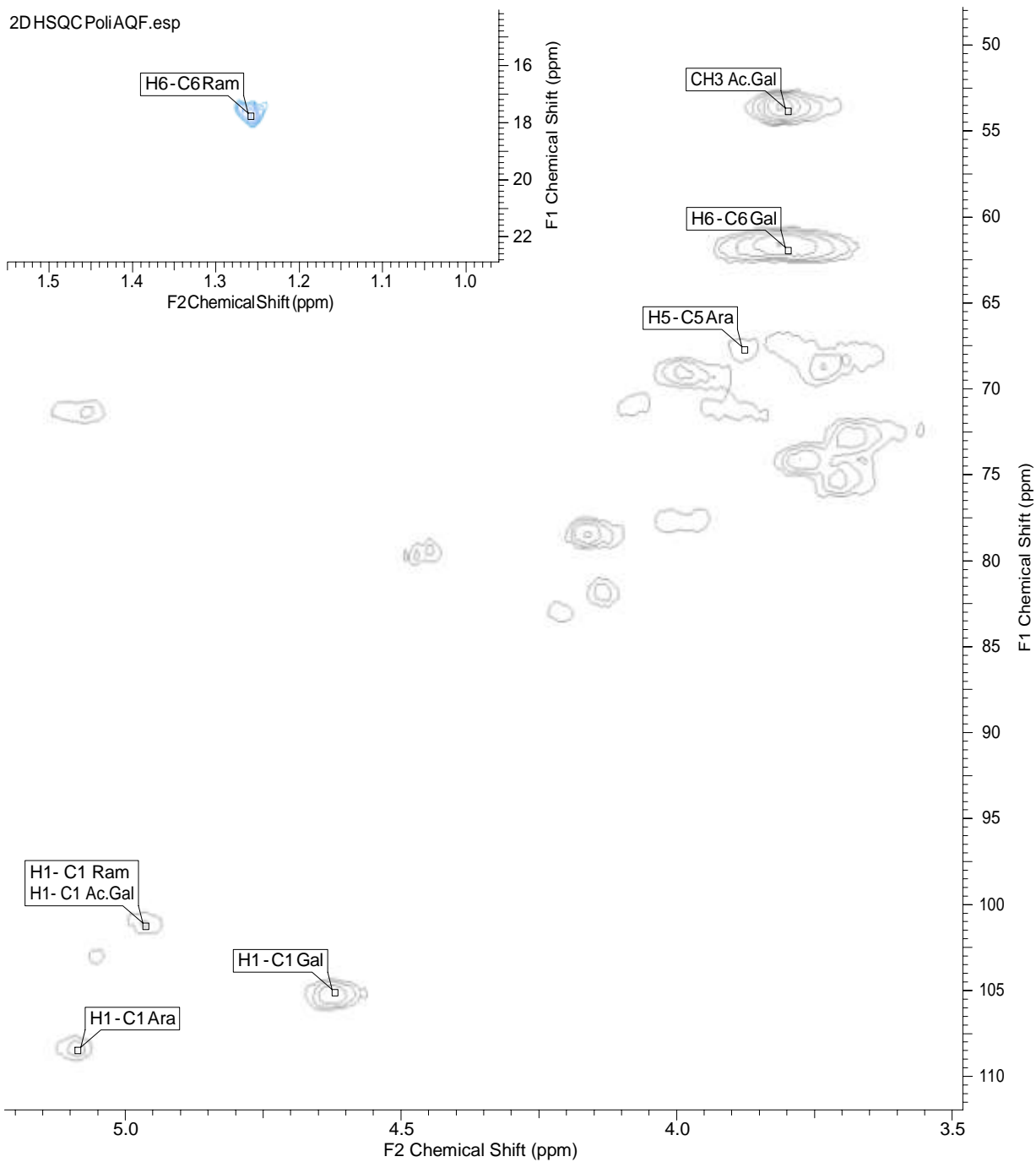


Figura 29: Espectro de RMN: 2D (HSQC) da porção AQF de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 2,22 ppm (^1H) e 30,25 ppm (^{13}C).

