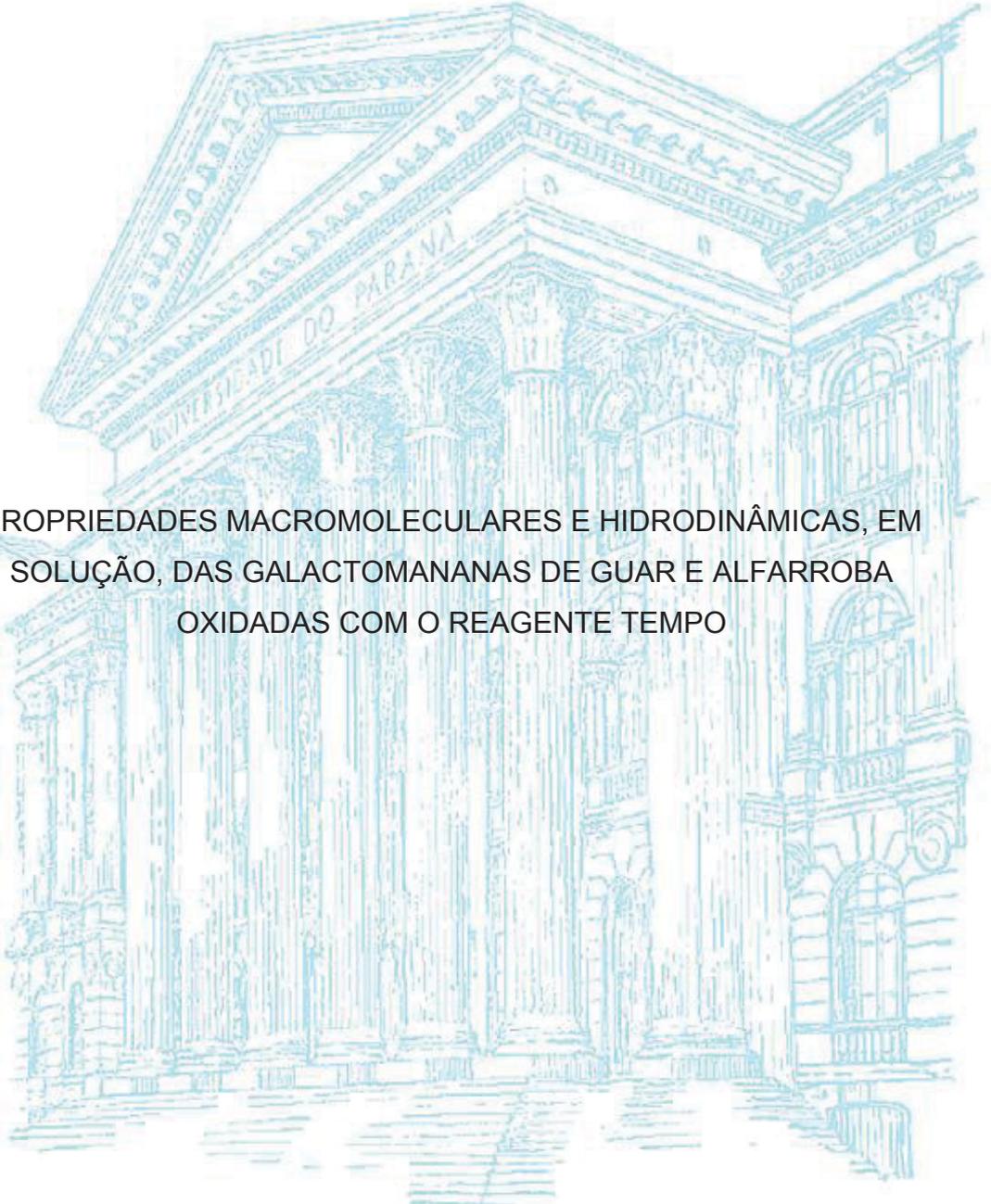


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE NOVAK SAKAKIBARA



PROPRIEDADES MACROMOLECULARES E HIDRODINÂMICAS, EM
SOLUÇÃO, DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA
OXIDADAS COM O REAGENTE TEMPO

CURITIBA

2014

CAROLINE NOVAK SAKAKIBARA

PROPRIEDADES MACROMOLECULARES E HIDRODINÂMICAS, EM SOLUÇÃO,
DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA OXIDADAS COM O
REAGENTE TEMPO

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Química, no Curso
de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências
Exatas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2014

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

- S132p Sakakibara, Caroline Novak
Propriedades macromoleculares e hidrodinâmicas, em solução,
das galactomananas de guar e alfarroba oxidadas com o reagente
TEMPO [recurso eletrônico] / Caroline Novak Sakakibara –
Curitiba, 2014.
- Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Exatas, Programa de Pós-graduação em Química.
Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
1. Galactose. 2. Galactomananas – Guar. 3. Oxidação. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Freitas, Rilton Alves de. III.
Título.

CDD: 574

TERMO DE APROVAÇÃO

**PROPRIEDADES MACROMOLECULARES E HIDRODINÂMICAS, EM
SOLUÇÃO, DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA
OXIDADAS COM REAGENTE TEMPO**

por

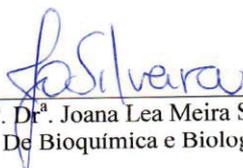
CAROLINE NOVAK SAKAKIBARA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Dep. de Química – UFPR



Prof.^a. Dr.^a. Joana Lea Meira Silveira
Dep. De Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof.^a. Dr.^a. Maria Rita Sierakowski
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 28 de março de 2014.

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais
Seiji Sakakibara e Zilma Soeli Novak e a
todos que estiveram comigo nessa
caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades colocadas em meu caminho e amor incondicional. Aos meus pais Zilma e Seiji por me ajudar, aturar e incentivar a prosseguir no estudo.

À minha querida e amada tia Cátia por tantas vezes me auxiliar em momentos difíceis e acreditar em mim.

À minha tia Eliane e ao meu tio Manuel por estarem sempre me apoiado, aconselhando seja nos estudos ou em outras áreas da vida.

À minha vó que apesar de não entender bem o que faço é um exemplo de fé e dedicação à família.

Aos meus amigos e familiares que de alguma forma me incentivaram e estiveram comigo nessa caminhada. Em especial à Ludmila pelos seus inúmeros puxões de orelha.

Ao prof^o Dr. Rilton Alves de Freitas pela orientação, ensino e exemplo de dedicação, competência e comprometimento com o trabalho. Obrigada também pelos puxões de orelha e paciência.

À prof^a Dra. Maria Rita Sierakowski por abrir as portas do laboratório de Biopolímeros – Biopol e poder fazer parte desta linda e vitoriosa família.

À prof^a Dra. Joana Lea Meira Silveira pela importante contribuição e disponibilizar a utilização dos equipamentos de espalhamento de luz e HPAEC-PAD, ferramentas cruciais na realização deste projeto.

À prof^a Dra. Neoli Lucyszyn pelos materiais e auxílio referente a oxidação das galactomananas.

À Dra. Francine Valenga pela amizade, auxílio com o trabalho, disponibilidade e paciência. À Dra. Adriana F. Lubambo pelo conhecimento compartilhado.

Aos colegas de laboratório pelos bons momentos passados neste, em especial ao Msc Gabriel A. T. Kaminski pelas suas piadas sem graça, força e contribuição com o artigo.

À Renata Silva por compartilhar das mesmas dificuldades e pela companhia nas muitas e muitas comilanças.

Ao Msc Guilherme Fadel Picheth pela paciência em ensinar a utilizar programas de computadores tão básicos e ao mesmo tempo tão complicados. Por sempre estar disposto a ajudar e pelos conselhos.

À Msc Vivian C. Spier pelos conselhos e por ajudar a ter paciência com o GPC. Ao Msc Cleverton Luiz Pirich pelo auxílio e disposição a ajudar sempre que possível. À Aline Grein por ensinar o básico com relação ao laboratório quando era sua IC, conhecimento importante no começo do mestrado.

Aos alunos de iniciação científica Thais Cheminski e Gabrielly Nagatomy pelas contribuições com o projeto, e à Jéssica Caroline pelas análises no HPAEC-PAD.

A todos os professores e colegas do Departamento de Química que contribuíram de alguma maneira para minha formação e desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação e ao Colegiado do curso de Pós-graduação em Química.

À CAPES, CNPq e ao programa REUNI, pelo auxílio financeiro.

“Feliz é a pessoa que acha a sabedoria
e que adquire conhecimento, pois isso é
melhor do que a prata e tem mais valor
do que o ouro.”

Provérbios 3:13-14

Bíblia Sagrada

RESUMO

As galactomananas são polissacarídeos constituídos por uma cadeia principal de *D*-manopiranosose unidas por ligação β -(1 \rightarrow 4) e ramificações *D*-galactopiranosose α -(1 \rightarrow 6). A oxidação seletiva do C-6 promovida pelo reagente 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO) é uma forma de modificar e promover características e funcionalidades diferentes a esta molécula. Neste trabalho foi realizado a oxidação seletiva com reagente TEMPO das galactomananas de alfarroba e guar, com 5 graus diferentes de oxidação, determinados a partir do consumo de NaOH durante a reação. A oxidação foi confirmada através da caracterização por Espectroscopia no Infravermelho (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), onde foi observada a presença de aldeídos nos graus de oxidação intermediários. A partir dos dados obtidos pela metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica acoplada a detecção por amperometria pulsada (HPAED-PAD) a razão de Manose/Galactose foi determinada sendo para alfarroba nativa e seus derivados oxidados 1, 2, 3, 4 e 5 de 3,8/1, 2/1, 1,9/1, 1,7/1, 1,5/1 e 3,9/1. Para a guar e seus derivados oxidados 1, 2, 3, 4 e 5 os valores são de 1,2/1, 1,6/1, 1,5/1, 1,6/1, 1,5/1 e 5,4/1. Estes dados demonstraram que há uma preferência em oxidar a manose e posteriormente a galactose durante a reação. As propriedades macromoleculares e hidrodinâmicas das galactomananas nativas e oxidadas foram obtidas através da análise por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). Os valores de massa molar (M_w), viscosidade intrínseca $[\eta]$, raio de giração (R_g) e comprimento de persistência (L_p) diminuíram com o aumento do grau de oxidação em ambas as galactomananas. Para a alfarroba nativa os valores foram de respectivamente $2,7 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, de $4,9 \text{ dL.g}^{-1}$, 35 nm, 6,15 nm. Na amostra 4 estes valores foram de respectivamente $0,43 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, $0,6 \text{ dL.g}^{-1}$, 9 nm e 2,50 nm. Os valores de R_g foram calculados a partir da equação de Flory-Fox, usando informações do viscosímetro, e o L_p pela fórmula para cadeias semi-flexíveis ou "worm like". A mesma redução nos parâmetros macromoleculares também pode ser observada comparando-se a guar nativa com as amostras 1 a 5, devido ao fato das cargas presentes nas galactomananas oxidadas gerarem uma repulsão entre as moléculas e conseqüentemente diminuírem a tendência ao entrelaçamento e agregação entre essas. Os valores de M_w , $[\eta]$, R_g , L_p foram, respectivamente, para a guar nativa e amostra 5 de $2,4 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ e $0,56 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, $2,0 \text{ dL.g}^{-1}$ e $0,5 \text{ dL.g}^{-1}$, 25 nm e 10,0 nm, 4,15 nm e 2,80nm. A oxidação seletiva com reagente TEMPO se mostrou eficiente para aumentar a flexibilidade da molécula, mesmo com pouco tempo de reação. Os parâmetros macromoleculares obtidos a partir da técnica de espalhamento de luz (LS) para as galactomananas nativas e oxidadas foram superiores aos obtidos por SEC. Este fato evidencia que para as moléculas com tendência a agregação, as técnicas que não sejam influenciadas por esses fatores são mais adequadas para realizar as caracterizações.

Palavras chave: Galactomanana 1. Guar 2. Alfarroba 3. Oxidação seletiva C-6 4. Reagente TEMPO 5. Comprimento de persistência 6.

ABSTRACT

Galactomannans are polysaccharides composed of *D*-mannopyranose linked β -(1 \rightarrow 4) main chain, α -(1 \rightarrow 6) branched by *D*-galactopyranose. The selective oxidation of C-6, promoted by reagent 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO), is a way to promote and modify various characteristics of this molecule. In this work, the oxidation reactions of guar and carob galactomannans were performed with TEMPO with 5 different degrees of oxidation, determined from the consumption of NaOH during the reaction. Characterization with Infrared Spectroscopy (FTIR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) confirmed the chemical modification, where the presence of aldehydes was observed in intermediate degrees of oxidation. From the data obtained by high performance liquid chromatography coupled ion exchange efficiency with detection by pulsed amperometry (HPAED-PAD), the ratio of Mannose /Galactose was determined to be, respectively for the native carob and their oxidized derivatives 1, 2, 3, 4 and 5 were 3.8/1, 2/1, 1.9/1, 1.7/1, 1.5/1 and 3.9/1. For oxidized guar and its derivatives 1, 2, 3, 4 and 5 values are 1.2/1, 1.6/1, 1.5/1, 1.6/1, 1.5/1 and 5.4/1. These data demonstrated a preference to oxidize the mannose, and subsequently the galactose, during the reaction of oxidation. The macromolecular and hydrodynamic properties of the native and oxidized galactomannans were obtained through the analysis by size exclusion chromatography (SEC). The values of molar mass (M_w), intrinsic viscosity $[\eta]$, radius of gyration (R_g) and the persistence length (L_p) decreased with increasing degree of oxidation in both galactomannans. To native locust, these parameter were respectively $2,7 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, 4.9 dL.g^{-1} , 35 nm and 6.15 nm. In sample 4 these values reduced so much $0,43 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, $0,6 \text{ dl.g}^{-1}$, 9 nm and 2.50 nm. R_g values were calculated from the Flory-Fox equation and L_p by the formula for semi-flexible strands or "worm like". The same reduction can also be observed by comparing the native guar with samples 1 to 5, due to the presence of charges in the oxidized galactomannans, that generated a repulsion between molecules and consequently diminish the tendency to aggregation and form entanglements in the pH and buffer used (0.1 mol.L^{-1} , TRIS-HCl, pH 8.0). The values of M_w , $[\eta]$, R_g , L_p for native guar and sample 5 respectively were $2,4 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ and $0.56 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, 2.0 dl.g^{-1} and 0.5 dl.g^{-1} , 25 nm and 10.0 nm, 4.15 nm and 2,80nm. The selective oxidation with TEMPO reagent proved to be efficient to increase the flexibility of the molecule, even with a short reaction time. The macromolecular parameters obtained from the technique of light scattering (LS) for native and oxidized galactomannans were higher than those obtained by SEC. This fact suggested the use of techniques which are not influenced by aggregates in solution to improve the characterization of galactomannans and its oxidized derivatives.

Keywords: Galactomannans 1. Guar 2. Carob 3. Selective oxidation 4. Reagent TEMPO 5. Length of persistence 6.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESQUEMA DE UM SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE GALACTOMANANA DE ORIGEM VEGETAL.....	21
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA COMPOSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS DAS GALACTOMANANAS DE ALFARROBA (<i>Ceratonia siliqua</i>) e GUAR (<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L. (Taub.)).....	22
FIGURA 3 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ARRANJO DAS GALACTOMANANAS.....	23
FIGURA 4 -	FOTO DAS PARTES AÉREAS DA PLANTA DE <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> (L.) Taub. ONDE OBSERVA-SE AS VAGENS, FOLHAS E FLORES DA PLANTA.....	25
FIGURA 5 -	FOTO DAS PARTES AÉREAS DA PLANTA DE <i>Ceratonia siliqua</i> L. ONDE OBSERVA-SE AS FOLHAS E VAGENS.....	26
FIGURA 6 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GALACTOMANANA DE GUAR E SUAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS MAIS COMUNS.....	27
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO (N-OXIL-2,2,6,6-TETRAMETILPIPERIDINA).....	28
FIGURA 8 -	ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE GALACTOMANANA (a) ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE GALACTOMANANA APÓS OXIDAÇÃO (b).....	29
FIGURA 9 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA OXIDAÇÃO DO ÁLCOOL PRIMÁRIO A ÁCIDO CARBOXÍLICO MEDIADA PELO REAGENTE TEMPO.....	29
FIGURA 10 -	REPRESENTAÇÃO DA RELAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM REAGENTE TEMPO.....	31
FIGURA 11 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RAIOS DE GIRAÇÃO DE UM POLÍMERO E A COMPARAÇÃO ENTRE O RAIOS DE	

	GIRAÇÃO E O VOLUME HIDRODINÂMICO DE UMA MOLÉCULA.....	34
FIGURA 12 -	DIAGRAMA ILUSTRATIVO DO FENÔMENO DE ESPALHAMENTO DE LUZ POR UMA PARTÍCULA. UM FEIXE VERTICALMETE POLARIZADO (I_0) PROVOCANDO A POLARIZAÇÃO DA PARTICULA IRRADIADA EM DIFERENTES DIREÇÕES (I) A UM ÂNGULO θ E DISTÂNCIA DO OBSERVADOR (r).....	35
FIGURA 13 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GRÁFICO DE ZIMM. ONDE EXTRAPOLAÇÃO À $c=0$ TEM-SE A_2 E AO $\theta=0$ OBTEM-SE O R_g , E O COEFICIENTE LINEAR CORRESPONDE A $1/M_w$	37
FIGURA 14 -	MOL DE ÁCIDO CARBOXÍLICO FORMADO NA GALACTOMANANA PELA MASSA INICIAL DE POLÍMERO UTILIZADA EM FUNÇÃO DO TEMPO EM MINUTOS, DURANTE A REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE GOMA GUAR (GN) COM REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL).....	48
FIGURA 15 -	MOL DE ÁCIDO CARBOXÍLICO FORMADO NA GALACTOMANANA PELA MASSA INICIAL DE POLÍMERO UTILIZADA EM FUNÇÃO DO TEMPO EM MINUTOS, DURANTE A REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE GOMA GUAR (GN) COM REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL).....	49
FIGURA 16 -	MOL DE ÁCIDO CARBOXÍLICO FORMADO NA GALACTOMANANA PELA MASSA INICIAL DE POLÍMERO UTILIZADA EM FUNÇÃO DO TEMPO EM MINUTOS, DURANTE A REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA COM REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL).....	49
FIGURA 17 -	ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$) DAS GALACTOMANANAS DE ALFARROBA (1) E GUAR (2) NATIVA E OXIDADAS.....	51

FIGURA 18 -	AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ENTRE (4000 – 2000 cm^{-1}) DA GALACTOMANANA DE GUAR NATIVA E OXIDADAS.....	52
FIGURA 19 -	ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ENTRE (2000 - 500 cm^{-1}) DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA E OXIDADAS.....	53
FIGURA 20 -	ESPECTRO BIDIMENSIONAL HMQC (C–H) RESOLVIDO PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA EM D_2O , A 70°C.....	55
FIGURA 21 -	ESPECTRO BIDIMENSIONAL HSQC (C–H) RESOLVIDO PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA OXIDADA AMOSTRA 5, EM D_2O A 70°C.....	55
FIGURA 22 -	ESPECTROS DE RMN ^1H DA GALACTOMANA DE ALFARROBA REFERENTE A REGIÃO DO HIDROGÊNIO LIGADO AO CARBONO ANOMÉRICO. AMOSTRA SOLUBILIZADA EM D_2O A 70°C.....	57
FIGURA 23 -	ESPECTROS DE RMN ^1H DA GALACTOMANA DE GUAR REFERENTE A REGIÃO DO HIDROGÊNIO LIGADO AO CARBONO ANOMÉRICO C-1. AMOSTRA SOLUBILIZADA EM D_2O A 70°C.....	58
FIGURA 24 -	CROMATOGRAMA DE TROCA IÔNICA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DA AMOSTRA 5 DA GUAR.....	63
FIGURA 25 -	PERFIL DE ELUIÇÃO DO SEC PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA E OXIDADAS.....	69
FIGURA 26 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA GALACTOMANANA E SEUS RESPECTIVOS MEROS.....	71
FIGURA 27 -	RELAÇÃO ENTRE O RAIOS DE GIRAÇÃO (R_g^2) E O COMPRIMENTO DE PERSISTÊNCIA (L_p) PARA A ALFARROBA NATIVA (NA).....	72
FIGURA 28 -	GRÁFICO DE ZIMM DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA (AN) EM TRIS-HCl 0,1 MOL/L, pH 8,0, UTILIZANDO AZIDA A 200 PPM, EM TEMPERATURA DE 25°C.....	73

