

JOÃO FRANCISCO BENTO

**Aspectos comparativos entre mananas e galactomananas de sementes de  
leguminosas**

Monografia da disciplina Estágio em Bioquímica, apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz.

CURITIBA  
2006

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

*Aos meus pais, Maria e Sérgio, que não  
mediram esforços para que eu pudesse  
chegar aonde cheguei.*

*Muito obrigado por tudo.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Carmen, por ter me aceito no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais, pelo companheirismo, pela paciência, pelos momentos engraçados.

Às Prof<sup>as</sup> Fany e Joana pela ajuda, pelo incentivo e pelas inúmeras dúvidas tiradas.

À minha irmãzinha Raquel, que todo dia me perguntava o que eu fazia na escola ou se a Carmen era muito brava. Mana, te amo!

Aos amigos de longa data:

Karina, por sempre me agüentar e pelos quase 20 anos de amizade. Sei que posso contar com você sempre.

Luís, pelas longas conversas, pelos momentos engraçados que passamos juntos (e olhe que não foram poucos). Se não fosse você e a Yana me estragarem no segundo grau o que seria de mim hoje?

Yana, por ser essa pessoa alegre, companheira, que me entende tão bem. Vê se não some por tanto tempo.

Aos amigos recentes:

Nana, você é a pessoa que melhor me entende no mundo. Sorte minha o dia que eu te conheci. Agradeço-te pelas conversas, pelo apoio, pelas jantas na sua casa. Descobri que tenho uma amiga de verdade pra vida inteira.

Mariana, pelas baladas, pelas bagunças, pelas risadas, por ser essa que eu sei que posso confiar e contar tudo (em detalhes) sobre minha vida.

Andréia, primeiro pelas intermináveis análises. Mas, principalmente, pela sua amizade, pelas nossas “piras”, pelas nossas conversas nos banquinhos que tanto me agradam, por me ensinar a ver a vida de uma outra maneira.

Priscila, pelas agradáveis conversas e pelos vários momentos em que fiquei “chorando” no seu ombro.

Aos amigos que encontrei na faculdade:

Edi, Gisele e Patrícia, as meninas superpoderosas. O trio mais engraçado que eu conheço. A faculdade não seria a mesma sem o nosso santo truço de todo dia, sem as churrascadas, sem as nossa idas ao bar.

Kleber, obrigado por esses cinco anos de companheirismo e de momentos sem noção.

Carol, pelas longas conversas, pelas dicas de filmes. Obrigado por ser essa amiga que sei que vou poder contar a vida inteira.

Aos outros amigos que encontrei na faculdade: Carla, Eli, Flávia, Jeane, Letícia, Nelson, Shayana, Wanessa, William. Vocês tornaram a faculdade uma diversão.

Aos companheiros de laboratório: Aline, Ana Paula, Arianni, Encida, Heide, Lúcia.

Ao Departamento de Bioquímica.

A Rô, por sempre estar quebrando alguns galhos para gente e pelos cafezinhos na coordenação.

Ao Curso de Ciências Biológicas.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS.....	xi
RESUMO.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Galactomananas.....	2
1.2 Mananas.....	7
1.3 Família Leguminosae.....	9
1.3.1 Subfamília Caesalpinioideae.....	10
1.3.1.1 <i>Cassia fastuosa</i> .....	10
1.3.1.2 <i>Delonix regia</i> .....	11
1.3.2 Subfamília Mimosoideae.....	12
1.3.2.1 <i>Adenanthera pavonina</i> .....	12
1.3.2.2 <i>Leucaena leucocephala</i> .....	13
1.3.3 Subfamília Faboideae.....	14
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Métodos Gerais.....	16
3.2 Obtenção das sementes.....	16
3.3 Extração dos polissacarídeos.....	16
3.4 Determinação da composição monossacarídica.....	18
3.5 Análises polarimétricas.....	19
3.6 Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser multiângulos e de índice de refração (HPSEC-MALLS/RI).....	19
3.7 Análise de metilação.....	20

3.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
4.1 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do endosperma de semente de <i>Cassia fastuosa</i> (cassia).....	23
4.2 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do endosperma de sementes de <i>Delonix regia</i> (flamboyant).....	27
4.3 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do endosperma de sementes de <i>Adenantha pavonina</i> (carolina).....	31
4.4 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do endosperma de sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> (leucena).....	37
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resumo da nomenclatura de identificação das frações isoladas a partir das extrações aquosas e alcalinas das diferentes espécies estudadas.....	22
TABELA 2 - Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações seqüenciais do endosperma das sementes de <i>Cassia fastuosa</i> .....	23
TABELA 3 - Relação manose:galactose e rotação óptica específica das galactomananas obtidas do endosperma das sementes de <i>Cassia fastuosa</i> .....	24
TABELA 4 - Análise por metilação da manana de <i>Cassia fastuosa</i> na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.....	26
TABELA 5 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN- <sup>13</sup> C para a manana do endosperma das sementes de <i>Cassia fastuosa</i> .....	27
TABELA 6 - Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações seqüenciais do endosperma das sementes de <i>Delonix regia</i> .....	28
TABELA 7 - Rotação óptica específica das galactomananas obtidas do endosperma das sementes de <i>Delonix regia</i> .....	29
TABELA 8 - Análise por metilação da manana de <i>Delonix regia</i> na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.....	30
TABELA 9 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN- <sup>13</sup> C para a manana do endosperma das sementes de <i>Delonix regia</i> .....	31
TABELA 10 - Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações seqüenciais do endosperma das sementes de <i>Adenanthera pavonina</i> .....	32

TABELA 11 - Relação manose: galactose das frações obtidas das extrações sequenciais do endosperma das sementes de <i>Adenantha pavonina</i> .....	33
TABELA 12 - Análise por metilação da galactomanana de <i>Adenantha pavonina</i> na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.....	35
TABELA 13 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN- <sup>13</sup> C para a manana do endosperma das sementes de <i>Adenantha pavonina</i> .....	36
TABELA 14 - Composição monossacarídica do resíduo das extrações de <i>Adenantha pavonina</i> .....	37
TABELA 15 - Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações sequenciais do endosperma das sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> .....	38
TABELA 16 - Relação manose: galactose das frações obtidas das extrações sequenciais do endosperma das sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> .....	38
TABELA 17 - Análise por metilação da galactomanana de <i>Adenantha pavonina</i> na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.....	40
TABELA 18 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN- <sup>13</sup> C para a manana do endosperma das sementes de <i>Leucaena leucocephala</i> .....	41
TABELA 19 - Composição monossacarídica do resíduo das extrações de <i>Leucaena leucocephala</i> . ....	41

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Flor e fruto de <i>Cassia fastuosa</i> .....	11
FIGURA 2 - Flor e fruto de <i>Delonix regia</i> .....	12
FIGURA 3 - Fruto e sementes de <i>Adenanthera pavonina</i> .....	13
FIGURA 4 - Flor e fruto de <i>Leucaena leucocephala</i> .....	14
FIGURA 5 - Fluxograma de extração dos polissacarídeos do endosperma das sementes de leguminosas.....	17
FIGURA 6 - Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da manana de <i>Cassia fastuosa</i> em uréia 50% (em D <sub>2</sub> O).....	27
FIGURA 7 - Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da manana de <i>Delonix regia</i> em uréia 50% (em D <sub>2</sub> O).....	31
FIGURA 8 - Perfil de eluição obtido por HPSEC-MALLS/RI. (RI – detector diferencial de índice de refração; MALLS - detector de espalhamento de luz laser em multiângulos - ângulo 90°).....	34
FIGURA 9 - Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da galactomanana de <i>Adenanthera pavonina</i> em D <sub>2</sub> O .....	36
FIGURA 10 - Perfil de eluição obtido por HPSEC-MALLS/RI. (RI – detector diferencial de índice de refração; MALLS- detector de espalhamento de luz laser multiângulos – ângulo de 90°) .....	39
FIGURA 11 - Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da galactomanana de <i>Leucaena leucocephala</i> em D <sub>2</sub> O.....	40

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ara – Arabinose

D<sub>2</sub>O – Água deuterada

DMSO – Dimetil sulfóxido

dn/dc – Variação do índice de refração da solução do material analisado com a variação de sua concentração

EtOH – Álcool etílico

Gal – Galactose

GLC-MS – Cromatografia líquido gasosa acoplada a espectrometria de massa

GLC – Cromatografia líquido gasosa

Glc – Glucose

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido sulfúrico

HPSEC-MALLS – Cromatografia de exclusão estérica acoplada a espalhamento de luz de multiângulos

IPEF – Instituto de Pesquisas Florestais

Man – Manose

Man:Gal – Relação manose:galactose

Na<sup>+</sup> - Íon sódio

NaBH<sub>4</sub> – Boroidreto de sódio

NaN<sub>3</sub> – Azida de sódio

NaNO<sub>2</sub> – Nitrito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

Rha – rhamnose

RI – Índice de refração

RMN-<sup>13</sup>C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

rpm – Rotações por minuto

TFA – Ácido trifluoracético

Xyl – Xilose

## RESUMO

Entre os polissacarídeos de reserva dos vegetais destacam-se as galactomananas e mananas, as quais são características das famílias Leguminosae e Palmae, respectivamente. A maioria das galactomananas de vegetais são polissacarídeos constituídos de uma cadeia linear de unidades D-manose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  com substituições por unidades de D-galactose ligadas  $\alpha(1\rightarrow6)$  ao longo da cadeia principal, enquanto que são consideradas  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-mananas puras o polissacarídeo vegetal que contém 95% ou mais de manose. Os endospermas das sementes de Leguminosae, *Adenanthera pavonina*, *Cassia fastuosa*, *Delonix regia* e *Leucaena leucocephala* foram isolados e submetidos a extrações seqüenciais com H<sub>2</sub>O (4°C, 25°C e 60°C) e NaOH 2M e 4M, ambas a 25°C. Em *C. fastuosa* e *D. regia* foram obtidas galactomananas com diferentes razões Man:Gal, 2,5:1 a 10:1 e 3,0:1 a 6,8:1, respectivamente. A redução no conteúdo de galactose foi acompanhada pela diminuição dos valores de rotação óptica específica. Os resíduos finais das extrações apresentaram em torno de 95% de manose, sendo considerados como mananas puras. Os polissacarídeos foram submetidos à análise de metilação, apresentando como derivado principal 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man (90%). A estrutura das mananas foi confirmada por RMN-<sup>13</sup>C. A partir dos endospermas das sementes de *A. pavonina* e *L. leucocephala* foram isoladas galactomananas com relação Man:Gal de 1,6:1, independente das condições de extração. As galactomananas apresentaram estrutura convencional, analisada por metilação e RMN-<sup>13</sup>C. O resíduo final das extrações foi analisado e mostrou a presença de glucose como componente majoritário. Nas espécies *C. fastuosa* e *D. regia*, pertencentes à subfamília Caesalpinioideae, foi caracterizada a ocorrência de uma "família" de galactomananas e uma manana pura. Por outro lado, nas sementes de *A. pavonina* e *L. leucocephala*, pertencentes à subfamília Mimosoideae, foi observada a presença de apenas um tipo de galactomanana. A composição do resíduo destas espécies sugere a presença de celulose, ao invés de mananas.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma nova planta formada por reprodução sexuada inicia como um embrião dentro de uma semente. A semente desenvolve-se do óvulo fecundado e, quando madura, é o meio de dispersão da espécie. Assim, a semente ocupa uma posição crítica na vida de uma planta superior. O sucesso com o qual o novo indivíduo é estabelecido no tempo e lugar, e o vigor da plântula é em grande parte determinado pelas características fisiológicas e bioquímicas da semente. A chave deste sucesso está nas respostas da semente ao meio e nas reservas disponíveis para sustentar a jovem planta nos estágios iniciais de crescimento, antes dela tornar-se um organismo independente, autotrófico. Além disso, para o homem, as sementes representam uma grande fonte de nutrientes. Cerca de 10% de todo o alimento para o consumo humano vem diretamente de sementes, principalmente de cereais e legumes (BEWLEY; BLACK, 1986).

Dentre as substâncias de reserva da semente destacam-se, pela sua abundância e multiplicidade de usos, os carboidratos, que podem ocorrer sob a forma oligossacarídeos, como a sacarose e rafinose, ou ainda como polissacarídeos (AVIGAD; DEY, 1997).

Durante a evolução da planta diferentes carboidratos foram selecionados como substâncias de reserva. O mais amplamente distribuído é o amido, seguido das frutanas e dos polissacarídeos de reserva de parede. Cada um destes compostos de reserva apresenta características que os tornam mais convenientes para a planta em determinadas situações. Primeiramente, nenhum destes possui terminais redutores livres, uma vantagem quando comparados com o acúmulo de monossacarídeos livres, o que poderia levar a glicosilação não específica de elementos celulares. A atividade osmótica destes polissacarídeos também é importante. Sendo insolúvel, o amido é menos ativo osmoticamente que as frutanas, e seu maior empacotamento também o torna menos reativo. As frutanas, por outro lado, pelo seu estado mais desempacotado, se tornam mais úteis no controle do potencial osmótico da célula (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

Em muitas sementes as paredes celulares dos tecidos de reserva estão espessadas e contém polissacarídeos que são mobilizados durante a germinação. Estes

são os polissacarídeos de reserva de parede que, além da função de reserva, também estão relacionados à rigidez (mananas no endosperma de sementes de palmeiras), relações hídricas (xiloglucanas em cotilédones e galactomananas em endosperma de leguminosas) e expansão celular (galactanas dos cotilédones de *Lupinus angustifolius*). É possível distinguir três grandes grupos de polissacarídeos de reserva de parede: mananas, o qual inclui as mananas puras, galactomananas e glucomananas; xiloglucanas e galactanas (REID, 1985).

### 1.1 Galactomananas

As duas principais fontes de galactomananas são: (a) o endosperma de sementes dos vegetais, a maioria proveniente da família Leguminosae, e (b) fontes microbianas, em particular, leveduras e outros fungos (DEA; MORRISON, 1975).