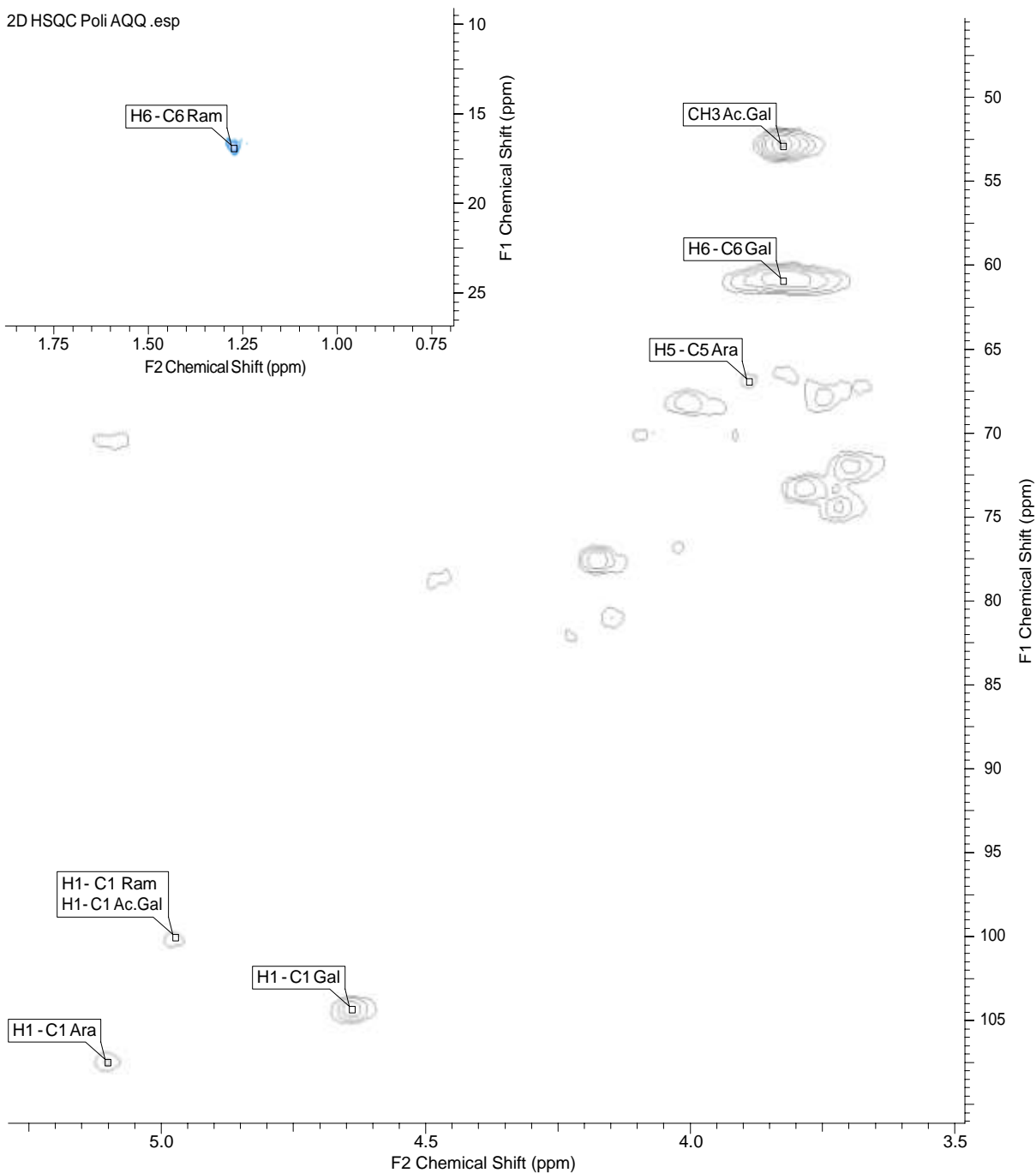


Figura 30: Espectro de RMN 2D (HSQC) da porção AQQ de polissacarídeos com padrão interno de acetona e calibração 2,22 ppm (^1H) e 30,25 ppm (^{13}C).

Ao se compararem os dados encontrados nesse trabalho aos de Fenwick et al. (1996), sugere-se a presença de (1 \rightarrow 4)- β -galactanas pela presença do sinal anomérico em 104 ppm, assim como o sinal de 60,95 característicos de C1 e C6, respectivamente.

Quando os dados foram ajustados para serem comparados com os resultados apresentados por Davis (1990) os sinais foram compatíveis com os

descritos pelo pesquisador para os resíduos de galactopirranose, (1→4)-β-Galp- (1→.

Quando comparados com os dados apresentados por Zykwincka et al. (2006), seguindo as mesmas calibrações, as galactanas presentes na batata inglesa apresentam sinais muito similares aos encontrados para todos os carbonos (C1 104,7 ppm, C2 72,3 ppm, C3 73,8 ppm, C4 78,1 ppm, C5 74,8 ppm e C6 61,3 ppm).

Os sinais da tabela 4 estão de acordo com os apresentados como típicos para galactanas (1→4)-β-Galp. O sinal anomérico em 107 ppm é indicativo de alfa-arabinofuranose (α-L-Araf) e o sinal em 17 ppm referente ao C6 de ramnopirranose, (Rhap) (CUI et al., 1996; HABIBI, MAHROUZ e VIGNON, 2005; TANAKA et al., 2010)

Os sinais em 104 ppm para C1 e em 4,6 ppm para H1 estão de acordo com o proposto por Gurjanov et al. (2008) para confirmação de que os resíduos de galactose presente se encontram na forma β. Seguindo o proposto no trabalho desse mesmo autor, pode-se afirmar que não existem ligações 1→3 pela ausência de sinais significativos na região de 80 ppm. Pode-se ainda inferir que a grande quantidade de sinais nas regiões de 3,7 ~ 4,2 ppm e de 71 ~ 77 ppm (H2, H3, H4, H5 e C2, C3, C4, C5) indica que galactose com ligações 1→4 é predominante. Acreditou-se também que o forte sinal em 60,95 ppm indica o C6 da galactose, este provavelmente não contém ligações glicosídicas (DAVIS et al., 1990; COLQUHOUN et al., 1990; WILLFÖR et al., 2002;). Os dados apresentados até aqui também estão de acordo com a galactana de configuração (1→4)-β-Galp apresentada no trabalho de Vogl, Paper e Franz (2000), inclusive apresentando o mesmo sinal de C4 (77 ppm) que indica uma ligação glicosídica neste carbono quando este sofre um deslocamento químico paramagnético em relação ao sinal usual deste carbono (69 ppm, segundo Guiseley, 1978).

Mendes (2014) descreveu galactanas sulfatadas presentes em algas marinhas vermelhas que apresentam sinal característico de C1 em 104 ppm, com padrão interno (acetona) ajustado igualmente, a análise apresentada neste trabalho foi correspondente ao grupamento (diáde) G → D.

Zibetti (2009) em seu trabalho descreveu sinal anomérico em 104 ppm sendo este referente a uma β-galactopirranose, com C2 – C6 em: 70, 78, 65, 74

e 60 ppm, respectivamente. Galactanas com este mesmo padrão, carbono anomérico em 104 ppm e os demais variando entre 60 ppm e 78 ppm, foram descritas por Usov (1997).

Outro estudo, desenvolvido por Zibetti (2005), também mostrou galactanas apresentando este mesmo padrão, com destaque para o carbono anomérico (C1), que ajuda a diferenciar as galactanas de glucanas que usualmente apresentam sinais mais baixos (103 ppm). Segundo a nomenclatura de Knutsens (KNUTSEN, 1994) este sinal observado a 104 ppm pode representar as diádes G→D(6S), G→D2M ou G→D(6S).

Segundo esta mesma nomenclatura Estevez, Ciancia e Cerezo (2008) descreveram galactanas de algas vermelhas compatíveis com os sinais encontrados, estes correspondendo às diádes G4S e G. Ciancia et. al (1993), apresentaram sinais com características semelhantes ao espectro de RMN até aqui discutido, isto se seguida a devida calibração (^{13}C 31,1 ppm).

A estrutura proposta por Cipriani et al. (2009) para uma arabinogalactana do tipo I, composta principalmente por unidades de galactose com ligações (1→4)- β , apresentou sinais que estão compatíveis com os encontrados neste estudo.

O resíduo $\rightarrow 4$)- β -Galp-(1→ descrito por Mikshina (2012), componente de uma galactana presente nas células de parede secundárias de linho (*Linum usitatissimum* L.), também apresentou sinais compatíveis com os encontrados, isto quando feita a calibração para o carbono anomérico.

Ainda segundo Jarvis et al. (1981), a parede celular da batata inglesa (*Solanum tuberosum*) é rica em galactanas (1→4)- β , e segundo Ha et al. (2005) as galactanas apresentam C1 e C6 com sinais em 105,1 e 61,5 ppm, respectivamente, o que corresponde com o encontrado na porção polissacarídica, desde que mantidas as devidas calibrações quanto ao padrão interno.

É possível verificar mais dois sinais anoméricos (100~101 ppm e 107~108 ppm), com menor intensidade. O carbono anomérico em 100 ppm pode ser referente aos resíduos de ramnose, assim como de ácido galacturônico, ou de ambos. A presença de ácido galacturônico ajuda a explicar o sinal detectado em 52 ppm, no entanto o sinal característico do C6 próximo a 175 ppm não foi identificado (HA et al. 2005; NURDJANAH et al., 2013). Na tabela 4, os possíveis

sinais referentes aos demais carbonos (inclusive C2 e C5) deste resíduo podem ser visualizados.