FIGURA 29 - GRÁFICO DE ZIMM DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA OXIDADA AMOSTRA 5, EM TRIS-HCl 0,1 MOL/L, pH 8,0, UTILIZANDO AZIDA A 200 PPM, EM TEMPERATURA DE 25°C.. 74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS URÔNICOS PRESENTES NA AMOSTRA.....	46
TABELA 2 -	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES NEUTROS PRESENTES NA AMOSTRA.....	47
TABELA 3 -	TEMPO DE RETENÇÃO E VALORES REFERENTES AO COEFICIENTE ANGULAR E LINEAR, OBTIDOS A PARTIR DA CURVA PADRÃO DOS MONOSSACARÍDEOS DE GALACTOSE, MANOSE, ÁCIDO GALACTURÔNICO E ÁCIDO MANURÔNICO.....	47
TABELA 4 -	CONSTANTES DE VELOCIDADES (k) E ORDEM DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GOMA GUAR E ALFARROBA.....	50
TABELA 5 -	BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA (AN) E GUAR NATIVA (GN) E AMOSTRAS OXIDADAS DE 1 A 5.....	53
TABELA 6 -	ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN BIDIMENSIONAL HSQC (C-H) PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA (AN) E GUAR NATIVA (GN).....	56
TABELA 7 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS REFERENTES AOS HIDROGÊNIOS DO CARBONO ANOMÉRICO C ¹ -H. OBTIDOS ATRAVÉS DOS ESPECTROS DE RMN ¹ H DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA.....	60
TABELA 8 -	DESLOCAMENTOS QUÍMICOS REFERENTES AOS HIDROGÊNIOS DO CARBONO ANOMÉRICO C ¹ -H. OBTIDOS ATRAVÉS DOS ESPECTROS DE RMN ¹ H DA GALACTOMANANA DE GUAR.....	60

TABELA 9 -	DADOS REFERENTES A COMPOSIÇÃO PROTEICA E ÁCIDO URÔNICO DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA NATIVA E OXIDADAS.....	62
TABELA 10 -	DADOS REFERENTES A DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM (%) DE AÇÚCARES NEUTROS E ÁCIDOS PRESENTES NA ALFARROBA NATIVA (AN) E OXIDADAS. PROPORÇÃO DE MANOSE (MAN), GALACTOSE (GAL), ÁCIDO GALACTURÔNICO (ÁC. GAL) E ÁCIDO MANURÔNICO (ÁC. MAN) PRESENTE NAS AMOSTRAS.....	64
TABELA 11 -	DADOS REFERENTES A DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM (%) DE AÇÚCARES NEUTROS E ÁCIDOS PRESENTE NA GUAR NATIVA (AN) E OXIDADAS. PROPORÇÃO DE MANOSE (MAN), GALACTOSE (GAL), ÁCIDO GALACTURÔNICO (ÁC. GAL) E ÁCIDO MANURÔNICO (ÁC. MAN) PRESENTE NAS AMOSTRAS.....	66
TABELA 12 -	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE GUAR NATIVA (GN) E AMOSTRA 1, AMOSTRA 2, AMOSTRA 3, AMOSTRA 4, AMOSTRA 5.....	67
TABELA 13 -	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ALFARROBA NATIVA E AMOSTRA 1, AMOSTRA 2, AMOSTRA 3, AMOSTRA 4, AMOSTRA 5.....	70
TABELA 14 -	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS DE ALFARROBA NATIVA E AMOSTRA 1, AMOSTRA 2, AMOSTRA 3, AMOSTRA 4 E AMOSTRA 5, A PARTIR DOS GRÁFICOS DE ZIMM OBTIDOS PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO.....	75
TABELA 15 -	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR NATIVA E AMOSTRA 1, AMOSTRA 2, AMOSTRA 3, AMOSTRA 4 E AMOSTRA 5 A PARTIR DOS GRÁFICOS DE ZIMM OBTIDOS PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A₂: Segundo coeficiente virial

AN: Alfarroba nativa

c: Concentração

HPAEC-PAD: Cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica acoplada a detecção por amperometria pulsada

dn/dc: Incremento do índice de refração da amostra em função da variação da concentração

IR: Espectroscopia no Infravermelho

G: representação da substituição por unidade de galactose em α -(1→6)

Gal: Galactose

GN: Guar nativa

GP: Grau de polimerização

HMQC: *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation spectroscopy*

I₀: Intensidade de Luz laser incidente

IR: Detector do índice de refração

I_θ: Intensidade da luz laser espalhada

k: Constante de velocidade

K_c: Constante óptica determinada de acordo com a fonte de luz laser incidente verticalmente polarizada

L: Comprimento do contorno do polímero

L_p: Comprimento de persistência

M: representação das unidades de manose da cadeia principal em ligação β -(1→4)

Man: Manose

M_o: Massa molar do mero

M_w/M_n: Índice de Polidispersão

M_w: Massa molar média-ponderal em peso

M_n: Massa molar média-ponderal numérica

n₀: Índice de refração do solvente

N_A: Número de Avogadro

P_θ: Fator de forma

r: Distância entre a partícula e o observador

RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

R_θ: Razão de Rayleigh

SEC: Cromatografia por exclusão de tamanho

TEMPO: N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina

Tris-HCl: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

VIS: Detector viscosimétrico

α: Constante de Mark-Houwink

η₀: Viscosidade do solvente

η_r: Viscosidade relativa

η_{sp}: Viscosidade específica

θ: Ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada

λ: Comprimento de onda

Φ₀: Constante de Flory-Fox

[η]: Viscosidade intrínseca

[η]_θ: Corresponde à viscosidade intrínseca no solvente theta (θ)

<S₂>^{1/2} ≡ R_g: Raio de giração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	GALACTOMANANAS.....	21
2.2	GUAR (<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L. Taub.).....	24
2.3	ALFARROBA (<i>Ceratonia siliqua</i> L.).....	25
2.4	MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS.....	26
2.4.1	Oxidação do C-6 das galactomananas com N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO).....	27
2.5	MÉTODOS DE ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO MACROMOLECULAR E HIDRODIÂMICA.....	31
2.5.1	Análise cromatográfica de exclusão por tamanho (SEC).....	31
2.5.2	Espalhamento de luz laser estático.....	34
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	PROCEDÊNCIA DAS GALACTOMANANAS.....	39
4.2	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS GALACTOMANANAS DE SEMENTES DE GUAR E ALFARROBA.....	39
4.2.1	Modificação química via oxidação com o reagente TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina).....	39
4.2.2	Conversão para forma ácida das galactomananas oxidadas.....	40
4.3	ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR e ALFARROBA OXIDADA COM O REAGENTE TEMPO.....	41
4.3.1	Espectroscopia de Infravermelho.....	41
4.3.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	41
4.3.3	Determinação qualitativa e quantitativa de ácidos urônicos.....	42
4.3.4	Dosagem colorimétrica de proteínas.....	43

4.3.5	Análise cromatográfica de exclusão por tamanho (SEC).....	44
4.3.6	Espalhamento de luz estático e gráfico de Zimm.....	45
4.3.7	Hidrólise.....	45
4.3.8	Cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica acoplada a detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD).....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
5.1	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS GALACTOMANANAS PROVENIENTES DE SEMENTES DE GUAR E ALFARROBA.....	48
5.1.1	Modificação química via oxidação com o reagente TEMPO.....	48
5.2	ANÁLISES QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA OXIDADAS COM O REAGENTE TEMPO.....	51
5.2.1	Espectroscopia no Infravermelho.....	51
5.2.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	54
5.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA NATIVAS E OXIDADAS COM O REAGENTE TEMPO.....	61
5.2.1	Determinação de ácidos urônicos e dosagem de proteína.....	61
5.3.2	Cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica acoplada a detecção por amperometria pulsada.....	62
5.3.3	Análise cromatográfica de exclusão por tamanho (SEC).....	66
5.3.4	Espalhamento de Luz estático e Gráfico de Zimm.....	73
6	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos podem ser constituídos por diversas unidades idênticas de monossacarídeos (homopolissacarídeos) ou diferentes entre si (heteropolissacarídeos) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). Dentre estes polissacarídeos, os carboidratos extraídos das sementes, como as galactomananas, xiloglucana, glucanas e mananas, são amplamente utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

As galactomananas constituem o segundo maior grupo de polissacarídeos de armazenamento no mundo vegetal, oriundos, em maior parte, da família *Leguminosae* (DEA; MORRISON, 1975; DEY, 1978; SCHERBUKHIN; ANULOV, 1999). Estas são empregadas em diversos setores da indústria, em especial na área alimentícia (ELIASSON, 2006). As modificações químicas na estrutura de biopolímeros são empregadas como uma forma de obter moléculas com graus de complexidade variados, para diferentes aplicações tecnológicas. Essas modificações podem aumentar a retenção de água em um determinado sistema, tornar a molécula mais ou menos solúvel em meio aquoso, adicionando-se grupamentos hidrofílicos ou hidrofóbicos, respectivamente, aumentar o poder emulsificante, entre outras características as quais tornam a molécula mais interessante para a indústria (WHISTLER, BEMILLER, 1993; CERQUEIRA *et al.* 2001; PRAJAPATI, *et al.* 2013).

O laboratório de biotecnologia em polissacarídeos da Universidade Federal do Paraná (BioPol – UFPR) tem estudado a anos as galactomananas, desde o aperfeiçoamento na extração a partir de espécies nativas da flora brasileira, blendas com outros polissacarídeos, e até a modificação química. Como exemplo entre os inúmeros trabalhos tem-se o de Ono e colaboradores (2004), que sintetizaram derivados sulfatados de galactomananas extraídas de sementes de *Leucaena leucocephala* com a finalidade de estudar a citotoxicidade e atividade antiviral. Pires e colaboradores (2001) estudaram as propriedades biológicas de galactomananas nativas e quimicamente modificadas por sulfatação de *Senna macranthera*. A partir deste trabalho, concluíram que esta possui atividade anticoagulante.

A oxidação seletiva de álcoois primários em polissacarídeos utilizando o reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) foi adaptada de uma metodologia utilizada por Semmelhack e colaboradores (1983). Nooy e colaboradores

(1994, 1995, 1997) empregaram essa reação, utilizando vários carboidratos e obtiveram alto rendimento, seletividade e baixa taxa de despolimerização. Dentre as modificações químicas realizadas por pesquisadores do BioPol, Sierakowski e colaboradores (2000) oxidaram seletivamente a galactomanana de *Leucaena leucocephala*, gerando grupos de aldeídos como intermediários da reação, com a finalidade de alquilar a estrutura, deixando a molécula com um caráter mais anfifílico.

A caracterização desses biopolímeros, após modificação química, é normalmente realizada em condições que não são as de equilíbrio ou através de técnicas que não contemplam a descrição das propriedades macromoleculares e hidrodinâmicas dos derivados. Assim, ainda não foram completamente elucidadas, para as galactomananas após as modificações químicas com reagente TEMPO, suas reais propriedades macromoleculares. Esta elucidação faz-se necessária para obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis, além da obtenção de informações importantes sobre os polímeros, estudando-se a estabilidade em solução, as condições para formação de agregados e a influência da força iônica do meio (FREITAS *et al.*, 2010, 2011).

Tendo em vista a necessidade de se determinar as propriedades macromoléculas e hidrodinâmicas de polissacarídeos quimicamente modificados, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades físico-químicas das galactomananas de guar e alfarroba, após oxidação seletiva de álcoois primários com o reagente TEMPO.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GALACTOMANANAS

A maior parte das galactomananas de origem vegetal é extraída do endosperma de sementes de plantas leguminosas. Este polissacarídeo funciona como reserva de carboidratos (ANDERSON, 1949; REID; MEIER, 1970) com a função biológica de fornecer nutrientes para a germinação e reter água por solvatação, impedindo a desidratação da semente e a possível desnaturação de proteínas essenciais a esse processo (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

As galactomananas são polissacarídeos neutros que têm a propriedade de formar soluções muito viscosas em baixas concentrações poliméricas. São também denominadas e comumente conhecidas como gomas (DEA; MORRISON, 1975). Possuem uma cadeia principal formada por D-manopiranoose (M ou Man) unidas por ligação glicosídica do tipo β -(1 \rightarrow 4) e ramificações D-galactopiranoose (G ou Gal) unidas por ligação α -(1 \rightarrow 6) (FIGURA 1) (DEA; MORRISON, 1975; DEY, 1978; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

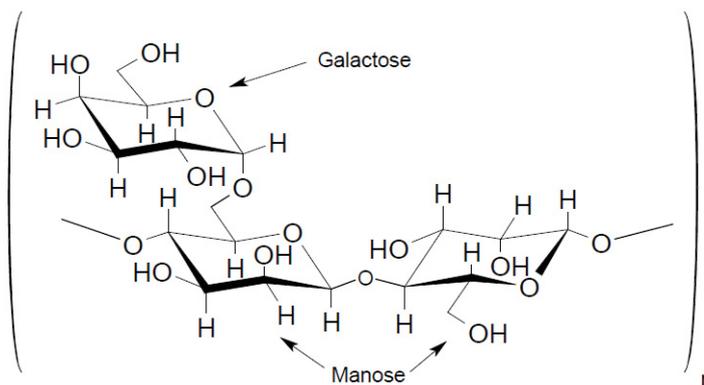


FIGURA 1 – ESQUEMA DE UM SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE GALACTOMANANA DE ORIGEM VEGETAL.

LEGENDA: M: representação das unidades de manose da cadeia principal em ligação β -(1 \rightarrow 4). G: representação da substituição por unidade de galactose em α -(1 \rightarrow 6).

FONTE: O autor.

As galactomananas diferem na proporção de Man/Gal (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005), e também apresentam diferentes massas molares e disposição

estrutural da cadeia (WHISTLER, 1973), conferindo a elas propriedades químicas e variadas aplicações. A razão Man/Gal depende da fonte de extração do polissacarídeo, e varia entre 10 a 1. O teor de galactose determina a solubilidade em água, quanto maior a quantidade deste, mais solúvel a galactomanana se torna, devido a melhor hidratação gerada pelas regiões ricas em galactose. A baixa solubilidade em água faz com que galactomananas como a alfarroba, a qual possui baixo grau de substituição de galactose, tenham uma tendência maior a agregar em solução.

A substituição da galactose α - (1 \rightarrow 6) na manana ajuda na solubilização do polissacarídeo, por promover uma barreira entrópica (e talvez estérica) na cadeia ordenada da manose. Assim, uma vez que a hidrofobicidade da cadeia é devida a uma redução de entropia, considera-se que as cadeias da manana sejam relativamente menos hidrofílicas que as unidades de galactose (PICOUT *et al.*, 2002). Devido a este fato, as galactomananas com conteúdo de galactose inferior a 10% são insolúveis em água e formam precipitados à temperatura ambiente, por causa das fortes interações intermoleculares entre as cadeias de manose não galactosilada (BOURBON *et al.*, 2010; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005; DEA, 1987; MCCLEARY *et al.*, 1981; DEA; MORRISON, 1975;). Assim, como exemplo, a goma guar apresenta maior grau de substituição em relação à alfarroba, conforme mostrado na FIGURA 2. Esta característica torna a goma guar mais solúvel devido a maior hidratação das regiões ricas em galactose (DEA, CLARK, MCCLEARY, 1986).

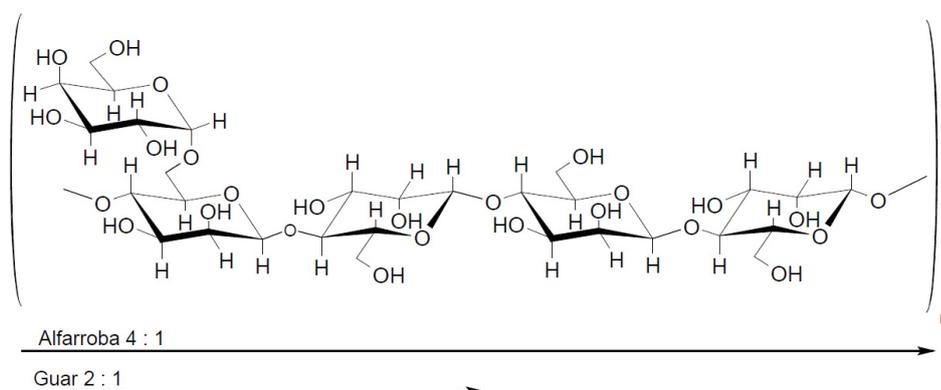


FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA COMPOSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES MONOSSACARÍDICAS DAS GALACTOMANANAS DE ALFARROBA (*Ceratonia siliqua*) e GUAR (*Cyamopsis tetragonolobus* L. (Taub.)).
 FONTE: O autor.

Conforme Dea e Morrison (1975) há três possibilidades para a estrutura fina da molécula de galactomanana, ou seja, para a distribuição de G ao longo da cadeia principal de M, de acordo com a FIGURA 3. A primeira possibilidade apresentada é a de um arranjo regular, onde um mero constituído por uma M ligada a uma G é intercalado por um sem a presença desta substituição. A outra possibilidade é o arranjo irregular desses meros e eles estarem presentes no polissacarídeo em blocos.

Diversos trabalhos têm contribuído para a elucidação da estrutura química das galactomananas. Através de técnicas de metilação, oxidação com periodato e trióxido de crômio. Como exemplo, Ganter e colaboradores (1993) estudaram a estrutura química de galactomananas nativas da flora brasileira, *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman* e *Schizolobium parahybum*. McCleary, e McCleary e colaboradores (1985) estudaram a estrutura fina das galactomananas de guar e alfarroba, realizando uma hidrólise com enzimas a partir de cultura de *Aspergillus niger* e de sementes de guar germinada (3-D-manase). Os dados obtidos foram processados com auxílio de um software e os autores puderam identificar a estrutura fina das galactomananas em questão, as quais apresentaram um padrão de distribuição de galactose de forma irregular. (McCLEARY *et al.*, 1985).

a) Arranjo regular



b) Arranjo irregular



c) Arranjo em blocos

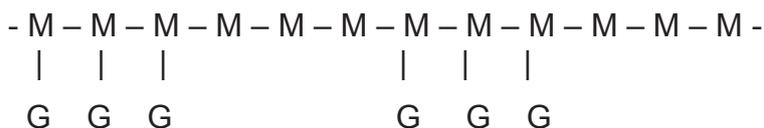


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ARRANJO DAS GALACTOMANANAS.

LEGENDA: M: representa as unidades de manose da cadeia; G: representa as unidades de galactose da cadeia de galactomanana.