Nos vegetais, as galactomananas também são encontradas nas sementes das famílias Annonaceae, Compositae, Convolvulaceae, Ebenaceae, Lagoniaceae, Malvaceae, Palmae, Solanaceae, Tiliaceae, Umbelliferae, e provavelmente Cuscutaceae. A maioria das galactomananas de plantas são polissacarídeos constituídos de uma cadeia linear de unidades D-manose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  com substituições por unidades de D-galactose ligadas  $\alpha(1\rightarrow6)$  ao longo da cadeia principal (DEY, 1978; SCHERBUKHIN; ANULOV, 1999).

O laboratório de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular desta Universidade já isolou e caracterizou galactomananas de diferentes espécies de leguminosas nativas. Já foram estudadas as galactomananas de sementes de *Mimosa scabrella* (GANTER *et al.*, 1992), *Strypnodendron barbatiman* (REICHER *et al.*, 1991), *Schizolobium parahybae* (GANTER *et al.*, 1995) e *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ *et al.*, 1998), entre outras.

Algumas galactomananas apresentam estruturas que diferem da estrutura clássica. Em *Cassia absus*, a galactomanana apresenta ligações  $(1\rightarrow3)$  na cadeia principal, e podem ocorrer substituições em O-2, além daquelas convencionais ligadas em O-6 (DEA; MORRISON, 1975). GUPTA (1986) demonstrou que a galactomanana

de *Melilotus indica* apresenta 36% de ligações (1→4) e 10% de ligações (1→2) na cadeia de manose. Além disso, estão presentes unidades de  $\alpha$ -D-galactose ligadas (1→4), unidas a O-6 na cadeia da manana. Apresenta ainda cadeias laterais de unidades  $\beta$ -D-manose ligadas (1→4), unidas a O-4 de uma unidade de  $\alpha$ -D-galactose, que se liga a cadeia principal por ligação (1→6).

ISHURD *et al.* (2005) isolaram, das semente de *Retama raetam*, uma galactomanana cuja cadeia principal apresenta unidades de manose ligadas majoritadamente  $\beta$ (1→3), existindo, ocasionalmente, ligações  $\beta$ (1→4). As cadeias laterais de unidades galactopiranosil estão ligadas em O-6.

A bioquímica e fisiologia da síntese e mobilização das galactomananas foram extensivamente estudadas nas sementes de *Trigonella foenum-graecum*, *Cyamopsis tetragonolobus*, *Trifolium repens* e *Ceratonia siliqua* (REID; BEWLEY, 1979; REID; EDWARDS, 1995).

O endosperma de *Trigonella foenum-graecum* é completamente preenchido com galactomanana e é considerado não vivo; as únicas células vivas do endosperma estão presentes na camada de aleurona que contorna o tecido de reserva. O polissacarídeo é depositado na parede celular do endosperma e ocorre até o preenchimento total da célula. Citoplasma e vacúolo desaparecem e são substituídos por uma massa de galactomanana, num processo que ocorre célula a célula; as células do endosperma próximas ao embrião são as primeiras a serem preenchidas. Já no endosperma de *Ceratonia siliqua* as células do tecido de reserva são vivas e as galactomananas estão presentes na parede celular espessada (REID, 1985).

A síntese das galactomananas no endosperma ocorre com a geração de dois nucleotídeos-açúcar: GDP-glucose e UDP-glucose. Estes compostos são transformados pela 2-epimerase e 4-epimerase em GDP-manose e UDP-galactose, respectivamente, os quais são os doadores das unidades monossacarídicas para a construção das cadeias do polímero. Este processo é mediado por duas transferases: manosil transferase (na presença de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) e galactosil transferase ( $Mg^{2+}$ ). Foi descrito um acceptor glicosil endógeno (primer), mas sua natureza é pouco compreendida (DEY, 1978).

Durante a germinação, a biodegradação das galactomananas requer a presença de três enzimas:  $\alpha$ -galactosidase, para remoção das cadeias laterais de  $\alpha$ -D-galactose;  $\beta$ -mananase, uma endoenzima que hidrolisa cadeias de mananas ligadas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) em oligossacarídeos; e  $\beta$ -manosidase, uma glicosidase para hidrólise completa dos oligossacarídeos formados (DEY, 1978; REID; BEWLEY, 1979).

A quebra das galactomananas no endosperma de *Trigonella foenum-graecum* inicia-se 16h após a germinação, e é completa em 24 horas (REID; BEWLEY, 1979). Os produtos desta quebra são rapidamente absorvidos pelo embrião e convertidos em sacarose e amido. A degradação da galactomanana no endosperma é realizada pela ação da  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -mananase e  $\beta$ -manosidase, produzidas pela camada de aleurona. Em *Ceratonia siliqua*, as três enzimas citadas estão presentes no endosperma. Inicialmente ocorre uma dissolução da parede ao redor das células endospermicas, devido à secreção das enzimas hidrolíticas. A produção das enzimas inibe o acúmulo dos produtos degradados no endosperma, assim os produtos degradados são transportados aos cotilédones e a inibição é atenuada (REID, 1985; McCLEARY; MATHESON, 1975). SCHAEFER (2000) mostrou que nas sementes de *Schizolobium parahybae*, a galactomanana começa a ser degradada no endosperma a partir do quarto dia após a germinação, sendo totalmente consumida pelo embrião após 12 dias.

A presença de galactomananas como principal carboidrato de reserva em sementes de Leguminosas é considerada uma importante ferramenta taxonômica (HEGNAUER; GRAYER-BARKMEUER, 1993). O grau de substituição de galactose nas galactomananas varia de 20 a aproximadamente 100% e é controlado geneticamente. A relação manose:galactose é taxonômica dependente, ou seja, espécies relacionadas taxonomicamente apresentam relações manose:galactose semelhantes. Altos valores de relação manose:galactose são relacionadas com táxon primitivo (subfamília Caesalpinioideae), enquanto uma quantidade maior de galactose é característica de espécies mais avançadas (subfamília Faboideae) (SCHERBUKHIN; ANULOV, 1999; BUCKERIDGE; DIETRICH, 1990).

Quando dispersas em água, as galactomananas formam soluções de alta viscosidade. As galactomananas secas são hábeis em embeber água em quantidades

que excedem sua própria massa, resultando na formação de soluções de alta viscosidade com aparência de um gel (DEA; MORRISON, 1975). Devido à natureza não iônica das galactomananas, estes polissacarídeos mantêm sua viscosidade aproximadamente constante em uma ampla faixa de pH. É aceito que a viscosidade das soluções de galactomananas seja essencialmente controlada pelo tamanho molecular, sendo que o nível de substituição representa pouco ou nenhum papel (DEA; MORRISON, 1975).

As moléculas de galactomananas no estado sólido apresentam-se em uma conformação do tipo “fita”, relativamente estendida e flexível. A introdução de cadeias laterais de galactose promove uma redução nas dimensões das cadeias. O grau de substituição tem grande influência na solubilidade destes polissacarídeos. As substituições em O-6 de unidades de D-manose por grupos D-galactose resulta em um aumento na capacidade de hidratação, aumentando a solubilidade destes polissacarídeos. Um nível mínimo de substituição de 10% de galactose é necessário para a solubilidade em água a temperatura ambiente. A proporção manose:galactose também é extremamente importante na capacidade de interação molecular e susceptibilidade a degradação enzimática (DEA; MORRISON, 1975; DEA, 1987; DEY, 1978; McCLEARLY, *et al.*, 1985; PETKOWICZ *et al.*, 1998).

Em solução aquosa as galactomananas apresentam-se em uma conformação do tipo enovelada (“random coil”), um estado que só é revertido a formas mais ordenadas em condições favoráveis de agregação ou interação com outras espécies (DEA; MORRISON, 1975; ROBINSON *et al.*, 1982).

As galactomananas das sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), de alfaborro ou “locust bean” (*Ceratonia siliqua*) são amplamente usadas na indústria, principalmente na alimentícia. Os principais usos das galactomananas são em produtos derivados do leite (espessante em sobremesas, e, em particular, sorvetes e como substitutos de gordura), produtos em pó (sobremesas e pudins), panificação (misturas para bolo e glacê), produtos dietéticos, formulações de leite para crianças, temperos, molhos, sopas e alimentos enlatados (REID; EDWARDS, 1995).

As galactomananas de guar e alfaborro também são utilizadas na indústria de papel, sendo adicionadas durante o processo de obtenção da polpa celulósica com a

finalidade de repor o suplemento natural de hemicelulose, que é removido no processo de deslignificação, contribuindo nas propriedades de hidratação da polpa e resistência da folha de papel (WHISTLER, 1973).

Na indústria de cosméticos as galactomananas são utilizadas como espessantes e estabilizantes em cremes e loções (WHISTLER, 1973).

Na indústria farmacêutica, além do uso direto como fibras dietéticas, as galactomananas são utilizadas na fabricação de comprimidos alterando a velocidade de liberação da substância ativa (BAVEJA *et al.*, 1991). UGHINI *et al.* (2004) verificaram o potencial de uso de uma mistura de galactomanana e xantana como matriz de liberação controlada de diclofenato de sódio em tabletes e cápsulas. Em comparação com o produto comercial de liberação de diclofenato de sódio, o sistema xantana:galactomanana funcionou como retardador da liberação tanto em cápsulas como tabletes.

Sabe-se que a adição da galactomanana de guar em refeições ricas em carboidratos reduz o aumento pós-prandial de glucose e insulina no sangue em indivíduos saudáveis e diabéticos. Além disso, melhorias no metabolismo de carboidratos e lipídeos em pacientes insulino dependentes e insulino não dependentes foram conseguidas usando preparações farmacêuticas de guar e alimentos adicionados da mesma goma. A ação fisiológica do guar parece depender principalmente da capacidade da goma de hidratar rapidamente e assim aumentar a viscosidade do bolo alimentar no estômago e no intestino delgado. A alta viscosidade no intestino delgado diminui a digestão e absorção de carboidratos, o que tende a reduzir a hiperglicemia pós-prandial (ELLIS *et al.*, 1991).

RAMESH *et al.* (2002) demonstraram que a galactomanana de *Trigonella foenum-graecum* é capaz de ativar a fagocitose em macrófagos peritoniais, além de promover o crescimento de células HB4C5 e inibição da secreção de IgM.

## 1.2 Mananas

As mananas podem ser encontradas, nos vegetais, em parede celular ou endosperma de sementes maduras de plantas não leguminosas, e podem ter função estrutural ou de reserva (STEPHEN, 1983).

A parede celular de muitas leveduras apresenta mananas ligadas covalentemente a proteínas, onde representam um componente estrutural. Neste caso as  $\alpha$ -D-manopiranas são predominantes, exibindo uma variedade de tipos de ligações, tanto em estruturas lineares como ramificadas (GORIN; BARRETO-BERGTER, 1983).

Mananas puras são relativamente raras em plantas. São consideradas D-mananas puras os polissacarídeos que contém 95% ou mais de manose (ASPINALL, 1959). São encontrados no endosperma de sementes de Palmae, onde atuam como material de reserva (AVIGAD & DEY, 1997). Os polissacarídeos de *Phytelephas macrocarpa*, chamados de mananas de “ivory nut” constituem as mananas de planta mais estudada e melhor caracterizada que se conhece (STEPHEN, 1983). Duas mananas com a mesma estrutura química, mas que diferem na solubilidade, estão presentes nestas sementes: a manana A, granular, que pode ser extraída com álcali e a manana B, fibrilar, que não pode ser extraída diretamente, e é separada da celulose por precipitação com solução de cobre amoniacal. O tamanho das cadeias também varia entre as duas mananas, tendo sido determinado um grau de polimerização de 20 para a manana A e 80 para a manana B (TIMELL, 1957; MEIER, 1958; BACIC *et al.*, 1988).

Por razões termodinâmicas, uma  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-manana, em solução, deve adotar uma conformação tipo “fita estendida”, onde os grupos alcoólicos primários projetam-se alternadamente para ambos os lados da cadeia linear. Tais polissacarídeos são caracterizados pela eficiência de suas pontes de hidrogênio e concomitante perda de solubilidade em água (REES, 1972; STEPHEN, 1983).

As  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-mananas assemelham-se a celulose estereoquimicamente, exceto pela configuração axial do O-2 na manose, em oposição à equatorial na glucose. Porém, as mananas possuem uma massa molecular extremamente pequena quando comparadas à celulose e suas microfibrilas são muito mais sensíveis a tratamentos

químicos e físicos (NIEDUSZYNSKI; MARCHESSAULT, 1972; YUI *et al.*, 1992; MILLANE; HENDRIXSON, 1994).

A presença deste polissacarídeo também já foi constatada em sementes de café (WOLFRON *et al.*, 1961), tomate (GROOT *et al.*, 1988), pimenta (WATKINS *et al.*, 1985), alface (HALMER; BEWLEY, 1979) e centeio (JACOBSEN; PRESSMAN, 1979).

Mananas lineares ligadas  $\beta(1\rightarrow4)$  estão presentes em grãos de café verdes e torrados. A partir de extrações aquosas das sementes torradas de café (*Coffea arabica*) NAVARINI *et al.* (1999) isolaram uma  $\beta(1\rightarrow4)$  manana com poucas substituições por galactose e arabinose. Alguns autores consideram que as mananas presentes nas sementes de café podem ser responsáveis pela viscosidade de certos extratos de café, uma vez que o tratamento com mananases reduz significativamente a viscosidade destes extratos (OOSTERVELD *et al.*, 2004).

A única semente, que contém manana, cuja mobilização do carboidrato foi estudada em detalhes é *Phytalephas macrocarpa* (REID, 1985). Nestas sementes, um pequeno embrião cônico desenvolve-se lentamente e seu cotilédone é transformado em um haustório, o qual absorve os produtos de degradação das reservas que se segue após a germinação. Nestas sementes, uma  $\beta$ -mananase e uma  $\beta$ -manosidase foram detectadas próximas ao haustório. Foi proposto que o haustório não seria responsável pela produção destas enzimas. Ao invés disso, as enzimas seriam ativadas nas células endospermas, que são vivas e metabolicamente ativas, por um sinal ainda não conhecido derivado do haustório (BUCKERIDGE *et al.*, 2000).

A polpa mucilaginosa da folha da planta *Aloe vera* consiste de células mortas, sem organelas. Da mucilagem (ou gel), principal componente da polpa, foi possível isolar uma manana parcialmente acetilada, sendo que muitos dos benefícios desta planta são atribuídos aos polissacarídeos presentes no material (NI *et al.*, 2004).

