JOANA LÉA MEIRA SILVEIRA GANTER

GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Mimosa scabrella* (BRACATINGA)

Tese apresentada à Coordenação de Pós-Graduação do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1988

GALACTOMANANA DE SEMENTES DE

Mimosa scabrella (bracatinga)

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pela Comissão formada pelos Professores:

Orientadora: _____
Profª Fany Reicher

_____
Prof. José Domingos Fontana

_____
Prof. Philip Albert James Gorin

Curitiba, 16 de Dezembro de 1988.

ORIENTADORES:

Profª Dra. Fany Reicher

Prof. Dr. João Batista Chaves Corrêa

SIDNEY

que mais de perto vivenciou

o meu trabalho

muito amor ...

THIAGO

tentando justificar minhas ausências

o meu eterno carinho e afeição ...

Aos meus estimados pais

JOSÉ e JOSEFA

a quem devo muito.

Ao JÚLIO, irmão muito querido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a DEUS que me encaminhou para esta profissão, a qual, não obstante às dificuldades, reforçou minha disposição em atingir os objetivos nos quais sempre acreditei.

À professora Dra. Fany Reicher, orientadora, pela tenacidade que me levou a enfrentar, retroceder, calcular, procurar apoio, contornar, ou refazer e finalmente ultrapassar, o meu reconhecimento e admiração.

Ao professor Dr. João Batista Chaves Corrêa, orientador , pela manifestação de desprendimento, característica daqueles cuja crença está baseada na universalidade do saber.

Ao professor Dr. Philip Albert James Gorin pelas valiosas sugestões e colaboração recebida.

Ao professor Dr. José Domingos Fontana, chefe do Departamento de Bioquímica, pelo apoio e análise de ^{13}C-n.m.r. realizada no National Research Council, Canadá.

À professora Dra. Maria Rita Sierakowski pela valiosa cooperação emprestada.

Ao professor Dr. Marcello Iacomini, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pela colaboração.

Ao professor Adirce Moreira Miceno, à Bióloga Selma Faria Zawadzki, ao Bioquímico Hidevaldo B.Machado,cujo incentivo e compreensão se fizeram presente durante todo o Curso de Mestrado.

À Engenheira Química Sônia Faria Zawadzki pelo estímulo e amizade.

À Geógrafa Maria Estela Meira pelo esmero e boa vontade na execução do trabalho datilográfico.

À srta. Thaís L. Pie pela dedicação na elaboração dos desenhos e gráficos.

À doutoranda Márcia Helena Mendonça pela atenção e análise com a galactose oxidase.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, à Refinações de Milho Brasil Ltda, à Companhia Paranaense de Energia Elétrica, ao Instituto de Terras, Cartografia e Florestas, à Unidade Regional de Pesquisa Florestal Centro Sul, pela boa vontade com que nos franquearam o campo de trabalho quando da realização de experimentos e informações prestadas.

Agradeço profunda e sinceramente a todos os professores , pós graduandos e funcionários, que tornaram possível a realização desta tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), à Nutrimental - Indústria e Comércio de Alimentos S.A. e ao Conselho de Ciência e Tecnologia do Paraná (CONCITEC), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas xi

Lista de Figuras xii

Resumo xv

Summary xvi

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 Galactomananas de sementes 4

1.2 Análise estrutural das galactomananas 8

1.3 Conformação das galactomananas em solução.. 26

1.4 Interações mistas e formação de geis 32

1.5 Aplicação industrial de galactomananas 38

1.6 Mimosa scabrella 41

2. OBJETIVOS 50

3. MATERIAIS E MÉTODOS 51

3.1 Métodos gerais 51

3.1.1 Hidrólises ácidas totais 54

3.1.2 Redução e acetilação dos produtos das hidrolises ácidas 55

3.2 Obtenção das sementes 55

3.3 Obtenção dos polissacarídeos 56

3.3.1 Extração com benzeno etanol 56

3.3.2 Extração aquosa 56

3.3.3 Extração alcalina 57

3.4 Desproteinização da Fração I 58

3.5 Complexação com cobre 58

3.6 Análise das frações polissacarídicas 59

3.7 Cromatografia de gel permeação em coluna .. 59

3.7.1 Filtração em Sephadex G-100 da Fração I desproteinizada 59

3.7.2 Filtração em Bio-Gel A-1,5m 59

3.7.3 Filtração em Sepharose CL-4B 60

3.8 Hidrólise ácida parcial do polissacarídeo . 60

3.9 Hidrólises enzimáticas parciais 61

3.10 Análises de metilação 62

3.11 Distribuição das unidades D-galactopiranosil nas cadeias laterais do polissacarídeo 63

3.12 Oxidação com meta periodato de sódio 64

3.12.1 Determinação do consumo de periodato ... 64

3.12.2 Degradação de SMITH do polissacarídeo .. 65

3.12.3 Degradação de SMITH controlada 66

3.13 Acetólise do polissacarídeo 66

3.14 Tratamento do polissacarídeo com galactose oxidase 67

3.15 Viscosidade 68

3.15.1 Viscosidade relativa 69

3.15.2 Viscosidade reduzida 69

3.15.3 Viscosidade específica 70

3.15.4 Viscosidade intrínsica 70

3.15.5 Determinação do peso molecular 71

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 72

4.1 Obtenção dos polissacarídeos 73

4.2 Purificação da Fração I 77

4.3 Estudo em gel filtração da galactomanana . 78

4.4 Análise estrutural da galactomanana 83

4.5 Análise de viscosidade 100

5. CONCLUSÕES 106

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109

LISTA DE TABELAS

I Atribuições dos sinais do espectro de ^{13}C-n.m.r de galactomananas de semente de leguminosas ... 20

II Relação fruto/semente, peso de 1.000 sementes e número de sementes/Kg de bracatinga 45

III Polissacarídeos de sementes de Mimosa scabrella, obtidos por extrações aquosas e alcalinas 75

IV Análise por metilação da galactomanana de Mimosa scabrella na forma de acetatos de alditois parcialmente metilados 85

V Atribuição dos sinais do espectros de ^{13}C-n.m.r. de galactomanana de sementes de Mimosa scabrella 96

LISTAS DE FIGURAS

1 Estrutura genérica de galactomananas de sementes de leguminosas 9

2 Produtos obtidos a partir de uma galactomanana genérica após a sequência de reações de BAKER e WHISTLER 17

3 Região espectral de ^{13}C-n.m.r. em 25 MHz das unidades D-manopiranosídicas. A, galactomanana de Ceratonia siliqua; B, galactomanana de Cyamopsis tetragonolobus e C, galactomanana de Trifolium pratense 22

4 Região espectral de ^{13}C-n.m.r. em 75 MHz (A) e 25,2 MHz (B) das unidades D - manopiranosídicas de Gleditsia triacanthos 25

5 Estrutura proposta para um gel de galactomanana. 36

6 Estruturas propostas para interação entre galactomananas e outros polissacarídeos 37

7 Coordenadas geográficas - Área de ocorrência natural de bracatinga 42

8 Esquema I - Processo de extração dos polissacarídeos de sementes de Mimosa scabrella 73

9 Filtração em Sephadex G-100 da galactomanana de Mimosa scabrella 79

10 Filtração em Bio-Gel A-1,5m da galactomanana de Mimosa scabrella 81

11 Filtração em Sepharose CL-4B da galactomanana de Mimosa scabrella 82

12 Cromatograma em g.l.c. em coluna capilar SE-54 do derivado p-toluil sulfonila de galactomanana de Mimosa scabrella 87

13 Espectros de massa de 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manopiranose, 2,3,6-tri-O-metil-D-manopiranose e 2,3-di-O-metil-D-manopiranose 88

14 Estruturas parciais propostas para a galactomanana de Mimosa scabrella a partir dos derivados 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manose (14-A), 2,3,6-tri-O-metil-D-manose (14-B) e 2,3-di-O-metil-D-manose (14-C) segundo Método de BAKER e WHISTLER ... 89

15 Determinação do consumo de meta periodato de sódio (0,1 M) da galactomanana de Mimosa scabrella 92

16 Espectro de ^{13}C-n.m.r. (125,76 MHz) da galactomanana de Mimosa scabrella, em óxido de deutério (D_2O) a 47° 95

17 Espectro acoplado de ^{13}C-n.m.r. (125,76 MHz) da galactomanana de Mimosa scabrella, em óxido de deutério (D_2O) a 47° 98

18 Determinação da viscosidade intrínsica da galactomanana de Mimosa scabrella (Fração I), a 25°. 101

19 Efeito do pH sobre a viscosidade reduzida da galactomanana de Mimosa scabrella (Fração I), a 25° 102

20 Efeito da variação da temperatura sobre a viscosidade relativa da galactomanana de Mimosa scabrella (Fração I) 104

RESUMO

A Mimosa scabrella (bracatinga) é uma leguminosa abundante no Sul do Brasil e de crescimento rápido. A extração aquosa de suas sementes forneceu uma galactomanana homogênea, com um peso molecular entre 1,5-2,0.10^6 (gel filtração) e 3,8.10^5 (viscosimetria). O polissacarídeo consiste de uma cadeia principal de unidades de β-D-manopiranoses, 13% das quais não são substituidas, e outras substituidas em O-6 com α-D-galactopiranoses (85%), ou com O-6-α-D-galactopiranosil-α-D-galactopiranose (2%). Esta estrutura, com alta relação de manose-galactose (53:47) e com a maioria das unidades da cadeia principal substituidas por galactose é incomum em sementes de leguminosas e não foi encontrada em nenhuma espécie da sub-família Mimosoideae. Cada árvore de bracatinga fornece 1 kg de sementes anualmente, 30% das quais consiste de galactomananas, que devido as suas características físico-químicas possivelmente serão aplicadas na indústria.

SUMMARY

Mimosa scabrella (bracatinga) grows abundantly and rapidly in Southern Brazil. Aqueous extraction of its seeds provides a homogeneous galactomannan, mol. wt. 1.5-2.0 x 10^6 (gel filtration) and 3.8 x 10^5 (viscosimetry). It consists of a main chain of β-D-mannopyranosyl units, 13% of which are unsubstituted with others substituted at O-6 with α-D-galactopyranosyl (85%) and 6-O-α-D-galactopyranosyl-α-D-galactopyranosyl units (2%). This structure, with a high galactose to mannose ratio (47:53) and with most of the main-chain units substituted with side chains, is unusual in legume seeds and has not been found previously in those of the sub-family Mimosoideae. Each bracatinga's tree provides 1 kg of seeds annually, 30% of which consist of galactomannan, and a possibility exists that the latter has unusual physical chemistry characteristics that might be applied industrially.

1. INTRODUÇÃO

Entre as milhares de espécies vegetais existentes na natureza, somente um número restrito é utilizado pelo homem. A escolha das espécies desenvolvidas e cultivadas é determinada por motivos sociais e culturais, bem como por interesses industriais. São utilizadas todas as partes dos vegetais, para os mais diversos fins.

As sementes acumulam substâncias de reserva, dentre as quais destacam-se pela abundância e multiplicidade de usos, os carboidratos. Estes podem ocorrer sob a forma de mono ou oligossacarídeos solúveis em solução aquosas,como sacarose e rafinose ou polissacarídeos, onde sobressaem-se o amido e as galactomananas[50].

As galactomananas estão presentes principalmente no endosperma das sementes de plantas da família das leguminosas[40]. De acordo com os dados mais recentes a família Leguminosae compreende em torno de 650 gêneros e 18.000 espécies[144]. Possuem variações morfológicas, que compreendem desde árvores de grande porte até pequenas plantas, bem como diferenças na obtenção de nutrientes essenciais para crescimento, forma de reprodução e defesa, o que as diferenciam das outras famílias[38]. A família Leguminosae

pertence a ordem das Rosales ou Rosiflorae [88,161], e ocorre em todos os habitats terrestres com exceção das regiões árticas e antárticas e algumas ilhas como Nova Zelândia [88, 47]. Subdivide-se em três sub-famílias, sendo elas Mimosoideae, Caesalpinioideae e Faboideae [145].

As sub-famílias Mimosoideae e Caesalpinioideae são megatérmicas e como consequência predominam nas selvas e savanas equatoriais e sub-equatoriais.

A Faboideae é mega, meso e microtérmica e constitue a maior representação da família nas zonas temperadas e temperadas frias [146].

A sub-família das Mimosoideae apresenta-se como árvores e arbustos, raramente ervas. Possue flores actinomorfas e o fruto em forma de legume (vagem) seguindo as suturas dorsal e ventral, com várias sementes em duas fileiras. Existem cerca de 54 gêneros e 2.000 espécies, todas em zonas tropicais e sub-tropicais[88].

A sub-família Caesalpinioideae apresenta-se como plantas lenhosas, sub-tropicais, com folhas compostas. As flores são zigomorfas com prefloração de corola imbricada ascendente. Os frutos apresentam-se em forma de legumes. Possue em torno de 150 gêneros e 2.200 espécies.

A sub-família Faboideae compreende plantas herbáceas arbustivas e arbóreas, com aproximadamente 440 gêneros e 12.000 espécies difundidas em todas as latitudes; apresenta folhas compostas, fruto em forma de legumes com sementes duras. Diferencia-se

das outras sub-famílias por possuir flores zigomorfas e preflora ção da corola imbricada descendente.

As sub-famílias Mimosoideae[46] , Caesalpinioideae[144] e Faboideae[34] estão divididas em 6, 5 e 32 tribos respectivamente , segundo tabela abaixo[47].

Angiospermeae

Classe: Dicotyledoneae
Sub-classe: Archiclamydeae
Grupo de ordem: Coroliano
Ordem: Rosales
Sub-ordem: Leguminosineae
Família: Leguminosae
Sub-famílias:

Caesalpinioideae
Tribos: Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae, Detarieae, Amherstieae.

Mimosoideae
Tribos: Parkieae, Mimozygantheae, Mimoseae, Acacieae, Ingeae, Adenanthereae (incluindo Piptadenieae).

Faboideae
Tribos: Swartzieae, Sophoreae, Dipteryxeae, Dalbergieae, Abreae, Tephorosieae, Robiieae, Indigofereae, Desmodieae, Loteae, Phaseoleae, Psoraleeae, Amorpheae, Sesbanieae, Galegeae, Aeschynomenea, Adesmieae, Carmichaelieae, Redysareae, Coronilleae, Vicieae, Cicereae, Trifolieae, Bossiaeae, Brongniarteeae, Mirbelieae, Liparieae, Crotalarieae, Euchresteae, Thermopsideae, Genisteae, Lonchocarpeae.

1.1. GALACTOMANANAS DE SEMENTES

São consideradas galactomananas polissacarídeos que contem no mínimo 5 ou 15% de galactose de acordo com ASPINALL [6], ou BECK e WIECZOREK [12], respectivamente.

Ocorrem como componentes da parede celular principalmente em caules de gimnospermas[182], em líquens [60, 61] microorganismos como leveduras [10,62,102] e fungos[10,64,91,131] e em endosperma de sementes de plantas de família das leguminosas. No presente trabalho analisaremos as últimas, que foram estudadas em mais de 70 diferentes espécies [38].

A quantidade de galactomananas armazenada na semente das leguminosas depende do tamanho relativo do endosperma. O soja (*Glycine max*) tem um endospermas rudimentar contendo menos de 1% de galactomananas[5,190], enquanto que o guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e o alfarrobo [28] (*Ceratonia siliqua*) possuem um endosperma maciço com 35 e 38% em peso de galactomanana, respectivamente.[38]

O endosperma possue função de reserva durante a germinação e para a nutrição do embrião [154]. Age também como um tecido

de absorção de água para a semente, prevenindo contra a sua perda nos períodos de seca, o que poderia causar a desnaturação das proteínas, e em particular das enzimas essenciais para a germinação. Pode-se considerar que as ramificações laterais das galactomananas sejam a porção hidrofílica do endosperma.

Existe uma relação entre a estrutura e as propriedades físico-químicas das galactomananas e sua função como agente na regulação do equilíbrio hídrico durante a germinação[143]. Sendo assim, o conhecimento das caracterícas químicas e físico-químicas dos polímeros naturais a nível molecular é indispensável para a análise do metabolismo e atuação nas plantas, bem como o seu aproveitamento pelo homem.

A depolimerização das galactomananas na semente ocorre pela ação de três enzimas: α-galactosidase, endo-β-mananase e β-manosidase ou exo-β-mananase[117,153,118,161,116].

McCLEARY e MATHESON[117] observaram que a atividade das glicosidases aumenta durante a germinação de várias espécies. Este processo deve ocorrer nas células do endosperma. Os produtos da depolimerização da galactomanana: galactose e manose são rapidamente transportados do endosperma até o embrião por difusão passiva [162] e convertidos em sacarose e amido transitório.

A biossíntese de galactomanana de plantas ainda não está bem definida[40]. REID e MEIER estudando a biossíntese de galactomana na de Trigonella foenum graecum L.[153] sugeriram que unidades de

D-galactose e D-manose são distribuidas simultaneamente durante formação de galactomanana, o que foi observado por COURTOIS e Le DIZET[33] pela constância da relação manose:galactose em galactomananas de sementes de Gleditsia ferox, durante a maturação.

As galactomananas de sementes tem sido utilizadas pelo homem e animais desde os tempos mais antigos, sendo o guar (Cyamopsis tetragonolobus) e o alfarrobo (Ceratonia siliqua) as fontes que se sobressaem[98,160,188].

A Ceratonia siliqua conhecida comercialmente por locust bean, carob ou alfarrobo, é nativa do Sul da Europa e foi utilizada inicialmente como ração animal[38]. Esta espécie pertence a sub-família das Caesalpinioideae, tribo Cassieae, produzindo árvores com oito metros de altura com frutos de 10 a 20 cm a partir dos 5 anos, em média. Suas sementes são em forma oval, amarronzadas, com 8 a 9 mm de comprimento[20].

A Cyamopsis tetragonolobus é uma planta nativa do Paquistão (India), da sub-família das Faboideae, tribo Indigofereae cujo polissacarídeo é conhecido comercialmente como guar ou guaran. O interesse nesta espécie surgiu em 1940[38] devido a escassez de outras fontes de galactomanana durante a 2ª Guerra Mundial. Atualmente é cultivada em larga escala nos U.S.A. É uma espécie de cultivo anual, possuindo 0,6 m de altura com sementes de diâmetro médio entre 4-5 mm. Sua produção anual mundial em 1980 foi de 80.000 toneladas métricas, sendo 1/3 consumido na indústria de alimentos e o

restante na indústria em geral [160].

As propriedades da galactomanana de guar podem ser modificadas pela obtenção de derivados, que elevam sua importância industrial, como o hidroxipropil guar, carboximetil guar e derivado de amônio quaternário [126]. Estes derivados possuem maior tolerância a sais inorgânicos, maior estabilidade térmica, maior capacidade para interações cruzadas, melhor poder seletivo em filtrações, e podem atuar como auxiliares na floculação de sólidos e como espessantes [160].

Genericamente as galactomananas são polissacarídeos formados de uma cadeia principal de unidades de D-manopiranose ligadas glicosidicamente β-(1→4). Unidades de D-galactopiranose ligadas glicosidicamente α-(1→6) estão distribuidas na cadeia principal do polissacarídeo. Para o guar e alfarrobo as proporções de manose e galactose são de 2:1 e 4:1 respectivamente [8].

A extração aquosa destes polissacarídeos é realizada em temperatura ambiente, sendo que para o alfarrobo os maiores rendimentos são obtidos em água quente.

Os rendimentos de galactomananas são muito altos entre as espécies das sub-famílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (15 a 38% do peso seco da semente). Algumas espécies das tribos Galegeae, Crotalarieae, Mimoseae, Sophoreae e Trifolieae possuem cerca de 15 a 25% destes polissacarídeos, enquanto que as tribos Desmodieae, Genisteae e Loteae contém somente de 1 a 15% [40]. Observou-se que a solubilidade do polímero em água aumenta com o

decréscimo da relação man:gal. Consequentemente a eficiência da extração aquosa depende da composição das galactomananas. O tempo envolvido no processo de extração pode alterar o rendimento pela degradação enzimática, afetando a composição do polissacarídeo e sua solubilidade [38,40].

As relações D-manose:D-galactose entre as galactomananas têm sido utilizadas como guia taxonômico de leguminosas. Há proporções desde 1:1, para galactomananas de Medicago sativa[31] e Trifolium repens[84] ambas da tribo Trifolieae, até 5,26:1 para galactomanana de Shofora japonica[93] da tribo Sophoreae.

1.2. ANÁLISE ESTRUTURAL DAS GALACTOMANANAS

As galactomananas foram, pela primeira vez, analisadas quimicamente em 1897, quando EFFRONT[170,172] investigou sua composição em sementes de Ceratonia siliqua. Entre 1900-1936 outras espécies de leguminosas foram analisadas como a Gleditsia triacanthos[38]. Trigonella foenum graecum[4], Lotus corriculatus[38] e Meticago sativa[31] onde investigou-se as proporções de galactose e manose presentes nos polissacarídeos bem como métodos de extração. A estrutura genérica das galactomananas, de acordo com análise de metilação e hidrólises parciais, é a seguinte :

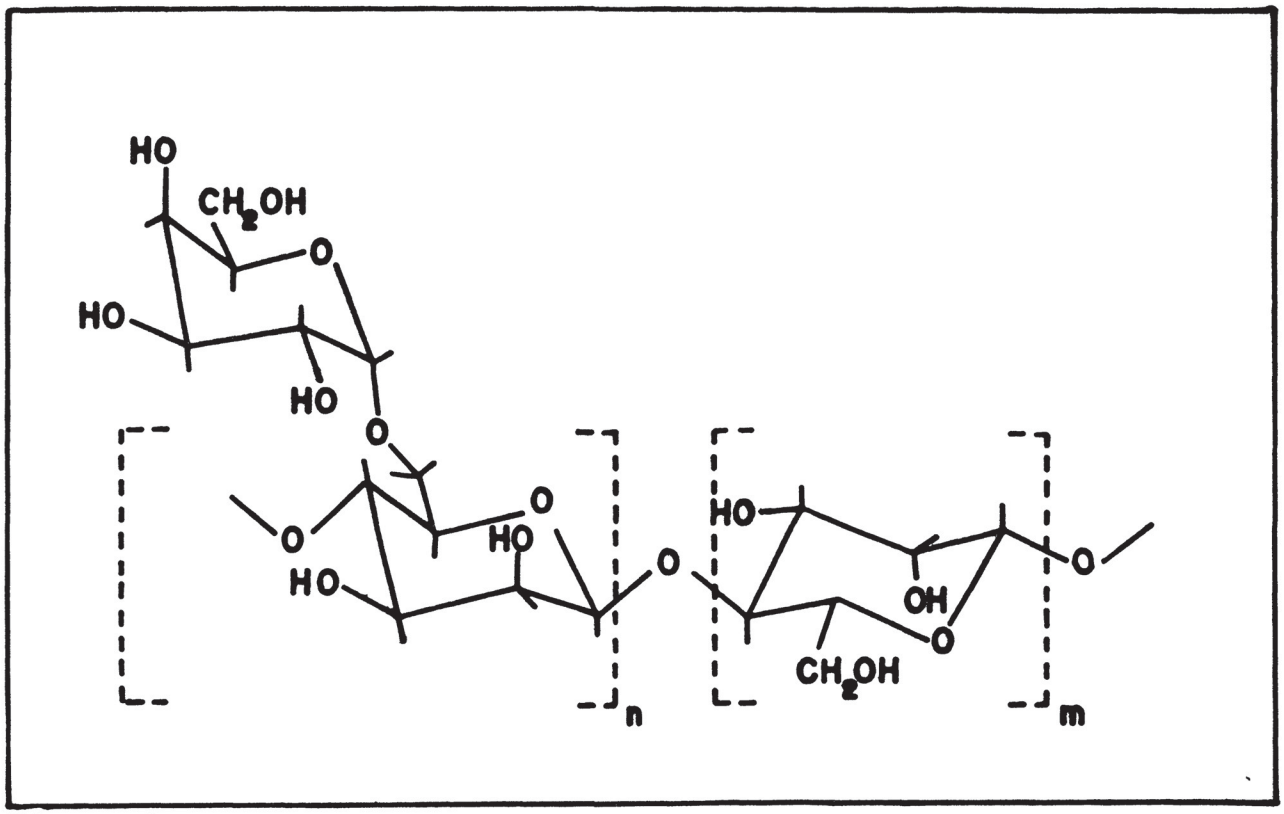


Figura 1

§ Estrutura genérica de galactomananas de sementes de Leguminosas.

Estruturas diferentes do tipo clássico são encontradas em algumas galactomananas[69] como as de Crotalaria mucronata[185] e Caesalpinia pulcherima[184] que possuem ligações do tipo (1→3) e (1→2) na cadeia principal de manose. A hidrólise do polissacarídeo metilado de Caesalpinia pulcherima[184] forneceu como derivados: 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose; 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manose; 2,4,6-tri-O-metil-D-manose; 2,3,6-tri-O-metil-D-manose; 3,4,6-tri-O-metil-D-manose e 2,3-di-O-metil-D-manose nas proporções 27:1:4:60:2:32. Estes resultados indicam que toda a galactose ocupa posições de terminal não redutora, aparecendo somente como derivado tetra metilado, e a relação entre este deri-

vado e o derivado 2,3-di-O-metil-D-manose é praticamente 1:1; a presença de ligações (1→2) e (1→3) é indicada pelos derivados 3,4,6 e 2,4,6-tri-O-metil-D-manose respectivamente. Estes dados foram confirmados por análise de oxidação com periodato.

Além das diferenças da estrutura clássica na cadeia principal das galactomananas, podem ocorrer diferenças em relação ao tipo de ligação glicosídica na cadeia lateral da galactose. KAPPOR e MUKHERJEE [90], ao analisarem a galactomanana de Cassia ab sus, obtiveram como derivados metilados: 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose; 2,3,6-tri-O-metil-D-manose; 2,3-di-O-metil-D-manose e 4,6-di-O-metil-D-manose em proporções molares de 2:4,2:1:1. Foram isolados os seguintes oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial deste polissacarídeo que possue relação man:gal de 3:1 : os dissacarídeos 2-O-α-D-galactopiranosil-D-manose, 6-O-α-D-galactopiranosil-D-manose, e os trissacarídeos 4-O-(6-O-α-D-galactopiranosil-β-D-manopiranosil) β-D-manose e 4-O-(4-O-β-D-manopiranosil-β-D-manopiranosil)β-D-manose. Estes resultados indicaram que aproximadamente 85% das manoses estão unidas com ligações do tipo (1→4) e o restante (1→3). Todas as unidades de manose unidas (1→3) são substituídas em O-2 por α-D-galactose o que representa 50% das cadeias laterais de galactose, o restante se encontra ligado a O-6 das unidades de manose (1→4). Os dados obtidos por oxidação com periodato estão em concordância com os acima descritos.

Outra possível variação na estrutura clássica das galactomananas é a presença de cadeias laterais de α-D-galactobiose, li

gadas glicosidicamente (1→ 6) , além das ramificações isoladas de α-D-galactose. Galactomananas que apresentam este tipo de estrutura foram isolados de sementes de Gleditsia amorphoides[23] , Trifolium repens[30] , Gleditsia ferox [30], Cassia corymbosa[181] e Cassia renigera[73] . Em todas estas galactomananas obteve-se o derivado metilado 2,3,4-tri-O-metil-D-galactose, sempre em pequenas quantidades. Existe a possibilidade de que a cadeia principal de D-manose não seja linear. Isto se explica quando a presença do derivado 2,3-di-O-metil-D-manose ocorre em maiores proporções que 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-galactose,para algumas galactomananas[30,84].

A distribuição das unidades α-D-galactose ao longo da cadeia principal pode ocorrer regularmente (alternadas)[a.],em blocos[b.] ou randomicamente[c.], conforme figura abaixo [38]:



A variação desta distribuição influe nas propriedades das galactomananas.Os primeiros estudos sobre a distribuição das cadeias laterais nas galactomananas foram por tratamento enzimático. A α-

galactosidase (α-D-galactoside galactohidrolase, EC 3.2.1.22) é encontrada em uma grande variedade de microorganismos e em sementes[31,32,22,41,166] podendo existir em múltiplas formas. A quantidade de liberação da galactose pela enzima depende do seu conteúdo na galactomanana[31]. Os resultados de uma ação prolongada da enzima diferem significativamente para galactomananas de diferentes espécies. Observou-se também que a relação man:gal aumentava regularmente pelo tratamento sucessivo com a enzima e que não era possível liberar a totalidade da galactose. A velocidade inicial de liberação de D-galactose não permite diferenciar galactomananas com relação man:gal de 1,0, como de Trifolium repens e de Genista scoparia, daquelas de relação elevada, como de Gleditsia ferox (3,9:1,0) e de Gleditsia triacanthos (3,8:1,0). A partir destas determinações, foi possível avaliar a existência de diferenças marcantes na distribuição das cadeias laterais de galactose.

As β-mananases (endo-β-D-mananase, β-D-(1→4)-manana manohidrolase, EC 3.2.1.78) hidrolisam a manana em oligossacarídeos. Observou-se que para galactomananas de Ceratonia siliqua e Gleditsia ferox, com relação de man:gal de 3,8 e 3,9, respectivamente, ocorria uma diminuição acentuada da viscosidade do polímero em solução após o tratamento com β-D-mananase[118], indicando que os pontos iniciais do ataque se encontram no centro da cadeia, comprovando ser uma endo-enzima.