FONTE: Dea e Morrison (1975)

Sharman e colaboradores (1978) realizaram estudos sobre a relação entre a massa molar, polidispersidade, relação média de Man e Gal, e a viscosidade intrínseca $[\eta]$ de seis galactomananas diferentes, entre elas as de *Cyamopsis tetragonoloba* (guar) e *Ceratonia siliqua* (alfarroba). Wu e colaboradores (2012) estudaram a conformação molecular de quatro tipos de galactomananas extraídas de sementes, com diferentes razões de Man/Gal, e posteriormente realizadas simulações das conformações. A partir desse trabalho concluiu-se que a proporção de Man/Gal desempenha um papel fundamental na conformação da cadeia assim como os grupos laterais de galactose e seu padrão de distribuição ao longo da cadeia.

As propriedades reológicas das galactomananas determinam seu uso industrial como emulsificantes, espessantes e dispersantes. A utilização dessas gomas é realizada em diversos setores da indústria como, farmacêutica, cosmética, petrolífera, perfuração, explosivos, entre outras (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005; SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005).

Dentre as galactomananas que possuem importância comercial, três se destacam: a goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), tara (*Caesalpinia spinosa*) e alfarroba (*Ceratonia siliqua*) (DEA; MORRISON, 1975; DAKYA, 2008).

2.2 GUAR (*Cyamopsis tetragonolobus* L. Taub.)

A espécie *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub. é conhecida popularmente como goma guar ou guaré. É uma planta leguminosa originária principalmente da região de Bangladesh, Índia e Paquistão. Foi introduzida nos Estados Unidos em 1903 e em 1953 a goma começou a ser produzida industrialmente (HERALD, 1986).

Pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, gênero *Cyamopsis*, tribo *Faboideae*. As partes aéreas da planta estão apresentadas na FIGURA 4, onde se observa as vagens donde são extraídas as sementes que possuem um comprimento em torno de 3,5-6,0 cm, com cor branca, cinza ou negra (MONGE, 1994).



FIGURA 4 – FOTO DAS PARTES AÉREAS DA PLANTA DE *Cyamopsis tetragonolobus* (L.) Taub. ONDE OBSERVA-SE AS VAGENS, FOLHAS E FLORES DA PLANTA.

FONTE: <http://guarcultivationinindia.blogspot.com.br/p/guar-seed-and-guar-gum-photo.html>

Devido a sua propriedade viscosa, a goma guar é extensivamente explorada por diversos setores da indústria (CHUDZIKOWSKI, 1971). A goma guar apresenta uma relação de Man/Gal de 2 (FIGURA-2, pag. 21), essa característica é responsável pela capacidade de inchamento e solubilidade da goma em água fria e sua menor tendência de interação com outros polissacarídeos (McCLEARY *et al.*, 1985; DEA, 1987; NEUKON, 1989).

2.3 ALFARROBA (*Ceratonia siliqua* L.)

Goma de alfarroba é obtida das sementes da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.), que crescem em torno do Mar Mediterrâneo, na Espanha, Portugal e Marrocos, onde mais atenção é dada para seu cultivo sistemático. É conhecida também como “locust bean” ou “carob tree” (ELIASSON, 2006).

Ceratonia siliqua L. é uma espécie subtropical da família *Leguminosae* (sin. *Fabaceae*), subfamília *Caesalpinioidea* (TUCKER, 1992) (FIGURA 5) .



FIGURA 5 – FOTO DAS PARTES AÉREAS DA PLANTA DE *Ceratonia siliqua* L. ONDE OBSERVA-SE AS FOLHAS E VAGENS.

FONTE: <https://australianseed.com/shop/item/ceratonia-siliqua/exotic-a-l>

A goma de alfarroba forma soluções viscosas a concentrações relativamente baixas. Devido ao seu baixo grau de galactosilação, possui propriedades sinérgicas com outros polissacarídeos como a carragenana, ágar e goma xantana, formando géis mais resistentes e mais elásticos (GOYCOOLEA; MORRIS; GIDLEY, 1995).

As gomas de alfarroba e guar, como já mencionado, são as galactomananas mais utilizadas industrialmente e possuem elevadas taxas de importação no Brasil. Uma excelente forma de aumentar os índices de exportação nacional desses polissacarídeos é agregar valor ao insumo, através do uso de tecnologias como as modificações químicas.

2.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE POLISSACARÍDEOS

As galactomananas possuem álcoois primários e secundários que podem ser quimicamente modificados com a finalidade de melhorar a viscosidade ou a solubilidade. Como exemplo de modificações de grande importância industrial encontram-se os derivados hidroxialquilados obtidos por tratamento de galactomananas com óxido de etileno ou óxido de propileno em meio alcalino, e produtos carboximetilados, obtidos por esterificação de certa porção do grupo hidroxila com ácido monocloroacético. Na FIGURA 6 há cinco tipos de modificações químicas, comercialmente disponíveis, da galactomanana de guar. Derivados catiônicos são obtidos por tratamento de galactomananas com aminas orgânicas tais como o cloreto de 2-hidroxi-3-cloropropiltrimetilamônio ou com cloreto de 2,3-

epoxipropiltrimetilamônio (ELIASSON, 2006). Outra modificação química utilizando galactomananas é através da oxidação hidrolítica ou degradação enzimática, a partir de enzimas extraídas de plantas ou fungos, como uma forma de auxiliar no entendimento da estrutura fina do polissacarídeo (McCLEARY, 1986).

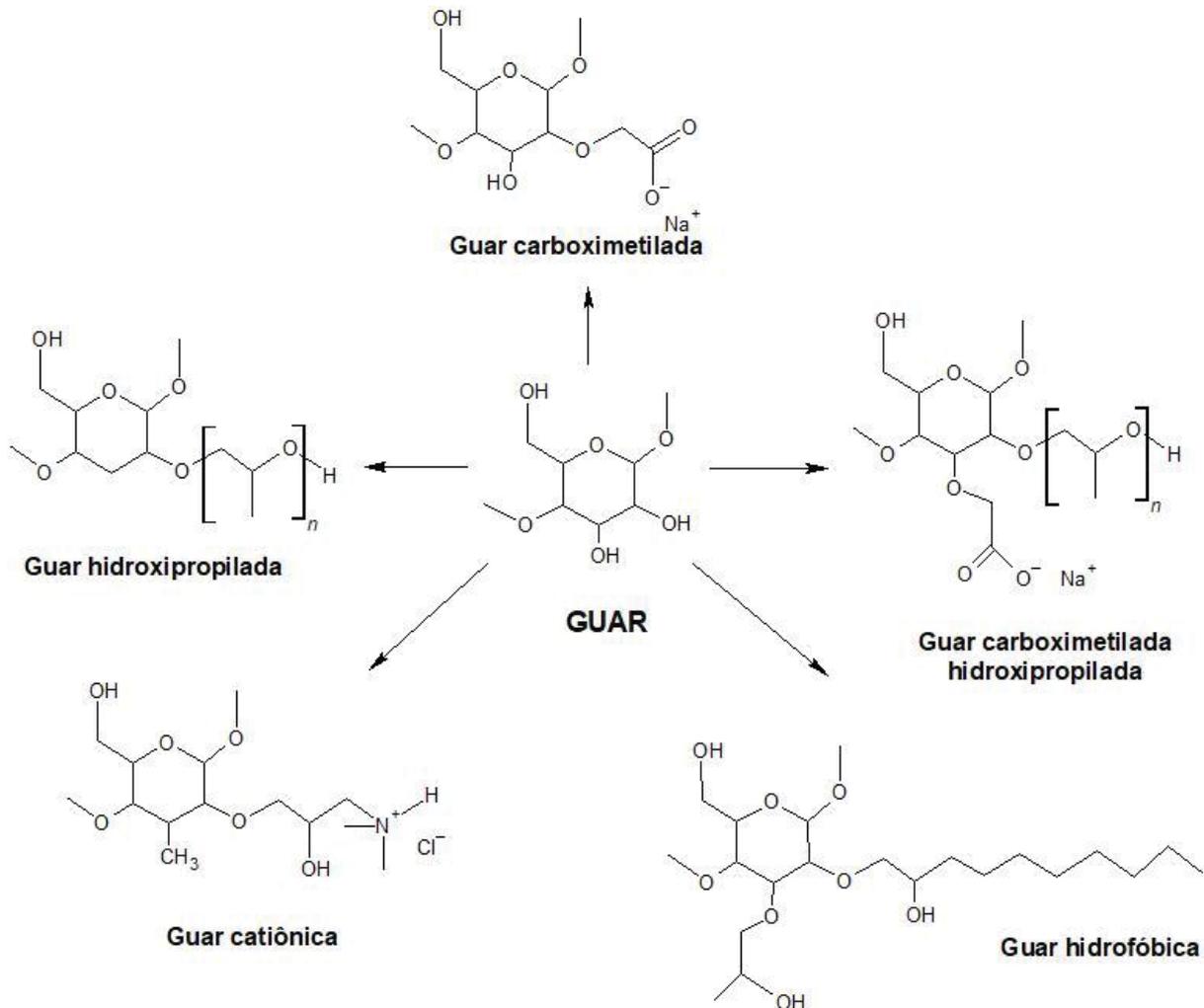


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GALACTOMANANA DE GUAR E SUAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS MAIS COMUNS.

FONTE: Adaptado de Phillip (2000).

2.4.1 Oxidação do C-6 das galactomananas com N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO)

O método de oxidação de polissacarídeos com óxidos de nitrogênio foi avaliado por Maurer e Drefahl (1942) e Yackel e Kenyon (1942) utilizando inicialmente a

celulose. Nesses estudos foi constatado que há uma preferência pela oxidação dos álcoois primários em carboidratos com obtenção de ácidos urônicos.

Monômeros e oligômeros podem ser oxidados seletivamente na presença de oxigênio utilizando platina como catalisador (Pt/O₂), entretanto, moléculas mais complexas como os polissacarídeos reagem lentamente e com um baixo grau de oxidação (ASPINALL; NICOLSON, 1960; BEKKUM, 1991).

Semmelhack e colaboradores (1983) utilizaram o radical orgânico N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) na oxidação seletiva de álcoois primários a compostos carbonílicos. Desde então, o método tem sido utilizado por diversos autores, para a oxidação de diferentes polissacarídeos (NOOY *et al.*, 1994, 1995 e 1996; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 2003).

O reagente TEMPO (2) (FIGURA 7) é um radical estável que é oxidado pelo íon hipobromito, gerando o íon nitrosonium (nitrosônio), um forte oxidante com alta afinidade por álcoois primários. Durante a oxidação, o íon nitrosonium (1) oxida o álcool primário presente na molécula em aldeído, e é reduzido à hidroxilamina (3). No meio reacional a hidroxilamina é oxidada pelos reagentes oxidantes presente na reação e convertida novamente em radical TEMPO. O íon hipobromito é regenerado através da oxidação do íon hipoclorito presente na solução, podendo ser utilizado novamente, encerrando assim o ciclo catalítico (BRAGD *et al.*, 2000; NOOY *et al.*, 1994).

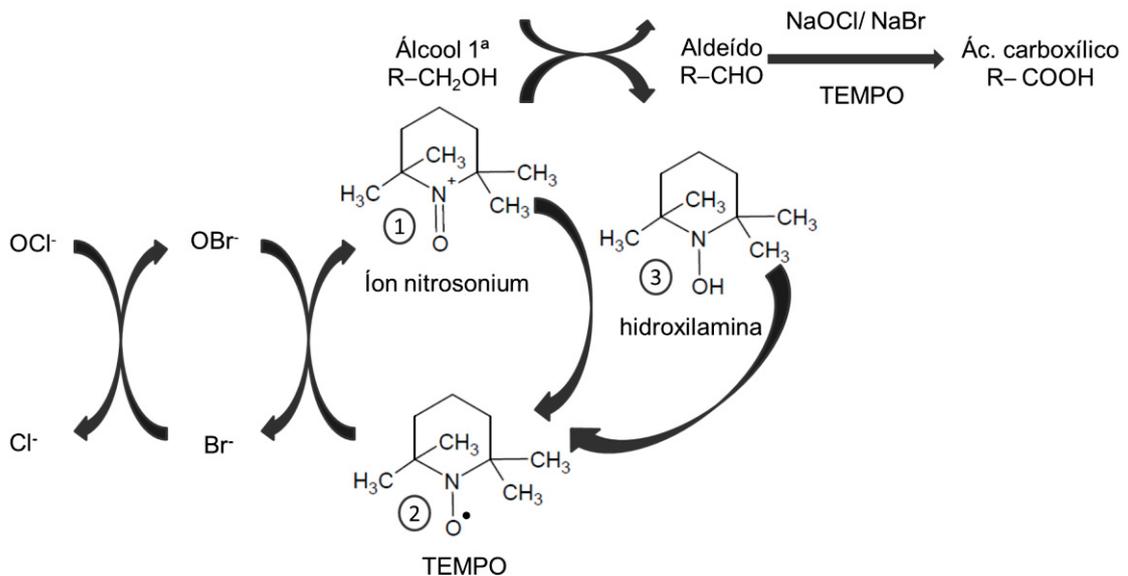


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO UTILIZANDO O REAGENTE TEMPO (N-OXIL-2,2,6,6-TETRAMETILPIPERIDINA).

LEGENDA: (1) íon nitrosonium; (2) reagente TEMPO; (3) hidroxilamina.

FONTE: Adaptado de Bragd *et al.*, 2010.

Após a reação de oxidação com TEMPO, a estrutura oxidada da galactomanana esperada esta representada na FIGURA 8.

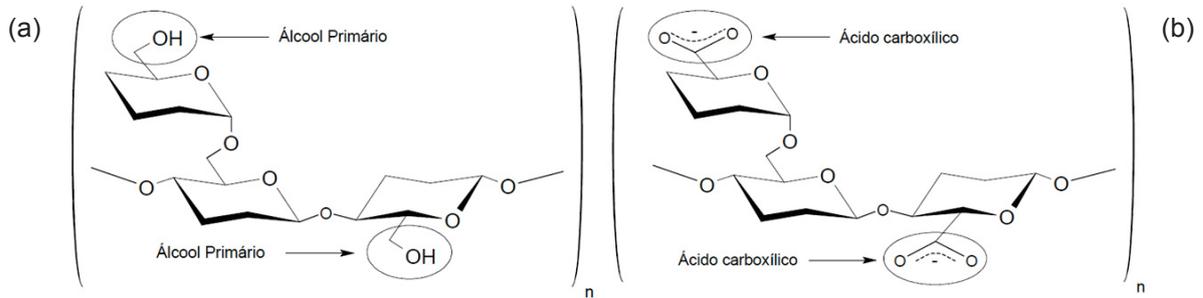


FIGURA 8 – ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE GALACTOMANANA (a) ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA MOLÉCULA DE GALACTOMANANA APÓS OXIDAÇÃO (b).

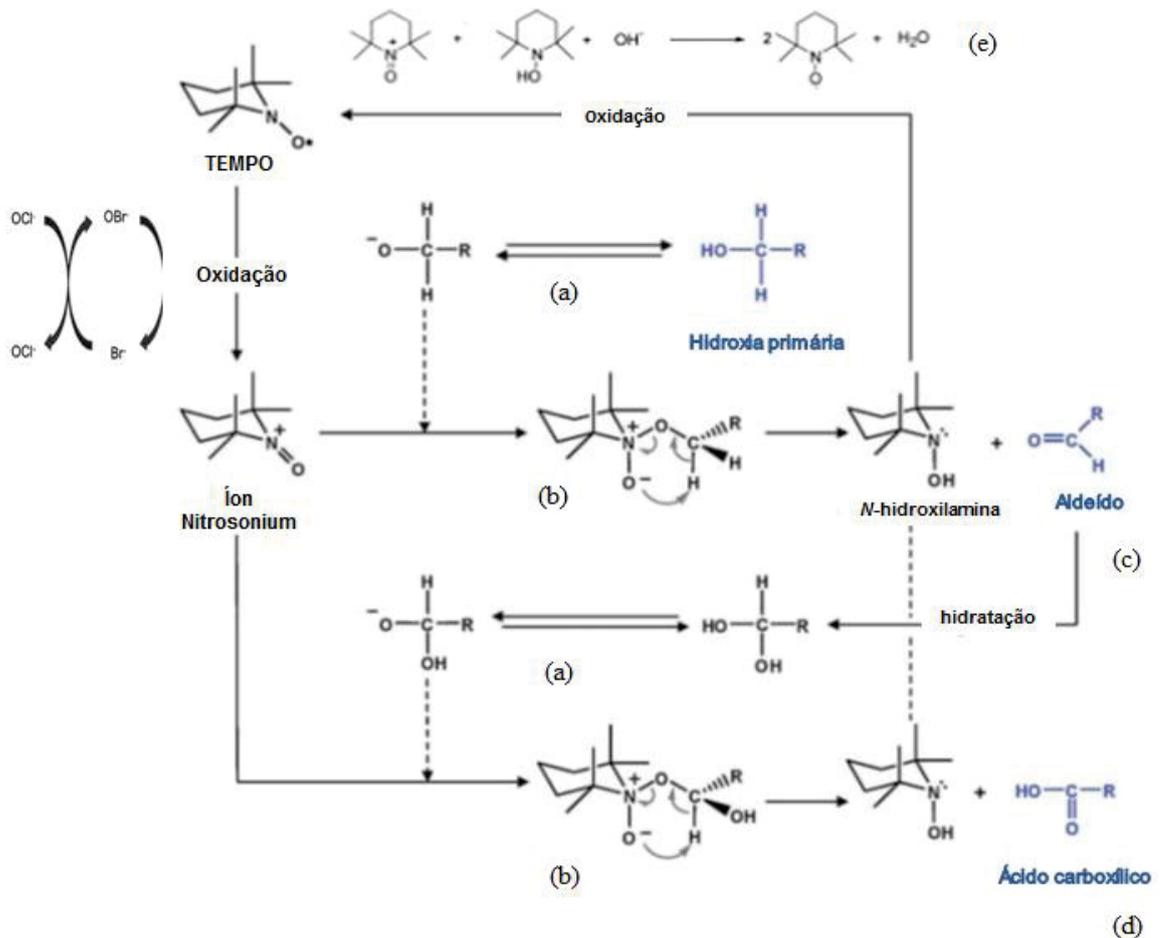


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA OXIDAÇÃO DO ÁLCOOL PRIMÁRIO A ÁCIDO CARBOXÍLICO MEDIADA PELO REAGENTE TEMPO.

LEGENDA: (a) ataque nucleofílico com formação de alcóxido; (b) ataque ao íon nitrosonium; (c) formação da carbonila do aldeído (d) formação do ácido carboxílico; (e) oxidação da hidroxilamina em reagente TEMPO.

FONTE: Adaptado de Isogai e colaboradores (2011).

A FIGURA 9 esquematiza o mecanismo de conversão do álcool primário a ácido carboxílico. Esta reação começa quando há, em meio alcalino a formação de um alcóxido, ou devido a um ataque nucleofílico do íon nitrosônio na hidroxila primária do polissacarídeo (a). Isso acarreta um ataque nucleofílico do alcóxido gerado ao íon nitrosônio (b). Posteriormente, a carbonila do aldeído é gerada quando o hidrogênio do carbono do polissacarídeo é atacado pelo alcóxido do TEMPO, fazendo com que o par de elétrons vá para a ligação C–O (c), o íon nitrosônio é assim convertido em hidroxilamina (d). O mesmo ocorre para o ácido carboxílico, de forma semelhante à carbonila do aldeído (ISOGAI *et al.*, 2011; SOUZA, 2009). A hidroxilamina pode ser convertida a reagente TEMPO através do oxidante como o íon OBr^- . Outra forma de regeneração é realizada quando há proporções equimolares de íon nitrosônio e hidroxilamina produzindo 2 mol de radicais TEMPO (e) (NOOY *et al.*, 1995).