O endosperma de sementes verdes de algumas espécies da família Palmae contém galactomananas, ao passo que, as sementes maduras de todas as espécies desta família que foram estudadas, consistem de mananas contendo apenas uma pequena proporção de unidades de galactose. Para KOOIMAN (1971), isto pode sugerir que a maior parte das unidades de galactose seja removida durante a maturação destas

sementes, resultando em uma parede celular que é muito menos sujeita a inchamento e dissolução em água. Este processo ocorreria concomitantemente com a transição do endosperma da fase hidratada, gelatinosa, para a fase desidratada na maturidade.

SAMPEDRO *et al.* (2004) testaram os efeitos antiproliferativos de uma manana isolada de *Aloe saponaria*. A manana inibiu a resposta proliferativa em células normais e tumorais. O polissacarídeo inibiu a expressão de CD3<sup>+</sup>, indicando que a manana inibe principalmente a resposta proliferativa de linfócitos T.

PETKOWICZ *et al.* (2001) isolaram, pela primeira vez, em leguminosas, uma manana pura a partir do endosperma de *Schizolobium amazonicum* (Leguminosae-Caesalpinioideae). Os padrões de difração de raio-X e difração de elétrons foram típicos deste polissacarídeo. As análises de metilação e espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C confirmaram a estrutura de uma manana pura.

SCHAEFER (2000) isolou uma manana pura do endosperma de *Schizolobium parahybae*. Foi demonstrado também que durante a germinação desta semente, a manana não foi consumida pelo embrião, sugerindo que este polissacarídeo possui função estrutural no endosperma das sementes.

Considerando-se que a presença de mananas em espécies da família Leguminosae é um fato novo, o presente trabalho tem o objetivo de investigar se a presença deste polissacarídeo é uma característica exclusiva do gênero *Schizolobium* ou se ocorre em outras espécies de leguminosas.

### 1.3 Família Leguminosae

A família Leguminosae, uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreende mais de 600 gêneros que reúnem mais de 13000 espécies, espalhadas por todo o mundo especialmente regiões tropicais e subtropicais (JOLY, 1993).

São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e também muitas trepadeiras; vivem nos mais variados ambientes, em diferentes altitudes e longitudes. As folhas são sempre de disposição alterna, compostas. Folhas e folíolos de todas as ordens sempre

com pulvinos (articulações) na base, seja do pecíolo, que permitem movimentos diurnos aos folíolos e folhas (JOLY, 1993).

As flores são variadas, sempre cíclicas e fruto variado em geral legume, seco deiscente por duas valvas ou do tipo lomento, segmentando-se ou seco e indeiscente ou de pericarpo mais ou menos carnosos. As sementes são, às vezes, envolta em mucilagem ou polpa doce, ou com arilo ou ainda com testa duríssima. Todas são plantas que vivem simbioticamente com certas bactérias, capazes de fixar o nitrogênio do ar, encontradas nos nódulos, nas raízes (JOLY, 1993).

Esta família compreende, de acordo com a classificação de ENGLER (1964), três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae. CRONQUIST (1981) classifica as leguminosas como ordem Fabales, a qual engloba três famílias: Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae. A classificação adotada neste trabalho será a de ENGLER (1964).

### 1.3.1 Subfamília Caesalpinioideae

Esta subfamília compreende cerca de 150 gêneros. São leguminosas arbustivas, arbóreas ou trepadeiras das matas, raramente são ervas. Apresentam folhas compostas, em geral, simplesmente pinadas ocorrendo também duplamente pinadas. Fruto em geral legume, às vezes falsamente septado, às vezes com uma só semente que cai envolta do endocarpo fibroso que funciona como asa (JOLY, 1993).

Esta subfamília está muito bem representada no Brasil. O gênero com maior número de espécies é *Cassia*, conhecido por suas flores amarelas; outros gêneros freqüentes são: *Caesalpinia*, *Dimorphandra*, *Bauhinia*, *Copaifera*, *Hymenaea*, dentre outros. Dentre os gêneros introduzidos e cultivados destacam-se *Delonix*, *Tamarindus* e certas espécies de *Cassia* (JOLY, 1993).

#### 1.3.1.1 *Cassia fastuosa*

A *Cassia fastuosa*, vulgarmente conhecida por cassia, também conhecida como marimari, parica, maripixuma, é uma árvore da subfamília Caesalpinioideae, que

apresenta comumente 8 a 12 metros de altura, podendo atingir até 40 metros, com tronco de 1,5-6 dm de diâmetro, podendo chegar a 1m. A espécie é encontrada em florestas de terra firme, sobrevivendo entre capoeiras, é uma árvore sombreira em pastos, originalmente nativa de beiras rios e clareiras naturais (LORENZI, 1992).

Apresenta folhas bipinadas compostas por 10 a 12 folíolos, flores longas-pediculadas amarelas, legumes lenhosos e quadrangulares. Cada legume apresenta 40 a 50 sementes, com massa total variando de 8 a 10g (LORENZI, 1992).

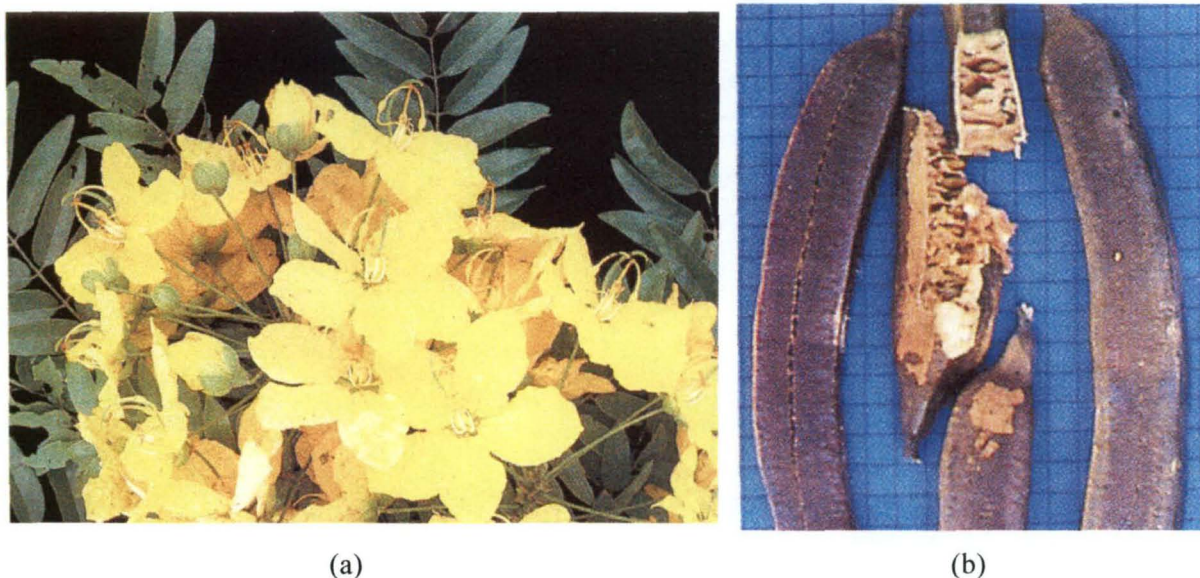


FIGURA 1 - Flor (a) e fruto (b) de *Cassia fastuosa*

#### 1.3.1.2 *Delonix regia*

Flamboyant é o nome vulgar da espécie *Delonix regia*, pertencente a subfamília Caesalpinioideae. É uma árvore de médio porte que cresce em regiões quentes e úmidas da Índia, África e América (zonas tropicais). Empregada na arborização de parques e jardins, e muito apreciada pelas qualidades ornamentais de suas flores. As folhas apresentam de 10 a 14 pares de pinas opostas, com 20 a 25 folíolos curtos e peciolados. Suas flores são vermelhas e alaranjadas e suas vagens são compridas e grandes, contendo em média 20 sementes, com valvas que se enroscam e abrem na maturação, lançando as sementes a curta distância (BAILEY, 1954; BRAGA 1976).



FIGURA 2 - Flor e fruto de *Delonix regia*

### 1.3.2 Subfamília Mimosoideae

Esta subfamília, que é a menor dentre as leguminosas, compreende cerca de 40 gêneros. São plantas arbustivas ou arbóreas, de folhas freqüentemente duplamente pinadas. Flores reunidas em densas inflorescências esféricas, capituliformes ou alongadas. Fruto seco, tipo legume, ou indeiscente, com sementes mergulhadas em polpa doce, ou do tipo lomento (JOLY, 1993).

Representantes desta subfamília são abundantes nas regiões tropicais. Dentre os gêneros que se encontram no Brasil destacam-se pelo número de espécies: *Mimosa*, *Calliandra*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Parkia* e *Piptadenia* (JOLY, 1993).

#### 1.3.2.1 *Adenanthera pavonina*

Popularmente conhecida como carolina, *Adenanthera pavonina* pertence à subfamília Mimosoideae. É uma planta nativa da Ásia e África tropical, que foi transplantada para toda a América tropical. Apresenta até 15 metros de altura e é empregada na arborização de parques e jardins. As folhas, pecioladas, apresentam de

dois a cinco pares de pinas opostas, com seis a dez folíolos curtos e peciolados. Apresentam flores amarelo-pálidas ou raramente brancas. Suas vagens são compridas, estreitas, curvado-falconadas, com valvas que se enroscam na maturação, lançando as sementes à curta distância (BAILEY, 1954; BRAGA 1976).



FIGURA 3 - Fruto e sementes de *Adenanthera pavonina*

#### 1.3.2.2 *Leucaena leucocephala*

A *Leucaena leucocephala*, conhecida como leucena, é uma planta da subfamília Mimosoideae. Arbusto ou árvore pequena, entre 5 e 10 m de altura. Folhas alternas bipinadas, com 25 cm de comprimento; entre 4-9 pares de pinas, com 8-10 cm. Entre 11-17 pares de folíolos, de 9-12 mm, opostos, lanceolados, acuminados; de coloração verde-acinzentada. As vagens são agrupadas, lineares, achatada, com 10-15 cm de comprimento e 2 cm de largura, marrom-escura, com um bico no ápice; cada vagem contém aproximadamente 20 sementes de coloração marrom brilhante, oblonga-oval, achatada, com 6 mm de comprimento (LORENZI, 1992).



FIGURA 4. Flor e fruto de *Leucaena leucocephala*

### 1.3.3 Subfamília Faboideae

Esta subfamília compreende cerca de 400 gêneros, sendo a maior entre as leguminosas. As folhas deste grupo geralmente são trifoliadas e as flores fortemente zigomorfas com uma grande pétala, superior, externa. O fruto, em geral, é legume raramente indeiscente (JOLY, 1993).

Pertencem a esta subfamília todos os legumes, tais como *Phaseolus* (feijão), *Lens* (lentilha), *Cicer* (grão-de-bico), *Glycine* (soja), *Arachis* (amendoim), entre outros. Dentre os gêneros nativos se destacam: *Erythrina*, *Mucuna*, *Desmodium*, *Andira*, *Sophora* e *Clitoria* (JOLY, 1993).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a presença de galactomananas e mananas no endosperma de sementes de espécies das diferentes subfamílias de leguminosas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolar o endosperma de sementes de *Adenanthera pavonina*, *Cassia fastuosa*, *Delonix regia* e *Leucaena leucocephala*.
- Extrair as galactomananas presentes no endosperma de *Adenanthera pavonina*, *Cassia fastuosa*, *Delonix regia* e *Leucaena leucocephala* através de extrações aquosas e alcalinas.
- Caracterizar as galactomananas isoladas.
- Investigar a presença de mananas no resíduo final proveniente das extrações aquosas e alcalinas do endosperma.
- Caracterizar as mananas isoladas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Métodos Gerais

Foi utilizado etanol com grau de pureza comercial para a precipitação dos polissacarídeos das soluções, apresentando os demais solventes e reagentes utilizados grau de pureza PA-ACS.

Os polissacarídeos obtidos por precipitação com etanol foram separados da fase líquida por centrifugação, lavados com etanol absoluto, e secos em estufa a vácuo.

Para remoção dos solventes foi utilizado evaporador rotatório, a vácuo, em temperatura inferior a 50°C.

#### 3.2 Obtenção das sementes

As sementes de *Delonix regia* e *Leucaena leucocephala* foram adquiridas junto ao IPEF (Instituto de Pesquisas Florestais).