Este sinal em 52 ppm, segundo Ascencio (2004) também é característico e indicativo de N-acetilgalactosamina, mas assim como os ácidos urônicos a presença desta só pode ser confirmada se o seu sinal característico em 176 ppm estiver presente.

A detecção destes sinais no campo baixo do espectro (175 e 176 ppm) pode ocorrer com alterações no método de detecção utilizado, principalmente aumentando-se o tempo de aquisição. A detecção dos sinais nos experimentos de RMN ocorre quando o spin de determinado núcleo, ao ser exposto a um campo magnético externo, se alinha de duas maneiras, a favor do campo spin α ou contra o campo spin β . Estes núcleos quando recebem um pulso de energia mudam o seu spin de α para β e vice-versa. O realinhamento do spin ao seu estado natural (tempo de relaxamento) gera um sinal que é detectado pelo aparelho. No entanto, determinados núcleos (em virtude do seu ambiente químico) demoram mais tempo para voltar ao estado natural, o que demandaria um tempo de aquisição maior (BATHISTA, 2005; BRUICE, 2006).

Tomando-se o sinal em 100 ppm como indicativo de ramnose, a configuração alfa e possível ligação no carbono 2 (α -2-Rhap) são mais prováveis. Sendo importante destacar o sinal próximo a 17 ppm, referente ao C6 deste açúcar. Em trabalho desenvolvido por Neiwert, Holst e Duda (2014) os sinais apresentados por eles levam a crer que os encontrados nesta pesquisa (tabela 4) são indicativos da presença deste resíduo, principalmente pela presença do sinal referente ao C6.

O sinal em 107 ppm pode indicar a presença de arabinose com conformação alfa, possivelmente com ligação no carbono 5, assim como os sinais 81,08 e 82,29 ppm referentes ao C2 e C4, respectivamente. Outros trabalhos também remetem estes sinais como provenientes de resíduos de arabinose (COLQUHOUN et al., 1990; ZYKWINSKA et al., 2006; DONG et al. 2010; OLIVEIRA et al. 2013; LIANG et al. 2013; NEIWERT, HOLST e DUDA, 2014).

Apesar das galactanas serem mais conhecidas como provenientes de algas, estas também foram encontradas como componente de parede celular ou

ainda complexadas com os polissacarídeos de reserva de plantas (HA et al. 2005; GURJANOV et al., 2008).

Tanto a análise de CCD quando a de CLAE corroboram com a teoria de que a porção polissacarídica é composta por um polímero de principalmente galactose, podendo sim, corresponder a uma galactana

Diversos outros pesquisadores têm estudado galactanas e apresentado espectros de ressonância, no entanto, cabe destacar o trabalho de Ozaki et al. (2010) que identificaram uma arabinogalactana presente na batata-doce de casca branca com atividade hipoglicêmica, no entanto a estrutura isolada por eles era constituída, principalmente, de (1→3)-β-D-galactana e (1→6)-β-D-galactana.

O programa CASPER – *Computer-assisted spectrum evaluation of regular polyssacharides* (LUNDBORG e WIDMALM, 2011) foi utilizado como uma ferramenta para prever e estimar os possíveis sinais químicos de monossacarídeos e polissacarídeos, além de propor possíveis estruturas primárias para glicanas. Esta é uma ferramenta muito útil para auxiliar o pesquisador no esclarecimento e entendimento dos seus dados. Simulou-se os possíveis sinais químicos de uma galactana apresentando como cadeia principal resíduos (galactose) com ligações (1→4)-β, por estes motivos.

O resultado proposto pelo programa que ressalta sinais relativos à padrão interno de acetona 2,225 ppm para ¹H e 31,07 ppm para ¹³C, quando comparado com os sinais da possível galactana encontrada, são compatíveis, o que leva a crer nesta hipótese. A variações entre os dados simulados e encontrados ficou abaixo de 0,1 ppm de diferença (exceto C6 e C4), o que é excelente, tendo-se em vista que até 1 ppm de diferença é aceitável, dependendo da situação. A simulação e a variação podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5: Comparação entre sinais químicos calculados pelo programa CASPER e os sinais encontrados para a possível cadeia principal do polímero presente na porção polissacarídica da fração AQF.

	Encontrado (experimento)		Calculado (CASPER)		Variação C1	Variação H1
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H		
C1/H1	105,14	4,62	105,17	4,54	0,03	0,08
C2/H2	72,98	3,67	72,92	3,64	0,06	0,03
C3/H3	74,21	3,77	74,22	3,72	0,01	0,05
C4/H4	78,52	4,16	78,63	4,1	0,11	0,06
C5/H5	75,34	3,7	75,42	3,67	0,08	0,03
C6/H6	61,98	3,8	61,54	3,88	0,44	0,08

Todos dados até aqui apresentados sugerem que a parte analisada da porção polissacarídica do coproduto gerado na biofermentação etanólica da batata-doce possa ser um polímero constituído principalmente de galactose, apresentando resíduos deste açúcar com ligações (1→4)-β na cadeia principal. Possivelmente, apresentava ramificações ligadas em unidades de arabinose e ramnose. A figura 31 apresenta a possível estrutura química do polímero constituído de galactose, ramnose e arabinose em virtude dos dados apresentados.

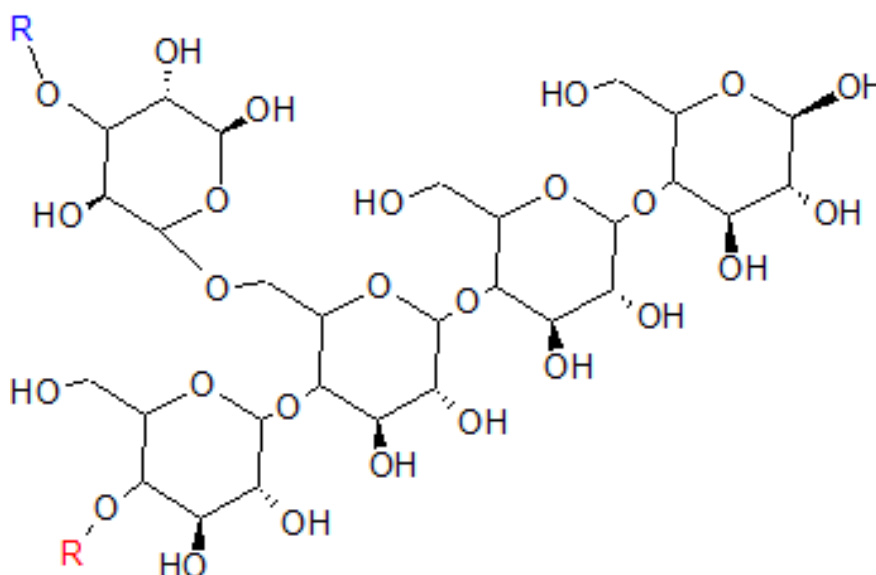


Figura 31: Estrutura proposta para representar o polímero constituído de galactose (1→4)-β na cadeia principal com possíveis ramificações de ramnose e arabinose.