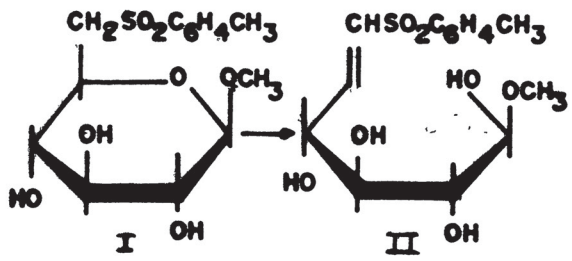
COURTOIS e LeDIZET[32,33] utilizaram a combinação de β-D-mananase e α-D-galactosidase para comprovar a estrutura fina

das galactomananas, bem como a acentuada diferença na distribuição das cadeias laterais entre estes polissacarídeos.

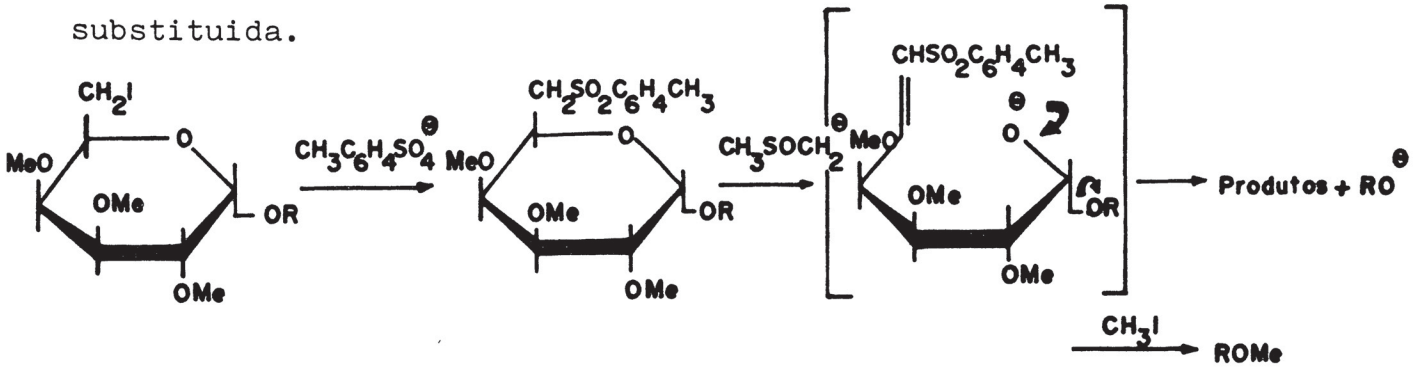
McCLEARY, MATHESON e SMALL [119] analisaram a distribuição das unidades de D-galactopiranose em galactomananas de sementes de diferentes espécies de leguminosas, baseados em análises dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise com β-mananase purificada, isto é, sem a presença de α-D-galactosidase e β-D-manosidase . Concluiram que era necessário pelo menos duas unidades de manose consecutivas não substituidas para que ocorresse a hidrólise com a β-mananase de Medicago sativa . Mais recentemente McCLEARY e NEUKOM[114] comprovaram que as endo β-D-mananases são capazes de hidrolisar rapidamente as cadeias de galactomananas em solução juntamente com um polissacarídeo com a qual interaja fortemente, como a xantana[116].McCLEARY et alii sugerem, ainda, que em galactomananas altamente substituidas a β-mananase atua rapidamente em pontos de D-manose não substituidas adjacentes a unidades de manose substituidas por galactose[120,121].

A análise da distribuição das cadeias laterais de galactose em galactomananas pode ser realizada por vários outros métodos.

Um dos métodos químicos utilizados é através do derivado 6-deoxi-(-p-toluil sulfonila) hexapiranosídeo[101], que é sucetível a degradação alcalina.



Entretanto o rendimento do derivado (II) foi baixo e aumentou quando o derivado correspondente 6-deoxi-6-iodo foi tratado com o mesmo reagente (6-deoxi-p-tolil sulfinato de sódio). Esta reação foi aplicada a galactana de Polyporus squamosus que consiste de uma cadeia principal de α-D-galactopiranose 6-O-substituida com cadeias laterais de 3 unidades de α-D-galactopiranose 2-O-substituida.



O derivado 6-p-toluil sulfona metilado preparado através de muitas etapas foi tratado com alcali que removeu as unidades substituidas por β-eliminação deixando a cadeia principal parcialmente O-metilada que foi subsequentemente analisada[15,97].

A metodologia foi melhorada por BAKER e WHISTLER[8] e aplicada para galactomanana de sementes de leguminosas. Eles converteram as galactomananas diretamente para os derivados 6-deoxi-6-iodo, que foram facilmente transformados aos derivados 6-p-toluil sulfonas. O produto continha unidades de manopiranose e galactopiranose substituidas com sulfonas e outras de manopiranose não substituidas. Após o tratamento com ion metil sulfinil em DMSO na presença de iodeto de metila, que promove metilação e β-eliminação, é possível distinguir-se as unidades de D-manose substituidas por D-galactose, que se encontram isoladas na cadeia, daquelas unidades substituidas adjacentes[9].

Este princípio pode ser aplicado na depolimerização de polissacarídeos contendo unidades de cadeia lateral unidas por ligações do tipo (1→6) sendo possível, então, deduzir a natureza da distribuição das cadeias laterais. Este processo foi aplicado na determinação da distribuição de unidades de D-galactopiranose de galactomananas de sementes de Cyamopsis tetragonolobus e Ceratonia siliqua [8].

A galactomanana é convertida em um derivado 6-deoxi-6-p-toluil sulfonila, que é depolimerizado sob condições alcalinas, obtendo-se unidades de D-manopiranose unidas glicosidicamente a uma unidade sulfonila ou a uma unidade de D-manopiranose não derivatizada. Após metilação e hidrólise é possível distinguir-se as unidades de D-manose substituidas por D-galactose, que se encontram isoladas na cadeias, daquelas unidades substituidas adjacentes [9].

A reação ocorre inicialmente com uma degradação alcalina por β-eliminação e metilação com metil-sulfinil-metídeo de sódio e iodeto de metila, seguida por uma hidrólise ácida, redução e acetilação, originando os derivados acetatos de alditois de manose parcialmente metilados. Cada unidade de D-manopiranose substituida em O-6 por α-D-galactopiranose e em O-4 por uma D-manopiranose não substituida em O-6, fornece como derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol. Quando a unidade de D-manopi-

ranose unida em O-4, for substituida por α-D-galactopiranose, e adjacência a outra unidade também substituida o produto obtido é 2,3,6-tri-O-metil-D-manitol, de acordo com o mecanismo a seguir.

As unidades de α-D-galactopiranose e β-D-manopiranose não substituidas, fornecem derivados de p-toluil sulfonas, que sofrem transformação em meio alcalino[101].

A análise dos resultados levou BAKER e WHISTLER[8] a sugerir uma possível estrutura primária para galactomanana de Cyamopsis tetragonolobus, que consiste de repetições regulares do trissacarídeo 4-O-(6-O-α-D-galactopiranosil-β-D-manopiranosil)-β-D-manopiranose, em concordância com a estrutura regular sugerida anteriormente por COURTOIS e LeDIZET[32, 30]. Dentro desta mesma análise supõe-se que, para galactomanana de Ceratonia siliqua, os grupos de α-D-galactopiranose se encontram distribuidos em blocos, não havendo distribuição fixa das cadeias laterais em função dos resultados obtidos para o derivado 2,3,6-tri-O-metil-D-manitol e 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol nas proporções molares de 1:0,04, indicando que cada bloco compreende 25 unidades de manose.

HOFFMAN e SVENSSON[83] desenvolveram um método diferente de degradação destinado a analisar a distribuição das cadeias laterais de galactomananas. O processo consiste na tritilação do polissacarídeo que assegura aos grupos hidroxilas (OH-6) a não metilação seguido por uma detritilação; numa outra etapa ocorre a oxidação, β-eliminação e hidrólise ácida suave[97] onde as cadeias laterais de D-galactose e unidades de D-manose não substi-

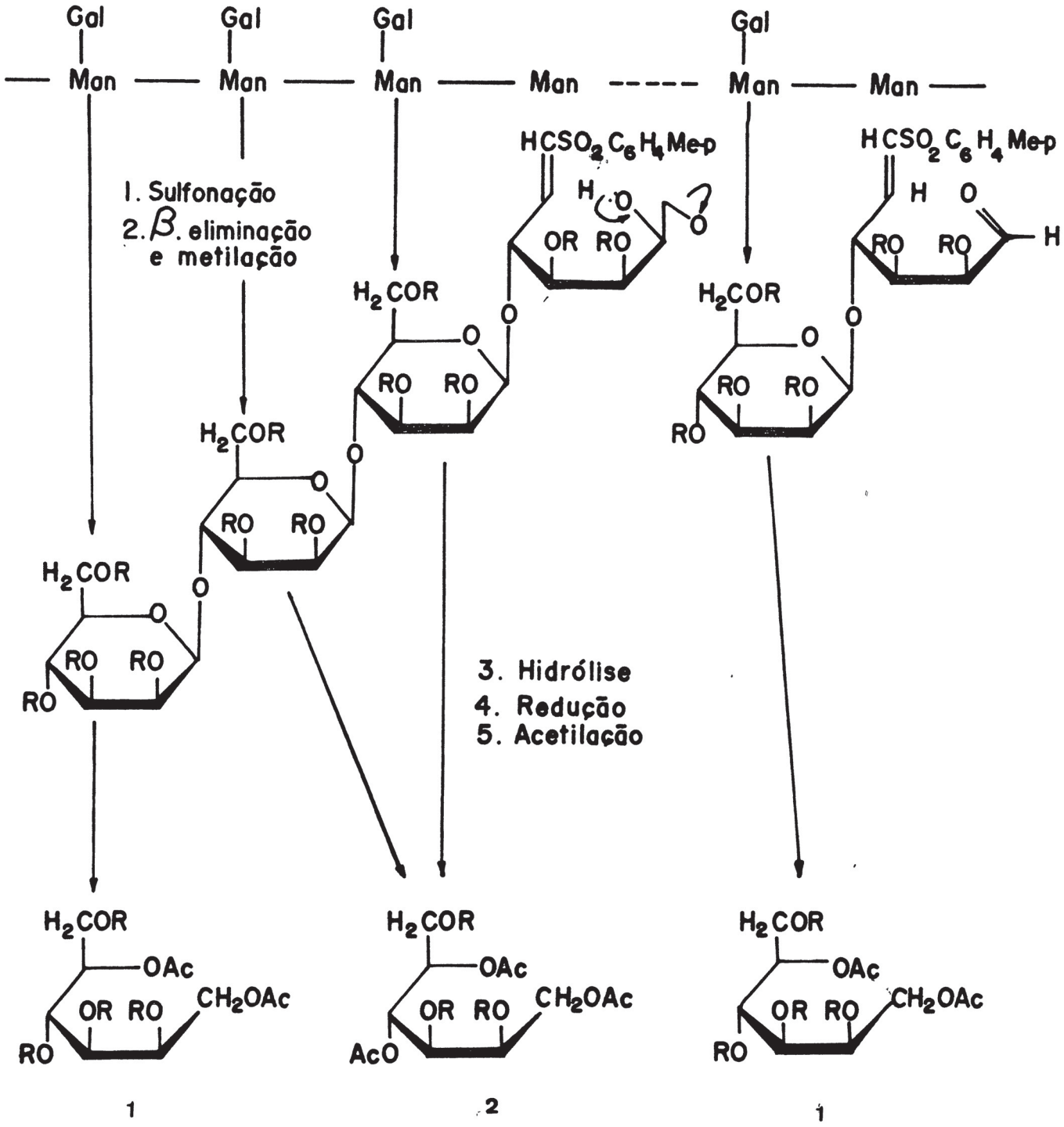


Figura 2

§ Produtos obtidos a partir de uma galactomanana genérica após a sequência de reações de BAKER e WHISTLER.[8].

Degradação alcalina por β-eliminação e metilação seguida de hidrólise, redução e acetilação.

1) 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol; 2) 2,3,6-tri-O-metil-D-manitol

tuidas são degradadas, deixando intactas somente as unidades de D-manose substituidas que possuam adjacentemente uma ou mais unidades de D-manose ramificadas. A análise de metilação da mistura degradada sugeriu que as cadeias laterais de D-galactose da galactomanana de Cyamopsis tetragonolobus estão distribuidas principalmente em pares tripletes.

PAINTER, GONZALES e HEMMER [136] analisaram a distribuição de D-galactose em galactomananas, baseados em estudos cinéticos da oxidação com periodato. Quando há um grupo hidroxila livre em C-6 na unidade de D-manose oxidada, há formação de hemiacetal entre o grupo aldeido da manose oxidada e o grupo hidroxílico em C-6. No entanto quando OH-6 está bloqueado por uma substituição de D-galactose há formação de hemiacetais inter unidades, que são estáveis e tornam-se resistentes ao ataque subsequente do periodato [81,82]. Análises teóricas detalhadas na cinética da oxidação com periodato [56,57] de galactomananas de Cyamopsis tetragonolobus (guar) e Ceratonia siliqua (alfarrobo), juntamente com a análise de metilação, sugerem que no guar, as unidades de D-galactose encontram-se distribuidas em pequenos grupos de duas a quatro unidades, regularmente, ao longo, da cadeia principal de D-manose, enquanto que no alfarrobo as unidades de D-galactoses estão distribuidas em blocos. Estes resultados são semelhantes aos propostos por COURTOIS e LeDIZET [32,30].

HALL e YANPANI[74], baseados em estudos de oxidação propuseram uma distribuição em blocos para a galactomanana de Cyamopsis tetragonolobus.

Como pode ser observado, os diversos métodos para determinar a distribuição das cadeias laterais nas galactomananas, nem sempre são concordantes para uma mesma espécie. Isto pode ser atribuido às falhas de metodologia e processos de extração dos polissacarídeos.

Com a finalidade de encontrar métodos de análise estrutural mais simples, rápidos e adequados para as rotinas de trabalho, GRASDALEN e PAINTER[68] desenvolveram estudos de ressonância nuclear magnética aplicados à galactomanana de sementes de leguminosas.

O processo requer uma despolimerização parcial da galactomanana, que diminui a viscosidade do polissacarídeo produzindo um material com mais mobilidade em solução, fornecendo assim um espectro de ^{13}C.n.m.r. de melhor resolução. O tratamento é realizado com ácido ortofosfórico a frio, que apresenta um excelente poder de solubilização, sendo facilmente removido com éter. Além disso, este ácido acelera a velocidade de hidrólise das ligações β-D-manopiranosídicas em relação as α-D-galactopiranosídicas[135]. Nestas condições é possível diminuir o grau de despolimerização da amostra, sem que se altere significativamente a composição monomérica. Os espectros de ressonância nuclear magnética de carbono treze (^{13}C.n.m.r) de 25 MHz das galactomananas de Ceratonia siliqua e Cyamopsis tetragonolobus, e de 50 MHz para Trifolium pratense [68] apresentaram

uma boa resolução. Os valores dos deslocamentos químicos estão na Tabela abaixo:

TABELA I

§ ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE ^{13}C-n.m.r. DE GALACTOMANANAS DE SEMENTE DE LEGUMINOSAS[a,68].

Tipo de unidade	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α-D-galactopiranose	101,8	72,3[b]	71,4	72,5[b]	74,1	64,1
β-D-manopiranose	103,0	72,9*	74,4*	79,3[c]	78,0	63,6
não substituído em O-6				79,6[d]		
β-D-manopiranose	103,0	72,9	74,4	79,6[c]	76,4	69,6
substituído em O-6				79,9[d]		

a) Os deslocamentos químicos estão expressos em p.p.m. relativos a 3-(trimetil silil)-propionato-d4 como padrão interno.
b) Os dados podem ser permutados.
c) Quando a unidade precedente de D-manose não está substituída.
d) Quando a unidade precedente de D-manose está substituída.
* Os valores estão invertidos de acordo com os trabalhos posteriores de BOCIEK[19] e GORIN[63].

A região espectral do carbono anomérico C-1(101,8-103) e de C-6(63,6-64,1) são bastante conhecidas. Em C-5(76,4) e C-6(69,6) as unidades de D-manose substituídas em O-6 apresentam um deslocamento para campo mais alto de 1,6 ppm e 6 ppm para campo mais baixo, respectivamente, comparadas

com os mesmos sinais de unidades de carbono não substituídas. Em C-4 resulta um campo menor devido ao envolvimento com ligação glicosídica.

Os sinais de C-2 e C-3 da D-manose, são comparados com os carbonos correspondentes da β-manana de Rhodotorula glutinis[58].. Todos os carbonos da α-D-galactopiranose são comparados com espectros dos monômeros[63,42] .

Os sinais das unidades D-manose são mais largos que os das unidades de D-galactose devido a elevada mobilidade e heterogeneidade das α-D-galactose relacionada com a sequência de unidades na cadeia. No espectro de 50 MHz observou-se três sinais de C-4 bem definidos.Como todas as unidades de D-manopiranose apresentam-se unidas por ligação $\beta(1\rightarrow 4)$ e se encontram em conformação $^4C_1$, estes sinais podem representar a sensibilidade da presença ou não de substituição nas unidades de D-manose unidas em O-4, fornecendo assim uma maneira para determinar as probabilidades de distribuição de D-galactose e D-manose nas vizinhanças da galactomanana[68].

Comparando-se a região do espectro de ^{13}C-n.m.r. correspondente aos deslocamentos de C-4 de D-manose para três galactomananas,tais como Ceratonia siliqua, Cyamopsis tetragonolobus[68] e Trifolium pratense e conhecendo-se a relação man:gal de cada uma delas, 79:21, 63:37, 58:42,respectivamente , pode-se determinar que dentre os três sinais,o sinal em campo mais alto corresponde à unidades de D-manose não substituída,ou seja (III). Isto se

explica em razão da maior intensidade no espectro de galactomana na de Ceratonia siliqua que possue poucas unidades de D-galactose. (Figura abaixo):

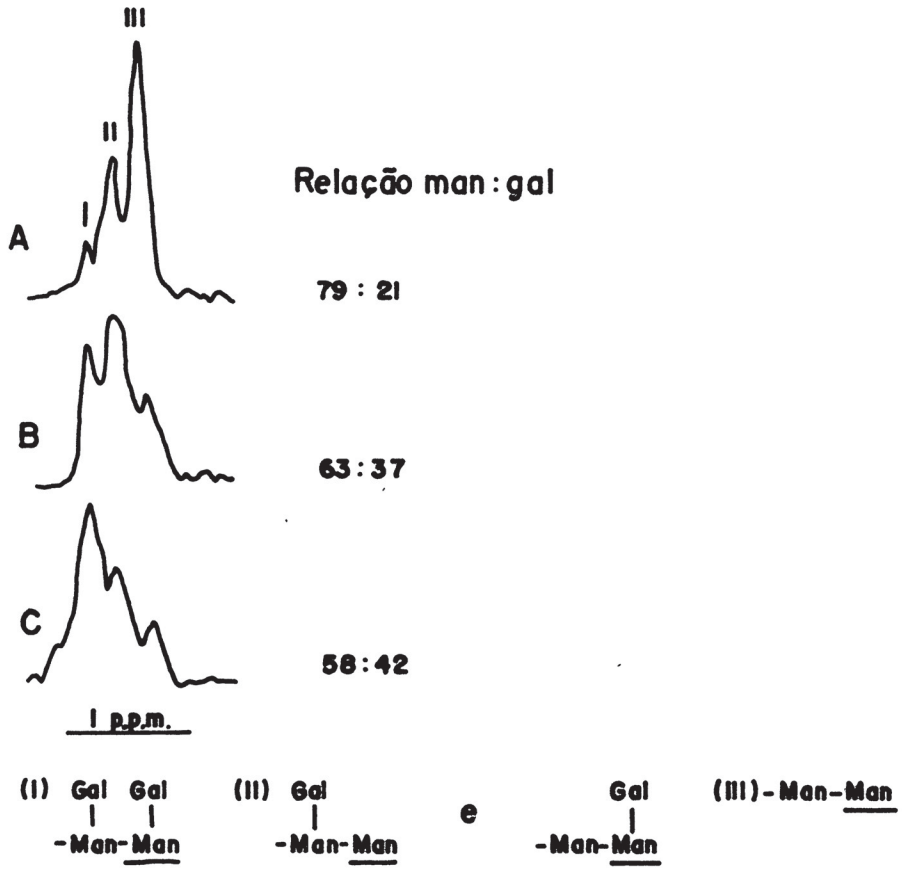


Figura 3-
§ Região espectral de ^{13}C n.m.r., em 25 MHz, das unidades D-manopiranosídicas. A, galactomanana de Ceratonia siliqua; B, galactomanana de Cyamopsis tetragonolobus e C, galactomanana de Trifolium pratense. I, II e III correspondem as díades citadas no texto [68].

O sinal em campo mais baixo na região de C-4 de D-manose indica D-manose substituída ligada a outra também substituída ,

(I), sendo este sinal predominante para a galactomanana de Trifolium pratense, a qual é altamente substituída por D-galactose.

O sinal intermediário representa a superposição dos sinais originais, onde somente uma das unidades de D-manose está substituída, (II). Isto implica que o ambiente de C-4 da D-manose está afetado em igual magnitude pelo grupo D-galactose unido à unidade precedente da cadeia, bem como pelo grupo de D-galactose unido à D-manose em questão. Logo, é razoável que o efeito destes dois grupos combinados originem deslocamentos para campo mais baixo que III.

Os resultados indicam que a distribuição das unidades de D-galactose ao longo da cadeia principal é de forma randômica para as três galactomananas analisadas, contrariando a distribuição em blocos e regulares descritos anteriormente por BAKER e WHISTLER [8,9] e HOFFMANM e SVENSSON [83].

A partir das áreas relativas dos sinais de C-1 nos espectros de ^{13}C-n.m.r. é possível calcular a abundância relativa dos monômeros (relação man:gal) e comparar os resultados obtidos por análise química.

De acordo com o método de GRASDALEN e PAINTER [68], a análise das galactomananas por ^{13}C-n.m.r. requer um período de quatro semanas para a depolimerização com ácido ortofosfórico. Pelo método de BOCIEK et alii [17] a hidrólise parcial para depolimerização é realizada com ácido clorídrico diluido (pH 2-2,5), seguida de aquecimento por 1 hora a 98°. Após resfriamento, é neutralizada com

NaOH 2 M, recuperando-se a galactomanana despolimerizada após 3 dias de diálise.

Os resultados obtidos por este método confirmaram os obtidos por GRASDALEN e PAINTER[68], a não ser pelos deslocamentos de C-2 e C-3 dos sinais de D-galactopiranose que estavam invertidos, conforme sinais atribuidos para o monomero metil- -D-galactopiranose[63]. Os espectros apresentaram boa resolução, sem que se modificassem as características básicas da amostra.

BOCIEK et alii[17] concluiram que, apesar da impossibilidade de obter-se bons espectros de ^{13}C-n.m.r. para soluções de galactomananas não hidrolisadas devido a sua alta viscosidade, mesmo a altas temperaturas, os espectros auxiliaram na distinção entre diferentes espécies de galactomananas.

MANZI et alii[104] e MANZI e CEREZO[105] realizaram estudo sobre a distribuição das cadeias laterais de galactose em galactomananas de sementes de Gleditsia triacantos por ^{13}C-n.m.r.As galactomananas foram obtidas por extração aquosa a diferentes temperaturas, obtendo-se polissacarídeos com diferentes proporções de man:gal.Os produtos, previamente despolimerizados, foram analisados por ^{13}C-n.m.r.,apresentando espectros em 75 MHz com tima resolução onde foi observada, pela primeira vez, a região de C-6 como região espectral característica para D-manose substituída com formação de tripletes. Este carbono é sensível às vizinhanças de ramificação para a cadeia principal de D-manose fornecendo informações juntamente com as díades de C-4, para determinação da provável

distribuição da D-galactose no polissacarídeo. (Figura abaixo):

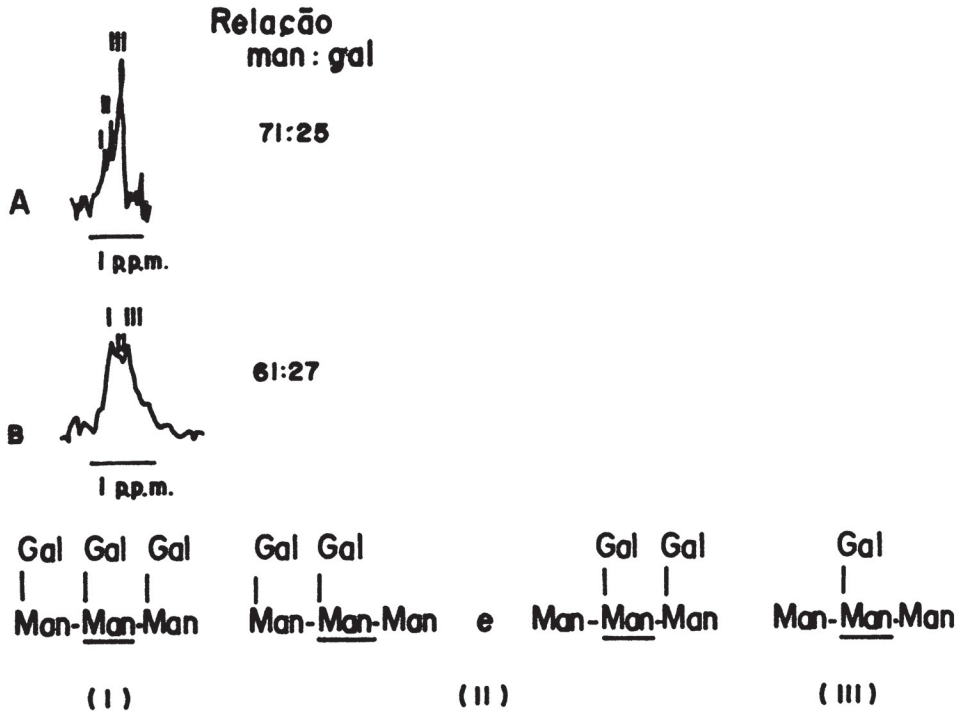


Figura 4
§ Região espectral de ^{13}C-n.m.r., em 75 MHz (A) e 25,2 MHz (B), das unidades D-manopiranosídicas de Gleditsia triacanthos. I,II, III-tripletes ou tríades de C-6 [105].

Embora as frequências das díades (C-4) sejam consistentes para assegurar uma distribuição randômica para as galactomananas de Gleditsia triacanthos, os valores das tríades observadas na região de C-6 para D-manose substituída indicaram uma forma complexa de distribuição para as cadeias laterais de D-galactose, conforme foi observado para Cyamopsis tetragonolobus e Ceratonia siliqua por análise de oxidação com periodato [136].

O comportamento sinergístico da galactomanana de Cyamopsis tetragonolobus, juntamente com outros polissacarídeos como a carragenana e a xantana, despertou maior interesse por estes polímeros. As associações de carragenanas com galactomananas de Ceratonia siliqua e de Cyamopsis tetragonolobus têm sido analisadas com sucesso por ^{13}C-n.m.r. na região do carbono anomérico[17].

A interação entre guar e borato foi investigada por ^{13}C-n.m.r., com a finalidade de obter novas informações sobre a associação molecular existente durante a formação do complexo , ou seja a compreensão do processo de gelatinização guar-borato[54,133].

1.3. CONFORMAÇÃO DAS GALACTOMANANAS EM SOLUÇÃO

O comportamento dos polissacarídeos hidrossolúveis é determinado por três propriedades fundamentais: a conformação, a estrutura e o peso molecular. Para o entendimento das suas propriedades é necessário o conhecimento da forma tridimensional , que não é estática nem única, podendo alterar-se continuamente conforme as condições impostas.

As unidades monoméricas dos polissacarídeos normalmente apresentam-se em conformação $^4C_1$ (D) ou $^1C_4$ (L)[49]. Baseando-se em cálculos de valores padrões dos ângulos e comprimentos das ligações, REES[147] calculou as conformações energeticamente mais estáveis de alguns polissacarídeos. São estas conformações que

determinam como se distribuem os átomos e moléculas no interior da estrutura em relação ao meio exterior, ou seja, para com outras moléculas do mesmo polímero, moléculas diferentes presentes no meio, solventes, superfícies biológicas, etc, determinando as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos.

No caso de cadeias longas a estrutura global pode alterar-se por oscilações independentes entre cada par de unidades vicinais e, além disso, cada anel pode passar a formas de maior energia. A forma de cadeia que altera continuamente entre conformações locais e globais diferentes é conhecida como "random coil" (enrolamento ao acaso)[147]. Este tipo de conformação é estabilizada pela entropia conformacional; quanto maior o número de conformações locais, entre as quais a cadeia possa flutuar, mais difícil para esta cadeia sobrepor-se ao movimento térmico e permanecer em uma forma particular. Assim, a entropia compensa a energia potencial. Também é necessário levar em conta que as energias de interação entre as unidades monossacarídicas não são suficientemente fortes e numerosas para fixar em uma forma determinada a cadeia estabilizada por interações cooperativas.