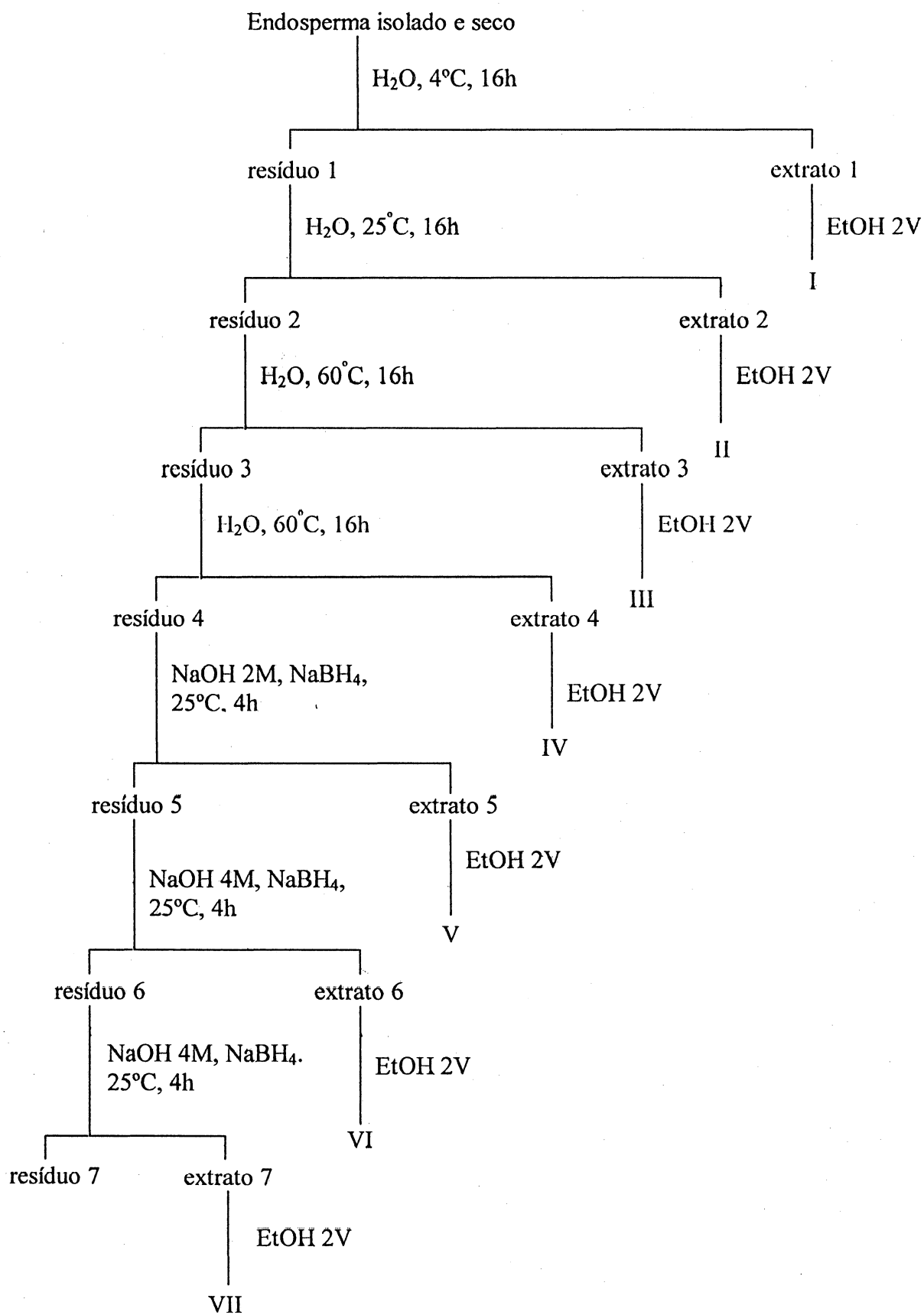
As sementes de *Adenantha pavonina* foram gentilmente cedidas pelo Dr. Renato Moreira, da Universidade Federal do Ceará.

As sementes de *Cassia fastuosa* foram coletada em Curitiba, em espécimes utilizadas na arborização da cidade. A espécie foi identificada pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná. Uma exsicata da espécie está depositada no Herbário (UPCB) do mesmo Departamento, sob número 5904.

#### 3.3 Extração dos polissacarídeos

Inicialmente as sementes foram submetidas à fervura em água, por aproximadamente 20 minutos, para inativação enzimática e embebição. Após, o endosperma foi separado do tegumento e seco em estufa a vácuo. Para obtenção das galactomananas, os endospermas isolados foram submetidos a extrações aquosas seqüenciais: 4°C, 25°C e 60°C, sendo a última extração aquosa realizada duas vezes.

FIGURA 5 - Fluxograma de extração dos polissacarídeos do endosperma das sementes de leguminosas.



Em seguida foram realizadas uma extração com NaOH 2M e duas extrações com NaOH 4M na presença de NaBH<sub>4</sub> (Figura 5). As frações originadas foram centrifugadas em equipamento SORVALL T6000D a 10000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante precipitado com a adição de dois volumes de etanol comercial.

O material precipitado foi lavado com álcool absoluto três vezes e então seco em estufa a vácuo.

Para a obtenção das mananas o resíduo das extrações foi submetido a extrações com álcali até que todos os polissacarídeos solúveis fossem extraídos.

### 3.4 Determinação da composição monossacarídica

As hidrólises ácidas foram realizadas por dois métodos:

- a) TFA 1 M, durante 5 horas a 100°C. Ao término da hidrólise o excesso de ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965; BIERMANN, 1989).
- b) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (p/p), durante 1 hora, em banho de gelo, seguido de diluição para 7% a 100°C, durante 6 horas. Ao final da hidrólise o ácido foi neutralizado com carbonato de bário e o sal resultante removido por filtração (BIERMANN, 1989).

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram então reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), em meio aquoso, a 25°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Em seguida foi adicionado ao material uma resina catiônica Lewatit S-100 para a remoção do cátion sódio (Na<sup>+</sup>) e para decompor o excesso do agente redutor. A seguir o material foi filtrado, evaporado até a secura e lavado sucessivamente com metanol para a remoção do ácido bórico remanescente por co-destilação com metanol, na forma de borato de trimetila. Após completa secura, os alditóis foram acetilados com anidrido acético – piridina (1:1 v/v) durante 16 horas a temperatura ambiente (25 °C) (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). Esta reação foi interrompida com a adição de gelo moído e os alditóis acetatos foram extraídos com clorofórmio. A piridina residual na fase clorofórmica foi eliminada com sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% e água de forma intercalada. A fase clorofórmica foi lavada diversas vezes

com água destilada, evaporada a 25°C para posterior análise por cromatografia líquido-gasosa.

Para as análises de cromatografia líquido-gasosa (GLC) utilizou-se um cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 A II, equipado com detector de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2 mL/min. Foi utilizada uma coluna capilar [30 m x 0,25 mm (d.i.)] DB-225, com espessura de filme 0,25 µm, sendo a temperatura do detector 300°C e do injetor 250°C (SLONEKER, 1972).

### 3.5 Análises polarimétricas

As análises de rotação óptica foram efetuadas a 25 °C, em polarímetro digital PDA 8200-ACATEC, com caminho óptico de 1,0 dm. As amostras foram solubilizadas em água ou solução de uréia 50%. Os valores experimentais do ângulo de desvio da luz plano-polarizada  $\alpha$ , fornecidos pelo aparelho, foram utilizadas para o cálculo da rotação óptica específica,  $[\alpha]_D^{25}$  das soluções, conforme a equação:

$$[\alpha]_D^{25} = \alpha / (Lc) \times 100, \text{ onde:}$$

L = comprimento do caminho óptico (dm)

c = concentração da solução (g%)

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

As amostras foram solubilizadas em solução de NaNO<sub>2</sub> 0,1 M contendo NaN<sub>3</sub> a fim de que a concentração de polissacarídeo fosse 1 mg/mL. As amostras foram filtradas através de membranas de acetato de celulose de 0,2µm. As análises foram efetuadas em um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 (RI) e detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. O ângulo

de 90° é o canal utilizado devido a sua maior sensibilidade. Utilizaram-se quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de  $1.10^6$ ,  $4.10^5$ ,  $8.10^4$  e  $5.10^3$ . O eluente utilizado foi uma solução de  $\text{NaNO}_2$  0,1 M contendo  $\text{NaN}_3$  200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min, pressão de 920 psi a 30°C, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração ( $dn/dc$ ) foi determinada para as amostras homogêneas, sendo que para cada amostra foram utilizadas 5 concentrações. Para isto foi preparada uma solução na concentração de 0,5 mg/mL em  $\text{NaNO}_2$  0,1M, filtrada em membrana de 0,22 $\mu\text{m}$  e a partir desta solução foram feitas diluições para concentrações de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg/mL. A massa molar foi determinada a partir do perfil de eluição e valores de  $dn/dc$ . Os cálculos foram efetuados pelo software ASTRA.

### 3.7 Análise de metilação

As galactomananas secas foram metiladas pelo método de CIUCANU e KEREK (1984). Cerca de 10 mg do polissacarídeo foi solubilizado em DMSO, seguido da adição de 200 mg de NaOH seco e pulverizado. O sistema foi agitado durante 10 min em aparelho Vortex, adicionando-se em seguida 0,5 mL de iodeto de metila, repetindo-se a agitação por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de gelo e ácido acético. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e lavado com água.

Para a metilação das mananas foi utilizado o método de Haworth, conforme descrito por HIRST e PERCIVAL (1960), no qual o polissacarídeo (10 mg) foi solubilizado em 10 mL de NaOH 40% em presença de  $\text{NaBH}_4$ . Em intervalos de 30 min, por 10 vezes, foram adicionadas alíquotas de dimetil sulfato e o sistema permaneceu sob agitação, a temperatura ambiente, por mais 18h, e após o último acréscimo do agente metilante, o processo descrito foi repetido. Após a última adição, foi acrescentado 50 mL de água e o sistema levado a ebulição por 30 min sob refluxo. Após o resfriamento, o meio foi neutralizado com ácido acético, em banho de gelo, dialisado por 92h e seco a vácuo.

Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% (p/v), reduzidos, acetilados e analisados por cromatografia líquido gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS). As análises por GLC-MS foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN-MAT, com injetor a 50°C e “rampa” de 40°C por minuto até 220°C, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i) revestidas com DB-225 ou DB 210 e hélio como gás de arraste (1 mL/min).

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

As determinações de RMN foram realizadas no aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400, com ressonância de  $^{13}\text{C}$ , de 400MHz, utilizando a temperatura de 50 ou 70 °C. As amostras foram solubilizadas em  $\text{D}_2\text{O}$  (para galactomananas) ou uréia 50% em  $\text{D}_2\text{O}$  (para mananas).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O endosperma seco das diferentes sementes, previamente inativadas, foi submetido a extrações seqüenciais com água e álcali conforme indicado na Figura 5 (página 17).

O fluxograma de extrações utilizado foi o mesmo para as quatro espécies estudadas. Para identificação das frações resultantes das extrações para cada espécie utilizou-se a inicial do nome científico da espécie seguida do número romano que identifica a seqüência da extração, conforme indicado na tabela abaixo:

TABELA 1 - Resumo da nomenclatura de identificação das frações isoladas e resíduos finais a partir das extrações aquosas e alcalinas das diferentes espécies estudadas.

	Fração originada	<i>Adenanthera</i> <i>pavonina</i>	<i>Cassia</i> <i>fastuosa</i>	<i>Delonix</i> <i>regia</i>	<i>Leucaena</i> <i>leucocephala</i>
Extração H <sub>2</sub> O 4°C	I	A I	C I	D I	L I
Extração H <sub>2</sub> O 25°C	II	A II	C II	D II	L II
Extração H <sub>2</sub> O 60°C	III	A III	C III	D III	L III
Extração H <sub>2</sub> O 60°C	IV	A IV	C IV	D IV	L IV
Extração NaOH 2M	V	A V	C V	D V	L V
Extração NaOH 4M	VI	A VI	C VI	D VI	L VI
Extração NaOH 4M	VII	A VII	C VII	D VII	L VII
Resíduo Final	R	A R	C R	D R	L R

#### 4.1 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do endosperma de sementes de *Cassia fastuosa* (cassia)

O percentual de endosperma nas sementes de cassia foi 60%, o que pode ser considerado um valor elevado. Este valor é superior ao descrito por WHISTLER e SMART (1953) para as Caesalpinoideae (8-40%).

As extrações sequenciais do endosperma (Figura 5; página 17) revelaram a presença de polissacarídeos com altos percentuais de manose e galactose, indicando a ocorrência de galactomananas, conforme mostrado na Tabela 2.

O rendimento total de galactomanana solúveis em água corresponde a aproximadamente 56% do endosperma seco. O alto percentual de galactomananas no endosperma é uma característica da subfamília Caesalpinioideae, enquanto que baixos conteúdos de galactomananas são típicos da subfamília Faboideae. O rendimento em galactomananas solúveis no endosperma da cássia é superior ao descrito para *Ceratonia siliqua*, utilizada como fonte comercial de galactomanana (DEA; MORRISON, 1975).

TAEBLA 2 - Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações sequenciais do endosperma das sementes de *Cassia fastuosa*.

Composição monossacarídica							
mol (%) <sup>a</sup>							
Fração	Rend. <sup>b</sup>	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
C I	21,2	tr	tr	tr	67,8	26,9	5,3
C II	8,7	-	tr	tr	76,0	24,0	tr
C III	23,2	tr	tr	tr	76,3	19,3	4,4
C IV	3,2	tr	tr	tr	82,9	17,1	tr
C V	5,4	tr	tr	tr	85,4	12,6	2,0
C VI	4,0	tr	2,2	tr	79,6	11,8	6,4
C VII	1,6	tr	1,9	tr	85,7	8,4	4,0

(a): monossacarídeos neutros determinados por GLC

(b): em relação ao endosperma seco (g%)

As extrações do endosperma de *Cassia fastuosa* deram origem a galactomananas com valores crescentes de relação manose:galactose (Tabela 3). Essa redução na proporção de galactose diminui a solubilidade dos polissacarídeos.

Na literatura, a maioria das descrições de galactomananas de leguminosas envolvem a caracterização de um único tipo de polissacarídeo (CHAUBEY; KAPOOR, 2001). Entretanto, a ocorrência de uma “família” de galactomananas no endosperma de sementes de uma mesma espécie já foi descrita para *Gleditsia triacanthos* (MANZI *et al.*, 1984) e *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ *et al.*, 1998).

À medida que decresce o conteúdo de ramificações de  $\alpha$ -galactose na cadeia da  $\beta$ -manana, a rotação óptica específica altera-se desde valores positivos para as galactomananas mais substituída para valores negativos e decrescentes com a redução da quantidade de galactose.

NOBLE *et al.* (1986) correlacionaram a rotação óptica específica com o conteúdo de galactose para uma série de galactomananas com diferentes graus de substituição. LESCHZINER e CEREZO (1969) e KOOIMAN (1971) desenvolveram equações empíricas correlacionando a composição de galactomananas com suas rotações.

TABELA 3 – Relação manose:galactose e rotação óptica específica das galactomananas obtidas do endosperma das sementes de *Cassia fastuosa*.

Fração	Man:Gal	$[\alpha]^{25}_D$
C I	2,5:1	+ 28,4°
C II	3,2:1	+ 20,5°
C III	4,0:1	+ 9,5°
C IV	4,8:1	- 5,2°
C V	6,7:1	- 16,7°
C VI	6,8:1	- 30,7°
C VII	10:1	- 31,7°

Para o isolamento da manana do endosperma de *Cassia fastuosa* foram necessárias duas extrações adicionais, além das extrações sequenciais realizadas previamente.