O íon OBr^- é um oxidante mais reativo que o OCl^- , por este motivo a taxa de reação de oxidação é maior quando se acrescenta o Brometo de sódio (NaBr). Entretanto, vários autores vêm descrevendo a possibilidade de não acrescentar este sal. Bragd e colaboradores (2001) realizaram a reação sem a presença de NaBr e observaram que os resultados obtidos eram semelhantes as oxidações com a presença de NaBr, quando estas foram efetuadas a temperatura de 20°C e pH 8,5. A explicação é que quando não há a presença do NaBr o íon OCl^- é o responsável por oxidar o reagente TEMPO a íon nitrosônio e a hidroxilamina em reagente TEMPO.

A conversão dos álcoois primários do polissacarídeo a ácido carboxílico pode ser estimada através da titulação potenciométrica utilizando uma solução aquosa de NaOH durante o processo de oxidação. A formação dos grupos carboxílicos corresponde, dessa forma, a quantidade de NaOH utilizado no processo titulométrico (NOOY *et al.*, 1994; 1995). Esta conversão pode ser estimada através da equação estequiométrica da reação demonstrada na FIGURA 10.

De acordo com o esquema para cada 2 mol de NaClO 1 mol de NaOH é consumido com a finalidade de que 1 mol da hidroxila do álcool primário seja oxidada. A oxidação parcial de polissacarídeos solúveis em água foi estudada por Kato e colaboradores (2003), utilizando como polissacarídeo o amido. O grau de oxidação da hidroxila primária do carbono C-6 foi controlado pela adição de NaOH e do tempo de reação, obtendo produtos com graus de 0% a 100%. A caracterização dos derivados oxidados foi realizada através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de

hidrogênio (^1H) e carbono 13 (^{13}C), a qual revelou a presença de produtos não completamente oxidados e indicou a presença significativa de hemiacetais no C-6, formados como estruturas intermédias.

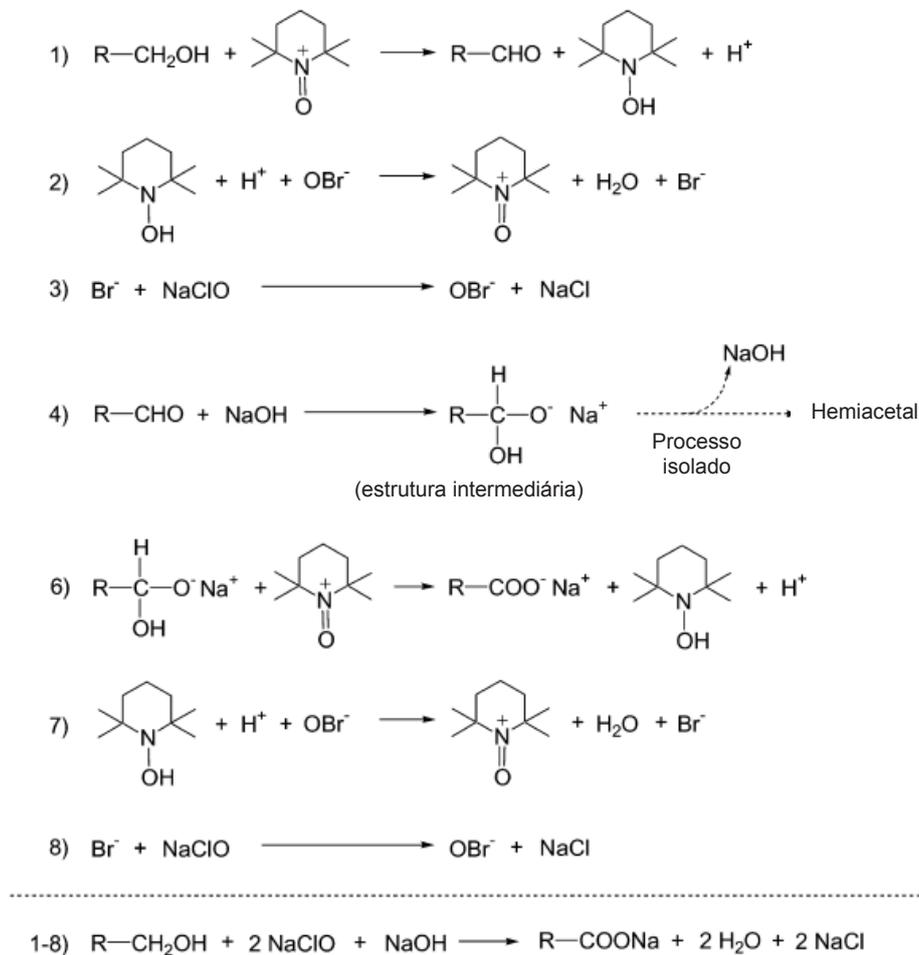


FIGURA 10 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA RELAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO COM REAGENTE TEMPO.

FONTE: Adaptado Kato (2003).

2.5 MÉTODOS DE ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO MACROMOLECULAR E HIDRODINÂMICA

2.5.1 Análise cromatográfica de exclusão por tamanho (SEC)

Cromatografia de exclusão por tamanho ou estérica (SEC) é um nome genérico para o processo de separação das moléculas de acordo com o seu volume hidrodinâmico (que pode ser correlacionado com a massa molar). A SEC consiste na separação cromatográfica de macromoléculas sintéticas, biopolímeros e proteínas com a utilização de géis porosos rígidos ou partículas contendo poros de diferentes tamanhos (fase estacionária) (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004). Moléculas menores do que os tamanhos dos poros entram mais facilmente nestes poros e ficam retidos na fase estacionária. Já os polímeros com maiores dimensões permanecem na fase móvel. Por isso, moléculas com volumes hidrodinâmicos maiores eluem primeiro, enquanto que as menores levam mais tempo para atingir a saída da coluna (TERAOKA, 2002).

Quando o polímero possui cadeias lineares e ramificações curtas, com distribuição unimodal, existe uma única relação entre o volume hidrodinâmico e a massa molar, por isso pode-se dizer que esses polímeros podem ser separados de acordo com a massa molar. Polímeros complexos, com ramificação de cadeia longa ou com uma variação na distribuição da composição, por outro lado, são separados de acordo com o tamanho ou seu volume hidrodinâmico. Por esta razão faz-se necessário detectores para que haja uma caracterização quantitativa pelo SEC da massa molar e outros parâmetros como o raio de giração (R_g) e a viscosidade intrínseca $[\eta]$, que também podem ser obtidos através desta combinação (KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004).

Dentre os detectores utilizados para esta finalidade está o de espalhamento de luz a laser, que determina a massa molar polimérica. A resposta deste detector depende da concentração da solução na amostra, a qual é determinada através do detector de índice de refração (IR). O detector viscosimétrico (VIS) é utilizado para determinar a viscosidade absoluta da macromolécula em solução (TRATHINGG, 2000, KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004).

A viscosidade intrínseca, também conhecida como número de viscosidade limite $[\eta]$, expressa em dL/g, e pode ser um parâmetro para indicar a dimensão espacial de um polímero em solução diluída (TRATHINGG, 2000; LUCAS, SOARES E MONTEIRO, 2001; STRIEGEL, 2003;). Pode ser utilizado para determinar a massa molar de macromolécula, desde que os parâmetros K e α da equação de Mark-Houwink-Sakurada $[\eta] = KM^\alpha$ sejam conhecidos. Para macromoléculas de cadeias

flexíveis, este parâmetro pode fornecer informação sobre as suas dimensões e a flexibilidade da cadeia (MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

O aumento da viscosidade da solução macromolecular (η) em relação ao solvente puro (η_0), a uma concentração c , pode ser medido pela viscosidade relativa (η_r).

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (1)$$

ou a viscosidade específica (η_{sp}):

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_r - 1 \quad (2)$$

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ é definida como a razão entre a viscosidade específica (η_{sp}) e a concentração, quando $c \rightarrow 0$, determinada de acordo com a equação 3:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (3)$$

em que: η corresponde à viscosidade da amostra, η_0 é a viscosidade do solvente. Como as medidas das concentrações em SEC são tipicamente muito baixas, $[\eta]$ pode ser aproximada pela η_{sp}/c (TRATHINGG, 2000).

Através dos dados de viscosidade intrínseca podemos calcular o raio de giração (R_g) utilizando a equação de Flory-Fox (1953) (equação 4). O $R_g \equiv \langle S^2 \rangle^{1/2}$ corresponde a raiz quadrada média entre os elementos da molécula e o centro de gravidade, fornecendo informações sobre as dimensões globais da cadeia e depende da distância ponta a ponta (FIGURA 11) (LUCAS, SOARES E MONTEIRO, 2001; TERAOKA, 2002):

$$[\eta]_{\theta} = 6^{3/2} \Phi_0 \frac{\langle S^2 \rangle_0^{3/2}}{M} \quad (4)$$

em que: $[\eta]_\theta$ corresponde à viscosidade intrínseca no solvente theta (θ), Φ_0 é a constante de Flory-Fox, $\langle S^2 \rangle^{1/2} \equiv R_g$ e M é a massa molar.

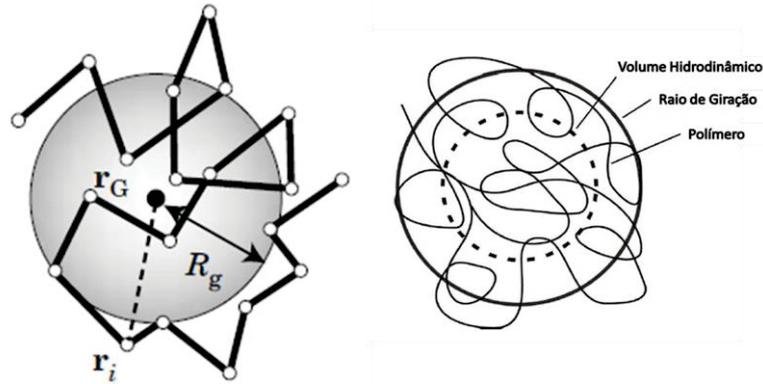


FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO RAIOS DE GIRAÇÃO DE UM POLÍMERO E A COMPARAÇÃO ENTRE O RAIOS DE GIRAÇÃO E O VOLUME HIDRODINÂMICO DE UMA MOLÉCULA.

FONTE: Teraoka (2002), Giacomelli (2008).

A SEC pode ser aplicada para determinar a distribuição da massa molar do polímero e também para estudar a agregação e fenômenos em solução. SEC também pode ser utilizada no estudo dos processos realizados por uma alteração do volume hidrodinâmico dos polímeros ou moléculas pequenas, degradação, hidrólise, dobramento das proteínas, polimerização e agregação (TRATHINGG, 2000).

2.5.2 Espalhamento de luz laser estático

A descrição matemática inicial utilizada para a caracterização molecular através do espalhamento de luz foi desenvolvida pelo Lord Rayleigh (RAYLEIGH, 1971). Em 1940 Debye e Zimm relacionaram a intensidade total de espalhamento de luz polarizada com a massa molar e a interação polimérica em solução, desde então este método tem sido muito utilizado para obter parâmetros macromoleculares importantes como massa molar, segundo coeficiente virial (A_2) e o raio de giração (R_g) (STRIEGEL, 2003). Lord Rayleigh demonstrou que partículas dispersas em qualquer meio atuam como fontes de luz, cuja intensidade da luz espalhada é I_θ , quando observada a um ângulo θ a certa distância em relação a um feixe de luz incidente (FIGURA 12) (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2003).

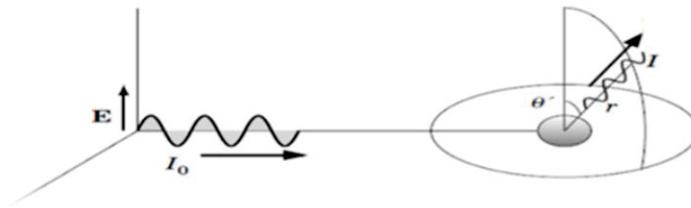


FIGURA 12 – DIAGRAMA ILUSTRATIVO DO FENÔMENO DE ESPALHAMENTO DE LUZ POR UMA PARTÍCULA. UM FEIXE DE LUZ LASER VERTICALMETE POLARIZADO (I_0) PROVOCA A POLARIZAÇÃO DA PARTICULA QUE IRRADIA EM DIFERENTES DIREÇÕES (I) A UM ÂNGULO θ E DISTÂNCIA DO OBSERVADOR (r).

FONTE: Teraoka (2002)

A razão entre a luz incidente e a luz espalhada é conhecida como razão de Rayleigh de acordo com a equação 5:

$$R_{\theta} = \left(\frac{I_{\theta}}{I_0}\right) r^2 \quad (5)$$

em que: R_{θ} é a razão de Rayleigh, I_{θ} é a luz espalhada, I_0 é a luz incidente, r^2 é a distância entre a partícula e o observador ao quadrado e θ é o ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada.

A intensidade de luz espalhada varia de acordo com o tamanho da partícula. Moléculas com tamanho menor que 1/20 avos do comprimento de onda da luz incidente (λ), espalham luz com a mesma intensidade e em todas as direções. Este espalhamento é isotrópico. Para obter os parâmetros macromoleculares utiliza-se a equação de Zimm (1948) descrita na equação 6:

$$\frac{K_c}{R_{\theta}} = \left(\frac{1}{M_w}\right) + 2A_2c \quad (6)$$

onde: M_w é a massa molar média-ponderal, A_2 corresponde ao segundo coeficiente virial, c é a concentração e K é uma constante óptica determinada de acordo com a fonte de luz incidente verticalmete polarizada, conforme a equação 7:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{(N_A \lambda^4)} \quad (7)$$

em que: n_0 é o índice de refração do solvente, dn/dc corresponde ao incremento do índice de refração da amostra em função da variação da concentração, N_A é o número de Avogadro, λ o comprimento de onda do laser.

Para moléculas maiores que $\lambda/20$ a intensidade de luz espalhada (I_θ) varia de acordo com o ângulo de observação. Isto ocorre porque o espalhamento poderá ocorrer de acordo com os vários centros da molécula (LUCAS; SOARES, MONTEIRO, 2003). Devido à diferença de intensidade de luz espalhada faz-se necessário acrescentar na equação 6 um fator de forma (P_θ) aos cálculos na equação de Zimm, conforme equação 8 a 10:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M_w P_\theta} \right) + 2A_2c \quad (8)$$

$$\frac{1}{P_\theta} = 1 + \frac{16 \pi^2 n^2}{3 \lambda_0^2} R_g^2 \text{sen}^2(\theta/2) \quad (9)$$

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \left[\left(1 + \frac{16 \pi^2 n^2 R_g^2}{3 \lambda_0^2} \right) \text{sen}^2(\theta/2) \right] + 2A_2c \quad (10)$$

A massa molar, o raio de giração e o segundo coeficiente virial são obtidos quando a razão Kc/R_θ é colocada em gráfico *versus* $\text{sen}^2(\theta/2) \times c$. A FIGURA 13 ilustra um diagrama de espalhamento, conhecido como diagrama de Zimm.

A partir do gráfico de Zimm demonstrado na FIGURA 13 e extrapolando-se à concentração zero e a ângulo constante obtém-se o segundo coeficiente virial (A_2), este parâmetro termodinâmico relaciona a interação entre o polímero e o solvente. Quando o A_2 é negativo indica que o polímero prefere interagir com ele mesmo ao solvente, ou seja, este é um mau solvente. Quanto mais positivo este valor maior a interação polímero-solvente, ou seja, tem-se um bom solvente. Em solvente θ não há interações preferenciais. Considerando-se a concentração constante e extrapolando ao ângulo zero obtém-se o raio de giração (R_g). Como coeficiente linear do gráfico de uma dupla extrapolação, a angulo zero e concentração zero, tem-se o recíproco da massa molar média-ponderal ($1/M_w$) (TERAOKA, 2002).

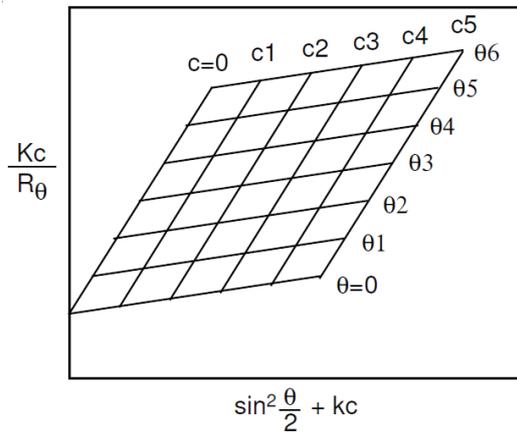


FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GRÁFICO DE ZIMM. ONDE EXTRAPOLANDO-SE À $c=0$ TEM-SE A_2 E À $\theta=0$ OBTEM-SE R_g , O COEFICIENTE LINEAR CORRESPONDE À $1/M_w$.

FONTE: Indian academy of sciences (2013);

http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/LightScat.pdf. Acesso em 30/10/2013

Utilizando-se de informações como massa molar, raio de giração e comprimento de contorno da cadeia polimérica, é possível determinar o comprimento de persistência (L_p) que corresponde ao comprimento rígido mínimo da cadeia, que é utilizado para especular sobre a flexibilidade da cadeia polimérica. O comprimento de persistência varia de acordo com o solvente utilizado, da temperatura, da concentração, da força iônica e pH (TERAOKA, 2002). Para um modelo de cadeias semi-flexíveis ou “worm like”, o cálculo é efetuado através da equação (11):

$$\langle S^2 \rangle_0 = \frac{L L_p}{3} - L_p^2 + \frac{2 L_p^3}{L} - \left(\frac{2 L_p^4}{L^2} \right) \left[1 - \exp\left(-\frac{L}{L_p}\right) \right] \quad (11)$$

em que: L é o comprimento do contorno do polímero que corresponde ao grau de polimerização (GP) multiplicado pelo comprimento do mero. O GP corresponde à razão entre a massa molar do polímero e a massa molar do mero.

Assim, a partir do exposto, este presente trabalho visa avaliar o comportamento macromolecular e hidrodinâmico das galactomananas de guar e alfarroba, após processo de oxidação seletiva com o reagente TEMPO. Será estimado o contraste entre a cinética de oxidação dos monossacarídeos oxidados em função do tempo, e o efeito da oxidação no comportamento macromolecular e hidrodinâmico desses polissacarídeos oxidados em comparação com os que não passaram pelas modificações químicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades macromoleculares dos derivados obtidos a partir da oxidação de galactomananas de goma guar e alfarroba com reagente TEMPO.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Oxidar seletivamente as galactomananas provenientes das sementes de guar e alfarroba;
- Quantificar os ácidos urônicos e açúcares neutros através da Cromatografia Líquida de alta eficiência por troca iônica acoplada a detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD);
- Caracterizar as amostras obtidas via oxidação através de análises de infravermelho (FTIR);
- Analisar por ressonância magnética nuclear do Hidrogênio (^1H), ^{13}C - ^1H (HMQC), as características estruturais dessas galactomananas;
- Analisar os parâmetros físico-químicos macromoleculares e hidrodinâmicos como massa molar, polidispersão, raio de giração, segundo coeficiente virial e viscosidade intrínseca das galactomananas nativas e oxidadas;
- Determinar o comprimento de persistência (L_p) das galactomananas nativas e oxidadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDÊNCIA DAS GALACTOMANANAS

A galactomanana de sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), comercializada pela Indian Industries Limited – B -5/7. M.I.A., Basni, Phase-Ist, Jodhpur-342005, foi fornecida pela empresa Herbarium S.A. – Produtos Naturais – Curitiba, Paraná, Brasil. A galactomanana de sementes de Alfarroba (*Ceratonia siliqua*) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich, Itália (Lote 034k0039).

