

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

INGRID SANTOS MIGUEZ

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA MANANA CRISTALINA ISOLADA DO
ENDOSPERMA DE SEMENTES DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.)

Rio de Janeiro

2024

INGRID SANTOS MIGUEZ

**ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA MANANA CRISTALINA ISOLADA DO
ENDOSPERMA DE SEMENTES DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciência.

Orientação:

D.Sc. Ayla Sant'Ana da Silva

Rio de Janeiro

2024

CIP - Catalogação na Publicação

M636e Miguez, Ingrid Santos
Elucidação estrutural da manana cristalina isolada do endosperma de sementes de açaí (Euterpe oleracea Mart.) / Ingrid Santos Miguez. -- Rio de Janeiro, 2024.
124 f.

Orientadora: Ayla Sant'Ana da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2024.

1. Semente de açaí. 2. Manana linear. 3. Caracterização estrutural. 4. E. oleracea Mart.. I. Silva, Ayla Sant'Ana da , orient. II. Título.

INGRID SANTOS MIGUEZ

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA MANANA CRISTALINA ISOLADA DO
ENDOSPERMA DE SEMENTES DE AÇAÍ (*EUTERPE OLERACEA* MART.)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciência.

Rio de Janeiro, 05 de setembro de 2024.

Prof. Dra. Ayla Sant'Ana da Silva – INT
Orientadora

Prof. Dra. Denise Maria Guimarães Freire – UFRJ
Membro interno

Prof. Dr. Anderson de Sá Pinheiro – UFRJ
Membro interno

Prof. Dra. Emanuele Catarina da Silva Oliveira – IFES
Membro externo

Prof. Dr. Nei Pereira Junior – UFRJ
Membro externo

Ao meu pai, à minha família e aos meus
amigos, extraordinários e essenciais.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e FAPERJ, pela concessão das bolsas de estudo.

À coordenação da pós-graduação, pelo suporte oferecido aos alunos. Foram diferentes coordenações ao longo desse período, e a todas elas agradeço.

À Ayla Sant'Ana, tenho muito a agradecer. Sou muito grata por todas as oportunidades que me ofereceu nesses últimos 10 anos. Foi uma longa jornada e estar ao lado de uma pessoa tão inspiradora e genial foi a maior de todas essas oportunidades. Obrigada por cada orientação e cada momento que dedicou a mim, que não foram poucos.

Ao laboratório de biocatálise, LABIC, por ter sido minha segunda casa. Durante esses anos de doutorado, mesmo que a maior parte dos meus experimentos tenha sido realizada em outros lugares, era no LABIC que eu sempre queria estar. Sou grata a todos do grupo por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável e acolhedor e a sala 4 por ser a melhor de todas. Em especial, agradeço à Viridiana por ser um exemplo de profissional e pessoa, e a Franciny por ser uma IC tão amigável e dedicada.

Aos laboratórios de dentro e fora do INT, por me permitirem fazer análises fundamentais para o andamento do trabalho. Obrigada aos laboratórios da DICAP do INT, ao laboratório Bioetanol e ao laboratório de RMN de sólidos do Instituto de Química da UFRJ, ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ e ao laboratório Multiusuário de Difração de raios-X da UERJ.

Ao laboratório de Tecido Conjuntivo do Hospital Universitário da UFRJ, por ter me recebido. Em especial, agradeço ao professor Mourão por me permitir fazer parte do laboratório, ao Felipe Bezerra por todo auxílio nas práticas de RMN e CG, ao Tiago pela companhia no laboratório.

Às professoras Adriane Todeschini e Carmen Petkowicz, pela assistência. Agradeço pelo direcionamento que me deram para começar a entender RMN, pelo suporte nas análises e pela generosa troca de conhecimentos que gentilmente compartilharam comigo.

À professora Bodil Jørgensen e o professor Peter Ulvskov, por me receberem na Universidade de Copenhague. Tive o privilégio de trabalhar com grandes nomes na área de glicobiologia de plantas, o que me permitiu aprender muito em pouco tempo. Sou grata pela generosidade e atenção que me dedicaram. Também agradeço a todos que tornaram essa experiência incrível de crescimento profissional tão enriquecedora. Em especial, agradeço imensamente a acolhida da minha irmã científica Roberta Espinheira, além do suporte e da

atenção de pessoas tão especiais que pude conhecer ao longo desse percurso, Sylwia Głazowska e Monna Al-Naqqash.

Ao Jochen Junker e ao seu grupo, pelo suporte em RMN, agradeço a generosidade com que me acolheram. Agradeço à Marcelle, Jéssica e Katherine por estarem presentes nessa reta final. Foi um presente conhecer e compartilhar bons momentos com vocês no congresso.

Aos meus amigos, por todo o carinho. Tive a sorte de ter ao meu lado pessoas tão especiais que tornaram esse caminho mais fácil. Obrigada por me fazerem acreditar em mim e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Um agradecimento especial à Carol Reis, ao Davi, e à Stella, por me fazerem ver graça em tudo e tornarem o dia a dia no laboratório, e fora dele, mais feliz. Aos que não estavam mais no laboratório, mas ainda assim compartilharam todos esses momentos, sou grata à Taísa, ao Bruno, à Carol Lázaro e ao Javier. Aos amigos que conheci ao longo dos curso de RMN, Brian e Roni, muito obrigada pela troca de ideias e até mesmo pela troca cultural. E agradeço aos amigos que, mesmo de longe, estiveram sempre na torcida.

À minha família, por serem tudo para mim. Esse período de doutorado foi muito desafiador, tanto dentro quanto fora do trabalho, e ter vocês ao meu lado foi essencial para que eu pudesse seguir em frente. Obrigada pela compreensão, pelo respeito, pelo amor e pela alegria genuína que me dedicaram nesse período. Sempre muito presentes em minha vida, agradeço a cada um dos meus tios, primos e afilhados, aqui representados por minha mãe, Jurailde, meu irmão, Paulo Vinícius, meu parceiro, Alberto, minha avó, Josefina, e meu pai, Paulo, *in memoriam*, a quem amo imensamente.

"Tolos e fanáticos estão sempre cheios de convicção, enquanto os sábios estão sempre cheios de dúvidas." Bertrand Russell

RESUMO

As sementes de açaí (*E. oleracea* Mart.) são resíduos da produção da polpa que contêm até 50% de manana em sua massa seca total. A despolimerização de manana libera manose e manano-oligossacarídeos. No entanto, a semente de açaí é recalcitrante à desconstrução por ação enzimática. Compreender a estrutura desse polissacarídeo pode ajudar a identificar as limitações de seu processamento visando aumentar a eficiência da bioconversão. Para isso, uma fração insolúvel foi isolada das sementes e avaliada por ressonância magnética nuclear (RMN) em solução. Os espectros $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HSQC foram atribuídos a uma β -D-manana, e os espectros de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC confirmaram a presença de ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$ entre as unidades Man α por meio dos picos cruzados a 4,73/78,0 ppm (H-1/C-4) e 3,88/101,8 ppm (H-4/C-1). Todavia, devido à dificuldade de solubilizar a amostra, a fração isolada também foi avaliada por RMN de sólidos. Os resultados confirmaram ser uma manana linear, notando ainda a presença de polimorfos cristalinos I e II a partir da detecção dos sinais correspondentes ao carbono 5 de ambas as formas em 70,2 e 70,9 ppm, respectivamente. A avaliação da cristalinidade dessa fração por difração de raios-X (DRX) teve picos de intensidade 2θ igual a 16° , 18° , 20° , 24° e 26° , que correspondem aos planos 110, 111, 200, 210, 211, respectivamente. Este perfil é semelhante a uma forma cristalina de manana tipo I, predominante na amostra. No entanto, o perfil de DRX também revelou um pico em $22,5^\circ$ característico do plano cristalino 200 de celulose I β , indicando uma possível contaminação da amostra. A contaminação foi corroborada pelo comportamento de degradação térmica da amostra e pela análise composicional, que indicou a relação de 78:19:2 entre man:glc:gal. Assim, a amostra foi reavaliada por RMN em solução equipado com criosonda, visando aumentar a sensibilidade do método. Entretanto, não possível notar o sinal de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ referente ao anomérico do resíduo Gal-(1 \rightarrow) sendo necessário a otimização do método para confirmar a ramificação da cadeia. Para superar os problemas de contaminação, a manana das sementes de açaí também foi analisada *in situ*, por imunolocalização. A análise permitiu não só identificar a concentração de manana linear na parede celular do endosperma maduro, como também permitiu monitorar a transformação de galactomanana em manana linear ao longo do desenvolvimento do fruto. Assim, a identificação da estrutura de manana em semente de açaí foi realizada pela primeira vez. Os resultados obtidos podem direcionar estratégias para reduzir a cristalinidade da manana e seleção de enzimas mais adequadas para a hidrólise dessa biomassa recalcitrante.

Palavras-chave: Semente de açaí. Manana linear. Caracterização estrutural. *E. oleracea* Mart.

ABSTRACT

Açaí seeds (*E. oleracea* Mart.) are a byproduct of pulp production, with 50% of their total dry weight consisting of mannan. The depolymerization of mannan releases mannose and mannan-oligosaccharides. However, açaí seeds are recalcitrant to deconstruction by enzymatic action. Understanding the structure of this polysaccharide can help identify the limitations of its processing, with the aim of increasing the efficiency of bioconversion. For this purpose, an insoluble fraction was isolated from the seeds and evaluated by solution nuclear magnetic resonance (NMR). The $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC spectra were attributed to a β -D-mannan, and the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC spectra confirmed the presence of a $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic linkage between the Man_p units through cross-peaks at 4.73/78.0 ppm (H-1/C-4) and 3.88/101.8 ppm (H-4/C-1). However, due to the difficulty of solubilizing the sample, the isolated fraction was also evaluated by solid-state NMR. The results confirmed it to be a linear mannan, with the presence of crystalline polymorphs I and II, detected by signals corresponding to carbon 5 of both forms at 70.2 and 70.9 ppm, respectively. The crystallinity of this fraction was assessed by X-ray diffraction (XRD), which showed peaks at 2θ values of 16° , 18° , 20° , 24° , and 26° , corresponding to planes 110, 111, 200, 210, and 211, respectively. This profile is similar to that of a crystalline form of type I mannan, which predominated in the sample. However, the XRD profile also revealed a peak at 22.5° , characteristic of the 200 crystalline plane of cellulose I β , indicating possible sample contamination. The contamination was corroborated by the thermal degradation behavior of the sample and compositional analysis, which indicated a 78:19:2 ratio of Man:Glc:Gal. Consequently, the sample was re-evaluated using solution NMR equipped with a cryoprobe to increase the sensitivity of the method. However, it was not possible to observe the $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ signal corresponding to the anomeric position of the Gal-(1 \rightarrow) residue, making further optimization of the method necessary to confirm the chain branching. To overcome contamination issues, the mannan from açaí seeds was also analyzed *in situ* through immunolocalization. The analysis not only allowed for the identification of linear mannan in the mature endosperm cell wall but also enabled the monitoring of the transformation of galactomannan into linear mannan throughout fruit development. Thus, the structure of mannan in açaí seeds was identified for the first time. The results obtained can guide strategies to reduce the crystallinity of mannan and select more suitable enzymes for the hydrolysis of this recalcitrant biomass.

Keywords: Açaí seed. Linear mannan. Structural characterization. *Euterpe oleracea* Mart.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Açazeiros da espécie <i>Euterpe oleracea</i> Mart. de múltiplas estipes por touceira. .	15
Figura 2 - Aumento da produção de açaí no Brasil nos últimos 10 anos.	16
Figura 3 - Grandes acúmulos de sementes de açaí formam dunas que podem ser vistas em regiões do Pará.	18
Figura 4 - Sementes de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) em meio ao fruto seco. Em destaque, o corte transversal das sementes evidenciando o endosperma ruminado pelo tegumento e o embrião diminuto.....	20
Figura 5 - Estrutura de D-manose.....	21
Figura 6 - Classificação da diversidade estrutural de β -manana.	26
Figura 7 - Esquema ilustrativo da diversidade estrutural dos polissacarídeos, resultante das diferentes combinações entre resíduos glicosídicos, ligações, configurações e substituintes..	31
Figura 8 - Análises complementares realizadas para caracterização estrutural da manana presente no endosperma de sementes de açaí.	46
Figura 9 - (a) Semente de açaí; (b) sementes após remoção da camada mesocárpica fibrosa externa; (c) sementes utilizadas nesse trabalho, sem as fibras e raspadas para remoção parcial do tegumento que a recobre.....	47
Figura 10 - Fruto de açaí em diferentes estágios de desenvolvimento. Na esquerda, estágio 4 (fruto maduro), estágio 3, 2, e a direita estágio 1.	48
Figura 11 - Etapas do fracionamento das sementes de açaí in natura os componentes separados em cada uma das etapas: (a) sementes no início do processo; (b)AIR; (c) extrato em amilases; (d) extrato em oxalato de amônio; (e) extrato em KOH 1 M; (f) extrato em KOH 4 M; (g) extrato de clorito de sódio; (h) extrato de KOH 4M; (i) fração insolúvel recuperada ao final.....	49
Figura 12 - Esquema da metodologia CoMPP utilizada para determinação do perfil glicômico das sementes.	55
Figura 13 - Preparo das placas para impressão do microarranjo. (a) Placa 1 contendo parte dos extratos diluídos; (b) Placa 2 contendo o restante dos extratos diluídos; (c) layout do microarranjo a ser impresso com as amostra dispostas em posições relativas a disposição nas placas de poços.	57
Figura 14 - Esquema simplificado de anticorpos monoclonais utilizados para localização de moléculas alvo <i>in situ</i>	62

Figura 15 - Etapas do fracionamento das sementes de açaí: (a) sementes in natura no início do processo; (b) AIR; (c) extrato em amilases; (d) extrato em oxalato de amônio; (e) extrato em KOH 1 M; (f) extrato em KOH 4M; (g) extrato de clorito de sódio; (h) extrato de KOH 4M; (i) fração insolúvel recuperada ao final.	66
Figura 16 - (a) Espectros de HSQC da fração de polissacarídeo isolado das sementes de açaí, solubilizada em 50% m/m de uréia-D ₂ O com atribuições de sinais de ¹ H/ ¹³ C; (b) estrutura molecular de manana linear identificada.	70
Figura 17 - Espectros de HMBC da fração de polissacarídeo isolado das sementes de açaí, solubilizada em 50% m/m de uréia-D ₂ O.	72
Figura 18 . Espectro de ¹³ C da fração do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí analisado por RMN de estado sólido.	73
Figura 19 - Perfil DRX do padrão de celulose microcristalina; de manana insolúvel isolada de sementes de açaí; e do padrão de manana linear de marfim vegetal.	75
Figura 20 . Cromatograma de HPAEC-PAD do hidrolisado de polissacarídeos insolúveis em água que foram isolados de sementes de açaí.	76
Figura 21 - Cromatograma de cromatografia gasosa do hidrolisado de polissacarídeos isolados da semente de açaí.	77
Figura 22 - Espectro de HSQC da fração de polissacarídeo isolado das sementes de açaí, solubilizada em 50% m/m de uréia-D ₂ O e analisado por RMN em solução equipado com criosonda.	78
Figura 23 - Resíduos de β-D-1,4-Man _p , resíduo de β-D-1,4,6-Man _p , resíduo de α-D-Gal _p presentes na manana linear identificada por RMN.	79
Figura 24 - Resíduos de (a) curva de termogravimetria do padrão de celulose microcristalina, da fração de polissacarídeos isolada de sementes de açaí e padrão de manana linear de marfim vegetal; (b) derivada da curva de termogravimetria do padrão de celulose microcristalina, da fração de polissacarídeos isolada de sementes de açaí e padrão de manana linear de marfim vegetal.	81
Figura 25 - Estrutura de manana linear identificada no endosperma de sementes de açaí maduras.	82
Figura 26 - Mapa de calor do perfil glicômico das sementes de açaí madura, do controle de <i>Arabidopsis</i> , e de padrões de: manana linear de marfim vegetal (ML), glucomanana de konjac (GlcM), galactomanana de guar (GalM I) e galactomanana de alfarroba (GalM II). Os mAbs estão organizados de acordo com o grupo de polissacarídeos que eles têm como alvo (glucana,	

heteroxilana, manana, pectina, xilana, xiloglucana) para cada solvente extração (água:tween, CDTA e NaOH).....	84
Figura 27 - Detecção <i>in situ</i> de epítomos de manana no endosperma de sementes de açaí usando duas sondas de anticorpos monoclonais. (a) Imunolocalização com LM21 (sinal verde); (b) Imunolocalização com BS-400-4 (sinal vermelho).....	88
Figura 28 - Colocalização de <i>Calcofluor white</i> , LM21 e BS-400-4 no endosperma de sementes de açaí. (a) Delimitação das organelas celulares por <i>Calcofluor white</i> (sinal azul); (b) Imunolocalização com LM21 (sinal verde); (c) Colocalização de <i>Calcofluor white</i> (sinal azul), LM21 (sinal verde) e BS-400-4 (sinal vermelho); (d) Imunolocalização com BS-400-4 (sinal vermelho).....	89
Figura 29 - Imunolocalização do endosperma de sementes de açaí utilizando o mAb LM22. (a) Delimitação das organelas celulares por <i>Calcofluor white</i> (sinal azul); (b) Imunolocalização com LM22 (sinal verde); (c) Colocalização de <i>Calcofluor white</i> (sinal azul) e LM22 (sinal verde).	90
Figura 30 - Microscopia de secções de sementes de açaí com fluoroglucinol para observação de componentes poliméricos.	92
Figura 31 - (a) Microscopia de secções de sementes de açaí coradas com <i>pontamin scarlet</i> sem sinais detectáveis de celulose; (b) Controle da marcação com o corante em controles de celulose microfibrilada indenticadas pela coloração vermelha.....	93
Figura 32 - Colocalização de <i>Calcofluor White</i> (sinal azul) e INRA-RU2 (sinal vermelho) para identificação de epítomos de ramnogalacturonana I. (a) estágio 1; (b) estágio 2; (c) estágio 3; (d) estágio 4.....	101
Figura 33 - Colocalização de <i>Calcofluor white</i> , LM21 e BS-400-4 no endosperma de sementes de açaí em quatro diferentes estágios de amadurecimento do fruto. (a) Colocalização de <i>Calcofluor white</i> (sinal azul) e LM21 (sinal verde) em sementes do estágio 1; (b) Colocalização de <i>Calcofluor white</i> (sinal azul) e LM21 (sinal verde) em sementes do estágio 2; (c) Colocalização de <i>Calcofluor white</i> (sinal azul) e LM21 (sinal verde) em sementes do estágio 3; (d) Colocalização de <i>Calcofluor white</i> (sinal azul) e BS-400-4 (sinal vermelho) em sementes do estágio 1; (e) Colocalização de <i>Calcofluor white</i> (sinal azul) e BS-400-4 (sinal vermelho) em sementes do estágio 2; (f) Colocalização de <i>Calcofluor white</i> (sinal azul) e BS-400-4 (sinal vermelho) em sementes do estágio 3.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de usos comerciais identificados para sementes de açaí.....	19
Tabela 2. Estudos realizados nos últimos 5 anos sobre o conteúdo de açúcar das sementes de açaí.....	22
Tabela 3 - Diferentes tipos de manana e sua origem vegetal.....	27
Tabela 4. Anticorpos monoclonais e módulos de ligação a carboidratos utilizados para determinar o perfil glicômico das sementes de açaí e suas especificidades, como: a diluição utilizada, origem, e os epítomos de atuação.....	58
Tabela 5. Composição química (% massa seca) de diferentes porções da semente de açaí in natura utilizada nesse trabalho e na dissertação de mestrado que antecede este trabalho. As partes avaliadas são: sementes após despolpa do fruto (semente + fibras), sementes sem as fibras mesocárpicas e sem o endocarpo (semente), o endosperma isolado das sementes de açaí (endosperma isolado).....	64
Tabela 6. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.), manana linear de marfim vegetal (<i>Phytelephas macrocarpa</i>), manana linear de sementes de tâmara (<i>Phoenix dactylifera</i>), e de resíduos não ramificados de β -D-Manp de galactomananas de sementes de <i>Cassia grandis</i> e <i>Cassia obtusifolia</i>	70
Tabela 7. Deslocamentos químicos de ^{13}C (ppm) do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí, e de polimorfos de manana linear presentes em marfim vegetal (<i>ivory nut</i>), e em alga <i>Codium fragile</i>	73
Tabela 8. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (ppm) de HSQC do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) analisado em RMN em solução com criosonda, padrão de manana linear do marfim vegetal analisado em RMN com criosonda...78	78
Tabela 9. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (ppm) de HSQC do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí (<i>Euterpe oleracea</i> Mart.) analisado em RMN com criosonda; galactomanana de <i>Prosopis affinis</i> ; galactomanana de <i>Cassia obtusifolia</i>	79
Tabela 11- Mapa de calor do perfil glicômico das sementes de açaí em quatro diferentes estágios de maturação do fruto, do controle de <i>Arabidopsis</i> , e de padrões de: manana linear de marfim vegetal (ML), glucomanana de konjac (GlcM), galactomanana de guar (GalM I) e galactomanana de alfarroba (GalM II). Os mAbs estão organizados de acordo com o grupo de polissacarídeos que eles têm como alvo (glucana, heteroxilana, manana, pectina, xilana, xiloglucana) para cada solvente extração (água:tween, CDTA e NaOH).....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Método de derivatização de alditol acetato
AIR	<i>Alcohol insoluble residue</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CBM	<i>Carbohydrate-Binding Module</i>
CDTA	Ácido 1,2-ciclohexilenodinitrilotetraacético
CG	Cromatografia gasosa
COMPP	<i>Comprehensive microarray polymer profiling</i>
CPMAS	Polarização cruzada com rotação no ângulo mágico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raios-X
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPAEC-PAD	<i>High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
mAb	Anticorpo monoclonal
MOS	Manano-oligossacarídeos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RID	Detector de índice de refração
RMN	Ressonância magnética nuclear
ssRMN	Ressonância magnética nuclear em estado sólido
TFA	Ácido trifluoroacético
TGA	Análise gravimétrica térmica
TMS	Método de derivatização de trimetilsilil
UV-VIS	Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 AÇAÍ: BENEFÍCIOS, NOTORIEDADE E PRODUÇÃO	14
2.2 SEMENTES DE AÇAÍ: ESTADO-DA-ARTE.....	17
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SEMENTES DE AÇAÍ E SUAS APLICAÇÕES ASSOCIADAS AO CONTEÚDO DE AÇÚCARES.....	19
2.4 MANANA	25
2.4.4 Manana linear	27
2.4.1 Galactomanana	28
2.4.2 Glucomanana	29
2.4.3 Galactoglucomanana	30
2.5 A PAREDE CELULAR E AS METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS ESTRUTURAIIS	30
2.5.1 Preparo da amostra	31
2.5.2 Caracterização da composição de resíduos glicosil de polissacarídeos da parede celular vegetal	34
2.5.3 Caracterização estrutural de polissacarídeos da parede celular vegetal	38
2.5.4 Metodologias complementares para análise de polissacarídeos estruturais ...	41
3 JUSTIFICATIVA	43
4 OBJETIVOS	45
4.1 OBJETIVO GERAL.....	45
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
5 MATERIAIS E MÉTODOS	46
5.1 FONTE DE MATERIAIS	46
5.2 ORIGEM DAS SEMENTES DE AÇAÍ.....	47
5.3 CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DAS SEMENTES DE AÇAÍ.....	48
5.4 FRACIONAMENTO DAS SEMENTES DE AÇAÍ PARA ISOLAR FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM POLISSACARÍDEOS ESPECÍFICOS.....	49
5.5 AVALIAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO INSOLÚVEL ISOLADO DA SEMENTE DE AÇAÍ.....	51
5.5.1 Espectroscopia de RMN em solução	51
5.5.2 Espectroscopia de RMN de sólidos	52
5.6 AVALIAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS INSOLÚVEIS ISOLADOS DA SEMENTE DE AÇAÍ	52
5.7 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS INSOLÚVEIS ISOLADOS DA SEMENTE DE AÇAÍ	53

5.7.1 Cromatografia gasosa (CG)	53
5.7.2 Cromatografia de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)	53
5.8 AVALIAÇÃO POR TERMOGRAVIMETRIA (TGA) DA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS INSOLÚVEIS ISOLADOS DA SEMENTE DE AÇAÍ	54
5.9 AVALIAÇÃO DO PERFIL GLICÔMICO DA SEMENTE DE AÇAÍ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO VIA COMPP	54
5.9.1 Extração das sementes de açaí em diferentes estágios de maturação	55
5.9.2 Preparo de matrizes de glicanos oriundas de sementes de açaí em diferentes estágios de desenvolvimento	56
5.9.3 Sondagem dos microarranjos de sementes de açaí utilizando mAbs e CBMs ..	58
5.9.4 Revelação e quantificação dos microarranjos	60
5.10 AVALIAÇÃO <i>IN SITU</i> DE POLISSACARÍDEOS NA SEMENTE DE AÇAÍ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO	61
5.10.1 Seccionamento das sementes de açaí	61
5.10.2 Controle das análises de microscopia das sementes de açaí	61
5.10.3 Avaliação do conteúdo de celulose no tecido de sementes de açaí maduras ..	61
5.10.4 Avaliação do conteúdo de lignina no tecido de sementes de açaí maduras	62
5.10.5 Imunolocalização das sementes de açaí em diferentes estágios de maturação	62
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
6.1 CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DAS SEMENTES E PREPARO DA AMOSTRA.....	64
6.2 CARACTERIZAÇÃO DE MANANA DE SEMENTES DE AÇAÍ MADURAS	68
6.2.1 Caracterização estrutural da fração isolada de sementes de açaí por RMN ...	68
6.2.2 Avaliação da fração isolada de sementes de açaí por RMN de sólidos e DRX	72
6.2.3 Caracterização composicional da fração isolada de sementes de açaí	76
6.2.4 Confirmação do conteúdo de galactose no polissacarídeo isolado das sementes de açaí	77
6.2.5 Confirmação do conteúdo de glicose no polissacarídeo isolado das sementes de açaí	80
6.3 ELUCIDAÇÃO <i>IN SITU</i> DA ESTRUTURA DA MANANA DE SEMENTES DE AÇAÍ	82
6.3.1 Avaliação do perfil glicômico da semente de açaí madura via COMPP	82
6.3.2 Avaliação <i>in situ</i> de manana na semente de açaí madura	86
6.3.3 Avaliação <i>in situ</i> de diferentes componentes no tecido de sementes de açaí	91
6.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL GLICÔMICO DAS SEMENTES DE AÇAÍ AO LONGO DA MATURAÇÃO DO FRUTO	94
7 CONCLUSÃO	104
8 PERSPECTIVAS	105

9 REFERÊNCIAS	107
----------------------------	-----

1 INTRODUÇÃO

Os dados mais recentes sobre o cultivo de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) no Brasil indicam a intensificação de sua produção, atingindo 1.946.622 toneladas em 2022 (<https://sidra.ibge.gov.br>). A produção visa atender à crescente demanda por este fruto popularizado pelos seus efeitos nutracêuticos benéficos a saúde. Entretanto, assim como aumento de sua notoriedade no cenário atual, cresce a preocupação relacionada à grandes volumes de resíduos de produção gerados. Dentre esses resíduos, as sementes representam sua maioria, uma vez que aproximadamente 85% da massa total do fruto correspondem à esta fração (Pessoa *et al.*, 2010). Estima-se que sejam gerados mais 1.650.000 t/ano de sementes como resíduo da produção da polpa comestível. Entretanto, há um descaso no descarte desse material que resulta em problemas ambientais causados pelo acúmulo inadequado das sementes a céu aberto.

Atualmente, são poucos os usos das sementes e nenhuma das aplicações aproveita o real potencial desse material para gerar produtos com maior valor agregado. Como exemplo, atualmente as sementes são usadas apenas como adubo, geração de calor, eletricidade, ou artesanato (Oliveira *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2010; Votorantim, 2018). Os resultados que integram a dissertação de mestrado que antecede essa tese de doutorado (Miguez, 2020) e a publicação de Monteiro, Miguez e colaboradores (2019) mostraram que a semente de açaí é composta majoritariamente por carboidratos, que representam 57% da sua massa seca total. Além disso, aproximadamente metade da massa do fruto corresponde a um único polissacarídeo, a manana.

A manana é um polímero formado por monossacarídeos de manose que pode apresentar diferentes classificações a depender da presença de ramificações de galactose ou resíduos de glicose na cadeia principal (Moreira; Filho, 2008). Já a manose é um açúcar de alto valor, com significativa relevância e aplicação em diversos nichos de mercado, sendo utilizada como matéria-prima na produção de variados bioprodutos. Entre esses, destacam-se os produtos das indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia, em virtude do seu potencial como ingrediente funcional e de suas funções biológicas (Hu *et al.*, 2016). Assim, o alto conteúdo de manana das sementes de açaí, representam, portanto, uma oportunidade de aproveitamento desse resíduo para produção de manose.

Pensando nesse potencial das sementes, o grupo de trabalho do laboratório estabeleceu dois métodos patenteados para obtenção de manose a partir de sementes de açaí (BR 102018067282-7 e BR 102023005989-9). Um desses processos avaliou o uso de ácido oxálico para despolimerizar a manana em uma única etapa. Esses ácidos possuem baixo potencial de ionização, o que reduz as reações de desidratação e a formação de produtos de degradação, potencializando a produção de manose em condições reacionais mais brandas (Breslow, 1995; Lee; Jeffries, 2011).

Em um processo alternativo, buscou-se avaliar a hidrólise enzimática para promover a conversão de manana de sementes das açaí em manose. No entanto, a atuação das enzimas hidrolíticas na manana da semente de açaí foi limitada, resultando em rendimento de hidrólise de apenas 3%. Em função da notável recalcitrância da biomassa, foi necessário uma pré-hidrólise da biomassa utilizando ácido diluído. Dessa maneira, o método combinado de hidrólise com ácido diluído e mananases comerciais permitiu a conversão da manana à manose com rendimento de 96,8% (Monteiro *et al.*, 2019).

A recalcitrância da biomassa pode ser causada por diversos fatores, estando frequentemente ligada às propriedades físico-químicas da parede celular vegetal. Esses fatores podem incluir aspectos estruturais relacionados aos polissacarídeos, como a área superficial específica, a cristalinidade e o grau de polimerização de manana. Além disso, também pode estar associada a outros fatores químicos como o teor de lignina, por exemplo (Zoghلامي; Paës, 2019). Tais fatores estão fortemente interligados e são difíceis de dissociar, resultando em barreiras físicas que protegem a manana da desconstrução não só química como enzimática (Melati *et al.*, 2019).

Sabe-se que a estrutura que a manana assume determina não só as suas propriedades, mas impacta na forma que será processada uma biomassa com alto conteúdo de manana (Moreira; Filho, 2008). Portanto, entender a estrutura da manana contida nas sementes de açaí pode ajudar a identificar as limitações de seu processamento buscando melhorar a conversão de manana a manose em um processo mais sustentável.

Até o momento, não se sabe como as unidades de manose estão organizadas na estrutura que a manana assume em sementes de açaí. Entretanto, a composição de resíduos glicosil de diferentes frações de sementes de açaí indica que 90% da fração de açúcares do endosperma corresponde a unidades de manose (Miguez, 2020). Desse modo, A elucidação estrutural da manana contida nas sementes de açaí permitiria aumentar o conhecimento sobre

o grau de substituição desse polissacarídeo e os tipos de ligação glicosídicas envolvidas, facilitando a escolha de enzimas mais adequadas às peculiaridades da semente de açaí.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo entender a estrutura da manana contida nas sementes de açaí, assim como a avaliação de fatores que impactam na sua recalcitrância. Para isso, diferentes aspectos da natureza química e física do polissacarídeo foram analisados por variadas técnicas analíticas complementares. As metodologias de caracterização foram escolhidas de modo a se sobreporem e auxiliar na compreensão da estrutura macromolecular da manana. A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) foi utilizada para determinar a configuração anomérica, o grau de substituição, e a sequência de ligação de açúcares monoméricos (Yao *et al.*, 2021). A composição de resíduos de glicosil foi determinada por cromatografia gasosa por meio da derivatização dos carboidratos pelo método alditol acetato (ASTM, 2007; Liu *et al.*, 2021). Além da avaliação da estrutura, alguns parâmetros como tipo, cristalinidade e comportamento térmico do polissacarídeo influenciam as propriedades mecânicas da parede celular vegetal. Assim, essas características físico-químicas também foram monitoradas por métodos consolidados como difração de raios-X (DRX) e análises termogravimétricas (TGA).

Para evitar perder informações da estrutura dos polissacarídeos que foram isolados da parede celular vegetal, o perfil glicômico e a imunolocalização utilizando anticorpos monoclonais (mAbs) e módulos de ligação a carboidratos (CBMs) foram escolhidos como metodologias analíticas. Essas ferramentas permitiram avaliar não apenas a estrutura de polissacarídeos *in situ*, mas também monitorar mudanças na composição e estrutura da parede celular vegetal de modo a compreender a estrutura molecular de manana ao longo do desenvolvimento do fruto e quais seriam as interações com outros polissacarídeos estruturais (Freshour *et al.*, 2003; Knox, 1997).

Portanto, espera-se que a elucidação estrutural da manana contida nessas sementes e sua interação com outros polissacarídeos estruturais contribua para otimizar esforços no aproveitamento dessa matéria-prima ao contribuir para estabelecer uma estratégia eficaz de processamento do resíduo para a obtenção de manose e manano-oligossacarídeos (MOS).

O texto a seguir foi estruturado iniciando com uma revisão bibliográfica acerca tópicos essenciais para o entendimento do estudo, seguida da justificativa, apresentando a relevância e importância do trabalho. Posteriormente, são descritos os objetivos e a metodologia adotada para atingi-los. Por fim, os resultados obtidos são apresentados e discutidos para conclusão do trabalho, finalizando com possibilidades para a continuidade desse estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AÇAÍ: BENEFÍCIOS, NOTORIEDADE E PRODUÇÃO

O açaí é um fruto típico da palmeira *Euterpe oleracea* Mart. da família das Arecaceae, nativa da Floresta Amazônica. De alto valor nutricional e boas características sensoriais, o açaí é considerado uma “superfruta” com macronutrientes e compostos bioativos benéficos a saúde (Oliveira *et al.*, 2015).

Nos artigos de revisão de Schauss *et al.* (2016) e Pantoja *et al.* (2022) é possível encontrar um resumo dos componentes que já foram identificados na polpa de açaí. Um dos principais constituintes do perfil químico da polpa de açaí são os compostos fenólicos. A presença desses compostos, em particular das antocianinas, estão associados ao potencial antioxidante do fruto, tendo sido associado à prevenção de doenças neurodegenerativas (Silva *et al.*, 2023). Por esses compostos também estarem relacionados a propriedades anti-inflamatórias, há pesquisas que atrelam o consumo do fruto ao tratamento de inflamações crônicas, como diabetes, dislipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares. Seus efeitos na saúde humana vão além, abrangendo a estudos que indicam seu potencial anticâncer, antimicrobiano, antinociceptivo, anticonvulsivante, antileishmania, atividade antienvhecimento e efeitos vasodilatadores (Laurindo *et al.*, 2023).

Além disso, a literatura indica que o açaí tem alto conteúdo de lipídeos, tornando-o um alimento rico em energia. Ele é constituído por uma variedade de ácidos graxos, predominantemente monoinsaturados, poliinsaturados e saturados (Pantoja; Silva, 2022). Adicionalmente, o açaí é uma fonte de nutrientes essenciais, incluindo vitaminas, minerais, fibras alimentares, proteínas, esteróis, aminoácidos e reduzido teor de carboidratos (Pantoja; Silva, 2022; Schauss, 2016).

Assim, o açaí é considerado um alimento completo, o que o torna uma “superfruta”, impulsionando sua crescente popularidade. Esse status resultou na integração do fruto em diferentes nichos de mercado, como os setores alimentício, farmacêutico e cosmético (Souza *et al.*, 2020). A polpa que antes era consumida como um alimento básico restrito a região norte do país, hoje está inserida em sobremesas, bebidas, suplementos, vitaminas, e até mesmo como produtos cosméticos de cuidados pessoais (Sebrae, 2015).

Desse modo, a crescente popularidade do açaí estimulou a expansão do consumo da fruta para além das regiões produtoras. Embora o consumo seja predominantemente local, o alcance comercial do açaí se estendeu a mais de 70 países em todos os continentes, refletindo

seu estágio avançado de difusão global (<https://www.conab.gov.br/>). Para atender à demanda em expansão pela polpa de açaí, foram promovidos avanços agrotecnológicos, resultando no aumento significativo da produção (Silveira *et al.*, 2023).

O açaizeiro *Euterpe oleracea* Mart. é uma espécie tropical nativa da região Amazônica e, portanto, tem forte incidência no norte do Brasil. É nessa região, sobretudo no estuário do rio Amazonas, que se concentram as maiores populações naturais dessa espécie, principalmente nos estados do Pará e Amapá. A palmeira apresenta múltiplas estipes por touceiras ocorrendo naturalmente em áreas alagadas de várzea com solos eutróficos (ricos em nutrientes), porém também aparecem em regiões de igapós com solo distróficos (pobres em nutrientes) (Oliveira *et al.*, 2015) (Figura 1).

Figura 1 - Açaizeiros da espécie *Euterpe oleracea* Mart. de múltiplas estipes por touceira.



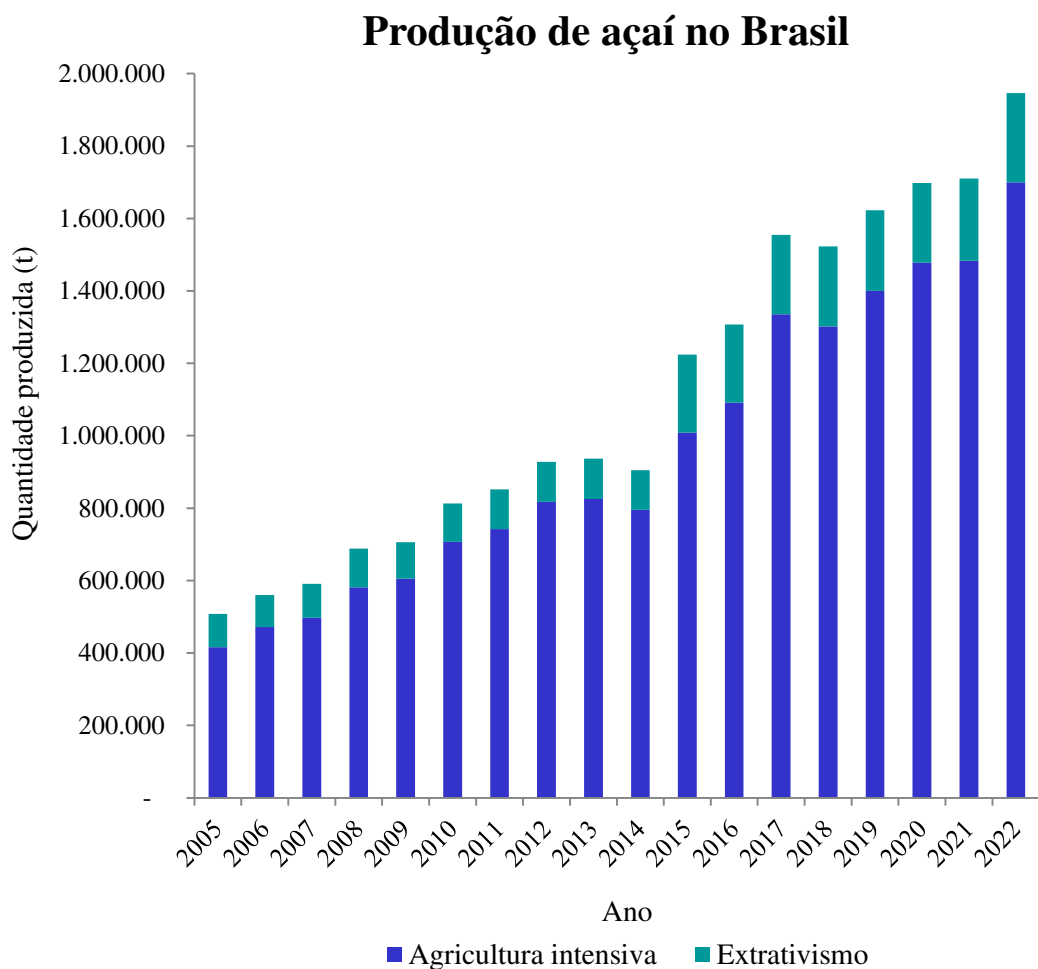
Fonte: Imagem cedida por Ayla Sant'Ana da Silva.