As propriedades das galactomananas em solução aquosa tem despertado grande interesse por formarem um produto de alta viscosidade, o que levou à investigação mais detalhada das propriedades reológicas a níveis comerciais, consequentemente moti

vando o estudo conformacional destes polímeros.

As galactomananas em solução aquosa, segundo DEA, Mc KINNON e REES [36], estão dispostas em conformação "random coil", estado que pode ser revertido a uma forma ordenada em condições favoráveis de agregação ou interação com outras espécies.

McCLEARY [111] estudou o efeito do conteúdo de galactose em galactomananas de Cyamopsis tetragonolobus e Ceratonia siliqua, nas propriedades das soluções, ou seja, na solubilidade e interação com outros polissacarídeos. Ao submeter as amostras ao tratamento com α-D-galactosidase durante 2 horas aproximadamente 75% da galactose foi eliminada, obtendo-se uma leve diminuição da viscosidade na solução. Após 5 horas de hidrólise, houve formação de partículas suficientemente grandes com turvação da solução, sendo que com mais uma hora houve a precipitação da manana residual. O mesmo autor concluiu que não há relação entre o conteúdo de galactose e a viscosidade de soluções da galactomananas, sugerindo que esta propriedade seja totalmente dependente da natureza da cadeia principal de manana. Assim, as cadeias laterais de galactose lograriam papel importante na solubilização das galactomananas, não afetando o grau de interação ente as moléculas em solução diluida e nem a sua conformação aparente.

Cálculos de modelos construídos por computador, a partir

de dados obtidos por padrões em difração de raio X, indicaram que moléculas de galactomananas de Cyamopsis tetragonolobus e Gleditsia amorphoides no estado sólido encontram-se sob a forma estendida, ou seja, em conformação "ribbon" e que as cadeias laterais de galactose não necessariamente afetam a conformação da cadeia principal[38, 2].

Como as galactomananas são polissacarídeos não iônicos, suas propriedades em solução são pouco afetadas por mudanças moderadas de pH. A viscosidade tende a manter-se constante na faixa de pH 1-10,5, embora a degradação possa ocorrer em soluções altamente ácidas ou alcalinas, principlamente quando aquecidas[38].

As galactomananas de Cyamopsis tetragonolobus e Ceratonia siliqua, ambas solúveis em água, apresentam um comportamento reológico distinto, sendo estas diferenças aumentadas pelas interações soluto-soluto e soluto-solvente. Em polímeros neutros a extensão destas interações pode ser determinada por análise de viscosidade em solução diluidas[127].

Como foi citado anteriormente, as galactomananas são utilizadas para controlar as propriedades reológicas de uma variedade de produtos alimentícios e na industria em geral, sendo seu comportamento alterado na presença de outros componentes[45].

Reologia pode ser definida como a ciência do fluxo e deformação dos materiais. Para fluidos simples, o estudo da reologia envolve a medida de viscosidade, sendo que esta depende pri

meiramente da temperatura e da pressão hidrostática. Entretanto, a reologia dos polímeros é muito complexa, pois esta propriedade depende do peso molecular, da estrutura do polímero, da concentração dos vários aditivos, da temperatura e da natureza do solvente[98,128]. Soluções poliméricas geralmente possuem propriedades viscoelásticas, sendo a viscosidade um dos principais parâmetros para análise[113].

O peso molecular é diretamente proporcional à viscosidade intrínsica, de acordo com a equação de MARK-KUHN-HOUWINK[176,177], largamente utilizada para determinação de pesos moleculares dos polímeros:

$[\eta] = K\ M^a$, onde $[\eta]$ = viscosidade intrínsica do polímero

K = coeficiente de interação de HUGGINS

M = peso molecular viscosimétrico médio

a = constante empírica para um dado sistema polímero-solvente e uma dada temperatura.

A viscosidade intrínsica pode aumentar ou diminuir com a variação de temperatura. Se a afinidade termodinâmica aumenta com a elevação da temperatura, a conformação em espiral expande-se e a viscosidade intrínsica torna-se crescente. Em caso contrário, ou seja, se a conformação em espiral é contraída, a viscosidade intrínsica diminue com a elevação da temperatura[177].

A viscosidade das galactomananas em solução é diminuida na presença de sacarose e alguns sais como sulfato de sódio, pois seu poder de dissolução torna-se menor [36].

ELFAK et alii [45] analisaram o efeito da adição de glucose e sacarose na viscosidade de solução de Cyamopsis tetragonolobus e Ceratonia siliqua, cujas viscosidades intrínsicas, $[\eta]$, são 19,2 dl/g e 16 dl/g, respectivamente . A viscosidade intrínsica é a medida do volume hidrodinâmico das moléculas de soluto , logo, sugeriu-se que o polissacarídeo do guar possue uma conformação mais estendida que o do alfarrobo em soluções diluidas, devido a maior interação solvente-soluto, ou seja, capacidade de dissolução e hidratação.

O coeficiente de interação de HUGGINS (K) reflete como a viscosidade do sistema, aumenta com o aumento da concentração do polímero, devido à interação entre as cadeias vizinhas. O valor de $\underline{K}$ para o guar é pequeno, indicando uma fraca interação intermolecular em solução, ou seja, soluto-soluto, apesar de possuir uma forte interação soluto-solvente em soluções diluidas. Logo, em soluções concentradas os valores de viscosidade intrínsica vão decrescendo e torna-se menor em relação do alfarrobo.

Quando a glucose é adicionada às soluções das galactomananas, a viscosidade intrínsica decresce. A interação polímero-solvente é menor devido a redução da atividade da água na presença da glucose, ou devido à competição entre glucose e polissacarídeo pelas moléculas de água. A adição de sacarose e glucose restrin-

gem a hidratação das galactomananas de guar e alfarrobo, aumentando a interação polímero-polímero. Em soluções diluidas de galactomananas o aumento da interação polímero-polímero é compensado pela redução na hidratação e aumento da viscosidade aparente da solução. A influência da adição de sacarose nas moléculas dos polissacarídeos é indireta, através dos efeitos de hidratação e não há nenhuma evidência da interação direta sacarose-galactomananas em soluções diluidas [45].

ROBINSON et alii [157] aplicaram teorias moleculares da viscosidade em soluções diluidas e concentradas para cinco amostras de galactomananas de Cyamopsis tetragonolobus com diferentes pesos moleculares, e observaram as propriedades de fluxo. A partir de medidas de viscosidade em soluções muito diluidas as viscosidades intrínsicas foram determinadas, sendo elas 4,5; 5,0; 6,5; 8,8; 12,5 dl/g para os respectivos pesos moleculares de 440.000, 510.000, 790.000, 1.120.000 e 1.650.000. Estes pesos moleculares foram obtidos segundo a seguinte relação: $[\eta] = 3{,}8.10^{-4}.M^{0{,}723}$. Esta variação de viscosidade intrínsica com pesos moleculares é consistente com conformação em "random coil".

1.4. INTERAÇÕES MISTAS E FORMAÇÃO DE GEIS

As galactomananas, glucomananas, arabinoxilanas e celuloses derivatizadas não formam geis em soluções aquosas, mas o fazem ao associar-se com polissacarídeos em dupla hélice como aga-

rose ou carragenana. Estas associações entre cadeias polissacarídicas distintas correspondem à estrutura quaternária dos polissacarídeos[36].

Considera-se que as cadeias de polissacarídeos distintos combinam-se por união de um retículo de sequências não substituidas com ligações β-(1→4), apresentando formas de cinta com duplas hélices ou agregados[129]. Estas interações podem ocorrer também com polissacarídeos bacterianos, como o exo-polissacarídeo de Xanthomonas campestris . Estes geis devem-se a estrutura de entrecruzamento de cadeias por associações não-covalentes, sendo possível caracterizar estas associações pelas propriedades de interconversão sol-gel que envolve sua formação e destruição[38].

Durante a formação de um gel as moléculas de polissacarídeos se associam, de modo que a viscosidade do sistema aumente , chegando finalmente a um estado semi-sólido. Estes filamentos entre cruzados formam uma rede tridimensional que se introduz nos interstícios do meio líquido dispersante, significando que as cadeias do polissacarídeo se encontram livres e solvatadas em algumas regiões e associadas em outras, para formar os entrecruzamentos. As regiões associadas denominam-se "zonas de união" e podem estar constituidas de uma ou mais cadeias[148].

Comprovou-se que as galactomananas não apresentam variação significativa da rotação ótica que indicasse uma transformação conformacional em soluções aquosas quando aquecidas ou resfriadas[36]. No entanto, estas variações ocorrem quando as galac-

tomananas são misturadas à polissacarídeos gelificantes[129].

Os retículos formados numa estrutura gelificante são capazes de absorver grande quantidade de água, pois as cadeias são solúveis, mas não podem dissociar-se completamente por estarem unidas umas às outras pela rede tridimensional.

A tendência de obter-se um gel inchado ocorre paralelamente à indução da separação das cadeias, o que é balanceado pela resistência elástica ao continuar o inchamento.

A sinerese, ou seja, a contração expontânea da rede tridimensional, com a consequente separação da fase líquida, fenômeno existente em muitos geis, principalmente quando a concentração do polissacarídeo é baixa, consiste na passagem a um estado de maior estabilidade, que pode ocorrer após várias horas ou dias, indicando que o equilíbrio não se estabelece quando o gel se forma[148].

Ao analisarem as propriedades das soluções de galactomananas modificadas por α-D-galactosidase, McCLEARY [111] consideraram que a formação e retrogradação dos geis se deve a associações não-covalentes entre as partes de galactomananas não substituídas por galactose e que a extensão desta interação depende do conteúdo de galactose na amostra.

As galactomananas com 15-20% de galactose interagem para formar uma rede tridimensional que é mantida em solução pelas regiões ricas em galactose. Logo, as galactomananas com menos de 10% em galactose formam precipitados,pois não possuem galactose

suficiente para manter um agregado em solução.

Em outros estudos, McCLEARY[112] observou que galactomananas de Cyamopsis tetragonolobus e Leucaena leucocephala, que possuem o mesmo conteúdo em galactose (38%), interagem com a xantana de forma distinta. A interação entre a xantana e galactomanana de leucena foi muito mais forte do que com galactomanana de guar. A degradação enzimática com β-mananase indicou diferenças na distribuição dos substituintes de galactose ao longo da cadeia central das mananas. A galactomanana de leucena apresentou proporções significativas de unidades de D-manose substituídas ao longo da cadeia de forma alternada, enquanto que a galactomanana de guar possuia uma distribuição de substituintes de galactose muito mais irregular ao longo da molécula. Existem indicações que as diferenças estruturais na distribuição dos substituintes de D-galactose em galactomanana influencia nas suas propriedades de interação[35].

MORRIS et alii[129] estudaram a formação de geis mistos entre galactomananas e xantana, concluindo que para um material ser gelificante deve existir suficiente flexibilidade e irregularidade estrutural para evitar uma associação completa que dê lugar à precipitação, assim como suficiente rigidez e regularidade para formar uma união suficientemente estável entre as cadeias. Fora destes limites, as interações entre os polímeros serão detectadas com o simples aumento da viscosidade das soluções.

DEA, MORRIS e REES[37] analisaram a associação de galactomana-

nas com diferentes relações de man:gal,como a Ceratonia siliqua (3,5:1,0), Caesalpinia spinosa (3,0:1,0) e Cyamopsis tetragonolobus (2,0:1,0),entre si. A partir de evidências e análises das variações das concentrações das amostras, temperatura e tempo de congelamento e degelo propuseram um modelo para a estrutura dos geis de galactomananas, em que a associação entre as cadeias ocorre por agregação das regiões lisas da manana, enquanto as regiões ramificadas servem para solubilizar o retículo. (Figura seguinte):

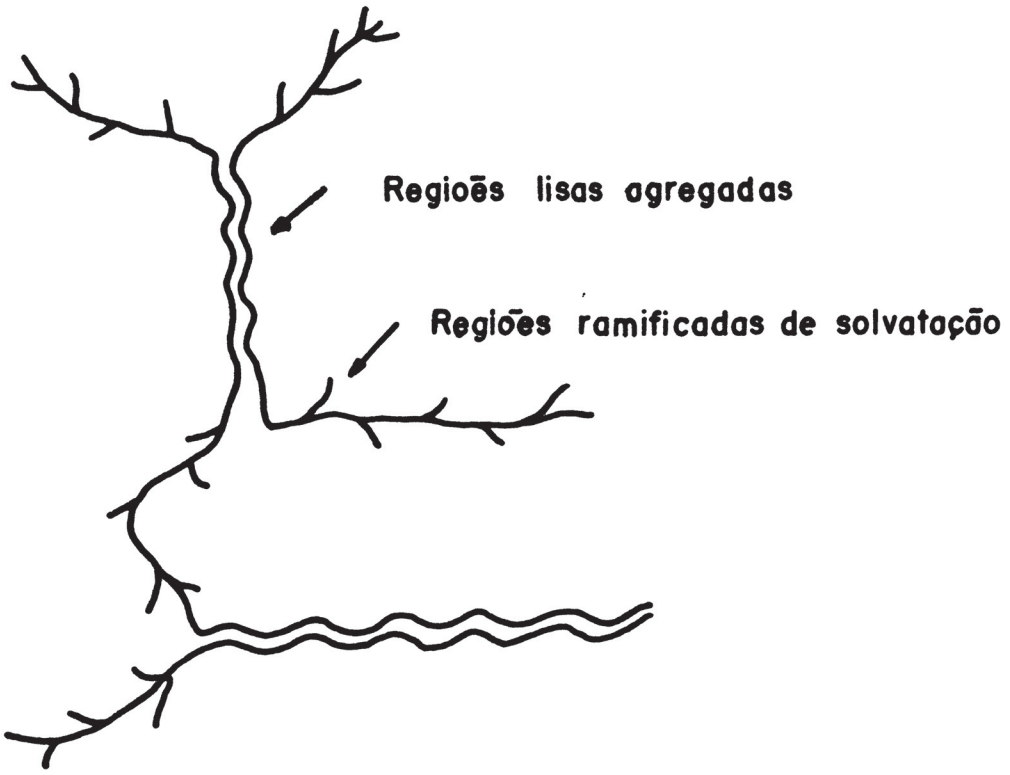


Figura 5

§ Estrutura proposta para um gel de galactomanana [37] . As regiões da cadeia central não substituídas estão associadas como no estado sólido para formar uniões entre cadeias, sendo que as regiões substituídas se encontram altamente hidratadas, e previnem a precipitação.

Estes resultados são concordantes com os de McCLEARY[112], a não ser para galactomananas com alto grau de substituição, pois análises mais recentes demonstraram que as regiões lisas das galactomananas não são imprescindíveis para a interação com a xantana e que a interação pode efetuar-se através de regiões substituídas onde as unidades laterais de D-galactose se encontram no mesmo lado da cadeia central. Isto explica a pequena mas significativa interação entre as galactomananas de Cyamopsis tetragonolobus com a xantana. Sabe-se que esta galactomanana não possue regiões sem substituição e que a xantana não forma gel sozinha, mesmo em altas concentrações (Figura seguinte).

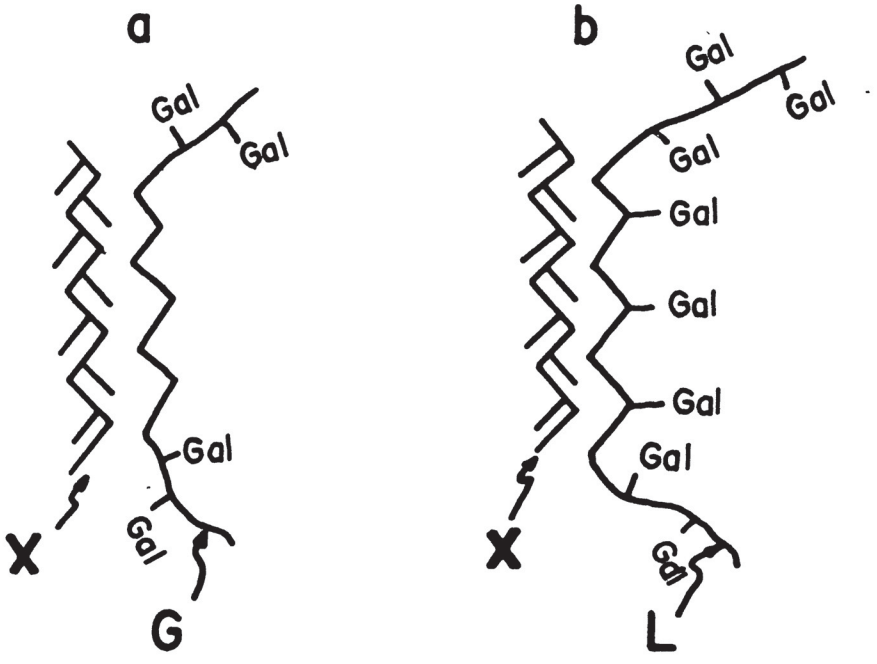


Figura 6

§ Estruturas propostas para a interação entre galactomananas e outros polissacarídeos. a) modelo proposto por MORRIS et alii[129] para a interação entre cadeias de polissacarídeo de xantana (X) e galactomananas (G). b) modelo proposto por McCLEARY[112] para a interação entre cadeias de polissacarídeo de xantana (X) e galactomanana (L) com alto conteúdo de galactose.

TAKO e NAKAMURA[179] também estudaram o comportamento reológico de interação sinergística de mistura xantana e galactomanana de guar.

DEA, CLARK e McCLEARY[35] constataram que o conhecimento da estrutura fina destes polímeros pode explicar porque galactomananas com elevadas proporções em galactose possuem propriedades de interação tão boas ou superiores a galactomananas com baixa porcentagem em galactose. Assim, a galactomanana de Leucaena leucocephala (40% em galactose) possue propriedades de interação semelhantes a da Caesalpinia vesicaria (29% em galactose).

Por outro lado, como foi comprovado que a estrutura pode influenciar na interação das galactomananas com xantana e agarose, é possível que ela possa influenciar, também, em outras associações, entre elas a gelatinização com o amido e galactomanana[192].

1.5. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE GALACTOMANANAS

A importância industrial das galactomananas está relacionada com as modificações das propriedades reológicas das solu-

ções aquosas[160,188,191]. Estes biopolímeros possuem a capacidade de apresentar soluções altamente viscosas em baixas concentrações, levemente afetados pelo pH e ciclos de aquecimento e congelamento.

São empregados como espessantes, gelificantes, emulsificantes, estabilizantes, floculantes, ligantes e impermeabilizantes[159,123].

Na indústria alimentícia são adicionados a sopas, molhos, maioneses, embutidos, queijos, geléias, sucos, iogurtes, pães, bebidas alcoólicas, alimentos congelados, etc.[38,98]. Atuam como auxiliares no controle do sabor, textura, aparência e cor; reduzindo a sensibilidade ao calor em alimentos precozidos, diminuindo a quebra do produto a altas temperaturas; conferindo resistência ao gelo-degelo em alimentos congelados e evitando a sinerese no degelo.

Na indústria farmacêutica são utilizados em medicamentos que atuam no tratamento de úlceras gastrointestinais e diarréias; no tratamento de hipercolesteremia; como substâncias imunoestimulantes; no preparo de vitamina B_{12} proporcionando maior estabilidade e solubilidade em água; em drogas microencapsuladas (sulfonamidas) favorecendo a ação da mesma; em comprimidos atuando como aglutinante seco e na elaboração de drogas de ação controlada, retardando a liberação da substância atuante. Como estes polissacarídeos não são digeríveis, são também indicados nas dietas para diabetes e diverticulite.[122,94].

Na indústria de tintas atuam como estabilizantes da viscosidade em produtos a base de acetato de polivinila [160].

Na indústria de explosivos são empregados com a finalidade de aumentar a resistência dos geis explosivos à água e ao envelhecimento. São empregados no processamento fotográfico viscoso, sendo compatíveis com as soluções utilizadas no fotoprocessamento.

Na agricultura podem ser utilizados como agentes de suspensão em herbicidas, inseticidas e fungicidas, produzindo concentrados com propriedades adequadas de fluxo, controle do tamanho da gota, previnindo a expulsão violenta durante a pulverização, e favorecendo a aderência do produto às superfícies. São utilizados com esta mesma finalidade em produtos de combate ao fogo.

Na indústria papeleira as galactomananas são incorporadas à polpa onde contribuem para formação de pontes de hidrogênio entre as fibras de celulose, conferindo ao produto maior resistência durante a secagem e proteção contra a umidade, pela formação de um filme na superfície das fibras.

Na indústria têxtil podem ser usadas na impressão e secagem de tapetes. Em detergentes, as galactomananas atuam como adsorventes das partículas de gordura e redutoras das cargas existentes entre os agentes sulfactantes que os compõe.

Outra aplicação importante dos polissacarídeos de semente de leguminosas é na indústria Petroquímica. São Utilizadas técni

cas para aumentar a produtividade dos hidrocarbonetos, onde os biopolímeros atuam como agentes espessantes em fluidos de fratura de poços, com pressões suficientemente altas para abertura de fissuras nas rochas. Também na recuperação de petróleo residual, a injeção destes biopolímeros nos poços aumenta o fluxo de óleo bruto, pois aumenta a viscosidade do meio aquoso, melhorando assim o deslocamento do óleo[24].

Considerando-se as inúmeras aplicações, importações e a demanda crescente de galactomananas no país, torna-se importante a busca destes polissacarídeos em fontes nativas. Neste aspecto, a Mimosa scabrella é uma espécie com grandes potencialidades.

1.6. MIMOSA SCABRELLA

A Mimosa scabrella é uma leguminosa da sub-família Mimosoideae, tribo Mimoseae, popularmente conhecida como bracatinga, bracaatinga, bracatinho, abaracaatinga, paracaatinga, bracatinga preta, bracatinga-branca, bracatinga vermelha e bracatinga argentina. Estas três últimas podem ser consideradas como três variedades diferentes, normalmente reconhecidas pelos produtores. A bracatinga branca apresenta sementes lisas, madeira clara e é a mais conhecida. A vermelha, também possue sementes lisas mas a madeira é avermelhada e mais pesada. A bracatinga argentina possue sementes ásperas, crescimento mais rápido e maior rendimento em madeira[155,156,86].

A Mimosa scabrella é nativa do planalto Sul brasileiro , presente em 195 municípios compreendidos nas regiões do Sul do Estado de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Norte do Rio Grande do Sul. Esta área estende-se desde a latitude de 23°50'S até 29°40'S e longitude 48°30'W até 53°50'W [158] (Figura seguinte) :

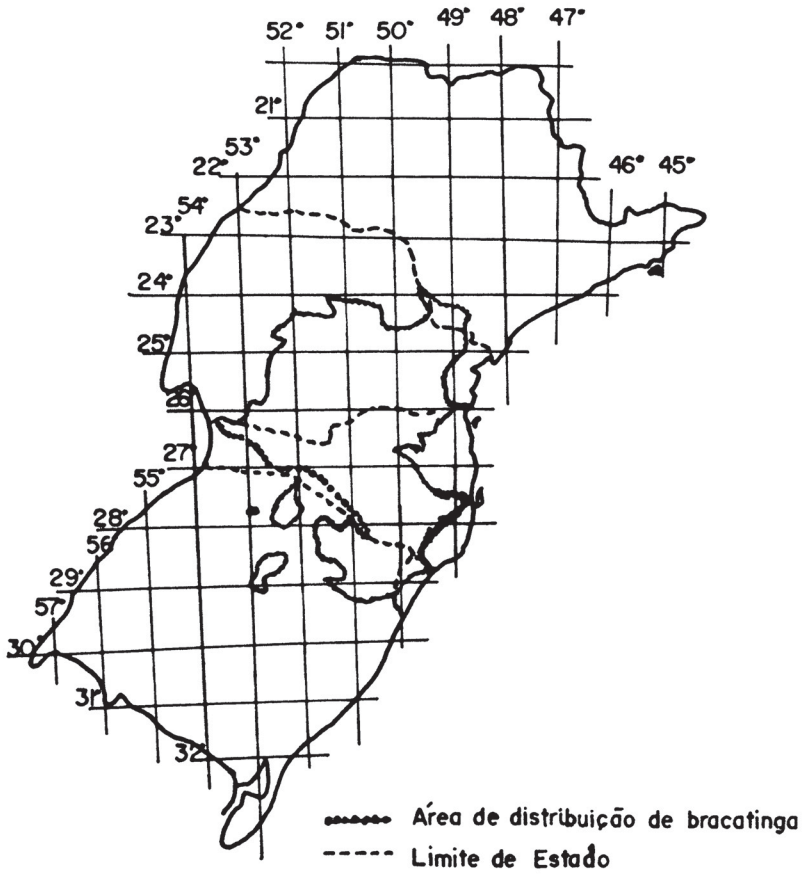


Figura 7

§ Coordenadas geográficas - Área de ocorrência natural de bracatinga[158].

No Paraná, pode formar associações com o pinheiro (Araucá

ria angustifolia), não atingindo as florestas pluviais, tropicais e sub-tropicais do Norte e Oeste do Estado, assim como inexiste na Floresta Pluvial Atlântica[86].

Os polissacarídeos de caule de Mimosa scabrella vem sendo estudados pelo grupo de CORRÊA e REICHER há muitos anos[25,26,27,43,150,151], tendo sido isolada, inicialmente, a hemicelulose A, uma (4-O-metil glucurono)-xilana[25]. As análises desse polissacarídeo álcali-solúvel indicaram uma estrutura com unidades β-D-(1→4)-xilopiranose, com ramificações de ácido 4-O-metil-D-glucurônico ligados na posição 2. Os oligossacarídeos obtidos por hidrólises ácida e enzimática da hemicelulose A, também foram estudados[53].

Os principais componentes da hemicelulose B, uma (4-O-metil glucurono)-xilana, uma glucomanana e, em menor proporção, uma arabinoglucuronoxilana ramificada, foram isolados e analisados estruturalmente.

Uma hemicelulose com estrutura semelhante a hemicelulose A foi obtida do caule delignificado por extração com dimetil sulfóxido, tratando-se de uma xilana acetilada, contendo xilose, ácido 4-O-metil-glucurônico e grupos O-acetílicos nas proporções molares de 59,9:6,5:33, respectivamente[150], além de 6 % de lignina. Usando-se o método de BOUVENG[18], modicado por CORRÊA[26] et alii , os grupos O-acetílicos na xilana nativa foram localizados, estando distribuídos em proporções aproximadamente iguais entre C-2 e C-3 das unidades D-xilopiranose (14 e 16 % respectivamente), havendo 5% de unidades di-acetiladas e 65% não

substituídas por grupos O-acetílicos[150].

Estudos posteriores indicaram que os grupos O-acetílicos estão distribuídos irregularmente ao longo da cadeia da xilana. As interações da xilana com a lignina foram evidenciadas, podendo ser do tipo eter[49] ou ester[27].

A bracatinga tem crescimento rápido e extraordinária capacidade de regeneração natural, com florescimento a partir de oito meses de idade, em média com árvores de três metros de altura[86].

No Paraná a bracatinga floresce nos meses de maio a agosto, em Santa Catarina de julho a setembro e no Rio Grande do Sul de agosto a setembro.

A frutificação ocorre no verão, de novembro a janeiro no Paraná, sendo que em Santa Catarina e Rio Grande do Sul nos meses de dezembro a março[86,14,156]. O fruto é um lomento oblongo-linear, achatado, sessil, obtuso, mucronato, levemente toruloso com articulações rombóides ou quase retangulares, caducas e deiscentes, de 1,7-4,8 por 0,5-0,9 cm de comprimento e largura. As sementes são ovais achatadas, duras, escuras, de 2-6 mm com linha fissural e albumem vítreo, não cavernose, cotiledones esverdeados. Estas sementes apresentam dormência devido a impermeabilidade do tegumento (casca) à água. Esta dormência deve ser superada para ocorrer a germinação. Para a quebra de dormência recomenda-se a imersão das sementes em água aquecida a 80-96°, deixando-as em repouso na mesma água, com resfriamento gradual até atingir a temperatura ambiente por 18 horas (85,2% de germinação),

ou imersão em ácido sulfúrico concentrado de 1 a 4 minutos (86% de germinação)[13]. O início efetivo de produção de sementes ocorre a partir dos três anos de idade.

A relação fruto semente, pode ser analisada conforme a Tabela seguinte:

TABELA II

§ RELAÇÃO FRUTO/SEMENTE, PESO DE 1.000 SEMENTES E NÚMEROS DE SEMENTES/KG DE BRACATINGA[14].

Espécie	Localidade	Relação Fruto/ Semente	Peso de Mil Sementes (g)	Nº de Sementes/Kg
Bracatinga	Colombo, PR	15:8:1*	12,5	80.000
	Gal Carneiro, PR	6,7:1**	15,5	64.500
	Castanheira, SC	3,5:1**	17,2	58.000
	Irani, SC	2,5:1**	16,0	62.500

Fonte: Laboratório de sementes URPFCS

* Coleta na árvore de ramos e frutos

** Coleta no chão = vibração manual na árvore e coleta de vagens.

FONSECA[51], em 1982, constatou que o peso, tamanho e porcentagem de germinação de sementes variam em função da localização e procedência, aumentando com o acréscimo da latitude.