Esta arabinogalactana pode apresentar também ligação com grupos aminados. Pode estar presente também uma segunda estrutura química, em

conjunto da arabinogalactana na porção polissacarídica, apresentando em sua composição açúcares aminados, por exemplo uma proteoglicana.

No entanto, faz-se necessário o estudo continuado destes carboidratos visando o melhor entendimento da estrutura desse polímero assim como os seus possíveis benefícios.

6. CONCLUSÕES

Com os dados apresentados, conclui-se que o coproduto proveniente da biofermentação etanólica da batata-doce analisado neste trabalho apresenta, uma média de 38% de carboidratos em sua composição, onde a maior quantidade é de oligossacarídeos próximo a 20%.

Constatou-se também que a extração destes carboidratos em meio aquoso foi eficiente, e sem diferenças qualitativas de acordo com o método empregado; as técnicas de fracionamento e purificação cumpriram o objetivo esperado possibilitando a análise separada das frações polissacarídica e oligossacarídica. O tempo de hidrólise ótimo para cada fração foi determinado.

Os carboidratos extraídos não apresentaram quantidades significativas de proteínas, somente a nível de traços.

Foi possível quantificar e identificar por meio de CLAE alguns monossacarídeos presentes em cada porção. Glicose é o monossacarídeo mais abundante na porção oligossacarídica, representando aproximadamente 42% dos monossacarídeos de AQF e 33% de AQQ. A porção polissacarídica é constituída principalmente de galactose, a parte solúvel de AQF apresentou 599,42 $\mu\text{mol/g}$ deste monossacarídeo.

Pela análise de CG-MS identificou-se diferentes monossacarídeos presentes na porção polissacarídica (arabinose, xilose e ramnose) além dos monossacarídeos já identificados por CLAE. A possível presença de açúcares aminados (GalNAc e GluNAc) foi notada, no entanto não foi possível diferenciá-los, mas este dado é importante, pois estes podem ser o constituinte da parte anteriormente não solúvel dos polissacarídeos. Assim, a cromatografia gasosa e a espectrometria de massas são extrema importância para a compreensão da

composição monossacarídica deste coproduto, principalmente pela detecção de compostos não identificados tanto por CCD, quanto por CLAE.

Na fração polissacarídica a presença de uma possível arabinogalactana do tipo I foi apresentada. A análise dos dados obtidos pelo RMN levam a crer que este polímero é provavelmente composto em sua maioria por galactose e apresenta uma cadeia principal de (1→4)-β-Galp onde podem estar ligadas possíveis unidades de arabinose e ramnose. É possível notar também o sinal de grande intensidade na região próxima de 53 ppm podendo este ser referente inclusive aos açúcares aminados não diferenciados por CG-MS.

Os carboidratos isolados apresentam grande complexidade e é necessário o estudo continuado destes para que seja possível elucidar com maior clareza a sua estrutura e composição, com ênfase na fração oligossacarídica.

Deste modo, por estes polímeros serem amplamente estudados quanto ao seus benefícios quando ingeridos, é necessário o estudo dos possíveis benefícios que o seu uso na alimentação humana e animal possam vir a apresentar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC, American Association of Cereal Chemists. **The definition of dietary fiber**. *Cereal Foods World*, 46 (3), 112-126, 2001.

AGRAWAL, P. K. **NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides**. *Phytochemistry*, 31 (10), 3307-3330, 1992.

AGUEDO, M.; KOHNEN, S.; RABETAFIKA, N.; BOSSCHE, S. V.; STERCKX, J.; BLECKER, C.; BEAUVE, C.; PAQUOT, M. **Composition of by-products from cooked fruit processing and potential use in food products**. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27 (1), 61–69, 2012.

ALVIM, F. A. L. S. **Fermentação etanólica conjunta da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), mandioca (*Manihot esculenta*) e milho (*Zea mays*)**. Palmas, 2013. Dissertação de Mestrado em Agroenergia. Universidade Federal do Tocantins. 117pp, 2013. Orientador: Prof. Dr. Tarso da Costa Alvim.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U.A. 1990. **Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial**. v. 2. São Paulo: E. Blücher.

ARAÚJO, N. Q.; CASTRO, H. F.; SALLES FILHO, M.; LEAL, J.L.S.; ESTEVES, A.M.L.; COSTA, F. A.; ARAUJO, I.M.C.; SALLES, N.G. **Batata-doce: parâmetros preliminares na tecnologia de produção de etanol**. (S.L.), 11p. 1978.

ARIFKHODZHAEV, A. O. **Galactans and Galactan-containing polysaccharides of higher plants**. *Chemistry of natural compounds*, 36 (3), 229 – 244, 2000.

ASCENCIO, P. G. M. **Diatomácea marinha *Coscinodiscus wailesii* Gran et Angst (Bacillariophyceae): isolamento, cultivo e estudo dos polissacarídeos**. Curitiba, 2004. Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 96 pp, 2004. Orientador: Prof.^a Dr.^a Selma F. Zawadzki Baggio.

ASCENCIO, S D. **Extração, quantificação e caracterização química de carboidratos de baixa massa molecular de algas vermelhas**

(Rhodophyta). Curitiba, 2002. Tese de Mestrado em Ciências (Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. 100pp, 2002. Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá.

ASCENCIO, S. D. **Heterosídeos sintetizados por linhagens de cor e estádios reprodutivos de macroalgas vermelhas dos gêneros Hypnea e Gracilaria**. Curitiba, 2006. Tese de Doutorado em Bioquímica. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 135pp, 2006. Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá.

ASSUNÇÃO, J. S. F.; ALVIM, T. C. **Avaliação bromatológica do resíduo da biofermentação alcoólica da batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) LAM.) e do seu potencial para uso na elaboração de ração para peixes**. Resumo expandido em Anais do II Congresso Científico e III Seminário de Iniciação Científica, UFT, Palmas-TO, 427p, 2007.

BATHISTA, A. L. B. S. **Princípios Básicos de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido, 1ª Edição**. São Carlos: Edição do autor, 2005. 50 p.

BOUAL, Z.; KEMASSI, A.; KHELIL, A. O. E. H.; MICHAUD, P.; HADJ, M. D. O. E. **Partial characterization of water soluble polysaccharides extracted from one saharian medicinal plant: Malva aegyptiaca L.** IPCBEE, 24, 420 – 424, 2011.

BRADFORD, MM. **A rapid and sensitive for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, 72, 248-254, 1976.

BRASIL. **PLANO NACIONAL DE AGROENERGIA 2006 – 2011 2ª edição revisada**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Produção e Agroenergia. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF. 2006

BRUCE, P. Y. **Organic Chemistry, 5th edition**. University of California, Santa Barbara: Prentice hall, 2006. 1440 p., ISBN: 0131963163.