Novos cultivares melhorados geneticamente foram desenvolvidos de modo que a exploração do açaí deixou de ser exclusivamente oriunda de práticas de extrativismo e foram estabelecidas práticas de agricultura intensiva, com o manejo de açaizais nativos e novos cultivares. A EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) lançou em 2005 o cultivar BRS Pará adaptado para terra firme, de modo a aumentar a oferta dos frutos no mercado. Ainda buscando superar as limitações da sazonalidade do fruto, foi desenvolvido

outro cultivar em 2019. O BRS Pai d'Égua, de terra firme, tem produção no período entressafra, portanto de janeiro a junho (MAPA, 2024).

Com a consolidação do sistema de produção desses novos cultivares, as áreas de plantio e manejo tiveram um aumento de 675% em 12 anos, de acordo com o relatório de monitoramento da EMBRAPA Amazônia Oriental (2022). A produção teve um aumento gradativo ao longo dos anos, atingindo um incremento de até 110% da quantidade de açaí produzida nos últimos 10 anos, conforme indica os dados mais recentes do IBGE (Figura 2) (<https://www.ibge.gov.br> e <https://sidra.ibge.gov.br>).

Figura 2 - Aumento da produção de açaí no Brasil nos últimos 10 anos.



Fonte: IBGE, 2024.

A produção recorde do ano de 2022 pode ser atribuída ao incentivo governamental que implementou o programa de desenvolvimento da cadeia produtiva do açaí no estado do Pará, o Pró-Açaí (SEDAP, 2016). Com isso, o estado do Pará se reafirma como o maior produtor

do fruto, contribuindo com cerca de 90% da produção nacional (IBGE, 2024). O programa prevê que a estabilidade produtiva seja atingida neste ano de 2024.

O problema com relação à produção de açaí é que a polpa é a única fração do fruto com amplo uso comercial. No processo de despulpamento, grandes quantidades de resíduos são geradas, já que as sementes representam cerca de 85% da massa total do fruto (Pessoa *et al.*, 2010). Com base na produção atual de açaí, estima-se que aproximadamente 1.654.629 toneladas de sementes sejam geradas anualmente nas áreas produtoras do país.

2.2 SEMENTES DE AÇAÍ: ESTADO-DA-ARTE

O descarte inadequado das sementes de açaí é um problema crônico nas regiões produtoras. De acordo com a Política Nacional dos Resíduos Sólidos – Lei nº 12.305/2010, as sementes de açaí são consideradas um resíduo de responsabilidade dos locais de beneficiamento da polpa. Entretanto, à falta de gestão eficiente e de legislação específica tem feito com que essas sementes não recebam o tratamento adequado. Essa situação contribui para o descaso com o destino final que é dado a esses resíduos, causando impactos negativos ao meio ambiente e à saúde pública (Mathias *et al.*, 2024).

Uma pesquisa realizada por Miranda *et al.* (2022) nos municípios de Macapá e Santana, no Amapá, revelou um cenário alarmante em relação ao descarte das sementes de açaí. A maior parte das sementes geradas por batedores locais no processo de produção da polpa foi descartada de forma inadequada. Essas sementes teriam sido descartadas em aterros, vias públicas, lagos e terrenos baldios, compondo verdadeiros lixões a céu aberto. Em alguns casos, o destino dessas sementes não foi determinado, evidenciando a falta de gestão e controle sobre esse resíduo. Em outras regiões produtoras, como o Pará, também é comum encontrar áreas de armazenamento temporário destinadas a receber as sementes de açaí até que sejam encaminhadas para o descarte ou tratamento (Figura 3).

Figura 3 - Grandes acúmulos de sementes de açaí formam dunas que podem ser vistas em regiões do Pará.



Fonte: Imagem cedida por Ayla Sant'Ana da Silva.

Além de gerar impactos negativos na paisagem urbana, essa prática contribui para a contaminação do solo e da água. A disposição inadequada causa o assoreamento de cursos de água assim como pode desencadear na eutrofização de corpos hídricos, com excesso de nutrientes e a redução do oxigênio dissolvido na água (Neto *et al.*, 2023). Outros fatores de risco são semelhantes aos observados em aterros de lixo doméstico, como a contaminação do solo e do lençol freático (Santos *et al.*, 2019).

Diante do desafio de dar um destino adequado às sementes de açaí, algumas iniciativas surgiram para atenuar esse passivo ambiental. Além de serem incineradas ou destinadas a aterros sanitários, como tradicionalmente ocorre com resíduos agroindustriais (Almaraz-Sánchez *et al.*, 2022), foram identificadas outras aplicações de uso comercial das sementes de açaí, conforme indicado na Tabela 1. Dentre os usos, pode-se exemplificar que sementes são utilizadas para geração de energia, na produção de fertilizantes e adubos, além de servir como matéria-prima para confecção de artesanato, cosméticos e bebidas (Sebrae, 2015).

Tabela 1. Exemplos de usos comerciais identificados para sementes de açaí.

Setor de aplicação	Exemplos de uso	Referência
Agricultura	•Muda de açaizeiro	(Teixeira <i>et al.</i> , 2005)
	•Produção de adubo/fertilizantes	(Sato <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Biochar</i> para captura de CO ₂ e melhoria da qualidade do solo	
Artesanato	•Confecção de bio-jóias	(www.tokbijoux.com.br)
Alimentação	•Torrefação de sementes para produção de uma bebida similar a café	(www.acai.coffee)
Cosméticos	•Insumo na formulação de hidratantes	(www.natura.com.br)
Geração de energia	•Substituição de parte do coque de petróleo utilizado como combustível em fornos na indústria de cimento	(www.votorantincimentos.com.br) (www.wortice.com.br)
	•Confecção de pellets utilizados como combustível em caldeiras	

Apesar dos usos encontrados para as sementes de açaí, a demanda atual ainda não é suficiente para absorver a grande quantidade gerada. Além disso, as aplicações identificadas atualmente se concentram em produtos de baixo valor agregado. No entanto, a literatura científica demonstra um grande potencial para a exploração de novas aplicações das sementes de açaí, o que, associado à implementação de uma logística reversa eficiente, poderia transformar esse resíduo em uma fonte de renda e impulsionar a sustentabilidade da cadeia produtiva (Jorge; Da Silva; Brigagão, 2024).

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS SEMENTES DE AÇAÍ E SUAS APLICAÇÕES ASSOCIADAS AO CONTEÚDO DE AÇÚCARES

As sementes de açaí, residuais do processo industrial de beneficiamento da polpa, possuem a camada fibrosa do mesocarpo aderida à sua superfície (Figura 4). Internamente, a semente contém um embrião diminuto, e o tegumento externo, que recobre a semente, é ruminado em direção ao interior do endosperma (Calzavara, 1972). As sementes, quando apresentam baixo teor de umidade, tornam-se densas e rígidas.

Figura 4 - Sementes de açáí (*Euterpe oleracea* Mart.) em meio ao fruto seco. Em destaque, o corte transversal das sementes evidenciando o endosperma ruminado pelo tegumento e o embrião diminuto.



Fonte: Acervo próprio.

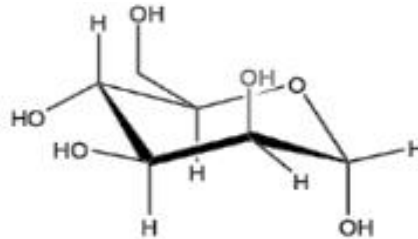
Entre os componentes identificados, as sementes apresentam baixos teores de proteínas (1,7–6,7%), lipídeos (1,70–2,75%), e cinzas (1,36–1,64%) (Igreja *et al.*, 2023; Melo *et al.*, 2021; Silveira *et al.*, 2023). Esse percentual pode variar de acordo com diferentes fatores aos quais o material biológico é suscetível (Silveira *et al.*, 2023).

O perfil químico das sementes de açáí se destaca pela presença de polifenóis, compostos principalmente por procianidinas, também conhecidas como taninos condensados (Martins *et al.*, 2020). Esses compostos fenólicos conferem às sementes propriedades antioxidantes semelhantes às observadas na polpa do fruto. Consequentemente, muitas pesquisas sobre a valorização das sementes têm se concentrado na análise da composição e, principalmente, na bioatividade dos compostos da semente de açáí, com foco nas atividades farmacológicas desses componentes para a prevenção de doenças cardiovasculares e metabólicas (Dias *et al.*, 2024).

Dentre todos os componentes, os carboidratos são os mais abundantes nas sementes de açáí. Cabe destacar que, a avaliação química de diferentes frações da semente, separando a parte interna da fração fibrosa externa, revelou que essas partes contêm diferentes teores de carboidratos. A composição de resíduos de glicosil identificada nas fibras indicam que esta fração possui uma composição típica de biomassas lignocelulósicas, contendo celulose e hemicelulose do tipo xilana (Lima *et al.*, 2021c; Miguez, 2020).

A composição do interior maciço das sementes mostrou-se similar à da semente com as fibras externas, uma vez que essa fração fibrosa corresponde a aproximadamente apenas 6% da massa total do material. Embora as sementes contenham alguns polissacarídeos estruturais em menor quantidade, como glucana, xilana, galactana e arabinana, é interessante observar que quase metade da massa desse resíduo agroindustrial é composta por um único polissacarídeo, a manana (47-58%) (Igreja *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2019; Rambo; Schmidt; Ferreira, 2015). A avaliação apenas do endosperma, sem a presença do tegumento e da fração fibrosa, indica que a composição de resíduos de manose (Figura 5) seria majoritária dentre os monossacarídeos atingindo níveis entre 74-90% (Lima *et al.*, 2021c; Miguez, 2020).

Figura 5 - Estrutura de D-manose.



Fonte: Elaboração própria.

Assim, as sementes de açaí possuem mais manana do que outros resíduos agrícolas abundantes que possuem teor máximo de 35%, como torta de palmiste, fibras de coco e borra de café (Fan *et al.*, 2014; Kusakabe *et al.*, 1987; Pedras *et al.*, 2019). Contudo, apesar do alto conteúdo de carboidratos, especialmente de manana, não são muitos os trabalhos que exploram esse potencial das sementes.

A Tabela 2 apresenta os principais estudos sobre as sementes de açaí correlacionados ao conteúdo de açúcares desse resíduo. Observa-se o uso dessas sementes como subprodutos alimentícios, ricos em fibras e carboidratos. Apesar do baixo valor nutricional, as sementes foram utilizadas na produção de farinha (Borges *et al.*, 2021), macarrão (Barros *et al.*, 2021), e também como ração animal (Rufino *et al.*, 2020). Lima e colaboradores (2021a) indica que as sementes de açaí podem ser aproveitadas na produção de inulina, um alimento funcional. Embora o teor desse frutooligossacarídeo seja baixo, a abundância da matéria-prima o torna notável.

Tabela 2. Estudos realizados nos últimos 5 anos sobre o conteúdo de açúcar das sementes de açaí.

Referência	Descrição do trabalho	Objetivo
BR 102018067282-7	Hidrólise químico-enzimática das sementes para obtenção de manose e MOS*	Manose e MOS
BR 102023005989-9	Hidrólise ácida para obtenção de manose e MOS de sementes de açaí	Manose e MOS
WO 2024/036399	Produção de MOS para controle de patógenos	MOS
(Murillo-Franco; Galvis-Nieto; Orrego, 2024a)	Hidrólise das sementes utilizando β -mannanase imobilizada para obtenção de MOS	MOS
(Murillo-Franco; Galvis-Nieto; Orrego, 2024b)	Otimização da hidrólise enzimática das sementes para obtenção de MOS	MOS
(Jorge; Da Silva; Brigagão, 2024)	Avaliação técnico-econômica do uso de sementes para obtenção de manose e polifenóis	Manose e polifenóis
(Igreja <i>et al.</i> , 2023)	Hidrólise ácida das sementes para obtenção de açúcares redutores	Xarope de açúcar
(Ghysels <i>et al.</i> , 2022)	Produção de 1,6-anidro- β -D-manopiranosose a partir de matérias-primas ricas em manana	1,6-anidro- β -D-manopiranosose
(Aguiar <i>et al.</i> , 2022)	Características físico-químicas de resíduos de abacaxi e açaí no cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	Substrato
(Barros <i>et al.</i> , 2021)	Elaboração de massa alimentícia fresca sem glúten enriquecida com farinha de resíduo de açaí	Subproduto alimentício
(Borges <i>et al.</i> , 2021)	Avaliação das propriedades físico-químicas e tecnológicas da farinha do resíduo de açaí	Subproduto alimentício
(Lima <i>et al.</i> , 2021b)	Produção de β -mannanase por <i>Penicillium citrinum</i> através de fermentação em estado sólido usando biomassa residual de açaí	Substrato
(Lima <i>et al.</i> , 2021c)	Avaliação do potencial das sementes para produção de energia e bioprodutos	Manose
(Lima <i>et al.</i> , 2021a)	Otimização do processo de extração aquosa de inulina a partir da semente	Inulina
(Araújo <i>et al.</i> , 2020)	Uso das sementes como substrato para a produção de mudas de <i>Euterpe precatoria</i>	Adubo
(Rufino <i>et al.</i> , 2020)	Avaliação da digestibilidade do farelo de açaí na alimentação animal	Alimentação animal
(Monteiro <i>et al.</i> , 2019)	Hidrólise químico-enzimática para obtenção de manose	Manose e MOS

*MOS: manano-oligossacarídeos.

Além disso, as sementes têm sido avaliadas como substrato para adubação de mudas de açaí (Aguiar *et al.*, 2022) e como fonte de carbono no cultivo de fungos filamentosos (Araújo *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2021b). Porém, dentre todos os estudos analisados, apenas alguns abordam especificamente o conteúdo de manose nas sementes de açaí. Glysels *et al.* (2022) propõe um processo de pirólise que pode ser aplicável às sementes para a obtenção de 1,6-anidro- β -D-manopiranosose como molécula plataforma.

Outro bioproduto que vem ganhando notoriedade são os manano-oligossacarídeos, obtidos da despolimerização parcial de manana (Murillo-Franco; Galvis-Nieto; Orrego, 2024a, 2024b). MOS são carboidratos de cadeia curta não digeríveis de 2 a 10 resíduos de manose, que estimulam seletivamente a atividade de crescimento da microbiota probiótica intestinal específica (Jana *et al.*, 2021). A crescente demanda comercial por prebióticos promotores de saúde tem estimulado o interesse por esses alimentos funcionais nos setores nutracêutico e farmacêutico, como evidenciado não apenas pelos artigos publicados, mas também pela existência patentes relacionadas à produção de MOS a partir de sementes de açaí (Kango *et al.*, 2022).

Murillo-Franco e colaboradores (2024a) descreve a utilização de um coquetel de β -mananases imobilizadas em espumas de resina epóxi preenchidas com fibras de cápsula de urucum para liberação preferencial de MOS de dois a cinco graus de polimerização a partir de manana presente em sementes de açaí. Em seu outro trabalho, Murillo-Franco *et al.* (2024b) caracterizam as propriedades físico-químicas e estruturais das sementes de açaí da região do Pacífico colombiano e explora seu potencial para produzir MOS por meio de hidrólise enzimática utilizando mananases comerciais.

Por outro lado, a hidrólise total da manana libera manose, um açúcar com alto valor de mercado com potencial como nutracêutico funcional e suplemento dietético prebiótico com funções biológicas de grande interesse na indústria (Hu *et al.*, 2016). A manose não é muito explorada, provavelmente devido à escassez de fontes naturais abundantes, o que torna as sementes de açaí um material interessante para esse fim. Monteiro *et al.* (2019), Jorge *et al.* (2024), Igreja *et al.* (2023) apresentam diferentes metodologias de hidrólise químico e enzimática para processamento das sementes para a extração de manose.

Igreja e colaboradores (2023) cita o uso de ácidos inorgânicos, H_2SO_4 e H_3PO_4 , para obtenção de manose de sementes de açaí. A comparação entre os ácidos indicou que a hidrólise ácida com H_2SO_4 foi mais eficaz na produção de manose do que o uso de H_3PO_4 em condições otimizadas para comparação. Em contraponto, em outra metodologia apresentada na patente BR 102023005989-9, o uso de ácido oxálico seria superior ao ácido sulfúrico.

Foi sugerido que a presença de dois grupos carboxila nos ácidos dicarboxílicos estaria correlacionado a eficácia na despolimerização. Esses dois valores de pKa fornecem a acidez necessária para uma melhor protonação do substrato, o que leva a uma hidrólise mais eficiente do polissacarídeo (Lee; Jeffries, 2011). Essa abordagem pode resultar em maiores rendimentos de manose em uma ampla faixa de condições de pH e temperatura, comparado ao desempenho de ácidos monocarboxílicos. Comparado aos ácidos minerais fortes, ácidos orgânicos apresentam menor potencial de toxicidade aquática, são menos corrosivos, além de reduzida formação de produtos de degradação. O estudo de otimização das condições de hidrólise ácida demonstrou que uma única etapa de hidrólise foi capaz de atingir altos rendimentos de conversão de manana em manose.

Apesar das vantagens da hidrólise utilizando ácido oxálico, outro processo de hidrólise foi identificado como ainda mais sustentável, em que seriam utilizadas enzimas mananolíticas para despolimerização da manana de sementes de açaí (BR 102018067282-7). No entanto, a atuação das enzimas hidrolíticas na manana da semente foi limitada em função da recalcitrância da biomassa, fato evidenciado pelo baixo rendimento de hidrólise enzimática da semente de açaí *in natura*, que foi inferior a 3% de manose recuperada. De modo a viabilizar o processo, o processo contou com uma etapa de pré-hidrólise das sementes utilizando ácido sulfúrico diluído para que assim, a hidrólise químico-enzimática resultasse em rendimentos de conversão à manose equivalentes a 98% (Monteiro *et al.*, 2019).

A recalcitrância da biomassa à hidrólise enzimática pode ser ocasionada por diversos fatores químicos e/ou estruturais que podem estar fortemente interconectados e por muitas vezes difíceis de dissociar. Os fatores químicos referem-se aos componentes lignina, celulose, hemiceluloses ou grupamentos acetil que se presentes impactam na recalcitrância da biomassa ao acesso das enzimas. Além disso, há possibilidade de que as interações entre esses polímeros aumentem a recalcitrância das paredes celulares à hidrólise enzimática. Assim como foi exemplificado na avaliação de *softwoods* de coníferas, a recalcitrância da manana pode variar de acordo com o perfil de glicosilação e galactosilação. A estrutura do material interferiu na associação dos polissacarídeos com outros polímeros componentes da parede celular vegetal (Martínez-Abad; Jiménez-Quero; Wohlert, 2020).

Para que haja a hidrólise é necessário a adsorção das enzimas aos substratos. Portanto, fatores estruturais como a área de superfície acessível da biomassa é um fator crítico que limita a digestibilidade do polissacarídeo. No entanto, este não é um fator independente, pois está relacionado com o tamanho das partículas da biomassa, porosidade e volume dos poros.

Outro fator determinante na recalcitrância do material seria a cristalinidade de certos polissacarídeos, como a celulose (Zoghلامي; Paës, 2019).

O estudo conduzido por Zhang *et al.* (2014) para avaliar a relação entre a especificidade de CBMs em aumentar a atividade de mananases da família GH5 e GH26, exemplificou que a manana presente nos espaços intercelulares eram particularmente recalcitrantes à degradação enzimática. Isso foi evidenciado pela eficácia limitada das mananases e pela falta de aumento na atividade de certos módulos de ligação a carboidratos (CBMs). O arranjo de polissacarídeos em junções intercelulares poderia criar uma barreira física que os torna menos acessíveis às enzimas responsáveis pela degradação desses carboidratos complexos. Se os polissacarídeos estiverem protegidos em uma matriz densa, ou localizados em áreas de difícil acesso como essas, as enzimas teriam dificuldade em alcançá-los e degradá-los de forma eficaz.

Um estudo recente de avaliação técnico-econômica e ambiental de uma biorrefinaria de sementes de açaí (Jorge; Da Silva; Brigagão, 2024) demonstrou que a coprodução de polifenóis e manose constitui uma alternativa tecnicamente viável e economicamente mais atrativa quando comparada à prática atualmente predominante, baseada na queima das sementes para geração de vapor. O cenário proposto apresentou indicadores financeiros evidenciando um tempo de retorno do investimento de aproximadamente 2,7 anos, taxa interna de retorno de 34,8% e elevado valor presente líquido após 20 anos de operação. Esses resultados ressaltam o potencial das sementes de açaí como matéria-prima estratégica para o desenvolvimento de biorrefinarias integradas, nas quais a recuperação de manose pode contribuir para a valorização de um resíduo abundante ainda subutilizado. A implementação deste modelo de bioeconomia circular sustentável permitirá não só agregar valor à cadeia de açaí como também mitigar impactos ambientais causados por grandes acúmulos desse material.

Desse modo, fica claro que entender a estrutura da manana e os fatores que impactam na recalcitrância observada auxiliaria a melhorar os processos de conversão das sementes de açaí a manose, uma vez que poderia direcionar na busca por mananases mais específicas.

2.4 MANANA

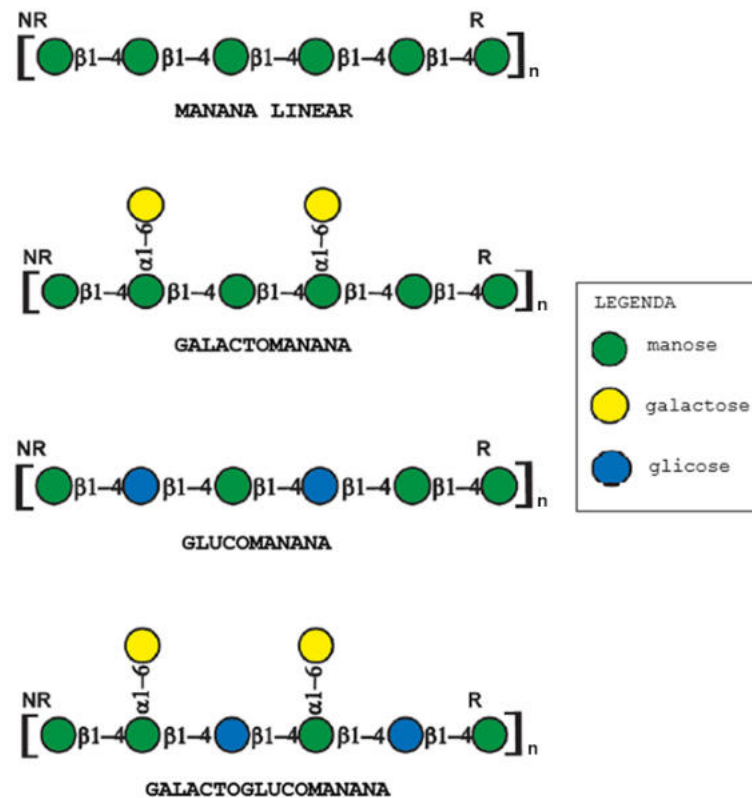
A manana apresenta uma diversidade estrutural, a qual reflete as diferentes funções biológicas que desempenha nos organismos em que está presente (Panwar; Shubhashini; Kapoor, 2023). Enquanto α -mananas são tipicamente encontradas em leveduras e fungos

como constituintes da parede celular e de glicoproteínas, nas plantas esse polissacarídeo ocorre na forma de β -manana (Baek *et al.*, 2024; Burnham-Marusich *et al.*, 2018; Mislovičová *et al.*, 2002).

Dentre os polissacarídeos que compõem a parede celular vegetal, as β -mananas apresentam diversidade funcional. Além de integrarem a rede hemicelulósica associada às microfibrilas de celulose, o que contribui para a organização estrutural da parede (Capek *et al.*, 2000), essas moléculas podem atuar como polissacarídeos de reserva acumulados no endosperma das sementes de determinadas espécies (Avigad; Dey, 1997; Meier; Reid, 1982; Srivastava, 2002).

As β -mananas podem ser classificadas em quatro subfamílias (manana linear, galactomanana, glucomanana e galactoglucomanana) de acordo com a composição e a proporção relativa dos resíduos de manose, galactose e glicose presentes em suas cadeias (Figura 6). A distribuição desses polissacarídeos varia amplamente entre espécies vegetais, refletindo diferenças na origem botânica e nas particularidades estruturais de cada parede celular conforme exemplificado na Tabela 3 (Scheller; Ulvskov, 2010).

Figura 6 - Classificação da diversidade estrutural de β -manana.



Fonte: Adaptado de Panwar e colaboradores (Panwar; Shubhashini; Kapoor, 2023).

Tabela 3 - Diferentes tipos de manana e sua origem vegetal.

Origem	Espécie	Classificação	Referência
Marfim Vegetal	<i>Phytelepha macrocarpa</i>	Manana linear	(Meier, 1958)
Semente de tâmara	<i>Phoenix dactylifera</i>	Manana linear	(Meier, 1958)
Torta de palmiste	<i>Elaeis guineensis</i>	Manana linear	(Zhang <i>et al.</i> , 2021)
Borra de café	<i>Coffea arabica</i>	Galactomanana	(Nguyen <i>et al.</i> , 2019)
Casca de soja	<i>Glycine max</i>	Galactomanana	(Hsiao; Anderson; Dale, 2006)
Goma de alfarroba	<i>Ceratonia siliqua</i>	Galactomanana	(Muschin; Yoshida, 2012)
Goma de cassia	<i>Cassia tora</i>	Galactomanana	(Li <i>et al.</i> , 2020)
Goma feno-grego	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Galactomanana	(Muschin; Yoshida, 2012)
Goma guar	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	Galactomanana	(Muschin; Yoshida, 2012)
Goma Tara	<i>Caesalpinia spinosa</i>	Galactomanana	(Muschin; Yoshida, 2012)
Konjac	<i>Amorphophallus konjac</i>	Glucomanana	(Jiang <i>et al.</i> , 2018)
Aloe Vera	<i>Aloe barbadensis</i>	Glucomanana	(Eshun; He, 2004)
Softwood	<i>Picea abies</i>	Galactoglucomanana	(Polari <i>et al.</i> , 2012)
Softwood	<i>Pinus brutia</i>	Galactoglucomanana	(Rajani <i>et al.</i> , 2016)

2.4.4 Manana linear

A manana linear é composta por unidades repetidas de D-manopiranoses unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, em uma cadeia altamente ordenada. Esse polissacarídeo se aproxima de um homopolissacarídeo, mas pode conter até 5% de outros açúcares

monoméricos, como galactose e glicose (Holtzaple, 2003). As fortes interações intermoleculares, estabelecidas por ligações de hidrogênio entre as cadeias, promovem alta compactação estrutural, conferindo à manana linear um perfil cristalino e insolubilidade em água (Dhawan; Kaur, 2007; Stephen, 1983).

Essas características estruturais estão associadas as propriedades mecânicas que esse polissacarídeo desempenha nas sementes, conferindo rigidez ao material e, conseqüentemente, protegendo o embrião (Meier; Reid, 1982). Além desse papel estrutural, a manana também atua como polissacarídeo de reserva na parede celular do endosperma de sementes, sendo mobilizada durante a germinação e convertida em fonte de carbono e energia para o embrião (Srivastava, 2002; Zamski, 1995). De modo geral, os polissacarídeos de reserva são sintetizados na forma polimérica durante o desenvolvimento da semente e permanecem armazenados no tecido até a maturidade. Com o término do período de dormência e o início da germinação, essas macromoléculas são progressivamente despolimerizadas, liberando monossacarídeos que podem ser metabolizados para suprir as demandas energéticas do embrião (Avigad; Dey, 1997).

A manana linear constitui o principal material de reserva da parede celular do endosperma de algumas espécies de palmeiras (Arecaceae), como as sementes de tâmara (*Phoenix dactylifera*) e o marfim vegetal (*Phytelphas macrocarpa*) (Meier, 1958). Do mesmo modo, resíduos agroindustriais, como a torta de palmiste, destacam-se pelo teor de manana linear que contêm (Rana *et al.*, 2023). A semente de açaí provavelmente também é composta por uma manana linear, conforme indicado pelos resultados que integram a dissertação de mestrado (Miguez, 2020) e a publicação de Monteiro, Miguez e colaboradores (2019). Os dados mostraram que a semente de açaí é composta majoritariamente por carboidratos, dos quais 82% correspondem à manose. Além disso, testes de resistência à compressão demonstraram que as sementes de açaí apresentam rigidez superior à de outras sementes que também contêm manose, reforçando a hipótese de que essa elevada rigidez está relacionada à presença de manana linear.

2.4.1 Galactomanana

As galactomananas são polissacarídeos cuja cadeia principal de manose apresenta ramificações laterais formadas por resíduos de Gal- α -1,6, distribuídos de maneira aleatória ao longo da estrutura. O grau de ramificação varia de acordo com a espécie vegetal, com isso a razão manose:galactose pode variar entre 1:1 e 4:1. Entre os exemplos mais representativos, a

goma guar apresenta uma razão aproximada de 2:1, enquanto a goma de alfarroba é de 4:1 (Avigad; Dey, 1997; Meier; Reid, 1982).

As ramificações de galactose correspondem à fração hidrofílica da galactomanana e, portanto, quanto maior o grau de substituição, maior será a hidrofílicidade do polissacarídeo. Essa característica estrutural confere às galactomananas a capacidade de serem facilmente solubilizadas e recuperadas (Dea; Morrison, 1975; Gidley; Reid, 2006).

As galactomananas estão entre as mananas mais extensivamente estudadas e comercializadas, sobretudo devido às suas propriedades reológicas e funcionalidade tecnológica. Na indústria alimentícia, essas macromoléculas desempenham papel essencial como agentes gelificantes, espessantes e estabilizantes, contribuindo para a textura, viscosidade e estabilidade de formulações. Além disso, sua conversão em β -mananoglicosacarídeos (β -MOS) tem ampliado o interesse nessas macromoléculas (Jana *et al.*, 2021).

As galactomananas estão amplamente distribuídas em diferentes fontes vegetais, incluindo grão de café (*Coffea arabica*), casca de soja (*Glycine max*), goma de alfarroba (LBG, *Ceratonia siliqua*), goma de feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*), goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) e goma tara (*Caesalpinia spinosa*) (Moreira *et al.*, 2014; Muschin; Yoshida, 2012; Whistler; Saarnio, 1957).

2.4.2 Glucomanana

As glucomananas possuem os resíduos de D-manopiranosose da cadeia principal alternados com resíduos de β -1,4-glicose, que correspondem até 20% da composição total (Holtzaple, 2003). Nas glucomananas as unidades de manose que compõem a cadeia podem estar acetiladas, o que influencia as propriedades físico-químicas e a solubilidade do polímero (Avigad; Dey, 1997; Meier; Reid, 1982). De maneira geral, esse polissacarídeo é conhecido por ser mais solúvel do que a manana linear, pois as cadeias apresentam uma conformação paracristalina, caracterizada por empacotamentos mais fracos e menor grau de ordenação (Northcote, 1972).

As glucomananas ocorrem predominantemente como carboidratos de reserva em sementes, bulbos e tubérculos de monocotiledôneas, contribuindo para o metabolismo energético dessas plantas (Pontis, 2017). A composição estrutural pode variar entre tais espécies, com razões manose:glicose de 2:1 a 4:1 (Tester; Al-Ghazzewi, 2016).

2.4.3 Galactoglucomanana

De forma geral, as galactoglucomananas apresentam uma estrutura semelhante à das glucomananas, porém com cadeias ramificadas por resíduos de Gal- α -1,6. Parte dos resíduos de manose pode estar acetilada, característica que, em conjunto com as ramificações laterais, contribui para a elevada solubilidade em água observada nesse polissacarídeo (Timell, 1965).

As galactoglucomananas ocorrem predominantemente em coníferas (*softwoods*), como o abeto-da-Noruega (*Picea abies*) e o pinheiro-turco (*Pinus brutia*), espécies utilizadas na produção de polpa celulósica e papel (Kumar Suryawanshi; Kango, 2021). Nessas madeiras, a razão entre glicose:galactose:manose pode atingir valores de aproximadamente 8:1:33, como ocorre no abeto-da-Noruega (Capek *et al.*, 2000). Em outras fontes vegetais, como nas sementes de *Cercis siliquastrum*, essa proporção é de 2:1:11, confirmando as variações estruturais conforme a origem botânica (Holtzapfel, 2003).

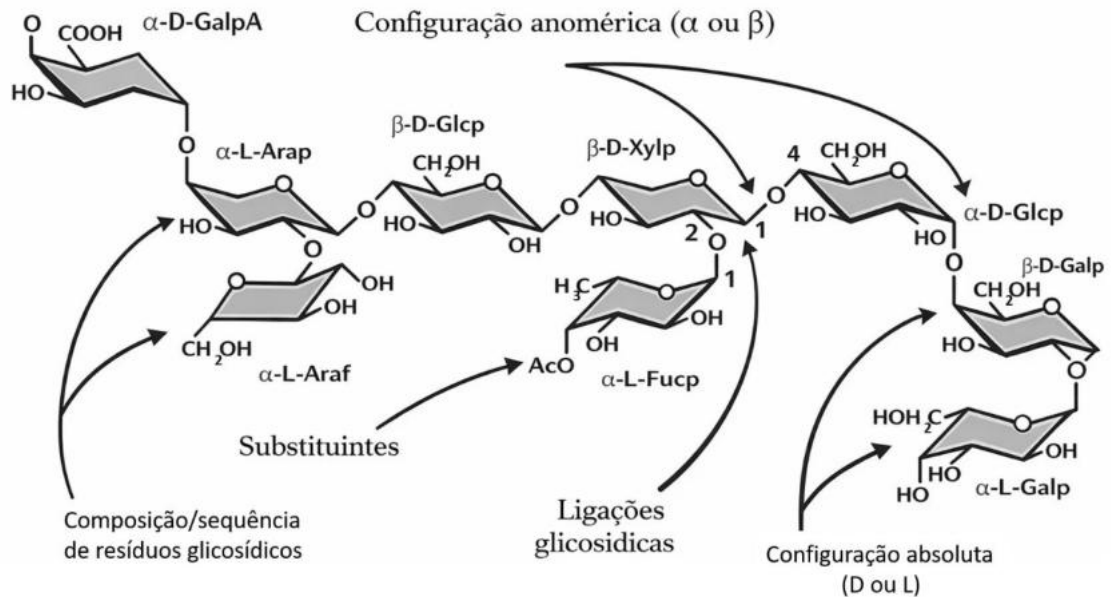
2.5 A PAREDE CELULAR E AS METODOLOGIAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS ESTRUTURAIIS

A parede celular vegetal é uma estrutura altamente complexa devido à presença de vários polímeros interligados por ligações covalentes e não covalentes, dispostos na parede primária e secundária (Burton; Gidley; Fincher, 2010). A parede celular primária é formada principalmente por polissacarídeos, entre os quais microfibrilas de celulose e hemiceluloses em meio a uma matriz de pectina. A parede celular secundária é majoritariamente formada por celulose e hemiceluloses envoltas por lignina, sendo baixa ou inexistente a presença de pectina (Carpita; Gibeaut, 1993)

A composição e a organização da parede celular variam de acordo com a espécie, o tecido e o estágio de desenvolvimento do material que compõem. Os polissacarídeos podem ser classificados como homo ou heteropolissacarídeos, ácidos, neutros ou básicos, além de desempenharem funções estruturais ou de reserva. A arquitetura molecular que assumem é determinante para suas propriedades físico-químicas, influenciando características como a solubilidade e o comportamento frente a diferentes processos de transformação.

Nesse contexto, os polissacarídeos representam um grupo estruturalmente diverso, cuja heterogeneidade resulta da combinação de diferentes parâmetros (Figura 7). Entre esses, as configurações estereoquímicas dos resíduos glicosil (D ou L; α ou β), os tipos de ligações glicosídicas, as variações no padrão de ramificação e a presença de substituintes (Bacic; Harris; Stone, 1988).

Figura 7 - Esquema ilustrativo da diversidade estrutural dos polissacarídeos, resultante das diferentes combinações entre resíduos glicosídicos, ligações, configurações e substituintes.



Fonte: Adaptado de glygen.ccruc.uga.edu/ccrc/mao/intro/outline.html.

Considerando o potencial da biomassa vegetal para a consolidação de uma bioeconomia baseada em fontes renováveis, a identificação da estrutura dos polissacarídeos contribui para o desenvolvimento de estratégias capazes de melhorar a digestibilidade da biomassa, bem como sua suscetibilidade a processos de conversão em bioprodutos (Rußler *et al.*, 2013).

Devido à complexidade desses polissacarídeos formadores da parede celular vegetal, elucidar a estrutura destes se torna um desafio em que a caracterização completa requer diferentes métodos analíticos usados de forma complementar. Atualmente há uma variedade de métodos para caracterizar polissacarídeos da parede celular vegetal (Miguez *et al.*, 2023). As técnicas envolvem a identificação da composição de açúcar total além de métodos avançados para caracterização da estrutura. A metodologia escolhida dependerá do propósito da análise e da natureza da amostra.

2.5.1 Preparo da amostra

Os polissacarídeos da parede celular vegetal estão organizados em uma matriz complexa, cuja heterogeneidade impõe desafios à sua caracterização. Nesse cenário, a avaliação dos carboidratos estruturais em condições que favoreçam sua análise isolada

contribui para uma interpretação mais precisa dos resultados de composição e estrutura dos polissacarídeos. Quando o objetivo é avaliar um polissacarídeo específico, torna-se necessário promover seu isolamento, a fim de eliminar ou minimizar ao máximo a presença de interferentes que possam comprometer a determinação de sua estrutura real. Entre esses interferentes destacam-se açúcares livres, oligossacarídeos e outros polissacarídeos coexistentes na parede celular vegetal (Hickey *et al.*, 2021).

De acordo com o grau de detalhamento requerido para a caracterização dos polissacarídeos, determinadas metodologias analíticas exigem o fracionamento prévio dos componentes da parede celular vegetal. O amido e a celulose ilustram essa condição, em que embora ambos sejam constituídos por glicose, se diferenciam pelo padrão das ligações glicosídicas (Mischnick; Momcilovic, 2010).