STURION e CARNEIRO[173] observaram que o tamanho das sementes afeta o crescimento das mudas e que as sementes procedentes de

Caçador (Santa Catarina), de 3,5 mm, desenvolveram mudas de ótima qualidade

A produção de sementes de bracatinga é anual e abundante, sua colheita pode ser realizada diretamente das árvores após vibração ou em árvores abatidas nos períodos de novembro a janeiro[14].

GRAÇA et alii[65,66,67] analisaram parâmetros de receita, custos e produtividade de 105 produtores de bracatinga no Paraná, pelo sistema tradicional, e concluiu que 7 anos seria a idade econômica ótima (bem como de máxima produção biológica) para o abate desta espécie, sendo estes dados concordantes com a intuição dos produtores

A formação de uma área de produção de sementes de bracatinga pode ser feita a partir de um povoamento de regeneração natural de cinco anos que chega a apresentar cerca de 6.000 árvores por hectare. A produção média de sementes por árvore é de 900 g, e para coleta de 1.000 kg de sementes serão necessários 3,4 a 4,0 hectares[14].

CAMPOS et alii[21] sugeriram que para se aumentar a produtividade, tanto plantio como debastes em bracatingais tradicionais deveriam completar uma população de 3.000-3.500 árvores por hectare.

A crescente demanda de lenha, principlamente no Estado do Paraná, tem estimulado não só a entrada de novos produtores de bracatinga no mercado como a ampliação dos bracatingais já existentes.

Os bracatingais tradicionalmente são regenerados através da escarificação térmica das sementes, ou seja, através do fogo. No sentido de orientar os produtores de bracatinga, GRAÇA et alii[66,67] sugeriram culturas intercalares com milho e feijão, bem como inclusão da apicultura. Em vista do crescimento rápido[48], resistência a geadas e grande poder de adaptação aos mais variados ambientes[92,125], em solos de baixa fertilidade, ativando a vida microbiana pela adição de grande quantidade de nitrogênio ao solo, o reflorestamento da Mimosa scabrella é uma atividade pouco dispendiosa.

A bracatinga é também recomendada para a implantação de florestas em solos alterados pela mineração de xisto[125,167], na estabilização de áreas marginais e reservatórios hidroelétricos[152].

MATTOS e MATTOS[107] fizeram referência ao uso desta espécie como forrageira, devido ao alto teor em nutrientes contidos na folha.

A Mimosa scabrella projeta-se no mercado da madeira, como fonte energética, na secagem de grãos, sementes agrícolas, erva-mate e fumo, em olarias, panificadoras, cerâmicas e caldeiras de diferentes indústrias[67], na fabricação de aglomerados e celulose[10] como matéria-prima para produção de coque e carvão[140] vege-

tal, na indústria moveleira e na construção civil.

Aliado a este mercado consumidor seguro, tem-se como vantagens adicionais o fato de seu manejo ser simples, pouco oneroso e possuir um ciclo curto e produtivo.

O cultivo tradicional das florestas de bracatinga, desenvolvido, principalmente nos municípios limítrofes com Curitiba PR, tem tido importante participação nas atividades de milhares de pequenos e médios agricultores. Inexiste uma quantificação exata da superfície ocupada por bracatingais no Sul do País, mas esta encontra-se em expansão, a julgar pelo aumento da demanda de sementes distribuidas anualmente pelo fomento estatal e privado.

Na Região Metropolitana de Curitiba em pesquisa efetuada pelo Governo do Estado do Paraná (1985) determinou-se a existência de 45 mil hectares de bracatingais com mais de 3 anos que fornecem 90% da lenha consumida nesta região[7,39].

Em estudo realizado pela Secretaria de Estado da Agricultura em 1980 constatou-se que as áreas de floresta nativas no Estado do Paraná estão reduzidas a 5,1%, cerca de 1.031.288 hectares[138,139].

Mediante a situação de destruição crescente da flora e, consequentemente, da fauna, em 1987 estabeleceu-se um Programa de Desenvolvimento Florestal Integrado, sob coordenação do Governo do Estado do Paraná, juntamente com os órgãos ACARPA/EMATER-PR, ITCF e IAPAR e um convênio BRASIL/PARANÁ-FRANÇA/FAO, tendo por ob

jetivos a preservação, conservação e produção florestal. Incluído neste programa, dentro do projeto "Energia", foram coletados no ano de 1988, 7.750 kg de sementes de bracatinga nas regiões de União da Vitória, Francisco Beltrão, Irati, Guarapuava, Pato Branco, Ponta Grossa e Curitiba (Região Metropolitana) para redistribuição e produção de novas áreas florestais. Existe ainda uma previsão de coleta de 14.000 kg de sementes de bracatinga nas regiões de União da Vitória, Irati, Curitiba, Guarapuava, Pato Branco e Ponta Grossa durante o biênio 88/89.

O projeto "Energia" pretende ainda colher 60.000 Kg de sementes de bracatinga para o reflorestamento de uma área de 90.000 hectares entre 1988-1993, considerando que o Paraná possue uma área de 2.447.039 hectares efetivamente disponíveis para este fim [137].

2. OBJETIVOS

Considerando os fatos expostos, a presente tese tem por objetivo a análise da estruturá química e propriedades reológicas da galactomanana obtida de sementes de Mimosa scabrella, de acordo com os seguintes itens:

1. Extração exaustiva e rendimentos dos polissacarídeos presentes na semente, a diferentes temperaturas.

2. Purificação da galactomanana.

3. Determinação da rotação ótica, homogeneidade e peso molecular da galactomanana.

4. Análise estrutural da galactomanana por métodos químicos e por espectroscopia de ressonância nuclear magnética (^{13}C n.m.r.).

5. Distribuição das unidades de D-galactose no polímero.

6. Análise do comportamento reológico do polímero, em termos de viscosidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MÉTODOS GERAIS

As rotações óticas foram medidas em polarímetros Perkin-Elmer modelo 141 e polarímetro automático ACATEC modelo PDA 8.200, a 25°, utilizando-se água como solvente e célula de 1 dm.

As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório à vácuo, a temperaturas abaixo de 50°.

As determinações de pH foram realizadas a 25° em aparelho Ionalyser Orion research/Analog pHmeter modelo 399.

Os espectros de infra-vermelho foram obtidos em espectrofotômetro Beckman Acculab T.M. 10, sendo que as amostras solúveis em $CHCl_3$ foram aplicadas sobre células de NaCl e as insolúveis analisadas sob a forma de discos de KBr.

Os espectros de ultra-violetas foram realizados em espectrofotômetro Intralab UV-Visível modelo DMS-80.

As determinações espectrofotométricas para a região de visível foram realizadas em aparelho Coleman Junior, modelo 6A.

As soluções foram liofilizadas em aparelho Virtis, modelo 10-15 MR-BA.

A umidade foi determinada em estufa a 100° e as cinzas em mufla a 650/700° [168].

As análises cromatográficas em papel (c.p.) foram realizadas pela técnica ascendente, utilizando-se papel Whatman nº 1, com os seguintes sistemas de solventes:

a: Benzeno-n-butanol-piridina-água (1:5:3:3 v/v, fase superior);

b: Acetato de etila-ácido acético-água (3:1:1 v/v);

c: Acetato de etila-piridina-água (2:1:2 v/v);

d: Acetato de etila-piridina-água (10:4:3 v/v);

Os cromatogramas foram visualizados com nitrato de prata alcalino[183].

As análises cromatográficas em camada delgada (t.l.c) foram realizadas em placas de sílica gel Merck (20 x 20 cm), empregando-se os seguintes sistemas de solventes e visualizadores, respectivamente:

a: n-Butanol-acetona-tampão fosfato pH 5.0 (4:5:2 v/v) em placa tamponada no mesmo tampão; fosfato de anilina ;

b: Solução aquosa de fenol a 75% (v/v) ; ninidrina a 0,1% em acetona (p/v);

c: Acetato de etila-ácido acético-água (3:1:1 v/v); orcinol .

As cromatografias líquido-gasosas (g.l.c.) foram realiza-

das em cromatógrafo Varian, modelo 2440, com detetor de ionização de chama, utilizando-se nitrogênio como gás de arraste (40,0 ml/min) em coluna de 3% de OV-225 sobre gás Chrom Q de 100 -200 mesh em tubo de aço inoxidável 200 x 0,15 cm (d.i.) com detector a 240° e injetor a 200°. As temperaturas de operação da coluna foram 190° para os acetatos de alditois e 165° para os acetatos de alditois parcialmente metilados. Os tempos de retenção são relativos ao 1,5-di-O-acetil 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol. As determinações quantitativas dos produtos analisados por g.l.c. foram calculados por triangulação [174].

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (g.l.c.-m.s.) dos acetatos de alditois parcialmente metilados foi realizado no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em espectrômetro Hewlett Packard, modelo 5987A, com unidade CG/EM/C, equipado com coluna capilar (25 m x 0,3 mm d.i.) revestida com SE-54. Os espectros foram obtidos por impacto de eletrons a cada 2 segundos, a 70 eV, desde massa 40 até 400. Utilizou-se hidrogênio como gás de arraste a velocidade de 50 cm/s. As áreas dos picos foram obtidas por integração automática.

As análises de ressonância nuclear magnética de carbono ^{13}(^{13}C n.m.r.) foram realizadas no National Research Council, Canada, em espectrômetro Bruker AM-500 WB incorporado ao transformador de Fourier. Os polissacarídeos solubilizados em D_2O (3 ml) foram colocados em tubos de 20 cm de comprimento x 10 mm de diâmetro. Os parâmetros espectrais foram:

"spectral width" 25.000 Hz, "aquisition time" 0,328 s e "pulse width" 20 μs. Os deslocamentos químicos foram expressos em (p.p.m.), relativos à ressonância de Me_4Si (TMS), determinada em experimento separado. Os espectros foram obtidos em 125,76 MHz, a 47°.

As dosagens de carboidrato total foram realizadas pelo método do fenol ácido sulfúrico[44] a 490 nm, utilizando-se como padrão solução de D-glucose a 40 μg/ml; açúcares redutores foram determinados pelo método de SOMOGYI[175] e NELSON[132]. A determinação quantitativa de proteínas foi realizada com o reagente de FOLIN-CIOCALTEAU, segundo método de LOWRY et alii[103], a 660 nm, utilizando-se como padrão albumina bovina a 10 μg/ml.

3.1.1. HIDRÓLISES ÁCIDAS TOTAIS

As hidrólises ácidas foram realizadas em tubo Kimax nas seguintes condições:

a: Ácido trifluoracético (TFA) 1,0 M, durante 5 horas em banho de água fervente ;

b: Ácido sulfúrico a 72%, a frio durante 1 hora (pré-hidrólise) seguido de diluição a 8% e aquecimento a 100° durante 5 horas;

c: Ácido clorídrico (HCl) 6,0 M, por 18 horas em estufa a 100-105°.

Os agentes catalizadores (ácido trifluoracético e clorídrico) foram removidos por sucessivas evaporações a vácuo. O agente catalizador (ácido sulfúrico) foi neutralizado com carbonato de bário e o precipitado formado eliminado por filtração.

3.1.2. REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DOS PRODUTOS DAS HIDRÓLISES ÁCIDAS

Os monossacarídeos foram reduzidos com boroidreto de sódio[163], a temperatura ambiente por 16 horas. O agente catalizador ($NaBH_4$) foi destruido por ácido acético, os ions Na^+ removidos por resina Lewatit S-100, forma H^+, e o ácido bórico foi eliminado por co-destilação com metanol, na forma de ester volátil borato de trimetila. Os alditois foram então submetidos à acetilação com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v) a temperatura ambiente por 16 horas, ou a 100-105° por 1 hora, quando o processo foi interrompido por adição de gelo moido.

Os acetatos de alditois foram extraídos com clorofórmio e a piridina residual foi eliminada da preparação por tratamentos sucessivos com $CuSO_4$ 5%. A fase clorofórmica foi lavada com água destilada e evaporada. Os acetatos de alditois foram analisados por g.l.c., nas condições descritas anteriormente.

3.2. OBTENÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de Mimosa scabrella foram adquiridas na Honjo

S.A. Comércio de produtos agropecuários - Curitiba/PR. São provenientes de povoamentos naturais, localizados em Colombo-PR, onde foram coletadas durante o período de novembro-janeiro de 1986.

As sementes (300 g) foram trituradas em moinho Wiley, utilizando-se peneiras de 40 e 20 mesh, sucessivamente.

3.3. OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.3.1. EXTRAÇÃO COM BENZENO ETANOL

As sementes trituradas (136 g) foram extraídas em Soxhlet, com a mistura de benzeno-etanol (2:1 v/v) durante 14 horas. O extrato resultante foi reservado para estudo posterior e o resíduo submetido à extração aquosa.

3.3.2. EXTRAÇÃO AQUOSA

O resíduo obtido do tratamento com benzeno-etanol (30 g) foi submetido à extração com água (800 ml), a 4^{o}, sob agitação durante 24 horas e filtrado. O procedimento foi repetido mais duas vezes.

Os extratos foram reunidos, concentrados até 900 ml, precipitados com três volumes de etanol 95% e centrifugados.

O precipitado, Fração I, foi lavado sequencialmente com

etanol e acetona. Rendimento: 9 g; 30%.

O resíduo resultante da extração a 4° foi, então, submetido a extrações a 25° e 60°, três vezes cada, fornecendo a Fração II (0,23 g; 0,8%) e Fração III (0,02 g; 0,07%), respectivamente.

O sobrenadante etanólico proveniente da precipitação do polissacarídeo extraído a 4° foi evaporado, o resíduo dissolvido em água (0,4 g de carboidrato total) e aplicado em colina de carvão celite[187], seguindo-se eluição com água, etanol 5% e etanol 10%, sucessivamente. Os eluatos foram monitorados para a presença de açúcar pela reação de fenol-ácido sulfúrico e proteína pela absorção a 280 nm e reservados para estudos estruturais que serão realizados oportunamente.

3.3.3. EXTRAÇÃO ALCALINA

O resíduo proveniente da extração aquosa a 60° foi submetido à extração com NaOH 2 M, a temperatura ambiente, pelo método de WHISTLER e FEATHER[189]. A hemicelulose A foi precipitada pela acidificação do meio à pH 5,0, com ácido acético a 50%, fornecendo 0,75 g (2,5%) de produto. A hemicelulose B foi precipitada da solução com etanol, fornecendo 1,2 g de produto (4%).

3.4. DESPROTEINIZAÇÃO DA FRAÇÃO I

A solução aquosa do polissacarídeo (300 ml, 10 mg/ml) foi desproteinizada com a mistura de clorofórmio-butanol (5:1 v/v) , sob agitação, durante 12 horas, a temperatura ambiente. Após centrifugação, a proteína desnaturada formada na interfase foi removida [171]. O processo foi repetido 5 vezes.

A fração polissacarídica (250 ml) foi precipitada com 3 volumes de etanol e lavada sucessivamente com etanol e acetona.

A Fração I foi analisada em espectrômetro u.v. antes e após o tratamento de Sevag.

3.5. COMPLEXAÇÃO COM COBRE

Uma aliquota do polissacarídeo desproteinizado (0,5 g)foi solubilizada em H_2O (20 ml) e igual volume de solução de FEHLING[89] foi adicionada. Houve a formação de um precipitado que, após centrifugação, diálise e novamente centrifugado, foi lavado com água destilada e tratado com ácido clorídrico M para a decomposição do complexo com o cobre. Em seguida o polissacarídeo foi reprecipitado com excesso de etanol.

O sobrenadante de FEHLING apresentou reação de fenol sulfúrico negativa.

3.6. ANÁLISE DAS FRAÇÕES POLISSACARÍDICAS

A Fração I, antes e após SEVAG, frações II e III e hemiceluloses A e B foram hidrolisadas com TFA 1 M, reduzidas, acetiladas e analisadas por g.l.c.

3.7. CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO EM COLUNA

3.7.1. FILTRAÇÃO EM SEPHADEX G-100 DA FRAÇÃO I DESPROTEINIZADA

O polissacarídeo (10 mg/ml, 0,5 ml) foi aplicado no topo de uma coluna de vidro (24 x 1,8 cm), contendo Sephadex G-100 e eluido com água destilada (30 ml/h). Frações de 1 ml foram coletadas à temperatura ambiente, com coletor automático de frações GM Instrument Company/Microflex e monitoradas para carboidratos (490 nm) e para proteínas (280 nm).

A coluna foi previamente calibrada com Blue Dextran (P.M. 2.10^6). O experimento foi repetido, usando-se uréia 7 M como eluente. Neste caso a coluna foi pre-equilibrada com uréia 7 M e o fluxo foi de 20 ml/h

3.7.2. FILTRAÇÃO EM BIO-GEL A-1,5m

O polissacarídeo desproteinizado (10 mg/ml, 0,3 ml) foi

aplicado no topo de uma coluna de vidro (22 x 1,3 cm), contendo Bio-Gel A-1.5 m e eluido com água destilada (30 ml/h). Frações de 1 ml foram coletadas e monitoradas a 490 e 280 nm. A coluna foi calibrada com Blue Dextran. O experimento foi repetido utilizando-se, uréia 7 M como eluente (fluxo 22 ml/h)

3.7.3. FILTRAÇÃO EM SEPHAROSE CL-4B

O polissacarídeo desproteinizado (2 mg/ml) foi aplicado no topo de uma coluna de vidro (82 x 2,0 cm) contendo Sepharose CL-4B e eluido com água destilada (fluxo 30 ml/h). Frações de 1,5 ml foram coletadas e monitoradas em 490 e 280 nm. O experimento foi repetido duas vezes utilizando-se uréia 7 M (26 ml/h) ou dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% em NaCl 0,1 N em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (40 ml/h), como eluentes. Em cada experimento a coluna foi calibrada com Blue Dextran.

3.8. HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DO POLISSACARÍDEO.

O polissacarídeo desproteinizado (650 mg) foi dissolvido em ácido ortofosfórico (85% p/p; 50 ml) a temperatura ambiente, sob agitação, durante quatro horas e, em seguida, deixado por 4 semanas a temperatura de 4^{o}. Após este período, a solução resultan

te foi dialisada em água corrente por 48 horas e liofilizada. O produto resultante foi analisado por ^{13}C-n.m.r.,polarimetria e após hidrólise a composição monossacarídica foi analisada por g.l.c., na forma de acetato de alditol.

3.9. HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS PARCIAIS

O polissacarídeo, Fração I (200 mg),foi dissolvido em água (18 ml) e incubado com 8 ml de tampão acetato 0,2 M,pH 5,0 e 4 ml de uma solução de celulase Bioferm (20 mg/ml). Ao mesmo procedimento foi submetida uma aliquota com a enzima de suco digestivo de caramujo Megalobulimus paranaguensis [52] . Paralelamente fez-se os controles com enzima ou substrato. O experimento foi realizado a 40°, durante duas horas.

Aliquotas de 5 µl foram retiradas nos tempos zero, 5, 15, 35, 45, 60, 90 e 120 minutos; o poder redutor foi determinado pelo método de SOMOGYI-NELSON e as aliquotas foram analisadas por t.l.c.

No final do período de incubação os sistemas enzimáticos foram aquecidos a 100° e tratados com 3 volumes de etanol. Os precipitados colhidos por centrifugação foram redissolvidos em água, desproteinizados pelo método de SEVAG (5x) e liofilizados. Amostras destes produtos de hidrólise enzimática (15 mg) foram hidrolisados com TFA e analisados por g.l.c., na forma de acetatos de alditois.

3.10. ANÁLISE DE METILAÇÃO

O polissacarídeo desproteinizado foi, inicialmente, metilado pelo método de HAWORTH[78]. A amostra de polissacarídeo(50 mg) foi dissolvida em NaOH a 40 % (8 ml) e tratada com $NaBH_4$ (10 mg). Em seguida dimetil sulfato de sódio(4 ml) foi adicionado, gota a gota, durante o período de 8 horas, ao final do qual novas porções dos mesmos reagentes foram adicionados nas mesmas condições. O processo foi repetido por mais uma vez.

O polissacarídeo parcialmente metilado foi dissolvido em N, N dimetilformamida (20 ml) e a esta solução adicionaram-se iodeto de metila (20 ml) e, imediatamente após, óxido de prata (Ag_2O; 0,1 g), de acordo com método de PURDIE, modificado por KUNH et alii[96]. Durante quatro dias consecutivos foram adicionadas novas porções de Ag_2O (1 g por dia) mantendo-se o sistema sob agitação e na ausência de luz.

Após vinte e quatro horas da última adição, o material foi extraído com clorofórmico, filtrado sob vácuo, havendo a formação de uma emulsão, que foi secada, redissolvida em clorofórmio e lavada diversas vezes com água.

O polissacarídeo parcialmente metilado pelos métodos de HAWORTH (2 vezes) e KUHN foi permetilado pelo método de HAKOMORI[77] de acordo com o seguinte procedimento. Após secagem sob P_2O_5 e dissolução em 2 ml de dimetil sulfóxido, adicionou-se metil-sulfinil metídeo de sódio e o sistema reagente foi agitado a temperatura ambiente por um perío-

do de 20 horas. Após este período foi adicionado iodeto de metila (0,3 ml) e deixado em agitação por mais 6 horas, a temperatura ambiente. O processo foi interrompido pela adição de água, extração com clorofórmio e sucessivas lavagens com água.

O polissacarídeo O-permetilado foi analisado por espectroscopia de infra-vermelho. Uma aliquota (5 mg) do polissacarídeo O-permetilado foi hidrolisada, inicialmente com ácido sulfúrico 72% (0,5 ml), por 1 hora a temperatura ambiente, seguindo-se de adição de água (4 ml) à solução e aquecimento por mais 4 h a 100°. Após remoção do ácido por precipitação por $BaCO_3$ com $NaBH_4$, o hidrolisado acetilado e analisado por g.l.c.-m.s.

3.11. DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES D-GALACTOPIRANOSIL NAS CADEIAS LATERAIS DO POLISSACARÍDEO.

Ao polissacarídeo desproteinizado e seco (80,5 mg), foram adicionados 461 mg de N-iodo sucinimida (NIS) e 6 ml de hexametil fosforamida (HMPA). Após 30 minutos em banho de gelo e sob agitação, adicionou-se trifenilfosfina em pequenas porções até completar 540 mg, sendo a mistura aquecida gradativamente a 95°C e mantida nestas condições sob agitação durante 24 horas. Em seguida foi adicionado 1,5 g de p-tolil sulfinato de sódio, e a mistura foi mantida a temperatura de 110° durante mais 24 horas. O derivado 6-deoxi-6-p-tolil sulfonila (92,4 mg) obtido foi dialisado em água corrente, precipitado com 3 volumes de etanol e lavado sucessivamente com etanol e acetona.Em seguida foi submetido a uma de

gradação alcalina por β-eliminação simultânea com a metilação segundo o método de HAKAMORI e o produto O-metilado foi hidrolisado, reduzido, acetilado e analisado por g.l.c.-m.s.

3.12. OXIDAÇÃO COM META PERIODATO DE SÓDIO.

3.12.1. DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE PERIODATO.

O polissacarídeo (60 mg) foi oxidado com solução de metaperiodato de sódio 0,05 M (20 ml) durante 128 horas, a 4°C, em ausência de luz[56]. Durante este período foram retiradas aliquotas de 1 ml para determinação do consumo de periodato, por titulação com solução padronizada de tiossulfato de sódio 0,1 N, usando-se solução de amido a 1% como indicador.

Para o cálculo do número de moles de periodato consumidos por mol de hexose anidra, empregou-se a seguinte fórmula:

$$X = \frac{(B-A) \cdot \text{volume total de solução oxidante} \cdot N_{Na_2S_2O_3} \cdot 162}{\text{ml de aliquota titulada} \cdot \text{mg de amostra}}$$

onde:

X = Número de moles de periodato consumidos por mol de hexose anidra.

B = Volume de solução de tiossulfato gasto para a titulação do branco.

A = Volume da solução de tiossulfato gasto para a titulação das aliquotas.

$N_{Na_2S_2O_3}$ = Normalidade da solução de tiossulfato de sódio, multiplicada pelo seu fator de correção.

162 = Peso molecular de hexose anidra.

Com o consumo de oxidante expresso em moles de meta-periodato de sódio por mol de hexose anidra, em diferentes intervalos de tempo, construiu-se um gráfico em que o valor real da quantidade requerida para a oxidação completa do polissacarídeo, foi obtido pela estrapolação para o tempo zero. O mesmo procedimento foi realizado a 25°.

Este experimento foi, ainda, repetido a temperatura de 25°, utilizando-se tampão fosfato (SORENSEN), pH 7,0, com concentração de $NaIO_4$ duas vezes maior, durante 180 horas[76,56].

3.12.2. DEGRADAÇÃO DE SMITH DO POLISSACARÍDEO.

O polissacarídeo desproteinizado foi oxidado com meta-periodato de sódio, como descrito no item anterior, a 4 e 25°. O excesso de agente oxidante foi decomposto pela adição de etileno gli

col (2 ml) e, após 1 hora, levado à diálise contra água corrente por 18 horas. Após diálise a solução foi tratada com boroidreto de sódio (~ 10 mg) durante 12 horas a temperatura ambiente, O excesso de agente redutor foi eliminado por diálise contra água corrente durante 12 horas.

A fração não dialisável foi evaporada à secura e submetida à hidrólise com TFA 1 M (1 ml) por 5 horas, a temperatura de 100^{o}, reduzida com $NaBH_4$, acetilada e analisada por g.l.c.

3.12.3. DEGRADAÇÃO DE SMITH CONTROLADA.

O polissacarídeo desproteinizado (100 mg) foi oxidado com meta-periodato de sódio durante 70 horas, reduzido e dialisado, conforme descrito no item anterior.

A fração não dialisável foi concentrada e submetida a hidrólise suave com ácido sulfúrico 0,05 N, em pH 2,0, sob refluxo durante 40 minutos.

O produto da hidrólise parcial foi deionisado, sucessivamente, com resinas Amberlite forma OH^- e Lewatit S-100 forma H^+, concentrado e analisado polarimetricamente.

3.13. ACETÓLISE PARCIAL DO POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo (500 mg) foi dissolvido em uma mistura

contendo ácido acético glacial (20 ml), anidrido acético (20 ml) e ácido sulfúrico 98% (2 ml). Após 10 minutos em banho de gelo , a mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 5 dias e centrifugada.

O sobrendante foi ressuspenso em água destilada e permaneceu em pH 5,5 à temperatura de 4°C, por 18 horas. A mistura gelada foi filtrada e o precipitado dissolvido em clorofórmio. A solução clorofórmica foi tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O clorofórmio foi evaporado e ao produto seco foi adicionado metanol (7 ml) e metóxido de sódio (1 meq).

O precipitado formado após desacetilação foi lavado com metanol e dissolvido em água, tratado com resina Lewatit S-100 forma H^+ e liofilizada[85,99].

3.14. TRATAMENTO DO POLISSACARÍDEO COM GALACTOSE OXIDASE

A fração I desproteinizada (7 mg de açúcar total), foi hidrolisada com TFA (1 M, 5 h, 100°) e o excesso de ácido foi removido após sucessivas evaporações à vácuo. O hidrolisado foi deionizado em resina mista (MB-3, 20-50 mesh, forma H^+ e OH^-). O eluado aquoso foi utilizado inicialmente para dosagem do açúcar total (0,3 mg/ml) e, posteriormente, como substrato para a enzima.

A atividade da galactose oxidase, extracelular foi,determinada pela dosagem de peróxido de hidrogênio formado pelo méto-

do enzimático acoplado de AISAKA e TEREDA[1].

A decomposição da água oxigenada formada, em presença de peroxidase, neste método acopla oxidativamente a 4-aminoantipirina ao fenol, resultando num produto colorido, a quinoneína, que apresenta absorção máxima a 500 nm.

O sistema de incubação, em um volume de 3 ml, continha 45 µmoles de tampão fosfato, pH 7,0; 1,5 µmoles de 4-aminoantipirina; 21 µmoles de fenol; 20 unidades de peroxidase; 5 µl de enzima (4 µg de galactose oxidase extracelular com atividade específica de 3,30 unidades/mg e 100 µl de substrato).

A reação foi sempre iniciada pela adição de enzima. Após a incubação a 30° por 60 min., foi determinada a absorbância a 500 nm. A conversão das unidades de absorbância da amostra em µg D-galactose foi realizada pela reação direta do padrão de D-galactose. Todos os controles sem enzima e sem substrato foram efetuados na determinação da concentração de D-gal presente no ensaio, nas quais não foi observado o desenvolvimento de produto colorido.

3.15. VISCOSIDADE

As viscosidades foram determinadas em viscosímetro tipo Cannon Fenske Routine, com diâmetro interno do capilar de 0,54 mm (nº 75) e constante de aproximação (K) igual a 0,007864, imerso em

um banho termostático modelo FANFEM-UNITEMP.

As viscosidades relativas (η_r), que correspondem a relação entre a viscosidade da solução (η_{sol}) e a viscosidade do solvente puro (η_{solv}), foram determinadas para a solução da fração I a temperatura de 25°, com concentrações variando entre 0,04 é 2,0 g/l. Para determinar a viscosidade relativa, o tempo do fluxo da solução (t) e do solvente (t_o) foram cronometrados (tempo de escoamento da água destilada : 121 segundos).