CASTRO, I. P. M. **Potencialização da produção de etanol de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) pela incorporação de soro de queijo ao processo**. Comunicação pessoal. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Tocantins. No prelo. 68p. 2009.

CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M. C.; FINCH, P.; CERESO, A. S. **Determination of the structures of cystocarpic carrageenans from *Gigartina skottsbergii* by methylation analysis and NMR spectroscopy**. Carbohydrate Research, 238, 241–248, 1993.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; BERTOLINI, M. L.C.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. **Gastroprotective effect of a type I arabinogalactan from soybean meal**. Food Chemistry. 115, 687–690, 2009.

COLQUHOUN, I. J.; RUITER, G. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. **J. Identification by n.m.r. spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy regions of apple pectin with rhamnogalacturonase.** Carbohydrate Research, 206(1), 131–144, 1990.

COMIS, D. **Sweet Potato Out-yields Corn in Ethanol Production Study.** United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. 2008. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/is/pr/2008/080820.htm>>. Acesso em: 04 Fev. 2014.

CUI, S. W. **Food carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications.** Carbohydrate Polymers, 62 (4), 392, 2005.

CUI, W.; ESKIN, M. N. A.; BILIADERIS, C. G.; MARAT, K. **NMR characterization of 4-O-methyl- β -d-glucuronic acid-containing rhamnogalacturonan from yellow mustard (*Sinapis alba* L.) mucilage.** Carbohydrate Research, 292, 173–183, 1996.

DAVIS, E. A., DEROUET, C., HERVÉ DU PENHOAT, H. C., & MORVAN, C. **Isolation and an NMR study of pectins from flax (*Linum usitatissimum* L.).** Carbohydrate Research, 197, 205–215, 1990.

DELATTRE, C.; FENORADOSOA, T. A.; MICHAUD, P. **Galactans: An Overview of their Most Important Sourcing and Applications as Natural Polysaccharides.** Brazilian Archives Of Biology And Technology, 54 (6), 1075–1092, 2011.

DEMIRBAS, A. **Biorefineries: Current activities and future developments.** Energy Conversion and Management, 50, 2782 – 2801, 2009a.

DEMIRBAS, M. F. **Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review.** Applied Energy, 86, 151 – 161, 2009b.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. **Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status.** Appl Microbiol Biotechnol, 63, 258–266, 2003.

DIMITRIU, S. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility.** Marcel Dekker, Inc., 1224, 1998.

DONG, Q.; LIU, X.; YAO, J.; DONG, X.; MA, C.; XU, Y.; FANG, J.; DING, K. **Structural characterization of a pectic polysaccharide from *Nerium indicum* flowers.** Phytochemistry, 71, 1430–1437, 2010.

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

DUNCAN, R. **The dawning era of polymer therapeutics.** Nat. Rev. Drug Discov, 2, 347–360, 2003.

ELGART, A.; FARBER, S.; DOMB, A. J.; POLACHEK, I.; HOFFMAN, A. **Polysaccharide Pharmacokinetics: Amphotericin B Arabinogalactan Conjugates A Drug Delivery System or a New Pharmaceutical Entity?** *Biomacromolecules*, 11, 1972–1977, 2010.

ESTEVEZ, J. M.; CIANCIA, M.; CERESO, A. S. **The system of sulfated galactans from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* (Phyllophoraceae, Rhodophyta): Location and structural analysis.** *Carbohydrate Polymers*, 73, 594–605, 2008.

FALK, R., DOMB, A. J.; POLACHEK, I.. **A Novel Injectable Water-Soluble Amphotericin B-Arabinogalactan Conjugate.** *Antimicrob Agents Chemother*, 43(8), 1975–1981, 1999.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>> Acesso em: 10/01/2012

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. **Ethanol can contribute to energy and environmental goals.** *Science*, 311, 506–508, 2006.

FENWICK, K. M.; JARVIS, M. C.; APPERLEY, D. C.; SEYMOUR, G. B.; BIRD, C. R. **Polymer mobility in cell walls of transgenic tomatoes with reduced polygalacturonase activity.** *Phytochemistry*, 42(2), 301–307, 1996.

FERRARI, M. D.; GUIGOU, M.; LAREO C.; **Energy consumption evaluation of fuel bioethanol production from sweet potato.** *Bioresource Technology*, 136, 377-384, 2013.

FERREIRA, L. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; DUCATTI, D. R. B.; FUJII, M. T.; DUARTE, M. E. R. **Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta).** *Carbohydrate Research*, 347, 83–94, 2012.

FINCHER, G.B., STONE, B.A. **A water-soluble arabinogalactans-peptide from wheat endosperm.** *Australian Journal of Biological Sciences*, 27, 117– 132, 1974.

FITZPATRICK, A.; ROBERTS, A.; WITHERLY, S.; **Larch arabinogalactan: A novel and multifunctional natural product.** *AgroFOOD industry hi-tech*, 15, 30- 32, 2004.

GHATAK, H. R. **Biorefineries from the perspective of sustainability: Feedstocks, products, and processes.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 4042 – 4052, 2011.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. **A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics.** *Acta Histochemica*, 113(3), 236–247, 2011.

GUISELEY, K. B. **Some novel methods and results in the sulfation of polysaccharides**. In R. G. Schweiger (Ed.), *Carbohydrate sulfates*, (pp. 148–162). Washington, DC: American Chemical Society, 1978.

GURJANOV, O. P.; IBRAGIMOVA, N. N.; GNEZDILOV, O. I.; GORSHKOVA, T. A. **Polysaccharides, tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre: Isolation and identification**. *Carbohydrate Polymers*, 72, 719–729, 2008.

HA, M.; VIËTOR, R. J.; JARDINE, G. D.; APPERLEY, D. C.; JARVIS, M. C. **Conformation and mobility of the arabinan and galactan side-chains of pectin**. *Phytochemistry*, 66, 1817–1824, 2005.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M.R. **Isolation and structural characterization of protopectin from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits**. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 205–213, 2005.

HALFORD, N.G.; CURTIS, T.Y.; MUTTUCUMARU, N.; POSTLES, J.; MOTTRAM, D.S. **Sugars in crop plants**. *Ann Appl Biol*, 158, 1 – 25, 2010.

HARAZONOA, A.; KOBAYASHIA, T.; KAWASAKIA, N.; ITOHA, S.; TADAA, M.; HASHIIA, N.; ISHIIA, A.; ARATOB, T.; YANAGIHARAC, S.; YAGIC, Y.; KOGAD, A.; TSUDAD, Y.; KIMURAD, M.; SAKITAD, M.; KITAMURAE, S.; YAMAGUCHIE, H.; MIMURAE, H.; MURATAE, Y.; HAMAZUMEF, Y.; SATOF, T.; NATSUKAG, S.; KAKEHIH, K.; KINOSHITAH, M.; WATANABEH, S.; YAMAGUCHIA, T. **A comparative study of monosaccharide composition analysis as a carbohydrate test for biopharmaceuticals**, *Biologicals*, 39, 171-180, 2011.