Desse modo, o preparo da amostra pode requerer etapas sequenciais de extração organizadas de modo a favorecer uma separação progressiva dos diferentes componentes da matriz vegetal (Pattathil *et al.*, 2012). Em geral, cada etapa é planejada para solubilizar classes específicas de polímeros, iniciando-se por condições mais brandas, capazes de remover componentes fracamente associados, e avançando para tratamentos progressivamente mais severos, necessários para romper interações mais fortes e liberar os polímeros mais intimamente integrados à matriz.

As metodologias aplicadas nesse processo não são universais, e a seleção das estratégias de extração deve considerar tanto o material vegetal de origem quanto o tipo de polissacarídeo. A seleção das técnicas de extração exige uma abordagem criteriosa, uma vez que condições inadequadas podem promover alterações estruturais comprometendo a representatividade do material isolado e influenciando as interpretações analíticas subsequentes (Fangel *et al.*, 2021).

A moagem da amostra é uma etapa essencial do preparo do material vegetal, promovendo a redução da granulometria e maior uniformidade da biomassa. Dependendo das características da biomassa, procedimentos adicionais, como secagem ou liofilização, podem ser aplicados para remover a umidade e minimizar a aglomeração de partículas. Ademais, o congelamento com nitrogênio líquido pode ser adotado como estratégia para inativar enzimas endógenas, prevenindo modificações estruturais que poderiam comprometer a integridade dos polissacarídeos (Raessler, 2011).

Com a moagem da biomassa vegetal, a amostra pode ser submetida ao fracionamento de seus constituintes por meio de extrações sequenciais com solventes (Pattathil *et al.*, 2012). Frequentemente, o primeiro passo envolve uma extração sólido-líquido alcoólica com a

obtenção de um resíduo insolúvel em álcool (AIR) (Stevens; Selvendran, 1980). Essa etapa favorece a extração de componentes não estruturais da parede celular, como sais inorgânicos, metabólitos de baixo peso molecular, açúcares livres, lipídios, clorofila, além de contribuir também para a inativação de enzimas endógenas (Pettolino *et al.*, 2012). Metanol, etanol e isopropanol estão entre os solventes mais empregados (Sanz; Martínez-Castro, 2007).

A extração alcoólica pode ser associada a solventes orgânicos, como o clorofórmio, para ampliar a eficiência da extração de compostos hidrofóbicos. Contudo, em biomassas com elevado teor lipídico, pode ser necessária uma etapa complementar empregando solventes orgânicos adequados, como o éter de petróleo. Para garantir a remoção de proteínas, uma mistura de clorofórmio e butanol pode ser utilizada para promover a desnaturação proteica (Yang *et al.*, 2021).

A remoção do amido pode ser realizada com o uso de dimetilsulfóxido (DMSO), no entanto, esse solvente pode promover a solubilização não seletiva de outros componentes da parede celular. Como alternativa mais específica, abordagens enzimáticas baseadas na ação de α -amilases e amiloglicosidases podem ser adotadas. Nesses casos, recomenda-se o uso de coquetéis enzimáticos puros e livres de atividades secundárias que possam hidrolisar polissacarídeos estruturais (Pettolino *et al.*, 2012).

Para a remoção de pectinas, são frequentemente empregados agentes quelantes capazes de romper as pontes iônicas mediadas por cálcio presentes na estrutura do polissacarídeo. Entre os reagentes mais utilizados destacam-se o oxalato de amônio, o carbonato de sódio diluído, o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e o ácido 1,2-ciclohexilenodinitrilotetraacético (CDTA). Tanto o EDTA quanto o CDTA, contudo, podem ser de difícil separação da fração péctica (Barnes *et al.*, 2021).

O tratamento subsequente com soluções alcalinas aquosas, como NaOH ou KOH pode ser utilizado para a extração de hemiceluloses. Cabe destacar que, em meio alcalino, as extremidades redutoras dos polissacarídeos ficam suscetíveis a reações de degradação, podendo causar a redução do grau de polimerização. Para minimizar essas reações, sais de borohidreto de sódio (NaBH_4) são adicionados às soluções alcalinas, promovendo a estabilização das unidades terminais por redução química (Abdel-Akher; Hamilton; Smith, 1951).

Na etapa subsequente, a lignina pode ser removida por meio de tratamento com clorito de sódio. O resíduo sólido obtido pode ser submetido a uma extração alcalina pós-clorito, a fim de extrair frações de hemiceluloses que tenham permanecido no material em decorrência de associações com a lignina (Siqueira *et al.*, 2013). Ao final de todas as etapas de extração, a

fração sólida recuperada tende a ser enriquecida em polissacarídeos insolúveis aos solventes empregados, que é o caso da celulose e das mananas lineares.

Todas as frações enriquecidas nos diferentes polissacarídeos podem ser posteriormente dialisadas e liofilizadas para a análise composicional e estrutural seguinte (Pettolino *et al.*, 2012).

2.5.2 Caracterização da composição de resíduos glicosil de polissacarídeos da parede celular vegetal

A compreensão dos polissacarídeos envolve diferentes níveis estruturais, sendo sua composição monomérica a base para o entendimento desses biopolímeros, uma vez que os monossacarídeos constituem as unidades fundamentais responsáveis pela formação das cadeias poliméricas (Lesco; Williams; Laurens, 2025). A caracterização dos resíduos de açúcar pode ser conduzida por diversas abordagens analíticas, contudo, uma vez que essas técnicas detectam açúcares livres, a quantificação dos resíduos requer uma etapa prévia de hidrólise, fundamental para a despolimerização total ou parcial do polissacarídeo. Conseqüentemente, a precisão na quantificação dos monossacarídeos depende diretamente da eficiência do método de despolimerização, bem como da estabilidade desses compostos após a hidrólise (Liu *et al.*, 2021).

A hidrólise ácida total utiliza, principalmente, ácido trifluoroacético (TFA) facilidade de remoção por evaporação, entretanto, o ácido não é capaz de despolimerizar polissacarídeos cristalinos, como a celulose (Albersheim *et al.*, 1967)., Como alternativa são utilizados ácidos minerais ácido sulfúrico (H₂SO₄) ou ácido clorídrico (HCl), os quais podem ser removidos por precipitação com hidróxido de bário ou neutralização com N,N-dioctilamina em clorofórmio (Saeman *et al.*, 1954; Sluiter *et al.*, 2010). A hidrólise é conduzida sob condições controladas de concentração, tempo e temperatura, a fim de minimizar a degradação dos açúcares. Além disso, o tipo de ácido empregado pode influenciar a forma estrutural detectada, afetando o equilíbrio entre as configurações cíclica (piranose) e linear (Kang *et al.*, 2012).

A análise quantitativa desses açúcares derivados da hidrólise de polissacarídeos da parede celular vegetal pode ser realizada por diversos métodos analíticos clássicos, sendo a cromatografia uma das mais amplamente empregadas (Liu *et al.*, 2021). Nessa técnica, a separação ocorre em função das diferentes velocidades de migração dos analitos, determinadas pelas interações físico-químicas estabelecidas com a fase estacionária. À

medida que os analitos eluem com a fase móvel, eles são conduzidos a um detector, onde são convertidos em um sinal analítico proporcional à sua concentração (Michalski; Kończyk, 2024). Com base nesses princípios fundamentais, diversas modalidades cromatográficas foram desenvolvidas, variando principalmente quanto à natureza das fases utilizadas e ao mecanismo de separação envolvido.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consolidou-se como uma das principais técnicas para a análise de carboidratos, podendo ser associada a diferentes sistemas de detecção (Yan, 2014). Entre esses, o detector de índice de refração (RID) funciona comparando o índice de refração do analito com o da fase móvel. Quando há diferença entre eles, ocorre o desvio do feixe de luz na célula de detecção, o que resulta na geração de um sinal elétrico proporcional à concentração da amostra (Jalaludin; Kim, 2021). A configuração CLAE-RID é amplamente reconhecida como uma abordagem universal para a análise de açúcares, destacando-se pela simplicidade do preparo da amostra e por sua ampla adoção em protocolos padronizados pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL) para a quantificação de monossacarídeos neutros em biomassas lignocelulósicas (Sluiter *et al.*, 2012).

A CLAE-RID constitui um método adequado para a quantificação de monossacarídeos neutros, como glicose, xilose, galactose, manose e arabinose. No entanto, a baixa seletividade e sensibilidade do detector de índice de refração podem comprometer a detecção de compostos presentes em baixas concentrações (Jung; Ha; Yang, 2022). Além disso, o desempenho do RID é influenciado por variações de temperatura, composição e fluxo da fase móvel, fatores que podem provocar instabilidades na linha de base durante a análise. Em decorrência dessas limitações, o sistema de eluição é geralmente restrito a condições isocráticas (Dolan, 2012). Cabe ressaltar que, a avaliação de pectinas e certas hemiceluloses é limitada, uma vez que a metodologia não permite a detecção eficiente de açúcares desoxi, como ramnose e fucose, nem de açúcares ácidos, como os ácidos glucurônico e galacturônico (Sluiter *et al.*, 2010).

Dessa forma, embora a CLAE-RID seja amplamente empregada na quantificação de açúcares neutros, suas limitações analíticas e instrumentais abrem espaço para o uso de detectores baseados na absorção de luz ultravioleta e visível (UV-Vis). Nesse tipo de detecção, os analitos são expostos à radiação em comprimentos de onda geralmente entre 190 e 800 nm. Quando o composto possui grupos capazes de absorver essa radiação, ocorre uma redução na intensidade da luz transmitida, a qual é medida pelo detector. Essa variação de

absorbância é então correlacionada à concentração do analito (Jalaludin; Kim, 2021; Yan, 2014).

Entretanto, a ausência de cromóforos naturais nos carboidratos exige a derivatização prévia das amostras para permitir sua detecção (Jalaludin; Kim, 2021; Yan, 2014). Estratégias de derivatização incluem abordagens pré-coluna, como a reação com 3-metil-1-fenil-2-pirazolina-5-ona (PMP) ou a aminação redutiva com 2-aminobenzamida e 3-amino-9-etilcarbazol, bem como métodos pós-coluna, com o uso do reagente Cu(II)-neocuproína (Honda *et al.*, 1989).

A fim de contornar algumas das limitações associadas à CLAE, a cromatografia gasosa (CG) se destaca como uma alternativa com elevada sensibilidade e resolução para a análise de monossacarídeos. A CG promove a separação de compostos voláteis com base em suas interações diferenciadas com uma fase estacionária, enquanto são transportados por uma fase móvel gasosa (Albersheim *et al.*, 1967). A eficiência da separação é determinada por propriedades físico-químicas como volatilidade, polaridade, massa molecular e afinidade química. Em geral, a fase móvel consiste em um gás inerte, como hélio, hidrogênio ou nitrogênio. A CG é compatível com os detectores de ionização de chama (FID) e espectrometria de massa (MS) além de outros (Walford, 2010).

Contudo, os carboidratos não apresentam volatilidade nem estabilidade térmica suficientes para análise direta por cromatografia gasosa, por isso é necessário a derivatização prévia dos açúcares para formas voláteis. Entre as estratégias mais empregadas o método de aditol acetato (AA) é um dos mais utilizados para a análise da composição de açúcares em amostras de parede celular vegetal (ASTM, 2007).

No método AA, os monossacarídeos são convertidos em derivados de acetatos de alditol por reações sequenciais que compreendem a redução dos grupos carbonila com NaBH₄ ou NaBD₄, seguida da acetilação das hidroxilas com anidrido acético na presença de catalisadores, como acetato de sódio, piridina ou metilimidazol (Pettolino *et al.*, 2012). Diversas abordagens de acetilação têm sido descritas na literatura como variações do método AA original, frequentemente adaptadas às características da matriz e aos objetivos analíticos. Independentemente da variação metodológica empregada, é fundamental garantir a completa remoção dos resíduos ácidos provenientes da etapa de hidrólise durante o preparo da amostra, e a remoção completa do boro residual da etapa de redução, a fim de evitar interferências nas respectivas reações subsequentes (Albersheim *et al.*, 1967; Blakeney *et al.*, 1983; Jones; Albersheim, 1972).

Tais procedimentos de derivatização são, entretanto, laboriosos, exigindo múltiplas etapas e longos tempos de preparo, o que pode aumentar a suscetibilidade a erros experimentais. Como consequência, o método pode apresentar limitações quanto à sua aplicabilidade em análises de rotina (Ruiz-Matute *et al.*, 2011). Cabe destacar que, assim como a metodologia CLAE-RID o método clássico de AA é inadequado para a caracterização de polissacarídeos estruturais que contêm açúcares ácidos, como pectinas e glucuronoxilanas (Biswal *et al.*, 2017).

Nesse cenário, a cromatografia por troca aniônica de alto desempenho acoplada à detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) surge como uma abordagem capaz de oferecer elevada sensibilidade para análise direta de carboidratos, eliminando a necessidade de derivatização. Em condições fortemente alcalinas ($\text{pH} > 12$), os carboidratos tendem a se ionizar devido à desprotonação de seus grupos hidroxila, adquirindo caráter aniônico. Essa propriedade permite sua separação em colunas contendo resinas funcionalizadas com grupos quaternários de amônio como fase estacionária. A fase móvel é composta por soluções aquosas de hidróxidos (OH^-), principalmente hidróxido de sódio ou potássio, cujos íons hidróxido desempenham dupla função: promovem a ionização dos carboidratos e atuam como eluentes, modulando a intensidade das interações eletrostáticas com a fase estacionária (Hardy; Cornell, 2003; Polta; Johnson, 1986).

Em muitos casos, a separação pode ser realizada sob condições de eluição isocrática. No entanto, carboidratos com maior afinidade pela fase estacionária podem exigir a aplicação de gradientes de eluição. Nesses casos, frequentemente é adicionado acetato de sódio (NaOAc) ao eluente. O acetato atua como um íon competidor mais fortemente retido, promovendo a eluição de analitos fortemente ligados e permitindo a separação simultânea de açúcares neutros e ácidos com elevada seletividade e sensibilidade (Anders *et al.*, 2015; Little *et al.*, 2019).

A detecção dos carboidratos eluídos por detecção amperométrica pulsada (PAD) se baseia na oxidação eletroquímica dos analitos em um eletrodo, geralmente de ouro. A aplicação cíclica de potenciais de oxidação e limpeza permite a regeneração contínua da superfície do eletrodo, garantindo uma detecção estável, sensível e reprodutível (Polta & Johnson, 1986). Frente a instabilidade do método CLAE-RID, a HPAEC-PAD tolera variações na força iônica e no pH da fase móvel, ainda que, em alguns casos, possa ser necessária uma etapa prévia de dessalinização para evitar perturbações na linha de base (Quéméner *et al.*, 2007). Ainda assim, comparações entre métodos cromatográficos indicam

que a HPAEC-PAD oferece elevada resolução e um ganho em sensibilidade para a análise de carboidratos estruturais, especialmente quando adequadamente otimizada.

2.5.3 Caracterização estrutural de polissacarídeos da parede celular vegetal

A elucidação da estrutura dos polissacarídeos promove a identificação da sequência dos resíduos de açúcar e as ligações glicosídicas que os conectam. Entre as técnicas analíticas disponíveis, a ressonância magnética nuclear (RMN) destaca-se como uma das ferramentas mais robustas utilizadas para a caracterização estrutural desses polímeros, possibilitando a obtenção de informações detalhadas sobre composição monossacarídica, configurações anoméricas (α ou β), padrões de ligação e características conformacionais (Yao *et al.*, 2021).

A técnica se baseia no comportamento de núcleos atômicos que possuem momento angular de spin. Os núcleos com spin diferente de zero ($I \neq 0$) apresentam momento magnético. Quando submetidos a um campo magnético externo (B_0), os momentos magnéticos desses núcleos se alinham e passam a precessar em torno da direção de B_0 com uma frequência característica, conhecida como frequência de Larmor. A aplicação de radiação de radiofrequência com frequência igual à frequência de Larmor promove a absorção de energia pelo núcleo, induzindo a transição entre níveis de energia, fenômeno conhecido como ressonância (Duus; Gotfredsen; Bock, 2000; Koshani; Jafari; Van de Ven, 2020)

Após a interrupção do pulso de radiofrequência, os spins nucleares excitados relaxam em direção ao estado de menor energia por meio dos mecanismos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2). Nesse processo, a magnetização transversal induz uma corrente elétrica na bobina receptora, originando um sinal no domínio do tempo denominado *free induction decay* (FID). A aplicação da transformada de Fourier permite converter esse sinal em um espectro no domínio da frequência. Por fim, os sinais observados no espectro são expressos como deslocamento químico (δ , ppm) e refletem o ambiente eletrônico local dos núcleos, fornecendo informações essenciais para a interpretação estrutural (Keeler, 2006).

A predominância de carbono e hidrogênio nos polissacarídeos torna os núcleos ^1H e ^{13}C os principais alvos na caracterização estrutural por RMN (Yao *et al.*, 2021). Em experimentos unidimensionais (1D), é possível identificar a configuração (α ou β) do hidrogênio e do carbono anomérico das unidades monossacarídicas (Agrawal, 1992; Cui, 2005). O carbono anomérico estabelece ligações com dois átomos de oxigênio, um pertencente ao anel e outro do grupo hidroxila ou à ligação glicosídica. Devido à elevada

eletronegatividade desses átomos, ocorre um deslocamento da densidade eletrônica em direção aos oxigênios, reduzindo a blindagem ao redor do núcleo de carbono. Como consequência, esse núcleo torna-se mais suscetível a B_0 , resultando em sinais mais deslocados quando comparados aos demais carbonos do anel (Yang *et al.*, 2015).

Os espectros de RMN de ^1H apresentam limitações decorrentes da sobreposição de sinais, enquanto os espectros de ^{13}C exibem menor sensibilidade em razão da baixa abundância natural desse isótopo. Para complementar as informações obtidas, a ressonância magnética nuclear bidimensional (RMN 2D) permite estabelecer correlações entre diferentes núcleos da molécula, fornecendo dados estruturais adicionais (Yao *et al.*, 2021).

Para análise de RMN em solução, a amostra deve apresentar o menor teor possível de água residual, a fim de evitar a sobreposição do sinal de ^1H da água com os sinais do analito. Para minimizar esse efeito, a água é geralmente substituída por um solvente deuterado, cujos prótons não interferem significativamente nas condições experimentais. Entre os solventes mais empregados na análise de carboidratos destacam-se o óxido de deutério (D_2O) e o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) (Tang *et al.*, 2022).

O sinal residual do solvente pode ser suprimido por diferentes estratégias. Entre as técnicas mais utilizadas estão a pré-saturação (PRESAT), métodos baseados em gradientes (WATERGATE) e abordagens que exploram diferenças nos tempos de relaxação, como a sequência CPMG. A escolha do método de supressão irá depender da natureza da amostra, do solvente empregado e da proximidade entre os sinais do analito e o pico do solvente (Maiwald *et al.*, 2008).

Outra possibilidade para melhorar a razão sinal-ruído seria com o aumento da concentração da amostra, o que também tende a reduzir o tempo necessário para a aquisição dos dados. Contudo, concentrações elevadas podem aumentar a viscosidade da solução, dificultando sua homogeneização e comprometendo a qualidade espectral (Yin *et al.*, 2012).

Além disso, amostras heterogêneas e de alto peso molecular apresentam menor mobilidade molecular, favorecendo tempos de relaxação transversal (T_2) mais curtos e resultando em alargamento dos sinais, com consequente perda de sensibilidade. A hidrólise pode ser empregada como estratégia para minimizar problemas associados à presença de macromoléculas, uma vez que promove a redução do tamanho das cadeias e melhora a resolução espectral. Entretanto, esse procedimento pode aumentar a complexidade do espectro devido à maior diversidade de resíduos gerados e à possível sobreposição de deslocamentos químicos (Speciale *et al.*, 2022).

A caracterização de polissacarídeos insolúveis em D₂O, como a celulose, por RMN em solução é frequentemente limitada pela dificuldade de solubilização dessas macromoléculas. Como alternativa, a RMN de estado sólido (ssRMN) possibilita a investigação estrutural da celulose em sua forma intacta, fornecendo informações sobre sua organização molecular, o grau de ordem estrutural e aspectos de sua ultraestrutura (Pu; Hallac; Ragauskas, 2013). Da mesma forma, a ssRMN de ¹³C de estado sólido pode ser aplicada para avaliar paredes celulares intactas com mínima perturbação do estado físico e das interações moleculares dos polissacarídeos (Dick-Pérez *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2019).

Outra estratégia para a avaliação da parede celular com mínima perturbação estrutural consiste no uso de abordagens emergentes baseadas em sondas moleculares, que permite a avaliação semiquantitativa de epítomos de glicanos da parede celular em extratos sequenciais, fornecendo informações não apenas sobre a composição de polissacarídeos, mas também sobre sua integração na matriz da parede celular. Essas ferramentas permitem monitorar a presença e os padrões espaciais de distribuição dos principais glicanos por meio do perfil glicômico e também por análises *in situ*, imunolocalização, nas quais a integridade do tecido é mantida (Moller *et al.*, 2007).

Nessas abordagens anticorpos monoclonais (mAbs) são a sonda mais comumente utilizada, devido à alta sensibilidade de ligação a epítomos específicos. A disponibilidade de anticorpos pode limitar seu uso, contudo, atualmente estão disponíveis coleções de mais de 200 mAbs para ligação aos principais componentes da parede celular vegetal (Moller *et al.*, 2012). Além de mAbs, os CBMs são elementos de reconhecimento de enzimas ativas em carboidratos usados para ligar diversos polissacarídeos da parede celular vegetal (Duffieux *et al.*, 2020). Apesar de sua eficácia, os CBMs têm limitações em especificidade e sensibilidade, já que algumas famílias podem se ligar a várias estruturas (Duffieux *et al.*, 2020; Knox, 2008; Pattathil *et al.*, 2015).

Para a determinação do perfil glicômico, diferentes metodologias podem ser empregadas. Entre elas, destacam-se os ensaios do tipo ELISA, nos quais sondas moleculares, como anticorpos monoclonais ou módulos de ligação a carboidratos, ligam-se seletivamente aos epítomos presentes na amostra, permitindo sua detecção por meio de leitura óptica (Avci; Pattathil; Hahn, 2012). Uma alternativa de maior rendimento analítico é a técnica *Comprehensive Microarray Polymer Profiling* (CoMPP), em que há a produção automatizada de múltiplas matrizes de glicanos, com elevada reprodutibilidade e mínimo desperdício de amostras. A intensidade dos sinais obtidos reflete a abundância relativa dos epítomos

reconhecidos, possibilitando a comparação do perfil glicômico entre diferentes amostras (Pattathil *et al.*, 2012).

Os mesmos anticorpos podem ser utilizados na imunolocalização dos polissacarídeos diretamente no tecido vegetal. Na análise *in situ*, a escolha adequada da sonda molecular é um fator determinante para a obtenção de resultados confiáveis. A triagem prévia com os ensaios de perfil glicômico garante a identificação das sondas com maior especificidade, favorecendo uma caracterização mais precisa dos polissacarídeos (Pattathil *et al.*, 2015)..

Uma limitação importante dessas abordagens decorre do fato de que a ausência de ligação das sondas não implica, necessariamente, a ausência do glicano na amostra. Tal condição pode resultar da inacessibilidade do epítipo, frequentemente determinada pela organização estrutural da parede celular, ou ainda de modificações químicas introduzidas durante o preparo do material, que podem comprometer o reconhecimento molecular (Avci; Pattathil; Hahn, 2012). Apesar dessas limitações, a imunocitoquímica continua sendo uma ferramenta valiosa para entender rapidamente a estrutura específica dos polissacarídeos nas arquiteturas das paredes celulares vegetais com modificações mínimas no carboidrato analisado *in situ*.

2.5.4 Metodologias complementares para análise de polissacarídeos estruturais

Alguns parâmetros dos polissacarídeos, como forma, tamanho e cristalinidade, influenciam as propriedades mecânicas da parede celular. A difração de raios X (DRX) constitui uma das principais ferramentas para a investigação da organização estrutural dos polissacarídeos da parede celular vegetal, possibilitando a caracterização do grau de cristalinidade, da rede cristalina e do arranjo das microfibrilas (Rongpipi *et al.*, 2019). Seu princípio fundamenta-se na difração de um feixe monocromático de raios X pelos planos cristalinos formados pelo empacotamento ordenado do cristal de polissacarídeo. Quando a condição da lei de Bragg é satisfeita, a interferência construtiva dos raios espalhados origina picos característicos no difratograma, associados às regiões mais organizadas do material (Bunaciu; Udriștioiu; Aboul-Enein, 2015). Assim, a análise da posição e da intensidade dos picos permite inferir o grau de ordem estrutural e compreender aspectos do arranjo supramolecular da parede celular.

O caráter não destrutivo da análise, aliado ao preparo relativamente simples e ao rápido tempo de aquisição, consolida a DRX como uma técnica amplamente empregada na caracterização de biomassas. Entretanto, como a técnica fornece predominantemente

informações sobre regiões cristalinas, sua interpretação é frequentemente complementada por outros métodos analíticos (Brügemann; Gerndt, 2004; Bunaciu; Udriștioiu; Aboul-Enein, 2015).

A análise termogravimétrica (TGA), por sua vez, é uma metodologia amplamente empregada para avaliar as propriedades físico-químicas de polissacarídeos da parede celular vegetal, especialmente no que se refere à estabilidade térmica e ao comportamento de degradação. Nessa técnica o monitoramento da variação de massa da amostra em função da temperatura, sob atmosfera controlada, permite identificar eventos térmicos associados a transformações estruturais do material (Bothara; Singh, 2012).

De modo geral, os polissacarídeos apresentam perfis termogravimétricos característicos, frequentemente compostos por pelo menos duas etapas principais: uma perda inicial de massa em baixas temperaturas, relacionada à evaporação da água adsorvida, seguida por uma etapa predominante de decomposição térmica, associada à despolimerização das cadeias e à ruptura das ligações glicosídicas (Iqbal *et al.*, 2013). Parâmetros como a temperatura de início da degradação e a temperatura de máxima taxa de decomposição fornecem informações sobre a estabilidade térmica do material. Diferenças no grau de polimerização, na organização molecular e nas interações intermoleculares podem refletir em variações no comportamento térmico.

Diante da ampla gama de ferramentas analíticas apresentadas, a escolha da técnica deve ser orientada não apenas pela infraestrutura laboratorial, mas principalmente pelas características estruturais e pelas propriedades intrínsecas da biomassa avaliada. A caracterização precisa da composição dos resíduos glicosídicos, aliada à elucidação estrutural e à investigação das propriedades físico-químicas dos polissacarídeos, fornecerão subsídios para compreender a organização desses materiais e suas implicações funcionais. Esse entendimento possibilita direcionar de maneira mais estratégica o aproveitamento dos polissacarídeos, identificando aplicações compatíveis com as particularidades de cada biomassa (Voiniciuc, 2022).

Dado que as informações disponíveis na literatura até o momento carecem de relatos sobre o arranjo dos resíduos de glicosil em manana de sementes de açaí, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a estrutura da manana presente no endosperma dessas sementes. Com isso, buscou-se entender como superar a recalcitrância desse resíduo agroindustrial, promovendo o desenvolvimento de uma economia circular baseada no reaproveitamento dos resíduos do açaí (Barbosa; Carvalho Junior, 2022).

3 JUSTIFICATIVA

O grande volume de sementes de açaí gerado pela indústria de beneficiamento representa um desafio ambiental. No entanto, a alta concentração de manose nessas sementes as torna uma matéria-prima valiosa para diversos setores. A utilização da manose e MOS produzidos a partir das sementes pode agregar valor à cadeia produtiva do açaí e minimizar os impactos ambientais causados pelo descarte inadequado desse resíduo (Jorge; Da Silva; Brigagão, 2024).

MOS têm despertado interesse crescente em função de seu potencial prebiótico, sendo associados ao estímulo seletivo de microrganismos benéficos da microbiota intestinal (Rana *et al.*, 2023). Da mesma forma, a manose apresenta relevância comercial, sendo empregada como suplemento dietético funcional, nutracêutico e prebiótico (Hu *et al.*, 2016; Wu; Zhang; Mu, 2019). Esse açúcar é extensamente empregado no tratamento de infecções do trato urinário, pois as bactérias, *E. coli*, causadoras de infecções se ligam preferencialmente a manose em relação às células uroteliais do sistema urinário, e assim são eliminadas na urina (Scaglione; Musazzi; Minghetti, 2021).

Além dessas aplicações, a literatura reporta que a manose também pode ser utilizada como molécula-plataforma para a produção de bioprodutos. O açúcar pode ser uma fonte alternativa para produção de D-manitol, um importante composto amplamente utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica (Makkee; Kieboom; Bekkum, 1985). Estudos reportam que a manose também pode ser utilizada para a produção de etanol combustível, o que poderia contribuir para a descentralização da produção de energia no país e para o fortalecimento da autossuficiência energética em nível local (Yamabhai *et al.*, 2016).

A análise de comércio indica que o mercado de manose pode chegar a US\$ 1 bilhão até o final de 2025. O mercado global tende a expandir, com destaque para grandes empresas americanas e pequenos players, principalmente em segmentos de aditivos alimentares (www.transparencymarketresearch.com). Atualmente, a manose é obtida principalmente por meio da hidrólise ácida, térmica e enzimática de fontes como madeira, frutas e ervas, o que ressalta a escassez de matérias-primas ricas em manose disponíveis em grandes volumes para processamento industrial (Hu *et al.*, 2016). Diante desse cenário, surge uma oportunidade para o desenvolvimento de um processo pioneiro de produção de manose a partir da semente de açaí no Brasil.

O reaproveitamento de sementes contribui para a consolidação de uma biorrefinaria de açaí. A implementação de uma biorrefinaria pode reduzir a quantidade de resíduos gerados, ao

transformar esse resíduo em matéria-prima para a produção de bioprodutos de alto valor agregado. Assim, biorrefinarias podem contribuir significativamente para atingir alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS).

Os ODS visam promover um desenvolvimento sustentável, equilibrando aspectos econômicos, sociais e ambientais até 2030. O uso das sementes de açaí desempenha um papel crucial na promoção de práticas sustentáveis, ao otimizar o uso da biomassa, diminuir resíduos e gerar biobrodutos. Alinhando-se às metas de promover o crescimento econômico sustentável (ODS 8) e a industrialização sustentável (ODS 9), por exemplo (Ubando; Felix; Chen, 2020).

Cabe ressaltar que, o processo contribuirá ainda para gestão urbana e para a construção de uma bioeconomia circular, assim como ajudará a reduzir esse passivo orgânico na região amazônica. O uso das sementes de açaí considera os aspectos da cadeia produtiva no contexto local em que esse resíduo está sendo gerado. Desse modo, a exploração comercial sustentável das sementes também proporcionará a possibilidade de ascensão econômica e desenvolvimento social local.

Para isso, é fundamental desenvolver políticas públicas que alinhem as operações da biorrefinaria com os objetivos mais amplos do desenvolvimento sustentável. No entanto, o cenário atual ainda carece de políticas de apoio a logística reversa de sementes de açaí, o que dificulta o avanço de uma bioeconomia sustentável. Políticas eficazes são necessárias para incentivar práticas sustentáveis, e apoiar a pesquisa e desenvolvimento de produtos à base de sementes de açaí (Clement *et al.*, 2024).

Almejando uma aplicação industrial às sementes de açaí, é fundamental procurar alternativas que garantam o alto rendimento de conversão de manana das sementes de açaí a manose e manano-oligossacarídeos com processos viáveis de custos reduzidos. Desse modo, a presente proposta foi estruturada com o objetivo de atender a necessidade do avanço no conhecimento científico sobre o aproveitamento e valoração do resíduo do processamento açaí, uma biomassa da região amazônica ainda pouco explorada. Determinar a estrutura da manana contida na semente de açaí será uma forma de contribuir para direcionar o aproveitamento e valoração das sementes de açaí por um processo mais eficiente.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a estrutura do polissacarídeo de manana contido em sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) de modo a ajudar a identificar possíveis fatores estruturais que contribuam para a recalcitrância das sementes à conversão de manana a manose.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de uma metodologia adequada para o fracionamento dos polissacarídeos do endosperma de sementes de açaí e isolamento da fração de manana insolúvel em água;

- Identificar a composição e estrutura da manana isolada do endosperma de sementes de açaí por diferentes metodologias analíticas complementares, tais como: RMN em solução, RMN de sólidos, difração de raio-X, cromatografia líquida (HPAEC-PAD), cromatografia gasosa, e análise termogravimétrica;

- Traçar o perfil glicômico do endosperma de sementes de açaí utilizando como método analítico o perfil glicômico (*Comprehensive Microarray Polymer Profiling* (CoMPP));

- Avaliar a estrutura da parede celular das sementes de açaí maduras por imunolocalização utilizando anticorpos monoclonais para reconhecimento de epítomos de mananas;

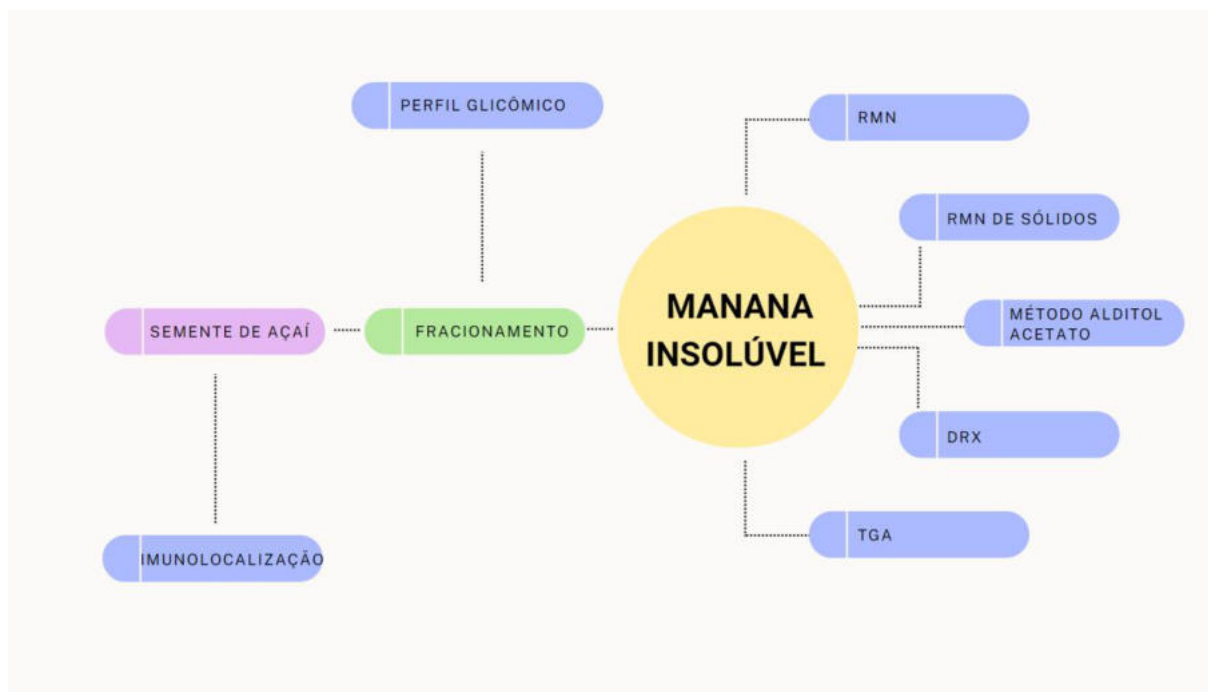
- Monitorar alterações da estrutura da manana da semente de açaí em diferentes estágios de desenvolvimento do fruto utilizando anticorpos monoclonais pré-selecionados pela metodologia CoMPP;

- Identificar fatores estruturais na parede celular vegetal que influenciam na recalcitrância do material à degradação por mananases.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a elucidação completa e robusta da manana de sementes de açaí, em trabalho de elucidação inédito, o polissacarídeo foi avaliado por diferentes metodologias complementares para caracterização *in situ* e também *in vitro* de frações do material vegetal (Figura 8).

Figura 8 - Análises complementares realizadas para caracterização estrutural da manana presente no endosperma de sementes de açaí.



* RMN: ressonância magnética nuclear; DRX: difração de raio-X; TGA: análise termogravimétrica.

Fonte: Elaboração própria.

5.1 FONTE DE MATERIAIS

Para isolar os polissacarídeos da sementes de açaí borohidreto de sódio (NaBH_4 – 452882), clorito de sódio (NaClO_2 – 71388), timerosal ($2\text{-(C}_2\text{H}_5\text{HgS)C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{Na}$ – T5125), ureia ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – U5128), e Pur-A-Lyzer™ Maxi Dialysis KitMWCO 3,5 kDa (PURX35015) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As enzimas α -amilase E-BLAAM (*B. licheniformis*) e amiloglicosidase E-AMGDF (*A. niger*) foram adquiridas da Megazyme (Megazyme Ltd. Wicklow, Irlanda). Todos os outros reagentes foram adquiridos de fontes comerciais em grau reagente.

Para realizar essas análises de RMN em solução foram adquiridos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) água deuterada (HOD 99,9% D – 151882), dimetilsulfóxido- d_6

(DMSO-d₆) ((CD₃)₂SO – 296147), piridina-d₅ (C₅D₅N – 532975), ureia ((NH₂)₂CO – U5128), padrão de celulose microcristalina (Avicel® pH 101 – 11365), e padrão de galactomanana de goma de alfarroba (LBG – G0753). O padrão de manana linear de marfim vegetal (P-MANIV) foi adquirido da Megazyme (Megazyme Ltd. Wicklow, Ireland).

Os anticorpos monoclonais e CBMs (séries CCRC, LM, JIM) foram gentilmente cedidos pelos professores Bodil Jongersen e Peter Ulksolv de estoques do Departamento de Planta, Universidade de Copenhague. Foram selecionadas 50 sondas imunológicas, dentre mAbs e CBMs, de acordo com o grupo de glicanos que seria de interesse mapear, dentre os quais: manana, glucana, celulose, heteroxilana, heteroglucana, xilana, pectina. As informações detalhadas sobre cada anticorpo estão descritas no banco de dados WallMabDB (<http://www.wallmabdb.net>).

5.2 ORIGEM DAS SEMENTES DE AÇAÍ

A atividade de pesquisa foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de acesso #AB49D01. As sementes de açaí maduras (*Euterpe oleracea* Mart.) foram cedidas por pequenos produtores agroextrativistas de polpa de açaí no estado do Amapá (Arquipélago de Bailique, foz do Rio Amazonas, Brasil – N 00°48.304' W 050°10.348') (Pinheiro, 2022). As sementes foram lavadas, tiveram a camada mesocárpica fibrosa removida e o tegumento externo foi raspado com auxílio de uma lâmina (Figura 9). As sementes de açaí, maduras e sem a camada fibrosa externa, foram moídas em moinho de facas WILEY MILL® e peneiradas a uma granulometria entre 180 µm e 840 µm.

Figura 9 - (a) Semente de açaí; (b) sementes após remoção da camada mesocárpica fibrosa externa; (c) sementes utilizadas nesse trabalho, sem as fibras e raspadas para remoção parcial do tegumento que a recobre.



Fonte: Acervo próprio.