3.15.1. VISCOSIDADE RELATIVA

Foram determinadas as variações das viscosidades relativas para solução aquosa de galactomanana de Mimosa scabrella, com concentração de 0,15 g/l, a diferentes temperaturas (20 a 70°), utilizando-se a seguinte equação:

$$\eta_r = \frac{\eta_{sol}}{\eta_{solv}} = \frac{t}{t_o}$$

3.15.2. VISCOSIDADE REDUZIDA

As viscosidades reduzidas (η_{red}), que compreende a relação entre a viscosidade específica e a concentração da solução , foram determinadas para soluções aquosas de galactomananas de Mi

mosa scabrella a diferentes concentrações e temperaturas, como descrito para viscosidade relativa, conforme a equação:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c}$$

3.15.3. VISCOSIDADE ESPECÍFICA.

As viscosidades específicas foram calculadas pela relação entre o aumento da viscosidade da solução (devido a presença do polímero) e a viscosidade do solvente puro (H_2O destilada), de acordo com:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{sol} - \eta_{solv}}{\eta_{solv}} = \eta_r - 1$$

3.15.4. VISCOSIDADE INTRÍNSICA.

A variação da viscosidade reduzida com a concentração (0,04 g/l à 2 g/l) em soluções poliméricas diluidas é dada pòr uma linha reta. A quantidade independente da concentração da solução é um valor limitante da viscosidade reduzida, ou seja, o valor da viscosidade para a concentração zero é denominada viscosidade intrínsica da solução, $[\eta]$, segundo a equação:

$$\left| \lim \frac{\eta_{sp}}{c} \right|_{c \to 0} \quad \text{(unidade ml/g ou dl/g)}$$

A viscosidade intrínsica para a solução aquosa de galactomanana de Mimosa scabrella foi obtida a 25°.

As viscosidades reduzidas (0,45 g/l) foram determinadas a diferentes pHs, na presença das seguintes substâncias (1 g/l a 25°):

- Ácido cítrico : pH entre 2,5 a 3,5
- Ácido fumárico : pH entre 2,5 a 3,5
- Ácido lático : pH entre 3,8 a 5,0
- Citrato de sódio: pH entre 6,0 a 6,9

3.15.5. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

O peso molecular da galactomanana de Mimosa scabrella foi determinada por viscosimetria de acordo com a Equação de MARK-KUHN-HOUWINK $[\eta] = K M^a$, onde K e a são constantes características do sistema polímero-solvente a uma dada temperatura e M o peso molecular do polímero a ser determinado.

Para o polissacarídeo em questão utilizou-se $K = 3,8.10^{-4}$ e $a = 0,723$, determinado previamente para galactomananas[179,157].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Mimosa scabrella (bracatinga) conhecida anteriormente como Mimosa bracatinga[150, 80], enquadra-se na seguinte classificação taxonômica:

XVIIª Divisão: Angiospermeae

Classe: Dicotyledoneae

Sub-classe: Archiclamydeae

Ordem: Rosales

Família: Leguminosae

Sub-família: Mimosoideae

Tribo: Mimoseae

Gênero: Mimosa

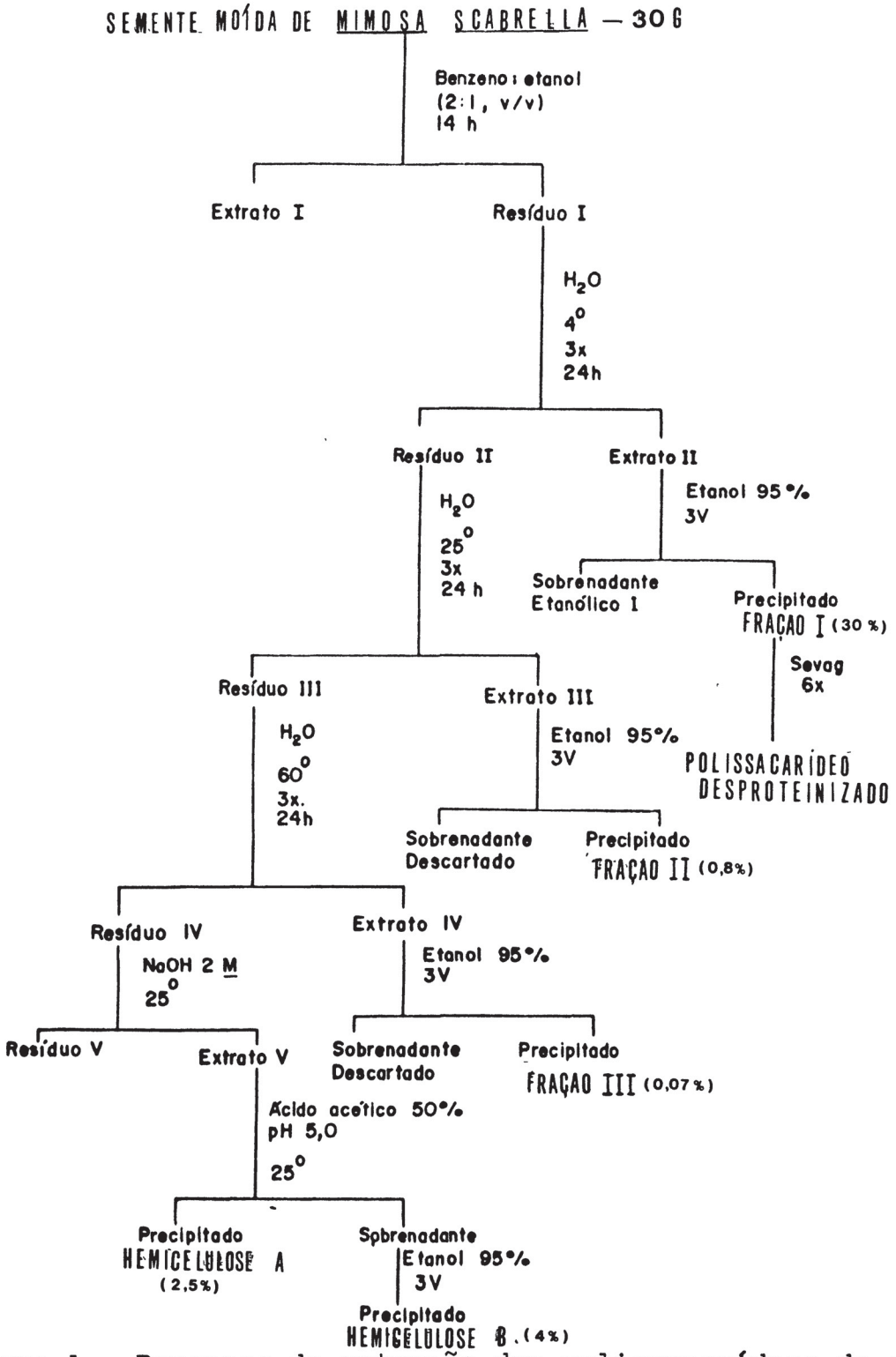
Espécie: Mimosa scabrella Benthan

Devido ao crescimento rápido e abundância desta espécie na região Sul do Brasil, em matas nativas e cultivadas, a mesma foi escolhida como fonte de matéria prima para o presente estudo. Cada árvore fornece anualmente, em média, 900 g de sementes, que foram utilizadas para a obtenção dos polissacarídeos.

4.1. OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As sementes foram moidas e o pó tratado com a mistura de benzeno-etanol a fim de eliminar lipídeos, ceras e pigmentos.

Após este tratamento, o resíduo foi extraído sequencialmente com água a 4°, 25° e 60° e com NaOH , de acordo com o Esquema I.



Esquema 1 - Processo de extração dos polissacarídeos de sementes de Mimosa scabrella.

A extração aquosa a 4° forneceu uma fração polissacarídica com rendimento aproximado de 30% (Fração I), seguindo-se de pequenas quantidades a 25° (0,8%; Fração II) e 60° (0,07%; Fração III). O resíduo das extrações aquosas foi tratado com NaOH e as hemiceluloses A e B obtidas de forma convencional[189].

A análise das frações está indicada na Tabela III. A fração principal (Fração I) contém 88 % de carboidratos, 6,3 % de proteína e 6,8 % de matéria inorgânica analisada como cinzas. A análise por g.l.c. indicou que os componentes monossacarídicos são manose(53%) e galactose(47%). As frações II e III contém galactose e manose tratando-se, portanto, também de galactomananas. Estas frações contém ainda xilose e arabinose, possivelmente originárias de componentes hemicelulósicos da parede celular. Esta possibilidade é reforçada pelo fato destes monossacarídeos serem os principais componentes das hemiceluloses A e B, que foram reservadas para estudos posteriores. A hemicelulose presente na Fração II justifica a rotação específica menos positiva da mesma.

A presença de pentoses em extratos aquosos foi observada em outras espécies de sementes de leguminosas como Indigofera tictoria linn[164] da tribo Galegeae, sub-família Faboidea, Cassia renigera[73], da tribo Cassieae e Gleditsia triacanthos[106, 104] da tribo Caesalpinieae, ambas da sub-família Caesalpinioideae.

A relação man:gal para as Frações I, II e III pode ser considerada igual a 1,1:1, indicando que se trata do mesmo polímero e que as galactomananas extraídas a 25° e 60° consistem

TABELA III

POLISSACARÍDEOS DE SEMENTES DE Mimosa scabrella, OBTIDOS POR EXTRAÇÕES AQUOSAS E ALCALINA.

Fração	Temperatura °C	Rendimento g%	$[\alpha]_D^{25}$	Proteína[a] g%	Composição Monossacarídica[b] - moles %					
					Man	Gal	Ara	Xyl	Glu	Rham
I	4	30.0	+53	6.3	53	47	-	-	-	-
II	25	0.8	+27	nd	37	35	19	19	-	-
III	60	0.07	nd	nd	19	19	42	19	-	-
Hemicelulose A	25	2.5	-40	nd	11	10	48	19	11	-
Hemicelulose B	25	4.0	-52	nd	-	-	52	45	-	3

a) Método de Lowry et alii[103]

b) Acetatos de alditois obtidos por g.l.c.

numa porção residual da Fração I. O pequeno rendimento destas duas frações favorece esta idéia.

Ao comparar a relação man:gal obtida para a galactomanana de Mimosa scabrella(~1:1) com diferentes espécies da tribo Mimoseae como Desmanthus illinoensis Mac e Leucaena glauca[79] cujas relações man:gal são 2,69:1 e 1,33:1, respectivamente, observou-se uma considerável dispersão neste índice.

O fato de não terem sido encontrados na literatura nenhuma espécie na sub-família Mimosoidea com relação man:gal igual a um, não indica um erro taxonômico. Isto pode representar uma tendência geral da variação na relação de man:gal da sub-família[38].

No entanto, foi encontrado proporção de man:gal ~ 1:1 para espécies da tribo Trifolieae, sub-família Faboideae, sempre com redimentos inferiores a 20%[38, 4, 84].

McCLEARY et alii[119] trabalhando com extratos neutros de sementes de leguminosas, concluiram que as galactomananas extraídas com água fria apresentam um conteúdo de galactose superior a 20%, sendo que aquelas que não podem ser extraídas nestas condições apresentam percentagens menores de galactose. Entretanto, galactomananas com relação de man:gal semelhantes requerem diferentes condições de extração, indicando que a eficiência das extrações não só depende do grau de substituição de galactose, mas também da sua distribuição, comprimento das cadeias laterais e do tempo envolvido na extração[38, 112].

A quantidade de galactomanana na semente total de Mimosa

scabrella (31%), enquadra-se dentre as espécies de elevado teor de galactomananas como a Gleditsia amorphoides[100] (20-30%), Ceratonia siliqua[115] (10-40%), ambas pertencentes a sub-família Caesalpinioideae, e Cyamopsis tetragonolobus (23 a 35%)[38], da sub-família Faboideae.

Convém ressaltar que nestas outras espécies citadas o rendimento refere-se ao endosperma, enquanto que o valor reportado para a galactomanana de bracatinga é em relação a semente total. As galactomananas de Ceratonia siliqua (alfarrobo) e Cyamopsis tetragonolobus (guar) são as utilizadas normalmente pela indústria.

4.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO I

A galactomanana foi tratada com solução de FEHLING, resultando na formação de um complexo de cobre insolúvel, não apresentando carboidratos no sobrenadante, indicando a ausência de outros polissacarídeos no meio. O complexo foi desfeito pelo tratamento com HCl e o polissacarídeo precipitado da solução pela adição de etanol. A composição monossacarídica do polissacarídeo purificado mostrou-se idêntica a do original.

A Fração I contém 6,3% de proteínas, cujo valor após o tratamento de desproteinização de SEVAG baixou para 2,5%. A porção removida provavelmente provém da coprecipitação das proteínas de

reserva do embrião durante o tratamento com etanol. A Fração I possuia uma rotação ótica de $+53^{o}$ e após purificação pelo método de SEVAG este valor passou a $+48^{o}$, possivelmente devido a remoção de proteína. Esta rotação específica é concordante com os valores descritos na literatura[191].

4.3. ESTUDO EM GEL FILTRAÇÃO DA GALACTOMANANA

Existe uma diversidade de critérios quanto a definição de homogeneidade - heterogeneidade e monodispersão - polidispersão para polissacarídeos.

Em galactomananas há a possibilidade de polidispersão com relação ao peso molecular e também pelas variações entre as relações de man:gal. Quando existem duas ou mais diferentes relações de man:gal, tratam-se de polissacarídeos heterogêneos.

A galactomanana desproteinizada foi analisada por cromatografia de gel permeação em colunas.

Inicialmente usou-se a coluna de Sephadex G-100, calibrada com Blue Dextran. Somente um pico foi obtido, no volume morto em eluição com água ou com uréia 7 M, em experimentos distintos. Os eluatos foram monitorados pela dosagem de açúcar total e pela absorção a 280 nm para proteínas (Figura 9).

Na cromatografia em Bio-Gel A-1,5 m houve a predominância de um pico simétrico no volume morto, nas eluições com água e

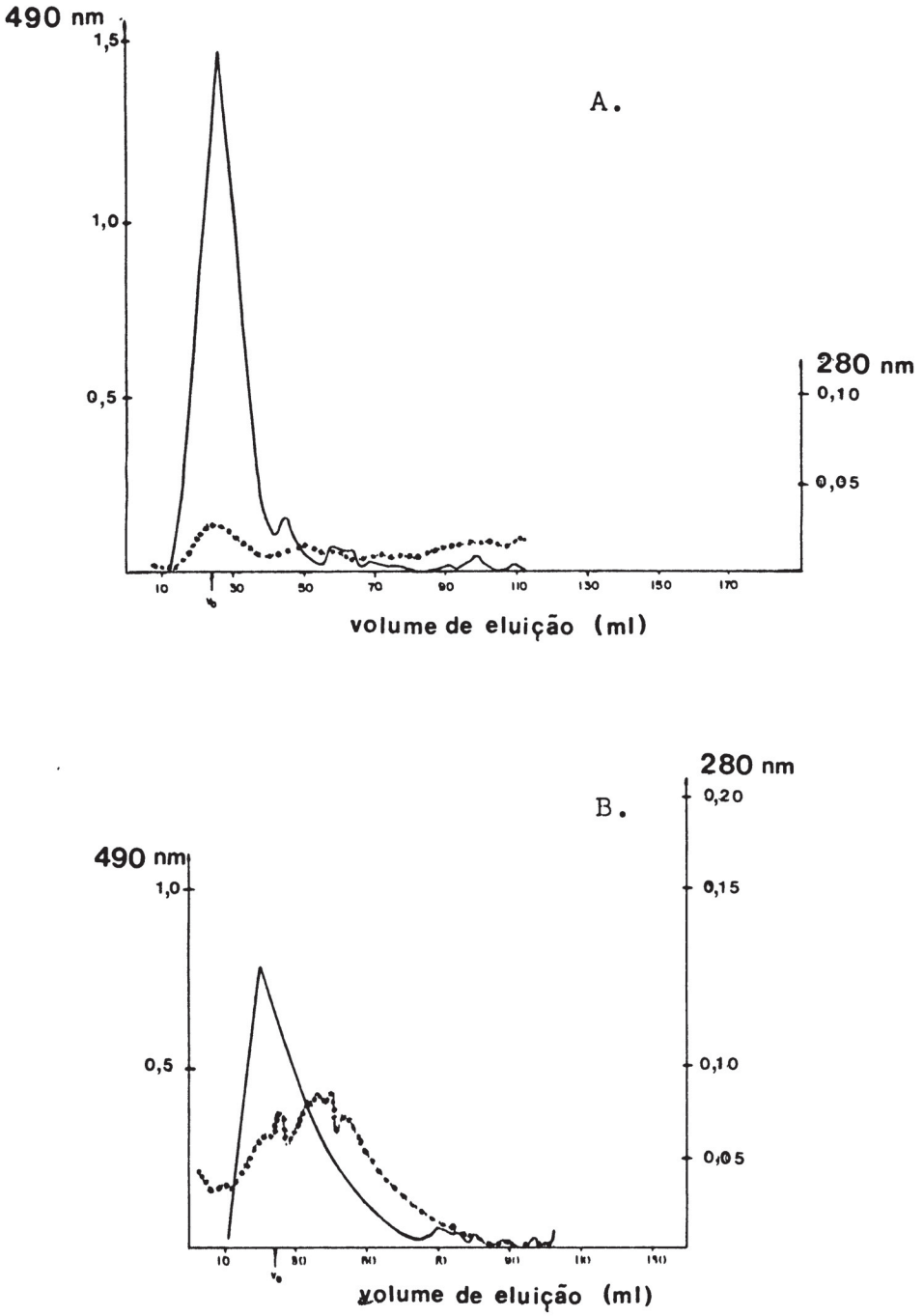


Figura 9 - Filtração em Sephadex G-100 da galactomanana de Mimosa scabrella (coluna 24 x 1,8 cm, d.i.). Eluentes:A) água; B) uréia 7 M. A_{490} (——) ; A_{280} (....) .

com uréia (Figura 10), indicando que o peso molecular é maior que $1,5.10^6$, pois este é o limite de exclusão do gel.

A galactomanana foi então gel permeada em uma coluna de Sepharose CL-4B e eluida com água, com uréia 7 M e com dodecil sulfato de sódio (SDS) (Figura 11). Em todos os casos o polissacarídeo foi eluido em um único pico principal, com volume de eluição semelhante ao do Blue Dextran. Como o limite de exclusão deste gel é 5.10^6 e o Blue Dextran foi incluido, pode-se sugerir que o peso molecular da galacmanana esteja entre 1,5 e 2.10^6. Este peso molecular é muito elevado e poderia ser causado por fortes interações intermoleculares.

O emprego de soluções altamente caotrópicas, também utilizadas na análise de pesos moleculares de proteoglicanas[19,29,75,124] como a uréia 7 M, tem como objetivo dissociar as estruturas compactadas e romper as pontes de hidrogênio inter ou intramoleculares. O mesmo efeito é causado pelo detergente dodecil sulfato de sódio, porém neste caso a concentração recomendada é 1%, o que poderia minimizar os efeitos da alta concentração de uréia.

Embora o uso de uréia ou SDS não tenha promovido nenhuma dissociação entre as moléculas da galactomanana, não fica descartada a possibilidade de agregação molecular, pois devido a alta viscosidade da galactomanana, mesmo em concentrações relativamente baixas, as interações secundárias são dificilmente rompidas.

SEN et alii[164] encontraram valor similar de peso molecular ($1,4-2,1.10^6$), por análise de cromatografia de gel permea-

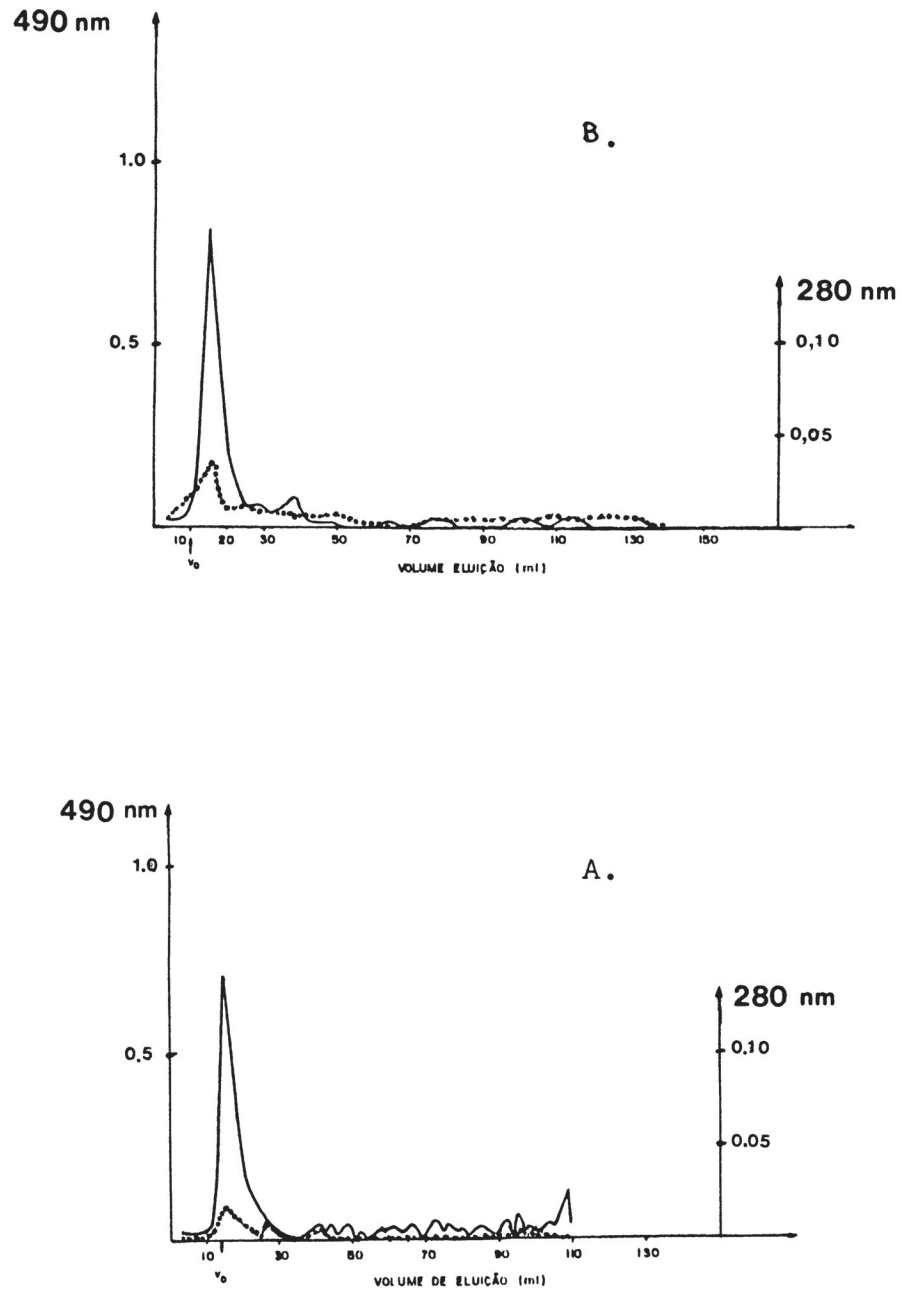


Figura 10 - Filtração em Bio-Gel A-1,5m da galactomanana de Mimosa scabrella (coluna 22 x 1,3 cm, d.i.). Eluentes: A) água; B) uréia 7 M. A_{490} (——); A_{280} (.....).

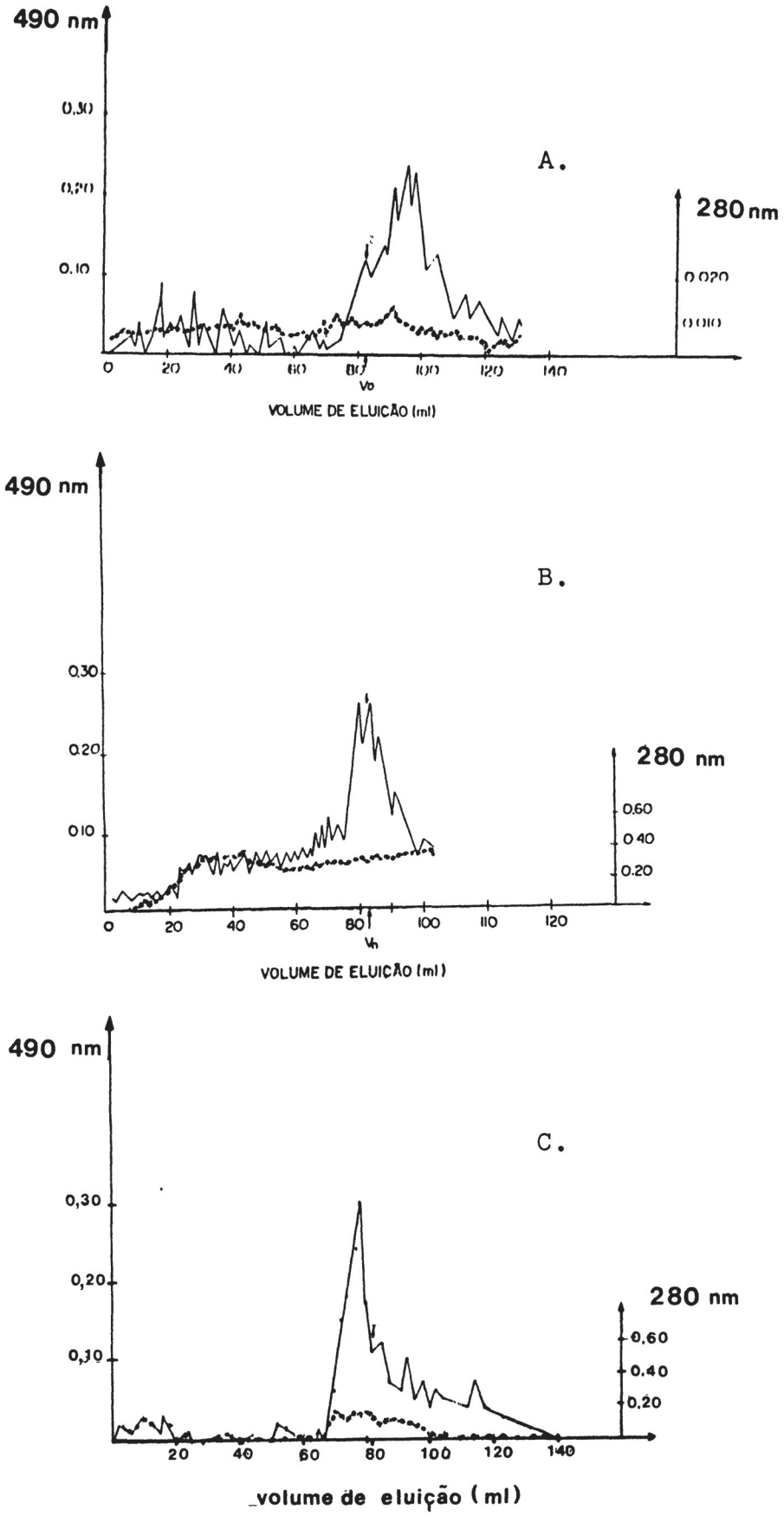


Figura 11- Filtração em Sepharose CL-4B da galactomanana de Mimosa scabrella (coluna 82 x 2,0 cm, d.i.). Eluentes: A) água; B) uréia 7 M; C) dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% em NaCl 0,1 N em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,5. A_{490} (——); A_{280} (·····).

ção em coluna de Sepharose CL-4B e eluição com água, para galactomanana de semente de Indigofera tictoria, sub-família Faboideae.

Os eluatos das colunas foram também monitoradas para detectar a presença de proteína. Apesar dos resultados mostrarem uma tendência de eluição concomitante para carboidrato e proteína , não são suficientes para sugerir ligação covalente. A pequena quantidade de proteína na fração eleva as dificuldades de esclarecer o problema que será reabordado oportunamente.

CEREZO et alii[106,108] e McCLEARY et alii[119] demonstraram que galactomananas de sementes de Gleditsia triacanthos, Medicago sativa, Ceratonia siliqua e Cyamopsis tetragonolobus apresentam entre 0,7 e 2,9% de proteína após purificação através da formação de complexos com cobre e gel permeação. A permanência de proteína indica que esta esteja associada covalentemente a galactomanana, porém os autores ainda não comprovaram este tipo de ligação.

4.4. ANÁLISE ESTRUTURAL DA GALACTOMANANA

A análise estrutural foi determinada por métodos clássicos, como metilação e oxidação com periodato, e também por espectroscopia de ^{13}C-n.m.r.

Inicialmente a galactomanana foi metilada pela sequência métodos de HAWORTH[78], KUHN et alii[96] e HAKOMORI[77].

Realizou-se espectro de infra-vermelho do derivado metila

do de galactomanana, bem como do polissacarídeo original, com o objetivo de verificar a absorção em 3.600 cm^{-1}, banda característica para grupamentos hidroxilas. Esta banda não foi observada para o polissacarídeo metilado, mas sim para a galactomanana original.