A hidrólise do resíduo das extrações realizadas com endosperma das sementes de *Cassia fastuosa* mostrou a presença de manose como componente majoritário. A composição monossacarídica obtida foi de 95,1% de manose e 4,9% de galactose, indicando-se tratar de uma manana. Este polissacarídeo foi analisado por metilação e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

A composição monossacarídica desta fração apresentou apenas traços de glucose, indicando a ausência de celulose no endosperma das sementes de *Cassia fastuosa*. A rotação óptica específica da manana solubilizada em uréia (50%) foi de  $-111,9^\circ$ . O valor de rotação óptica obtido para a manana de cassia é muito mais negativo do que os valores determinados para outras mananas conhecidas:  $[\alpha]_D^{25} = -38,2^\circ$  para a manana B de “ivory nut”;  $[\alpha]_D^{25} = -48^\circ$  para a manana de *Borassus flabellier* e  $[\alpha]_D^{25} = -41^\circ$  para a manana de *Porphyra umbicalis*. Esta diferença deve-se provavelmente a maior massa molecular do polissacarídeo isolado de *Cassia fastuosa*. Além disso, as diferenças no tipo de solvente utilizado (NaOH para as mananas de “ivory nut” e *Borassus flabellier* e anidrido fórmico para a manana de *Porphyra umbicalis*) podem promover diferentes arranjos conformacionais nas moléculas, os quais também podem afetar os valores de rotação óptica.

A análise de metilação do resíduo indica se tratar de uma  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-manana (Tabela 4). O polissacarídeo metilado apresentou os seguintes derivados: 89,7% de 2,3,6 - Me<sub>3</sub> - Man (unidades de manose não substituídas); 3,0% de 2,3,4,6 - Me<sub>4</sub> - Man (terminais redutores); 4,2% de 2,3 - Me<sub>2</sub> - Man (unidades de manose substituídas por galactose).

TABELA 4 – Análise por metilação da manana de *Cassia fastuosa* na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

Derivados metilados	mol% <sup>a</sup>	M.S. (m/z) <sup>a</sup>
2,3,4,6 – Me <sub>4</sub> - Man	3,0	87,101,117,129,145,161,171,179,189,205
2,3,4,6 - Me <sub>4</sub> - Gal	3,1	87,101,117,129,145,161,171,179,189,205
2,3,6 - Me <sub>3</sub> - Man	89,7	87,99,101,113,117,129,131,141,159,173,179,189,203,211,217
2,3 - Me <sub>2</sub> – Man	4,2	85,101,111,117,127,142,153,159,171,187,201,209,217

(a) GLC-MS em coluna capilar de OV-225.

A manana solubilizada em solução de uréia 50% em D<sub>2</sub>O foi submetida à análise por espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C. O espectro está mostrado na Figura 7. O espectro apresenta seis sinais principais que correspondem a uma β(1→4)-D-manana (Tabela 5). Os sinais menores se devem provavelmente a presença de unidades de galactose.

A atribuição dos sinais foi feita comparando-se com dados da literatura, obtidos para uma manana em NaOD 5% (GORIN; MAZUREK, 1975) e para a manana de *Schizolobium amazonicum* em uréia 50% em D<sub>2</sub>O (PETKOWICZ *et al.*, 2001).

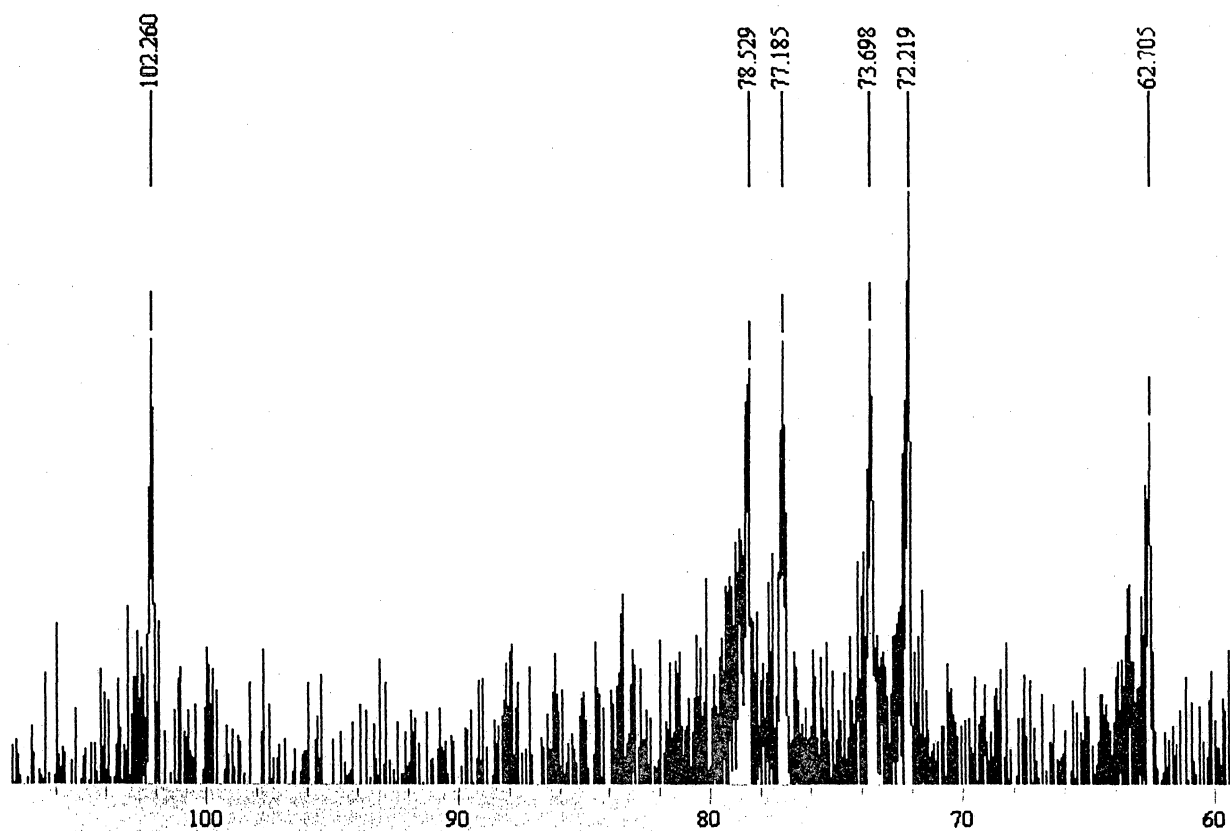


FIGURA 6 - Espectro de RMN -<sup>13</sup>C da manana de *Cassia fastuosa* em uréia 50% (em D<sub>2</sub>O).

TABELA 5 – Atribuição dos sinais do espectro de RMN -<sup>13</sup>C para a manana do endosperma das sementes de *Cassia fastuosa*.

	δ (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→4)-βMan-(1-	102,2	72,2	73,7	78,5	77,2	62,7

#### 4.2 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do endosperma de sementes de *Delonix regia* (flamboyant)

O conteúdo de endosperma das sementes de flamboyant foi inferior ao determinado para cassia, correspondendo a 35% do peso seco das sementes, neste caso dentro da faixa descrita por WHISTLER e SMART (1953) para as Caesalpinioideae (8 a 40%).

Frações com altos teores de manose e galactose foram encontradas nas extrações do endosperma de *Delonix regia*, indicando a presença de galactomananas

(Tabela 6). As galactomananas solúveis em água corresponderam a aproximadamente 45% do endosperma seco de flamboyant, um conteúdo semelhante ao obtido por PETKOWICZ *et al.* (1998) para a espécie de *Schizolobium amazonicum* (50%).

TABELA 6 - Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações seqüenciais do endosperma das sementes de *Delonix regia*.

Fração	Rend. <sup>b</sup>	Composição monossacarídica					
		mol (%) <sup>a</sup>					
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
D I	4,7	-	tr	tr	74	24,8	1,2
D II	4,4	-	tr	tr	75,6	22,5	1,9
D III	23,3	-	tr	1,6	78,9	19,5	tr
D IV	12,2	-	tr	1,1	79,8	19,1	tr
D V	8,8	-	1,1	2,3	79,7	16,9	tr
D VI	6,5	-	1,5	tr	82,6	15,9	tr
D VII	5,0	-	1,6	3,0	82,1	12,1	1,2

(a): monossacarídeos neutros determinados por GLC

(b): em relação ao endosperma seco (g%)

Observa-se que a cada extração a quantidade de galactose decresce, ou seja, a relação manose:galactose aumenta (Tabela 7). Nas galactomananas originadas nas primeiras extrações a relação manose:galactose é menor, indicando que as extrações mais brandas extraíram as galactomananas mais substituídas. A presença de galactomananas com diferentes graus de substituição indica que o endosperma das sementes de *Delonix regia* contém uma “família” de galactomananas, assim como o endosperma de *Cassia fastuosa*.

Apesar da importância da relação Man:Gal nas propriedades e aplicações das galactomananas, a ocorrência de uma “família” de galactomananas em uma mesma espécie tem passado despercebida em muitos casos. KAPOOR (1972) descreve a ocorrência de uma única galactomanana em sementes de *Delonix regia* com relação Man:Gal de 2:1.

A influência da galactose no comportamento óptico das galactomananas isoladas de flamboyant pode ser observada na Tabela 7. A medida que decresce o conteúdo de ramificações de  $\alpha$ -galactose na cadeia da  $\beta$ -manana, a rotação óptica específica altera-se desde valores positivos de  $36,9^\circ$  para a galactomanana mais substituída, decrescendo com a redução do conteúdo de galactose, assumindo valores negativos, até  $-9,0^\circ$  para a fração menos substituída. A diminuição nos valores de rotação óptica específica confirma a redução do número de unidades de  $\alpha$ -D-galactose à medida que a força de extração aumenta.

TABELA 7 – Relação manose:galactose e rotação óptica específica das galactomananas obtidas do endosperma das sementes de *Delonix regia*.

Fração	Man:Gal	$[\alpha]^{25}$
D I	3,0:1	+ 36,9°
D II	3,4:1	+ 32,0°
D III	4,0:1	+ 15,3°
D IV	4,2:1	+10,6°
D V	4,8:1	- 2,7°
D VI	5,2:1	- 3,3°
D VII	6,8:1	- 9,0°

Duas extrações adicionais foram realizadas, além daquelas descritas na Figura 5 (página 17), para o endosperma das sementes de flamboyant, afim de que todos os polissacarídeos solúveis fossem retirados e o resíduo fosse analisado.

A composição monossacarídica do resíduo de *Delonix regia* indicou como principal componente manose, indicando a presença de uma manana. Glucose não foi encontrada nesta fração, indicando a ausência de celulose no endosperma destas. O polissacarídeo isolado apresentou 95,1% de manose e 4,9% de galactose, sendo considerado uma manana pura.

A rotação óptica específica deste polissacarídeo apresentou um valor negativo de  $[\alpha]^{25}_D = -51,0^\circ$ , valor próximo aos já descritos na literatura, para a manana de *Borassus flabellier* ( $[\alpha]^{25}_D = -48^\circ$ ) e para a manana B de “ivory nut” ( $[\alpha]^{25}_D = -38,2^\circ$ ).

A metilação do polissacarídeo revelou a estrutura de uma manana ligada  $\beta(1\rightarrow4)$ . O derivado majoritário, 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man, indica unidades da cadeia principal de manose não substituídas. Os derivados 2,3-Me<sub>2</sub>-Man e 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man indica unidades de manose substituídas e terminais redutores, respectivamente.

TABELA 8 – Análise por metilação da manana de *Delonix regia* na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

Derivados metilados	mol% <sup>a</sup>	M.S. (m/z) <sup>a</sup>
2,3,4,6 - Me <sub>4</sub> - Man	2,6	87,101,117,129,145,161,171,179,189,205
2,3,4,6 - Me <sub>4</sub> - Gal	3,5	87,101,117,129,145,161,171,179,189,205
2,3,6 - Me <sub>3</sub> - Man	89,7	87,99,101,113,117,129,131,141,159,173,179,189,203,211
2,3 - Me <sub>2</sub> - Man	4,2	85,101,111,117,127,142,153,159,171,187,201,209,217

(a) GLC-MS em coluna capilar de OV-225.

A ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C confirmou a estrutura do polissacarídeo. Os deslocamentos obtidos para a manana de flamboyant são próximos dos valores determinados “in vivo” por JARVIS (1990) para a manana de *Phoenix dactylifera* e aqueles obtidos por PETKOWICZ *et al.* (2001) para a manana de *Schizolobium amazonicum*.