As sementes em diferentes estágios de desenvolvimento foram gentilmente cedidas pelo professor Francisco A. P. Campos (Universidade Federal do Ceará), oriundas de sua propriedade particular no litoral do Ceará (Taíba, município de São Gonçalo do Amarante, Brasil – S 3°30'19.9" W 38°54'31.7"). Os frutos foram agrupados em uma escala de desenvolvimento conforme similaridades morfológicas em grupos de 0, correspondendo ao botão floral, a 11, o fruto maduro (Andrade *et al.*, 2020). Dentre esses estágios de desenvolvimento, foram pré-selecionados para o estudo quatro grupos que representam as principais etapas de desenvolvimento do fruto, e estes foram renomeados como estágios: 1 (primário), 2, 3 e 4 (semente madura) (Figura 10).

Figura 10 - Fruto de açaí em diferentes estágios de desenvolvimento. Na esquerda, estágio 4 (fruto maduro), estágio 3, 2, e a direita estágio 1.



Fonte: Acervo próprio.

5.3 CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DAS SEMENTES DE AÇAÍ

A metodologia analítica de caracterização foi adaptada de protocolos de referência mundial (*Laboratory Analytical Procedures*) padronizados pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos (NREL, *National Renewable Energy Laboratory*) (Sluiter *et al.*, 2010).

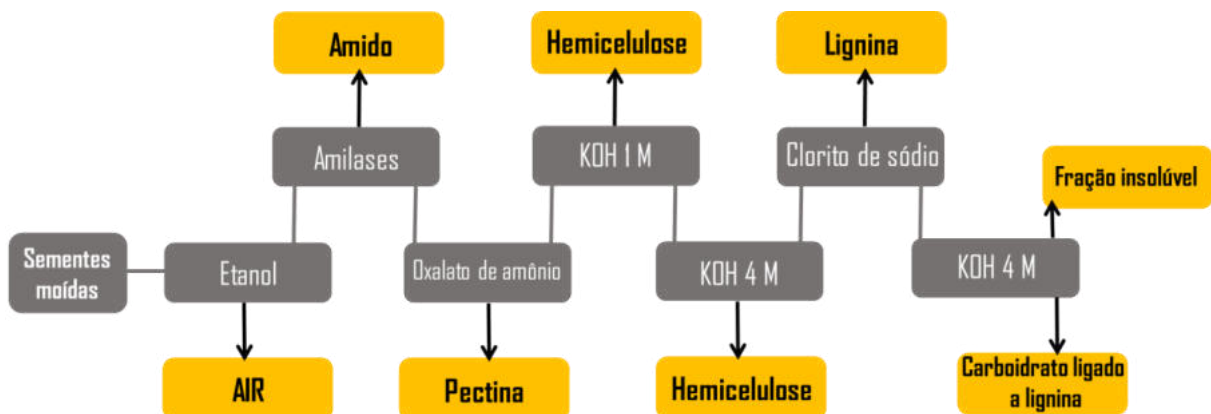
De início, 2 g (massa seca) de sementes moídas foram adicionadas em cartuchos de celulose para extração em Soxhlet com 190 mL de água, e em seguida com 190 mL de etanol 95%, sendo cada etapa de extração completando 6 sifonações. Parte das sementes foram secas a 105 °C por 18h para quantificar os extrativos por granulometria. A outra parte das sementes, livres de extrativos, foram submetidas a uma caracterização química após secagem a 40 °C. Para isso, 0,3 g das sementes, de umidade inferior a 10%, foram submetidas a um processo de hidrólise ácida em duas etapas (H₂SO₄ 72% m/m por 1 h a 30°C, e H₂SO₄ 4% m/m por 1 h a

121°C). O hidrolisado foi filtrado a vácuo em cadinhos Gooch de massa seca pré-estabelecida. Com os cadinhos contendo os sólidos remanescentes foi determinado por gravimetria o conteúdo de sólidos não hidrolisados em ácido. O hidrolisado líquido foi neutralizado com carbonato de cálcio (CaCO_3) para determinação do conteúdo de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Os açúcares foram quantificados por um sistema HPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração RI-101 (SHODEX, Japão). Para quantificação de açúcar foi utilizada uma coluna Aminex HPX-87P (300 × 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), com uma pré-coluna Carbo-P (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e uma sistema de remoção de cinzas em linha (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). A fase móvel correspondia a água ultrapura com vazão de 0,6 mL/min com temperatura de forno de 80 °C e temperatura do detector de 50 °C.

5.4 FRACIONAMENTO DAS SEMENTES DE AÇAÍ PARA ISOLAR FRAÇÕES ENRIQUECIDAS EM POLISSACARÍDEOS ESPECÍFICOS

Com base no protocolo descrito por Pattathil e colaboradores (2012), foi desenvolvida uma metodologia específica para isolar a fração de manana de sementes de açaí. Para isso, as sementes moídas foram adicionadas em etanol e o resíduo insolúvel em álcool (do inglês AIR, *alcohol insoluble residue*) foi submetido a extrações sequenciais com solventes cada vez mais severos para remover componentes específicos da parede celular, obtendo-se no final uma fração insolúvel (Figura 11). Os detalhes de cada procedimento estão descritos a seguir:

Figura 11 - Etapas do fracionamento das sementes de açaí in natura os componentes separados em cada uma das etapas: (a) sementes no início do processo; (b) AIR; (c) extrato em amilases; (d) extrato em oxalato de amônio; (e) extrato em KOH 1 M; (f) extrato em KOH 4 M; (g) extrato de clorito de sódio; (h) extrato de KOH 4M; (i) fração insolúvel recuperada ao final.



Para preparar o AIR, 400 mg de sementes moídas foram adicionadas a 40 mL de etanol 80% v/v e agitadas a 150 rpm por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi centrifugada e lavada com etanol 80%, para ser novamente adicionado etanol sob agitação por mais 1 h. Esse procedimento foi repetido por mais 3 vezes, para que ao final a amostra fosse filtrada a vácuo com filtros de fibra de vidro (GF/A) de massa seca conhecida, e o pellet fosse lavado com etanol absoluto. A massa recuperada foi adicionado 40 mL de uma mistura de clorofórmio e metanol (1:1) e agitado a 150 rpm por 4 horas. A amostra foi filtrada em filtros de fibra de vidro (GF/A) e lavada abundantemente com acetona.

Antes da próxima etapa, o conteúdo de sólidos retido no filtro foi seco a 40 °C a fim de estabelecer por gravimetria a quantidade de massa transferida para a fase líquida. Este procedimento foi repetido entre cada uma das etapas de extração.

O AIR resultante foi submetido a uma etapa de remoção de amido, em que a cada 250 mg de amostra foram adicionados 25 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) com 0,01% de timerosal, 150 µL de α -amilase e 30 µL de amiloglicosidase, a 55 °C, sob agitação constante (150 rpm) por 24h. O material final foi filtrado em filtro de fibra de vidro (GF/A), lavado com água deionizada e separado para as próximas etapas.

A etapa seguinte foi adicionada para remover possíveis traços de pectina. À massa recuperada na etapa anterior foi adicionado oxalato de amônio 50 mM (pH 5,0) e 0,01% de timerosal, em uma suspensão de 10 mg/mL. As amostras foram aclimatadas a 25 °C, 150 rpm, por 24h, e ao final a amostra foi preparada como na etapa anterior.

As duas etapas seguintes de extração utilizaram hidróxido de potássio (KOH) e NaBH₄ 1,0% (m/v) (KOH 1 M e KOH 4 M) numa suspensão de 10 mg/mL a 25 °C e 150 rpm, por 24h. Os sólidos foram filtrados com membrana de nylon (tamanho de poro de 0,45 µm) e submetidos à remoção de lignina. Nessa etapa, a cada 125 mg de sólidos recuperados foram adicionados 20 mL de água deionizada e mantido em banho de glicerina a 70°C. Após aclimatação, foram feitas três adições de 125 mg de clorito de sódio e 50 µL de ácido acético glacial, com cada adição separada por uma incubação de 1 h. Ao final da reação, gás cloro estava dissolvido no meio conforme indicava a cor amarela da solução. Por isso, as amostras foram retiradas do aquecimento e gás nitrogênio foi borbulhado lentamente até que a amostra perdesse a coloração.

A amostra recuperada, lavada e seca, foi novamente adicionada a KOH 4 M e NaBH₄ 1,0% (m/v) conforme descrito anteriormente. As frações solúvel e insolúvel foram recuperadas e dialisadas utilizando membranas de peso molecular máximo de corte (do inglês MWCO, *max molecular weight cut off*) de 3.500 Da por 48 h, com uma relação de

amostra: água deionizada de 1:60. Após a diálise, as amostras foram liofilizadas e armazenadas à temperatura ambiente.

5.5 AVALIAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO INSOLÚVEL ISOLADO DA SEMENTE DE AÇAÍ

As análises de espectroscopia de RMN foram aplicadas às amostras insolúveis em água, isoladas das sementes de açaí na etapa anterior de fracionamento, e comparativamente à padrões de açúcar

5.5.1 Espectroscopia de RMN em solução

A metodologia de preparo da amostra para análise em RMN em solução foi baseada em estudos de mananas lineares (Petkowicz *et al.*, 2001). Considerando isso, 40 mg da fração isolada, recuperada ao final do fracionamento das sementes de açaí, foi parcialmente solubilizada em 1 mL de uma mistura 50% m/m de ureia e água deuterada sob agitação constante por 48 horas a 65 °C. Ao final, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi liofilizado e solubilizado em água deuterada.

A fração isolada das sementes também foi solubilizada por outro método alternativo (Kim; Ralph, 2014). Para isso, às amostras foi adicionada uma mistura de DMSO-piridina deuterados 4:1, em que 50 mg de amostra receberam 75 µL de DMSO e 250 µL de piridina para serem colocadas em ultrassom por 5 h. Ao afinal as amostras foram centrifugadas, liofilizadas e solubilizadas como no processo anterior.

Com as amostras devidamente solubilizadas, os espectros de RMN 2D foram adquiridos seguindo os parâmetros descritos por Tovar e colaboradores (2019) para análises de polissacarídeos em espectrômetro Bruker Avaree III 900 MHz (Bruker, Billerica, EUA), com sonda TCI de tripla ressonância de detecção inversa otimizada por ¹H. O espectrômetro utilizado pertence ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ (RJ, Brasil).

Os espectros foram adquiridos com supressão de HOD por pré-saturação a 300 K. Espectros de ¹H/¹³C obtidos por HSQC (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) foram adquiridos após 64 acumulações, com 1024 pontos coletados na dimensão F₂ e 256 pontos em F₁, no modo de aquisição eco/anti-eco, via GARP (do inglês *globally optimized alternating-phase rectangular pulses for decoupling*). Os espectros de HMBC (do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) foram adquiridos após 256 acumulações, com

2048 pontos coletados na dimensão F_2 e 300 pontos em F_1 , no modo de aquisição eco/anti-eco. O processamento dos dados foi realizado utilizando o software TopSpin 4.4.0 (Bruker) e os deslocamentos químicos de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ foram expressos em ppm relativo a ressonância do padrão DDS, assumido como o ponto de 0 ppm.

Espectros de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ obtidos por HSQC também foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance Neo 500 MHz equipado com criosonda de nitrogênio líquido disponível no Laboratório de Métodos Analíticos em Farmanguinhos/Fiocruz (RJ, Brasil). Os parâmetros de análise utilizados foram os mesmos da análise anterior.

5.5.2 Espectroscopia de RMN de sólidos

A fração insolúvel isolada das sementes de açaí foi também analisada em espectrômetro Bruker Avance III 400 WB, que opera em campo magnético de 9,4 T, sintonizado na frequência de Larmor do ^{13}C de 100,63 MHz, equipado com sonda de três canais de 4 mm. O equipamento utilizado pertence ao Laboratório Multiusuário de RMN de Sólidos Prof.^a Adelina Costa Neto (LABRMN-1) do Instituto de Química da UFRJ (RJ, Brasil).

Aproximadamente 60 mg de amostra foram transferidas para o rotor de ZrO_2 de 4 mm, com tampas de Kel-F (clorofluorpolímero). As amostras decorreram em temperatura ambiente, na sequência de pulso de polarização cruzada com rotação no ângulo mágico (CPMAS), com tempo de contato de 2000 μs , tempo de reciclo de 4 s, velocidade de rotação de 10 kHz, com 1024 acumulações, utilizando como referência externa para os deslocamentos químicos a glicina (C=O em 176,1 ppm). O processamento dos dados foi por meio do software TopSpin 4.0.7, com ajuste automático da linha de base e ajuste manual das fases.

5.6 AVALIAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS INSOLÚVEIS ISOLADOS DA SEMENTE DE AÇAÍ

A cristalinidade da fração de polissacarídeos insolúveis isolados das sementes de açaí foi avaliada por DRX, e comparado ao perfil de difração de padrões de açúcar, como de manana linear e celulose microcristalina. A análise de DRX foi realizada no difratômetro Bruker D8 Advance (Bruker, Karlsruhe, Alemanha), emitindo radiação $\text{Cu K}\alpha$ com filtro de níquel ($\lambda = 1,5418$ angstroms), tensão de 40 kV e corrente de 40 mA. A análise foi realizada utilizando divergência variável, espalhamento de 4,2, ângulo de varredura na faixa de

$10 \leq 2\theta \leq 50$ graus, a $0,02^\circ$ por passo e taxa de leitura de $1^\circ/\text{min}$ (Gomide *et al.*, 2019). O processamento dos dados e a deconvolução dos picos foi realizada utilizando o software OriginPro 2024.

5.7 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS INSOLÚVEIS ISOLADOS DA SEMENTE DE AÇAÍ

5.7.1 Cromatografia gasosa (CG)

O polissacarídeo insolúvel isolado das sementes teve sua composição de carboidratos confirmada utilizando CG. Por se tratar de compostos não voláteis, estes precisaram ser derivatizados pelo método alditol acetato para análise (Wolfrom; Thompson, 1963).

Primeiramente 0,01 g de amostra foi hidrolisada usando 0,5 mL de H_2SO_4 72% (m/m) em 10 mg de amostra (1 h, 30°C) e, em seguida, diluída até uma concentração final de 4% (1 h, 121°C) (Saeman *et al.*, 1954). Os hidrolisados foram neutralizados com CaCO_3 até pH 6 e o precipitado foi removido por centrifugação. Para derivatização, as amostras hidrolisadas foram reduzidas com a adição de 10 mg de NaBH_4 sob agitação e aclimatado a 4°C por 16h. Caso o pH estivesse alcalino este foi corrigido com ácido acético 50% até pH ácido. Ao final, toda a fase aquosa da amostra foi evaporada em rotaevaporador a 40°C . À amostra seca foi adicionado 1 mL de metanol e evaporado até secar, em um procedimento repetido 3 vezes. Com a amostra seca foi adicionado ao tubo de hidrólise 0,5 mL de piridina e 0,5 mL de anidrido acético. A amostra foi agitada em vórtex e mantida em temperatura ambiente por 18 h, interrompendo a reação no final ao transferir para um banho-de-gelo. Os compostos acetilados foram extraídos com a adição de 1-2 mL de clorofórmio, e as fases foram separadas após agitação em vórtex. Foram realizadas lavagens alternadas da fase clorofórmica utilizando sulfato de cobre 5% e água, lavando 5 vezes cada. No final, a fase clorofórmica foi separada e o clorofórmio evaporado usando nitrogênio. Os acetatos de alditol resultantes foram analisados em cromatógrafo gasoso 5890 A II HP a 220°C (detector de ionização de chama e temperatura do injetor, 250°C) com uma coluna capilar DB-210 (0,25 mm d.i. \times 30 m), uma espessura de filme de $0,25\ \mu\text{m}$ e N_2 (2,0 mL/min) como gás de arraste.

5.7.2 Cromatografia de troca aniônica com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD)

A fração insolúvel isolada das sementes de açaí também foi avaliada por HPAEC-PAD para confirmação composição de monossacarídeos. Para a análise as amostras foram previamente hidrolisadas seguindo a mesma metodologia descrita no item 5.7.1. A identificação do monossacarídeo foi determinada usando um sistema Thermo Scientific Dionex ICS-5000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O cartucho de proteção e a coluna analítica usados foram o CarboPac PA1 (4 mm × 50 mm, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e o CarboPac PA1 (4 mm × 250 mm, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A temperatura da coluna era de 15 °C, e a fase móvel era composta de fase A (água deionizada de grau reagente tipo 1) e fase B (solução de NaOH 300 mM). Os programas de gradiente usados para a separação foram os seguintes: 0,0–32,0 min, 0% B; 32,0– 32,1 min, 0–85% B; 32,1–42,0 min, 85% B; 42,0–42,1 min, 85–0% B; e 42,1–52,0 min, 0% B. A taxa de fluxo foi de 1,25 mL/min, e o volume de injeção foi de 5 µL.

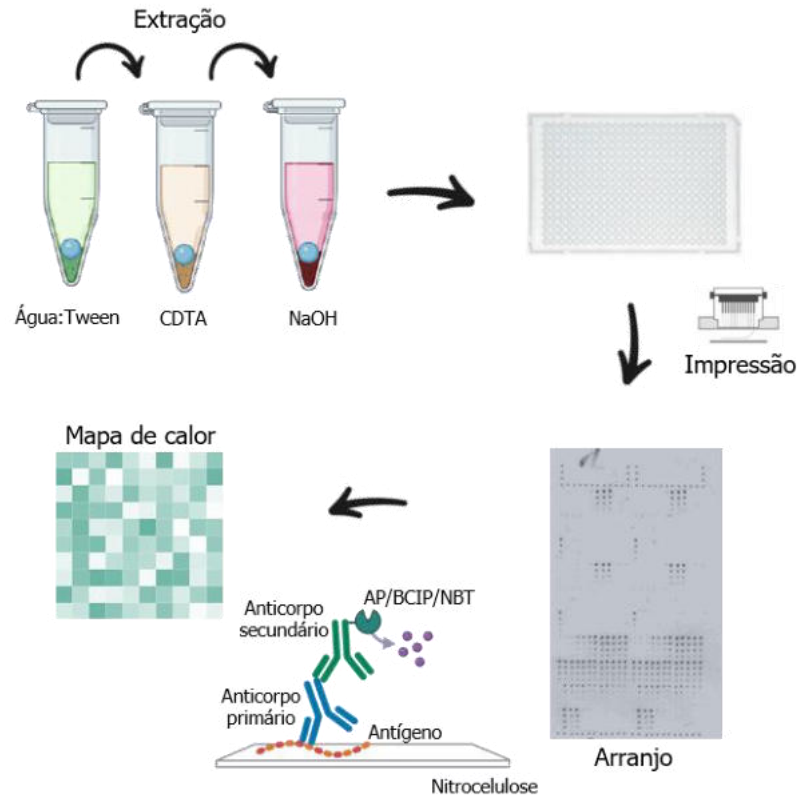
5.8 AVALIAÇÃO POR TERMOGRAVIMETRIA (TGA) DA FRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS INSOLÚVEIS ISOLADOS DA SEMENTE DE AÇAÍ

O ensaio foi conduzido em analisador termogravimétrico SDTDSC Q600 TA Instrument (TA Instrument, New Castle), que mediu a temperatura e o peso da amostra em função do tempo. Cerca de 10 mg de amostra foram adicionadas em cartucho de platina, em atmosfera inerte de nitrogênio a uma vazão de 100 mL min⁻¹. O aquecimento foi conduzido na faixa de temperatura de 40°C até 600°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹. A fração de polissacarídeos insolúveis isolados foi analisada e comparada a outros materiais também analisados: os padrões de açúcar de manana linear (de marfim vegetal) e celulose microcristalina (Avicel®).

5.9 AVALIAÇÃO DO PERFIL GLICÔMICO DA SEMENTE DE AÇAÍ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO VIA COMPP

Além das sementes de açaí maduras, sementes em outros três diferentes estágios de desenvolvimento do fruto tiveram o perfil glicômico avaliado utilizando anticorpos monoclonais por meio da técnica CoMPP. Na metodologia CoMPP, os carboidratos foram extraídos do material vegetal, estes foram impressos em microarranjos usados para fazer a triagem com diferentes módulos de ligação a carboidrato (CBM) e anticorpos monoclonais (mAbs) (Moller *et al.*, 2007) (Figura 12).

Figura 12 - Esquema da metodologia CoMPP utilizada para determinação do perfil glicômico das sementes.



Fonte: Adaptado de (Fradera-Soler *et al.*, 2023).

Os anticorpos monoclonais e a infraestrutura utilizados foram disponibilizados pelos professores Bodil Jørgensen e Peter Ulvskov na seção de Glicobiologia de Plantas da Universidade de Copenhague (Copenhague, Dinamarca), utilizando como base a metodologia descrita por Kračun *et al.* (Kračun *et al.*, 2017) com algumas adaptações.

5.9.1 Extração das sementes de açaí em diferentes estágios de maturação

Os frutos frescos foram despulpados, e a parte externa da semente (fibras mesocárpicas e endocarpo) foi removida nos estágios necessários. As sementes foram cominuídas e submetidas a extração de polissacarídeos do AIR, em um processo semelhante ao feito anteriormente no item 5.3, com os devidos ajustes. Adicionalmente foram acrescentados para o controle da análise os padrões de *Arabidopsis*, galactomanana, manana linear e glucomanana.

Para o preparo do AIR, 600 μL de etanol 80% foram adicionados a 100 mg de amostra. O material foi homogeneizado em vórtex e submetido a agitação de 900 rpm a 30 °C por 1 h. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 20000 xg por 10 min e o

sobrenadante foi descartado. Esse processo foi repetido mais três vezes. Em seguida, foram adicionados 600 μL de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ na proporção 1:1, e as amostras foram tratadas como no procedimento anterior. Por último, a amostra foi lavada três vezes com 600 μL de acetona cada. Ao final, as amostras foram secas em temperatura ambiente no interior de uma capela com sistema de exaustão por 12h.

Cerca de 10 mg de AIR foram submetidos a três extrações sequenciais, sendo os ensaios conduzidos em triplicata e realizados no mesmo dia que a impressão. A primeira extração foi de água:tween, em que foram adicionados 300 μL de Tween 20 a 0,07% v/v em microtubos. À amostra foi acrescida uma pérola de vidro (3 mm) para levar ao moinho de bolas (TissueLyser II, Qiagen) a 27 s^{-1} por 1 min, para em seguida serem centrifugadas a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi separado e armazenado sob refrigeração para análise futura, e o pellet permaneceu no tubo para ser extraído novamente com outro solvente.

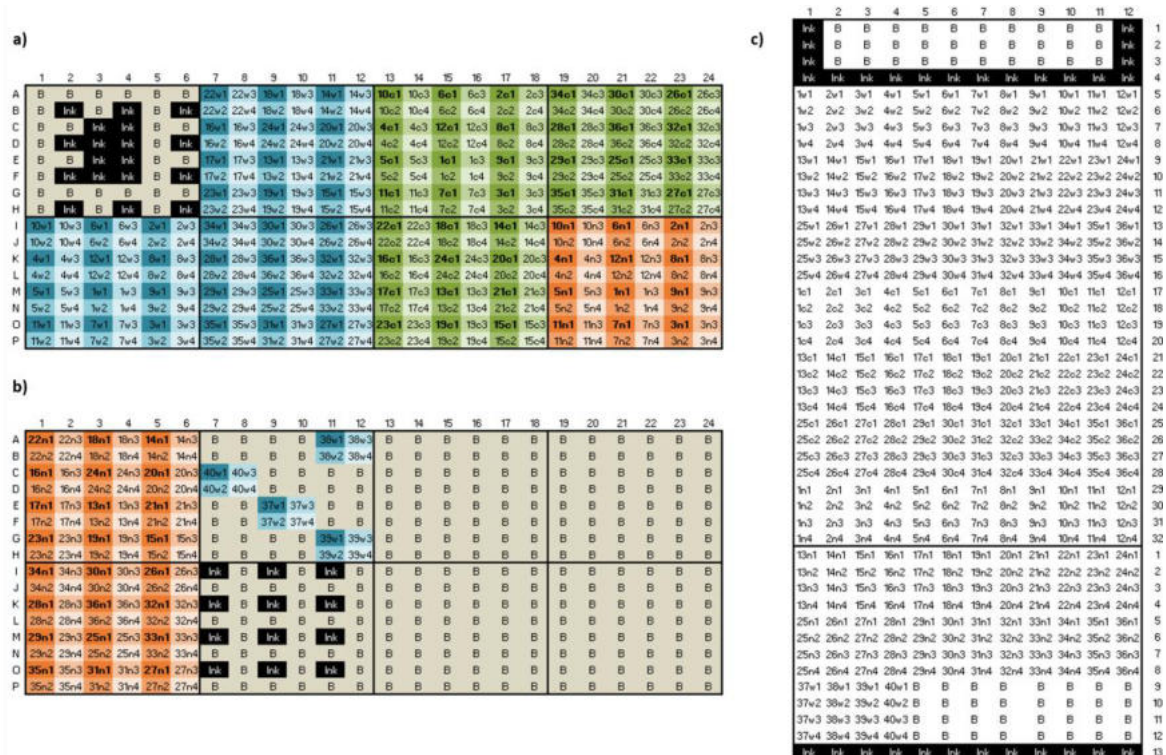
A segunda extração foi realizada utilizando 300 μL de CDTA (ácido ciclohexano 1,2-dinitrotetracético, 50 mM, pH 7,5) e uma pérola de vidro. A mistura foi inicialmente agitada a uma frequência de 27 s^{-1} por 2 minutos. Em seguida, a frequência foi reduzida para 6 s^{-1} e mantida por mais 2 horas. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos para separar o sobrenadante, que foi reservado para análises futuras, e o pellet, que foi utilizado para a extração subsequente. A extração final foi realizada com NaOH 4M contendo 0,1% v/v de NaBH_4 seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os sobrenadantes recuperados em cada uma das extrações, assim como os sólidos residuais, foram acondicionados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ até as próximas análises. Cabe ressaltar que, após descongelar as amostras, estas precisariam ser homogeneizadas e centrifugadas a 4000 rpm por 10 min.

5.9.2 Preparo de matrizes de glicanos oriundas de sementes de açaí em diferentes estágios de desenvolvimento

As amostras que foram extraídas sequencialmente utilizando tween, CDTA e NaOH foram impressas como pontos em papel de nitrocelulose 0,45 μm (Whatman) utilizando uma impressora piezoelétrica de impressão a jato de tinta (*Arrayjet*, Edimburgo, Reino Unido). Para entrada no equipamento, as amostras foram alocadas em microplacas de 384 poços em quatro diferentes diluições sequenciais (1:4, 1:12, 1:36, e 1:108). A placa foi preenchida com as amostras, tinta preta regular e tampão *Arrayjet* (46,3% glicerol, 52,3% água e 1,4% Triton X-100) na posição que o *Jetsyder* for programado para pegar a amostra (Figura 13). A tinta e o tampão foram adicionados para delimitar o início e final do layout de impressão. O layout

do arranjo que a diluição fosse realizada diretamente na placa com o auxílio de uma pipeta multicanal. Após a adição do material, as placas foram centrifugadas. Caso houvesse bolhas, estas eram estouradas com o auxílio de uma agulha estéril.

Figura 13 - Preparo das placas para impressão do microarranjo. (a) Placa 1 contendo parte dos extratos diluídos; (b) Placa 2 contendo o restante dos extratos diluídos; (c) layout do microarranjo a ser impresso com as amostra dispostas em posições relativas a disposição nas placas de poços.



*B: branco de tampão; Ink: tinta; 22c1, por exemplo, 22: número da amostra, n: tipo de extrato (w= água:tween, c= CDTA, n= NaOH), 1= número da diluição.

Fonte: Elaboração própria.

Foram impressos centenas de arranjos, os quais foram meticulosamente cortados com bisturi, e a qualidade da impressão foi averiguada. Em uma placa de petri, o arranjo foi alocado em meio a 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS–NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,5) com 50 µL de corante azul de toluidina sob agitação por 10 min. Os arranjos foram lavados com PBS e colocados para secar em papel de filtro Whatman®. Nos casos de pontos não bem definidos, a impressão foi refeita ajustando a diluição da amostra para até 250 vezes. Os arranjos foram armazenados em placas de 12 poços contendo 2 mL de tampão de bloqueio por no mínimo 1 h. O tampão usado era composto de 5% de leite em pó desnatado em PBS. O leite ajudou a isolar a membrana de nitrocelulose para que não interagisse com o mAb/CBM.

5.9.3 Sondagem dos microarranjos de sementes de açaí utilizando mAbs e CBMs

De acordo com a composição de polissacarídeos das sementes de açaí, foram selecionados 56 anticorpos monoclonais da série CCRC, JIM, LM, CBM entre outros de bibliotecas do *Plant Cell Wall Monoclonal Antibody Database* (WallMabDB) no *Complex Carbohydrate Research Center* (CCRC, Universidade da Geórgia, Estados Unidos). Os anticorpos usados para sondar os microarranjos como anticorpos primários foram agrupados conforme o epítipo de glicano em que atuam, cujos detalhes estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Anticorpos monoclonais e módulos de ligação a carboidratos utilizados para determinar o perfil glicômico das sementes de açaí e suas especificidades, como: a diluição utilizada, origem, e os epítipos de atuação.

mAb/CBM	Diluição	Origem	Epítipo
CBM27	10µg/mL	His-tag	
LM21	1/10	Rato	Manana
LM22	1/10	Rato	
BS-400-4	1/1000	Camundongo	β-(1→4)-D-manana
CCRC-M70	1/250	Camundongo	
CCRC-M167	1:100	Camundongo	Galactomanana
CCRC-M175	1:100	Camundongo	
CCRC-M170	1:250	Camundongo	Glucomanana acetilada
CBM3a	10 µg/mL	His-tag	
CBM2a	10 µg/mL	His-tag	Celulose
CBM4-1	3 µg/mL	His-tag	
CCRC-M102	1:100	Camundongo	
CCRC-M50	1:100	Camundongo	
LM15	1/10	Rato	Xiloglucanos fucosilados
LM24	1/10	Rato	
LM25	1/10	Rato	
CCRC-M145	1:100	Camundongo	
CCRC-M149	1:100	Camundongo	
CCRC-M159	1:100	Camundongo	
INRA-AX1	1/20	Camundongo	
LM10	1/10	Rato	Xilana
LM11	1/10	Rato	
LM23	1/10	Rato	
LM28	1/10	Rato	
InCH1	1:100	Camundongo	Amido
BS-400-2	1/1000	Camundongo	β(1→3)-D-glucana
BS-400-3	1/1000	Camundongo	β(1→3)(1→4)-D-glucana
INRA-UX1	1/20	Camundongo	Glucuronoxilana

2F4	1/250	Camundongo	
CCRC-M38	1:100	Camundongo	
INRA-RU2	1/10	Camundongo	
INRA-RU1	1/10	Camundongo	
JIM5	1/10	Rato	
JIM7	1/10	Rato	Homogalacturonana
LM18	1/10	Rato	
LM19	1/10	Rato	
LM20	1/10	Rato	
LM7	1/10	Rato	
PAM1	10µg/mL	His-tag	
LM27	1/10	Rato	Glucuronoarabinoxilanas
LM8	1/10	Rato	Xilogalacturonana
LM5	1/10	Rato	β(1→4)-D-galactana
LM6	1/10	Rato	α(1→5)-L-arabinana
LM13	1/10	Rato	α(1→5)-L-arabinana
LM16	1/10	Rato	6'-β-D-galactosil-β-(1→4)-D-galactotriose
CCRC-M171	1:100	Camundongo	Arabinogalactana
LM9	1/10	Rato	
LM12	1/10	Rato	Polissacarídeos ligados a ácido ferúlico
JIM8	1/10	Rato	
JIM13	1/10	Rato	
JIM14	1/10	Rato	Arabinogalactanas proteínas (AGP)
LM2	1/10	Rato	
LM14	1/10	Rato	
LM1	1/10	Rato	
JIM11	1/10	Rato	Extensina
JIM20	1/10	Rato	

Fonte: (Pattathil *et al.*, 2015).

Selecionados os mAbs/CBMs a serem avaliados, foi descartada a solução de leite-PBS em que as cópias do arranjo estavam armazenadas e 1 mL de leite-PBS fresco foi acrescentado a cada poço. Cada mAbs/CBM foi avaliado em replicatas do arranjo. Cada um dos poços recebeu um dos mAbs/CBMs na diluição sugerida pelo fabricante. As placas foram mantidas em temperatura ambiente sob agitação de 95 rpm por 2h. Por fim, a solução foi aspirada e os arranjos lavados com PBS três vezes, sendo que após a última adição de PBS as placas foram mantidas a 95 rpm por 10 min.

Após a sonda com o anticorpo primário, foram adicionados os respectivos anticorpos secundários (anticorpos policlonais produzidos conjugados com fosfatase alcalina). O mAb secundário a ser usado em cada um dos arranjos foi determinado pelo organismo hospedeiro

onde foi produzido o mAb primário (camundongo ou rato) ou por uma *tag* específica do CBM (His-*tag*). A solução dos mAbs/CBMs anti-rato (A8438, Sigma), anti-camundongo (A3562, Sigma) e anti-histidina (A5588, Sigma), foram diluídas conforme especificação do fabricante em tampão de fosfatase alcalina (AP). O tampão AP é formado por NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM e Tris HCl 100 mM, pH 9,5. Para controle dos anticorpos secundários, arranjos foram também incubados apenas com os mAbs secundários nessa etapa. O processo de sonda foi semelhante ao realizado anteriormente e, ao final, os arranjos foram igualmente lavados com PBS.

5.9.4 Revelação e quantificação dos microarranjos

Os arranjos foram lavados com água ultrapura e transferidos a um recipiente contendo uma solução reveladora. Essa solução continha 264 µL de nitro azul tetrazólio em metanol (NBT) 50 mg/mL, 330 µL de sal 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato dissódico (BCIP) 50 mg/mL e 40 mL de tampão AP. Os arranjos ficaram em contato com a solução até que os pontos ficassem visíveis ou por no máximo 10 min. A reação foi parada transferindo-os a outro recipiente contendo água ultrapura. Os arranjos foram colocados para secar em meio a papel de filtro Whatman[®] por 12 h. Os arranjos foram então colados em uma folha A4, escaneados usando um scanner (Canon 8800, Søborg, Dinamarca) e alinhados no Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) caso fosse preciso. O sinal foi detectado usando um software de detecção de arranjos (Array-Pro Analyzer v6.3, MediaCybernetics, Rockville, Maryland, Estados Unidos). O resultado foi transcrito como um mapa de calor de sinais relativos, em que os sinais foram ajustados para que a intensidade máxima fosse igual a 100 e sinais abaixo de cinco foram considerados zero.

5.9.5 Avaliação de novos arranjos preparados manualmente

Em uma análise qualitativa, foram avaliados os sólidos das sementes *in natura* ao invés de extratos do AIR. Portanto, cortes de sementes de açaí, obtidos nos quatro diferentes estágios de maturação, foram incubados em PBS para que o material extraído fosse imobilizado em arranjos de nitrocelulose.

O arranjo projetado era uma tira contendo seis quadrados de 6 mm², desenhados lado a lado com lápis. Foi depositado 1 µL de extrato no centro de cada quadrado do arranjo. Os arranjos foram deixados secando durante a noite e quando secos receberam as sondas

imunológicas, conforme descrito anteriormente no procedimento do CoMPP. Para este ensaio, foram avaliados os mAbs: BS 400-3, BS 400-4, LM11, LM15, LM21, LM22, LM25, LM28, INRA-RU2, InCH1 e JIM7.

5.10 AVALIAÇÃO *IN SITU* DE POLISSACARÍDEOS NA SEMENTE DE AÇAÍ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE MATURAÇÃO

5.10.1 Seccionamento das sementes de açaí

As avaliações *in situ* foram realizadas em sementes maduras e em outros três diferentes estágios de maturação do fruto. Os frutos frescos foram despulpados com o auxílio de um bisturi, e seccionados para análise por diferentes técnicas de avaliação *in situ*.

As sementes foram seccionadas em secções seriais de 80 µm usando um micrótomo de lâmina vibratória (Leica VT1000 S, Wetzlar, Alemanha). Inicialmente, as sementes foram cortadas para formar uma base reta de apoio que permitisse sua fixação no equipamento com o auxílio de uma supercola (*Super glue* Loctite®). A superfície de seccionamento foi orientada de maneira a incluir tanto o embrião quanto a cicatriz do fruto. Os cortes são colocados submersos em água ultrapura até análise. Após o corte, as secções foram imediatamente submersas em PBS para análise subsequente. Cabe destacar que, os frutos frescos foram despulpados e seccionados no mesmo dia da análise por microscopia.

5.10.2 Controle das análises de microscopia das sementes de açaí

Para avaliar a anatomia geral do tecido das sementes de açaí em diferentes estágios de maturação do fruto, em uma placa de 12 poços foi adicionado uma secção da semente e 1 mL de azul de toluidina 0,05%, e o sistema mantido por 10 min sob agitação em temperatura ambiente. O corante foi descartado ao final e as amostras foram lavadas com PBS, para que em seguida uma nova alíquota fosse adicionada e colocada sob agitação por 10 min. As amostras foram lavadas e avaliadas em microscópio óptico (Olympus BX 41, Japão) (Głazowska *et al.*, 2023).

5.10.3 Avaliação do conteúdo de celulose no tecido de sementes de açaí maduras

À uma secção da semente de açaí madura, em uma placa de poço, foram adicionados 2 mL de PBS e 200 µL do corante *Pontamine Fast Scarlet* 4B. As amostras foram deixadas em

temperatura ambiente sob agitação por 10 min, e depois foram lavadas com PBS até que a solução de lavagem não apresentasse mais coloração. Em seguida, as amostras foram avaliadas em microscópio óptico (Olympus BX 41, Japão) (Liesche; Ziomkiewicz; Schulz, 2013).

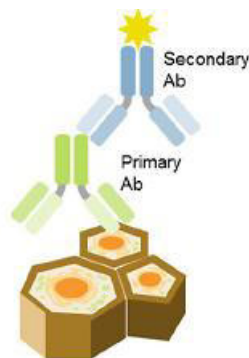
5.10.4 Avaliação do conteúdo de lignina no tecido de sementes de açaí maduras

Seguindo protocolo de Głazowska e colaboradores (2018), fluoroglucinol 1% (solução saturada em HCl 20%) foi gotejado diretamente sobre uma secção da semente de açaí madura para tingir a lignina (coloração de Wiesner). As secções foram incubadas por aproximadamente 5 min e observadas em microscópio óptico (Olympus BX 41, Japão).

5.10.5 Imunolocalização das sementes de açaí em diferentes estágios de maturação

Os anticorpos monoclonais BS400-4, LM21 e LM22 foram selecionados para localizar e monitorar a presença de manana em sementes de açaí ao longo do amadurecimento do fruto (Figura 14). O mAb INRA-RU2 também foi avaliado. Nessa técnica, as sementes recebem a sonda, mAbs primários e secundários, em seguida são corados para ao final serem avaliados por microscopia. Como são procedimentos muito longos, a secção das sementes foi realizada no dia anterior a análise e as secções foram armazenadas em paraformaldeído.

Figura 14 - Esquema simplificado de anticorpos monoclonais utilizados para localização de moléculas alvo *in situ*.



Fonte: (Rydahl *et al.*, 2018).