O polissacarídeo permetilado foi hidrolisado e os produtos analisados por g.l.c.-m.s., na forma de acetatos de alditois parcialmente metilados (Tabela IV). A relação man:gal encontrada foi 1,07:1, concordante com a obtida no polissacarídeo original.

Os principais derivados são o 2,3-di-O-metil-manose(45,2%) e 2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose (46,2%) indicando que a galactomanana está constituída de uma cadeia principal de manose ligada (1→4) com ramificações laterais de unidades galactoses unidas por ligações (1→6). Algumas unidades de manose não estão substituídas, o que pode ser comprovado pela presença do derivado 2,3,6-tri-O-metil-manose (6,5%). A amostra analisada apresentou ainda traços do derivado 2,3,4,6-tetra-O-metil-manose, oriundo do extremo não redutor da molécula. A diminuta quantidade deste derivado bem como a ausência do 2,3,4-tri-O-metil-manose são indicativos de alto peso molecular.

A presença do derivado 2,3,4-tri-O-metil-galactose (2%) sugere que algumas cadeias laterais apresentam mais de uma unidade de galactose.

A hidrólise ácida parcial e purificação da galactobiose será realizada oportunamente.

TABELA IV

ANÁLISE POR METILAÇÃO DA GALACTOMANANA DE Mimosa scabrella NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITOIS PARCIALMENTE METILADOS.

Componente	R_t rel.[a]	M.s.(m/z)[b]	Mol %
2,3,4,6-Me_4-Man	0.904	43,45,71,87,101,129,145,161,205	–
2,3,4,6-Me_4-Gal	1.095	87,101,117,129,145,161,173,205,207	**46,2**
2,3,6-Me_3-Man	1.88	87,99,101,113,117,129,161,173,203,233	**6,5**
2,3,4-Me_3-Gal	2.04	71,87,101,117,129,143,161,175,189,233	**2,0**
2,3-Me_2-Man	3.79	71,85,101,117,127,142,161,187,201,261	**45,2**

a) g.l.c. em coluna de OV 225 com tempo de retenção relativo ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol.

b) g.l.c.-m.s. em coluna capilar de SE-54.

A presença de cadeias curtas de α-D-galactopiranose com uniões (1→6) foi observada em galactomananas de Cassia corymbosa[181] Cassia renigera[73], Gleditsia ferox[30], Gleditsia amorphoides[23] e Trifolium repens[30].

BAKER e WHISTLER[7,9] estudaram a distribuição de unidades de D-galactose na galactomanana de Cyamopsis tetragonolobus, analisando o produto metilado após β-eliminação do derivado p-toluil sulfonila, conforme descrito no item 1.2 (Página 13).

A galactomanana de Mimosa scabrella foi submetida a esta mesma metodologia e os produtos resultantes analisados por g.l.c.-m.s. na forma de acetatos de alditois parcialmente metilados. O espectro (Figura 12) apresentou grande número de picos e ruidos, além dos esperados, provavelmente pela presença de produtos degradados. Foram identificados os derivados 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manose (Figura 13A) e o derivado 2,3,6-tri-O-metil-D-manose (Figura 13B) provenientes de unidades de D-manopiranose substituidas em O-6 por D-galactopiranose e em O-4 por unidades de manopiranose não substituidas em O-6, e unidades de D-manopiranose substituidas em O-6 por galactopiranose e unidas em O-4 a outra unidade também substituida em O-6, respectivamente (Figura 14A e Figura 14B).

A baixa resolução do espectro não permitiu a determinação quantitativa. O alto grau de ramificação da galactomanana deveria fornecer grande quantidade do derivado tri-O-metilado e somente uma pequena quantidade do tetra-O-metilado de manose. Outro pico identificado foi o 2,3-di-O-metil-manose (Figura 13C), correspon-

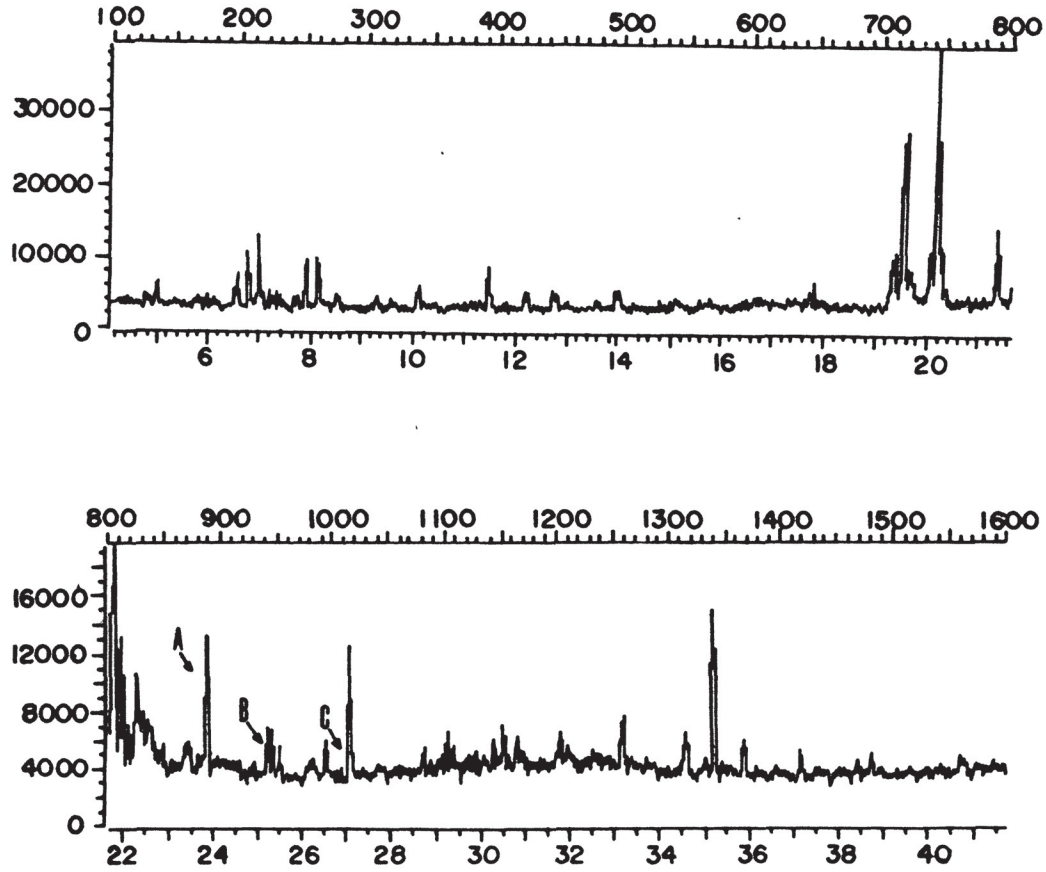


Figura 12 - Cromatograma em g.l.c. em coluna capilar de SE-54 do derivado p-toluil sulfonila de galactomanana de Mimosa scabrella. Os picos foram identificados como (ver espectros de massa figura 13):

A) 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manopiranose;

B) 2,3,6-tri-O-metil-manopiranose;

C) 2,3-di-O-metil-D-manopiranose.

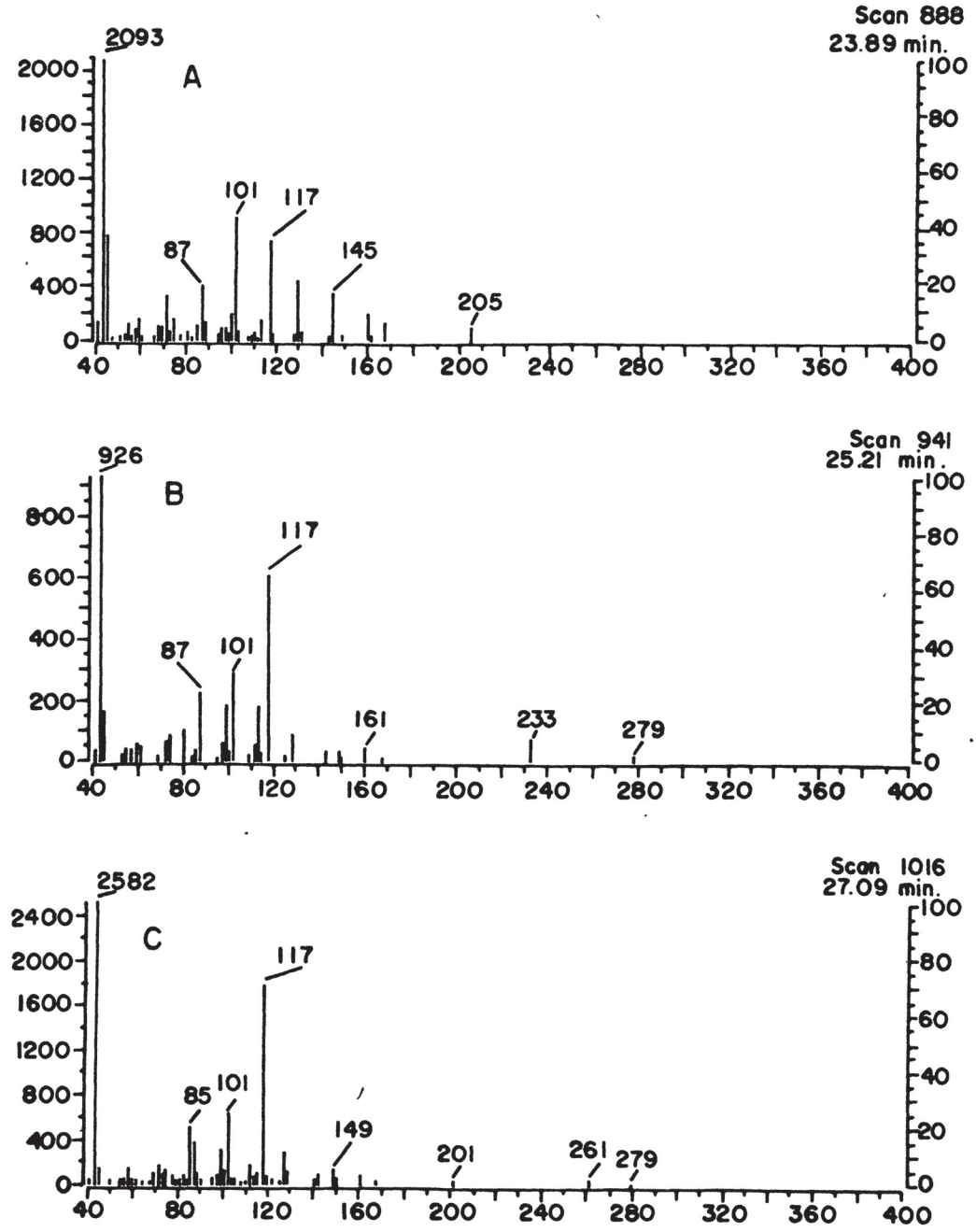


Figura 13 - Espectros de massa (impacto eletrônico) de:

A) 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manopiranose;

B) 2,3,6-tri-O-metil-D-manopiranose;

C) 2,3-di-O-metil-D-manopiranose.

dente àquelas unidades de manose substituidas na posição O-6 por galactobiose (Figura 14C).

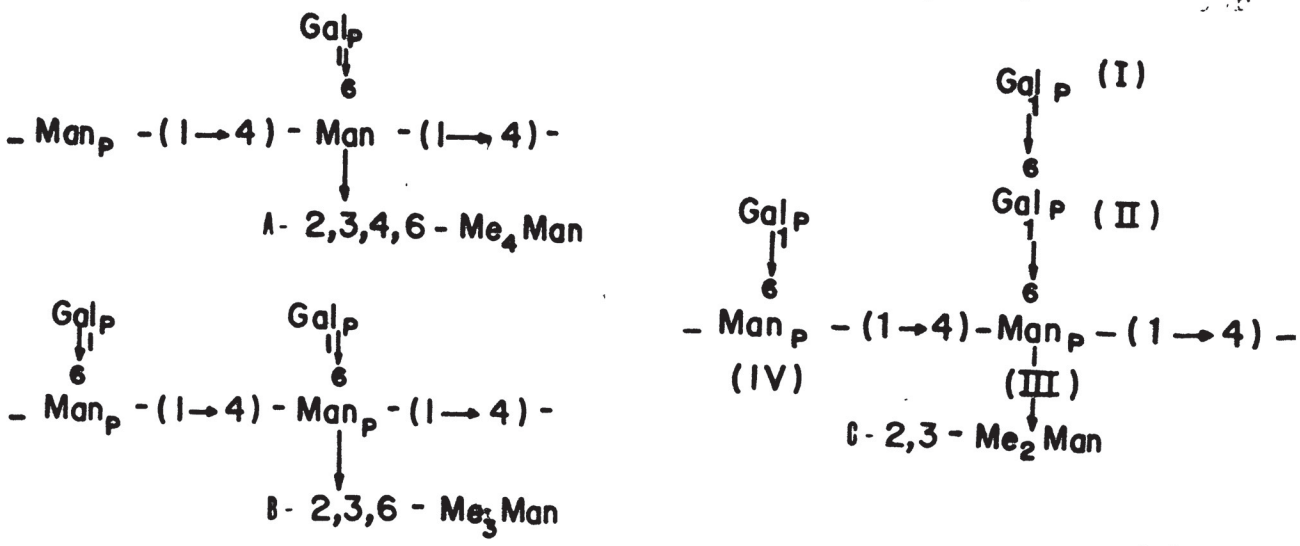


Figura 14 - Estruturas parciais propostas para galactomanana de Mimosa scabrella a partir dos derivados 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-manose(14A), 2,3,6-tri-O-metil-D-manose(14B) e 2,3-di-O-metil-D-manose(14C).

Neste caso, a unidade de galactose não substituída em O-6 (I) foi β-eliminada e a outra (II) forneceu o derivado metilado 2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose, cuja fragmentação corresponde à do derivado tetra metilado da manose. Porém, a unidade de manose substituída por galactobiose (III) originou o derivado 2,3-di-O-metilado. Pode se concluir ainda que esta unidade é vizinha à outra (IV) que possue substituinte em C-6, pois se (IV) não fosse substituída na posição 6, o produto de III seria 2,3,4-tri-O-metil-manose, que não foi identificado. Assim, este método que parece não ser apropriado para o estudo da distribuição de galactose em galactomananas altamente substituídas, foi um importantíssimo instrumento na confirmação

da existência de ramificações por galactobiose.

A galactomanana de Mimosa scabrella foi oxidada com solução aquosa de meta periodato de sódio 0,05 M a 4° durante 128 horas, quando o consumo de oxidante permaneceu constante. Os produtos da oxidação, reduzidos, hidrolisados e analisados por g.l.c. na forma de acetatos alditois, forneceram glicerol (46%; originário da galactose), eritritol (29%; originário da manose) e manose (25%). Este tratamento foi repetido a 25°, obtendo-se os mesmos resultados, não esperados e discordantes da análise de metilação.

Resultados bastante contraditórios foram encontrados em estudos sobre a oxidação com periodato para polissacarídeos com ligações glicosídicas(1--4)para alguns polissacarídeos[87], e também com galactomanana[4,3,23,72,100]. A oxidação incompleta da manose tem sido atribuída à formação de acetal cíclico. No entanto, PAINTER et alii[56,81,82,87] sugerem que, quanto há um grupo hidroxila livre C-6 na unidade de D-manose oxidada, ocorre a formação de hemiacetal entre o grupo aldeido oxidado e o grupo hidroxílico em C-6, mas quando OH-6 está bloqueado por uma substituição de D-galactose há formação de hemiacetais inter unidades, que são estáveis e tornam-se resistentes ao ataque subsequente do periodato.

Numa tentativa de obter uma oxidação mais completa da manose residual, a galactomanana foi oxidada com meta periodato de sódio em concentração duas vezes superior aos experimentos ante-

riores, em meio tamponado (pH 7,0) para neutralizar o ácido fórmico formado, a 25° durante 180 horas. Os produtos de oxidação foram reduzidos, hidrolisados e analisados por g.l.c. na forma de acetatos de alditois, encontrando-se gliberol (48 %; originário da galactose), eritritol (47% originário de manose) e manose (5%). Nestas condições houve sensível diminuição da manose residual, porém, a mesma não foi completamente oxidada.

O consumo de periodato foi determinado pela extrapolação para o tempo zero (Figura 14), sendo igual a 1,9 moles de periodato por mol de hexose anidra. O ácido fórmico liberado para o meio foi de 0,54 moles por mol de hexose anidra, de acordo com o resultado obtido por titulação com NaOH 0,1 N [169, 16, 10].

Como os resultados de metilação não indicaram a presença de mono-metil-manose; 2,6 ou 3,6-di-O-metil-manose, e o aumento de concentração teve efeito sobre a manose residual, pode-se considerar que esta sobreviveu à oxidação devido a formação de hemiacetais inter unidades. Admitindo-se esta possibilidade, os dados de metilação são coerentes com os da oxidação com periodato.

As unidades de D-galactose na galactomanana ligadas a O-6 da manose, são mais suscetíveis ao ataque do periodato[82]; por isto, são oxidadas mais rapidamente do que as unidades de D-manose com ligações glicosídicas (1→4) na cadeia linear, em condições convencionais. Este fato foi utilizado para o isolamento de oligossacarídeos de manose através da degradação de SMITH controlada. Os oligossacarídeos serão submetidos oportunamente a análise

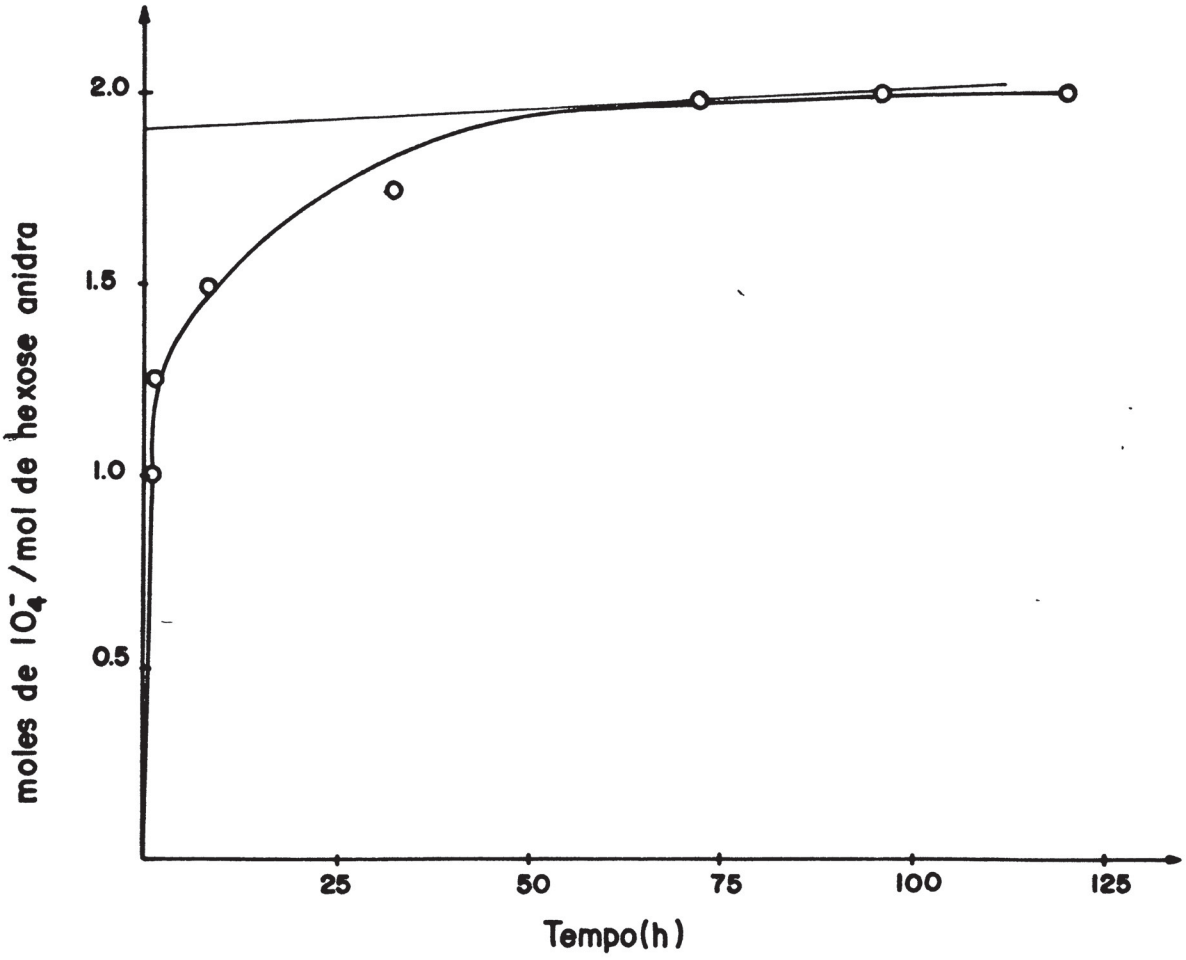


Figura 15 - Determinação do consumo de meta periodato de sódio (0,1 M) da galactomanana de Mimosa scabrella a 25° em meio tamponado (pH 7,0) com 0,1 M de $NaIO_4$.

polarimétrica, a fim de se determinar a configuração absoluta das unidades de manose[191]. Com a mesma finalidade a galactomanana foi submetida a acetólise parcial[91], que cinde preferencialmente as ligações α-(1-6) entre as unidades de D-galactose e D-manose, liberando também uma manana residual, que será analisada oportunamente.

Para a determinação da configuração absoluta das unidades de galactose, a galactomanana hidrolisada foi tratada com galactose-oxidase. A análise colorimétrica do produto indicou a configuração D para todas as unidades de galactose.

A galactomanana de Mimosa scabrella foi analisada por ^{13}C-n.m.r. Devido ao elevado peso molecular desse polissacarídeo, que restringe o movimento das moléculas não é possível obter espectros de ^{13}C-n.m.r. com sinais finos e de boa resolução. Por este motivo, a galactomanana foi parcialmente despolimerizada conforme GRASDALEN e PAINTER[68]. Foi tratado com ácido ortofosfórico a 4°, obtendo-se, após 30 dias, um produto com menor grau de polimerização, com maior mobilidade em solução e fornecendo assim um espectro de ^{13}C-n.m.r. com sinais mais finos e melhor resolvidos.

A relação man:gal determinada na amostra despolimerizada, coincide com a existente na galactomanana original. Assim, pode-se considerar que não houve alteração significativa na estrutura global do polímero. A galactomanana foi também despolimerizada utilizando-se celulase comercial e o complexo enzimático de suco digestivo do caramujo Megalobulimus paranaguensis[52].Os produtos dos tratamentos enzimáticos foram desproteinizados, hidrolisados e analisados

por g.l.c., mantendo a mesma relação de man:gal de amostra original. A viscosidade das soluções, após os tratamento enzimáticos, diminuiu visivelmente. Possivelmente foram hidrolisadas algumas ligações (1→4) entre as unidades de manose da cadeia principal. Este método parece ser vantajoso com relação a hidrólise ácida , pela redução do tempo de operação.

No espectro de ^{13}C-n.m.r. da galactomanana despolimerizada com ácido (Figura 15), os sinais estão bem definidos. A região de δ99-101 é característica para os carbonos anoméricos, de δ68-78 corresponde aos átomos de C-2 a C-5, enquanto que os sinais a δ 61-67 são atribuídos a C-6 [59].

O espectro permite determinar a relação man:gal, pelo cálculo das áreas dos sinais de C-1 (δ101,05 , manose e δ99,26 , galactose) obtendo-se uma relação de~1:1, concordante portanto com as análises químicas.

Os deslocamentos químicos assinalados para cada carbono da galactomanana de Mimosa scabrella podem ser observados na Tabela V.

As unidades de manopiranose ligadas (1→4) e com substituição em C-6 por galactose constituem 87,5% da cadeia principal do polímero segundo os resultados de metilação. Assim os sinais correspondentes a estas unidades (δ67,48; C-6 e δ74,29; C-5) são mais intensos que aqueles apresentados pelas unidades de manose não substituídas (δ61,53; C-6 e δ75,99; C-5). Em galactomananas pouco substituídas como a de Gleditsia triacanthos[104].

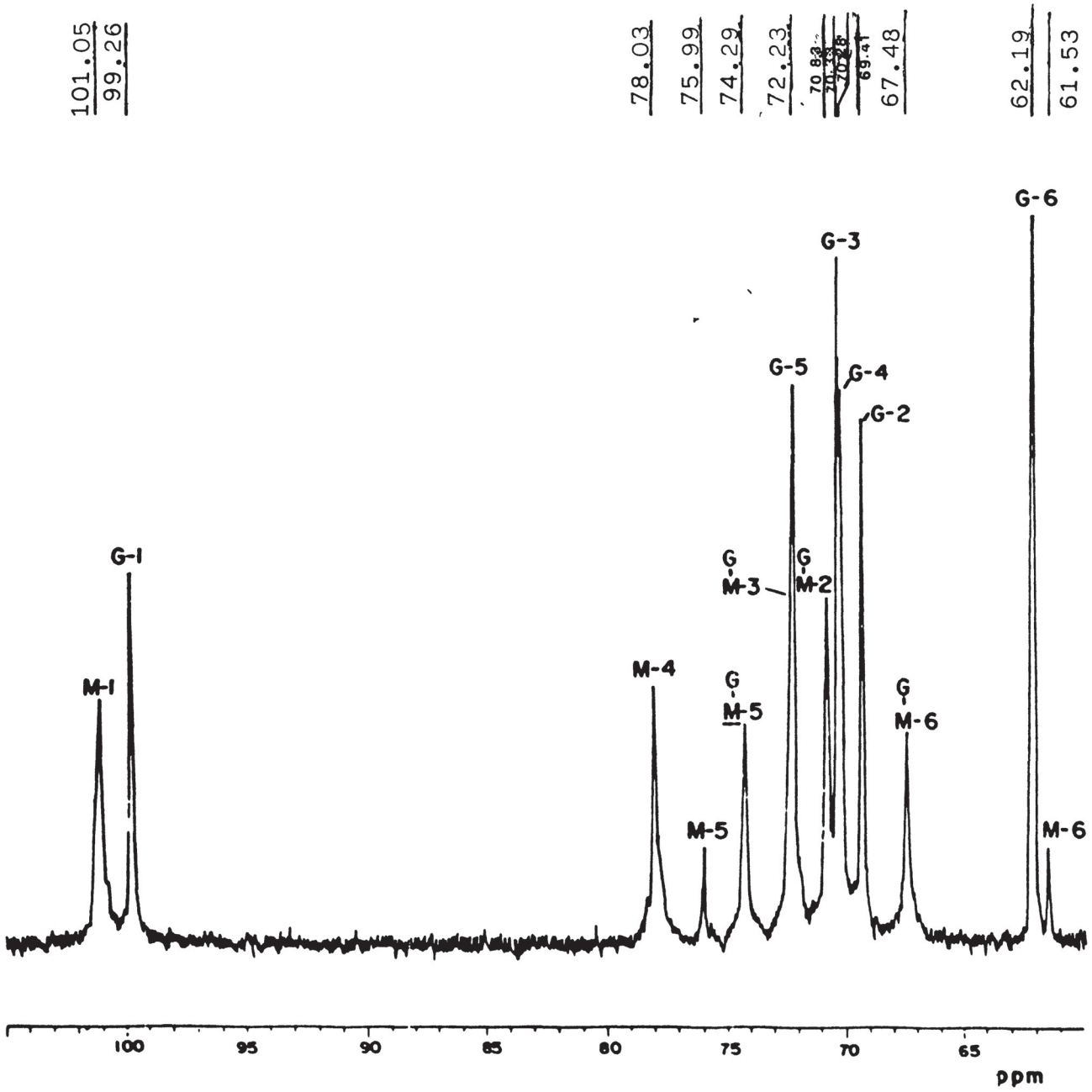


Figura 15 - Espectro de ^{13}C-n.m.r. (125,76 MHz) da galactomanana de Mimosa scabrella, em óxido de deutério (D_2O) a 47º

TABELA V

ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE ^{13}C-n.m.r. DE GALACTOMANA DE SEMENTES DE *Mimosa scabrella*.

Tipo de unidade	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α-D-galactopiranose	99,76	69,41	70,37	70,28	72,23	62,19
β-D-manopiranose não substituída em O-6	101,05	-	-	77,80	75,99	61,53
β-D-manopiranose substituída em O-6	101,05	70,83	72,30	78,03	74,29	67,48

a) Em p.p.m. relativo ao Me_4Si.

(man:gal 2,86:1) ocorre o inverso.

O espectro acoplado (Figura 16) mostra os sinais de C-1 a δ 99,8 (J ~170 Hz) e δ 101,1 (J ~ 160 Hz), indicando estruturas piranosídicas e configurações α e β para galactose e manose respectivamente[59].

A anomericidade dos monossacarídeos componentes de galactomananas tem sido indicada pelos picos característicos em 820 cm^{-1} e 870-875 cm^{-1} em espectroscopia de infra vermelho, para α-galactose e β-manose, respectivamente[69,73,165,100,23,104,71]. Estes picos ocorrem também no espectro de I.V. da galactomanana de Mimosa scabrella, porém, o uso de somente este critério não é confiável pois as bandas citadas foram observadas em espectros de mano-oligossacarídeos, sendo portanto ambas provenientes de manose; 820 cm^{-1} caracteriza a vibração do estiramento simétrico de β-D-manopiranose e 870-875 cm^{-1} corresponde a deformação do enlace equatorial C-2-H das mesmas unidades.