4.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DE SEMENTES DE GUAR E ALFARROBA

4.2.1 Modificação química via oxidação com o reagente TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina)

O processo de oxidação seletiva com reagente TEMPO foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Nooy e colaboradores (1994, 1995, 1996); Sierakowski e colaboradores (2000).

As galactomananas (4 g) foram dispersas em 1L de água destilada sob agitação mecânica e mantidas sob agitação por 24 h. A solução resultante foi levada para um reator a uma temperatura de 5°C, em presença de nitrogênio gasoso (N₂). Ao meio reacional foi adicionado: 10,7 mL de solução de hipoclorito de sódio a 10% (m/v), equivalente a 14,36 mmol de NaOCl. Em seguida, 115 mg (1,11 mol) de brometo de sódio (NaBr) foram adicionados. O pH foi reduzido para 9,3 utilizando uma solução de HCl 1mol/L. Posteriormente, 23 mg (0,149 mol) de TEMPO foram adicionados. A reação de oxidação foi controlada pela adição de uma solução aquosa de NaOH (0,1 ou 0,05 mol/L). Para interromper a reação foram acrescentados aproximadamente 20 mL de etanol e 30 mg (1,95 mol) de boroidreto de sódio (NaBH₄). Após 45 min o pH foi ajustado para 8. O material resultante passou por um processo de diálise contra água purificada (destilada), contra ácido acético (0,01 mol/L) e

novamente contra água purificada (destilada), por 24 h cada etapa. O material obtido foi rota-evaporado e liofilizado.

A conversão do álcool em ácido foi estimada através da titulação potenciométrica utilizando uma solução aquosa de NaOH (0,1 ou 0,05 mol/L), durante o processo de oxidação. A formação dos grupos carboxílicos corresponde, dessa forma, a quantidade de NaOH utilizado no processo titulométrico (NOOY *et al.*, 1994; 1995). O grau de oxidação (GO), que indica a razão entre a concentração em mol de grupos oxidados e a concentração em mol oxidáveis (unidades que apresentam CH₂OH livres), foi calculado através da medida de consumo de solução aquosa de NaOH (0,05 mol/L) durante a reação de oxidação que durou 4 horas. Esta oxidação foi considerada como se 100% dos álcoois primários estivessem oxidados. A partir da quantidade de NaOH consumida durante esta reação, foram realizados cálculos para se descobrir quando parar a reação para se obter galactomananas com teor de oxidação em torno de 5%, 10%, 30%, 60%. Como este grau de oxidação é teórico e não se mostrou real, as amostras foram nomeadas como Amostras 1, 2, 3, 4 e 5, referentes respectivamente aos seguintes graus teóricos de 5%, 10%, 30%, 60% e 100%.

4.2.2 Conversão para forma ácida das galactomananas oxidadas.

Para a retirada do sal presente na amostra, 20 mg do polímero foram colocados em 18 mL de etanol a 99° GL e, posteriormente foi adicionado 2 ml de HCl 37% e submetido a agitação por 10 a 20 min. Após este procedimento a solução foi centrifugada a 1.000 g por 20 min e o precipitado lavado exaustivamente com etanol a 99°GL, afim de remover o excesso de ácido e de íons cloro. A galactomanana purificada foi seca em estufa a vácuo em temperatura de 40°C.

4.3 ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR e ALFARROBA OXIDADA COM O REAGENTE TEMPO

4.3.1 Espectroscopia de Infravermelho

As amostras de galactomananas oxidadas foram caracterizadas por análise de espectroscopia no infravermelho, em espectrômetro Vertex 70 ATR (CEB/UFPR) em uma faixa de varredura de número de onda de 4.000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 8 cm^{-1} , 16 scans. Para realizar a análise, as amostras foram solubilizadas em água, acondicionadas em placas plásticas de petri e colocadas em estufa a 40°C por 48h. Após este período, um filme espesso foi formado o qual foi analisado.

4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos RMN monodimensional (^1H -RMN) e bidimensionais de correlações heteronuclear (HMQC do inglês - *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation spectroscopy*). Os hidrogênios da fração de galactomanana oxidada foram previamente trocados por deutério, num procedimento de solubilização em D_2O e liofilização por três vezes. A galactomanana oxidada deuterada foi solubilizada em D_2O numa concentração de 25 g/L, a temperatura de 40°C e mantida em agitação magnética por 12 h. A solução resultante foi centrifugada por 10 min a 10.000 g e o sobrenadante condicionado em tubo de vidro (5 mm) específico para RMN.

As análises de RMN mono e bidimensionais foram realizadas em espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE – DRX 400 (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR) acoplado a transformada de Fourier, com temperatura de análise de 70°C. Para a calibração dos espectros, o deslocamento da água (δ 4,7) foi utilizado como padrão interno para ^1H e a frequência de observação do núcleo foi de 400 MHz para ^1H . Todos os parâmetros para as análises mono e bidimensionais serão fornecidos pelo software do próprio equipamento.

4.3.3 Determinação qualitativa e quantitativa de ácidos urônicos

A quantificação de ácidos urônicos foi realizada através do método estabelecido por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Como reagente colorimétrico foi utilizado uma solução de meta-hidroxidifenil. Para minimizar a interferência dos açúcares neutros, foi utilizado o ácido sulfâmico e para realizar a hidrólise do polissacarídeo foi utilizado uma solução de tetraborato de sódio em H_2SO_4 . A curva padrão foi realizada utilizando o ácido (D-galacturônico) em 6 concentrações entre 5 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$. Para a realização da técnica os seguintes reagentes foram preparados:

- Solução de Meta-hidroxidifenil: 0,15% (m/v) da solução de metahidroxidifenil foi solubilizada em 0,5% (m/v) de NaOH. O reagente permaneceu sob refrigeração por um período de no máximo um mês, em recipiente recoberto com papel alumínio.
- Solução de H_2SO_4 / tetraborato de sódio: 0,0125 mol/L de tetraborato de sódio foi solubilizado em ácido sulfúrico concentrado, por 12 horas.
- Ácido sulfâmico / solução sulfamato de potássio, 4 mol/L (pH 1,6): 3,88 g de ácido sulfâmico (97,09 g/mol) foi solubilizado com 5 ml de água. Adicionou-se gota a gota KOH saturado até que o ácido sulfâmico foi dissolvido e cuidadosamente o pH foi ajustado para 1,6 com solução saturada de KOH. Após, completou-se o volume a 10 ml com água purificada.

A quantificação de ácidos urônicos foi realizada em triplicata para cada amostra. Alíquotas de 400 μL de cada amostra foram colocadas em tubos e posteriormente foram adicionados 40 μL de uma solução a 4 mol/L de ácido sulfâmico/solução sulfamato de potássio em todos os tubos e agitados vigorosamente. Após, 2,4 mL de uma solução a 75 mmol/L tetraborato de sódio em solução de ácido sulfúrico foi adicionado e agitados com o auxílio do vortex. As leituras de absorvância foram realizadas em comprimento de onda de 525 nm.

4.3.4 Dosagem colorimétrica de proteínas

Para a determinação de proteínas foi empregado o método de Hartree (1972) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Merck ®). Este método possui uma linearidade entre 15 a 110 mg/mL e sensibilidade: 10 a 100 µg/mL. Como curva padrão foi utilizada uma solução aquosa de soro albumina bovina (BSA) em concentrações entre 20 µg/mL a 100 µg/mL. A análise foi realizada num espectrômetro Biospectro, modelo SSP-200 em um cubeta de quartzo e as leituras de absorvância feitas em comprimento de onda de 650 nm.

Primeiramente, as amostras foram solubilizadas em água por 24h a 1 mg/ml. Três soluções foram preparadas para quantificação proteica:

Solução A: 2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 100 g de Na_2CO_3 dissolvidos em 500 mL de NaOH 1 mol/L. A solução foi diluída com água purificada, q.s.p 1000 mL.

Solução B: 2 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, dissolvidos em 10 mL de NaOH 1 mol/L

Solução C: 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 2 N, diluído em 15 mL de água purificada.

Após solubilização das galactomananas nativas, oxidadas ou da BSA, 0,9 mL da solução A foi acrescentada em 1 mL da amostra e/ou padrão, posteriormente os tubos foram colocados em banho maria a 50°C por 10 min. Depois de resfriado à temperatura ambiente, 0,1 mL da solução B foi adicionada e deixada em repouso por um período de 10 min. Por fim, foi acrescentado 3 mL da solução C e a mistura resultante homogeneizada com auxílio de um vortex. A amostra ou padrão foram colocados novamente em banho maria por 10 min a 50°C e após o resfriamento das soluções, as leituras de absorvância foram obtidas em comprimento de onda de 650 nm. A quantificação de proteínas foi executada em duplicata para cada amostra.

4.3.5 Cromatográfica de exclusão por tamanho (SEC)

Primeiramente foi determinado o incremento do índice de refração em função da concentração dos polissacarídeos (dn/dc). Uma amostra com concentração de 1 mg/mL foi solubilizada utilizando-se o solvente 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris)-HCl 0,1 mol/L pH 8,0, sob agitação por 24h. Após, uma alíquota da amostra foi reservada e com a outra parte foram preparadas 4 concentrações, realizando-se diluição seriada. As 5 concentrações foram filtradas em membranas de acetato de celulose (Millipore), com porosidade de 0,45 μm . O valor de dn/dc foi obtido pela extrapolação dos valores da área do pico de índice de refração em função da concentração, através de uma regressão linear desses valores. Como padrão para calibração do índice de refração foi utilizado o poli(óxido de etileno) (23×10^3 g/mol), a 1,0 mg/mL. As medidas foram realizadas em refratômetro VISCOTEK (Malvern Co., Estados Unidos), modelo VE3580.

As análises das amostras por cromatografia de exclusão por tamanho de permeação em gel foram realizadas utilizando-se colunas de polimetacrilato da Shodex-OH pack SB-806M L007054 (Japão), a 40°C, com limite de exclusão de 2×10^7 g/mol e acopladas a um refratômetro diferencial VISCOTEK, modelo VE3580, e um detector de espalhamento de luz laser, modelo 270 Dual Detector (VISCOTEK), baixo ângulo, a 7° (LALLS, do inglês *Low Angle Laser Light Scattering*) e ângulo reto, a 90° (RALLS, do inglês *Right Angle Laser Light Scattering*) e comprimento de onda de 632,8 nm; como eluente foi utilizado o mesmo solvente da solução das amostras, a um fluxo de 0,4 mL/min.

As amostras foram solubilizadas em concentração de 1 mg/mL, utilizando como solvente Tris-HCl 0,1 mol/L pH 8,0, sob agitação magnética por 24h. Posteriormente, as amostras foram filtradas utilizando filtros de acetato de celulose (Millipore) com porosidade de 0,22 μm . Para a normalização do espalhamento de luz e índice de refração do equipamento foi utilizado um padrão cromatográfico de massa molar e concentração conhecida, o poli(óxido de etileno) (23×10^3 g/mol). O resultado da normalização foi verificado com a utilização de um padrão cromatográfico, dextrana (70×10^3 g/mol) de procedência da VISCOTEK, preparados previamente no mesmo

solvente das amostras. A compilação dos resultados obtidos pelos detectores será realizada em Software OmniSec (VISCOTEK).

4.3.6 Espalhamento de luz estático e gráfico de Zimm

Para as análises de espalhamento de luz estático e gráfico de Zimm as amostras foram avaliadas em um equipamento de espalhamento de luz multi-ângulos Brookhaven Instrumentos BI-200S (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR), utilizando a 15 mW He-Ne laser a 632,8 nm, com 23 ângulos de espalhamento entre 30° a 140°. Para o processamento de dados das análises de espalhamento de luz estático foi utilizado o software Static Light Scattering versão 5.43, para a realização do gráfico de Zimm foi usado o software Zimm Plot versão 5.62.

As amostras foram solubilizadas em solvente Tris-HCl 0,1 mol/L e pH 8,0. O solvente foi duas vezes filtrado com membrana de acetato de celulose (Millipore) com porosidade de 0,22 µm. A solução polimérica foi preparada a uma concentração de 1 mg/mL, duplamente filtrada sequencialmente com membranas de acetato de celulose (Millipore) com porosidade de 0,45 µm e 0,22 µm, em capela de fluxo laminar, com a finalidade de eliminar a presença de particulados em solução.

As análises para construção do gráfico de Zimm foram realizadas fazendo-se 10 diluições em serie da dispersão polimérica inicial, utilizando como solvente o Tris-HCl 0,1 mol/L e pH 8,0, e realizando a leitura para cada diluição nos 23 ângulos de observação. Como liquido de calibração para determinação do I_0 foi utilizado o Tolueno, e como branco o solvente das amostras.

4.3.7 Hidrólise

A hidrólise dos polissacarídeos é uma técnica extensivamente utilizada com a finalidade de separar as unidades monossacarídeas. As condições da reação basearam-se nas realizadas por Dai e colaboradores (2010) onde primeiramente uma

solução aquosa de galactomanana com concentração de 4 a 5 mg/mL foi preparada. A hidrólise procedeu-se acrescentando 1mL do Ácido trifluoroacético 4 mol/L a 1 mL da solução de galactomanana em uma pequena ampola. Esta ampola foi selada sob uma atmosfera de Nitrogênio (N₂) e mantida durante 2 horas em um banho de areia a 100°C. Após a ampola foi arrefecida até à temperatura ambiente e adicionado 2 mL de metanol, com a finalidade de remover o TFA. Para que isto ocorresse, as amostras foram colocadas em uma capela, sob fluxo de ar quente. A lavagem com Metanol foi repetida 3 vezes, até completa remoção do solvente e de ácidos residuais.

4.3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica acoplada a detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD)

Após a hidrólise as amostras secas foram solubilizadas com 1 mL de água purificada (destilada) e diluídas até a concentração de 1 mg/mL. Estas foram então filtradas utilizando-se membranas de acetato de celulose de 0,22 µm (Millipore). As amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência por troca iônica acoplado a detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD), utilizando injetor automático modelo AS-DV com capacidade para até 50 amostras, fabricante Thermo Fisher Scientific. O equipamento utilizado para realizar as análises foi o modelo ICS-5000, com eletrodo ED de ouro, fabricante Thermo Scientific. A coluna utilizada foi a Dionex CarboPac™ PA20 Analytica (3x 150mm), fabricante Thermo Scientific, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR. As condições de análises estão descritas na TABELA 1 e 2:

TABELA 1 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS URÔNICOS PRESENTES NA AMOSTRA

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Hidróxido de sódio (%) solução 1mol/L	Acetato de sódio (%) solução 1mol/L
0,0	0,5	0,1	0
20,0	0,5	0,1	0
20,1	0,5	0,1	5
35,0	0,5	0,1	20

TABELA 2 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS AÇÚCARES NEUTROS PRESENTES NA AMOSTRA

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Hidróxido de sódio (%) solução 1mol/L	Acetato de sódio (%) solução 1mol/L
0	0,5	1,0	0
15	0,5	0,1	0

O tempo de retenção e a curva padrão foram estabelecidos utilizando-se padrões monossacarídeos de galactose, manose, ácido galacturônico e ácido manurônico. Os valores referentes ao tempo de retenção, coeficiente angular (a) e linear (b) obtidos para realizar os cálculos estão descritos na TABELA 3. A partir destes, e dos valores das áreas de cada pico das amostras, pode-se quantificar os açúcares ácidos e neutros utilizando-se a equação da reta.

TABELA 3 – TEMPO DE RETENÇÃO E VALORES REFERENTES AO COEFICIENTE ANGULAR E LINEAR, OBTIDOS A PARTIR DA CURVA PADRÃO DOS MONOSSACARÍDEOS DE GALACTOSE, MANOSE, ÁCIDO GALACTURÔNICO E ÁCIDO MANURÔNICO

Padrões	Tempo de Retenção (min)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)	R²
Galactose	8,2 – 8,3	2138,12	40,59	0,999
Manose	9,9 – 10,1	2177,59	36,30	0,999
Ác. Galacturônico	29,4 – 29,5	1380,09	4,27	0,995
Ác. Manurônico	32,3 – 32,4	1120,18	22,57	0,991

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DE SEMENTES DE GUAR E ALFARROBA

5.1.1 Modificação química via oxidação com reagente TEMPO

No presente estudo foram utilizadas galactomananas de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) denominadas como guar nativa (GN) e galactomanana de Alfarroba (*Ceratonia siliqua*) denominada de alfarroba nativa (AN).

Primeiramente, foi realizada a oxidação durante 4h das gomas GN e AN. Esta amostra foi considerada como 100% oxidada (Amostra 5). A partir da quantidade de NaOH (0,05mol/L) consumidos durante a reação total foram realizados cálculos para obtenção de oxidações teóricas de 5% (amostra 1), 10% (amostra 2), 30% (amostra 3) e 60% (amostra 4) (FIGURA 14 e 16).

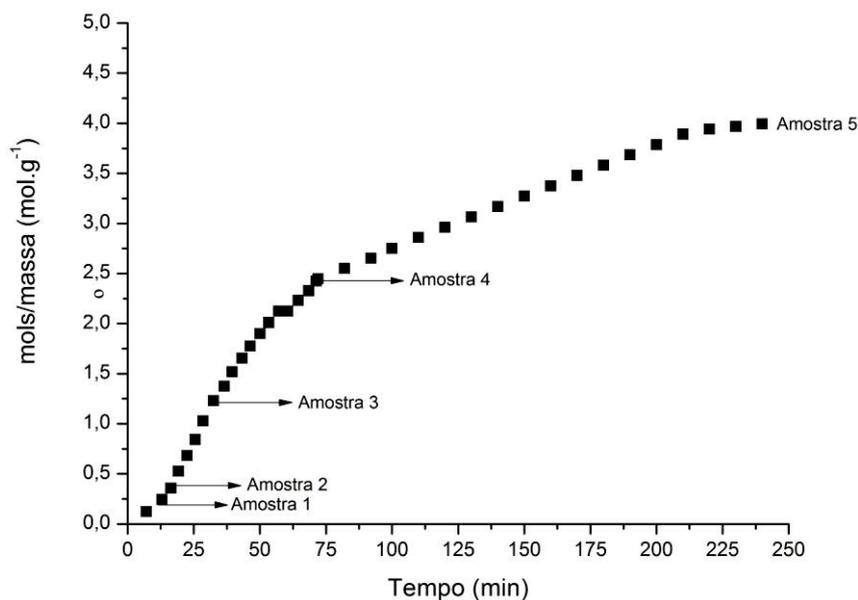


FIGURA 14 – MOL DE ÁCIDO CARBOXÍLICO FORMADO NA GALACTOMANANA PELA MASSA INICIAL DE POLÍMERO UTILIZADA EM FUNÇÃO DO TEMPO EM MINUTOS, DURANTE A REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE GOMA GUAR (GN) COM REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETÍLPÍPERIDINA-1-OXIL).

LEGENDA: As setas indicam o tempo para retirada das amostras correspondentes.