Seguindo o protocolo descrito por Avci *et al.* (2012), secções da semente de açaí foram lavadas com PBS e foram bloqueadas com 2 mL de albumina sérica bovina (BSA) 5% por 30 min. A solução foi retirada e uma nova alíquota fresca foi adicionada para incubar as

amostras em placas de poços com 20 μL dos anticorpos primários por 2 h em temperatura ambiente a 95 rpm, com as placas envoltas em papel alumínio. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS três vezes, sendo mantida em solução por 10 min na última adição. As amostras foram incubadas com 2 μL dos respectivos anticorpos secundários com fluorescência e em seguida lavadas como anteriormente. As amostras tratadas com os mAbs BS400-4 e INRA-RU2 receberam o mAb secundário anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 555 e aos mAbs LM21 e LM22 foi adicionado o mAb anti-rato conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Paralelamente foram avaliados controles dos mAbs secundários.

Por fim, as amostras lavadas foram contracoradas com 2 mL de PBS em 100 μL do corante *Calcofluor white*, para avaliação em microscópio confocal de varredura a laser (Leica TCS SP5, Wetzlar, Alemanha) equipado com lasers de diodo UV (405 nm), Ar (488 nm) e HeNe (543 nm) em objetivas de 20 \times ou 63 \times . Todas as seções foram escaneadas com as mesmas configurações. As imagens foram processadas com o software LAS X Office (Leica Microsystems).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO COMPOSICIONAL DAS SEMENTES E PREPARO DA AMOSTRA

As sementes de açaí estudadas neste trabalho possuem similaridades com outras também sementes de palmeiras (Arecaceae), como as sementes de tâmara (*Phoenix dactylifera*) e o marfim vegetal (*Phytelephas macrocarpa*), conhecidas por conter em seu endosperma a manana como polissacarídeo de reserva a ser metabolizado pelo embrião para germinação da planta (Brum *et al.*, 2023; Meier; Reid, 1982). As sementes de açaí residuais da produção da polpa, no entanto, ainda retêm parte das fibras do mesocarpo aderidas a ela (Figura 11a). Essa porção possui um teor composicional típico de biomassas lignocelulósicas que contêm celulose e hemicelulose do tipo xilana (Monteiro *et al.*, 2019).

Avaliando as sementes recebidas (semente + fibras), estas tinham em média $0,76 \text{ g} \pm 0,15$, tamanho transversal de $11,3 \text{ mm} \pm 0,71$ e longitudinal de $9,45 \text{ mm} \pm 0,68$ (foi considerado como eixo longitudinal na direção de crescimento do embrião). A composição química dessas sementes, com e sem a parte externa, foi comparada as sementes (semente + fibras) e ao endosperma avaliados na dissertação de mestrado que antecede este trabalho (Miguez, 2020). Para obtenção dessa fração isolada no trabalho anterior, as sementes foram cortadas até que o endosperma fosse totalmente isolado do tegumento (Tabela 5).

Tabela 5. Composição química (% massa seca) de diferentes porções da semente de açaí in natura utilizada nesse trabalho e na dissertação de mestrado que antecede este trabalho. As partes avaliadas são: sementes após despolpa do fruto (semente + fibras), sementes sem as fibras mesocárpicas e sem o endocarpo (semente), o endosperma isolado das sementes de açaí (endosperma isolado).

	Lote usado		Lote de referência (Miguez, 2020)	
	Semente	Semente + Fibras	Endosperma isolado	Semente + fibras
Manana	$58,33 \pm 2,51$	$54,49 \pm 1,40$	$74,33 \pm 5,99$	$47,09 \pm 1,42$
Galactana	$2,44 \pm 0,28$	$2,51 \pm 0,07$	$2,87 \pm 1,67$	$1,79 \pm 0,21$
Glucana	$4,19 \pm 0,34$	$7,36 \pm 0,06$	$5,41 \pm 0,42$	$6,09 \pm 0,67$
Arabinana	$0,49 \pm 0,02$	nd ^b	$0,25 \pm 0,27$	$0,40 \pm 0,02$
Xilana	nd ^b	$3,13 \pm 0,14$	nd ^b	$1,83 \pm 0,33$
Sólidos^a	$18,59 \pm 1,83$	$15,44 \pm 0,14$	$4,58 \pm 2,52$	$18,34 \pm 0,64$
Extrativos	$10,56 \pm 0,55$	$11,48 \pm 0,55$	nd ^b	$15,45 \pm 0,95$
Cinzas	$1,28 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,03$	$1,44 \pm 0,71$	$0,61 \pm 0,09$

^aSólidos: representa a matéria orgânica insolúvel após a hidrólise ácida, calculada sem considerar a quantidade de cinza insolúvel em ácido; ^bnd: não detectado.

A composição química das sementes (semente+fibras) foi similar ao reportado anteriormente (Miguez, 2020), cuja razão molar de açúcares man:gal:glc:ara:xil foi de 80:4:11:0:6 e 82:3:11:1:4, respectivamente. As variações entre o lote usado e o lote de referência está dentro do esperado das particularidades e variações inerentes a cada safra, aos diferentes cultivares, e a amostragem variada de fibra/semente analisada (Oliveira *et al.*, 2006).

Confirmada a composição rica em manana das sementes recebidas, estas puderam ser usadas para isolar seu conteúdo de manana a fim de iniciar a caracterização estrutural do polissacarídeo. Para evitar que a interpretação dos resultados de identificação da estrutura de manana fosse dificultada pela presença de outros componentes, o ideal seria trabalhar apenas com o endosperma isolado. No entanto, como as sementes são difíceis de manusear, optou-se por trabalhar com sementes sem a parte externa. Nesse processo removeu-se não apenas as fibras do mesocarpo, mas também o endocarpo e o tegumento externo que poderia ainda conter vestígios da fração fibrosa lignocelulósica.

Ao avaliar a composição dessas sementes, que não possuem a parte externa, observou-se que o conteúdo de extrativos foi superior ao encontrado no endosperma, que não possui tegumento. A presença de extrativos nas sementes, mas não no endosperma isolado, sugere que esses compostos estejam associados a partes do tegumento ainda presentes nas invaginações. Essa hipótese é corroborada pelos achados de Martins e colaboradores (2020), que, por meio de técnicas de imageamento (MALDI-IMS), indicaram que compostos fenólicos, como as procianidinas, estão associados à região do tegumento.

O conteúdo de sólidos não hidrolisáveis em ácido identificado nas sementes provavelmente indica a presença de lignina. Contudo, análises específicas são necessárias para caracterizar esse composto aromático e confirmar sua presença. A diferença no conteúdo desses sólidos entre as sementes e o endosperma isolado pode ser atribuída ao fato de que a porção avaliada representa de forma mais significativa a parede celular lignificada.

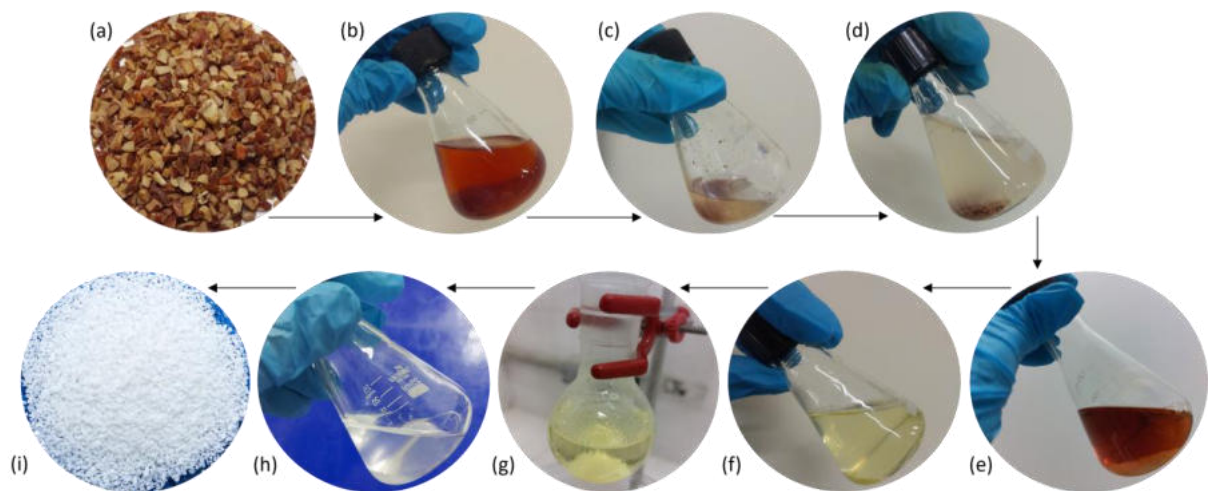
Por outro lado, a razão molar de man:gal:glc:ara:xil foi semelhante entre as sementes utilizadas neste trabalho e o endosperma isolado, sendo de 89:4:6:1:0 e 90:3:7:0:0, respectivamente. Esses valores estão dentro da variabilidade fenotípica esperada para sementes de diferentes origens. Como não houve índices detectáveis de xilana no material analisado, assumiu-se a hipótese de que as sementes que tiveram as fibras do mesocarpo, o endocarpo e tegumento externo removidos estavam livres de qualquer fração lignocelulósica.

Ainda assim, o estudo de polissacarídeos da parede celular é intrinsecamente complexo, pois os carboidratos podem estar ligados entre si ou interconectados a diversos

outros polímeros compondo a estrutura vegetal. Ademais, os métodos analíticos disponíveis para caracterização *ex situ* da estrutura de um polissacarídeo requer o rompimento da parede celular vegetal de modo a tornar o material passível de análise (Miguez *et al.*, 2023). Portanto, antes de qualquer análise foi necessário eliminar ou reduzir ao máximo a presença de outros componentes, isolando o polissacarídeo de interesse da parede celular vegetal.

Para isso, as sementes foram submetidas a uma extração sequencial em multi-etapas que removesse diferentes frações enriquecidas com polissacarídeos específicos, para que ao final fosse recuperado uma fração insolúvel rica em manana (Figura 15). Mesmo que a caracterização composicional tenha sinalizado a ausência de alguns componentes, optou-se por incluir o maior número de etapas no fracionamento das sementes de açai, pois se trata de uma avaliação ainda não descrita na literatura de um material ainda pouco explorado neste quesito, em que era preciso garantir que o material isolado fosse predominantemente manana.

Figura 15 - Etapas do fracionamento das sementes de açai: (a) sementes in natura no início do processo; (b) AIR; (c) extrato em amilases; (d) extrato em oxalato de amônio; (e) extrato em KOH 1 M; (f) extrato em KOH 4M; (g) extrato de clorito de sódio; (h) extrato de KOH 4M; (i) fração insolúvel recuperada ao final.



Fonte: Acervo próprio.

A primeira etapa do fracionamento das sementes é o preparo do AIR, em que são removidos materiais não estruturais, tais quais: lipídeos, pigmentos, açúcares livres, sais inorgânicos, e metabólitos de baixo peso molecular. Dependendo da metodologia escolhida haverá diferentes rearranjos dos componentes da parede celular vegetal, o que impactará na caracterização posterior (Fangel *et al.*, 2021). Dessa forma, foi estabelecida uma combinação de solventes orgânicos a qual fosse adequada às sementes de açai. Com isso, o extrato recuperado apresentava uma coloração vermelho intenso (Figura 15b), o que indica a presença

de compostos fenólicos, possivelmente procianidinas, conforme descrito na literatura (Martins *et al.*, 2020) e também evidenciado pelo teor de extrativos obtido com a caracterização química realizada anteriormente.

Um teste rápido de lugol com as sementes de açaí maduras não indicou a presença de amido, contudo o menor sinal deste componente atrapalharia a identificação da estrutura do polissacarídeo alvo, uma vez que o amido contém resíduos de 4- e 4,6-glicose que também estão presentes em (galacto)glucomananas, celulose, xiloglucanas, e (1,3 ou 1,4)- β -glucanas (Pettolino *et al.*, 2012). Portanto, uma etapa para extração desse polissacarídeo foi mantida utilizando enzimas para a remoção exclusiva desse componente (Figura 15c). Da mesma forma, mesmo sem indícios da presença de pectina nas sementes de açaí, esse carboidrato fracamente ligado na parede celular vegetal seria removido com o uso de um quelante que se liga a cátions divalentes solubilizando as pectinas ligadas a parede celular por ligações cruzadas de cálcio (Figura 15d) (Barnes *et al.*, 2021).

Nas duas etapas seguintes foram realizadas extrações alcalinas de hemicelulose utilizando concentrações crescentes de base, para que fossem removidos diferentes polissacarídeos em frações subsequentes (Figura 15e-f) (Selvendran; O'Neill, 1987). Como em meio alcalino as unidades redutoras terminais do polissacarídeo podem reagir ocasionando a degradação do carboidrato, para evitar tal ação, as unidades finais foram reduzidas com o uso de borohidreto de sódio (Abdel-Akher; Hamilton; Smith, 1951). Notavelmente, o extrato alcalino assumiu uma coloração vermelho intensa novamente, mesmo após as duas etapas anteriores não apresentarem coloração.

De acordo com a literatura, os polifenóis extraídos identificados nas sementes de açaí correspondem principalmente a procianidinas com grau de polimerização médio de 11,4 (>3000 Da), conforme reportado por Martins e colaboradores (2020). No entanto, a coloração indica que a extração realizada para procedimentos de caracterização não é capaz de remover todo o conteúdo de compostos fenólicos dessa matéria-prima. É possível que parte dos polifenóis permaneça mais intrinsecamente ligado à parede celular vegetal, seja por ligações covalente ou ligações não covalentes fortes. Esses polifenóis são descritos como polifenóis insolúveis não extraíveis (Zhang *et al.*, 2020). Assim a hidrólise alcalina pode ter favorecido a quebra de ligações covalentes que podem estar ligando os compostos fenólicos a polissacarídeos estruturais da parede celular vegetal ou mesmo estabelecendo ligações não covalentes muito fortes. Assim, apesar da etapa de extração com álcool, a análise macroscópica do extrato obtido após a etapa de hidrólise alcalina indica que o AIR formado ainda continha alguns compostos fenólicos que estavam mais fortemente ligados a

hemiceluloses, porém estudos de caracterização específicos dessa fração precisam ser realizados.

Não podemos afirmar até o momento se o conteúdo de sólidos não hidrolisados em ácido remete a lignina, uma vez que a caracterização composicional feita anteriormente não incluiu análises específicas para identificação das diferentes formas de lignina que podem haver em sementes de palmeiras (Del Río *et al.*, 2017; Rencoret *et al.*, 2018). Ainda assim, a lignina que poderia estar contida no material foi removida utilizando clorito de sódio. Como pode ser notado visualmente, ao final desse processo o sólido ficou ainda mais claro, tornando-se um cristal de coloração branca (Figura 15g).

A lignina é uma macromolécula descrita por fazer ligações cruzadas com hemiceluloses presentes na parede celular vegetal (Carpita, 1984; Mnich *et al.*, 2020). Por isso, foi adicionada uma nova etapa de extração alcalina de modo a garantir a que o sólido final fosse isolado de qualquer outro componente que pudesse estar ligado a lignina e tenha permanecido na amostra (Figura 15h).

A extração sequencial das sementes de açaí pode resultar em perda de massa devido à grande quantidade de procedimentos que estão envolvidos neste processo. Ainda assim, foi recuperado 45,83% de massa ao final de todo o fracionamento (Figura 15i). Considerando que o material inicial tinha um conteúdo teórico de manana igual a 58,33%, se assumiu que provavelmente todo o material insolúvel recuperado seria a manana das sementes de açaí. Logo, com essa fração insolúvel isolada das sementes podemos dar início a caracterização estrutural da manana.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DE MANANA DE SEMENTES DE AÇAÍ MADURAS

6.2.1 Caracterização estrutural da fração isolada de sementes de açaí por RMN

O fracionamento dos componentes da semente de açaí resultou em uma fração de polissacarídeos insolúvel em água. Tendo essa fração isolada, foi iniciada a caracterização completa desse material, o que abrange uma ampla gama de aspectos estruturais. Como a RMN é uma técnica comumente utilizada para a determinação da estrutura de biomoléculas, esta foi a ferramenta analítica escolhida para iniciar a avaliação da fração isolada.

Tradicionalmente, as amostras para análise por RMN em solução são dissolvidas em solventes deuterados, de modo a favorecer a troca de –OH para –OD simplificando o espectro a ser analisado (Guo; Ai; Cui, 2018). O desafio inicial, no entanto, foi trabalhar com uma

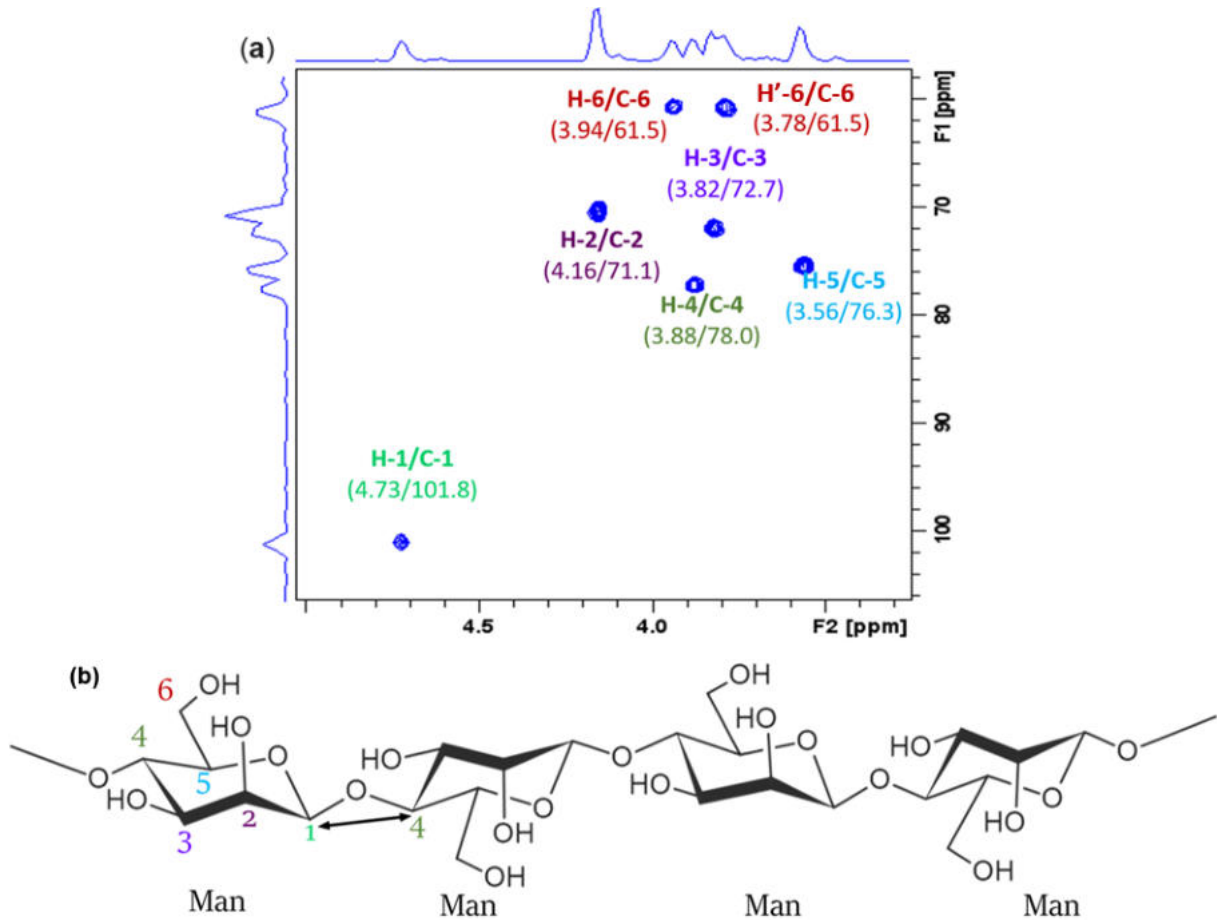
amostra insolúvel a maioria dos solventes utilizados no preparo da amostra, como D₂O e DMSO-d₆ (Speciale *et al.*, 2022). Tentou-se solubilizar a fração isolada em água deuterada sob aquecimento e agitação contínua, porém, conforme esperado, a amostra não foi solubilizada a ponto de ser detectada por RMN em solução. Da mesma maneira foi utilizado DMSO, com o qual também não foi possível solubilizar a amostra.

A alternativa encontrada foi avaliar a solubilização da fração de polissacarídeo em ureia concentrada, com base em relatos na literatura que sugerem que a ureia tem a capacidade de impedir a auto associação das cadeias de polissacarídeos com alto grau de polimerização (Isobe *et al.*, 2013). Esse fenômeno foi observado, por exemplo, na dissolução de glucomanana desacetilada, manana linear, e celulose em meio alcalino (Mackie; Preston, 1968; Petkowicz *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2014). Assim, após 48 horas de agitação e aquecimento a 65 °C da amostra em solução de ureia concentrada foi possível obter a solubilização parcial da amostra.

No entanto, obtivemos uma solução de baixa concentração. Por isso, os espectros de ¹H avaliados tiveram o sinal subestimado pelos sinais de alta intensidade da água residual ou da ureia que estavam presentes na amostra. Da mesma forma, não foi possível obter bons resultados com os espectros de ¹³C, pois estes requeriam muito tempo de análise para essas amostras diluídas e, ao final não foram observados sinais nos espectros avaliados.

Assim, a estratégia escolhida foram análises de RMN em solução 2D, realizando um experimento de HSQC. Por meio desta técnica, é possível estabelecer a correlação heteronuclear entre os átomos de hidrogênio e carbono diretamente ligados (Guo; Ai; Cui, 2018; Speciale *et al.*, 2022) (Figura 16). Os deslocamentos químicos de ¹H/¹³C do espectro de HSQC do polissacarídeo insolúvel isolado da semente de açaí se assemelham aos sinais de resíduos β-D-Manp não ramificados da cadeia principal de galactomananas pouco substituídas de sementes de leguminosas (Tabela 6) (Albuquerque *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2018). Além disso, o espectro de ¹³C apresentou seis sinais de carbono atribuídos a uma β(1→4)-D-manana, que corresponde ao reportado para outras sementes de palmeiras, como marfim vegetal (*ivory nut* de *Phytelephas macrocarpa*) e as sementes de tâmara (*Phoenix dactylifera*), conhecidas por conterem mananas lineares como material de reserva na parede celular do endosperma maduro (Jarvis, 1990).

Figura 16 - (a) Espectros de HSQC da fração de polissacarídeo isolado das sementes de açaí, solubilizada em 50% m/m de uréia-D₂O com atribuições de sinais de ¹H/¹³C; (b) estrutura molecular de manana linear identificada.



Fonte: Elaboração própria.

Tabela 6. Deslocamentos químicos de ¹H/¹³C do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), manana linear de marfim vegetal (*Phytelephas macrocarpa*), manana linear de sementes de tâmara (*Phoenix dactylifera*), e de resíduos não ramificados de β-D-Manp de galactomananas de sementes de *Cassia grandis* e *Cassia obtusifolia*.

Amostra	δ (ppm)					
	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H'-6 - H-6 /C-6
<i>E. oleracea</i>	4,73/101,8	4,16/71,1	3,82/72,7	3,88/78,4	3,56/76,3	3,78-3,94/61,5
<i>C.grandis</i> *	4,73/101,0	4,11/70,7	3,80/72,2	3,81/77,4	3,55/75,9	3,90/61,3
<i>C. obtusifolia</i> *	4,63/100,4	4,01/70,2	3,70/71,6	3,71/76,7	3,49/75,2	3,79/60,7
<i>P. macrocarpa</i> *	101,7	72,2	73,5	78,8	78,8	62,1
<i>P. dactylifera</i> *	101,7	69,9	72,1	81,0	75,9	61,9

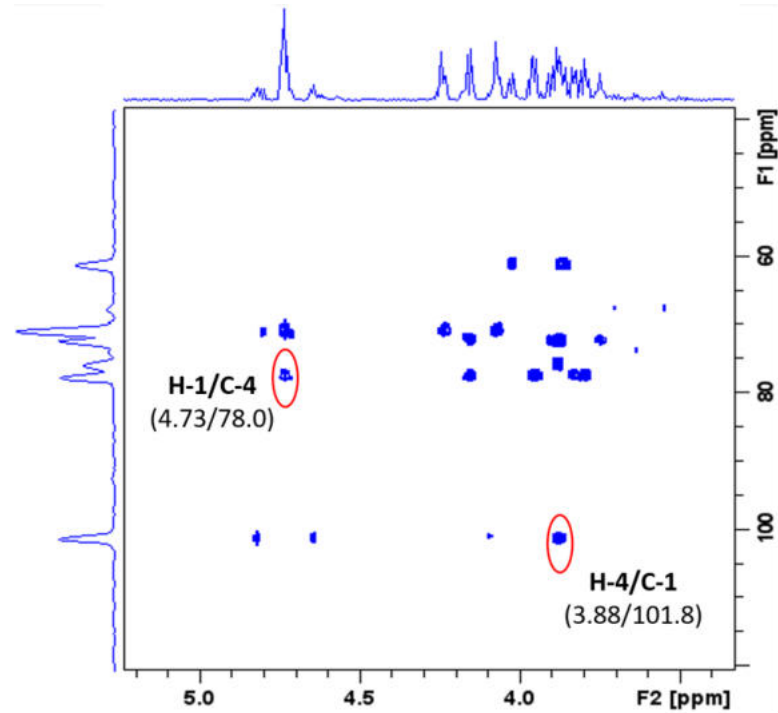
*(Albuquerque *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2018; Gorin, 1973; Jarvis, 1990)

É possível identificar a configuração α/β da molécula a partir do deslocamento químico do próton anomérico. A blindagem no carbono anomérico é menos pronunciada devido ao fluxo de elétrons direcionado aos dois oxigênios que se ligam a ele (Speciale *et al.*, 2022), conseqüentemente, a região anomérica é facilmente distinguível no espectro. Para configurações α , os deslocamentos estariam entre 4,90-5,12 ppm, portanto, o deslocamento observado de 4,73 ppm confirma a configuração β da manana de sementes de açaí (Kuraoka *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2021).

Para confirmar a natureza da ligação glicosídica presente na cadeia principal da manana identificada, foi escolhido aplicar uma segunda estratégia de RMN em solução 2D, o HMBC. A técnica permite a identificação de ligações entre resíduos de açúcar adjacentes através do acoplamento entre hidrogênio e carbono com três ligações de distância (Guo; Ai; Cui, 2018).

O espectro de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HMBC obtido revelou interações entre o H1-C4 a 4,73-78,0 ppm e entre o H4-C1 a 3,88-101,8 ppm, conforme indicado pelos picos cruzados na Figura 17. Como a técnica de HMBC identifica apenas interações entre os núcleos separados por três ligações, então essas interações indicam a ligação entre resíduos vizinhos e não dentro do mesmo resíduo de manose, confirmando assim uma ligação glicosídica (1 \rightarrow 4) entre unidades Man α . Cabe ressaltar que, o resultado de HMBC também mostra picos correspondentes ao acoplamento de resíduos internos, que não serão discutidos aqui, pois não contribuem com informações adicionais para a atribuição da ligação interglicosídica. Assim, a atribuição dos sinais por comparação com dados da literatura confirma uma $\beta(1\rightarrow4)$ manana linear presente no endosperma das sementes maduras de açaí.

Figura 17 - Espectros de HMBC da fração de polissacarídeo isolado das sementes de açaí, solubilizada em 50% m/m de uréia-D₂O.



6.2.2 Avaliação da fração isolada de sementes de açaí por RMN de sólidos e DRX

Devido à dificuldade de solubilizar a fração isolada de manana, optou-se por avaliá-la também usando a técnica de CPMAS para obter espectros de RMN de sólidos de ¹³C e também por difração de raios-X. Dessa forma, a fração isolada pode ser analisada em sua totalidade, evitando as perdas durante o processo de solubilização. O espectro de ¹³C da amostra (Figura 18) permitiu confirmar que a fração insolúvel em água é uma manana linear, com uma única ressonância para cada carbono da unidade de repetição (Tabela 7).

Figura 18. Espectro de ^{13}C da fração do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí analisado por RMN de estado sólido.

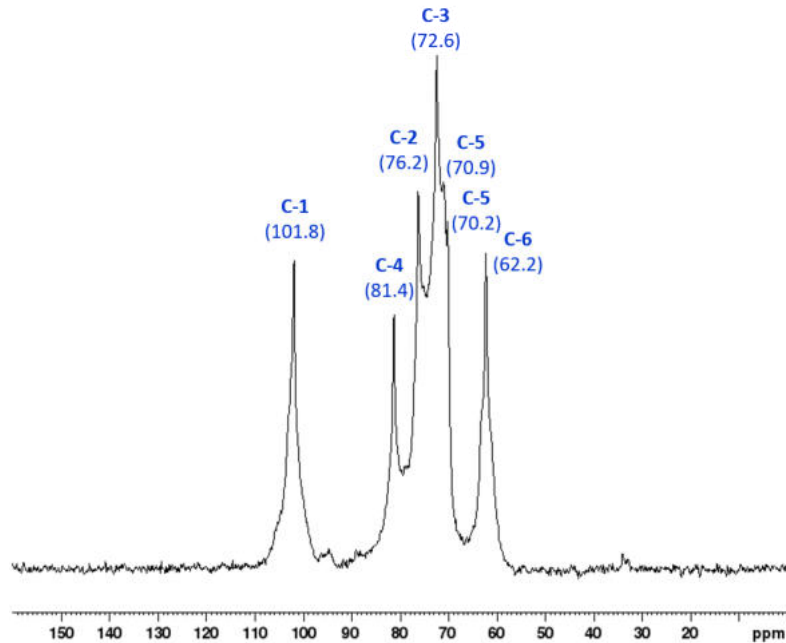


Tabela 7. Deslocamentos químicos de ^{13}C (ppm) do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí, e de polímeros de manana linear presentes em marfim vegetal (*ivory nut*), e em alga *Codium fragile*.

δ (ppm)			
Carbono	Amostra	Polímero I (<i>ivory nut</i>)	Polímero II (<i>C. fragile</i>)
1	101,8	102,0	102,4
2	76,2	76,3	75,0
3	72,6	72,5	72,5
4	81,4	81,4	83,0
5	70,2-70,9	70,3	70,9
6	62,2	62,4	62,9

*(Marchessault *et al.*, 1990)

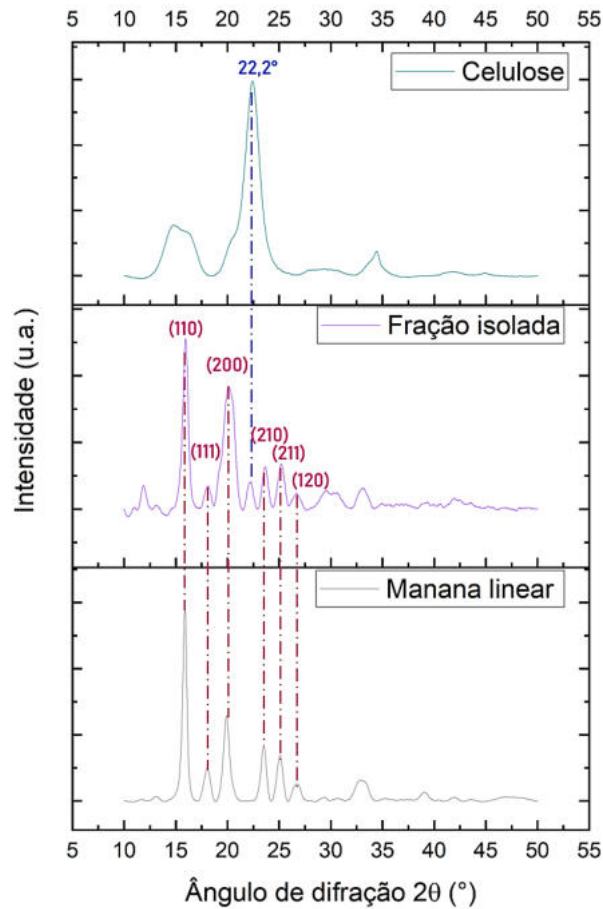
Ademais, a RMN de sólidos fornece informações sobre a estrutura molecular e a dinâmica das moléculas em estado sólido, incluindo a presença de regiões cristalinas e amorfas (Putaux, 2005). Neste caso, polissacarídeos lineares tem tendência a formar estrutura de cristais, e a forma nativa que os polissacarídeos de reserva assumem podem variar (Ogawa; Putaux; Nishiyama, 2022). Com o espectro foi possível notar que a manana linear cristalina das sementes possui diferentes polímeros. Os dados amostrais mostram a presença dos polímeros I e II na manana da semente de açaí, uma vez que os dois sinais correspondentes ao carbono 5 de ambas as formas foram detectados em 70,2 e 70,9 ppm, respectivamente,

sendo o polimorfo I encontrado em marfim vegetal (*ivory nut*), e o polimorfo II de alga *Codium fragile* (Marchessault; Taylor; Winter, 1990).

Os polimorfos I e II da molécula de manana possuem diferentes arranjos cristalinos, o que resulta em variações na estrutura e na cristalinidade. Essas diferenças estruturais conferem aos polimorfos distintas propriedades físicas e químicas. Em algumas algas, os polimorfos de manana coexistem com diferentes distribuições na célula, pois a manana II ocorre nas camadas externas da parede celular e a manana I está presente nas camadas internas. No marfim vegetal os polimorfos coexistem nas paredes celulares, onde uma manana II de estrutura fibrilar é incrustada com uma manana I de forma granular. (Chanzy *et al.*, 1984). Da mesma forma, espera-se que os diferentes polimorfos de manana em sementes de açaí estejam entrelaçados compondo uma manana mais resistente ao meio alcalino, porém outras análises precisariam ser realizadas para avaliar essa proposição.

Como a manana linear é um polissacarídeo cristalino, a cristalinidade da fração isolada de sementes de açaí também foi avaliada por DRX (Figura 19). O perfil de difração da amostra apresentou picos de intensidade no ângulo 2θ iguais a 16° , 18° , 20° , 24° e 26° , que correspondem aos planos cristalinos 110, 111, 200, 210 e 211, respectivamente, em um perfil semelhante à forma cristalina de manana linear encontrada no padrão de manana de marfim vegetal também avaliado. Os picos cristalográficos observados nesses ângulos específicos são associados a região cristalina de uma manana I, assim como foi identificado em marfim vegetal e até mesmo em algas *Acetobularia crenulata* (Hori; Sugiyama; Wada, 2007; Yui *et al.*, 1997). De acordo com dados de difração de elétrons da literatura, a estrutura cristalina e molecular da manana I consiste em duplas hélices compactadas em folhas que são estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Chanzy *et al.*, 1987).

Figura 19 - Perfil DRX do padrão de celulose microcristalina; de manana insolúvel isolada de sementes de açaí; e do padrão de manana linear de marfim vegetal.



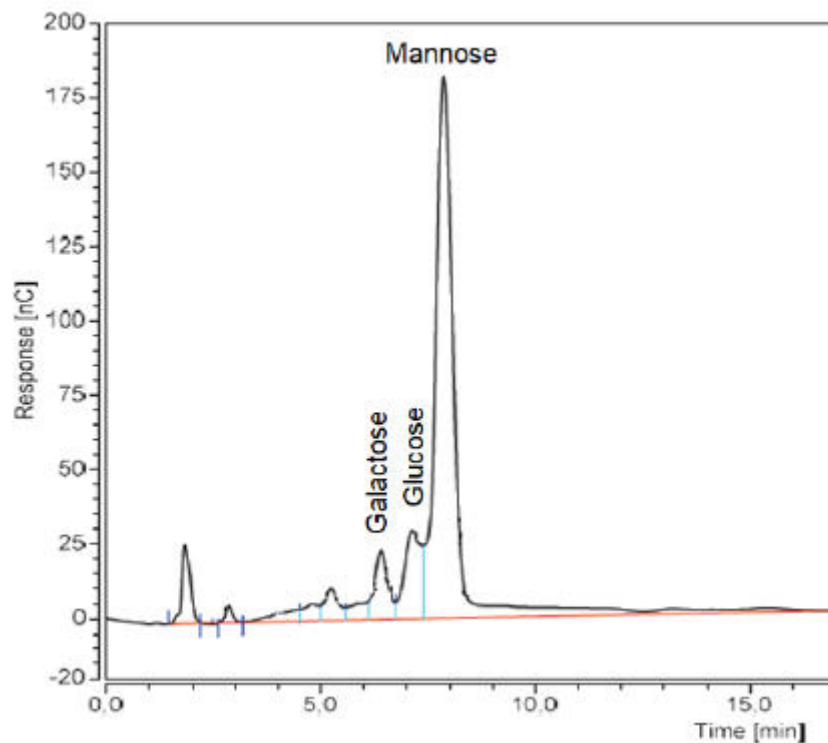
Em contrapartida, a manana II possui uma estrutura cristalina ortorrômbica menos compacta e menos cristalina do que a manana I, que permite que a sua estrutura varie dependendo do seu estado de hidratação, pois a presença de moléculas de água pode levar a alterações no arranjo das cadeias formando diferentes alomorfos (Heux *et al.*, 2005). Dessa forma, as informações acerca do perfil de difração de raio-X de manana II foram pouco exploradas considerando os diferentes alomorfos que pode apresentar. Com isso, não foi possível identificar quais picos seriam referentes a manana II na fração isolada das sementes.

No entanto, a presença de um pico em $22,2^\circ$, que não está correlacionado ao perfil de manana linear, gerou dúvidas se poderia haver contaminação da amostra, uma vez que este sinal é característico ao plano (200) de celulose I β (Gomide *et al.*, 2019). Então diante disso, a composição de açúcares da fração de polissacarídeos insolúveis isolados da semente de açaí precisou ser confirmada por outra metodologia analítica de forma complementar.

6.2.3 Caracterização composicional da fração isolada de sementes de açaí

A composição de resíduos glicosil do polissacarídeo insolúvel em água que foi isolado das sementes de açaí foi verificada por HPAEC-PAD (Figura 20). Para isso, a amostra foi hidrolisada com ácido e a composição de monossacarídeos foi avaliada. No entanto, a metodologia analítica utilizada não foi adequada para quantificar a contribuição de cada açúcar na amostra. É necessário ajustar o gradiente de eluição para obter uma melhor separação dos picos cromatográficos de modo a permitir a quantificação de açúcares. No entanto, a análise qualitativa de HPAEC-PAD mostrou que há um teor de glicose e galactose presente nessas amostras isoladas da semente.

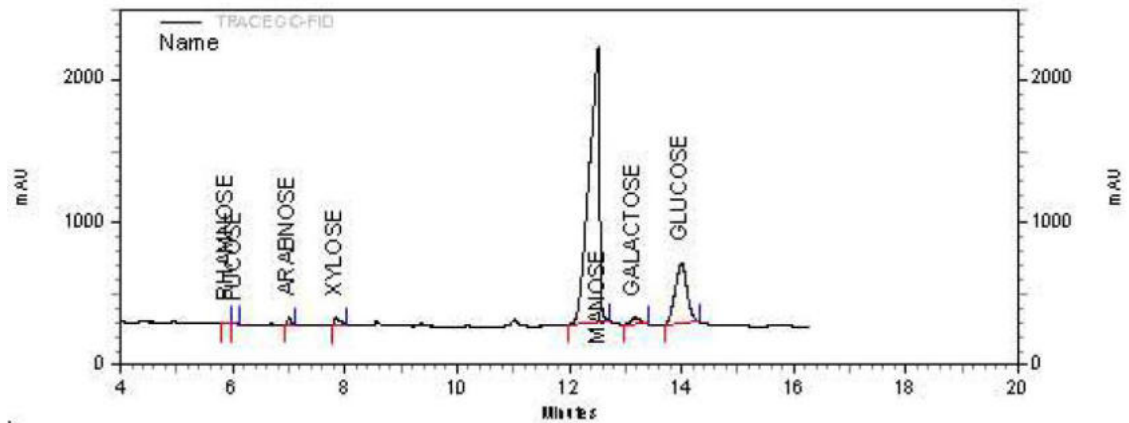
Figura 20. Cromatograma de HPAEC-PAD do hidrolisado de polissacarídeos insolúveis em água que foram isolados de sementes de açaí.