Sabe-se que o efeito da mudança de um hidrogênio de uma hidroxila na unidade monossacarídica por outro grupamento, provoca deslocamento nos sinais não só nos carbonos adjacentes (efeito α) mas também no carbono β (efeito β). O efeito α é notado no espectro da galactomanana (Figura 15) pela diferença de 5,9 ppm entre os sinais de C-6 da unidade de manose não substituída por galactose (δ 61,53) daquela substituída (δ 67,48).

A região de C-4 da manose é sensível à presença de galactose no próprio anel, bem como no anel adjacente, razão pela qual

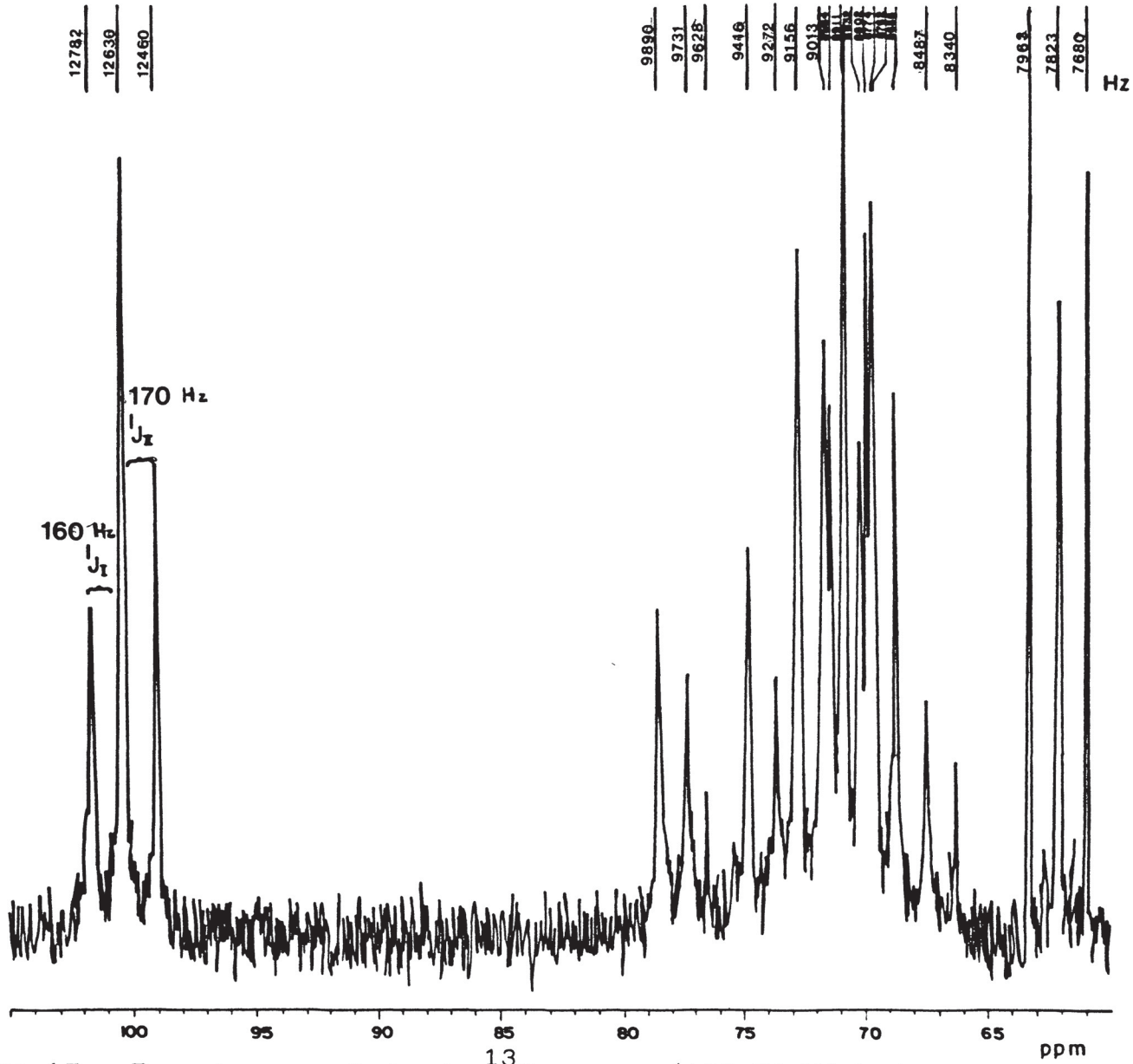


Figura 17 - Espectro acoplado de ^{13}C-n.m.r. (125,76 MHz) da galactomana de Mimosa scabrella, em óxido de deutério (D_2O) a 47°.

os sinais de C-4 das unidades de manose substituídas e não substituídas apresentam comportamentos diferentes.

Devido a este fato, a análise de região de C-4 foi utilizada por GRASDALEN e PAINTER[68] para o estudo da distribuição de unidades de galactose nos polímeros, conforme descrito no item 1.2 (página 18) Por analogia a este trabalho, é provável que na Figura 15, o sinal de C-4 em campo mais baixo (δ 78,03), intenso, indica D-manose substituída ligada a outra também substituída (díade $\overset{gal}{\underset{man}{|}}-\overset{gal}{\underline{man}}$) e o sinal em δ 77,8, fraco, indica uma unidade de manose substituída ligada a outra não substituída ou vice-versa (díade $\overset{gal}{\underset{man}{|}}-\underline{man}$ ou $man-\overset{gal}{\underline{|}}\underline{man}$). Pode-se concluir portanto, que as díades mais frequentes são $\overset{gal}{\underset{man}{|}}-\overset{gal}{\underline{|}}\underline{man}$, o que é coerente com a pequena proporção do derivado 2,3,6-tri-O-metil-manose, encontrado na análise de metilação. A ausência de sinal a campo mais alto correspondente a díade man-man, mostra que a galactomanana em questão não possue duas unidades de manose consecutivas não substituidas. Resultados semelhantes foram obtidos para a galactomanana da espécie Trigonella foenum graecum[19] (fenugreek) que possue relação man:gal 1,08:1.

A região de C-6 das unidades de manose substituídas permite a análise das tríades, que foram discutidas por MAZZINI e CEREZO[109]. Como os deslocamentos próximos δ 67,48 não estão bem resolvidos, não foi possível considerá-los.

4.5. ANÁLISE DA VISCOSIDADE

A reologia é definida como a ciência da deformação e comportamento de fluxo da matéria. Estudos físico-químicos do comportamento reológico dos polissacarídeos em soluções aquosas tem sido objeto de pesquisa nos últimos anos[186, 111, 112, 115, 178].

As propriedades físicas do polissacarídeo, entre elas peso molecular, grau de hidratação, interação intra e inter molecular, bem como as condições técnicas como temperatura, pH e presença de ions alteram a reologia das soluções[95,180].

As galactomananas possuem a capacidade de formarem soluções bastante viscosas em concentrações relativamente baixas[38].

A viscosidade intrínsica da solução aquosa diluida de galactomanana de Mimosa scabrella (Figura 17) a 25° foi de 0,410 l/g. Ao comparar os resultados obtidos com galactomananas de outras espécies como Gleditsia triacanthos[100] (0,4 l/g; man:gal 3,2:1), Cyamopsis tetragonolobus[110] (1,4 l/g; man:gal 1,5:1) e Ceratonia siliqua[110] (1,1 l/g; man:gal 3,3:1), observa-se que a viscosidade intrínsica independe do conteúdo de galactose presente no polímero, de acordo com os estudos realizados por McCLEARY[111] apresentados na página 27.

A viscosidade reduzida da galactomanana de Mimosa scabrella foi determinada em diferentes pHs (2,5 à 6,9; Figura 18). Observou-se que não há variação significativa de pH, conforme esperado para polissacarídeos não iônicos[45, 38]. No entanto numa mesma fai

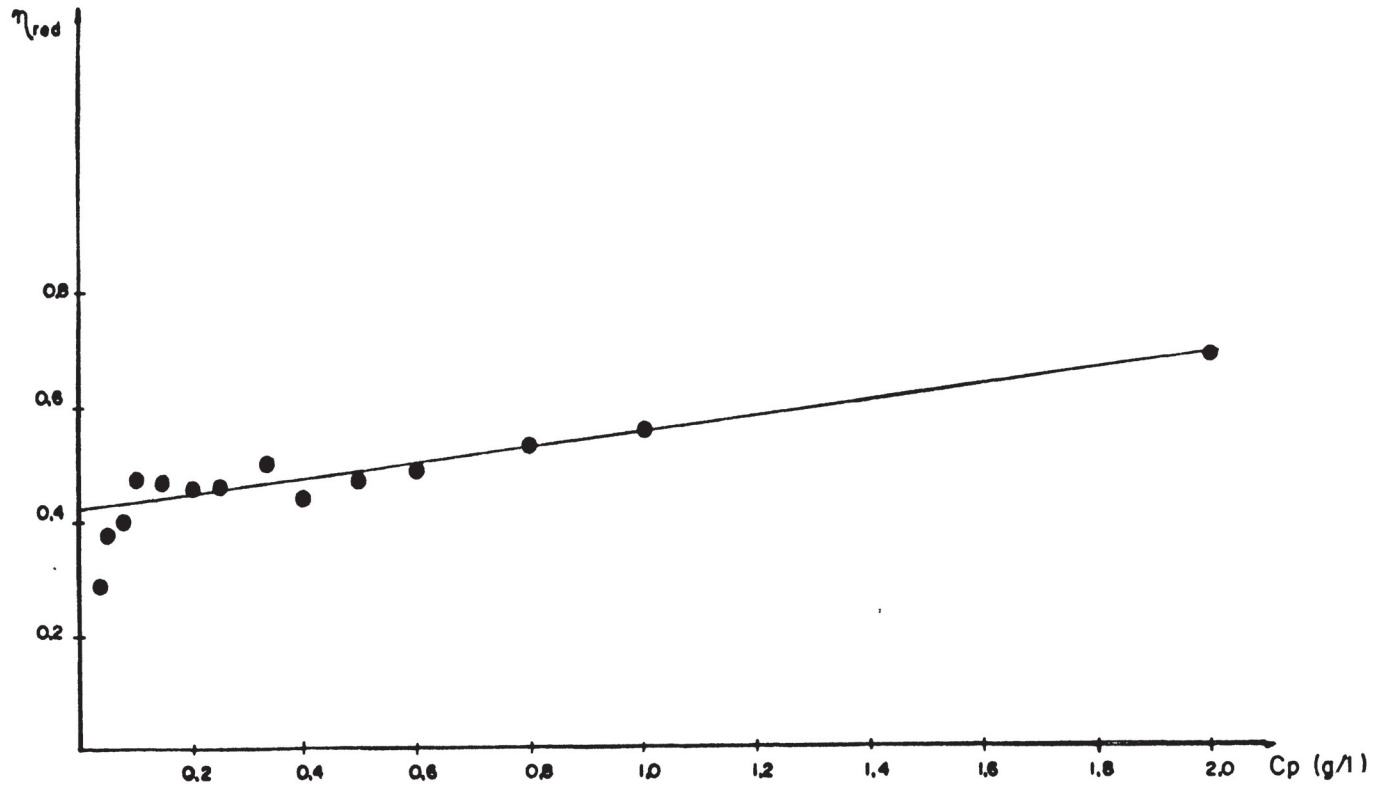


Figura 18 - Determinação da viscosidade intrínsica da galactomanana de Mimosa scabrella (Fração I), a 25°.

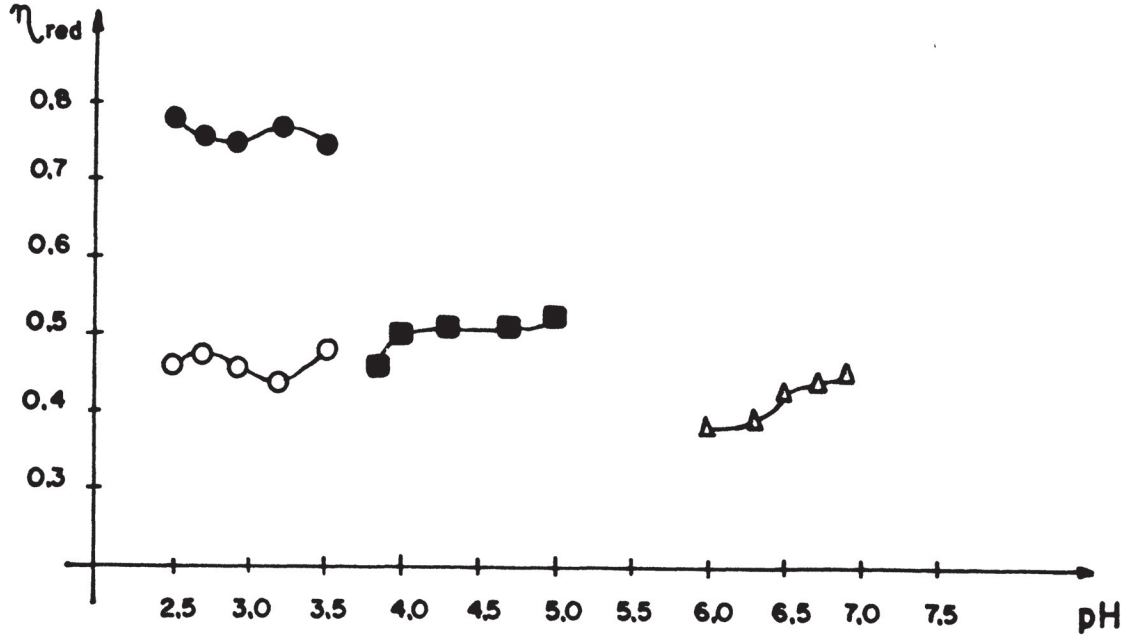


Figura 19 - Efeito do pH sobre a viscosidade reduzida da galactomanana de Mimosa scabrella (Fração I), a 25°.

- ● Ácido fumárico
- o Ácido cítrico
- ■ Ácido lático
- Δ Citrato de sódio

xa de pH (2,5-3,5) com duas soluções ácidas distintas, como ácido cítrico e ácido fumárico, verificou-se que a viscosidade reduzida é mais alta com ácido fumárico que com ácido cítrico. Isto pode indicar uma maior interação entre polímero-solvente no caso do ácido fumárico[45]. Os ácidos e sais escolhidos são os utilizados em indústrias de alimentos, portanto este resultado tem aplicabilidade no uso da galactomanana[141, 142].

A temperatura é uma propriedade físico-química indispensável na análise da viscosidade de polímeros.

A variação da viscosidade relativa foi observada para soluções aquosas da galactomanana de Mimosa scabrella em diferentes temperaturas (25° a 70°), onde verificou-se que a viscosidade diminui com o aumento da temperatura (Figura 19). Este fato pode ser atribuido ao movimento Browniano do polímero, que aumenta à medida que aumenta a temperatura da solução[179], ou à expansão da conformação em espiral do polissacarídeo.

Levando em consideração a polidispersão das galactomananas, torna-se difícil obter dados seguros sobre o peso molecular das mesmas. O peso molecular médio pode ser calculado por diferentes métodos, ou seja, light-scattering[70], osmometria, viscosimetria, gel permeação e métodos químicos.

O peso molecular da galactomanana de Mimosa scabrella foi determinado por viscosimetria, de acordo com a equação de MARK-KUHN-HOUWINK, utilizando-se os parâmetros dependentes da relação polímero solvente (K, a) determinados por ROBINSON et alii[157] pa-

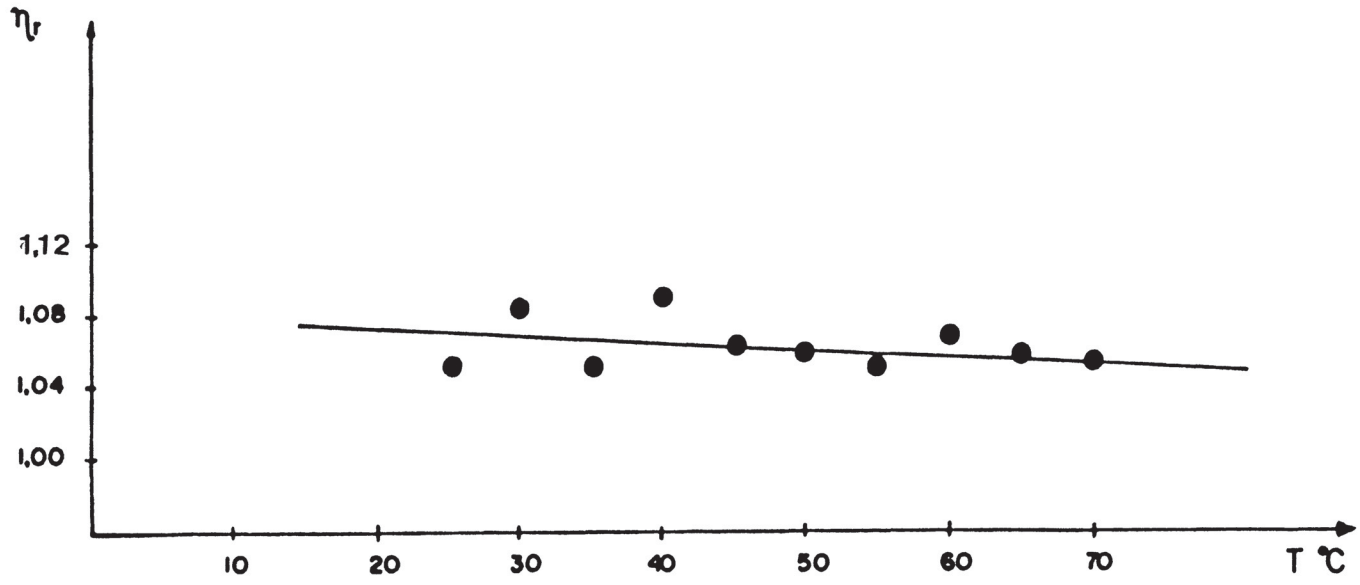


Figura 20 - Efeito da variação da temperatura sobre a viscosidade relativa da galactomanana de Mimosa scabrella (Fração I).

ra a galactomanana de guar.

Com o valor da viscosidade intrínsica obtida, $[\eta]$ = 0,41 l/g, foi possível calcular o peso molecular da galactomanana que corresponde a $3,8.10^5$. A literatura cita grandes variações para o peso molecular em galactomananas. Para o guar[38, 126], por exemplo os valores variam de $2,4.10^5$ a $1,9.10^6$. Muitos fatores interferem na determinação do peso molecular, como a pureza da amostra, conformação, principalmente quando obtidos por light scattering ou viscosimetria[38]. Além disso sabe-se da existência de uma concentração limite, C*, sendo que concentrações acima desta causam um enovelamento na estrutura, favorecendo um aumento da viscosidade, que origina desvios nas determinações de peso molecular.

CONCLUSÕES

1. A extração aquosa a 4° das sementes de Mimosa scabrella moídas forneceu uma galactomanana com rendimento de ~30 %, em relação ao peso total das sementes.

2. A galactomanana apresentou uma rotação específica de +53 e 6,3 % de proteína. Após desproteinização por SEVAG estes valores passaram a ser +48 e 2,5 %, respectivamente.

3. A configuração das unidades de galactose é D, conforme determinação enzimática por galactose oxidase.

4. As cromatografias em colunas de Bio-Gel A 1,5m e Sepharose CL 4B produziram somente um pico, em eluições com água ou soluções caotrópicas e o peso molecular aparente é $1,5\text{-}2,0.10^6$. Entretanto a existência de associação intermolecular não fica excluída.

5. O peso molecular da galactomanana obtido por viscosimetria, de acordo com a equação de MARK-KUNH-HOUWINCK é de $3,8.10^5$.

6. A galactomanana de Mimosa scabrella é composta de uma cadeia principal de manopiranoses ligadas $\beta(1\rightarrow 4)$ com 87,5 % de unidades substituidas em O-6 por unidades de α-D-galactopiranose, conforme determinado por análise de metilação.

7. A análise de metilação forneceu o derivado 2,3,4-tri-O-metil galactose (2 %), indicando que a galactomanana possue uma estrutura incomum, ou seja, a presença de unidades de galactobiose na cadeira principal de manose, fato confirmado pela ocorrência de 2,3-di-O-metil manose como produto de metilação do polissacarídeo β eliminado pelo método de BAKER e WHISTLER.

8. Os produtos de degradação de SMITH da galactomanana a 4^{o} e 25^{o} foram eritritol (29 %), glicerol (46 %) e manose (25 %). Quando o processo foi repetido a 25^{o} em meio tamponado e concentração de meta periodato de sódio duas vezes superior, a relação dos produtos passou a ser: glicerol (48 %), eritritol (47 %) e manose (5 %).

9. Pode-se considerar que as unidades de manose resistentes (5 %) são provenientes da formação de hemiacetais inter unidades, tendo em vista a ausência dos derivados de mono-metil-manose, 2,6 e ou 3,6-di-O-metil-manose na análise de metilação, e que a quantidade de manose diminuiu em condições de oxidação mais enérgicas.

10. O espectro acoplado de ^{13}C-n.m.r. da galactomanana mostra os sinais de C-1 a δ99,8 (J ~170 Hz) e δ101,1 (J ~160 Hz), indicando estruturas piranosídicas e configurações α e β para a galactose e manose, respectivamente.

11. Os sinais de C-6 (δ 67,48) e C-5 (δ 74,25) das unidades de manopiranose ligadas (1→4) e com substituição em C-6 por galactopiranose são mais intensos que aqueles apresentados para unidades de manopiranose não substituídas (δ 61,53; C-5 e δ 75,99; C-5) o que é concordante com o alto grau de substituição da galactomanana.

12. Os sinais de C-4 das unidades de manopiranose indicaram que as díades mais frequentes são $\overset{\text{gal}}{\underset{\text{man}}{|}}\ \overset{\text{gal}}{\underline{|}}\ \underline{\text{man}}$, e que provavelmente não há duas unidades de manose não substituídas consecutivas.

13. A viscosidade intrínsica da galactomanana é de 0,41 l/g.

14. Não foi observado variação significativa da viscosidade reduzida da galactomanana com o pH; no entanto a faixa de pH 2,5-3,5, em meios contendo ácido fumárico ou cítrico, os valores da viscosidade reduzida foram 0,78 g/l e 0,46 g/l, respectivamente.

15. A disponibilidade regional da Mimosa scabrella, crescimento rápido, produção de sementes elevada, alto rendimento de galactomanana a partir das mesmas, aliado às propriedades físico químicas deste polissacarídeo, são fatores que respaldam o aprofundamento nestes estudos bem como favorecem sua aplicabilidade industrial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 AISAKA,K.& TERADA, O. Production of galactose oxidase by Gibberella fujikuroi. Agric. Biol. Chem., 45:2311-2316, 1981.

2 AISEMBERG, E.; SMOLKO, E.; CEREZO, A.S. The crystalline structure of Gleditsia amorphoides galactomannan. Anales Asoc. Quim. Argentina, 62:113-120, 1974.

3 ANDREWS, P.; HOUGH, L.; JONES, J.K.N. Mannose-conteining polysaccharides. I. The galactomannans of lucerne and clover seeds. J.Am.Chem.Soc., 74:4029-4032,

4 ___. Mannose containing polysaccharides. II. The galactomannan of fenugreek seed (Trigonella foenum graecum). J.Am.Chem.Soc., 74:2744-2776, 1952.

5 ASPINALL, G.O. & WHYTE, J.N.C. Polysaccharides of soy-beans. Part I. Galactomannans from the hulls. J.Chem.Soc., 5058-5063, 1964.

6 ASPINALL, G.O. Structural Chemistry of the hemicelluloses. Advanc. Carbohydr. Chem., 14:429-468, 1959.

7 BAGGIO, A.J.; CARPANEZZI, A.A.; GRAÇA, L.R.; CECCON, E. Sistema agroflorestal tradicional da bracatinga com culturas agrícolas anuais. Boletim de Pesquisa Florestal, Curitiba, 12:73-82, jun. 1986.

8 BAKER, C.W. & WHISTLER, R.L. Distribution of D-galactosyl groups in guaran and locust-bean gum. Carbohydr.Res.,45: 237-243, 1975.

9 ___. Distribution of D-galactopyranosyl units in galactomannans. Meth.Carbohydr.Chem., 7:152-156,1976.

10 BARRETO-BERGER, E. & GORIN, P.A.J. The chemistry of polysaccharides of fungi and liquens. In: The Polysaccharides. vol 2, ASPINALL, G.O.(Ed).Academic Press,New York,1983. p. 365-400.

11 BARRICHELO,L.E.G. & FOELKEL, C.E.B. Utilização de madeiras e essências florestais nativas na obtenção de celulose:bracatinga (Mimosa scabrella), embaúba (Cecropia sp), caixeta (Tatebuia cassinoides) e boleira (Joannesia princeps).IPEF, Piracicaba, 10:43-56, 1975.

12 BECK, E. & WIECZOREK, J. In: Progress in Botany. ELLENBERG, H.; ESSER, K.; MERXMÜLLER, H.; SCHNEPF, E.; ZIEGLER, H. (Ed). Springer-Verlag, Berlin, 1977, p. 62-82.

13 BIANCHETTI, A. Comparação de tratamentos para superar a dormência de sementes de bracatinga (Mimosa scabrella Bentham). Boletim de Pesquisa Florestal, 2:57-66, 1981.

14 ___. Produção e tecnologia de sementes essenciais florestais Curitiba, EMBRAPA/URPFCS , 1981. 22p.(EMBRAPA/URPFCS. Documentos , 02).

15 BJORNDAL, H. & WAGSTROM, B. A heterogalactan elaborated by Polyporus squamosus. Acta Chem.scand.,23:3313-3320, 1969.

16 BOBBIT, J.M. Periodate oxidation of carborydrates. Advan. Carbohydr.Chem.,11:1-41, 1956.

17 BOCIEK, S.M.; IZZARD, M.J.; MORRISON, A.; WELTI, D. The ^{13}C-n.m.r. spectra of (1-6)-α-D-galactosyl-(1-4)-β-D-mannans. Carbohydr.Res.,93:279-283,1981.

18 BOUVENG, H.O. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates. Part II. Location of the O-acetyl groups in birch xylan. Acta Chem Scand., 15:96-100, 1961.

19 BRANDAN, E. & INESTROSA, N.C. Isolation of the heparan sulfate proteoglycans from the extracelular matrix of rat skeletal muscle. Journal of Neurobiology, 18(3):271-282, 1987.

20 BURKART, A. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2. ed. Buenos Aires - Argentina, Acme Agency, 1952.

21 CAMPOS, C.H.O.; GRAÇA, L.R.; RIBAS, L.C. A produtividade do bracatingal tradicional através do tempo. Boletim de Pesquisa Florestal, Curitiba, 12:35-46, jun. 1986.

22 CARCHON, H. & BRUYNE, C.K. Purification and properties of coffee-bean α-D- galactosidase. Carbohydr. Res., 41:175-189, 1975.

23 CEREZO, A.S. The constitution of a galactomannan from the seed of Gleditsia amorphoides. J.Org.Chem., 30:924-927, 1965.

24 CLARK, R.K. Applications of water-soluble polymer as shale stabilizers in drilling fluids. In: Water soluble polymers, GLASS, J.E. (Ed). American Chemical Society, Washington, DC., 1986. p. 171-181.

25 CORRÊA, J.B.C.; GOMES, S.L.; GEBARA, M. Structural features of the stem of Mimosa bracatinga. Carbohydr. Res., 60:337-343, 1978.

26 CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; ODEBRECHT, S.; OLIVEIRA, M.L. The distribuition of O-acetyl-groups in partially acetylated xylan. An.Acad.brasil.Ciênc., 51(3):429-433, 1979.

27 CORRÊA, J.B.C.; ROMANOWSKI, S.M.M.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F. Ester-type lignin-xylan linkages in the cell wall of stem of Mimosa scabrella. An.Acad.brasil.Ciênc., 59(3):179-184, 1987.

28 CORRÊA, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de janeiro, Imprensa Nacional, 1984.

29 COSTER, L.; MALSTROM, A.; CARLSTEDT, I.; FRANSSON, L.A. The core protein of fibroblast proteoheparan sulphate consists of disulphide-bonded subunits. Biochem. J., 215: 417-419, 1983.

30 COURTOIS, J.E. & LeDIZET, P. Action of coffee-bean α-galactosidase on some galactomannans. Carbohydr.Res., 3:141-151, 1966.

31 COURTOIS, J.E.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; PETEK, F. Recherches sur les galactomannanes. I-Isolement d'une galactomannane de la luzerne et hidrolyse partielle par l' galactosidase du café. Bull.Soc.Chim.Biol., 40(9-10):1277-1285, 1958.

32 COURTOIS, J.E. & LeDIZET, P. Recherches sur les galactomannanes. VI-Action de quelques mannanases sur diverses galactomannanes. Bull.Soc.Chim.Biol., 52(1):15-22, 1970.