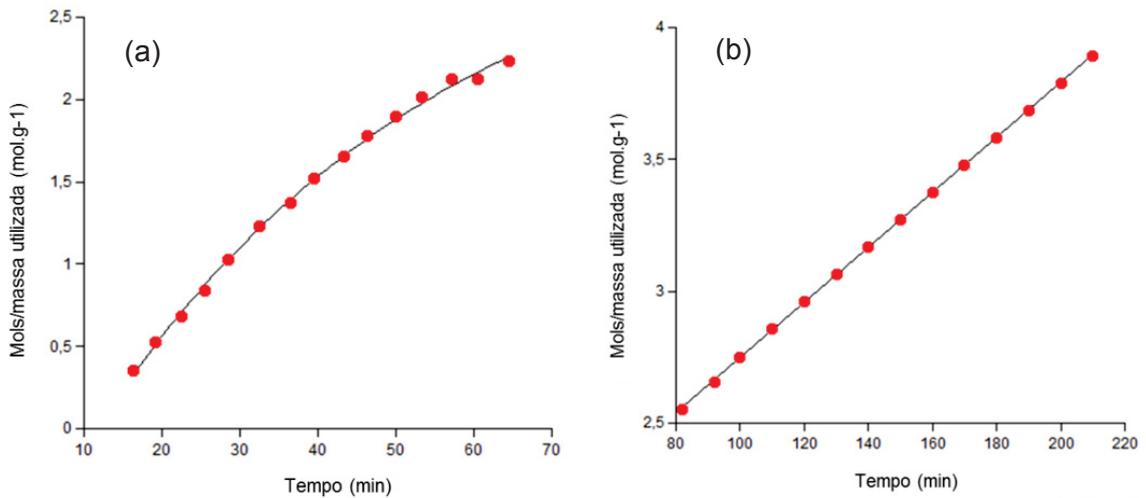


FIGURA 15 – MOL DE ÁCIDO CARBOXÍLICO FORMADO NA GALACTOMANANA PELA MASSA INICIAL DE POLÍMERO UTILIZADA EM FUNÇÃO DO TEMPO EM MINUTOS, DURANTE A REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE GOMA GUAR (GN) COM REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL).

LEGENDA: Cinética de 1ª ordem (a) Cinética de zero ordem (b)

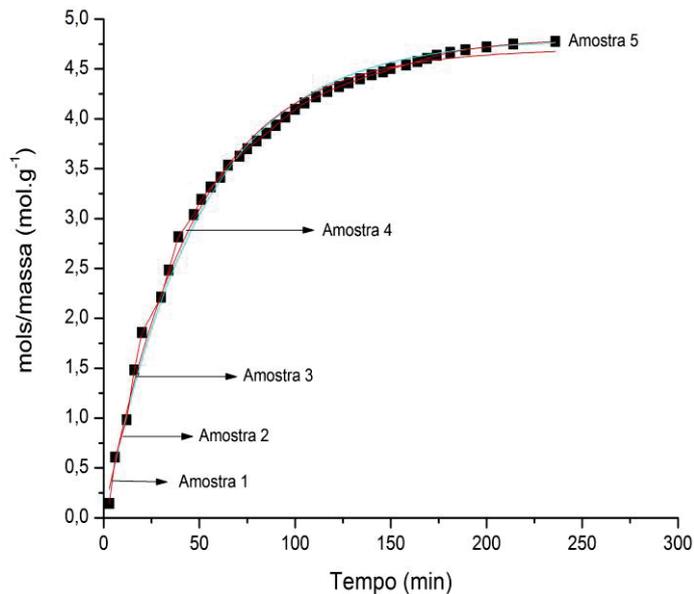


FIGURA 16 – MOL DE ÁCIDO CARBOXÍLICO FORMADO NA GALACTOMANANA PELA MASSA INICIAL DE POLÍMERO UTILIZADA EM FUNÇÃO DO TEMPO EM MINUTOS, DURANTE A REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA COM REAGENTE TEMPO (2,2,6,6,-TETRAMETILPIPERIDINA-1-OXIL).

LEGENDA: As setas indicam o tempo para retirada das amostras correspondentes.

Com a finalidade de padronizar e para melhor entendimento da reação de oxidação foram construídos os gráficos com base na razão do n° de mol de NaOH consumido pela massa do polímero utilizada versus o tempo da reação em minutos (min). A partir da cinética da reação de oxidação da GN, observou-se que há dois eventos ocorrendo sequencialmente. Um primeiro evento, até os 70 min de reação,

referente a uma cinética de primeira ordem, enquanto que há uma segunda etapa de reação, entre 80 e 220 min, com cinética de ordem zero, onde a velocidade reacional não varia à medida que os reagentes são consumidos (BROWN; HOLME, 2005).

A reação de oxidação da AN, como demonstrada na FIGURA 16, ocorre com uma cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade da reação é diretamente proporcional a concentração.

TABELA 4 – CONSTANTES DE VELOCIDADES (k) E ORDEM DA REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DA GOMA GUAR E ALFARROBA.

	k	R	Ordem
Guar ¹	0,02 min ⁻¹	0,999	1 ^a
Guar ²	0,01 mol.g ⁻¹ min ⁻¹	0,999	Zero
Alfarroba ³	0,02 min ⁻¹	0,999	1 ^a

(1) Reação oxidação 1ª parte FIGURA 15(B)

(2) Reação de oxidação 2ª parte FIGURA 15(C)

(3) Reação de oxidação FIGURA 16

Para a goma guar e goma alfarroba os valores da constante de velocidade, para uma cinética de 1ª Ordem foram de $k=0,02 \text{ min}^{-1}$. Apenas na reação de oxidação da guar ocorreu um segundo processo, com uma cinética reacional de ordem zero, com $k=0,01 \text{ mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$. Pode-se concluir que para ambas as galactomananas existe um fator limitante, que determina a velocidade desta reação. Possivelmente, tal fator seja a disponibilidade de álcoois primários para que a reação se processe, ou na Man ou Gal.

A AN possui uma razão de Man/Gal em torno de 4:1, enquanto que a GN possui uma razão menor, de 2:1. Acredita-se que haja uma preferência do reagente TEMPO em oxidar primeiramente a Man, devido possivelmente a sua menor entropia, quando comparada a Gal. Este fato pode ser a explicação para a reação de oxidação da AN ocorrer em uma cinética de 1ª ordem, enquanto que a reação de oxidação da GN ocorrer em cinética de 1ª ordem e depois em ordem zero. Assim, aparentemente, a concentração de Man não-substituída por Gal disponível é um parâmetro importante para a velocidade reacional, e em baixas concentrações de manose disponíveis, há uma cinética de saturação, possivelmente limitadas pela concentração de galactose disponível.

5.2. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA OXIDADAS COM REAGENTE TEMPO

5.2.1. Espectroscopia no Infravermelho

Com a finalidade de confirmar a oxidação das amostras de galactomananas, foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho (FIGURA 17, 18 e 19).

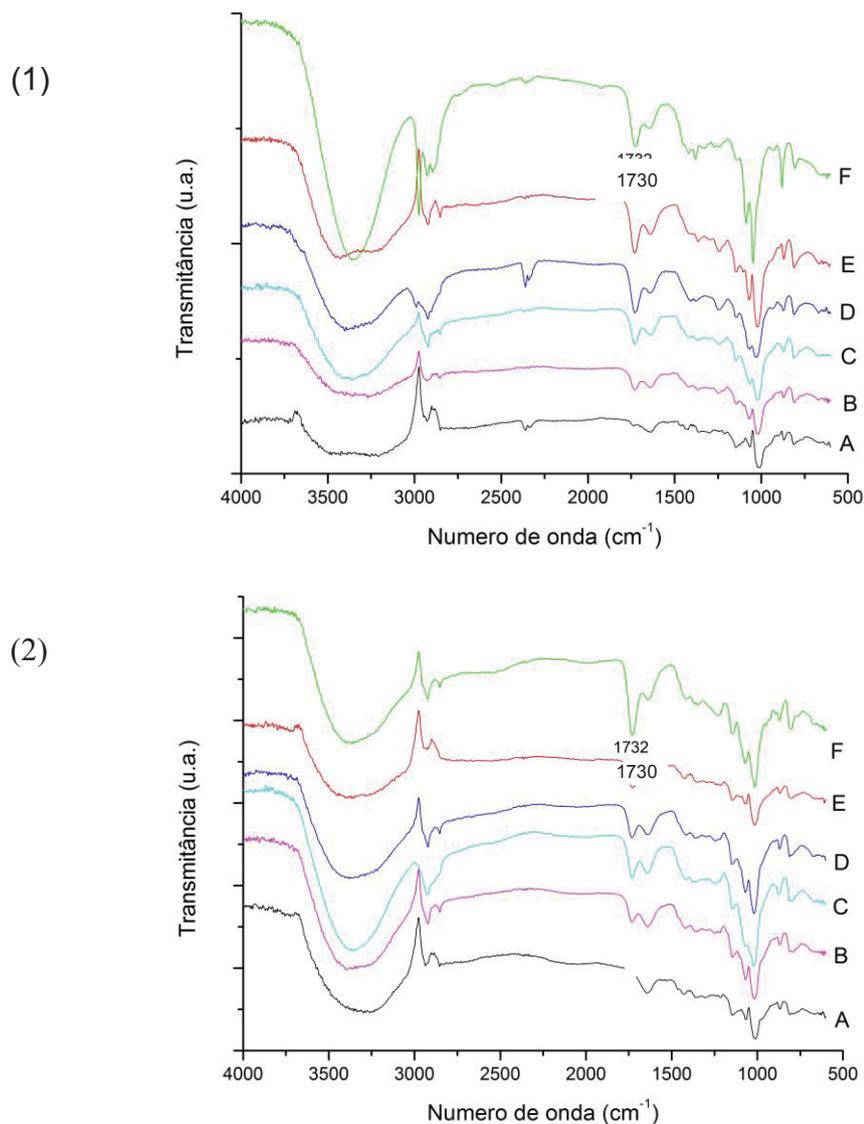


FIGURA 17 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$) DAS GALACTOMANANAS DE ALFARROBA (1) E GUAR (2) NATIVA E OXIDADAS. LEGENDA: A: Nativa; B: Amostra 1; C: Amostra 2; D: Amostra 3; E: Amostra 4 e F: Amostra 5.

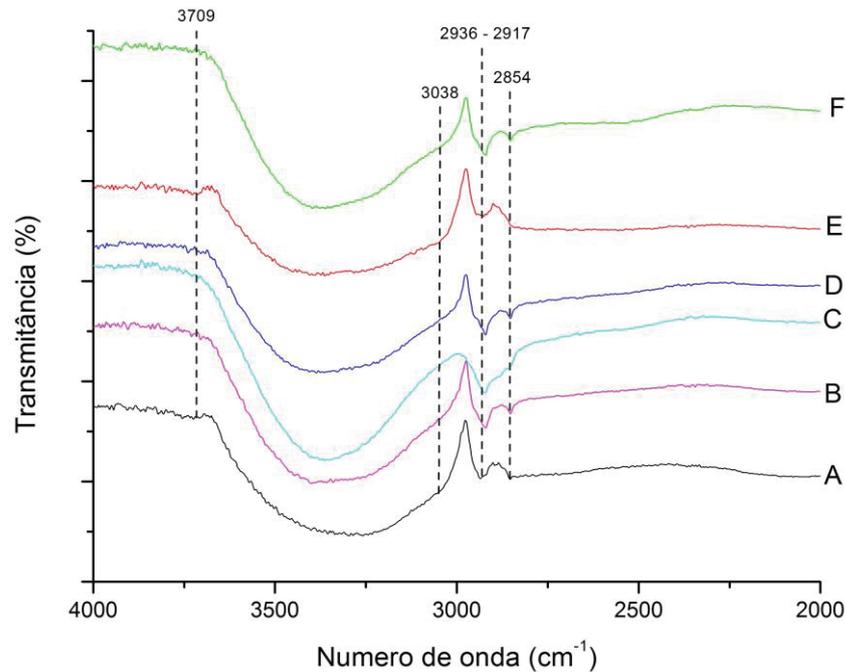


FIGURA 18 – AMPLIAÇÃO DO ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ENTRE (4000 – 2000 cm^{-1}) DA GALACTOMANANA DE GUAR NATIVA E OXIDADAS.

LEGENDA: A: Nativa; B: Amostra 1; C: Amostra 2; D: Amostra 3; E: Amostra 4 e F: Amostra 5.

A banda entre 3700 a 3038 cm^{-1} é característica de deformação axial do O–H, correspondente à ligação de hidrogênio intermolecular e intramolecular, com um alargamento e aumento na intensidade. A deformação axial do grupo C–H é mostrada de forma intensa e muito larga na região entre 2917 – 2849 cm^{-1} para os carbonos de $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ respectivamente (FIGURA 18).

As bandas observadas no espectro entre 800 e 1200 cm^{-1} representam o grupo C–C–O altamente acoplados, $-\text{C}-\text{OH}$ e $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ do estiramento da cadeia principal do polímero (KACURAKOVA, 1998). A banda de 1400 cm^{-1} é resultado da deformação $-\text{CH}_2$ (KACURAKOVA, 1994).

As amostras de galactomanana na forma oxidada (amostras 1 a 5) apresentaram uma banda intensa entre 1730 cm^{-1} , referente ao estiramento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do ácido carboxílico e outra entre 1643 cm^{-1} em seu carboxilato ($-\text{COO}^-$) (FIGURA 19), em razão de sua grande mudança no momento de dipolo (PAVIA et. al., 2010). Nota-se que tais bandas estão ausentes na GN e AN.

As atribuições discutidas encontram-se na TABELA 5, de forma genérica, tanto para as amostras de GN como AN, bem como para as amostras oxidadas 1 a 5.

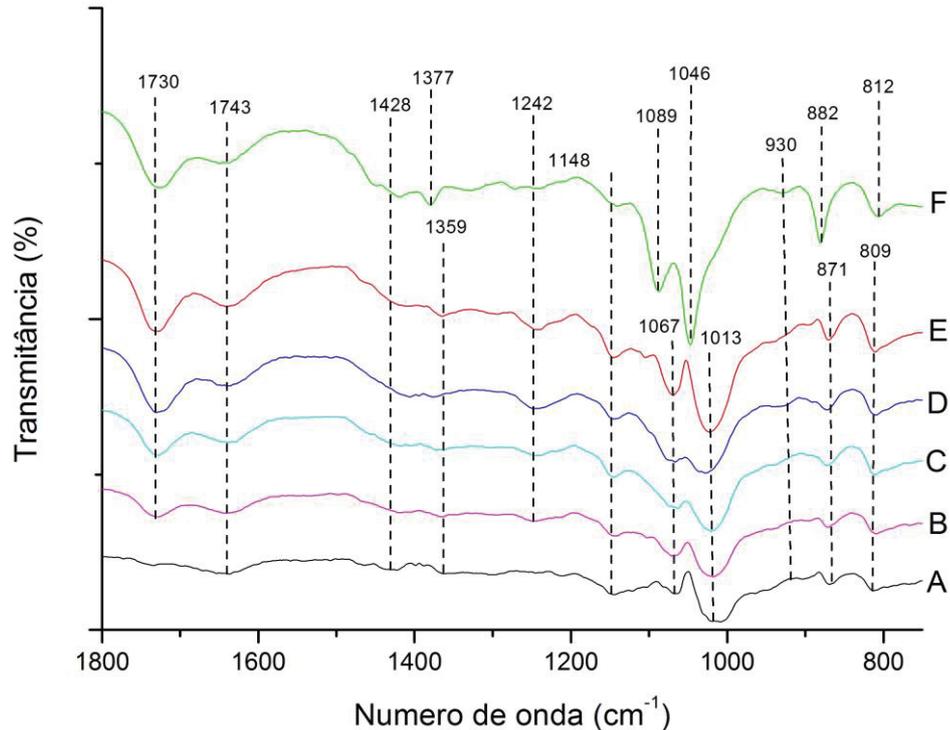


FIGURA 19 – ESPECTRO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO ENTRE (2000 - 500 cm^{-1}) DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA E OXIDADAS.

LEGENDA: A: Nativa; B: Amostra 1; C: Amostra 2; D: Amostra 3; E: Amostra 4 e F: Amostra 5

TABELA 5 - BANDAS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FTIR) OBSERVADAS NOS ESPECTROS DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA (AN) E GUAR NATIVA (GN) E AMOSTRAS OXIDADAS DE 1 A 5.

Numero de onda (cm^{-1})	Grupos característicos*
3709 – 3030	O-H deformação axial da hidroxila
2936 – 2917	C-H deformação axial carbono secundário (-CH ₂ -)
2854	C-H deformação axial carbono primário (-CH ₃)
1730	C = O estiramento de grupos carboxílicos
1643	-COO ⁻ estiramento de grupos carboxilatos
1428, 1377-1359	C-H deformação simétrica (-CH ₂)
1242	O-H estiramento de hidroxilas primárias e grupos carboxílicos
1148	C-OH estiramento de álcool primário
1089-1067	CH ₂ -OH estiramento de álcool primário
1046-1013	C-H vibração de CH ₂
930, 882-871	C-H defromações das unidades monossacarídeoas
812-809	C-O estiramento de álcoois

A partir dos dados obtidos pode-se confirmar a oxidação das amostras de galactomananas: GN e AN. Espectros semelhantes foram encontrados por outros autores que realizaram esta oxidação seletiva com reagente TEMPO. Souza (2009) oxidou com reagente TEMPO a galactomomanana de *Caesalpinia ferrea var. ferrea* e obteve valores referente ao estiramento de grupos carboxílicos em 1735 cm^{-1} , bem como estiramento de grupos carboxilados em 1640 cm^{-1} , semelhantes aos resultados aqui apresentados.

5.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido a ferramenta mais utilizada para caracterizar os materiais oxidados seletivamente com reagente TEMPO. Nooy e colaboradores (1994) oxidaram mediante reagente TEMPO os polissacarídeos de amido de batata e a pullulana, e observaram no espectro de ^{13}C o desaparecimento do deslocamento químico (δ) em 61 e 62 ppm referentes ao C-6. Comprovando assim a seletividade do reagente a hidroxila primária do carbono C-6 durante a oxidação. Esta constatação também pode ser observada através dos espectros bidimensionais de HMQC (C-H), comparando-se a FIGURA 20 referente ao espectro da AN e FIGURA 21 pertencente alfarroba oxidada, amostra 5.

As atribuições do espectro bidimensional HMQC (C-H) estão na TABELA 6, a posição do ^1H e ^{13}C são semelhantes para a GN. Entretanto, para as amostras oxidadas houve deslocamento dos sinais dos carbonos das unidades monossacarídicas para campos mais baixo, devido à presença do átomo de oxigênio mais eletronegativo da carbonila gerada na oxidação seletiva.

Para as amostras nativas o sinal do próton anomérico encontra-se em 5,56 ppm e 4,27 ppm para a α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose presentes no C-1 com deslocamento químico de 100,22 e 101,5 ppm, respectivamente para a AN. No caso das amostras de galactomanana de goma guar os sinais do ^1H encontram-se deslocados para regiões mais altas, em 5,44 ppm e 5,16 ppm. O mesmo ocorreu com o sinal do C-1 os quais foram observados em 99,32 ppm e 100,72.