A composição monossacarídica da fração insolúvel isolada das sementes foi determinada por CG (Figura 21), confirmando a presença de resíduos de manose, glicose, galactose e outros açúcares na proporção de 79:19:1:1. Os outros resíduos, que correspondem a ramnose, fucose, arabinose e xilose, somados contribuem com apenas 1% da composição total. Em outros resíduos agroindustriais, como a farinha de palmiste, a manana representa 78% dos polissacarídeos, com baixa substituição de galactose (Düsterhöft; Posthumus;

Voragen, 1992). Alto teor de manose também é observado em outras espécies de palmeiras, como as sementes de *Hyphaene Thebaica*, onde a manose compreende 70% do teor de açúcar (Gibril *et al.*, 2020).

Figura 21 - Cromatograma de cromatografia gasosa do hidrolisado de polissacarídeos isolados da semente de açaí.



O alto teor de manose detectado em ambos os métodos analíticos confirma que a fração isolada é uma manana, porém os outros monossacarídeos também presentes não foram anteriormente detectados por RMN em solução, por isso, a metodologia precisou ser revista e os teores de galactose e glicose precisaram ser novamente confrontados.

6.2.4 Confirmação do conteúdo de galactose no polissacarídeo isolado das sementes de açaí

Provavelmente, o baixo teor de galactose na amostra, que estava em baixa concentração, dificultou a detecção do açúcar por RMN em solução no método utilizado anteriormente. Por isso, as análises de RMN em solução foram refeitas utilizando uma criosonda que permitisse não só o aumento da sensibilidade do método, como também uma redução do tempo de experimento e da quantidade de amostra necessária a análise. Isso porque a criosonda permite que o ruído térmico na via de detecção do sinal seja atenuado ao diminuir a temperatura da bobina de radiofrequência que detecta os sinais de RMN dos núcleos atômicos (Kovacs; Moskau, 2013).

A fração de polissacarídeo insolúvel isolada de sementes de açaí foi reavaliada, apresentando deslocamentos químicos relativos a resíduos de β -(1 \rightarrow 4)-Manp (Figura 22) (Tabela 8). Desta vez, a amostra foi comparada a um padrão de manana linear de marfim

vegetal, que também foi analisado e teve seus sinais de carbono comparáveis aos descritos na literatura (Gorin, 1973). Os sinais de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de HSQC confirmaram que o polissacarídeo é uma manana linear, logo, prosseguiu-se com a busca pelos outros resíduos de açúcar.

Figura 22 - Espectro de HSQC da fração de polissacarídeo isolado das sementes de açaí, solubilizada em 50% m/m de uréia- D_2O e analisado por RMN em solução equipado com criosonda.

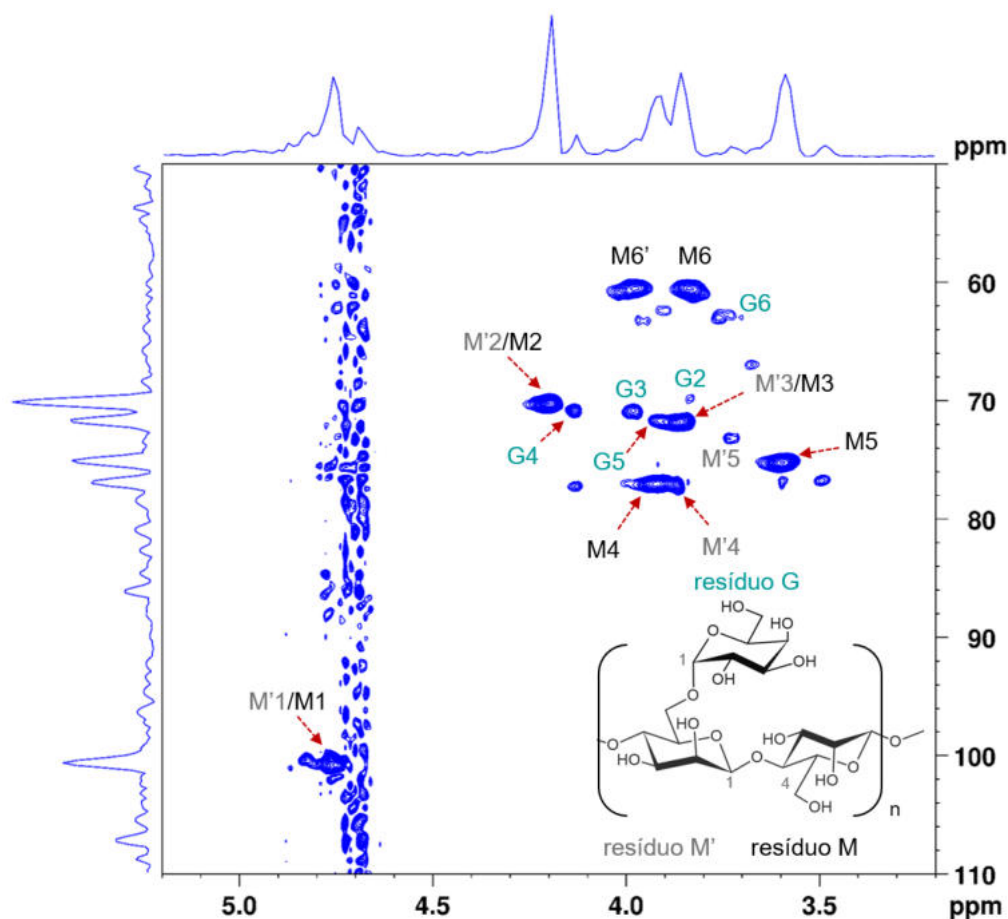


Tabela 8. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (ppm) de HSQC do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) analisado em RMN em solução com criosonda, padrão de manana linear do marfim vegetal analisado em RMN com criosonda.

	δ (ppm)					
	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H'-6 – H-6/C-6
<i>E. oleracea</i>	4,75/100,8	4,20/70,3	3,87/71,8	3,92/76,9	3,60/75,2	3,82-3,97/60,5
Manana linear	4,76/100,8	4,20/70,3	3,86/71,8	3,92/77,1	3,59/75,2	3,84-3,98/60,6

Além da cadeia principal de resíduos de manose, não foi possível notar que o polissacarídeo isolado tinha sinais de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ no HSQC atribuídos a ressonância de resíduos D-Galp unidos por ligações α -(1 \rightarrow 6) (Tabela 9), pois os sinais correspondentes ao carbono

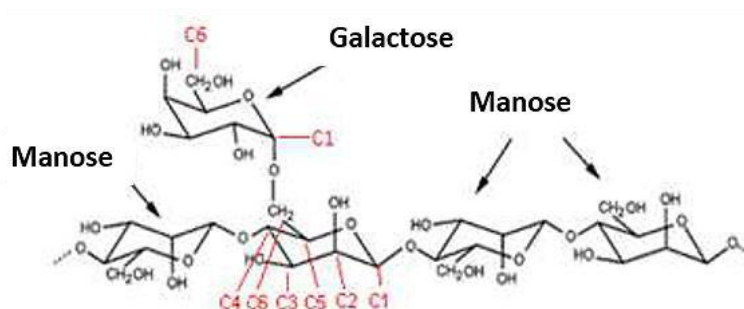
anomérico da galactose e à posição C-6 da manose substituída não foram detectados. Ademais, foi possível identificar outro tipo de unidade de manose além do resíduo da cadeia principal unidos por ligações β -(1 \rightarrow 4). A presença de resíduos 4,6- ligados gera mudanças nos deslocamentos químicos dos núcleos H-4/C-4 (3,60/76,9 ppm), H-5/C-5 (3,74/73,1 ppm) e H-6/C-6 (3,92/66,9 ppm), compondo os sinais identificados para os resíduos \rightarrow 4,6)-Man-(1 \rightarrow , que também foram identificados na amostra (Figura 23).

Tabela 9. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (ppm) de HSQC do polissacarídeo insolúvel isolado de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) analisado em RMN com criosonda; galactomanana de *Prosopis affinis*; galactomanana de *Cassia obtusifolia*.

Resíduo	Amostra	δ (ppm)					
		H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6
(M) \rightarrow 4)- Man- (1 \rightarrow	<i>E. oleracea</i>	4,75/100,8	4,20/70,3	3,87/71,8	3,92/76,9	3,60/75,2	3,82/60,5
	<i>P. affinis</i> *	4,71/100,5	4,09/70,3	3,77/71,8	3,84/77,3	3,51/75,5	3,86/60,9
	<i>C. obtusifolia</i> *	4,63/100,4	4,01/70,2	3,70/71,6	3,71/76,7	3,49/75,2	3,79/60,7
(M') \rightarrow 4,6)- Man- (1 \rightarrow	<i>E. oleracea</i>	4,87/101,0	4,20/70,3	3,87/71,8	3,60/76,9	3,74/73,1	-
	<i>P. affinis</i> *	4,71/100,5	4,09/70,3	3,77/71,8	3,79/77,2	3,71/73,8	3,92/66,9
	<i>C. obtusifolia</i> *	4,63/100,2	4,01/70,2	3,70/71,6	3,71/77,0	3,64/73,9	3,85/66,7
(G) Gal- (1 \rightarrow	<i>E. oleracea</i>	-	3,67/66,8	3,83/69,6	4,13/70,7	3,98/70,9	3,74/62,4
	<i>P. affinis</i> *	4,98/99,2	3,79/68,8	3,90/69,8	3,96/69,7	3,85/71,7	3,72/61,6
	<i>C. obtusifolia</i> *	4,91/99,0	3,71/68,6	3,84/69,6	3,88/69,5	3,79/71,5	3,65/61,4

*(Feng *et al.*, 2018; Vilaró *et al.*, 2018)

Figura 23 - Resíduos de β -D-1,4-Manp, resíduo de β -D-1,4,6-Manp, resíduo de α -D-Galp presentes na manana linear identificada por RMN.



Fonte: Adaptado de (Gillet *et al.*, 2014)

A cadeia principal β -(1 \rightarrow 4)-manopiranosídica, com cadeias laterais α -(1 \rightarrow 6)-galactopiranosídicas, é identificada em galactomananas de *Prosopis affinis* (Vilaró *et al.*, 2018) e de *Cassia obtusifolia* (Feng *et al.*, 2018). A composição de monossacarídeos da manana de sementes de açaí identificada pela caracterização por CG, no entanto, revelou uma proporção de manose para galactose na razão de 50:1. Essa proporção caracteriza uma

manana linear, uma vez mananas lineares são caracterizadas como polissacarídeos contendo mais de 90% manose, enquanto galactomananas apresentam uma proporção molar é tipicamente manose:galactose de 4:1 (Moreira; Filho, 2008; Muschin; Yoshida, 2012). Contudo, a metodologia analítica precisa ser otimizada para confirmar a presença de ramificações de galactose

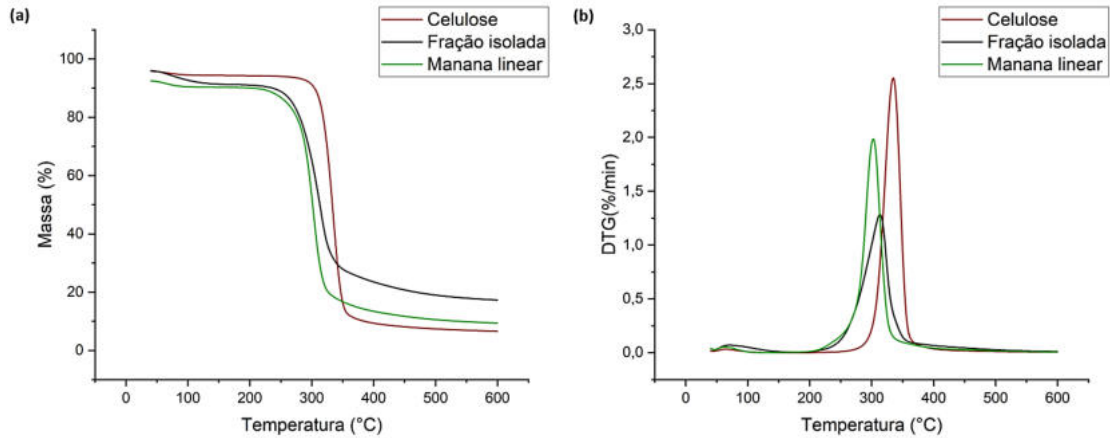
Os resíduos de glicose que poderiam estar presentes na cadeia principal da manana linear têm deslocamentos químicos previstos por bancos de dados de estruturas de carboidratos de plantas (<http://csdb.glycoscience.ru/database/>). No entanto, nenhum dos sinais de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ puderam ser identificados na amostra de manana isolada de sementes de açaí. Portanto, a glicose detectada na caracterização de monossacarídeos não provém da estrutura da manana. Além disso, o alto teor identificado pela caracterização composicional e o pico característica do cristal de celulose identificado na análise de DRX, reforçam a hipótese de uma contaminação da manana com celulose da matéria-prima. Considerando a presença desse polissacarídeo, o contaminante não teria sido identificado anteriormente por RMN, pois a celulose não se solubiliza em ureia a menos que esteja em meio alcalino e, portanto, não foi detectado (Xiong *et al.*, 2014). Da mesma forma, a cristalinidade da celulose não foi detectada por RMN de sólidos, uma vez o alargamento da base do espectro impediu sua visualização.

A fim de avaliar a presença de contaminação por celulose, a fração isolada das sementes de açaí foi avaliada por RMN tentando outro solvente que fosse capaz de solubilizar ambos os polissacarídeos. A literatura indica a aplicação de uma metodologia em gel para analisar celulose por RMN, com um sistema de solvente de DMSO- d_6 e piridina- d_5 (Kim; Ralph, 2014). No entanto, ao avaliar essa metodologia não tivemos sucesso, pois com os espectros de HSQC coletados não foi possível se quer determinar os resíduos de manose na amostra. Por isso optou-se por confirmar a presença de celulose na amostra por outra metodologia analítica.

6.2.5 Confirmação do conteúdo de glicose no polissacarídeo isolado das sementes de açaí

A termogravimetria é uma ferramenta de análise que pode fornecer essas informações sobre a composição química e a estabilidade térmica de misturas a partir do comportamento de degradação térmica único de cada material quando exposto a uma rampa de temperatura. Assim, a análise térmica conduzida foi dividida de acordo com as regiões distintas de perda de massa relacionadas a decomposição de cada componente, onde ocorre à ruptura ou formação de ligações (Figura 24a) (Santos *et al.*, 2020).

Figura 24 - Resíduos de (a) curva de termogravimetria do padrão de celulose microcristalina, da fração de polissacarídeos isolada de sementes de açaí e padrão de manana linear de marfim vegetal; (b) derivada da curva de termogravimetria do padrão de celulose microcristalina, da fração de polissacarídeos isolada de sementes de açaí e padrão de manana linear de marfim vegetal.

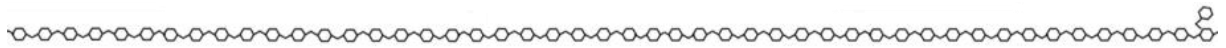


O primeiro evento de perda de massa da fração de polissacarídeos insolúveis que foi isolada de sementes de açaí é atribuída a perda de umidade da amostra em temperaturas de até 150 °C. No segundo evento de perda de massa foi alcançada a temperatura máxima de decomposição do polissacarídeo a 313 °C, o que pode ser associado a decomposição da manana linear, uma vez que o comportamento térmico de degradação da amostra foi inicialmente semelhante ao do padrão de manana linear de marfim vegetal também avaliado (Lima *et al.*, 2021c). Entretanto, a curva da derivada da amostra apresentou um deslocamento no decaimento do pico, o que pode estar associado ao aumento da reatividade das ligações glicosídicas decorrente da presença de um segundo componente, a celulose (Figura 24b) (Alves *et al.*, 2021). Conforme notado, a curva da derivada do padrão de celulose microcristalina avaliada indica que a celulose necessita de mais energia para quebra de suas ligações comparado a manana linear, resultando em diferentes temperaturas máximas de degradação, 334 °C e 313°C, respectivamente. Cabe notar que a fração isolada tinha um percentual mássico final superior ao dos padrões de polissacarídeos puros, o que pode indicar a presença de sais ainda aderidos a amostra decorrente de uma possível diálise incompleta ao final do fracionamento das sementes.

Com isso, esta análise forneceu mais uma evidência para a hipótese de contaminação da amostra com celulose, indicando que o percentual de glicose identificado na caracterização composicional não advém da estrutura da manana.

Assim, a caracterização estrutural foi capaz de identificar que o endosperma da semente de açaí madura é composto por uma estrutura de manana linear de cadeia principal formada por resíduos de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-Manp e uma possível ramificação de resíduos $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-Galp na razão de 50:1 unidades de man:gal, que precisa ser confirmada (Figura 25).

Figura 25 - Estrutura de manana linear identificada no endosperma de sementes de açaí maduras.



Fonte: Elaboração própria.

6.3 ELUCIDAÇÃO *IN SITU* DA ESTRUTURA DA MANANA DE SEMENTES DE AÇAÍ

As metodologias analíticas utilizadas até o momento permitiram identificar que a manana contida na semente de açaí madura é linear. No entanto, essas mesmas metodologias apresentaram dificuldades na separação da fração do polissacarídeo alvo. Isso se deve à complexidade e heterogeneidade da parede celular vegetal, com diversos polímeros interconectados, o que torna a caracterização completa de polissacarídeos da parede celular vegetal, especialmente em seu estado nativo, um desafio. Além de poder haver a contaminação do polissacarídeo que se quer avaliar, Chanzy *et al.* (1984) reportou que a manana linear quando extraída com clorito e álcali pode sofrer despolimerização ao longo do processo, alterando seu grau de polimerização de 250-2500 a 15-80.

Dessa forma, para superar os problemas de contaminação e evitar perder informações da estrutura do polissacarídeo isolado da parede celular vegetal, foi implementada outra estratégia para entender a estrutura da manana diretamente no tecido vegetal da semente de açaí. Dentre as ferramentas analíticas disponíveis, as abordagens que utilizam anticorpos monoclonais ou outros tipos de sondas moleculares para a detecção de componentes provocam uma modificação mínima ou nenhuma do carboidrato analisado *in situ*. Portanto, foram utilizadas duas metodologias complementares de imun química: inicialmente foi traçado o perfil glicômico das sementes de açaí via metodologia CoMPP, uma abordagem *in vitro* (Pattathil *et al.*, 2010), seguido da imunolocalização, uma técnica *in situ* para avaliar seções de tecido vegetal (Avci; Pattathil; Hahn, 2012; Pattathil *et al.*, 2015).

6.3.1 Avaliação do perfil glicômico da semente de açaí madura via COMPP

Com a metodologia do CoMPP, foi realizada a triagem das sondas moleculares que poderiam ser utilizadas para a identificação e localização da manana em sementes de açaí. Além disso, uma vantagem significativa da técnica é que esta também permite fazer o mapeamento de alto rendimento dos glicanos presentes na parede celular (Moller *et al.*, 2007), permitindo assim verificar a presença de outros componentes nas sementes de açaí.

Para essa técnica, as sementes foram extraídas por um tratamento sequencial com solventes que extraíssem as principais classes de polímeros da parede celular. Da mesma forma como nas análises anteriores, as sementes precisaram ser fracionadas e a extração foi realizada a partir do AIR, pois a extração alcoólica da amostra é fundamental para reduzir os artefatos e o *background* da análise (Kračun *et al.*, 2017). Os polissacarídeos extraídos foram impressos em microarranjos, sendo imobilizados em nitrocelulose por meio de ligações não covalentes, conforme descrito (Moller *et al.*, 2007). Esses arranjos foram marcados com anticorpos monoclonais e módulos de ligação a carboidratos com especificidades para os mais variados componentes da parede celular vegetal. Os sinais pontuais resultantes forneceram informações sobre a abundância relativa dos epítomos reconhecidos no conjunto de amostras.

Os resultados foram organizados na forma de um mapa de calor do perfil glicômico das sementes comparados ao de um tecido vegetal padrão de *Arabidopsis* e padrões de manana linear de marfim vegetal, glucomanana de konjac, galactomanana de guar e galactomanana de alfarroba, utilizados como controle, conforme recomendado em trabalho anterior (Marcus *et al.*, 2010). A Figura 26 reúne todos os resultados obtidos por CoMPP.

Antes de seguir com a interpretação dos resultados, é importante salientar duas informações. As avaliações da estrutura de manana foram realizadas anteriormente a partir da manana insolúvel obtida ao final do fracionamento das sementes, enquanto a metodologia CoMPP avaliou os polissacarídeos solúveis dos extratos obtidos em cada etapa de fracionamento. Ademais, embora alguns anticorpos não tenham se ligado aos glicanos nos ensaios *in vitro*, não necessariamente significa que a classe de glicanos não esteja presente no tecido analisado, pois a estrutura química dos polissacarídeos pode ser alterada devido ao uso de reagentes químicos agressivos durante a extração para análise *in vitro* (Avci; Pattathil; Hahn, 2012).

Oito anticorpos monoclonais primários foram selecionados para investigar a presença de epítomos de manana nas sementes de açaí maduras (estágio 4). Nos diferentes extratos avaliados, as respostas dos anticorpos variaram em intensidade. Observou-se que os epítomos de manana estavam presentes apenas nos extratos alcalinos, aos quais os anticorpos se ligaram. Todavia, alguns anticorpos dos grupos de manana não apresentaram reação cruzada com as amostras.

Conforme descrito na literatura, o mAb CBM27 se liga ao polissacarídeo de manana, entretanto é menos versátil no reconhecimento de uma ampla gama de estruturas (Marcus *et al.*, 2010) e, por isso, não foi capaz de analisar padrões de distribuição geral na parede celular das sementes de açaí. Foi apontado que o CBM se ligou fracamente às paredes celulares primárias em caules de ervilha, sendo mais seletivo a oligossacarídeos mais longos, condições contrárias ao encontrado na manana extraída com NaOH. Igualmente, nenhum sinal foi detectado para os mAbs CCRC-M70, M167 e M175, que se ligam com restrições a epítomos específicos de galactomanana, portanto, reconhecem um número limitado de estruturas desse polissacarídeo (Pattathil *et al.*, 2015).

Estudos realizados por Marcus *et al.* (2010) com o anticorpo LM22, em diferentes contextos, avaliaram a especificidade e os padrões de ligação do mAb com epítomos de manana em diferentes espécies de plantas e tecidos. Notou-se que o mAb LM22 tem ligação restrita a certas estruturas, apresentando especificidade a galactomananas e principalmente glucomanana acetilada que foi associada a epítomos presentes em elementos de vasos de xilema em desenvolvimento. Com seu reconhecimento limitado, o mAb LM22 também não se ligou aos extratos alcalinos das sementes de açaí. Considerando que, o respectivo epítomo de manana poderia ter sido removido ou poderia ter perdido o grupamento acetil com o uso dos solventes, um novo arranjo foi avaliado. O arranjo foi projetado para que fosse avaliado o material extraído das sementes *in natura*, no entanto, o mAb ainda assim não gerou sinal. Da

mesma forma, epítomos de glucomananas acetiladas não foram detectadas nos extratos de semente de açaí, pois o mAb CCRC-M170, de ligação específica para esse epítomo (Pattathil *et al.*, 2010), também não gerou sinais.

Dos anticorpos utilizados, dois deles, LM21 e BS-400-4, detectaram o epítomo específico de manana nos extratos das sementes de açaí, gerando respostas de intensidade variada. Isso indica que, além da fração insolúvel em álcali de manana que foi identificada no endosperma das sementes de açaí e caracterizada, também há uma fração solúvel em álcali do polissacarídeo nas sementes.

O anticorpo LM21 apresenta uma especificidade de ligação a uma ampla gama de estruturas de β -(1 \rightarrow 4)-D-(galacto)(gluco)manana, o que ficou evidente com a ligação do mAb não só aos epítomos presentes no extrato como também aos padrões de manana linear, galactomanana e glucomanana também avaliados. A literatura indica que o mAb se liga efetivamente a manano-oligossacarídeos com graus de polimerização 4, 5, ou menor, assim como a alguns oligossacarídeos derivados de galactomanana. Sua versatilidade também se aplica a detectar manana em diferentes tecidos vegetais, incluindo o tegumento e endosperma de sementes de *Lotus corniculatus*, paredes celulares primárias de tabaco e ervilha, além de paredes celulares primárias epidérmicas, corticais, e parede celular do parênquima medular avaliados por Marcus *et al.* (2010). Desse modo, o LM21 se mostrou uma sonda versátil para investigar a distribuição e função da manana na parede celular das sementes de açaí.

Por outro lado, o mAb BS400-4 tem ligação específica a epítomos referentes a resíduos β -(1 \rightarrow 4)-D-Manp, que são componentes chave de mananas lineares (Pettolino *et al.*, 2001). Tal observação pode ser corroborada com a intensidade máxima de marcação do anticorpo ligado ao epítomo de manana linear de marfim vegetal solubilizado em álcali, o padrão majoritariamente composto por esses resíduos. O mAb BS400-4 também se ligou a esses epítomos presentes nos extratos de galactomananas que apresentam esses resíduos em sua cadeia principal, com sinais mais intensos em galactomananas de alfarroba (Gal:Man, 22:78) do que as de guar (Gal:Man, 38:62), devido a maior afinidade para aqueles com maior proporção de manose, isto é, menor número de ramificações.

6.3.2 Avaliação *in situ* de manana na semente de açaí madura

Uma vez traçado o perfil de manana nos extratos das sementes de açaí, foi preciso entender a distribuição do polissacarídeo no tecido vegetal, por meio de uma avaliação *in situ*. Para esses ensaios foram utilizadas sementes frescas para preservar a célula íntegra, sem

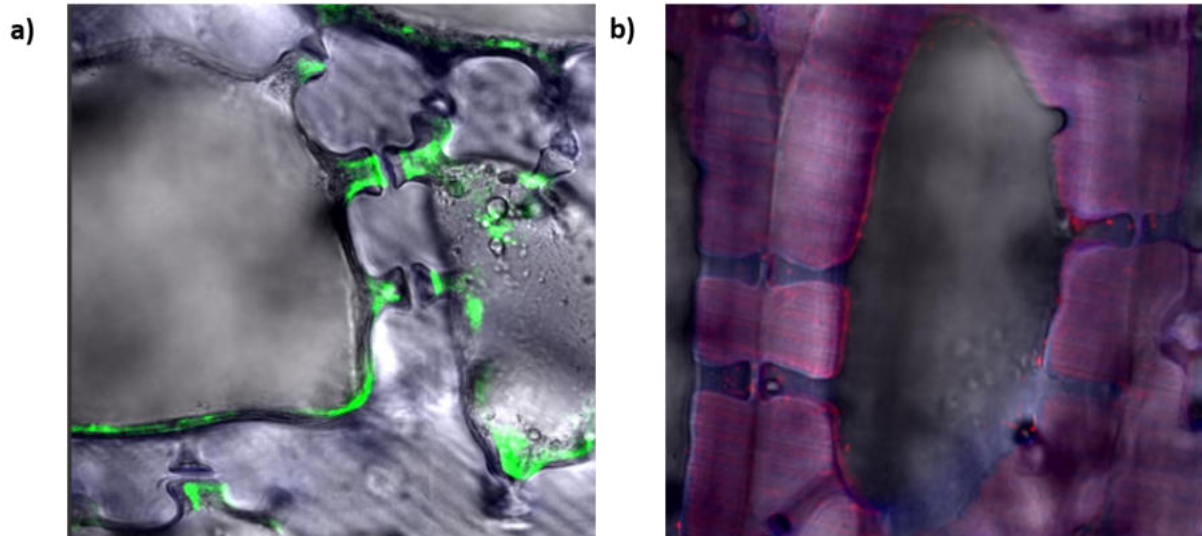
correr o risco de ter rompido durante um processo de congelamento. No entanto, foi possível notar que o embrião estava contaminado devido a visualização de hifas características de fungos e, portanto, as observações do tecido vegetal das sementes de açaí não incluíram a região do embrião.

Diversos testes foram realizados até que a metodologia fosse devidamente ajustada para análise das sementes de açaí. Para garantir praticidade, avaliou-se a possibilidade de realizar a secção do material no dia anterior à microscopia. No entanto, as imagens obtidas não foram satisfatórias, indicando a necessidade de utilizar paraformaldeído a fim de inibir qualquer atividade enzimática que pudesse ocorrer ao cortar o tecido e romper as células. Nas primeiras avaliações por microscopia apareceram grânulos em movimento, sugerindo que poderiam ser anticorpos não ligados. Por isso, o tempo de incubação com a sonda foi aumentado. Inicialmente, o bloqueio das secções foi realizado utilizando leite-PBS, mas o ensaio não foi bem sucedido e levantou-se a hipótese de que as proteínas do leite poderiam estar interferindo na ação dos mAbs. Portanto, a solução de bloqueio foi substituída por BSA. Desse modo, feitas as devidas adequações da metodologia, os ensaios puderam ser executados.

Para análise *in situ* da presença de manana linear no endosperma de sementes de açaí, os anticorpos primários utilizados foram escolhidos com base nos resultados do perfil glicômico dos extratos da semente. Foram usados apenas os dois anticorpos específicos de manana que detectaram o epítipo e um terceiro que não apresentou sinal. O LM21 se ligando (representado pela coloração verde) e BS-400-4 (representado pela coloração vermelha) e o LM22 (representado pela coloração verde) (Ahl *et al.*, 2019).

Como pode ser observado com as microscopias (Figura 27), as células do endosperma apresentam invaginações na parede celular, como *pits*, os quais se alinham à das células vizinhas. É em torno dessas particularidades das células que os diferentes epítipos de manana estão armazenados, porém em compartimentos intracelulares distintos. A ligação dos mAbs em diferentes regiões indica que há diferentes epítipos de manana, conseqüentemente diferentes classes do polissacarídeo.

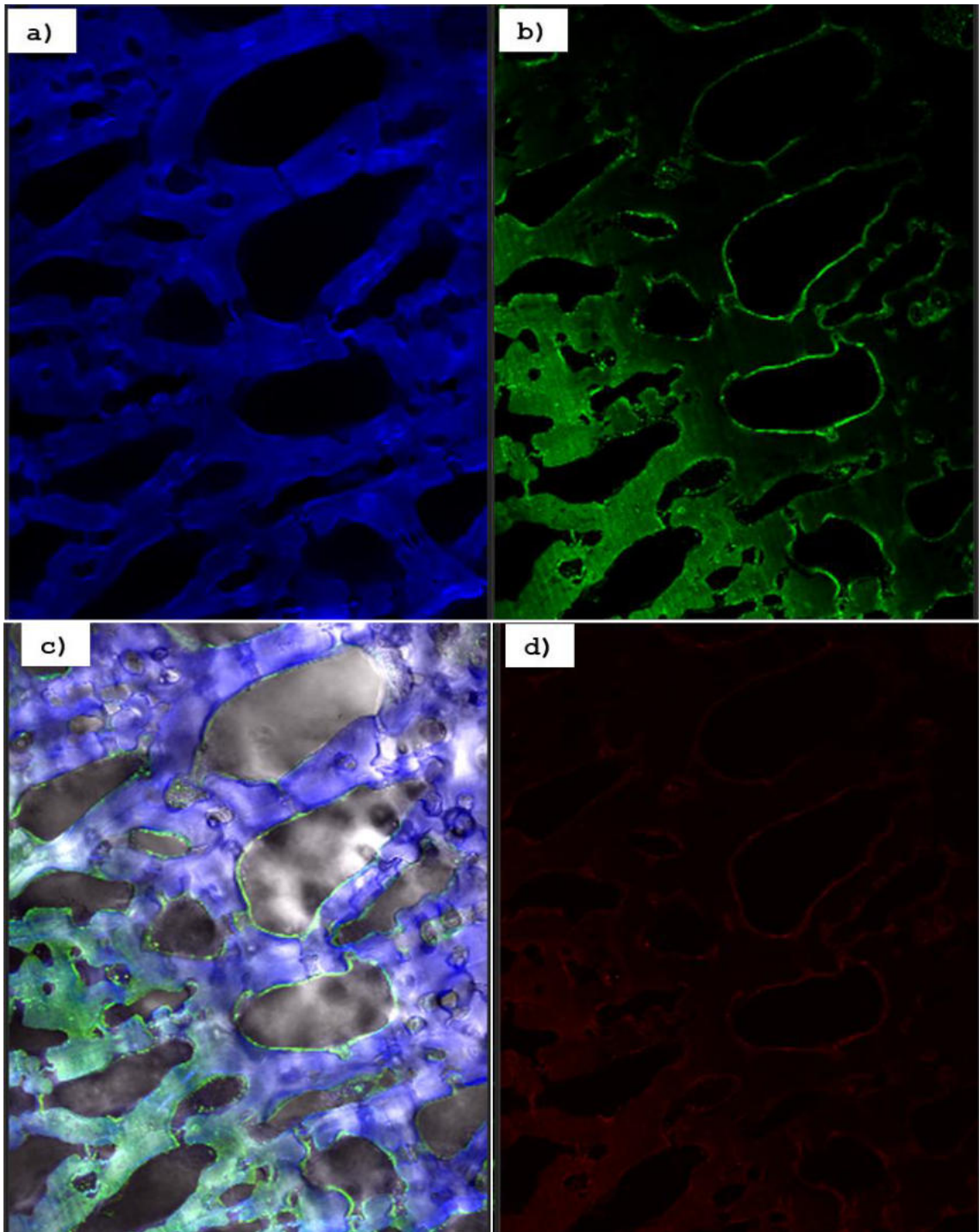
Figura 27 - Detecção *in situ* de epítomos de manana no endosperma de sementes de açaí usando duas sondas de anticorpos monoclonais. (a) Imunolocalização com LM21 (sinal verde); (b) Imunolocalização com BS-400-4 (sinal vermelho).



O mAb LM21 indicou que há mananas presentes na parte interna da parede celular, circundando a parede e se acumulando principalmente nas regiões de invaginações. Em contrapartida, o mAb BS400-4, associado a fluorescência vermelha, fracamente indicou a localização da manana nessa camada interna da parede celular. Para investigar se a fraca ligação do mAb BS400-4 era devida à análise ter sido feita com diferentes amostras, foi realizada uma nova análise com diferente preparo de amostra. Em vez de usar uma amostra diferente para marcar com cada anticorpo, a mesma amostra foi submetida aos anticorpos LM21 e BS400-4. Assim, foi possível observar uma correspondência nas regiões onde os epítomos de manana estão presentes, parte interna da parede celular vegetal em contato com a membrana plasmática, onde foi detectada uma maior intensidade de fluorescência (Figura 28).

É provável que o epítipo de manana linear estivesse oculto no tecido quando avaliado *in situ*. A acessibilidade do mAb ao epítipo pode ter sido limitada pela espessura e densidade da parede, o que tornou a manana inacessível, possivelmente devido ao bloqueio por outros carboidratos presentes na estrutura altamente compactada. Na análise por CoMPP, não houve inacessibilidade do mAb BS400-4, pois o estudo foi feito em extratos que continham uma fração de manana solúvel minoritária, nos quais os epítomos foram expostos ao usar reagentes abrasivos para a extração do material vegetal.

Figura 28 - Colocalização de *Calcofluor white*, LM21 e BS-400-4 no endosperma de sementes de açaí. (a) Delimitação das organelas celulares por *Calcofluor white* (sinal azul); (b) Imunolocalização com LM21 (sinal verde); (c) Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul), LM21 (sinal verde) e BS-400-4 (sinal vermelho); (d) Imunolocalização com BS-400-4 (sinal vermelho).

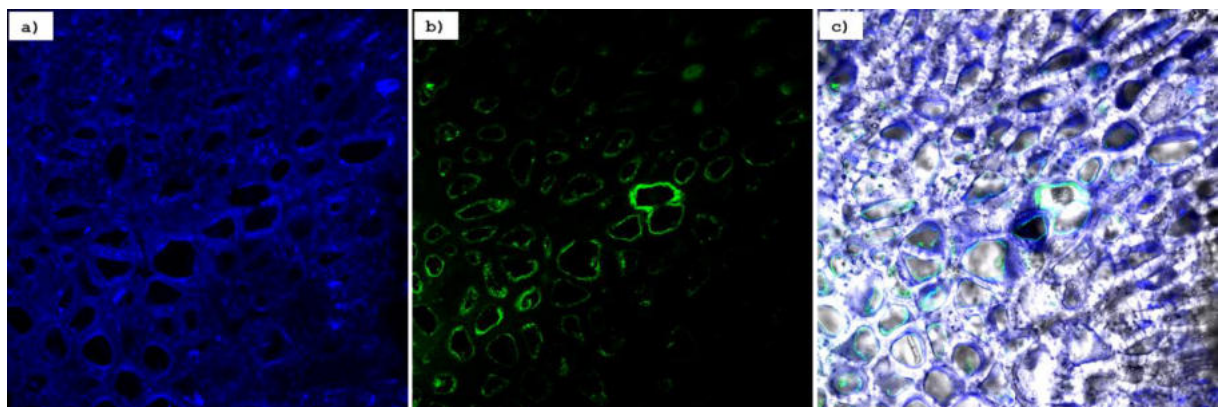


A não ligação do mAb BS400-4 aos epítomos de manana foi anteriormente relatado por Ahl *et al.* (2019) em tecidos foliares de *Aloe*, os quais precisaram ser tratados com NaOH de modo a aumentar o espaço entre as cadeias de polissacarídeos com a remoção de pectinas

ou qualquer outro componente que pudesse estar atrapalhando o acesso do mAb ao epítopo. O mesmo pode ser notado em *pits* da parede celular de alguns tecidos de plantas, em que a presença do polissacarídeo péctico homogalacturonana impactou significativamente na acessibilidade do mAb LM21 ao seu respectivo epítopo de manana (Marcus *et al.*, 2010). A atuação limitada do anticorpo LM21 a epítomos de manana também foi observada em outras sementes recalcitrantes de palmeira. As sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*) possuem a parede celular do endosperma espessa e rica em mananas, que são responsáveis por conferir rigidez e estrutura às células, contribuindo significativamente para o armazenamento de reservas energéticas. Entretanto, para fazer as imunomarcações de epítomos de mananas com LM21 foi preciso fazer um tratamento enzimático prévio do material vegetal (Dias *et al.*, 2020).

O anticorpo LM22 também foi avaliado para imunolocalização de manana nas sementes de açaí (Figura 29). O padrão de marcação de imunofluorescência do mAb LM22 foi similar ao do LM21, porém com sinais mais intensos em algumas regiões. As microscopias reforçam a presença de manana na parte interna da parede celular do endosperma de sementes de açaí.

Figura 29 - Imunolocalização do endosperma de sementes de açaí utilizando o mAb LM22. (a) Delimitação das organelas celulares por *Calcofluor white* (sinal azul); (b) Imunolocalização com LM22 (sinal verde); (c) Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul) e LM22 (sinal verde).