HILL, J., NELSON, E., TILMAN, D., POLASKY, S. **Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels**. *Proceedings National Academy Science*, 103, 11206–11210, 2006.

HOEKMAN S.K.; **Biofuels in the U.S. – challenges and opportunities**. *Renew Energy*, 34, 14 – 22, 2009.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A.; **Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering**. *Chem. Rev.* 106, 4044-4098, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020. Versão eletrônica, 2008.

International Energy Agency (IEA). **Sustainable Production of Second-Generation Biofuels**. Pg 221. 2010.

International Energy Agency (IEA). **Technology Roadmaps: Biofuels for transport**. Pg 56. 2011.

JARVIS, M.C.; THRELFALL, D.R.; FRIEND, J. **The polysaccharide structure of potato cell walls – chemical fractionation**. *Planta*, 152, 93–100, 1981.

JEBARAJ, S.; INIYAN, S.; **A review of energy models**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10 (4), 281–311, 2006.

JIN, Y.; FANG, Y.; ZHANG, G.; ZHOU, L.; ZHAO, H. **Comparison of ethanol production performance in 10 varieties of sweet potato at different growth stages**. *Acta Oecologica*, 44, 33-37, 2012.

JOVYN, K. T. Ng.; ZUJOVIC, Z. D.; SMITH, B. G.; JOHNSTON, J. W.; SCHRÖDER, R.; MELTON, L. D. **Solid-state ¹³C NMR study of the mobility of polysaccharides in the cell walls of two apple cultivars of different firmness**. *Carbohydrate Research*, 386, 1–6, 2014.

KAMM, B; GRUBER, P. R.; KAMM, M.. **Biorefineries – Industrial Processes and Products**. ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5, 659 – 683, 2012.

KELLY, G.S. **Larch arabinogalactan: Clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide (Review)**. *Alternative Medicine Review*, 4 (2), 96-103, 1999.

KHODAEI, N.; KARBOUNE, S. **Enzymatic extraction of galactan-rich rhamnogalacturonan I from potato cell wall by-product**. *LWT - Food Science and Technology*, xxx, 1-10, 2014.

KING, D., 2010. **The Future of Industrial Biorefineries**. WorldEconomic Forum, Switzerland. Disponível em: <http://www3.weforum.org/docs/WEF_FutureIndustrialBiorefineries_Report_2010.pdf>. Acesso em: 06 Fev. 2014.

KLASS, D. L. **Biomass for Renewable Energy and Fuel**. Encyclopedia of Energy volume 1. Elsevier, 2004. Disponível em: <http://beraonline.org/yahoo_site_admin/assets/docs/cyclopediaofEnergy.35293015.pdf>. Acesso em: 03 Fev. 2014.

KLEINMAN, T. E.; AZZAM, T.; FALK, R.; POLACHECK, I.; GOLENSER, J.; DOMB, A. J.. **Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B–arabinogalactan conjugates**. *Biomaterials*, 23, 1327–1335, 2002.

KNUTSEN, S.H.; MYSLABODSKI, D.E.; LARSEN, B.; USOV, A.I. **A modified system of nomenclature for red algal galactans**. *Bot. Mar.* 37, 163–169, 1994.

LÆRKE, H. N.; MEYER, A. S.; KAACK, K. V.; LARSEN T. **Soluble fiber extracted from potato pulp is highly fermentable but has no effect on risk markers of diabetes and cardiovascular disease in Goto-Kakizaki rats**. *Nutrition Research*, 27 (3), 152–160, 2007.

LAUFENBERG, G. **Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations.** *Bioresource Technology*, 87, 167-198, 2003.

LEE, W.; CHNE, I.; CHANG, C.; YANG, S.; **Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*.** *Renewable Energy*, 39 (1), 216–222, 2012.

LI, S.; HALBRENDT, C. **Ethanol production in (the) People’s Republic of China: Potential and technologies.** *Applied Energy*, 86 (1), 162–169, 2009.

LIANG, F., HU, C., HE, Z., PAN, Y. **An arabinogalactan from flowers of *Chrysanthemum morifolium*: structural and bioactivity studies.** *Carbohydrate Research* (2013), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.09.002>

LUNDBORG, M.; WIDMALM, G. **Structure Analysis of Glycans by NMR Chemical Shift Prediction.** *Anal. Chem*, 83, 1514-1517, Doi: 10.1021/ac1032534. Supporting information. 2011.

MAKKER, P.; HOGAN, V.; HONJO, Y.; BACCARINI, S.; TAIT, L.; BRESALIER, R.; RAZ, A. **Inhibition of Human Cancer Cell Growth and Metastasis in Nude Mice by Oral Intake of Modified Citrus Pectin** *JNCI J Natl Cancer Inst*, 94 (24), 1854-1862, 2002.

MARTINS, L. P. **Avaliação da resistência ao mal-do-pé (*Plenodomus destruens*) em clones de batata-doce destinados a indústria de etanol.** Palmas, 2013. Dissertação de Mestrado em Agroenergia. Universidade Federal do Tocantins. 53 pp, 2013. Orientador: Prof. Dr. Márcio Antônio da Silveira.

MCPHERSON, J.: **“Dietary fiber-A perspective”.** In *CRC Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition* (Spiller GA ed.), (1992) pp 7-14. CRC Press, Boca Raton, 1992.

MEI, X.; MU, T.; HAN, J. **Composition and Physicochemical Properties of Dietary Fiber Extracted from Residues of 10 Varieties of Sweet Potato by a Sieving Method.** *J. Agric. Food Chem*, 58, 7305–7310, 2010.

MENDES, G. S.; DUARTE, M. E. R.; COLODI, F. G.; NOSEDA, M. D.; FERREIRA, L. G.; BERTÉ, S. D.; CAVALCANTI, J. F.; SANTOS, N.; ROMANOS, M. T. V. **Structure and anti-metapneumovirus activity of sulfated galactans from the red seaweed *Cryptonemia seminervis*.** *Carbohydrate Polymers*, 101, 313– 323, 2014.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. **The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production.** *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 71 (1), 61-64, 1994.

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

galactan from the secondary cell walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) phloem fibres. Carbohydrates Polymers, 87, 853 – 861, 2012.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. **Non-digestible oligosaccharides: A review.** Carbohydrate Polymers, 68, 587–597, 2007.

National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2008. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>>. Acesso em: 28 Mai. 2012.

NEIWERT, O.; HOLST, O.; DUDA, K. A. **Structural investigation of rhamnose-rich polysaccharides from *Streptococcus dysgalactiae* bovine mastitis isolate.** Carbohydrate Research. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2013.12.018>>, 2014.