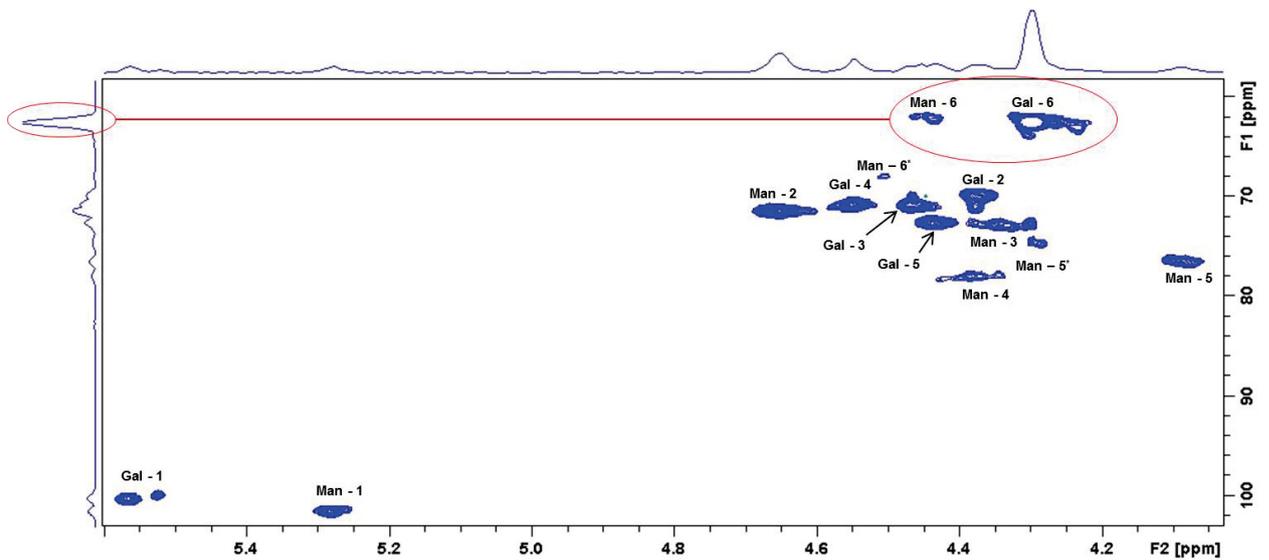


FIGURA 20 - ESPECTRO BIDIMENSIONAL HMQC (C–H) RESOLVIDO PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA EM D₂O, A 70 °C⁽¹⁾.

LEGENDA: (*) refere-se aos deslocamentos (δ) dos carbonos e hidrogênios pertencentes às unidades β -D-Man substituídas por α -D-Gal.

(1) Deslocamentos químicos expressos em ppm (δ).

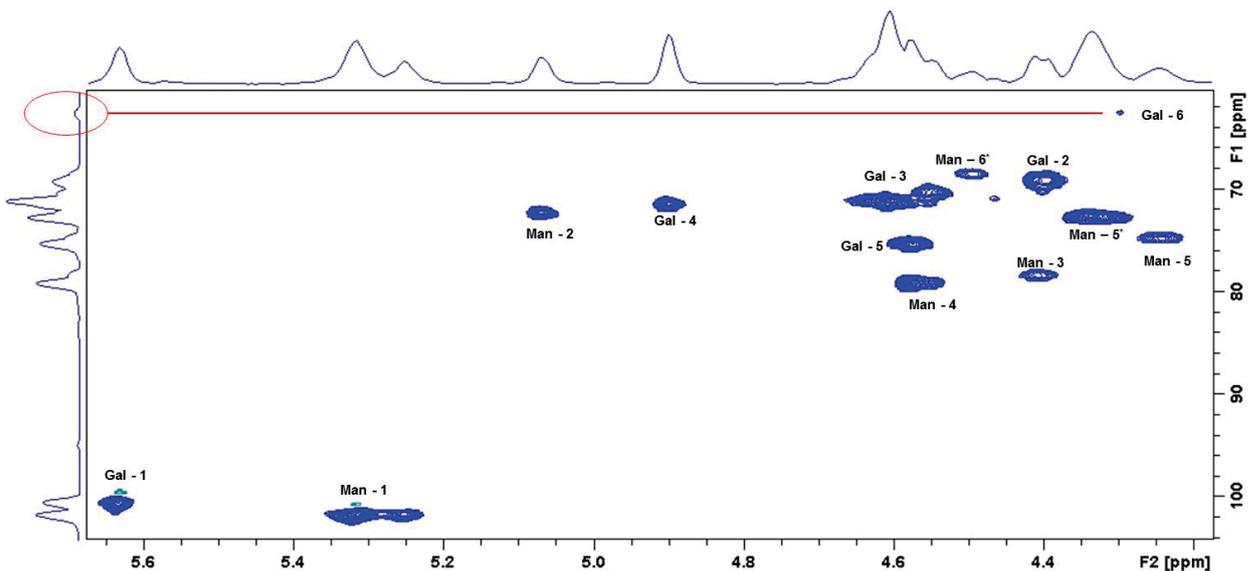


FIGURA 21 - ESPECTRO BIDIMENSIONAL HSQC (C–H) RESOLVIDO PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA OXIDADA AMOSTRA 5, EM D₂O, A 70 °C. ⁽¹⁾

LEGENDA: (*) refere-se aos deslocamentos (δ) dos carbonos e hidrogênios pertencentes às unidades β -D-Man substituídas por α -D-Gal.

(1) Deslocamentos químicos expressos em ppm (δ).

A medida que o grau de oxidação aumentou foram observadas alterações nos deslocamentos químicos dos ¹H, especialmente entre 5,1 - 5,7 ppm referentes aos hidrogênios anoméricos (FIGURA 22 e 23). Kato, Matsuo e Isogai (2003) identificaram

a presença de aldeído intermediário e estruturas hemiacetálicas através dos espectros de ^1H -RMN de amidos parcialmente oxidados. De acordo com a FIGURA 10 esses aldeídos hidratados ou hemiacetais são oxidados a grupos carboxílicos, em função do tempo de reação ou uma quantidade suficiente de reagentes.

TABELA 6 - ATRIBUIÇÕES DOS PICOS DAS ANÁLISES DE RMN BIDIMENSIONAL HMQC (C-H) PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA (AN) E GUAR NATIVA (GN).

Posição	ALFARROBA NATIVA		GUAR NATIVA	
	^1H (δ)	^{13}C (δ)	^1H (δ)	^{13}C (δ)
Gal	α -D-Galactopiranosose		α -D-Galactopiranosose	
C – 1	5,56	100,22	5,44	99,31
C – 2	4,37	70,25	4,27	69,1
C – 3	4,45	70,80	4,33	69,90
C – 4	4,54	70,68	4,42	69,57
C – 5	4,43	72,52	4,31	70,80
C - 6	4,29	62,48	4,18	61,75
Man	β -D-Manopiranosose		β -D-Manopiranosose	
C – 1	4,27	101,5	5,16	100,54
C – 2	4,65	71,32	4,57	70,36
C – 3	4,33	72,66	4,30	71,70
C – 4	4,37	77,93	4,27	77,09
C – 5	4,05	76,41	3,97	75,84
C – 5*	4,28	74,16	4,18	72,21
C - 6	4,43	62,11	4,31	61,69
C – 6*	4,50	67,90	4,36	68,4

LEGENDA: * deslocamentos (δ) dos carbonos e hidrogênios pertencentes às unidades β -D-Man substituídas por α -D-Gal.

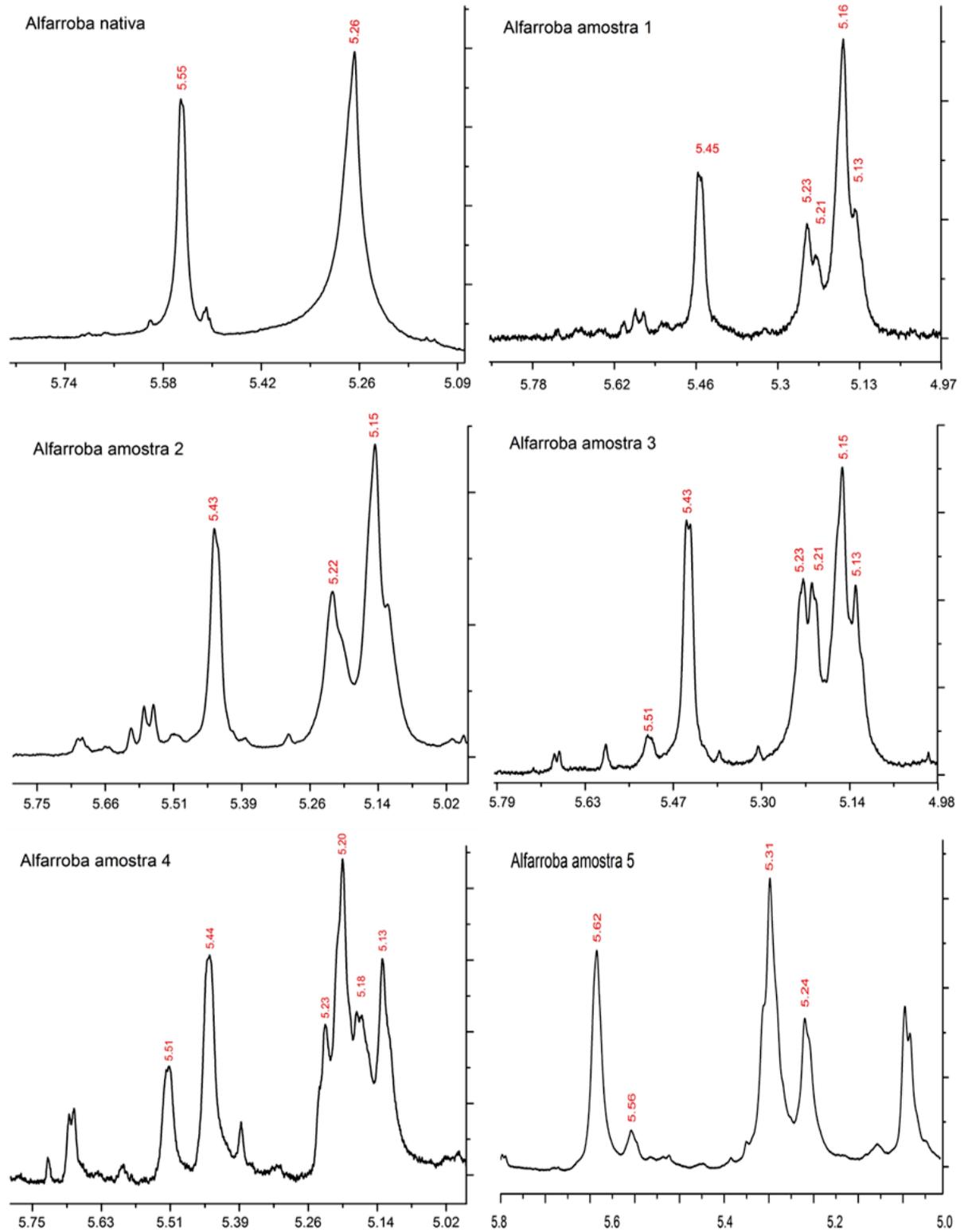


FIGURA 22 – ESPECTROS DE RMN ¹H DA GALACTOMANA DE ALFARROBA REFERENTE A REGIÃO DO HIDROGÊNIO LIGADO AO CARBONO ANOMÉRICO. AMOSTRA SOLUBILIZADA EM D₂O A 70 °C⁽¹⁾.

(1) Deslocamentos químicos expressos em ppm (δ). Deslocamento de 5,0 δ até 5,7 δ.

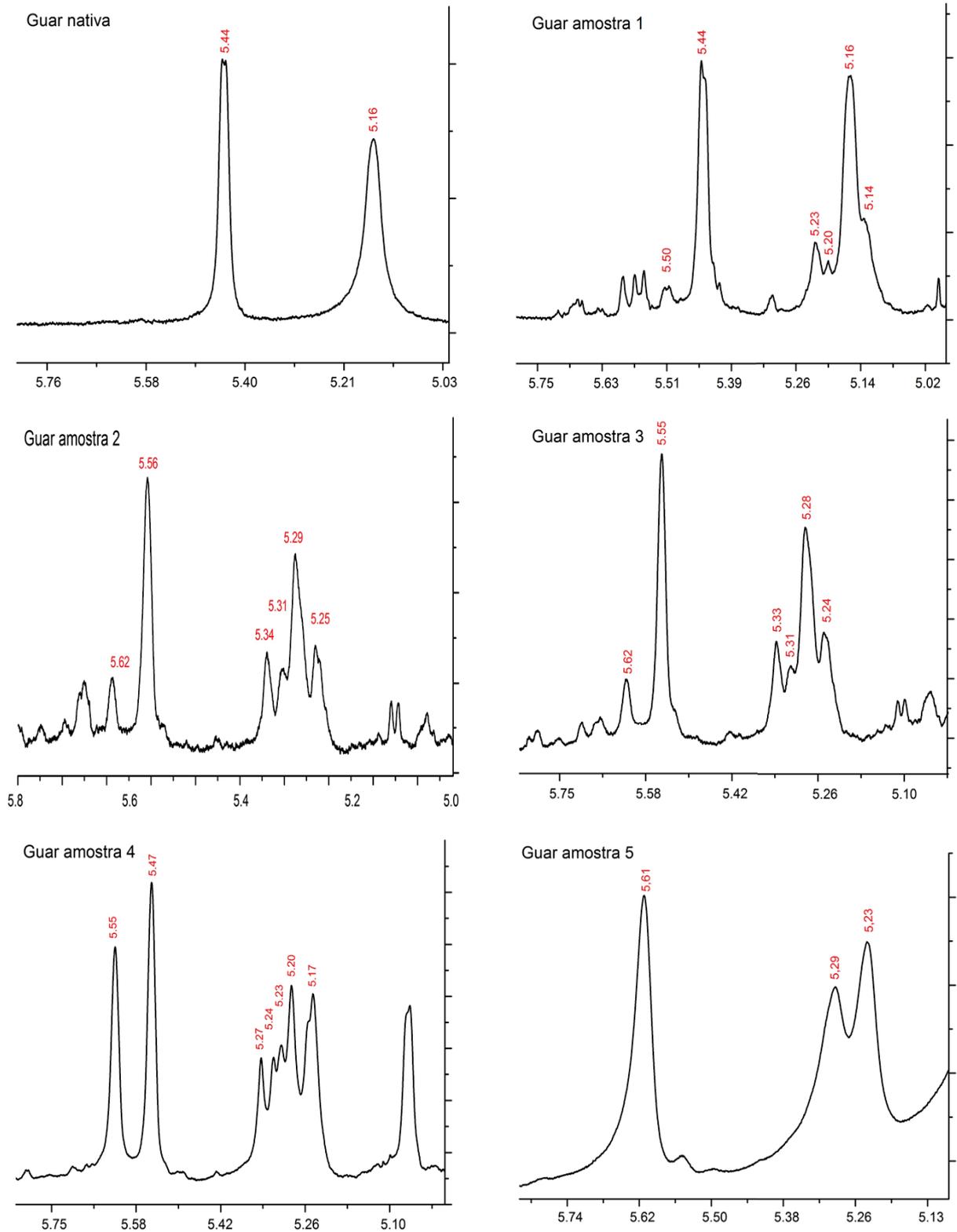


FIGURA 23 – ESPECTROS DE RMN ¹H DA GALACTOMANA DE GUAR REFERENTE A REGIÃO DO HIDROGÊNIO LIGADO AO CARBONO ANOMÉRICO C-1. AMOSTRA SOLUBILIZADA EM D₂O, A 70 °C⁽¹⁾.

(1) Deslocamentos químicos expressos em ppm (δ). Deslocamento de 5,0 δ até 5,7 δ.

O deslocamento químico destes aldeídos hidratados ou hemiacetais estão presentes entre os sinais dos prótons anoméricos de manose substituída e ácido manurônico nas amostras não completamente oxidadas. Eles consistem em dois tipos de prótons anoméricos, podendo ser devido a presença da forma C-6 com hemiacetal ou na forma de hemiacetal e hidrogênios C-6-H, de unidades formadoras de hemiacetal. Estes incluem aldeídos C-6 hidratados em conjunto com os hemiacetais formados entre C-6 aldeído e outros grupos hidroxílicos (KATO; MATSUO; ISOGAI, 2003). Nooy & Besemer (1995) também constataram a presença desses produtos intermediários e propuseram que estes aldeídos são posteriormente oxidados pelo reagente TEMPO.

As atribuições dos hidrogênios anoméricos estão descritas nas TABELAS 7 e 8. As quais podem notar que o sinal do hidrogênio anomérico das unidades de monossacarídeos oxidados encontram-se deslocados para regiões de campo mais baixos, enquanto que o sinal do hidrogênio anomérico das unidades de monossacarídeos nativa encontram-se em regiões mais altas.

Para a alfarroba nativa os sinais destes hidrogênios encontrou-se em 5,55 ppm e 5,26 ppm para a α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose respectivamente. Já na amostra 5, com grau maior de oxidação, o sinal do hidrogênio anomérico das unidades de monossacarídeos oxidados encontraram-se em 5,62 e 5,31 ppm.

Dados semelhantes foram obtidos analisando-se os espectros ^1H -RMN da goma guar. Onde os sinais dos hidrogênios anoméricos sem modificação encontraram-se em 5,44 ppm e 5,16 ppm para a Gal e Man. Os sinais dos hidrogênios dos derivados oxidados encontram-se entre 5,61 ppm e 5,29 ppm.

Os sinais do hidrogênio anomérico do C-1 da Man e do C-1 do Ác. Man correspondem aos deslocamentos dos hidrogênios de intermediários. Para interromper a reação de oxidação foi utilizado o álcool etílico 99% como um álcool primário, com a finalidade de competir com os álcoois primários da galactomanana, bem como foi utilizando como agente redutor NaBH_4 , que irá reduzir tanto os aldeídos das extremidades redutoras do polímero, bem como os aldeídos intermediários gerados. Por este motivo, a presença desses sinais intermediários não é bem compreendida. Entretanto o mais provável é que eles correspondam a hidrogênios anoméricos de unidades de monossacarídeos com aldeídos em C-6, possivelmente pela baixa eficiência do agente redutor em meio etanólico. Assim, aparentemente, o

álcool foi o responsável pela interrupção do processo de oxidação, e não o NaBH_4 , mantendo na estrutura os aldeídos intermediários (FIGURA 10).

TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS REFERENTES AOS HIDROGÊNIOS DO CARBONO ANOMÉRICO C¹-H. OBTIDOS ATRAVÉS DOS ESPECTROS DE RMN ¹H DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA⁽¹⁾.

Hidrogênios						
Anomérico (ppm)	AN	1	2	3	4	5
α -D-Galactose	5,5	5,45	5,43	5,44	5,43	5,56
α -D-Ác. Galacturônico				5,51		5,62
β -D-Manose _{substituída}	5,26	5,16	5,15	5,18	5,15	5,24
β -D-Manose _{não-substituída}		5,13	5,12	5,13	5,13	
H-1 _{intermediários}		5,21	5,21	5,20	5,21	
β -D-Ác. Manurônico		5,23	5,22	5,23		5,31

(1) – por RMN Brucker 400 MHz. Amostra solubilizada em D_2O , aquisição a 70 °c. Deslocamentos químicos expressos em ppm (δ)

TABELA 8 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS REFERENTES AOS HIDROGÊNIOS DO CARBONO ANOMÉRICO C¹-H. OBTIDOS ATRAVÉS DOS ESPECTROS DE RMN ¹H DA GALACTOMANANA DE GUAR⁽¹⁾.

Hidrogênios						
Anoméricos (ppm)	GN	1	2	3	4	5
α -D-Galactose	5,44	5,44	5,56	5,55	5,55	
α -D-Ác. Galacturônico			5,62	5,62	5,62	5,61
β -D-Manose _{substituída}	5,16	5,16	5,29	5,28	5,28	5,23
β -D-Manose _{não-substituída}		5,14	5,25	5,24	5,24	
H-1 _{intermediários}		5,20	5,31	5,31	5,32	
					5,30	
β -D-Ác. Manurônico		5,23	5,34	5,33	5,34	5,29

(1) – por RMN Brucker 400 MHz. Amostra solubilizada em D_2O , aquisição a 70 °c. Deslocamentos químicos expressos em ppm (δ)

Os deslocamentos químicos dos H-1 referentes aos intermediários reacionais para a goma de alfarroba, apareceram entre 5,21 ppm e 5,20 ppm, para as amostras 1, 2, 4 e 3. Nas amostras de guar parcialmente oxidadas 1, 2, 3 e 4 esses sinais apareceram em 5,20 ppm, 5,31 ppm, 5,30 e 5,32 ppm.