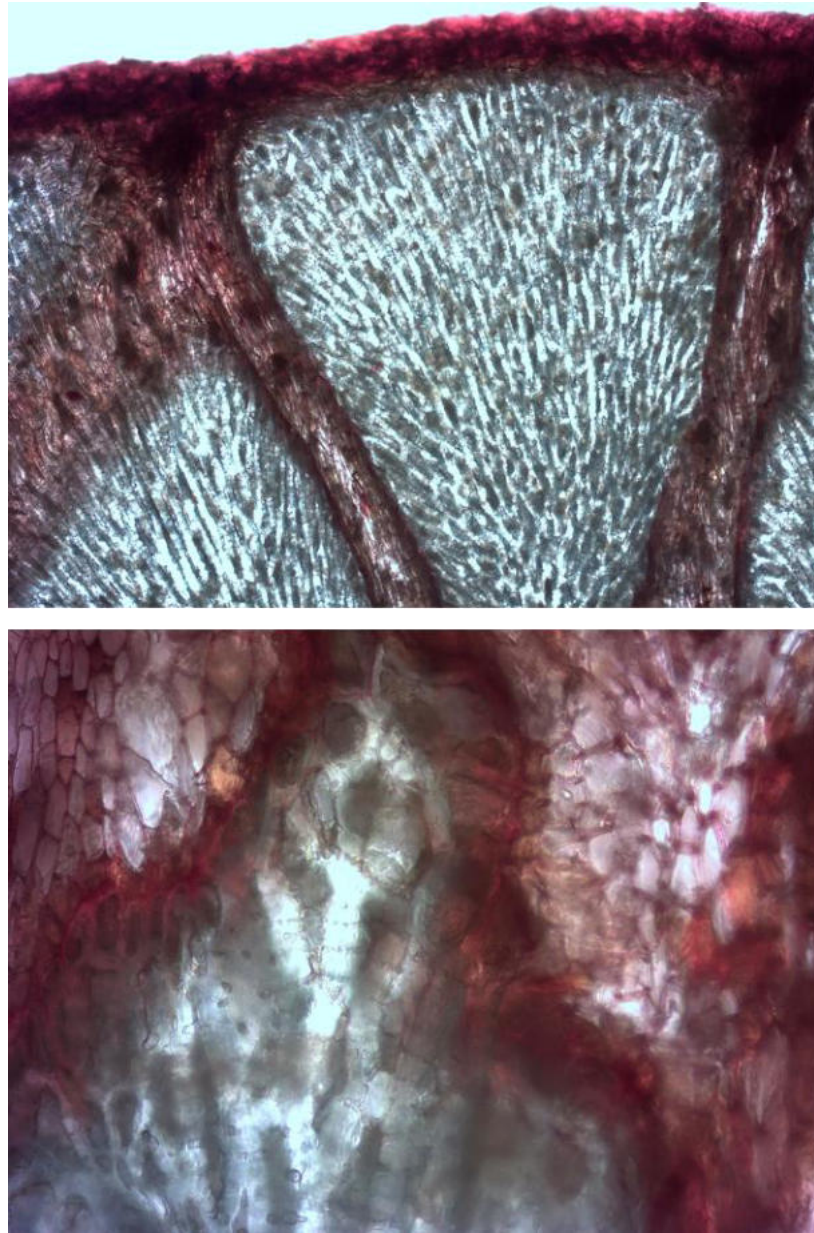
Handford *et al.*(2003) cita em seu trabalho que a diferença de marcação de manana entre as células do xilema no caule de *Arabidopsis* poderiam ser decorrentes da interação de mananas com celulose, ou diferenças na lignificação ou acetilação das mananas. A celulose e a lignina são estruturas também insolúveis assim como a fração de manana das sementes de açaí. Como as análises de CoMPP geraram um resíduo insolúvel ao final da extração alcalina, foi avaliado se esses outros polímeros poderiam estar presentes na célula juntamente a

manana linear insolúvel e, conseqüentemente, sua presença estaria dificultando a acessibilidade do mAb ao seu respectivo epítopo.

6.3.3 Avaliação *in situ* de diferentes componentes no tecido de sementes de açaí

A caracterização composicional das sementes de açaí apresentada no início deste estudo indicou que 18% do conteúdo das sementes seriam resíduos sólidos que não foram hidrolisados em ácido durante o processo. Parte desses sólidos poderiam estar associados à presença de lignina no material, entretanto são necessários estudos mais específicos para correlacionar a presença de lignina as sementes. Por essa razão, a presença de lignina em sementes de açaí foi avaliada *in situ* pelo Método Wiesner (Figura 30). Nesse método, a coloração com fluoroglucinol reage com os grupos fenólicos, resultando em uma cor roxo-avermelhada. À medida que a presença desses grupos terminais reduz, a coloração vai de laranja/vermelha intensa para amarelo-claro (Głazowska *et al.*, 2018).

Figura 30 - Microscopia de secções de sementes de açaí com fluoroglucinol para observação de componentes poliméricos.



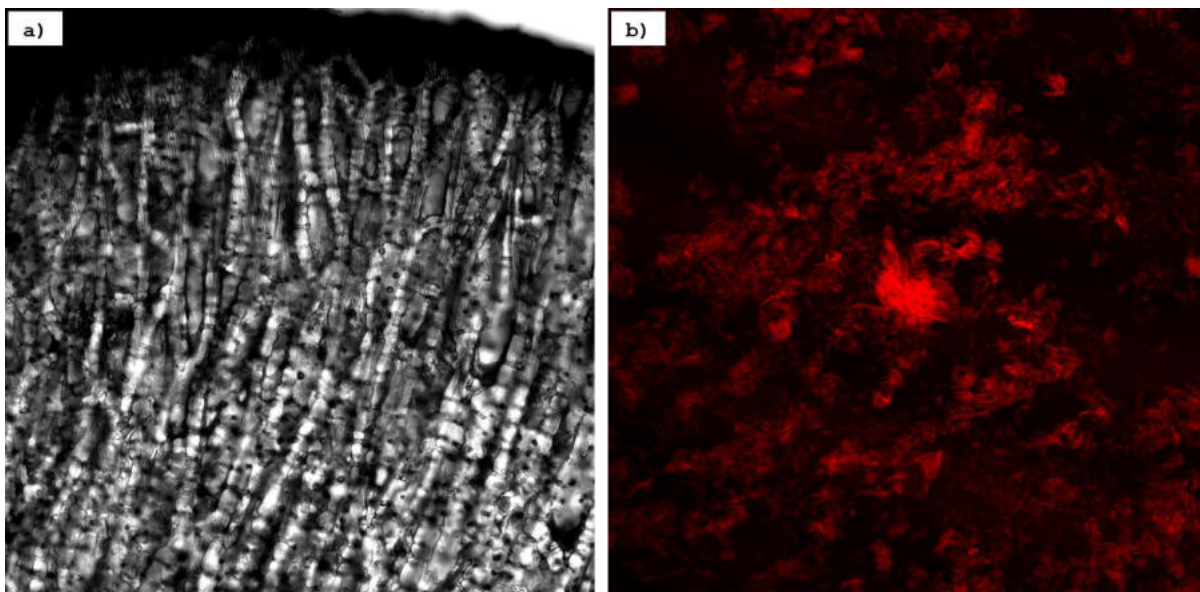
No entanto, esse método não é específico a lignina, pois também abrange a outros compostos fenólicos. Com as microscopias da sementes é possível notar a intensificação da coloração na camada mais externa das sementes e na região do tegumento ruminado, onde há a concentração de procianidinas (Martins *et al.*, 2020). Portanto, os sinais podem ser apenas uma reação colorimétrica com os compostos fenólicos presentes nessa região. Além do trabalho de caracterização detalhada das procianidinas realizado por Martins e colaboradores (2020), a presença de compostos fenólicos foi corroborada por testes histoquímicos com o corante cloreto férrico realizados por Pereira (2017). Os trabalhos indicam a concentração dos

compostos fenólicos na região do tegumento e próximo ao embrião, nas células de idioblastos, em camadas próximas da protoderme circundando o meristema apical e o radicular.

Outro componente recalcitrante que poderia haver na parede celular vegetal é a celulose. O perfil glicômico das sementes de açaí determinado pelo CoMPP não identificou nenhum epítipo de celulose, porém se presente no material a celulose cristalina não seria solubilizada e iria compor, juntamente a manana cristalina, a fração insolúvel restante das extrações sequenciais.

Uma alternativa para avaliar a presença de celulose foi visualizar o polissacarídeo utilizando o corante fluorescente *Pontamine Fast Scarlet 4B*, de alta especificidade a celulose gerando sinais de coloração vermelha (Figura 31). Comparado aos sinais obtidos no controle de celulose microfibrilada avaliada, não foi notada coloração vermelha nas células, logo, não foram detectados sinais de celulose nas células do endosperma da semente de açaí (Figura 31). Há a possibilidade da celulose que contaminou a fração insolúvel de manana isolada ser proveniente das fibras mesocárpicas no material. No marfim vegetal, por exemplo, as células do endosperma não apresentam lignina, porém além da manana linear em proporções majoritárias (72% m/m), há também a presença de celulose (7% m/m) (Carvajal-Barriga *et al.*, 2023). Novas avaliações complementares precisariam ser feitas para a avaliar do polissacarídeo no endosperma.

Figura 31 - (a) Microscopia de secções de sementes de açaí coradas com pontamin scarlet sem sinais detectáveis de celulose; (b) Controle da marcação com o corante em controles de celulose microfibrilada indentificadas pela coloração vermelha.



Ainda que haja similaridades da manana linear de sementes de açaí com as de marfim vegetal, cabe destacar que diferente da manana de marfim que foi solúvel em NaOH, a manana das sementes de açaí permaneceu insolúvel, indicando suas características estruturais distintas. Essa observação sugere que a manana das sementes de açaí seja mais recalcitrante e possui uma estrutura provavelmente mais compactada do que a manana linear do marfim vegetal. Com isso, talvez a imunolocalização realizada das mananas em sementes de açaí pode ter mostrado apenas a fração de manana solúvel no interior da célula, estando a fração insolúvel na parede celular inacessível aos anticorpos.

As diferentes localizações da manana na célula podem estar correlacionadas com sua função. Entende-se que, assim como em certas sementes monocotiledôneas de palmeiras, nas sementes de açaí as mananas desempenham uma função dupla. A manana linear seria encontrada em grandes quantidades, especialmente nas paredes celulares extremamente espessas do endosperma. Nessa parede celular, a manana atua como componente estrutural, conferindo dureza e protegendo as sementes contra danos mecânicos. Esses polissacarídeos insolúveis em água são remobilizados por ação enzimática para absorção celular, onde atuariam como reservatório de energia. Dessa forma, a manana serviria como forma de armazenamento de energia, intracelularmente ou *in muro* (Herburger; Głazowska; Mravec, 2022).

6.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL GLICÔMICO DAS SEMENTES DE AÇAÍ AO LONGO DA MATURAÇÃO DO FRUTO

O polissacarídeo seria uma reserva de energia para o embrião em desenvolvimento, de modo que também confere dureza para proteção do embrião contra danos mecânicos durante os longos períodos de germinação (Buckeridge, 2010). Em algumas espécies, no entanto, foi demonstrado que este polissacarídeo sofre mudanças significativas em sua estrutura durante o amadurecimento dos frutos (Meier; Reid, 1982). O metabolismo da parede celular pode mudar de síntese para a degradação de manana ao longo da maturação e germinação do fruto (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012).

Estudos recentes fornecem evidências de que o mesmo fenômeno ocorre ao longo de desenvolvimento do açaí, pois Neto *et al.* (2018) reportou presença mais elevada de α -galactosidases (responsáveis por clivar ramificações de galactose na cadeia principal de manana) nos estágios intermediários de desenvolvimento do fruto, enquanto Miguez (2020)

identificou uma razão molar entre manose:galactose de 64:20, nos estágios intermediários de desenvolvimento do fruto que foi equivalente a 86:3 na semente madura.

A espécie *Euterpe edulis* pertencente ao mesmo gênero do açazeiro possui frutos, conhecidos como juçara, de sabor e propriedades similares ao açaí. Nas sementes de juçara, por exemplo, a cristalinidade das sementes aumenta durante a maturação do fruto, o que pode ser um indicativo da mudança na estrutura da manana (Mello *et al.*, 2024). Estudos realizados no mestrado forneceram evidências de que o mesmo deve ocorrer em sementes de açaí, onde a galactomanana se acumula nas fases iniciais de desenvolvimento do fruto e, ao longo do processo de amadurecimento, se transforma em uma manana do tipo linear, pois a razão molar entre manose:galactose mudou de 64:20 para 86:3 nos estágios intermediários e maduros, respectivamente (Miguez, 2020). Assim como DeMason *et al.* (1992) observou nas sementes de *Phoenix dactylifera*, Neto *et al.* (2018) reportou que as sementes de açaí também apresentavam elevada concentração de α -galactosidases nos estágios intermediários de desenvolvimento do fruto. Tais enzimas seriam responsáveis por clivar ramificações de galactose na cadeia principal de manana, contribuindo para a alteração da estrutura de galactomanana à manana linear.

Assim sendo, foi monitorado de forma abrangente a presença e os padrões de distribuição dos glicanos da parede celular das sementes de açaí por quatro diferentes estágios de maturação. Para tanto, foram selecionados quatro estágios de desenvolvimento do fruto, dentro de uma escala crescente de maturação, com base na análise histológica. Cada grupo representou uma diferente fase do desenvolvimento, as quais foram agrupadas considerando o diâmetro do fruto, firmeza do endosperma e coloração do pericarpo. As metodologias analíticas que utilizam mAbs permitiram não apenas caracterizar o material vegetal, mas também monitorar mudanças na estrutura e composição dos carboidratos da parede celular do endosperma durante o desenvolvimento da semente (Knox, 1997).

Dentre os 56 mAbs/CBMs avaliados para traçar o perfil glicômico das sementes de açaí via CoMPP, apenas 22 geraram sinal de ligação aos seus respectivos polissacarídeos alvos, que seriam: pectina; heteroxilana; xilana; xiloglucana; glucana; e manana (Tabela 10). Os sinais referentes a ligação dos anticorpos LM11 e LM28 não foram considerados, pois os arranjos apresentaram *background*, o que poderia levar a resultados superestimados. Os resultados da ligação dos outros anticorpos permitiram avaliar os polissacarídeos solúveis que foram obtidos pelas extrações realizadas durante o fracionamento das sementes.

Continuação da Tabela 11 - Mapa de calor do perfil glicômico das sementes de açaí em quatro diferentes estágios de maturação do fruto, do controle de Arabidopsis, e de padrões de: manana linear de marfim vegetal (ML), glucomanana de konjac (GlcM), galactomanana de guar (GalM I) e galactomanana de alfarroba (GalM II). Os mAbs estão organizados de acordo com o grupo de polissacarídeos que eles têm como alvo (glucana, heteroxilana, manana, pectina, xilana, xiloglucana) para cada solvente extração (água:tween, CDTA e NaOH).

Extracção	Amostra	Gluc		HetXil		Manana			Pectina					Xilana				Xiloglucana					
		BS400-2	BS400-3	INRA-AX1	LM28	BS400-4	LM21	LM22	INRA-RU1	INRA-RU2	JIM5	JIM7	LM6	LM13	CCRC-M149	CCRC-M159	LM10	LM11	CCRC-M50	CCRC-M102	LM15	LM24	LM25
CDTA	Estágio 1	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	5	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	14	0	0	0	0	0
	Estágio 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Estágio 3	0	46	6	0	39	14	0	0	8	0	0	0	0	0	5	0	14	0	0	0	0	0
		0	26	0	0	31	10	0	0	9	0	0	0	0	9	0	0	5	0	0	0	0	0
		0	36	0	0	35	14	0	0	13	0	0	0	0	6	0	0	18	0	0	0	0	0
	Estágio 4	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	6	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Arabid	0	0	0	0	0	21	0	0	18	20	0	15	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
		11	0	0	0	0	22	0	0	14	24	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	22	0	0	5	29	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0
NaOH	Estágio 1	12	0	17	12	0	24	0	0	0	0	0	0	7	9	41	0	0	0	28	0	0	0
		13	0	7	18	0	22	0	0	0	0	0	0	0	11	30	0	0	0	17	0	0	0
		6	0	0	22	0	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	9	0	21
	Estágio 2	15	15	0	0	21	26	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	10	0	17
		12	17	0	18	20	29	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	21	20	0	30
		13	24	0	25	34	28	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	14	0	12
	Estágio 3	0	60	0	22	82	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	16	0	14	0
		0	66	0	21	87	57	0	0	9	0	0	15	0	9	0	7	9	0	0	11	0	10
		6	80	0	8	96	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Estágio 4	6	54	0	21	70	57	0	0	6	0	0	20	0	0	0	0	7	0	0	0	0	5
		6	57	0	71	74	63	0	0	9	0	0	12	0	0	12	7	0	0	0	0	0	0
		5	55	0	72	71	66	0	0	0	0	0	14	0	6	33	6	0	0	0	0	0	0
	Arabid	28	0	0	51	9	0	0	16	13	0	0	38	0	0	9	11	0	0	60	12	32	0
		29	0	0	62	10	0	0	11	11	0	0	0	0	0	20	20	0	0	59	0	28	0
		29	0	0	59	7	0	0	12	0	0	0	0	0	5	38	21	0	0	7	0	0	0

As observações realizadas nessa etapa do trabalho estão em acordo com as características morfológicas descritas por Pereira para as sementes de açaí (Pereira, 2017). No primeiro estágio de desenvolvimento das sementes, ainda não há a presença de endosperma. Neste estágio inicial, ocorre uma intensa divisão celular, responsável pelo crescimento da semente e pela formação do endosperma, que se desenvolverá nas fases subsequentes. No estágio 2, inicia-se a celularização do endosperma. Nesse momento, é possível observar uma fina camada gelatinosa no interior da semente, indicando o local onde o endosperma está começando a se formar. As células presentes nessa fase possuem paredes delgadas e estão em plena divisão celular, marcando também o início do processo de expansão celular.

No estágio seguinte, 3, a divisão celular cessa, dando lugar à expansão celular. À medida que o endosperma se desenvolve, ele passa a ocupar toda a semente. Ocorre o espessamento das paredes celulares, e as células já se apresentam como no estágio final. Até que no estágio maduro, o endosperma já consolidado apresenta células com dimensões irregulares e paredes espessas. As paredes espessas das sementes maduras apresentam campos primários de pontuação (*pits*). Essas invaginações são esperadas para células que desempenham funções relacionadas à condução de água ou que tenham comunicação intercelular intensa, como as células de xilema e algumas células do parênquima (Xu *et al.*, 2022; Yin *et al.*, 2022). Diferente do esperado para as células de sementes, esses *pits* se alinham aos da célula vizinha, porém não parecem estar conectadas como um canal de comunicação aberta. Essas particularidades da célula ainda não foram esclarecidas, e precisariam de outros estudos que melhor investigasse suas funções.

A primeira extração utilizou como solvente uma mistura de água e tween para que fossem separados polissacarídeos solúveis fracamente ligados a parede celular. O quelante de cálcio CDTA foi utilizado na extração seguinte para perturbar a parede celular primária e extrair possíveis pectinas reticuladas com íons de Ca^{2+} . Por fim, para a extração das hemiceluloses foi utilizado NaOH como base forte em uma única etapa, pois os mAbs eram específicos o suficiente para diferenciar as hemiceluloses (Kračun *et al.*, 2017).

Os mAbs LM10, CCRC-M149 e CCRC-M159 (McCartney; Marcus; Knox, 2005; Pattathil *et al.*, 2010) reconheceram o epítipo β -(1→4)-D-xilana não substituídas ou pouco substituídas nas sementes em seus quatro estágios de maturação. Os sinais de reconhecimento foram pouco consistentes entre as replicatas, sendo as sementes no estágio 1 as que apresentaram sinais mais fortes de ligação do anticorpo ao epítipo. Da mesma forma, apenas as sementes no estágio 1 de maturação do fruto apresentaram os epítipos de heteroxilanas para ligação ao mAb INRA-AX1 específico de arabinoxilanas.

As sementes nos quatro estágios de maturação apresentam nos extratos de tween sinais de ligação a epítomos de xiloglucanas fracamente ligadas aos mAbs CCRC-M50, LM15 e LM25. Com altos índices de ligação do anticorpo ao epítomo notado para as sementes no primeiro estágio, e a partir do segundo sua presença aparece em níveis constantes. Os anticorpos CCRC-M50, LM15 e LM25 se ligam a epítomos de xiloglucana não fucosiladas com pequenas diferenças dos seus respectivos epítomos em sua estrutura e localização celular, segundo aponta trabalho de imunomarcção de células de tabaco (Pattathil *et al.*, 2010). De acordo com um estudo conduzido no tecido vegetal de tabaco, a xiloglucana não fucosilada, especificamente os epítomos do anticorpo LM25, estariam localizados nas paredes que revestem os espaços intercelulares (Pedersen *et al.*, 2012). Além da fração não fucosilada, uma fração de xiloglucana fucosilada aparece mais proeminente nos dois primeiros estágios de desenvolvimento do fruto, em que os epítomos presentes no extrato alcalino se ligaram ao mAb CCRC-M102 (Pattathil *et al.*, 2010).

No estágio 3 foram detectados altos níveis de ligação do mAb BS400-3 ao epítomo de β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-D-glucana nos três extratos avaliados (Meikle *et al.*, 1994). No extrato alcalino das sementes nos estágios 2 e 4 também foi possível notar a presença desse epítomo. Entretanto, cabe ressaltar que esse mAb não é específico para ligações com glucana, pois o mAb também mostrou sinais de ligação ao padrão de manana linear de marfim vegetal. Nas sementes do estágio 1, o epítomo de glucana foi específico a ligação do anticorpo BS400-2, que seria β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana (Meikle *et al.*, 1994).

Curiosamente, os quatro estágios das sementes apresentam um epítomo de pectina fracamente ligado, pois o mAb INRA-RU2 foi capaz de se ligar ao epítomos presentes nos extratos de tween, sem que fossem utilizados reagentes quelantes específicos para extração deste polissacarícarideo. No estágio 1, os epítomos não aparecem mais no extrato de CDTA, uma vez que o tecido vegetal ainda está se formando, todavia nos extratos do estágio 2, 3 e 4 o uso do quelante foi necessário para que os epítomos fossem liberados. Tal mAb tem especificidade a cadeia principal de ramnogalacturonana I (RG-I), com dois sítios de ligação a $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$ que requer pelo menos duas repetições do dissacarídeo (Ralet *et al.*, 2010). Nos estágios iniciais 1, 2 e 3 de desenvolvimento das sementes ainda foi possível notar a presença de epítomos de homogalacturonana ligados ao mAb JIM7 (Willats *et al.*, 2000). No estágio 4, no entanto, foi possível identificar a ligação do mAb LM6 ao epítomo α -(1 \rightarrow 5)-L-arabinana presentes no extrato alcalino, característico de cadeias laterais de pectina (Willats; Marcus; Knox, 1998).

Como era esperado, dentre os glicanos avaliados foram os epítomos de manana os mais proeminentes nas sementes de açaí. As sementes no estágio 3 apresentaram os epítomos referentes aos três mAbs de ligação a manana no extrato de tween, enquanto nos extratos em CDTA e alcalino apenas foi notada a presença de epítomos de ligação aos mAbs LM21 e BS400-4. Nas sementes do estágio 2 foram detectados os epítomos dos três mAbs avaliados, os epítomos de ligação ao anticorpo LM22 no extrato de tween, e os de ligação aos mAbs LM21 e BS400-4 no extrato alcalino. Cabe destacar que nas sementes no segundo estágio de maturação provavelmente os resíduos não ramificados de manana ainda não são predominantes, de acordo com a composição de monossacarídeos descritos anteriormente (Miguez, 2020). Nas sementes do estágio 1 o endosperma ainda não foi formado, entretanto, o mAb LM21 foi capaz de detectar seus epítomos no extrato alcalino.

Para o monitoramento do desenvolvimento das sementes *in situ*, seções dos diferentes estágios foram marcadas com as sondas moleculares INRA-RU2 (Figura 32), LM21 e BS400-4 (Figura 33). Os epítomos de ramnagalacturonana I foram os mais proeminentes nas sementes nos diferentes estágios e por isso foram avaliados diretamente no tecido vegetal. No estágio 1 a fluorescência observada no próprio controle pode indicar que novos tecidos estão sendo formados. A presença do epítomo foi notada nos estágios 1 e 2, em que estariam presentes na lamela média das células em formação (Pereira, 2017). Nos estágios 3 e 4 a pectina estaria presente citoplasma das células do endosperma, na região próxima ao embrião, entretanto, a secção avaliada pode não ter englobado essa região. Nos estágios 1 e 2, não é possível observar sinais de fluorescência que indiquem qualquer ligação dos mAbs. Somente a partir do estágio 3, sinais de ligação do mAb LM21 aos epítomos de manana começam a surgir de maneira mais proeminente na região interna da parede celular. De forma semelhante ao que foi observado no estágio 4, o mAb BS400-4 não se ligou aos seus epítomos em nenhum dos três primeiros estágios.

Figura 32 - Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul) e INRA-RU2 (sinal vermelho) para identificação de epítomos de ramnogalacturonana I. (a) estágio 1; (b) estágio 2; (c) estágio 3; (d) estágio 4.

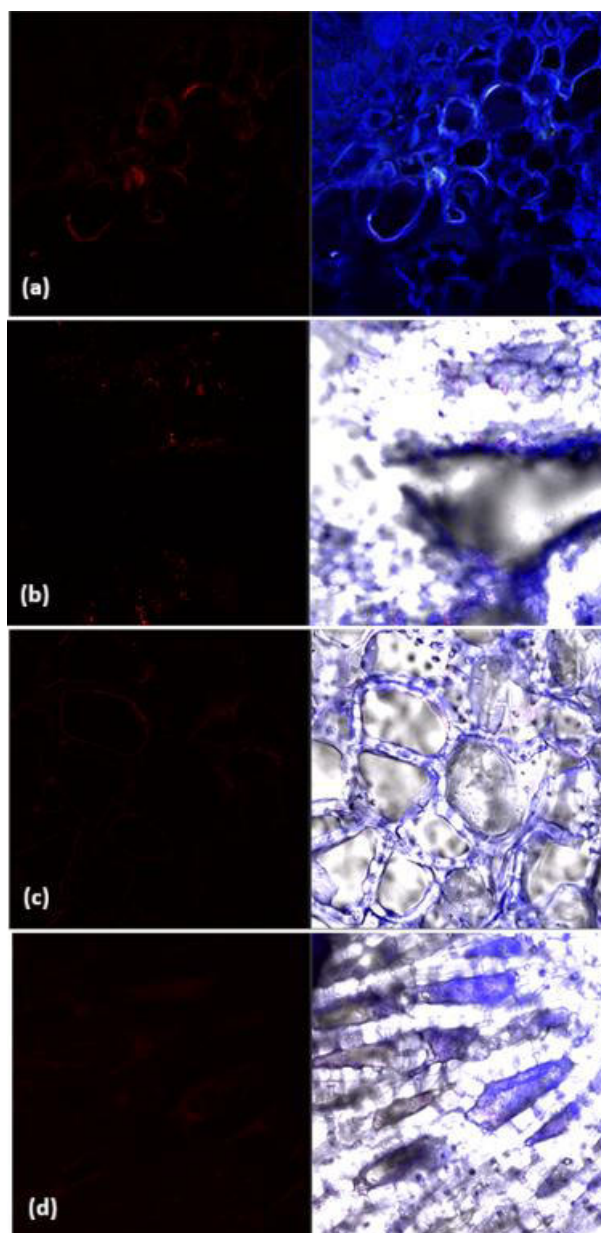
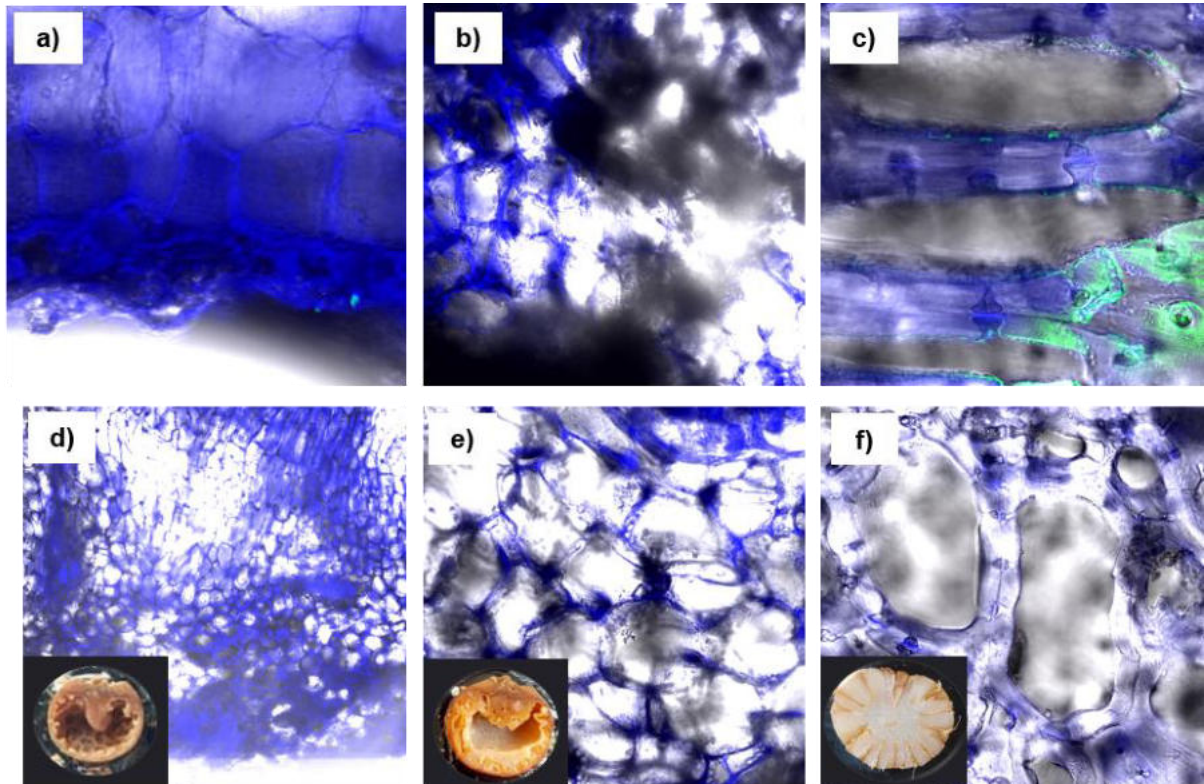


Figura 33 - Colocalização de *Calcofluor white*, LM21 e BS-400-4 no endosperma de sementes de açaí em quatro diferentes estágios de amadurecimento do fruto. (a) Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul) e LM21 (sinal verde) em sementes do estágio 1; (b) Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul) e LM21 (sinal verde) em sementes do estágio 2; (c) Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul) e LM21 (sinal verde) em sementes do estágio 3; (d) Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul) e BS-400-4 (sinal vermelho) em sementes do estágio 1; (e) Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul) e BS-400-4 (sinal vermelho) em sementes do estágio 2; (f) Colocalização de *Calcofluor white* (sinal azul) e BS-400-4 (sinal vermelho) em sementes do estágio 3.



DeMason e colaboradores (1989) identificaram que inicialmente as células de sementes de tâmara eram formadas por finas paredes celulares, e o espessamento dessas paredes só ocorreu posteriormente através de uma deposição centrípeta durante o alongamento celular. De forma análoga, espera-se que os glicanos notados nas sementes de açaí no primeiro estágio seriam principalmente componentes da parede celular primária. As primeiras camadas do endosperma formado nos estágios iniciais de desenvolvimento seriam hidrofílicas, macias e compostas por galactomananas, e à medida que as sementes amadurecem sua parede celular se torna espessa, o endosperma endurece ao se enriquecer de manana linear.

Esse resíduo agroindustrial na sua fase madura seria, assim como a farinha de palmiste e o grão de café, formado por altos conteúdos de manana pouco substituída (Adler *et al.*, 2015; Düsterhöft; Posthumus; Voragen, 1992). Relacionando o perfil de glicanos solúveis identificados nas sementes de açaí em desenvolvimento com a caracterização estrutural do

polissacarídeos insolúveis isolados da semente madura, é possível entender um pouco mais essa biomassa para avaliar novas oportunidades para a valorização dessas sementes. Os resultados obtidos poderão contribuir para o processo de tomada de decisão quanto à estratégia experimental de processamento de sementes de açaí, visando à produção de produtos de valor agregado à base de polissacarídeos extraídos da semente de açaí.

7 CONCLUSÃO

Visando aumentar a eficiência do processo de conversão de manana das sementes de açaí a manose e manano-oligossacarídeos, este trabalho foi fundamental para identificar as limitações do seu processamento, a partir da compreensão minuciosa e sistemática da estrutura da manana contida nas sementes de açaí. Com os resultados obtidos, foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

- Este trabalho mostrou a identificação da estrutura de manana linear da semente de açaí maduras pela primeira vez. A estrutura de manana insolúvel em álcali isolada de semente de açaí tem uma cadeia principal formada por resíduos Man_p unidos por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, e provável ramificação de resíduos α -1,6-D-Gal $_p$ na proporção molar de 50:1 resíduos de man:gal, o que a caracteriza como uma manana linear e tem padrão cristalino similar à manana isolada de marfim vegetal;
- O mapeamento dos polissacarídeos proeminentes em sementes de açaí maduras indica que, além da manana linear insolúvel em NaOH, há frações de manana solúveis. As sementes também possuem sinais de pectina, heteroxilana, xilana, xiloglucana, e glucana que puderam ser identificados pela ligação cruzada de anticorpos monoclonais aos seus respectivos epítomos;
- A deposição de manana, bem como sua distribuição temporal e espacial nas sementes de açaí, foi avaliada *in situ* ao longo da maturação do fruto. Mananas ramificadas são presentes nas células jovens das sementes recém formadas. Assim as ramificações da cadeia são provavelmente clivadas por ação de α -galactosidases alterando a estrutura para mananas de baixa ramificação. A medida que as sementes amadurecem, a parede celular do endosperma fica mais espessa e concentra as grandes quantidades de manana linear;
- Os resultados destacam a necessidade de estratégias para reduzir a cristalinidade e compactação das cadeias de manana. Além disso, os resultados permitem direcionar a seleção de mananases que sejam mais adequadas para a hidrólise dessa biomassa recalcitrante.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados observados contribuem substancialmente para o processo de tomada de decisão sobre a estratégia experimental para o processamento de sementes de açaí, visando à produção de produtos de valor agregado. Nesse contexto, projetos futuros podem ser propostos para a continuidade deste estudo:

- A β -1,4-manana linear presente na parede celular do endosperma de sementes de açaí foi caracterizada como uma estrutura cristalina e altamente compacta de baixa solubilidade. Com base nas informações coletadas, métodos de processamento da semente poderão ser avaliados com o objetivo de reduzir a recalcitrância da manana à hidrólise enzimática. Portanto, a seleção de métodos de pré-tratamento para essa biomassa pode ser orientada por estratégias capazes de reduzir a cristalinidade do polissacarídeo, favorecendo sua suscetibilidade aos processos de conversão. Paralelamente, a definição da rota de processamento deve considerar análises técnico-econômicas e critérios de sustentabilidade, de modo a garantir a viabilidade e a eficiência do aproveitamento dessa matéria-prima;
- Conhecidas as especificidades da manana de sementes de açaí, novas enzimas podem ser prospectadas para hidrolisar as sementes de açaí. Embora o domínio catalítico seja similar entre as mananases, a presença e a localização de módulos de ligação a carboidratos (CBM) variam entre as enzimas de uma mesma classe. Com isso, as enzimas mananolíticas produzidas por diferentes microrganismos podem apresentar uma diferença no reconhecimento de mananas cristalinas de diferentes origens. Assim, se faz necessário avaliar diferentes enzimas a fim de identificar a que melhor atende a especificidade do substrato em questão. Nesse sentido, as informações obtidas em banco de dados de enzimas relacionadas a degradação de carboidratos (Carbohydrate-Active enZymes Database, CAZy) podem esclarecer as diferenças presentes entre os *clusters* catalíticos de cada enzima que faça o reconhecimento da manana contida na semente de açaí;
- A recalcitrância das sementes de açaí seria avaliada *in situ*, diretamente no tecido vegetal das sementes de açaí e também na fração de manana isolada e purificada do material vegetal. O mapeamento da localização das enzimas mananolíticas ligadas ao

material poderá fornecer informações sobre a distribuição de locais receptivos e recalitrantes da biomassa. A interação mananases marcadas com fluorescência e as sementes de açai/fração de manana purificada pode ser quantificada utilizando microscopia confocal;

- A avaliação de fatores estruturais que impactam na recalitrância observada das sementes à ação de mananases, pode ser estabelecida com estudos da fração de manana linear insolúvel em água. Para isso, é necessário o aprimoramento do método de fracionamento e purificação do resíduo sólido final, para separação da celulose e da manana linear. A fração isolada e purificada sem presença de celulose precisa ter sua composição confirmada. Uma vez isolada a manana insolúvel, o índice de cristalinidade da fração poderá ser estimado pelo método de Segal;
- Avaliar a especificidade de mananases ao polissacarídeo de manana utilizando diretamente a fração de manana insolúvel em água isolada de sementes de açai. A manana purificada pode ser hidrolisada com mananases e, de forma complementar, pode a estrutura cristalina ser analisada por microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG), a fim de obter imagens detalhadas da morfologia desses cristais.

9 REFERÊNCIAS

- ABDEL-AKHER, M.; HAMILTON, J. K.; SMITH, F. The reduction of sugars with sodium borohydride. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 10, p. 4691–4692, 1951.
- ADLER, Sophie *et al.* Variations in cell wall monosaccharide composition during seed development in *Coffea arabica* L. Comparison between *Coffea arabica* var. Bourbon and *Coffea arabica* var. Laurina. **Trees - Structure and Function**, v. 29, n. 6, p. 1871–1881, 2015.
- AGRAWAL, Pawan K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3307–3330, 1992.
- AGUIAR, Lorena Vieira Bentolila de *et al.* Physico-chemical characterization of lignocellulosic wastes used in the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. **Conjecturas**, v. 22, n. 14, p. 311–332, 2022.
- AHL, Louise Isager *et al.* Dynamics of intracellular mannan and cell wall folding in the drought responses of succulent *Aloe* species. **Plant Cell and Environment**, v. 42, n. 8, p. 2458–2471, 2019.
- ALBERSHEIM, Peter *et al.* A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 5, n. 3, p. 340–345, nov. 1967.
- ALBUQUERQUE, Priscilla B. S. *et al.* Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, n. 1, p. 127–134, 2014.
- ALMARAZ-SÁNCHEZ, Iván *et al.* Processing Agroindustry By-Products for Obtaining Value-Added Products and Reducing Environmental Impact. **Journal of Chemistry**, v. 2022, 2022.
- ALVES, José Luiz Francisco *et al.* Exploring Açaí Seed (*Euterpe oleracea*) Pyrolysis Using Multi-component Kinetics and Thermodynamics Assessment Towards Its Bioenergy Potential. **Bioenergy Research**, v. 14, n. 1, p. 209–225, 2021.
- ANDERS, N. *et al.* Simultaneous determination of acid-soluble biomass-derived compounds using high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection. **Analytical Methods**, v. 7, n. 18, p. 7866–7873, 2015.
- ANDRADE, Moab T. *et al.* Proteome dynamics of the developing açaí berry pericarp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 1, p. 437–445, 2020.