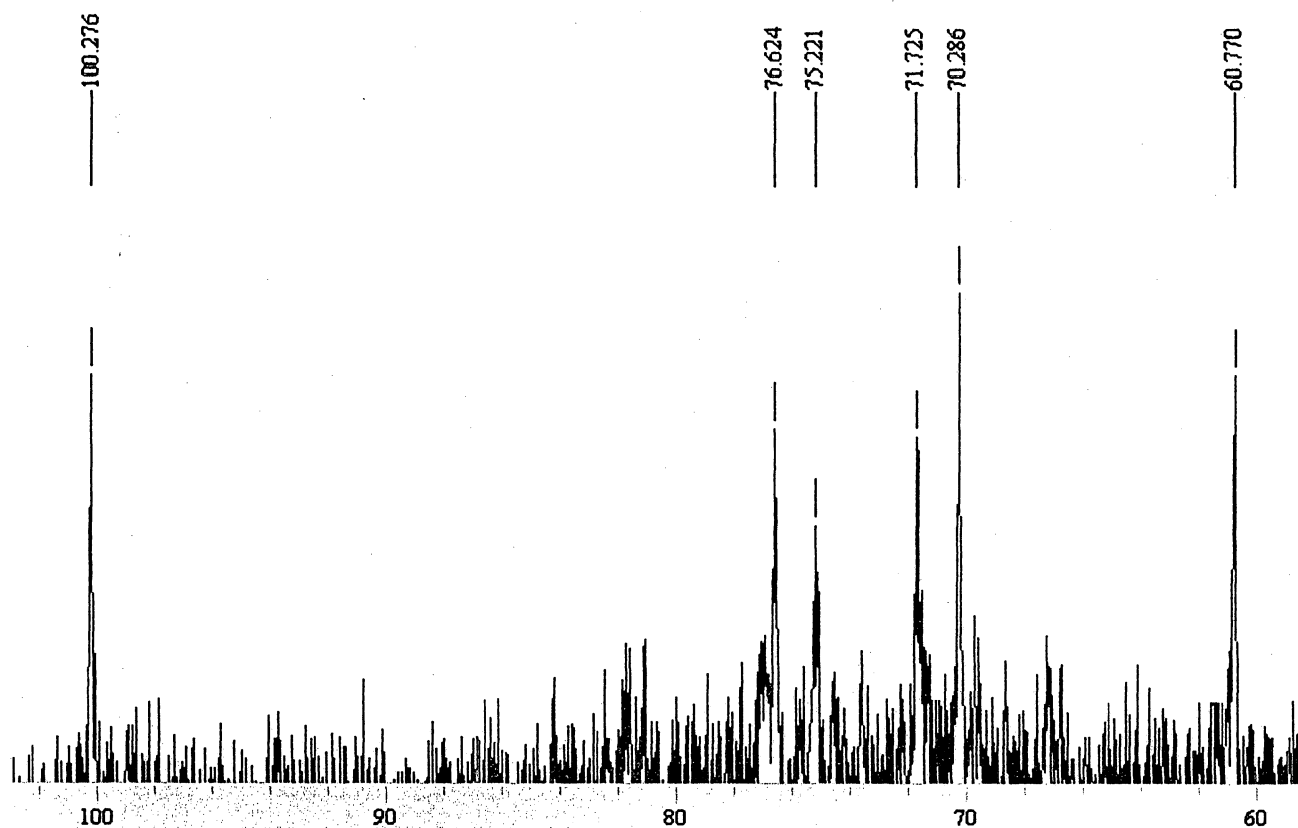


FIGURA 7 - Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da manana de *Delonix regia* em uréia 50% (em  $\text{D}_2\text{O}$ ).

TABELA 9 – Atribuição dos sinais do espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  para a manana do endosperma das sementes de *Delonix regia*.

	$\delta$ (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow 4$ )- $\beta$ Man-(1-	100,3	70,3	71,7	76,6	75,2	60,8

#### 4.3 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do endosperma de sementes de *Adenanthera pavonina* (carolina)

O endosperma corresponde a 15% da semente de carolina. O embrião é o principal constituinte das sementes de *Adenanthera pavonina*, perfazendo 45% do peso seco das sementes. FAROQUI e KAPOOR, citados por BUCKERIDGE *et al.* (1995) investigaram as sementes de 14 espécies de Mimosoideae e apenas quatro continham 13-30% de endosperma com rendimentos de 10 a 20% em galactomanana.

O endosperma seco e isolado foi submetido a extrações seqüenciais conforme descrito na Figura 5, página 17 e a composição monossacarídica das frações obtidas consta na Tabela 10. As extrações forneceram polissacarídeos compostos predominantemente de manose e galactose tratando-se de galactomananas.

As galactomananas solúveis em água perfazem cerca de 32% do endosperma seco. Este valor é semelhante ao descrito para *Cyamopsis tetragonolobus*, também pertencente à subfamília Mimosoideae, e utilizada como fonte de galactomananas comercial. Segundo DEA e MORRISON (1975), o conteúdo de galactomananas em relação ao endosperma para esta espécie seria de cerca de 34%.

TABELA 10 - Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações seqüenciais do endosperma das sementes de *Adenantha pavonina*.

Composição monossacarídica							
mol (%) <sup>a</sup>							
Fração	Rend. <sup>b</sup>	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
A I	15,6	tr	2,5	1,6	57,5	36,5	1,9
A II	6,8	-	1,4	tr	58,2	36,9	3,5
A III	5,1	-	tr	tr	60,4	36,0	2,5
A IV	4,9	-	2,9	tr	61,4	36,7	-
A V	35,1	-	tr	tr	58,2	38,9	2,9
A VI	0,9	-	1,7	tr	61,8	36,5	-
A VII	0,8	-	6,7	-	57,9	35,4	-

(a): monossacarídeos neutros determinados por GLC

(b): em relação ao endosperma seco (g%)

Diferentemente da cassia e do flamboyant, a relação manose:galactose manteve-se constante para todas as frações obtidas (aproximadamente 1,6:1), independente da força da extração (Tabela 11).

TABELA 11 – Relação manose: galactose das frações obtidas das extrações sequenciais do endosperma das sementes de *Adenantha pavonina*.

Fração	A I	A II	A III	A IV	A V	A VI	A VII
Man:Gal	1,6:1	1,6:1	1,6:1	1,6:1	1,6:1	1,7:1	1,6:1

Para a carolina, pertencente a subfamília Mimosoideae, apenas um tipo de galactomanana compõe o endosperma, contrastando com as espécies pertencentes a subfamília Caesalpinioideae estudadas neste trabalho. Os resultados obtidos sugerem que, essa característica da presença de “famílias” de galactomananas pode ser exclusiva da subfamília Caesalpinioideae.

A rotação óptica do polissacarídeo forneceu um valor de  $[\alpha]_{D}^{25} = +108,2$ . Este valor é alto quando comparado com galactomananas de outras espécies com relação manose:galactose próxima:  $[\alpha]_{D}^{25} = +40,2$  para *Cassia renigera* (Man:Gal=1,6:1) e  $[\alpha]_{D}^{25} = +48,8$  para *Lagonichium farctum* (Man:Gal=1,9:1)

O polissacarídeo obtido foi analisado por HPSEC-MALLS/RI para análise de homogeneidade. O perfil de eluição está mostrado na Figura 8.

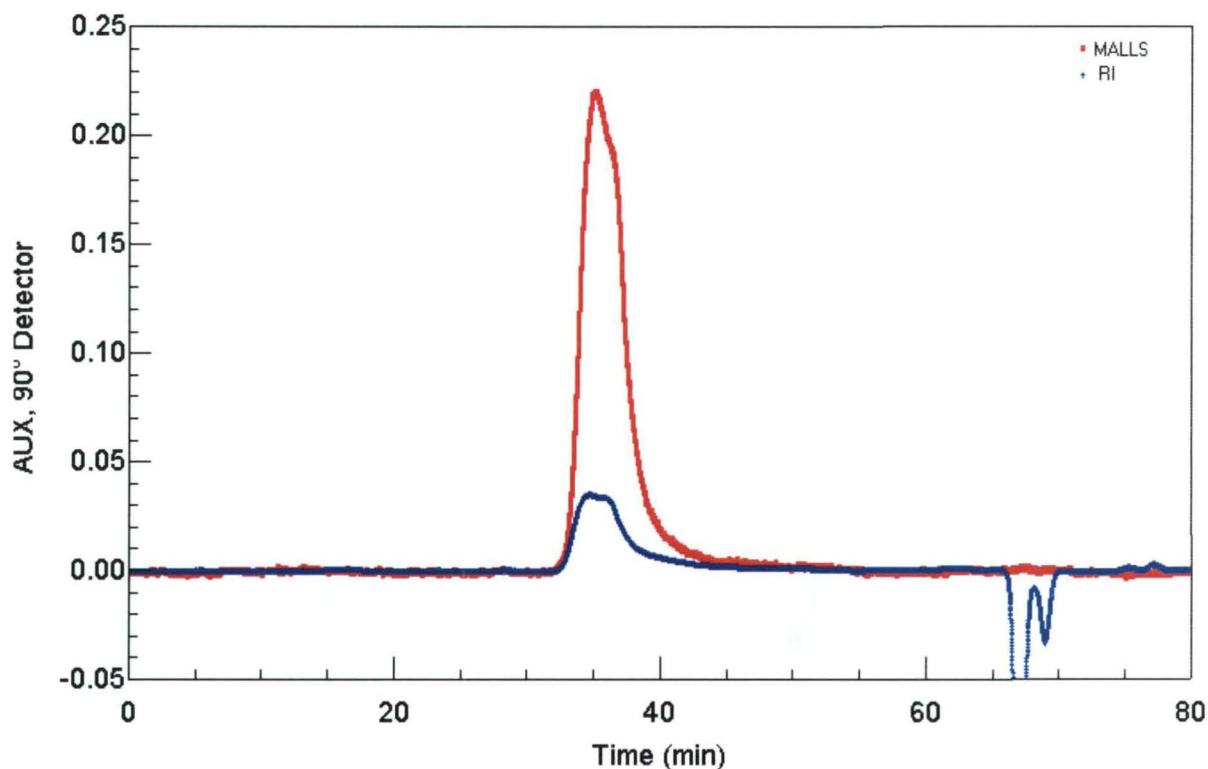


FIGURA 8 - Perfil de eluição obtido por HPSEC-MALLS/RI. (RI – detector diferencial de índice de refração; MALLS - detector de espalhamento de luz laser em multiângulos - ângulo 90°).

A presença de um único pico, detectado por ambos os detectores (MALLS e RI) indica que a amostra é homogênea. A massa molar calculada pelo software ASTRA a partir do perfil de homogeneidade e do valor do  $dn/dc$  foi de  $2.26 \times 10^6$  g/mol.

Os dados de metilação (Tabela 12) mostram uma estrutura convencional para a galactomanana de *Adenantha pavonina*. O derivado 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man indica uma cadeia principal de manose ligada (1→4). O composto 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal indica a presença de ramificações, comprovado pela presença do derivado 2,3-Me<sub>2</sub>-Man em quantidade equivalente. O derivado 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Man corresponde a terminal não redutor.

TABELA 12 – Análise por metilação da galactomanana de *Adenantha pavonina* na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

Derivados metilados	mol% <sup>a</sup>	M.S. (m/z) <sup>a</sup>
2,3,4,6 – Me <sub>4</sub> - Man	5	87,101,117,129,145,161,171,179,189,205
2,3,4,6 - Me <sub>4</sub> - Gal	25,8	87,101,117,129,145,161,171,179,189,205
2,3,6 - Me <sub>3</sub> - Man	41,5	87,99,101,113,117,129,131,141,159,173,179,189,203,211
2,3 - Me <sub>2</sub> - Man	27,7	85,101,111,117,127,142,153,159,171,187,201,209,217

(a) GLC-MS em coluna capilar de OV-225.

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C da galactomanana (Figura 9) confirmou a estrutura do polímero. Na região do carbono anomérico é possível distinguir três sinais, os quais correspondem a unidades de β-D-manopiranosose substituída em O-6 (δ 100,9), β-D-manopiranosose não substituída em O-6 (δ 100,7) e unidades de α-D-galactopiranosose (δ 99,5). A atribuição dos sinais consiste na Tabela 13. A atribuição dos sinais foi feita por comparação com o espectro de outras galactomananas descritas na literatura (GANter *et al.*, 1995; PETKOWICZ *et al.*, 1998).

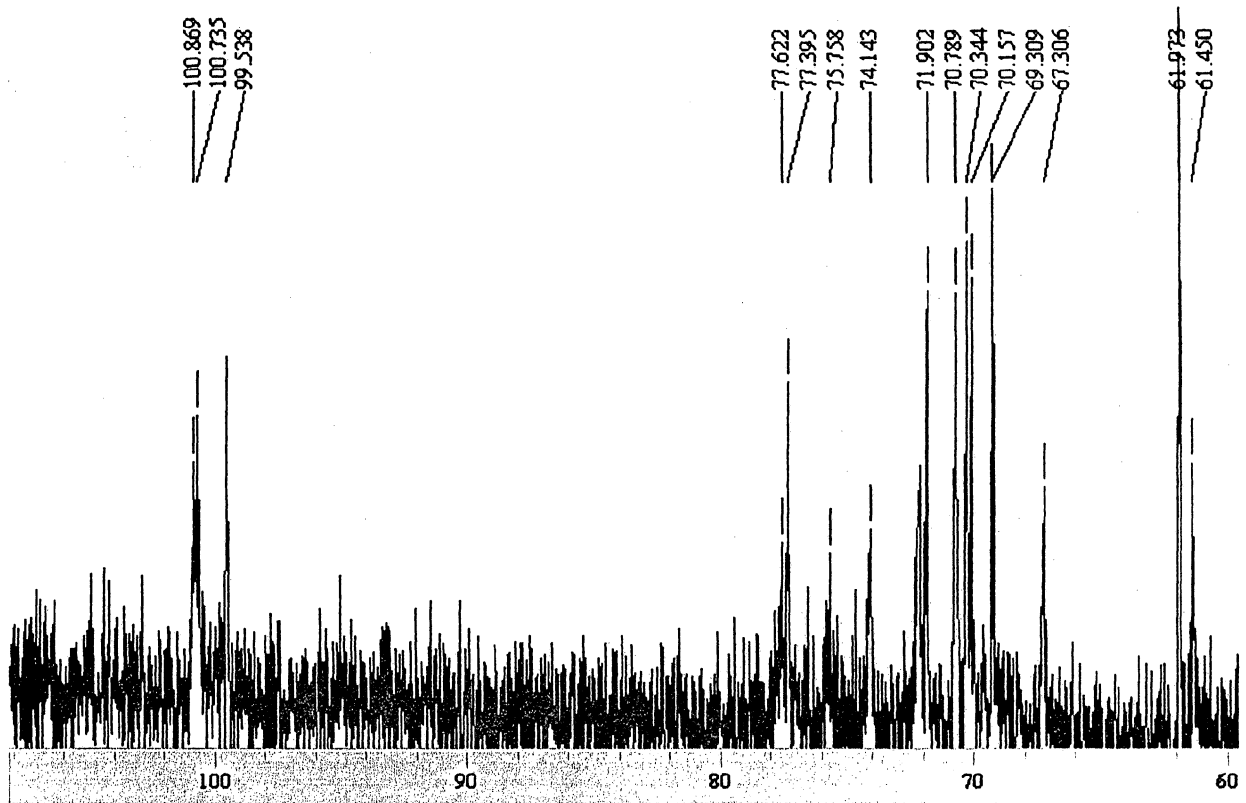


FIGURA 9 - Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da galactomanana de *Adenantha pavonina* em  $\text{D}_2\text{O}$ .

TABELA 13 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  para a galactomanana do endosperma das sementes de *Adenantha pavonina*.