NETO, J. T. B. B.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L. **Sulfated polysaccharides of the alga *Caulerpa sertularioides* (Gmel.) Howe: Analysis of methods of precipitation.** Rev. Bras. Eng. Pesca, 3(2), 50-62, 2008.

NEXANT Chem Systems, **Brazil's Biofuels Industry: Outlook for a Global Leader.** 2008. Disponível em: http://www.chemsystems.com/reports/search/docs/prospectus/mc07_brazil_biofuels_pros.pdf. Acesso em: 28 Maio 2012.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. **Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes.** Braz. J. Microbiol, 35, 1-2, 2004.

NODA, T.; TAKAHATA, Y.; KUMAMOTO; NAGATA, T.; SHIBUYA, N.; **Chemical Composition of Cell Wall Material from Sweet Potato Starch Residue.** Starch/Stärke, 46(6), 232-236, 1994.

NURDJANAH, S.; HOOK, J.; PATON, J.; PATERSON, J. **Galacturonic Acid Content and Degree of Esterification of Pectin from Sweet Potato Starch Residue Detected Using ¹³C CP/MAS Solid State NMR.** European Journal of Food Research & Review, 3(1), 16-37, 2013.

OLIVEIRA, A. J. B.; CORDEIRO, L. C. M.; GONÇALVES, R. A. C.; CEOLE, L. F.; NAKAMURA, T. U.; IACOMINI, M. **Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1→6)-β-D-galactan core from *Stevia rebaudiana* leaves.** Carbohydrate Polymers, 94, 179– 184, 2013.

OLSSON, L.; JØRGENSEN, H.; KROGH, K. B. R.; ROCA, C. Bioethanol Production from Lignocellulosic Material. In: DIMITRIU, S. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility.** Marcel Dekker, Inc., 1224p, 1998.

OOI, V. E. C.; LIU, F. **Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of polysaccharide-Protein Complexes.** Current Medicinal Chemistry, 7, 715-729, 2000.

OZAKI, S.; OKI, N.; SUZUKI, S.; KITAMURA, S.; **Structural Characterization and Hypoglycemic Effects of Arabinogalactan-Protein from the Tuberos Cortex of the White-Skinned Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.)**. J. Agric. Food Chem., 58, 11593–11599, 2010.

PARK, D.; LAI, S.; KIM, H. **Immunopotentiating and antitumor activities of the purified polysaccharides from *Phellodendron chinese*** SCHNEID. Life Sci., 75, 2621–2632, 2004.

PEREZ, S., MAZEAU, K., HERVE DU PENHOAT, C. **The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides**. Plant Physiol. Biochem., 38, 37–55, 2000.

PETERS, D. **Carbohydrates for fermentation**. Biotechnol. J., 1, 806–814, 2006.

PINHASSI, R. I.; ASSARAF, Y. G.; FARBER, S.; STARK, M.; ICKOWICZ, D.; DRORI, S.; DOMB, A. J.; LIVNEY, Y. D.. **Arabinogalactan-Folic Acid-Drug Conjugate for Targeted Delivery and Target-Activated Release of Anticancer Drugs to Folate Receptor-Overexpressing Cells**. Biomacromolecules, 11, 294–303, 2010.

QIU, H.G.; HUANG, J.K.; YANG, J. **Bioethanol development in China and the potential impacts on its agricultural economy**. Appl. Energy, 87 (1), 76–83, 2010.

SALVADOR, L. D.; SUGANUMA, T.; KITAHARA, K.; TANOUE, H.; ICHIKI, M., **Monosaccharide Composition of Sweetpotato Fiber and Cell Wall Polysaccharides from Sweetpotato, Cassava, and Potato Analyzed by the High-Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection Method**. J. Agric. Food Chem, 48, 3448–3454, 2000.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M. **Mass Spectrometry Strategies for Structural Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates**, Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization, Dr. Ana Varela Coelho (Ed.), 2013, ISBN: 978-953-51-1136-8, InTech, DOI: 10.5772/55221. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-molecular-characterization/mass-spectrometry-strategies-for-structural-analysis-of-carbohydrates-and-glycoconjugates>>. Acesso em: 24 Fev. 2014

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R. V.; CIPRIANI, T. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. **Application of acetate derivatives for gas chromatography–mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis**. Journal of Chromatography A, 1208, 215–222, 2008.

SCHWARTZ, L. **China fuels ethanol industry with yams, sweet potatoes and cassava**. China strategies, 2008. Disponível em: <<http://www.renewableenergyworld.com/rea/news/article/2008/05/china-fuels-ethanol-industry-with-yams-sweet-potatoes-and-cassava-52450>>. Acesso em: 03 Fev. 2014.

SENA, R. F.; NUNES, M. L. **Utilização de resíduos agroindustriais no processamento de rações para carcinicultura.** Rev. Bras. Saúde Prod. An., 7 (2), 94-102, 2006.

SHEN, Y.; GUO, J.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; ZHENG, X.; ZHANG, X.; BAI, F. **Application of low-cost algal nitrogen source feeding in fuel ethanol production using high gravity sweet potato medium.** Journal of Biotechnology, 160, 229-235, 2012.

SILVA, F. A. L.; ALVIM, T. C. **Elaboração e Avaliação Físico-Química, Microbiológica e da Vida de Prateleira de uma Barra de Cereais Diet e de um Biscoito Integral a partir do Resíduo da Biofermentação Etanólica Conjunta da Batata-Doce (*Ipomoea-Batatas* (L) Lam.) com o Soro de Leite.** 6º Seminário de Iniciação Científica, UFT, Palmas-TO. Anais do 6º Seminário de Iniciação Científica, v. 1, 233p, 2010.

SILVA, F. A. L.; ALVIM, T. C. **Elaboração e avaliação físico-química e microbiológica de barra de cereais tendo como base o resíduo da biofermentação etanólica da batata-doce (*Ipomoea-batatas* (L)LAM).** 5º Seminário de Iniciação Científica, UFT, Palmas-TO. Anais do 5º Seminário de Iniciação Científica, 2009.

SILVA, J. B. C.; LOPES, C. A.; MAGALHÃES, J. S. **Cultura da Batata doce: Composição e uso.** Embrapa Hortaliças: Sistemas de Produção, 6 ISSN 1678- Versão Eletrônica, 2004.

SOARES, I. M. **Determinação do conteúdo fenólico, flavonoides e atividade antioxidante nas folhas de dez cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. desenvolvidas para produção industrial de etanol.** Palmas, 2013. Dissertação de Mestrado em Agroenergia. Universidade Federal do Tocantins. 124pp, 2013. Orientador: Prof. Dr. Sérgio Donizeti Ascêncio.

SRICHUWONG, S.; ORIKASA, T.; MATSUKI, J.; SHIINA, T.; KOBAYASHI, T.; TOKUYASU, K. **Sweet potato having a low temperature-gelatinizing starch as a promising feedstock for bioethanol production.** Biomass and Bioenergy, 39, 120-127, 2012.