- ARAÚJO, Cleyton Silva *et al.* Use of agro-industry residues as substrate for the production of *Euterpe precatória* seedlings. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 50, p. 1–9, 2020.
- ASTM. **Standard test method for determination of carbohydrates in biomass by gas chromatography - ASTM-E1821-01**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.astm.org>.
- AVCI, Utku; PATTATHIL, Sivakumar; HAHN, Michael G. Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: Immunolocalization of glycan epitopes. *In: Methods in Molecular Biology*. [S.l.: S.n.]. v. 908 p. 73–82.
- AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. *In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Orgs.). Plant Biochemistry*. [S.l.]: Elsevier, 1997. p. 143–204.
- BACIC, A.; HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Structure and function of plant cell walls. *In: PRIESS, J. (Org.). The Biochemistry of Plants*. [S.l.]: Academic Press, 1988. p. 297–371.
- BAEK, Kwang Rim *et al.* Yeast cell wall mannan structural features, biological activities, and production strategies. **Heliyon**, v. 10, n. 6, p. e27896, 2024.
- BARBOSA, Jhonatas Rodrigues; CARVALHO JUNIOR, Raul Nunes de. Food sustainability trends - How to value the açai production chain for the development of food inputs from its main bioactive ingredients? **Trends in Food Science and Technology**, v. 124, n. March, p. 86–95, 2022.
- BARNES, William J. *et al.* Protocols for isolating and characterizing polysaccharides from plant cell walls: a case study using rhamnogalacturonan-II. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1–20, 2021.
- BARROS, Samara Kelly Amaral *et al.* Elaboração de massa alimentícia fresca sem glúten enriquecida com farinha de resíduo de açai (*Euterpe oleracea* Mart.) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e1810613722, 2021.
- BISWAL, Ajaya K. *et al.* Comparison of four glycosyl residue composition methods for effectiveness in detecting sugars from cell walls of dicot and grass tissues. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2017.
- BLAKENEY, Anthony B. *et al.* A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. **Carbohydrate Research**, v. 113, n. 2, p. 291–299, 1983.
- BORGES, Mikaelly Veiga *et al.* Propriedades físico-químicas e tecnológicas da farinha do resíduo de açai e sua utilização. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e17810514517, 2021.
- BOTHARA, Sunil B.; SINGH, Sudarshan. Thermal studies on natural polysaccharide. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2 SUPPL., 2012.
- BRESLOW, Ronald. Biomimetic chemistry and artificial enzymes: Catalysis by design.

Accounts of Chemical Research, v. 28, n. 3, p. 146–153, 1995.

BRÜGEMANN, Lutz; GERNDT, Ekkehard K. E. Detectors for X-ray diffraction and scattering: A user's overview. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 531, n. 1–2, p. 292–301, 2004.

BRUM, Felipe Lopes *et al.* The acquisition of thin sections of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed with elevated potassium content for molecular mapping by mass spectrometry imaging. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, n. January, 2023.

BUCKERIDGE, Marcos Silveira. Seed cell wall storage polysaccharides: Models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, v. 154, n. 3, p. 1017–1023, 2010.

BUNACIU, Andrei A.; UDRIȘTIOIU, Elena gabriela; ABOUL-ENEIN, Hassan Y. X-ray diffraction: Instrumentation and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 289–299, 2015.

BURNHAM-MARUSICH, Amanda R. *et al.* Conservation of Mannan Synthesis in Fungi of the Zygomycota and Ascomycota Reveals a Broad Diagnostic Target. **mSphere**, v. 3, n. 3, 2018.

BURTON, Rachel A.; GIDLEY, Michael J.; FINCHER, Geoffrey B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 10, p. 724–732, 2010.

CALZAVARA, Batista Benito G. **As possibilidades do açazeiro no Estuário Amazônico.** [S.l.: S.n.].

CAPEK, Peter *et al.* Galactoglucomannan from the secondary cell wall of *Picea abies* L. Karst. **Carbohydrate Research**, v. 329, n. 3, p. 635–645, 2000.

CARPITA, Nicholas C. Fractionation of hemicelluloses from maize cell walls with increasing concentrations of alkali. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1089–1093, 1984.

CARPITA, Nicholas C.; GIBEAUT, David M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993.

CARVAJAL-BARRIGA, Enrique Javier *et al.* Opportunities for ivory nut residue valorization as a source of nanocellulose colloidal suspensions. **Gels**, v. 9, n. 1, 2023.

CHANZY, Henri *et al.* The crystalline polymorphism of mannan in plant cell walls and after recrystallisation. **Planta**, v. 161, n. 4, p. 320–329, 1984.

CHANZY, Henri *et al.* An electron diffraction study of the mannan I crystal and molecular

- structure. **Macromolecules**, v. 20, n. 10, p. 2407–2413, out. 1987.
- CLEMENT, Charles R. *et al.* Challenges for a Brazilian Amazonian bioeconomy based on forest foods. **Trees, Forests and People**, v. 16, n. May, 2024.
- CUI, Steve W. Structural analysis of polysaccharides. *In: Food Carbohydrates: Chemistry, physical properties and applications*. [S.l.]: Taylor & Francis, 2005.
- DEA, Iain C. M.; MORRISON, Anthony. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, n. C, p. 241–312, 1975.
- DEL RÍO, José Carlos *et al.* Hydroxystilbenes are monomers in palm fruit endocarp lignins. **Plant Physiology**, v. 174, n. 4, p. 2072–2082, 2017.
- DEMASON, Darleen A. *et al.* Role of α -galactosidase in cell wall metabolism of date palm (*Phoenix dactylifera*) endosperm. **Protoplasma**, v. 166, n. 3–4, p. 177–186, 1992.
- DEMASON, Darleen A.; SEKHAR, K. N. Chandra; HARRIS, Marilyn. Endosperm Development in the Date Palm (*Phoenix Dactylifera*) (Arecaceae). **American Journal of Botany**, v. 76, n. 9, p. 1255–1265, 1989.
- DHAWAN, Samriti; KAUR, Jagdeep. Microbial mannanases: An overview of production and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 197–216, 2007.
- DIAS *et al.* Biological activities from açai (*Euterpe spp.* Mart.) seeds and their pharmacological aspects: a systematic review and meta-analysis. **PharmaNutrition**, p. 100405, ago. 2024.
- DIAS, Guilherme Pereira *et al.* Reserve mobilization dynamics and degradation pattern of mannan-rich cell walls in the recalcitrant seed of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, n. June, p. 445–460, 2020.
- DICK-PÉREZ, Marilú *et al.* Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR. **Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 989–1000, 2011.
- DOLAN, John W. Avoiding refractive index detector problems : the refractive index detector can be frustrating to use because of its extreme sensitivity to temperature and other variables . However , it can see things that no other detector can see. **LCGC Europe**, v. 25, n. 12, p. 666+, 2012.
- DUFFIEUX, Delphine *et al.* Monoclonal Antibodies, Carbohydrate-Binding Modules, and Detection of Polysaccharides in Cell Walls from Plants and Marine Algae. *In: The Plant Cell Wall: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. [S.l.: S.n.]. p. 351–364.
- DÜSTERHÖFT, E. -M; POSTHUMUS, M. A.; VORAGEN, A. G. J. Non-starch

polysaccharides from sunflower (*Helianthus annuus*) meal and palm-kernel (*Elaeis guineensis*) meal—investigation of the structure of major polysaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 59, n. 2, p. 151–160, 1992.

DUUS, Jens; GOTFREDSEN, Charlotte H.; BOCK, Klaus. Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 12, p. 4589–4614, 2000.

ESHUN, Kojo; HE, Qian. *Aloe Vera*: A Valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries - A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 2, p. 91–96, 2004.

FAN, Suet Pin *et al.* High yield production of sugars from deproteinated palm kernel cake under microwave irradiation via dilute sulfuric acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 69–78, 2014.

FANGEL, Jonatan U. *et al.* Analytical implications of different methods for preparing plant cell wall material. **Carbohydrate Polymers**, v. 261, n. February, 2021.

FENG, Lei *et al.* Structure and conformation characterization of galactomannan from seeds of *Cassia obtusifolia*. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 67–77, 2018.

FRADERA-SOLER, Marc *et al.* Cell wall polysaccharide and glycoprotein content tracks growth-form diversity and an aridity gradient in the leaf-succulent genus *Crassula*. **Physiologia Plantarum**, v. 175, n. 5, p. 1–22, 2023.

FRESHOUR, Glenn *et al.* Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the *mur1* mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 131, n. 4, p. 1602–1612, 2003.

GHYSELS, Stef *et al.* Levoglucosenone, furfural and levomannosan from mannan-rich feedstock: A proof-of-principle with ivory nut. **Chemical Engineering Journal**, v. 451, n. P1, p. 138486, 2022.

GIBRIL, Magdi E. *et al.* Physicochemical characterization and future beneficiation routes of wild fruit waste (*Hyphaene Thebaica* seed) as a source to extract mannan. **Journal of Cleaner Production**, v. 267, p. 121949, 2020.

GIDLEY, Michael; REID, J. Grant. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. *In: Food Polysaccharides and Their Applications*. [S.l.]: CRC Press, 2006. p. 181–215.

GILLET, Sébastien *et al.* Use of ¹³C-NMR in structural elucidation of polysaccharides: case of locust bean gum. **Young Belgium Magnetic Resonance Scientist 2014 (YBMRS 2014)**, v. 17, n. 1980, p. 2014, 2014.

GŁAZOWSKA, Sylwia *et al.* The impact of silicon on cell wall composition and enzymatic

saccharification of *Brachypodium distachyon*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2018.

GŁAZOWSKA, Sylwia *et al.* Tracking digestible and non-digestible cell wall components during protein concentrate production from grass-clover and alfalfa. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 0123456789, 2023.

GOMIDE, Felipe Tadeu Fiorini *et al.* Modification of microcrystalline cellulose structural properties by ball-milling and ionic liquid treatments and their correlation to enzymatic hydrolysis rate and yield. **Cellulose**, v. 26, n. 12, p. 7323–7335, 2019.

GORIN, P. A. J. Rationalization of Carbon-13 Magnetic resonance spectra of yeast mannans and structurally related oligosaccharides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 2375–2383, 1973.

GUO, Qingbin; AI, Lianzhong; CUI, Steve W. 1D & 2D and solid-state NMR. *In: Methodology for Structural Analysis of Polysaccharides. [S.l.]*: Biobased Polymers, 2018. p. 53–63.

HANDFORD, Michael G. *et al.* Localisation and characterisation of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 218, n. 1, p. 27–36, 2003.

HARDY, Mark R.; CORNELL, Richard J. Glycosylation analysis of a recombinant P-selectin antagonist by High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection (HPAEC/PED). **Carbohydrate-Based Drug Discovery**, p. 501–516, 2003.

HERBURGER, Klaus; GŁAZOWSKA, Sylwia; MRAVEC, Jozef. Bricks out of the wall: polysaccharide extramural functions. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 12, p. 1231–1241, 2022.

HEUX, L. *et al.* Structural aspects in semicrystalline samples of the mannan II family. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 324–332, 2005.

HICKEY, Daniel T. *et al.* The importance of extraction protocol on the analysis of novel waste sources of lignocellulosic biomass. **Energies**, v. 14, n. 19, p. 1–13, 2021.

HOLTZAPPLE, M. T. Hemicelluloses. *In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. [S.l.]*: Elsevier, 2003. v. 5 p. 3060–3071.

HONDA, Susumu *et al.* High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives. **Analytical Biochemistry**, v. 180, n. 2, p. 351–357, 1989.

HORI, Ritsuko; SUGIYAMA, Junji; WADA, Masahisa. The thermal expansion of mannan I obtained from ivory nuts. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 3, p. 298–303, 2007.

HSIAO, H. Y.; ANDERSON, D. M.; DALE, N. M. Levels of β -mannan in soybean meal.

Poultry Science, v. 85, n. 8, p. 1430–1432, 2006.

HU, Xing *et al.* D-Mannose: Properties, production, and applications: An overview.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 15, 2016.

IGREJA, Willen Silva *et al.* Açai seeds (*Euterpe oleracea* Mart) Are agroindustrial waste with high potential to produce low-cost substrates after acid hydrolysis. **Molecules**, v. 28, n. 18, 2023.

IQBAL, Mohammad S. *et al.* Thermal analysis of some natural polysaccharide materials by isoconversional method. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1–2, p. 178–182, set. 2013.

ISOBE, Noriyuki *et al.* Role of urea in alkaline dissolution of cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 1, p. 97–103, 2013.

JALALUDIN, Iqbal; KIM, Jeongkwon. Comparison of ultraviolet and refractive index detections in the HPLC analysis of sugars. **Food Chemistry**, v. 365, n. June, p. 130514, 2021.

JANA, Uttam Kumar *et al.* Prebiotic manooligosaccharides: Synthesis, characterization and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 342, n. October 2020, p. 128328, 2021.

JARVIS, Michael C. The ¹³C-n.m.r. spectrum of (1→4)-β-d-mannans in intact endosperm tissue of the date (*Phoenix dactylifera*). **Carbohydrate Research**, v. 197, n. C, p. 276–280, 1990.

JIANG, Min *et al.* Depolymerized konjac glucomannan: preparation and application in health care. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 19, n. 7, p. 505–514, 2018.

JONES, Thomas M.; ALBERSHEIM, Peter. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. **Plant Physiology**, v. 49, n. 6, p. 926–936, 1972.

JORGE, Fernanda Thimoteo Azevedo; DA SILVA, Ayla Sant’Ana; BRIGAGÃO, George Victor. Açai waste valorization via mannose and polyphenols production: techno-economic and environmental assessment. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 14, n. 3, p. 3739–3752, 2024.

JUNG, Ji Young; HA, Si Young; YANG, Jae-Kyung. Comparison of carbohydrate composition in lignocellulosic biomass by high performance liquid chromatography and gas chromatography analysis. **BioResources**, v. 17, n. 1, p. 1454–1466, 11 jan. 2022.

KANG, Eun kyung *et al.* Analysis of mono-sugars obtained by acid hydrolysis of algae-based polysaccharides. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1366–1369, 2012.

KANG, Xue *et al.* Lignin-polysaccharide interactions in plant secondary cell walls revealed by solid-state NMR. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2019.

- KANGO, Naveen *et al.* Advances in prebiotic mannoooligosaccharides. **Current Opinion in Food Science**, v. 47, n. Figure 1, p. 100883, 2022.
- KEELER, James. Understanding NMR spectroscopy. **Choice Reviews Online**, v. 43, n. 10, p. 43-5896-43-5896, 2006.
- KIM, Hoon; RALPH, John. A gel-state 2D-NMR method for plant cell wall profiling and analysis: A model study with the amorphous cellulose and xylan from ball-milled cotton linters. **RSC Advances**, v. 4, n. 15, p. 7549-7560, 2014.
- KNOX, J. Paul. The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. **International Review of Cytology**, v. 171, p. 79-120, 1997.
- KNOX, J. Paul. Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 308-313, 2008.
- KOSHANI, Roya; JAFARI, Seid Mahdi; VAN DE VEN, Theo G. M. Going deep inside bioactive-loaded nanocarriers through Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. **Trends in Food Science and Technology**, v. 101, p. 198-212, 2020.
- KOVACS, Helena; MOSKAU, Detlef. **Encyclopedia of Biophysics**. [S.l.: S.n.].
- KRAČUN, Stjepan Krešimir *et al.* Carbohydrate microarray technology applied to high-throughput mapping of plant cell wall glycans using comprehensive microarray polymer profiling (CoMPP). **Methods in Molecular Biology**, v. 1503, p. 147-165, 2017.
- KUMAR SURYAWANSHI, Rahul; KANGO, Naveen. Production of mannoooligosaccharides from various mannans and evaluation of their prebiotic potential. **Food Chemistry**, v. 334, n. June 2020, p. 127428, 2021.
- KURAOKA, Takuya *et al.* Determination of α -1,3-linked mannose residue in the cell wall mannan of *Candida tropicalis* NBRC 1400 strain. **Advances in Microbiology**, v. 10, n. 01, p. 14-26, 2020.
- KUSAKABE, Isao *et al.* Preparation of β -1, 4-Mannobiose from white copra meal by a mannanase from *penicillium purpurogenum*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2825-2826, 1987.
- LAURINDO, Lucas Fornari *et al.* Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) in Health and Disease: A Critical Review. **Nutrients**, v. 15, n. 4, 2023.
- LEE, Jae Won; JEFFRIES, Thomas W. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5884-5890, 2011.
- LESCO, Kaitlin C.; WILLIAMS, S. Kim R.; LAURENS, Lieve M. L. Marine Algae Polysaccharides: An Overview of Characterization Techniques for Structural and Molecular

Elucidation. **Marine Drugs**, v. 23, n. 3, 2025.

LI, Yan xiao *et al.* Preparation, characterization, and prebiotic activity of manno-oligosaccharides produced from cassia gum by a glycoside hydrolase family 134 β -mannanase. **Food Chemistry**, v. 309, n. October 2019, p. 125709, 2020.

LIESCHE, Johannes; ZIOMKIEWICZ, Iwona; SCHULZ, Alexander. Super-resolution imaging with Pontamine Fast Scarlet 4BS enables direct visualization of cellulose orientation and cell connection architecture in onion epidermis cells. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 1, 2013.

LIMA *et al.* Optimization of the inulin aqueous extraction process from the açai (*Euterpe oleracea*, mart.) seed. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 41, n. 4, p. 884–889, 2021a.

LIMA *et al.* β -Mannanase production by *Penicillium citrinum* through solid-state fermentation using açai residual biomass (*Euterpe oleracea*). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. February, 2021b.

LIMA *et al.* Physicochemical characterization of residual biomass (seed and fiber) from açai (*Euterpe oleracea*) processing and assessment of the potential for energy production and bioproducts. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 3, p. 925–935, 26 jun. 2021c.

LITTLE, Alan *et al.* A novel (1,4)- β -linked glucoxytan is synthesized by members of the cellulose synthase-like F Gene family in land plants. **ACS Central Science**, v. 5, n. 1, p. 73–84, 2019.

LIU, Dan *et al.* Monosaccharide composition analysis of polysaccharides from natural sources: Hydrolysis condition and detection method development. **Food Hydrocolloids**, v. 116, n. January, 2021.

MACKIE, W.; PRESTON, R. D. The occurrence of mannan microfibrils in the green algae *Codium fragile* and *Acetabularia crenulata*. **Planta**, v. 79, n. 3, p. 249–253, 1968.

MAIWALD, M. *et al.* Quantitative High-Resolution Online NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Reaction and Process Monitoring. **NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis**, p. 471–491, 2008.

MAKKEE, M.; KIEBOOM, A. P. G.; BEKKUM, H. van. Production methods of D-mannitol. **Starch/Stärke**, v. 37, n. 4, p. 136–141, 1985.

MAPA. **Registro Nacional de Cultivares**. Disponível em: <https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 1 ago. 2024.

MARCHESSAULT, R. H.; TAYLOR, M. G.; WINTER, W. T. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of poly- β -D(1 \rightarrow 4) mannose: mannan. **Can. J. Chem**, v. 68, p. 1192, 1990.

- MARCUS, Susan E. *et al.* Restricted access of proteins to mannan polysaccharides in intact plant cell walls. **Plant Journal**, v. 64, n. 2, p. 191–203, 2010.
- MARTÍNEZ-ABAD, Antonio; JIMÉNEZ-QUERO, Amparo; WOHLERT, Jakob. Influence of the molecular motifs of mannan and xylan populations on their recalcitrance and organization in spruce softwoods. **Green Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3956–3970, 2020.
- MARTINS, Gabriel R. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activities of açai seed (*Euterpe oleracea* Mart.) extracts containing A- and B-type procyanidins. **Lwt**, v. 132, n. August, p. 109830, 2020.
- MATHIAS, Samir Leite *et al.* Cultivated Brazilian Palm Tree Consumption , Production , and Properties for High Added Value Applications. **Materials Circular Economy**, v. 6, n. 44, 2024.
- MCCARTNEY, Lesley; MARCUS, Susan E.; KNOX, J. Paul. Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 53, n. 4, p. 543–546, 2005.
- MEIER, H.; REID, J. S. G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. *In*: LOEWUS, F. A.; TANNER, W. (Orgs.). **Plant Carbohydrates I. Encyclopedia of Plant Physiology**. [S.l.]: Springer, 1982. v. 13 p. 418–471.
- MEIER, Hans. On the structure of cell walls and cell wall mannans from ivory nuts and from dates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 28, p. 229–240, jan. 1958.
- MEIKLE, Peter J. *et al.* A (1→3,1→4)-β-glucan-specific monoclonal antibody and its use in the quantitation and immunocytochemical location of (1→3,1→4)-β-glucans. **The Plant Journal**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 1994.
- MELATI, Ranieri Bueno *et al.* Key Factors Affecting the Recalcitrance and Conversion Process of Biomass. **Bioenergy Research**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 2019.
- MELLO, Tamiris de *et al.* Mannans: Structural carbohydrates produced during seed maturation in *Euterpe edulis* Martius, an Atlantic Forest species vulnerable to extinction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 267, n. October 2023, 2024.
- MELO, Priscilla Siqueira *et al.* Açai seeds: An unexplored agro-industrial residue as a potential source of lipids, fibers, and antioxidant phenolic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 161, n. June 2020, p. 113204, 2021.
- MICHALSKI, Rajmund; KOŃCZYK, Joanna. Ion Chromatography and Related Techniques in Carbohydrate Analysis: A Review. **Molecules**, v. 29, n. 14, p. 1–24, 2024.
- MIGUEZ, Ingrid Santos. **Caracterização composicional da semente de açai (Euterpe oleracea) e seu processamento para obtenção de manose**. [S.l.]: Universidade Federal do

Rio de Janeiro, 2020.

MIGUEZ, Ingrid Santos *et al.* Plant cell wall polysaccharides: Methodologies for compositional, structural, and physicochemical characterization. *In: Polysaccharide-Degrading Biocatalysts*. [S.l.]: Elsevier, 2023. p. 1–37.

MIRANDA, Lidiane de Vilhena Amanajás *et al.* Discarding and final destination of açai in the Oriental Amazon - Brazil. **Ambiente & Sociedade**, v. 25, 2022.

MISCHNICK, Petra; MOMCILOVIC, Dane. **Chemical Structure Analysis of Starch and Cellulose Derivatives**. [S.l.: S.n.]. v. 64

MISLOVIČOVÁ, D. *et al.* Influence of mannan epitopes in glycoproteins - Concanavalin A interaction. Comparison of natural and synthetic glycosylated proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 30, n. 5, p. 251–258, 2002.

MNICH, Ewelina *et al.* Phenolic cross-links: Building and de-constructing the plant cell wall. **Natural Product Reports**, v. 37, n. 7, p. 919–961, 2020.

MOLLER, Isabel *et al.* High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. **Plant Journal**, v. 50, n. 6, p. 1118–1128, 2007.

MOLLER, Isabel E. *et al.* Glycan profiling of plant cell wall polymers using microarrays. **Journal of Visualized Experiments**, n. 70, p. 1–9, 2012.

MONTEIRO, Alvaro Ferreira *et al.* High concentration and yield production of mannose from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds via mannanase-catalyzed hydrolysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

MOREIRA, Ana S. P. *et al.* Galactomannans in Coffee. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 173–183, 2014.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 165–178, 2008.

MURILLO-FRANCO, Sarha Lucia; GALVIS-NIETO, Juan David; ORREGO, Carlos E. Production of Mannooligosaccharides from Açai Seed by Immobilized β -Mannanase. **Processes**, v. 12, n. 5, p. 1–20, 2024a.

MURILLO-FRANCO, Sarha Lucia; GALVIS-NIETO, Juan David; ORREGO, Carlos E. Mannooligosaccharide production from açai seeds by enzymatic hydrolysis: optimization through response surface methodology. **Environmental Science and Pollution Research**, 2024b.

MUSCHIN, Tegshi; YOSHIDA, Takashi. Structural analysis of galactomannans by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 1893–1898, 2012.

NETO *et al.* A Disposição Final De Caroço De Açaí No Distrito Administrativo De Icoaraci, Pará the Final Disposal of Açaí Stone in the Administrative District of Icoaraci, Pará. **Revista científica FAEMA**, n. 1, p. 221–236, 2023.

NETO, Domingos Ferreira de Mélo. **Análise proteômica de sementes em desenvolvimento de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)**. [S.l.]: Universidade Federal do Ceará (UFC), 2018.

NGUYEN, Quynh Anh *et al.* Development of an advanced integrative process to create valuable biosugars including manno-oligosaccharides and mannose from spent coffee grounds. **Bioresource Technology**, v. 272, n. October 2018, p. 209–216, 2019.

NORTHCOTE, D. H. Chemistry of the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 23, n. 1, p. 113–132, jun. 1972.

OGAWA, Yu; PUTAUX, Jean Luc; NISHIYAMA, Yoshiharu. Crystallography of polysaccharides: Current state and challenges. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 70, p. 102183, 2022.

OLIVEIRA, Maria do Socorro Padilha de *et al.* **Açaí: Manejo, produção e processamento**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br>>.

OLIVEIRA, Maria do Socorro Padilha de *et al.* Açaí-do-pará. In: LOPES, Ricardo *et al.* (Orgs.). **Palmeiras Nativas do Brasil**. 1. ed. [S.l.]: Embrapa, 2015. v. 6 p. 36–81.

PANTOJA, Kelly Roberta Pinheiro; SILVA, William Jeames Pantoja da. Bioavailable Compounds and the Biological Potentials of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): a Review. **International Journal of Health Science**, v. 2, n. 35, p. 2–10, 2022.

PANWAR, Deepesh; SHUBHASHINI, A.; KAPOOR, Mukesh. Complex alpha and beta mannan foraging by the human gut bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 66, n. April, p. 108166, 2023.

PATTATHIL, Sivakumar *et al.* A comprehensive toolkit of plant cell wall glycan-directed monoclonal antibodies. **Plant Physiology**, v. 153, n. 2, p. 514–525, 2010.

PATTATHIL, Sivakumar *et al.* Immunological approaches to plant cell wall and biomass characterization: Glycome profiling. In: **Methods in Molecular Biology**. [S.l.: S.n.]. v. 908 p. 61–72.

PATTATHIL, Sivakumar *et al.* Immunological approaches to biomass characterization and utilization. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. OCT, p. 1–14, 2015.

PEDERSEN, Henriette L. *et al.* Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 47, p. 39429–39438, 2012.

PEDRAS, Bruno M. *et al.* Semi-continuous extraction/hydrolysis of spent coffee grounds

with subcritical water. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 72, p. 453–456, 2019.

PEREIRA, João Alves Ferreira. **Morfoanatomia e histoquímica de sementes em desenvolvimento de *Euterpe oleracea* Mart. (ARECACEAE)**. [S.l.]: Universidade Federal do Ceará, 2017.

PESSOA, José Dalton Cruz *et al.* Characterization of Açai (*E. oleracea*) fruits and its processing residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1451–1460, 2010.

PETKOWICZ, C. L. de O. *et al.* Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 2, p. 107–112, 2001.

PETTOLINO, Filomena A. *et al.* A (1→4)- β -mannan-specific monoclonal antibody and its use in the immunocytochemical location of galactomannans. **Planta**, v. 214, n. 2, p. 235–242, 2001.

PETTOLINO, Filomena A. *et al.* Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. **Nature Protocols**, v. 7, n. 9, p. 1590–1607, 2012.

PINHEIRO, Carolina. **Açai certificado do Amapá mostra que soluções tradicionais são futuro para a Amazônia**. Disponível em: <<https://www.nationalgeographicbrasil.com/meio-ambiente/2022/12/acai-certificado-do-amapa-mostra-que-solucoes-tradicionais-sao-futuro-para-a-amazonia>>.

PINTO, Andréia *et al.* **Boas práticas para manejo florestal e agroindustrial**. [S.l.]: SEBRAE – IMAZON, 2010.

POLARI, Lauri *et al.* Galactoglucomannan extracted from spruce (*Picea abies*) as a carbohydrate source for probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 11037–11043, 2012.

POLTA, Theresa Z.; JOHNSON, Dennis C. Pulsed amperometric detection of sulfur compounds. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 209, n. 1, p. 159–169, set. 1986.

PONTIS, Horacio G. Case Study: Polysaccharides. **Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms**, p. 137–149, 2017.

PU, Yunqiao; HALLAC, Bassem; RAGAUSKAS, Arthur J. Plant biomass characterization: Application of solution- and solid-state NMR spectroscopy. **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**, p. 369–390, 2013.

PUTAUX, Jean Luc. Morphology and structure of crystalline polysaccharides: Some recent

- studies. **Macromolecular Symposia**, v. 229, p. 66–71, 2005.
- QUÉMÉNER, Bernard *et al.* Fast data preprocessing for chromatographic fingerprints of tomato cell wall polysaccharides using chemometric methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 1, p. 41–49, 2007.
- RAESSLER, Michael. Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 1833–1843, dez. 2011.
- RAJANI, J. *et al.* Effect of extracted galactoglucomannan oligosaccharides from pine wood (*Pinus brutia*) on Salmonella typhimurium colonisation, growth performance and intestinal morphology in broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 57, n. 5, p. 682–692, 2016.
- RALET, M. C. *et al.* Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone. **Planta**, v. 231, n. 6, p. 1373–1383, 2010.
- RAMBO, M. K. D.; SCHMIDT, F. L.; FERREIRA, M. M. C. Analysis of the lignocellulosic components of biomass residues for biorefinery opportunities. **Talanta**, v. 144, p. 696–703, 2015.
- RANA, Monika *et al.* Functional β -mannooligosaccharides: Sources, enzymatic production and application as prebiotics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 64, n. 28, p. 10221–10238, 2023.
- RENCORET, Jorge *et al.* Variability in Lignin Composition and Structure in Cell Walls of Different Parts of Macaúba (*Acrocomia aculeata*) Palm Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 138–153, 2018.
- RODRÍGUEZ-GACIO, María del Carmen *et al.* Softening-up mannan-rich cell walls. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 3976–3988, 28 jun. 2012.
- RONGPIPI, Sintu *et al.* Progress and opportunities in the characterization of cellulose – an important regulator of cell wall growth and mechanics. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. March, p. 1–28, 2019.
- RUFINO, João Paulo Ferreira *et al.* Açaí meal on diet digestibility for commercial laying hens. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 42, n. 1, p. 1–5, 2020.
- RUIZ-MATUTE, A. I. *et al.* Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 17–18, p. 1226–1240, 2011.
- RUSSLER, Axel *et al.* Chemical characterization of polysaccharides. *In*: NAVARD, P. (Org.). **The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE): Research Initiatives and Results**. [S.l.]: Springer-Verlag Wien, 2013. p. 1–401.
- RYDAHL, Maja G. *et al.* Report on the current inventory of the toolbox for plant cell wall

analysis: Proteinaceous and small molecular probes. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. May, p. 1–20, 2018.

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

SANTOS *et al.* Potencial de aproveitamento do resíduo de açaí no município de Labrea-AM. **30º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, n. 1, p. 1–13, 2019.

SANTOS, Vanuza O. *et al.* Pyrolysis of acai seed biomass: Kinetics and thermodynamic parameters using thermogravimetric analysis. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, n. August, p. 100553, 2020.

SANZ, M. L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, n. 1–2, p. 74–89, 15 jun. 2007.

SATO, Michel Keisuke *et al.* Biochar as a sustainable alternative to açaí waste disposal in Amazon, Brazil. v. 139, p. 36–46, 2020.

SCAGLIONE, Francesco; MUSAZZI, Umberto M.; MINGHETTI, Paola. Considerations on D-mannose mechanism of action and consequent classification of marketed healthcare products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, n. March, p. 1–7, 2021.

SCHAUSS, Alexander G. **Advances in the study of the health benefits and mechanisms of action of the pulp and seed of the Amazonian palm fruit, *Euterpe oleracea* Mart., known as “Açaí”**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2016.

SHELLER, Henrik Vibe; ULVSKOV, Peter. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SEBRAE. **Boletim: produtos à base de açaí brasileiro** Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <[SEDAP. **Pró-Açaí** Programa de desenvolvimento da cadeia produtiva do açaí no estado do Pará. \[S.l.: S.n.\].](https://bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/9f56e28eb2f2bb90496a1a44becc47ad/$File/5829.pdf#:~:text=Entre os produtos mais conhecidos,pó de açaí%2C dentre outros.>>.</p>
</div>
<div data-bbox=)

SELVENDRAN, R. R.; O’NEILL, M. A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. **Methods of biochemical analysis**, v. 32, p. 25–153, 1987.

SILVA, Ilano Oliveira da *et al.* What we know about euterpe genus and neuroprotection: A scoping review. **Nutrients**, v. 15, n. 14, 2023.

SILVEIRA, Jéssica Teixeira da *et al.* An integrative review of Açaí (*Euterpe oleracea* and

- Euterpe precatoria*): Traditional uses, phytochemical composition, market trends, and emerging applications. **Food Research International**, v. 173, n. April, 2023.
- SIQUEIRA, Germano *et al.* Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399–402, 2013.
- SLUITER, A. *et al.* Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. n. August, 2012.
- SLUITER, Justin B. *et al.* Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 9043–9053, 2010.
- SOUZA, Florisvaldo Gama de *et al.* Brazilian fruits of Arecaceae family: An overview of some representatives with promising food, therapeutic and industrial applications. **Food Research International**, v. 138, n. September, 2020.
- SPECIALE, Immacolata *et al.* Liquid-state NMR spectroscopy for complex carbohydrate structural analysis: A hitchhiker's guide. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, n. October 2021, p. 118885, 2022.
- SRIVASTAVA, Lalit M. Seed food reserves and their accumulation. **Plant Growth and Development**, p. 503–520, 2002.
- STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. *In*: ASPINALL, Gerald O. (Org.). **The Polysaccharides**. [S.l.]: ACADEMIC PRESS, INC., 1983. p. 97–193.
- STEVENS, Barry J. H.; SELVENDRAN, Robert R. The isolation and analysis of cell wall material from the alcohol-insoluble residue of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 31, n. 12, p. 1257–1267, 1980.
- TANG, Ning *et al.* Characterizations and application potentials of the hemicelluloses in waste oil-tea camellia fruit shells from Southern China. **Industrial Crops and Products**, v. 178, n. January, p. 114551, 2022.
- TEIXEIRA, Leopoldo *et al.* Processos de compostagem usando resíduos das agroindústrias de açaí e de palmito do açaizeiro. p. 1–6, 2005.
- TESTER, Richard F.; AL-GHAZZEWI, Farage H. Beneficial health characteristics of native and hydrolysed konjac (*Amorphophallus konjac*) glucomannan. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 96, n. 10, p. 3283–3291, 2016.
- TIMELL, T. E. Wood hemicelluloses: Part II. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, v. 20, n. C, p. 409–483, 1965.
- TOVAR, Ana *et al.* Converting the distinct heparins sourced from bovine or porcine mucosa into a single anticoagulant drug. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 119, n. 04, p. 618–632, 21

abr. 2019.

UBANDO, Aristotle T.; FELIX, Charles B.; CHEN, Wei Hsin. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 299, n. December 2019, 2020.

VILARÓ, Pilar *et al.* Isolation and characterization of galactomannans from *Prosopis affinis* as potential gum substitutes. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 711–719, 2018.

VOINICIUC, Cătălin. Modern mannan: a hemicellulose's journey. **New Phytologist**, v. 234, n. 4, p. 1175–1184, 2022.

VOTORANTIM. **Projeto de coprocessamento do açaí recebe prêmio da AmCham Últimas Notícias**. Disponível em: <<https://www.votorantimcimentos.com.br/noticia/projeto-de-coprocessamento-do-acai-recebe-premio-da-amcham/>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

WALFORD, S. N. GC-MS as a tool for carbohydrate analysis in a research environment. **Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.**, v. 27, p. 1–15, 2010.

WANG, Shishuai *et al.* Dissolution and rheological behavior of deacetylated konjac glucomannan in urea aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 499–504, 2014.

WHISTLER, Roy L.; SAARNIO, Jouko. Galactomannan from soy bean hulls. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 22, p. 6055–6057, 1 nov. 1957.

WILLATS, William G. T. *et al.* Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 3, p. 309–320, 2000.

WILLATS, William G. T.; MARCUS, Susan E.; KNOX, J. Paul. Generation of a monoclonal antibody specific to(1-5)-alpha-L-arabinan. v. 308, p. 149–152, 1998.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. **Acetylation**. [*S.l.*]: Academic Press, 1963. v. 2

WU, Hao; ZHANG, Wenli; MU, Wanmeng. Recent studies on the biological production of D-mannose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21–22, p. 8753–8761, 2019.

XIONG, Bi *et al.* Dissolution of cellulose in aqueous NaOH/urea solution: Role of urea. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1183–1192, 2014.

XU, Huizhen *et al.* Secondary cell wall patterning-connecting the dots, pits and helices. **Open Biology**, v. 12, n. 5, 2022.

YAMABHAI, Montarop *et al.* Mannan biotechnology: From biofuels to health. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 32–42, 2016.

YAN, Xun. High performance liquid chromatography for carbohydrate analysis. *In*:

- Analytical Sciences, Research & Development, Amway Corporation.** [S.l.: S.n.]. p. 1–8.
- YANG, Weifang *et al.* Purification and structural characterization of Chinese yam polysaccharide and its activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 1021–1027, 2015.
- YANG, Yanmin *et al.* Structural characterization and antioxidant activities of one neutral polysaccharide and three acid polysaccharides from *Ziziphus jujuba* cv. Hamidazao: A comparison. **Carbohydrate Polymers**, v. 261, n. February, p. 117879, jun. 2021.
- YAO, Hao Ying Ye *et al.* A review of NMR analysis in polysaccharide structure and conformation: Progress, challenge and perspective. **Food Research International**, v. 143, n. March, p. 110290, 2021.
- YIN, Jun Yi *et al.* Methylation and 2D NMR analysis of arabinoxylan from the seeds of *Plantago asiatica* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1395–1401, 2012.
- YIN, Lijuan *et al.* Anatomical adaptations of pits in two types of ray parenchyma cells in *Populus tomentosa* during the xylem differentiation. **Journal of Plant Physiology**, v. 278, n. July, p. 153830, 2022.
- YUI, Toshifumi *et al.* An evaluation of crystal structure of mannan I by X-ray powder diffraction and molecular mechanics studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, n. 3, p. 243–250, 1997.
- ZAMSKI, Eli. Transport and accumulation of carbohydrates in developing seeds: The seeds as a sink. In: KIGEL, Jaime (Org.). **Seed development and germination.** [S.l.]: Routledge, 1995.
- ZHANG, Bing *et al.* A review on insoluble-bound phenolics in plant-based food matrix and their contribution to human health with future perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 105, n. March, p. 347–362, 2020.
- ZHANG, Rui *et al.* Enzymatic preparation of manno-oligosaccharides from locust bean gum and palm kernel cake, and investigations into its prebiotic activity. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 49, p. 64–71, 2021.
- ZHANG, Xiaoyang *et al.* Understanding how the complex molecular architecture of mannan-degrading hydrolases contributes to plant cell wall degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 4, p. 2002–2012, 2014.
- ZOGLAMI, Aya; PAËS, Gabriel. Lignocellulosic biomass: Understanding recalcitrance and predicting hydrolysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. December, 2019.