	$\delta$ (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\alpha$ -D-galactopirranose	99,5	69,3	70,3	70,2	71,9	62,0
$\beta$ -D-manopirranose não substituída em O-6	100,9	70,8	71,9	77,4	75,8	61,5
$\beta$ -D-manopirranose substituída em O-6	100,7	70,4	71,9	77,6	74,1	67,3

Da mesma forma que para os endospermas de cassia e flamboyant foram feitas duas extrações adicionais com NaOH 4M, além daquelas descritas na Figura 5. O resíduo resultante das extrações seqüenciais do endosperma de *Adenantha pavonina* foi hidrolisado e analisado na forma de acetato de alditol (Tabela 14).

TABELA 14 – Composição monossacarídica do resíduo final das extrações de *Adenanthera pavonina*.

Monossacarídeo	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
mol (%) <sup>a</sup>	2,1	3,3	tr	26,1	8,9	59,6

(a): monossacarídeos neutros determinados por GLC

Pode-se observar que o monossacarídeo predominante foi a glucose, sugerindo a presença de celulose no resíduo final das extrações. Este resultado se distingue do encontrado nas espécies da subfamília Caesalpinoideae analisadas neste trabalho, onde encontramos uma manana como resíduo das extrações do endosperma.

Análises de metilação e ressonância magnética nuclear não foram possíveis de serem realizadas, pois a quantidade de resíduo não foi suficiente para tais análises.

#### 4.4 Isolamento e caracterização de polissacarídeos do endosperma de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena)

A galactomanana de leucena tem sido utilizada por diferentes autores para produção de derivados sulfatados visando aplicação em testes de atividade biológica (HUSSEIN; HELMY; SALEIN, 1998; ONO *et al.*, 2003) e na formação de complexos com cátions metálicos (LOMBARDI; MERCÊ, 2003).

O tegumento e o embrião correspondem a maior parte da semente de *Leucaena leucocephala*, correspondendo a 38% e 40% do peso seco da semente. O endosperma perfaz somente 18% da semente.

O endosperma seco e isolado das sementes de *Leucaena leucocephala* foi submetido a extrações seqüenciais conforme descrito na Figura 5, página 17. A presença de galactomananas é evidenciada pelos altos conteúdos de manose e galactose, indicados na Tabela 15. As galactomananas solúveis em água correspondem a aproximadamente 52% do endosperma seco.

TABELA 15 - Composição monossacarídica das frações obtidas das extrações seqüenciais do endosperma das sementes de *Leucaena leucocephala*.

Fração	Rend. <sup>b</sup>	Composição monossacarídica					
		mol (%) <sup>a</sup>					
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
L I	27,0	-	2,8	tr	59,1	36,1	2,0
L II	7,0	-	tr	1,2	60,0	36,1	2,7
L III	15,5	-	tr	-	61,4	38,6	tr
L IV	2,6	-	tr	tr	60,7	38,2	1,1
L V	6,0	-	1,4	tr	59,2	38,0	1,4
L VI	4,7	-	1,8	tr	58,1	39,1	1,0
L VII	1,5	-	8,2	1,2	54,7	33,1	2,8

(a): monossacarídeos neutros determinados por GLC

(b): em relação ao endosperma seco (g%)

A análise da Tabela 16 mostra que a relação manose:galactose manteve-se constante para todas as frações obtidas. A relação manose:galactose da galactomanana presente no endosperma de *Leucaena leucocephala* é de 1,6:1.

TABELA 16 – Relação manose: galactose das frações obtidas das extrações seqüenciais do endosperma das sementes de *Leucaena leucocephala*.

Fração	L I	L II	L III	L IV	L V	L VI	L VII
Man:Gal	1,6:1	1,6:1	1,6:1	1,6:1	1,6:1	1,5:1	1,6:1

A rotação óptica do polissacarídeo forneceu um valor de  $[\alpha]_D^{25} = +46,4$ , valor próximo ao determinado para a galactomanana da espécie *Cassia renigera* ( $[\alpha]_D^{25} = +40,2$ ), cuja relação manose:galactose é a mesma da leucena.

O polissacarídeo obtido foi analisado por HPSEC-MALLS/RI. O perfil de eluição obtido está mostrado na Figura 10, indicando que a amostra é homogênea.

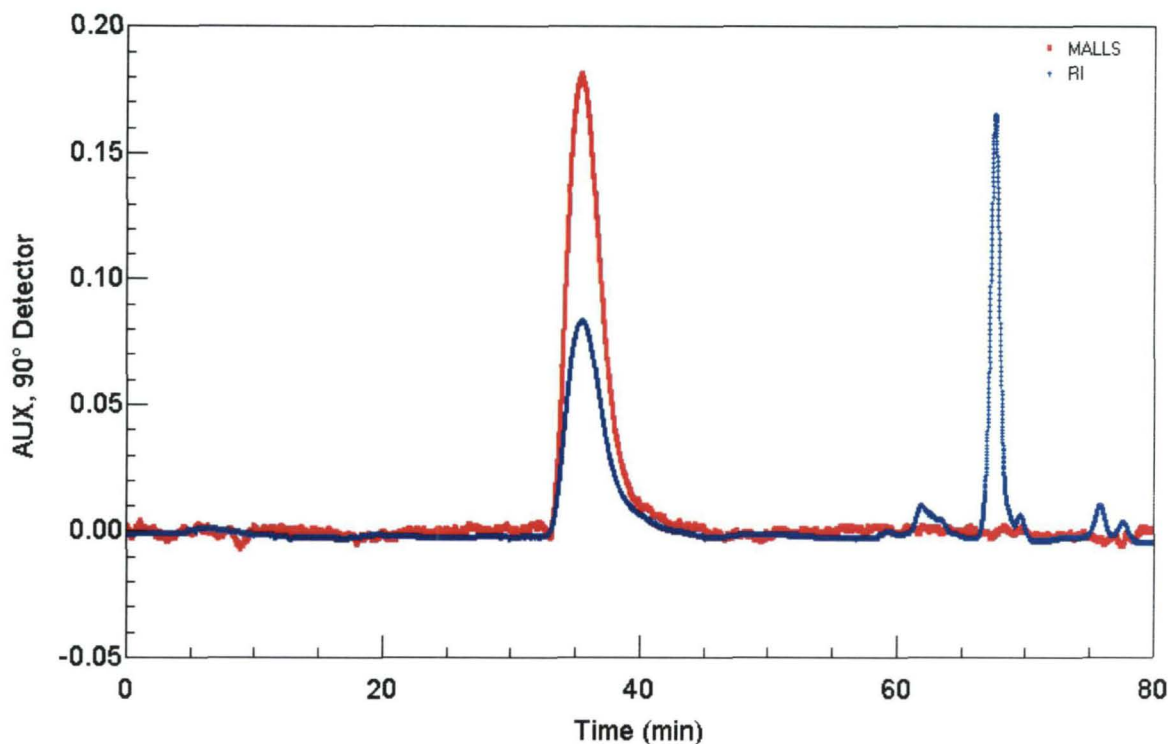


FIGURA 10 - Perfil de eluição obtido por HPSEC-MALLS/RI. (RI – detector diferencial de índice de refração; MALLS- detector de espalhamento de luz laser multiângulos – ângulo de 90°).

A massa molar calculada a partir do perfil de homogeneidade e do valor do  $dn/dc$  foi de  $1,35 \times 10^5$  g/mol.

A análise de metilação para o polissacarídeo indicou-se tratar de uma galactomanana. O polissacarídeo metilado apresentou 40,8% do derivado 2,3,6 - Me<sub>3</sub> - Man, correspondente a unidades de manose não substituídas; 30,4% de 2,3 - Me<sub>2</sub> - Man, o qual corresponde a unidades de manose substituídas; 27,8% de 2,3,4,6 - Me<sub>4</sub> - Gal (ramificações de galactose) e 1,0% de 2,3,4,6 - Me<sub>4</sub> - Man (terminais redutores).

TABELA 17 – Análise por metilação da galactomanana de *Adenantha pavonina* na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

Derivados metilados	mol% <sup>a</sup>	M.S. (m/z) <sup>a</sup>
2,3,4,6 - Me <sub>4</sub> - Man	1,0	87,101,117,129,145,161,171,179,189,205
2,3,4,6 - Me <sub>4</sub> - Gal	27,8	87,101,117,129,145,161,171,179,189,205
2,3,6 - Me <sub>3</sub> - Man	40,8	87,99,101,113,117,129,131,141,159,173,179,189,203,211
2,3 - Me <sub>2</sub> - Man	30,4	85,101,111,117,127,142,153,159,171,187,201,209,217

O espectro de RMN-<sup>13</sup>C da galactomanana confirma a estrutura do polímero (Figura 11, Tabela 18).

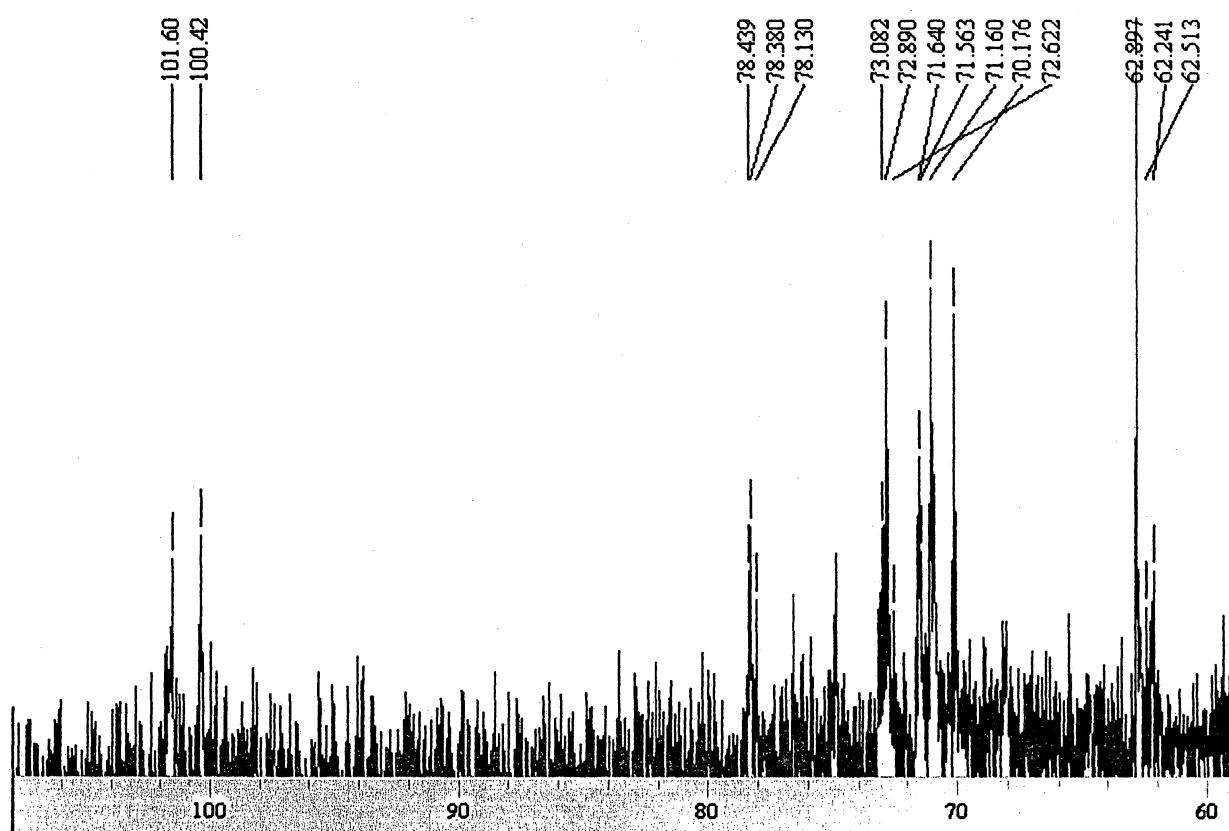


FIGURA 11 - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C da galactomanana de *Leucaena leucocephala* em D<sub>2</sub>O.

TABELA 18 - Atribuição dos sinais do espectro de RMN-<sup>13</sup>C para a galactomanana do endosperma das sementes de *Leucaena leucocephala*.

	δ (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α-D-galactopiranosose	100,4	70,2	71,6	71,2	72,9	62,5
β-D-manopiranosose não substituída em O-6	101,6	71,6	73,1	78,5	75,0	62,2
β-D-manopiranosose substituída em O-6	101,6	71,6	73,1	78,5	78,1	62,9

O resíduo final das extrações do endosperma de *Leucaena leucocephala*, após duas extrações adicionais com NaOH 4M, foi hidrolisado e analisado na forma de acetato de alditol e a composição monossacarídica obtida está indicada na Tabela 19.

TABELA 19 – Composição monossacarídica do resíduo das extrações de *Leucaena leucocephala*.

mol% <sup>a</sup>						
Fração	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Resíduo <sup>b</sup>	tr	7,7	4,5	22,7	10,1	55,0

(a): monossacarídeos neutros determinados por GLC

(b): após mais duas extrações com NaOH 4M

O monossacarídeo predominante foi glucose, sugerindo a presença de celulose. Análises de metilação e ressonância magnética nuclear não foram realizadas, pois a quantidade de resíduo não foi suficiente para tais análises.

Podemos observar que as espécies *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*, ambas pertencentes à subfamília Caesalpinioideae, forneceram a partir de diferentes condições de extrações, uma “família” de galactomananas. Este fato também foi observado por MANZI *et al.* (1984) para *Gleditsia triacanthos*, a qual também pertence à subfamília Caesalpinioideae.

As espécies *Adenanthera pavonina* e *Leucaena leucocephala*, por outro lado, forneceram galactomananas com relação Man:Gal constante. Essas espécies pertencem à subfamília Mimosoideae.

Além disso, do resíduo final das extrações de *Cassia fastuosa* e *Delonix regia* obtiveram-se mananas puras, enquanto que a análise do resíduo final das espécies estudadas pertencentes a subfamília Mimosoideae indica a presença de celulose em ambos.