SUN, J.; YIN, G.; DU, P.; CHEN, L. **Optimization of extraction technique of polysaccharides from pumpkin by response surface method.** Journal of Medicinal Plants Research, 5 (11), 2218-2222, 2011.

TAN, S.; XU, Q.; LUO, Z.; LIU, Z.; YANG, H.; YANG, L. **Inquiry of Water-Soluble Polysaccharide Extraction Conditions from Grapefruit Skin.** Engineering, 3, 1090-1094, 2011.

TANAKA, L. Y. A.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONÇALVES, J. E.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; MARQUES, M. C. A.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. **An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*.** Carbohydrate Polymers, 82(3), 714–721, 2010.

TAVARES, I. B.; SILVEIRA, M. A. **Seleção de cultivares de batata - doce, oriundos de sementes botânicas, adaptadas a produção de biomassa, visando a produção de etanol no estado do Tocantins.** In: XI Jornada de Iniciação Científica da UNITINS/UFT, 2004, Palmas, TO. Anais... Palmas, TO, 2004. p. 87-87.

THOMASSEN, L. V.; LARSEN, D. M.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A.S., **Definition and characterization of enzymes for maximal biocatalytic solubilization of prebiotic polysaccharides from potato pulp.** Enzyme and Microbial Technology, 49 (3), 289–297, 2011.

TIMOFIECSYK, F. R.; PAWLOWSKY, U. **Minimização de Resíduos na Indústria de Alimentos: Revisão.** B. CEPPA, 18 (2), 221-236, 2000.

TORNEY, F.; MOELLER, L.; SCARPA, A.; WANG, K. **Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize.** Current Opinion in Biotechnology, 18, 193–199, 2007.

UFT-Universidade Federal do Tocantins. Oportunidades em mercados alternativos em áreas rurais do Tocantins. **A cultura da Batata-doce como fonte de matéria-prima para produção de etanol.** Boletim Técnico. Palmas-TO. 64p. 2008.

ULLOA, J. B.; WEERD, J. H. V.; HUISMAN, E. A.; VERRETH, J. A. J. **Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation.** Waste Management, 24, 87–97, 2004.

USOV, A. I.; BILAN, M. I.; SHASHKOV, A. S. **Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red algae *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae).** Carbohydr Res, 303, 93 -102, 1997.

VARKI, A.; SHARON, N. **Historical Background and Overview.** In: **Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 2nd edition.** Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Chapter 1. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1931/>>. Acesso em: 16 Jan. 2014.

VICENT, M. J.; DUNCAN, R. **Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer** Trends in Biotechnology. Review, TRENDS in Biotechnology, 24(1), 39–47, 2006.

VIVIER, E.; TOMASELLO, E.; BARATIN, M.; WALZER, T.; UGOLINI, S. **Functions of natural killer cells.** Nat Immunol. 9(5), 503 – 510, 2008.

VOGL, H.; PAPER, D.H.; FRANZ, G. **Preparation of a sulfated linear (1→4)-β-d-galactan with variable degrees of sulfation.** Carbohydrate Polymers, 41, 185–190, 2000.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. **High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis.** Chromatographic Science Series, 102, 943, 2011.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. Chromatographic Science Series, 99, 888, 2008.

WANG, B. Q.; FANG, Y. **Analysis of sugars in traditional Chinese drugs**. Journal of Chromatography B, 812, 309-324, 2004.

WANG, M.; SHI, Y.; XIA, X.; LI, D.; CHEN, Q. **Life-cycle energy efficiency and environmental impacts of bioethanol production from sweet potato**. Bioresource Technology, 133, 285–292, 2013.

WHISTLER, R. L.; DURSO, D. F. **A New Crystalline Trisaccharide from Partial Acid Hydrolysis of Guaran and the Structure of Guaran**. J. Amer. Chem. Soc. 74, 5140-5141, 1952.

WILLFÖR, S., SJOHOLM, R., LAINE, C., & HOLMBOM, B. **Structural features of water-soluble arabinogalactans from Norway spruce and Scots pine heartwood**. Wood Science and Technology, 36, 101–110, 2002.

YANG, S. T. **Chapter 1 – Bioprocessing from Biotechnology to Biorefinery** Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, Shang-Tian Yang, Amsterdam, 2007, Pages 1–24.

YOKOI, H.; SAITSU, A.; UCHIDA, H.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y.; **Microbial Hydrogen Production from Sweet Potato Starch Residue**. Journal of Bioscience And Bioengineering, 91(1), 58-63. 2001.

YOO, H.; YOON, E.J.; CHA, J.; LEE, H. G. **Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms**. Int J Biol Macromol, 34, 37–41, 2004.

ZHANG, L.; CHEN, Q.; JIN, Y.; XUE, H.; GUAN, J.; WANG, Z.; ZHAO, H. **Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potato at very high gravity (VHG)**. Fuel Processing Technology, 91(12), 1845–1850, 2010.

ZHANG, L.; ZHAO, H.; GAN, M.; JIN, Y.; GAO, X.; CHEN, Q.; GUAN, J.; WANG, Z. **Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales**. Bioresource Technology, 102(6), 4573–4579, 2011.

ZHANG, P.; CHEN, C.; SHEN, Y.; DING, T.; MA, D.; HUA, Z.; SUN, D. **Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production**. Bioresource Technology, 128, 835–838, 2013.

ZHAO, G.; KAN, J.; LI, Z.; CHEN, Z. **Characterization and immunostimulatory activity of an (1→6)- α -d-glucan from the root of *Ipomoea batatas***. International Immunopharmacology, 5, 1436–1445, 2005.

ZIBETTI, R. G. M.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; COLODI, F. G.; DUCATTI, D. R. B.; FERREIRA, L. G.; CARDOSO, M. A.; CEREZO, A. S.

Galactans from *Cryptonemia* species. Part II: Studies on the system of galactans of *Cryptonemia seminervis* (Halymeniales) and on the structure of major fractions. Carbohydrates Research, 344, 2364 – 2374, 2009.

ZIBETTI, R. G. M.; NOSEDA, M. D.; CERESO, A. S.; DUARTE, M. E. R. **The system of galactans from *Cryptonemia crenulata* (Halymeniaceae, Halymeniales) and the structure of two major fractions. Kinetic studies on the alkaline cyclization of the unusual diad G2S→D(L)6S.** Carbohydrate Research, 340, 711 – 722, 2005.

ZISKA, L. H.; RUNION, G. B.; TOMECEK, M.; PRIOR, S. A.; TORBET, H. A.; SICHER, R. **An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland.** Biomass and Bioenergy, 33(11), 1503–1508, 2009.

ZYKWINSKA, A.; MOURO, C. R.; GARNIER, C.; THIBAUT, J. F.; RALET, M. C. **Alkaline extractability of pectic arabinan and galactana and their mobility in sugar beet and potato cell walls.** Carbohydrate Polymers, 65, 510–520, 2006.