33 COURTOIS, J.E.& LeDIZET,P.Galactomannans.III:Some properties of galactomannans of seeds of Gleditsia ferox.Bull.Soc.Chim. Biol., 45:731-741, 1963.

34 COWAN, R.S. Advances in Legume Systematics (Part I), 1981, in Procceding of the International Legume Conference, vol. 2, Kew (1978), POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H. (Ed), Royal Botanic Gardens, England. p. 57-62.

35 DEA, I.C.M.; CLARK, A.H.; McCLEARY, B.V. Effect of galactose-substitution patterns on the interaction properties of galactomannans. Carbohydr.Res., 147:275-294, 1986.

36 DEA, I.C.M.; McKINNON, A.A.; REES, D.A. Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharides systems which model cell wall cohesion: Reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans. J.Mol.Biol. 68:153-172, 1972.

37 DEA, I.C.M.; MORRIS, E.R.; REES, D.A.; WELSH, E.J.; BARNES, H.A.; PRICE, J. Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specifity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides and related systems. Carbohydr.Res., 57:249-272, 1977.

38 DEA, I.C.M. & MORRISON, A. Chemistry and interaction of seed galactomannans. Adv.Carbohydr.Chem.Biochem., 31:241-312, 1975.

39 DELEAGE, J.P.; SOUCHOU, C.; TARQUINIO, J.J.; ZANONI, M. Étude de la production integreé de bois, energie e d'aliments dans l'agriculture traditionnelle au Paraná, Brasil. Paris, Université Paris-Laboratoire D'ecologie Géneráce et Applique-Groupe EDEN, 1984. s.n.t.

40 DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannans. Adv. Carbohydr.Chem.Biochem., 35:341-376, 1978.

41 ___. α-Galactosidase from sweet chestnut seeds. Phytochemistry, 20:1493-1496, 1981.

42 DORMAN, D.E. & ROBERTS, J.D. Nuclear magnetic resonance spectroscopy Carbon-13 spectra of some pentose and hexose aldopyranoses. J.Am.Chem.Soc., 92:1355-1361, 1970.

43 DOROSO, N.; ODEBRECHT, S.; CORRÊA, J.B.C. Some aspects of the chemical structure of the hemicellulose from the stem of Mimosa bracatinga. Arq.Biol.Tecnol., 23:257-263, 1980.

44 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances . Anal.Chem., 28:350-356, 1956.

45 ELFAK, A.M.; PASS, G.; PHILLIPS, G.O.; MORLEY, R.G. The viscosity of dilute solutions of guar gum and locust bean gum with and without added sugars. J.Sci.Fd.Agric.,28:895-899, 1977.

46 ELIAS, T.S. Advances in Legume Systematics (Part I), 1981, in Procceding of the International Legume Conference, vol. 2, Kew (1978), POLHILL, R.M. & RAVEN, P.H. (Ed), Royal Botanic Gardens, England. p. 143-151.

47 ENGLER'S, A. Syllabus des Pflanzen Familien. Berlin, Gebrüder Borntraeger, 1964. 632 p.

48 FERRAZ, E.S.B. & FONSECA, S.M. Estudo do padrão de crescimento de Mimosa bracatinga pela análise de densidade dos aneis usando radiação gama.Piracicaba,IPEF,1980.7p.(Circular Técnica 113).

49 FERRIER, R.J. & COLLINS, P.M. Monosaccharide chemistry. England, Penguin Books, 1972. 318 p.

50 FIGUEIREDO, R.C.L. Reserve carbohydrates in underground organs of native brasilian plants. Revista Brasileira de Botânica, 9(2):159-166, 1986.

51 FONSECA, S.M. Variações fenotípicas e genéticas em bracatinga-Mimosa scabrella Bentham. Piracicaba,1982. 86 p.Tese,Mestrado,Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

52 FONTANA, J.D.;GEBARA, M.; SCHENEIDER, H; MACKENZIE, C.R.; JOHNSON, K;G. The α-(4-O-methyl)-D-glucuronidase:component of xylanolytic complexes. Meth.Enzymol., 160(63):560-571, 1988.

53 GEBARA, M. Degradação enzimática da hemicelulose A de Mimosa bracatinga. Curitiba, 1977. 34 p. Tese, Mestrado,Universidade Federal do Paraná.

54 GEY, C.; NOBLE, O.; PEREZ, S.; TAVAREL, F. Complexes of borate with guar galactomannan polymer and related model compounds. Carbohydr.Res., in press.

55 GOLDSTEIN, I.J.; HAY, G.W.; LEWIS, A.; SMITH, F. Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. Meth.Carbohydr.Chem., 5:361-367, 1975.

56 GONZALEZ, J.J. Sequential analysis by cooperative reactions on copolymers. 4. The structure of locust bean gum and guaran. Am.Chem.Soc., 11(6):1074-1085, 1978.

57 GONZALEZ, J.J. & PAINTER, T.J. Measurement of diad frequencies in lucern and clover seed galactomannans by periodate oxidation. Carbohydr.Res., 91:93-96, 1980.

58 GORIN, P.A.J. Assignment of signals of the carbon-13-magnetic resonance spectrum of a selected polysaccharide: comments on methodology. Carbohydr.Res., 39:3-10, 1973.

59 ___. Carbon-13-Nuclear magnetic resonance spectroscopy of polysaccharides. Adv.Carbohydr.Chem.Biochem., 38:13-37, 1981.

60 GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens Cetraria islandica and Ramalina usnea. Carbohydr.Res., 128(1):119-132, 1984.

61 ___. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having Ascomycetous mycosymbionts. Carbohydr.Res., 142:253-267, 1985.

62 GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Assignment of carbon-13 signals in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano-α-D-mannopyranans from yeasts. Carbohydr.Res., 105:283-287, 1982.

63 ___. Further studies of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. Can.J. Chem., 53:1212-1223, 1975.

64 GORIN, P.A.J. & SPENCER,J.F.T. Structural chemistry of fungal polysaccharides. Adv.Carbohydr.Chem., 23:367-417, 1968.

65 GRAÇA, L.R. Idade ótima de abate em bracatingal tradicional. Boletim de Pesquisa Florestal, Curitiba, 14:55-60, dez. 1987.

66 GRAÇA, L.R. & MENDES, J.B. Análise econômica de sistemas de reflorestamento com bracatinga. Boletim de Pesquisa Florestal, Curitiba, 14:54-63, jun. 1987.

67 GRAÇA, L.R.; RIBAS, L.C.; BAGGIO, A.J. A rentabilidade econômica da bracatinga no Paraná. Curitiba, EMBRAPA-CNPF, 1986.

68 GRASDALEN, H. & PAINTER, T. N.M.R. studies of composition and sequence in legume-seed galactomannans. Carbohydr.Res., 81:59-66, 1980.

69 GUPTA, A.K. & BOSE, S. Structure of the D-galacto-D-mannan isolated from the seeds of Melilotus indica All. Carbohydr.Res., 153:69-77, 1986.

70 GUPTA, R. & GUPTA, P.C. A neutral seed-gum from Crotalaria verrucosa. Carbohydr.Res., 181:287-292, 1988.

71 GUPTA, O.C.D.; GUPTA, R.; SRIVASTAVA, V.P.; GUPTA, P.C. Structure of new galactomannan from the seeds of Ipomoea fistulosa. Carbohydr.Res., 73:145-150, 1979.

72 GUPTA, D.S.; JANN, B.; BAJPAI, K.S.; SHARMA, S.C. Structure of a galactomannan from Cassia alata seed. Carbohydr.Res., 162:271-276, 1987.

73 GUPTA, R.; KHARE, N.; SINGH, V.; GUPTA, P.C. A neutral seed gum from Cassia renigera. Carbohydr.Res., 159:336-340, 1987.

74 HALL, L.D. & YANPANI, M. A high-yielding, specific method for the chemical derivatization of D-galactose containing polysaccharides: oxidation with D-galactose oxidase, followed by reductive amination. Carbohydr.Res., 81:C10-C-12, 1980.

75 HASSEL, J.R.; ROBEY, P.G.; BARRACH, H.J.; WILCZER, J.; RENNARD, S.I.; MARTIN, G.R. Isolation of a heparan sulphate containing proteoglycan from basement membrane. Proc.Natl.Acad.Sci, 77(8):4494-4498, 1980.

76 HAY, G.W.; LEWIS, B.A.; SMITH, F. Periodate oxidation of polysaccharides:general procedures. Meth.Carbohydr.Chem., 5:357-361, 1965.

77 HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbonion in dimethyl sulphoxide. J.Biochem., 55:205-207, 1964.

78 HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J.Chem.Soc., 107:8-16, 1915.

79 HEGARTY, M.P.; SCHINCKEL, P.G.; COURT, R.D. Reaction of sheep to the consumption of Leucaena glauca Benth and to its toxic principle mimosine. Aust.J.Agric.Res., 15: 153-167, 1964.

80 HOEHNE, F.C. A bracaatinga ou abaracaatinga. São Paulo, Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio, 1930. 47 p.

81 HOFFMAN, J.; LINDBERG, B.; PAINTER, T.J. The distribution of the D-galactose residues in guaran and locust bean gum. Acta Chem.Scand., 30:365-376, 1976.

82 ___. The structure of guaran. Acta Chem.Scand., 29(B):137, 1975.

33 HOFFMAN, J. & SVENSSON, S. Studies of the distribution of the D-galactosyl side chains in guaran. Carbohydr.Res., 65:65-71, 1978.

84 HORVEY, K.F. & WICKSTROM, A. The structure of a galactomannan from white clover seeds (Trifolium repens L.). Acta Chem. Scand., 18(3):833-834, 1964.

85 IACOMINI, M.; SCHNEIDER, C.L.; GORIN, P.A.J. Comparative studies on the polysaccharides of Cladonia alpestris (REINDEER MOSS), Cladonia confusa and Cladonia amaurocraea. Carbohydr.Res., 142:237-251, 1985.

86 INOUE, M.T.; RODERJAN, C.V.; KUNIYOSHI, Y.S. Projeto Madeira do Paraná. Curitiba, Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1984 p. 38-44. (IBDF/SUDESUL/Gov. Est. do Paraná, SEPL).

87 ISHAK, M.F. & PAINTER, T.J. The anomalous periodate oxidation limit of guaran. Acta Chem.Scand., 27:1268-1276, 1973.

88 JOLY, A.B. Botânica - Introdução a taxonomia vegetal. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 1985. 777 p.

89 JONES, J.K.N. & STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes. Meth.Carbohydr.Chem., 5:36-38, 1965.

90 KAPPOR, V.P. & MUKHERJEE, S. Galactomannan from Cassia absus seed. I. Nature of sugars present methylation and periodate oxidation studies. Can.J.Chem., 47:2883-2887, 1969.

91 KIHO, T.; TABATA, H.; UKAI, S.; HARA, C. A minor, protein-containing galactomannan from a sodium carbonate extract of Cordyceps sinensis. Carbohydr.Res., 156:189-197, 1986.

92 KLEIN, R.M. Aspectos fitossociológicos da bracatinga (Mimosa scabrella) In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais, 4, "Bracatinga uma alternativa para reflorestamento", Curitiba, 1981. Anais. Curitiba, EMBRAPA/URPFCS, : 145-148.

93 KOOIMAN, P. Structures of the galactomannans from seeds of Amnona muricata, Arenga saccharifera, Cocos nucifera, Convobulis tricolor and Shofora japonica. Carbohydr.Res., 20:329-377, 1971.

94 KRAUSE, M.V. & MAHAN, L.K. Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. São Paulo, Livraria Roca, 1985, cap. 2.

95 KRUMEL, K.L. & SARKAR, N. Flow properties of gums useful to the food industry. Food Technology, abr.: 36-44, 1975.

96 KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LOW, I. Zur permethylierung von zuckern and glykosiden. Angew.Chem., 67(1):32, 1955.

97 LARM, O.; LINDBERG, B.; SVENSSON, S. Studies on length of the side chains of the dextran elaborated by Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512. Carbohydr.Res., 20:39-48, 1971.

98 LAWRENCE, A.A. Galactomannans. In: Natural gums for edible purposes, _____., New York, Noyes Data Corporation, 1976. p. 17-57.

99 LEE, Y.C. & BALLOU, C.E. Preparation of mannobiose, mannotriose and a new mannotetraose from Saccharomyces cerevisiae mannan. Biochemistry, 4(2):257-264, 1965.

100 LESCHZINER, C. & CEREZO,A.S. The structure of a galactomannan from the seed of Gletitsia triacanthos. Carbohydr.Res.,15: 291-299, 1970.

101 LINDBERG,B. & LUNDSTROM,H. 6-Deoxy-p-tolylsulphonyl-D-glucopyranosides. Acta Chem.Scand.,20:2423-2426,1966.

102 LLOYD,K.O. Isolation, characterization, and partial structure of peptido galactomannans from the yeast form of Cladosporium werneckii. Biochemistry,9:3446-3453,1970.

103 LOWRY,O.H.; ROSEBROUGH,N.J.; RANDALL,R.J. Protein measuremente with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275, 1951.

104 MANZI, A.E.; CEREZO, A.S.; SHOOLERY, J.N. High resolution ^{13}C-n.m.r. spectroscopy of legume seed galactomannans. Carbohydr.Res., 148:189-197, 1986.

105 MANZI, A.E. & CEREZO, A.S. The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of the seed of Gleditsia triacanthos. Carbohydr.Res., 134:115-131, 1984.

106 MANZI, A.E.; MANZZINI, M.N.; CEREZO, A.S. The galactomannan system from the endosperm of the seed of Gleditsia triacanthos. Carbohydr.Res., 125:127-143, 1984.

107 MATTOS, J.R. & MATTOS, N.F. A bracatinga. Porto Alegre, Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis, 1980. 40 p. (Publicação IPRNR, 5).

108 MAZZINI, M.N. & CEREZO, A.S. Galactomannan-protein complexes from the seed of Gleditsia triacanthos. Anales Asoc.Quim. Argentina, 70:289-294, 1982.

109 ___. The carbohydrate and protein composition of the endosperm, embryo and testa of the seed of Gleditsia triacanthos. J.Sci.Food Agric., 30:881-891, 1979.

110 McCLEARY, B.V.; DEA, I.C.M.; WINDUST, J.; COOKE, D. Interaction properties of D-galactose-depleted guar galactomannan samples. Carbohydr.Polymers, 4:253-270, 1984.

111 McCLEARY, B.V. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. Carbohydr.Res., 92:269-285, 1981.

112 ___. Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interactions of legume seed D-galacto-D-mannans. Carbohydr.Res., 71:205-230, 1979.

113 MARON, S.H. & PRUTTON, C.F. Principles of physical chemistry. 4.ed. MacMillan, London, 1965, p. 835-868.

114 McCLEARY, B.V. & NEUKOM, K. Effect of enzymic modification on the solution and interaction properties of galactomannans. Prog.Food Nutr.Sci., 6:109-118, 1982.

115 McCLEARY, B.V. The fine structures of carob and guar galactomannans. Carbohydr.Res., 139:237-260, 1985.

116 McCLEARY, B.V. & MATHESON, N.K. Action patterns and substrate binding requirements of β-D-mannanase with mannosaccharides and mannan type polysaccharides. Carbohydr.Res., 119:191-219, 1983.

117 ___. α-Galactosidase activity and a galactomannan and galactosyl sucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds. Phytochemistry, 13:1747-1757, 1974.

118 ___. Galactomannan structure and β-mannanase and β-mannosidase activity in germinating legume seeds. Phytochemistry, 14:1187-1194, 1975.

119 McCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K.; SMALL, D.M. Galactomannans and galactoglucomannan in legume seed endosperms: structural requirements for β-mannanase hydroysis. Phytochemistry, 15:1111-1117, 1976.

120 McCLEARY, B.V. Modes of action of β-mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannans. Phytochemistry, 18:757-763, 1979.

121 McCLEARY, B.V.; NURTHEN, E.; TAVAREL, F.R; JOSELEAU, J.P. Characterisation of the oligosaccharides produced on hydrolysis of galactomannan with β-D-mannanase. Carbohydr.Res., 118:91-109, 1983.

122 McIVOR, M.F.; CUMMINGS, C.C.; MENDELOFF, A.I. Long-term ingestion of guar gum is not toxic in patients with non insulin dependent diabetes mellitus. Am.J.Clin.Nutr., 41: 891-894, 1985.

123 McNEELY, W.H. Algin. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. Industrial Gums. New York, Academic, 1959. p. 55-82.

124 MEHTA, H.; ORPHE, C.; TODD, M.S.; CORNBROOKS, C.J.; CAREY, D.J. Synthesis by schwann cells of basal lamina and membrane-associated heparan sulfate proteoglycans. J.Cell Biol., 101:660-666, 1985.

125 MENDES FILHO, J.M.A.; POGIANI, F.; LAPA, R.P. Comportamento de três espécies florestais em solo alterado pela exploração do xisto na Região de São Mateus do Sul. In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais, 4, "Bracatinga uma alternativa para reflorestamento", Curitiba, 1981. Anais. Curitiba, EMBRAPA/URPFCS, p. 149-159.

126 MENJIVAR, J.A. Use of gelation theory to characterize metal cross-linked polymer gels. In: Water Soluble Polymer, GLASS, J.E. (Ed). American Chemical Society, Washington, DC, 1986. p. 209-226.

127 MOORE, W.R. Progress in Polymer Science, (Ed) JENKINS, A.D. vol. I, London Pergamon, 1967. p. 3.

128 MORRIS, V.J. & CHILVERS, G.R. Rheological studies on specific ion forms of i-carrageenate gels. J.Sci.Food Agric., 32:1235-1241, 1981.

129 MORRIS, E.R.; REES, D.A.; ROBINSON, G.; YOUNG, G.A. Competitive inhibition of interchain interactions in polysaccharide systems. J.Mol.Biol., 138:363-380, 1980.

130 MURALIKHISHNA, G.; THARANATHAN, R.N.; BHAT, U.R. Heterogeneity and structural investigation of galactomannans isolated from the seeds of Cassia sericea. Carbohydr.Res., 182:119-125, 1988.

131 NAKAJIMA, T. Extracelular galactomannan from Neurospora crassa. Agric.Biol.Chem., 46(4):869-875, 1982.

132 NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J.Biol.Chem., 153:375-380, 1944.

133 NOBLE, O. & TAVAREL, F.R. Nuclear magnetic resonance evidence of the guar-borate interaction. Carbohydr.Res., 166:1-11, 1987.

134 OLIVEIRA, M.L. Alguns aspectos estruturais de O-acetil-(4-O-metil glucurono) xilano da Mimosa Bracatinga. Curitiba, 1977. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.

135 PAINTER, T.J. Influence of cosolutes upon the conformation of carbohydrates in aqueous solutions. I. Dependence upon the anion of the relative rates of hydrolysis of the anomeric methylglucopyranosides in aqueous mineral acids. Acta Chem.Scand., 27:2463-2484, 1973.

136 PAINTER, T.J.; GONZALEZ, J.J.; HEMMER, P.C. The distribution of D-galactosyl groups in guaran and locust bean gum: new evidence from periodate oxidation. Carbohydr.Res., 69: 217-226, 1979.

137 PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, Curitiba, PR. Programa de Desenvolvimento Integrado. Curitiba, 1987. 38 p.

138 PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura, Curitiba, PR. Plano Energético do Paraná: Programa de Implantação de Florestas Energéticas. Curitiba, 1980. 43 p.

139 PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura, Curitiba, PR. Necessidade de lenha e/ou carvão vegetal como alternativas na substituição do óleo combustível no Paraná, Curitiba, 1979. 55 p.

140 PAULA, J.E. Espécies nativas com perspectivas energéticas. In: Congresso Nacional sobre essências nativas, Campos do Jordão, 1982. Anais. São Paulo, Instituto Florestal, 1982. p. 1259-1315.

141 PHILLIPS, G.O.; WEDLOCK, D.J.; WILLIAMS, P.A. Gums and stabilisers food industry. 2. Oxford, Pergamon Press, 1984. 320 p.

142 ___. Gums and stabilisers for the food industry. 3. London, Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

143 PILNIK, W.; ROMBOUTS, M. Polysaccharides and food processing. XII th International Carbohydrate Symposium, Utrecht the Netherlands, 1-5 july, 1984. p. 93-105.

144 POLHILL, R.M. Advances in Legume Systematics (Part I), 1981, In: Procceding of the International Legume Conference, vol. 2, Kew (1978), (Ed). ___, Royal Botanic Gardens, England. p. 191-204.

145 ___. Advances in Legume Systematics (Part I), 1981, In: Procceding of the International Legume Conference, vol. 2, Kew (1978) (Ed). ___, Royal Botanic Gardens, England. p. 1-26.

146 QUER, P.F. & RAFOLS, E.S. Dicionário de Botânica. Spain, Editorial labor, 1953. 1244 p.

147 REES, D.A. Polysaccharide shapes. Londres, Chapman Hall Ltd., 1977. 80 p.

148 REES, D.A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. Adv. Carbohydr.Chem.Biochem., 24:267-332, 1969.

149 REICHER, F. Estudos sobre a localização de grupos O-acetílicos e de complexos lignina-xilana em hemicelulose nativa de"Mimosa scabrella"(bracatinga). Curitiba, 1984. 136 p. Tese, Doutorado, Universidade Federal do Paraná.

150 REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GORIN, P.A.J. Location of O-acetyl, groups in the acidic D-xylan of Mimosa scabrella (bracatinga). A study of O-acetil group migration. Carbohydr.Res., 135:127-143, 1984.

151 REICHER, F. & CORRÊA, J.B.C. Lignin-hemicellulose complexes from the stem of Mimosa bracatinga, HOEHNE. An.Acad.bras. Ci., 54(3):579-584, 1982.

152 REICHMANN NETO, F. Revegetalização de áreas marginais a reservatórios de hidroelétricas. Curitiba, COPEL, 1979. 15 p.

153 REID, J,S.G. & MEIER, H. Enzymic activities and galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (Trigonella foenum-graecum L. leguminosae) secrection of α-galactosidase and β-mannosidase by aleurone layer. Planta, 112:301-308, 1973.

154 REID, J.S.G. Structure and function in legume-seed polysaccharides. Biochemistry of plant cell walls. Society for Experimental Biology, 28(Ed). BRETT, C.T. & HILLMAN, J.R., Cambridge, 1985. p. 259-268.

155 REITZ,R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul. Sellowia, Itajaí,34/35, 1983. p. 525.

156 ___. Projeto Madeira de Santa Catarina. Sellowia, Itajaí, 28/30, 1978. p. 320.

157 ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S.B.; MORRIS, E.R. Viscosity-molecular weight relationships intrinsic chain flexibility and dynamic solution properties of guar galactomannan. Carbohydr.Res., 107:17-32, 1982.

158 ROTTA, E. & OLIVEIRA, Y.M.M. Área de distribuição natural de bracatinga (Mimosa scabrella). In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais, 4, "Bracatinga uma alternativa para reflorestamento". Curitiba, 1981. Anais Curitiba. EMBRAPA/URPFCS, p. 1-24.

159 SANDERSON, G.R. Polysaccharides in foods. Food Tecnology, 35(7):50-57, jul. 1981.

160 SANDFORD, P.A.& BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: The polysaccharides, vol. 2, ASPINALL, G.O. (Ed). Academic press, New York, 1983. p. 411-489.

161 SCHULTZ, A.R. Botânica Sistemática. 3.ed. Porto Alegre, Globo, 1968. 416 p.

162 SEILER, A. Galaktomannanabbau in keimenden johannisbiot samen Ceratonia siliqua L. Planta, 134:209-221, 1976.

163 SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING. S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96:282-292, 1979.

164 SEN, A.K.; BANERJEE, N.; FAROOQI, M.I.H. A water-soluble galactomannan from the seeds of Indigofera tinctoria linn. Carbohydr.Res., 157:251-256, 1986.

165 SETH, R.P.; MUKHERJEE, S.; VERMA, S.D. Investigations on partial structure of galactomannan "A" from Cassia renigera seed. Carbohydr.Res., 125:336-339, 1984.

166 SHARMA, C.B. & SHARMA, T.N. Multiple forms of α-galactosidase in chick pea seedlings. Phytochemistry, 16:1053-1054, 1977.

167 SIMÕES, J.W.; POGGIANI, F.; BALLONI, E.A.; RORIZ, M.S.; LEITE, J.C.C.; VIDIGAL, R.m. Implantação de espécies florestais em solo alterado pela exploração do xisto. In: Simpósio Nacional de Ecologia, 1, Curitiba, 1978. Anais. Curitiba. Instituto de Terras e Cartografia, 1978 p. 61-68.

168 SMITH, R.J. Determination of moisture and ash. Meth. Carbohydr.Chem., 4:36-42, 1964.

169 SMITH, F. & MONTGOMERY, R. End group analysis of polysaccharides. Meth.Biochem.Anal., 3:153-212, 1956.

170 ___. The chemistry of plant gums and mucilages. In: ___, New York, Reinhold Publishing Corporation, 1959.

171 STAUB, A.M. Removal of proteins. Sevag Method. Meth. Carbohydr.Chem., 5:5-6, 1965.

172 STEPHEN, A.M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. The Polysaccharides. USA. Academic Press, vol. 2, 1983. p. 115-122.

173 STURION, J.A. & CARNEIRO, J.G.A. Influência da procedência e tamanho de sementes no desenvolvimento de mudas de Mimosa scabrella Benth. - Fase de viveiro. In: Simpósio Internacional: Métodos de Produção e Controle de Qualidade de Sementes e mudas Florestais, Curitiba, 1984. Universidade Federal do Paraná/IUFRO, 1984. p. 314-328.

174 SAWARDEKER,J.S.; SLONEKER , J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chro,atography. Anal.Chem., 37:1602-1604 , 1965.

175 SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J.Biol.Chem., 160:61-68, 1945.

176 SWENSON, H.A. Intrinsic viscosity and its conversion to molecular weight. Meth.Carbohydr.Chem., 3:84-91, 1963.

177 TAGER, A. Physical chemistry of polymers. Moscow, Mir Publishers, 1978. 642 p.

178 TAKO, M. & NAKAMURA, S. Gelation mechanism of agarose. Carbohydr.Res., 180:277-284, 1988.

179 ___. Synergistic interaction between xanthan and guar gum. Carbohydr.Res., 138:207-213, 1985.

180 TANFORD, C. Physical chemistry of macromolecules. New York, Wiley (Ed), 1961. p. 145-291.

181 TEWARI, K.; KHARE, N.; SINGH, V.; GUPTA, P.C. A non-ionic seed-gum from Cassia corymbosa. Carbohydr.Res., 135:141-146, 1984.

182 TIMELL, T.E. Galactoglucomannans from the wood of gymnosperms. Meth.Carbohydr.Chem., 5:134-137, 1965.

183 TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.F.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166:444, 1950.

184 UNRAU, A.M. & CHOY, Y.M. Identification of linkages of a galactomannan isolated from seed of Caesalpinia pulcherima. Carbohydr.Res., 14:151, 1970.

185 ___. Structure of a galactomannan from seed of Crotalaria mucronata. Can.J.Chem., 48:1123-1128, 1970.

186 VISHNU, A. & MISRA, V.P. Studies on viscosity behavior of concentrated sodium and potassium in aqueous D-manitol solution. Carbohydr.Res., 63:29-40, 1978.

187 WHISTLER, R.L. & BeMILLER, J.N. Carbon column chromatography. Meth.Carbohydr.Chem., 1:42-44, 1962.

188 WHISTLER, R.L. Factors influencing gum cost and applications. In: ___. Industrial Gums, New York, Academic Press, 1959. p.1-13.

189 WHISTLER, R.L. & FEATHER, M.S. Hemicellulose. Extraction from annual plants with alkaline solutions. Meth.Carbohydr. Chem., 5:144-145, 1965.

190 WHISTLER, R.L. & SAARNIO, J. Galactomannan from soy bean hulls. J.Am.Chem.Soc., 79:6055-6057, 1957.

191 WHISTLER, R.L. & SMART, C.L. Polysaccharides chemistry (Ed). New York, Academic Press, 1953. 473 p.

192 WU, H.C.H. & SARKO, A. The double-helical molecular structure of crystalline B-amylose. Carbohydr.Res.,61: 7-25, 1978.

Parte deste trabalho deu lugar as seguintes publicações:

1 GANTER,J.L.M.S. ; CORRÊA,J.B.C. ; SIERAKOWSKI, M.R. and REICHER, F. Galactomannan from the seeds of Mimosa scabrella(bracatinga): Structure and Properties. VI Seminário de Polímeros Brasil-França. 12 a 16 de setembro de 1988. Rio de Janeiro-RJ. Procceding- in press.

2 GANTER,J.L.M.S. ; CORRÊA, J.B.C. ; SIERAKOWSKI, M.R. ; FONTANA,J.D. and REICHER,F. Fine structure of the galactomannan from the seeds of Mimosa scabrella. Arq. Biol.Tecnol., 31(1), abr.,1988. XVII Reunião Anual de Bioquímica; 1988. Caxambu-MG.

3 GANTER, J.L.M.S. ; CORRÊA, J.B.C. ; SIERAKOWSKI, M.R. ; FONTANA,J.D. and REICHER,F. Galactomannan from the seeds of Mimosa scabrella(bracatinga): Structural analysis. 2º Encontro de Química do Paraná. 1988. Curitiba-PR.