As relações Man:Gal obtidas para as diferentes espécies estudadas mostram que as galactomananas de espécies de Caesalpinioideae são as menos substituídas, confirmando a sugestão de que no curso da evolução houve um aumento na proporção de galactose (BUCKERIDGE *et al.*, 1995). Adicionalmente, considerando o padrão evolucionário aceito para Leguminosae, no qual as Mimosoideae seriam derivadas das Caesalpinioideae, pode-se sugerir que durante a evolução houve uma redução no grau de polidispersão das galactomananas. A síntese de uma “família” de galactomananas foi substituída pela síntese de um único tipo de polissacarídeo.

Os modelos de parede celular existentes e os dados obtidos por SHAEFER (2000) para as sementes de *Schizolobium parahybae*, que mostram que a manana não é consumida na germinação sugerem que este polímero tem função estrutural, provavelmente substituindo a celulose. A ausência da manana e a presença de quantidades elevadas de glucose nas espécies da subfamília Mimosoideae analisadas sugerem que durante a evolução houve uma alteração no padrão de parede celular presente nas células do endosperma de sementes da família Leguminosae, com a substituição da manana por celulose.

Estudos com maior número de espécies e com exemplares da subfamília Faboideae são necessários para comprovar a hipótese de que a presença de mananas e de uma “família” de galactomananas seria característico da subfamília Caesalpinioideae.

## 5. CONCLUSÃO

- A partir do endosperma das sementes de *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*, pertencentes à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, foram obtidas, por extrações aquosas e alcalinas seqüenciais, galactomananas com diferentes graus de substituição. Mananas puras foram isoladas no resíduo das extrações das duas espécies e caracterizadas por metilação e espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C.
- A partir do endosperma das sementes de *Adenanthera pavonina* e *Leucaena leucocephala*, pertencentes à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, foram isoladas, por extrações aquosas e alcalinas, galactomananas com relação Man:Gal constante. O resíduo das extrações das duas espécies apresentou como componente majoritário glucose, sugerindo a presença de celulose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v.5, p.269-276, 1965.

ASPINALL, G.O. Structural Chemistry of the hemicelluloses. **Adv. Carbohydr. Chem.**, New York, v.14, p. 429-468, 1959.

AVIGAD, G.; DEY, P.M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry.**, London: Academic Press, 1997. p. 103-111.

BACIC, A.; HARRIS, P.J.; STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: PREISS, J. **The Biochemistry of Plants.**, New York: Academic Press, v. 14, 1988. p. 297-371.

BAILEY, L.H. **Manual of Cultivated Plants.** 2 ed. New York, 1954.

BAVEJA, S.K.; RAO, K.V.R.; ARORA, J.; MATHUR, N.K.; VINAYAK, V.K. Chemical investigations of some galactomannans gums as matrix tablets for substandard drug delivery. **Indian J. Chem.**, New Dheli, v. 30B, p. 133-137, 1991.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds germination, structure and composition. In: **Seeds: Physiology of Development and Germination.** New York: Plenum Press, 1986. p.1-27.

BIERMANN, C.J. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMANN, C.J., MCGINNIS, G.D. **Analysis of Carbohydrates by GLC and MS.** Florida: CRC Press, 1989. p. 27-41.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3 ed, edição comemorativa do II Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais. Mossoró 18 a 24 de julho de 1976.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Galactomannans from Brazilian legume seeds. **Revta. Brasil. Bot.**, São Paulo, v. 13, p. 109-112, 1990.

BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R.; ROCHA, D.C.; DIETRICH, S.M.C. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. **Phytochemistry (Oxf)**., v. 38, n. 4, p. 871-875, 1995.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, v.38, p. 141-156, 2000.

CIUCANU, I.; KEREK, V. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 131, p. 209-217, 1984.

CRONQUIST, A. **An Intergated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p.XII-XVIII.

DEA, I.C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 31, p. 241-312, 1975.

DEA, I.C.M. The role of structural modification in controlling polysaccharide functionality. In: YAL-PANI, M. **Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/property Relations and Applications**. Amsterdam: Elsevier Science, 1987, p.207-216.

DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannan. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 35, p. 341-376, 1978.

ELLIS, P.R.; DAWOUD, F.M.; MORRIS, E.R. Blood glucose, plasma insulin and sensory responses to guar containing wheat breads: effects of molecular weight and particle size of guar gum. **British Journal of Nutrition.**, London, v. 66, p. 363-379, 1991.

ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien.** Berlin: Gerbruder Borntraeger, 1964. 193p.

GANTER, J.L.M.S.; MILAS, M.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydr. Polym.**, Kidlington, v.17, p.171-175, 1992.P

GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromol.**, Kidlington, v.17, n.1, p. 13-19, 1995.

GORIN, P.A.J.; BARRETO-BERGTER, E. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: ASPINALL, G.O. **The Polysaccharides.**, New York: Academic Press, 1983. v. 2, p. 366-409.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in  $^{13}\text{C}$  magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v.53, p. 1212-1223, 1975.

GROOT, S.P.C.; KIELISZEWSKAROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSEEN, C.M. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls and gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle profusion. **Planta.**, Heidelberg, v. 174, p. 952-958, 1988.

GUPTA, A.K.; BOSE, S. Structure of the D-galacto-D-mannan isolated from the seeds of *Melilotus indica*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.153, p. 69-77, 1986.

HALMER, P.; BEWLEY, J.D. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. **Planta.**, Heidelberg, v. 144, p. 333-340, 1979.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEUER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry (Oxf.)**, v. 34, n. 1, p. 3-16, 1993.

HIRST, E.L.; PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 287-298, 1960.

HUSSEIN, M. M-D.; HELMY, W.A.; SALEM, H.M. Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivatives. **Phytochemistry(Oxf.)**, v. 48, n. 3, p. 479-484, 1998.

ISHURD, O.; KERMAZI, A.; ZGHEEL, F.; FLEFLA, M.; ELMABRUK, M.; YALIN, W.; KENNEDY, J. F.; YUANJIANG, P. Structural aspects of water-soluble galactomannans isolated from the seeds of *Retama raetam*. **Carbohydr. Polym.**, Kidlington, v. 59, p. 531-535, 2005.

JACOBSEN, J.V.; PRESSMAN, E.A. Structural study of germination in celery (*Apium graveolens*) seed with emphasis on endosperm breakdown. **Planta.**, Heidelberg, v. 144, p. 241-248, 1979.

JARVIS, M.C. The <sup>13</sup>C-n.m.r. spectrum of (1→4)-β-D-mannans in intact endosperm tissue of the date (*Phoenix dactylifera*). **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.197, p. 276-280, 1990.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 11 ed. São Paulo, Companhia Editorial Nacional, 777 p., 1993.

KAPOOR, V.P. A galactomannan from the seeds of *Delonix regia*. **Phytochemistry (Oxf)**, v. 11, n. 3, p. 1129-1132, 1972.

KOOIMAN, P. Structures of the galactomannan from seeds of *Annora muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor* and *Sophora japonica*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 20, p.329-337, 1971.

LESCHZINER, C.; CEREZO, A.S. Correlation of chemical composition and optical rotation of water-soluble galactomannans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 11, p. 113-118, 1969.

LOMBARDI, S.C.; MERCÊ, A.L.R. Properties of complexes of galactomannan of *Leucaena leucocephala* and  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Pb^{2+}$ . **Biores. Techn.**, v. 89, p. 63-73, 2003.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1992, 163p.

MANZI, A.E.; MAZINNI, M.N.; CEREZO, A.S. The galactomannan system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triachantos*. **Carbohydr. Res.**, Amterdan, v.125, p.127-143, 194.

McCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K. Galactomannan structure and  $\beta$ -mannosidase activity in germinating legume seeds. **Phytochemistry (Oxf)**, Oxford, v. 70, p. 205-230, 1975.

McCLEARY, B.V.; AMADO, R.; WAIBEL, R. NEUKOW, H. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 139, p. 237-260, 1985.

MEIER, H.; On the structure of cell walls and cell wall mannans from ivory nuts and from dates. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 28, p. 229-240, 1958.

MILLANE, R.P.; HENDRIXSON, T.L. Crystal structure of mannan and glucommannans. **Carbohydr. Polym.**, Kidlington, v. 25, p. 245-251, 1994.

NAVARINI, L.; GILLI, R.; GOMBAC, V.; ABATANGELO, A.; BOSCO, M. TOFFANIN, R. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica*: isolation and characterization. **Carbohydr. Polym.**, Kidlington, v. 40, p. 71-81, 1999.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K.M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology.**, v. 4, p. 1745-1755, 2004.

NOBLE, O.; PEREZ, S.; ROCHAS, C.; TARAVEL, F.R. Optical rotation of branched polysaccharides. **Polym. Bulletin.**, v.16, p.175-180, 1986.

NIEDUSZYNSKI, I.; MARCHESSAULT, R.H. The crystalline structure of poly- $\beta$ ,D(1 $\rightarrow$ 4)mannose: mannan I. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 50, p. 2130-2138, 1972.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I.M.; COIMBRA, T.L.M.; GORIN, P.A.J.; SIERAKOWSKI, M.R. In vitro and vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research.**, v. 60, n.3, p. 201-208, 2003.

OOSTERVELD, A.; COENEN, G.J.; VERMEULEN, N.C.B.; VORAGEN, A.G.J.; SCHOLS, H.A. Structural features of acetylated galactomannans from green *Coffea arabica* beans. **Carbohydr. Polym.**, England, v. 58, p. 427-434, 2004.

PETKOWICZ, C.L.O.; REICHER, F.; MAZEAU, K. Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. **Carbohydr. Polymers.**, England, v. 37, p. 25-39, 1998.

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

RAMESH H.P.; YAMAKI K.; TSUHIDA T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydr. Polymers.**, England, v. 50, p.79-83, 2002.

REES, D.A. Shapely polysaccharides. **Biochem. J.**, London., v. 126, p. 257-273, 1972.

REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D.; CORRÊA, J.B.C. Properties of the seed gum of *Strypnodendron barbatiman* (barbatimão). **Appl. Biochem.**, Totowa, v.34/35, p.349-357, 1991.

REID, J.S.G.; BEWLEY, J.D. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*), an endospermic leguminous seed. **Planta.**, Heidelberg, v. 147(2), p. 145-150, 1979.

REID, J.S.G. Cell wall storage carbohydrates in seeds: Biochemistry of the seed "gums" and "hemicelluloses". **Adv. Bot. Res.**, New York, v. 11, p. 125-155, 1985.

REID, J.S.G. & EDWARDS, M.E. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: STEPHEN, A.M. **Food Polysaccharides and Their Applications.**, New York: Marcel Dekker, Inc., 1995, p. 155-186.

ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S.B.; MORRIS, E.R. Viscosity – molecular weight relation ships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v.107, p. 17-32, 1982.

SAMPEDRO, M.C.; ARTOLA, R.L.; MURATURE, M.; MURATURE, D.; DITAMO, Y.; ROTH, G.A.; KIVATINITZ, S. Mannan from *Aleo saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. **International Immunopharmacology**, v. 4, p.411-418, 2004.

SCHAEFER, S. **Estudos dos polissacarídeos das sementes do gênero *Schizolobium***. Curitiba, 2000. Monografia apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

SCHERBUKHIN, V.D.; ANULOV, O.V. Legume Seed Galactomannans (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Russia, v. 35(3), p. 229-244, 1999.

SLONEKER, J.H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 6, p. 20-24, 1972.

STEPHEN, A.M. Other plant polysaccharide. In: ASPINALL, G.O. **The polysaccharide.**, New York: Academic Press, v. 2, p.98-180, 1983.

TIMELL, T.E. Vegetable ivory as a source of a mannan polysaccharide. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 35, p. 333-338, 1957.

UGHINI, F.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S; BRESOLIN, T.M.B. Evaluation of xantan and highly substituted galactomannan from *M. scarabella* as a substained release matrix. **International J. Pharmaceutics**, v. 271, p. 197-205, 2004.

WATKINS, J.T.; CANTIFLLE, D.J.; HUBER, D.J.; NELL, T.A. Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. **J. Am. Hort. Sci.**, v. 110, p. 61-65, 1985.

WHISTLER, R.L.; SMART, C.L. **Polysaccharide chemistry**. New York: Academic Press, 1953, p. 292-301.

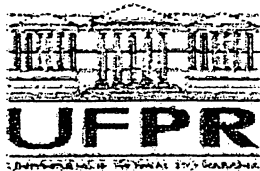
WHISTLER, R.L. Factors influencing gum costs and applications. In: **Industrial Gums.**, New York: Academic Press, 1973. p.2-18.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 2, p. 65-68, 1963a.

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

WOLFRON, M.L.; LAVER, M.L.; PATIN, D.L. Carbohydrates of the coffee bean. II isolation and characterization of mannan. **J. Org. Chem.**, v. 26, p. 4531-4533, 1961.

YUI, T.; OGAWA, K.; SARKO, A. Molecular and crystal structure of konjac glucomannan in the mannan II polymorphic form. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 229, p. 41-55, 1992.

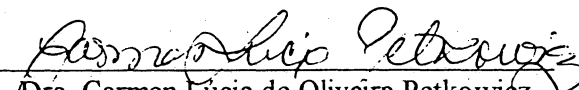


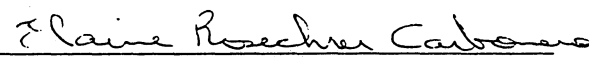
Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Biológicas  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas

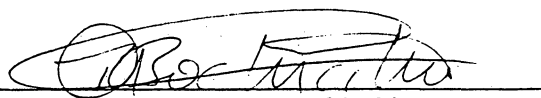
**PARECER DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO  
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DA DISCIPLINA  
DE ESTÁGIO CURRICULAR**

Aos 20 dias do mês de janeiro de 2006, a Comissão de Avaliação da Monografia de Estágio Curricular do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, composta por Profa. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz, Profa. Elaine Rosechrer Carbonero e Prof. Renato Bochicchio, reuniu-se para proceder a avaliação da Monografia "Mananas e galactomananas de sementes de espécies da família Leguminosae", de autoria do(a) acadêmico João Francisco Bento.

A Comissão julgou o trabalho e atribui a nota 9,5.

  
Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz  
Profa. Orientadora

  
Dra. Elaine Rosechrer Carbonero  
Membro da Comissão

  
Dr. Renato Bochicchio  
Membro da Comissão

Curitiba, 20 de janeiro de 2006.