5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA NATIVAS E OXIDADAS COM O REAGENTE TEMPO

5.3.1 Determinação de ácidos urônicos e dosagem de proteína

O método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973) é um método seguro para determinação de ácidos urônicos, porém susceptível a interferências a partir de açúcares neutros. Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) desenvolveram um método que manteve a utilização de tetraborato de sódio em ácido sulfúrico e m-hidroxidifenil presentes na técnica de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973) e incorporaram o sulfamato, já utilizado por Galambos (1967). O sulfamato suprime a formação de pigmentos escuros proveniente de açúcares neutros. O tetraborato de sódio aumenta a sensibilidade do método e o m-hidroxidifenil é o agente colorimétrico (LAURENCE; BRONWEN, 2001).

Com relação a determinação de ácidos urônicos relatada na TABELA 9, pode-se observar um grau de oxidação real menor que os valores teóricos previstos.

Os valores de porcentagem de proteína obtidos para a GN e com baixos graus de oxidação são semelhantes aos relatados por Wang e colaboradores (2003) que resultaram em valores entre 3,2-4,0%. A porcentagem menor de proteínas observado nas amostras com os maiores graus de oxidação podem ser provenientes deste processo de oxidação também em estruturas proteicas residuais. Prajapati e colaboradores (2013) obtiveram dados de porcentagem de proteínas de 3-7% para a alfarroba, dentro dos valores obtidos neste trabalho para a alfarroba nativa e com menores graus de oxidação.

TABELA 9 – DADOS REFERENTES A PROPORÇÃO PROTEICA E ÁCIDOS URÔNICOS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBA NATIVA E OXIDADAS.

Amostras	Ácidos urônicos teóricos (%)	Ácidos urônicos (%) ¹	Desvio Padrão	Proteínas (%) ²	Desvio padrão
GN	0	0,0	0,0125	2,9	0,0095
1	5	7,0	0,0219	4,2	0,0108
2	10	10,0	0,0121	3,4	0,0125
3	30	12,0	0,0017	3,0	0,0035
4	60	39,0	0,0065	2,1	0,0059
5	100	63,0	0,0176	1,5	0,0009
AN	0	0,0	0,0147	4,2	0,0057
1	5	8,3	0,0049	4,3	0,0186
2	10	12,0	0,0081	3,9	0,0040
3	30	14,0	0,0319	2,7	0,0007
4	60	42,0	0,0033	2,1	0,0007
5	100	42,0	0,0080	1,9	0,0146

(1) Dados obtidos através do método de FILISETTI-COZZI E CARPITA (1991)

(2) Dados obtidos através do método de HARTREE (1972)

5.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica acoplada a detecção por amperometria pulsada

A cromatografia de troca iônica com detecção por amperometria pulsada consiste numa ferramenta de separação eficiente e extremamente sensível de hidratos de carbono. Os hidratos de carbonos são separados de acordo com o seu potencial de ionização das hidroxilas, que varia para cada molécula de monossacarídeo de acordo com a hierarquia de acidez: C-1 - OH > C-2 - OH ≥ C-6 - OH > C-3 - OH > C-4 - OH (KOIZUMI, 1992).

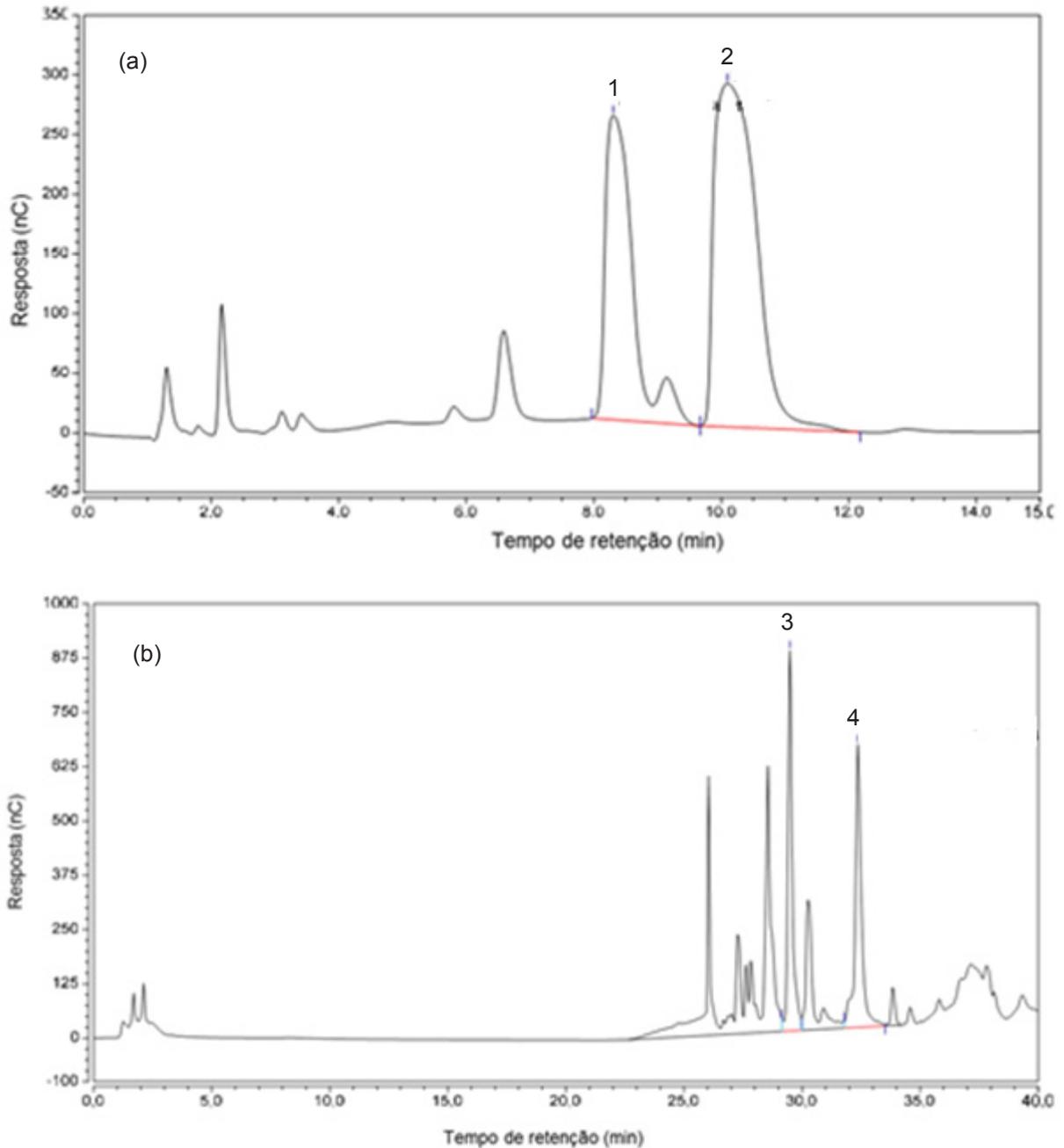


FIGURA 24 – CROMATOGRAMA DE TROCA IÔNICA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DA AMOSTRA 5 DA GUAR ⁽¹⁾.

LEGENDA: Figura (a): (1) Galactose; (2) Manose. Figura (b): Ácido galacturônico (3) e ácido manurônico (4).

(1) Sistema cromatográfico dionex, os tempos de retenção em minutos são respectivamente 8,308 min (1); 10,098 min (2); 29,491 min (3) e 32,36 min (4).

A combinação de amperometria pulsada com o eletrodo de trabalho de ouro, cuja superfície é capaz de catalisar a eletro-oxidação de -COH contendo compostos em soluções de pH elevado, proporciona a possibilidade de determinar açúcares,

alditóis, oligossacarídeos, açúcares aminados e N-acetilados, ácidos urônicos entre outros (FIGURA 24).

Para a caracterização das galactomananas nativas e oxidadas foram realizadas curvas padrão e a partir do tempo de retenção pode-se identificar o pico referente à unidade monossacarídica e quantificar a presença desses através dos respectivos cálculos de área (TABELA 3). Devido à diferença de ionização entre açúcares neutros e ácidos foi necessário realizar duas corridas com diferentes tempos e proporção de solução de hidróxido de sódio e acetato de sódio (TABELA 1 e 2). Os resultados obtidos estão detalhados nas TABELAS 10 e 11.

TABELA 10 – DADOS REFERENTES A DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM (%) DE AÇÚCARES NEUTROS E ÁCIDOS PRESENTES NA ALFARROBA NATIVA (AN) E OXIDADAS. PROPORÇÃO DE MANOSE (MAN), GALACTOSE (GAL), ÁCIDO GALACTURÔNICO (ÁC. GAL) E ÁCIDO MANURÔNICO (ÁC. MAN) PRESENTE NAS AMOSTRAS.

Amostras	Man (%)	Gal (%)	Man/Gal	Ác. Gal (%)	Ác. Man (%)	Ác. Man/Ác. Gal
AN	79,08	20,92	3,78:1			
1	38,69	19,45	1,98:1	9,73	32,13	3,30:1
2	32,85	17,20	1,90:1	12,46	37,49	3,01:1
3	31,30	17,63	1,77:1	16,97	34,10	2,09: 1
4	24,20	16,21	1,49:1	9,88	49,69	5,03: 1
5	15,00	3,81	3,93:1	20,52	60,64	2,95:1

1. – por DIONEX Thermo Scientific. Modelo: ICS-5000 com eletrodo ED de ouro. Coluna CarboPac™ PA20 Analytica (3x 150mm).

A razão entre Man/Gal obtidos através do HPAEC-PAD para as GN 1,23:1 e AN 3,78:1 são semelhantes as relatadas por outros autores. A Alfarroba apresenta razão Man/Gal de 4:1 e a guar, uma razão Man/Gal de 2:1 (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

A galactomanana de alfarroba e guar apresentaram porcentagens de ácidos urônicos diferentes aos obtidos pela técnica colorimétrica de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Essa discrepância pode ser resultado da interferência do açúcar neutro presente nas amostras e pelo fato de ter-se realizado a curva padrão apenas com o ácido galacturônico, no método colorimétrico. Outra possibilidade é a que possa ter ocorrido uma hidrólise parcial dos derivados, com formação de ácido biurônico, ou

mesmo a provável decomposição de monossacarídeos neutros durante o processo de hidrólise.

A razão Man/Gal da AN foi reduzindo durante o processo de oxidação. Passando de 3,78:1 para 1,49:1, respectivamente para as amostras AN e amostra 4. Esta queda indica que durante a reação, primeiro a Man é preferencialmente oxidada e posteriormente a Gal, como observado para a amostra 5, à qual teve proporção de Man/Gal semelhante a nativa 3,93:1. Esses dados vêm corroborar com as ponderações apresentadas na cinética da reação. A razão de Ác. Man/Ác Gal também auxilia a comprovar este fato. Para as amostras de alfarroba oxidadas 1, 2, 3, 4 e 5 estes valores são de 3,3:1; 3,01; 2,09:1; 5,03:1 e 2,95:1, ou seja no grau de oxidação 4 temos a maior proporção de Ác. Man, após este grau a proporção diminui devido ao fato da Gal estar sendo mais oxidada.

No gráfico da reação de oxidação da goma de alfarroba (FIGURA 16) observamos que, após o grau de oxidação 4, não há mais um crescimento exponencial do consumo de mol de NaOH/g de polissacarídeo em função do tempo. Até o grau de oxidação 4, 59% de ácidos urônicos foram obtidos, durante os primeiros 50 min, utilizando 3,0 mol/g de polissacarídeo. Da amostra 4 a 5 são formados os restantes dos ácidos urônicos que correspondem a 23%, oxidados num período de 150 min, utilizando 1,5 mol/g de polissacarídeo, da qual a maior parte corresponde à galactose. Estes dados auxiliam na conclusão de que há uma preferência em oxidar primeiro a Man e depois a Gal nas amostras.

A reação de oxidação da goma guar, mostrou-se não linear. Apesar de apresentar dois eventos distintos o primeiro referente a uma cinética de 1ª ordem e um segundo de ordem zero, há quatro eventos ocorrendo. Primeiramente há um aumento da porção Man na molécula da amostra 2 (1,54:1) em relação à nativa (1,23:1). Da amostra 2 (1,51:1) para a 3 (2,85:1) há um aumento considerável de Ác. Man, fazendo com que esta amostra tenha a maior razão Ác. Man /Ác. Gal. Da amostra 3 para a amostra 4 há uma queda desta razão para 1,62:1, apesar desta ter uma razão Man/Gal 1,48:1, semelhante à da alfarroba amostra 4. A partir deste grau 4 de oxidação a reação se procede da mesma forma que a alfarroba, onde nota-se nitidamente a preferência por oxidar a galactose. A queda é mostrada pela porcentagem de Gal presente nas amostras: 45%, 25,6%, 25,4% e 4,7% correspondente a GN, e amostras oxidadas 2, 3, 4 e 5.

TABELA 11 – DADOS REFERENTES A DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM (%) DE AÇÚCARES NEUTROS E ÁCIDOS PRESENTES NA GUAR NATIVA (AN) E OXIDADAS. PROPORÇÃO DE MANOSE (MAN), GALACTOSE (GAL), ÁCIDO GALACTURÔNICO (ÁC. GAL) E ÁCIDO MANURÔNICO (ÁC. MAN) PRESENTE NAS AMOSTRAS.

Amostras	Man (%)	Gal (%)	Man/Gal	ÁC. Gal (%)	ÁC. Man (%)	ÁC. Man/ÁC. Gal
GN	55,28	44,72	1,23:1			
2	39,59	25,61	1,54:1	13,82	20,98	1,51:1
3	40,50	25,41	1,59:1	8,84	25,25	2,85:1
4	28,80	19,35	1,48:1	19,79	32,06	1,62:1
5	25,09	4,67	5,37:1	23,66	46,58	1,97:1

(1) – por DIONEX Thermo Scientific. Modelo: ICS-5000 com eletrodo ED de ouro. Coluna CarboPac™ PA20 Analytica (3x 150mm).

Devido a grande quantidade de Gal na goma Guar, houve uma oxidação total maior na Gal que na Man.

5.3.3 Análise cromatográfica de exclusão por tamanho (SEC)

Os parâmetros de massa molar média-ponderal (M_w), massa molar média-numérica (M_n), viscosidade intrínseca ($[\eta]$), raio de giração (R_g) e a constante de Mark-Houwink (α) foram obtidos utilizando o incremento do índice de refração (dn/dc) previamente calculados com o solvente TRIS-HCl 0,1 mol/L em pH 8, sendo o dn/dc para a goma guar nativa de 0,159 mL/g, goma guar oxidada amostra 1, 2, 3, 4 e 5 de 0,165 mL/g; 0,160 mL/g; 0,151 mL/g; 0,129 mL/g e 0,184 mL/g, respectivamente e para a alfarroba nativa de 0,139 mL/g e alfarroba oxidada amostra 1, 2, 3, 4 e 5 de 0,135 mL/g; 0,134 mL/g; 0,157 mL/g; 0,185 mL/g e 0,185 mL/g respectivamente. Os cálculos foram realizados no software (OmniSEC) estão na TABELA 12 e 13.

A partir dos dados de espalhamento de luz obteu-se os valores de M_w do polímero. Para a GN previamente purificada a M_w foi de $2,4 \times 10^5$ g/mol. Para as frações modificadas este valor diminuiu com o aumento do grau de oxidação, com exceção da amostra 3 que apresentou um M_w de $2,9 \times 10^5$ g/mol. O motivo para isso pode estar na proporção de Ác. Man presente na amostra, valor superior as outras

oxidadas. A grande quantidade deste ácido pode ter gerado uma atração eletrostática e conseqüentemente resultou na agregação do polímero. A técnica de espalhamento de luz é sensível a presença de agregados, fazendo com que o valor de M_w seja maior que o real.

TABELA 12 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE GUAR NATIVA (GN) E AMOSTRA 1, AMOSTRA 2, AMOSTRA 3, AMOSTRA 4, AMOSTRA 5 ⁽¹⁾

	Amostras					
	GN	1	2	3	4	5
Vol. Eluição (mL)	7,8	8,05	8,08	8,2	8,3	8,5
M_w (g.mol⁻¹)	$2,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$0,56 \times 10^5$
M_w/M_n	1,0	2,0	1,7	1,9	1,4	1,9
$[\eta]$ (dL/g)	2,0	1,7	1,2	0,8	0,7	0,5
R_g (Flory-Fox) (nm)	25	22	18	17	12,5	10,0
L_p (nm)	4,15	3,8	2,55	1,5	1,86	2,8
Mark-Houwink a	0,9	0,2	0,3	0,5	1,1	0,2
dn/dc	0,159	0,165	0,160	0,151	0,129	0,184
Recuperação (%)	88	70	78	62	82	98

1. – por SEC Viscotek 270 Dual Detector, colunas SB-806M-HQ, fluxo 0,4 ml/min, a 40 °C

Com o objetivo de verificar se o meio reacional básico poderia estar afetando os valores de M_w , as galactomananas nativas de guar e alfarroba foram submetidas as mesmas condições da reação de oxidação descritas neste trabalho (por um período de 30 min), apenas não foi adicionado o reagente TEMPO. Observou-se que houve uma diminuição da M_w , $[\eta]$, R_g e maior polidispersão com relação AN. Nessas condições os valores obtidos foram de $M_w = 2,0 \times 10^5$ g/mol, $M_w/M_n = 2,0$, $[\eta] = 2,55$ dL/g, $R_g = 25$ nm. Esses dados indicam que houve uma desagregação devido ao entrelaçamento das cadeias poliméricas. O mesmo não ocorreu para a goma Guar que obteve valores de $M_w = 2,6 \times 10^5$ g/mol, $M_w/M_n = 1,47$, $[\eta] = 2,3$ dL/g, $R_g = 26$ nm, os quais são semelhantes a GN. Por estes motivos conclui-se que o meio reacional básico utilizado durante a reação de oxidação não é o responsável pela diminuição dos valores de M_w , devido a β -eliminação. Há possibilidade de que o tratamento dado as amostras tenha reduzido o estado de agregação dos polissacarídeos, principalmente para galactomananas pouco substituídas por Gal, como a AN.

A $[\eta]$ diminuiu com o aumento do grau de oxidação da molécula, inclusive da amostra 3, o que é mais um indicio de que a grande proporção de Ác. Man na molécula

faz com que esta tenha uma tendência maior a agregação. Isso pode ser caracterizado pelo aumento de massa molar, mas não de $[\eta]$, sugestivo de formação de agregados moleculares de elevada massa, mas com um pequeno volume hidrodinâmico. Esses valores de viscosidade intrínseca foram de 2,0 dL/g para a GN e 1,7; 1,2; 0,8; 0,7 e 0,5 dL/g para as amostra 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. A presença de agregados na amostra 3 pode ser percebida também no baixo valor de recuperação da amostra de 62%, indicando que boa parte desta foi perdida no processo de filtração a 0,22 μm .

A proporção M_w/M_n , chamada de polidispersidade ou índice de polidispersão, é uma medida utilizada para medir a propagação da distribuição do polímero. Maiores valores de M_w/M_n indicam uma grande dispersão de massa. Quando $M_w/M_n = 1$ indica que todas as moléculas têm a mesma massa molar e não há polidispersão (SUN, 1922). Este valor de polidispersão M_w/M_n aumentou em relação a GN, variando de 2 a 1,4 para as amostra oxidadas. Situação semelhante foi observada no trabalho de Souza (2009), onde a oxidação do polissacarídeo levou ao aumento da polidispersão e diminuição dos valores de M_w e $[\eta]$.

O perfil de eluição para as amostras por SEC está demonstrado na FIGURA 25, a qual é correspondente ao perfil de eluição da AN e as formas oxidadas. Neste espectrograma podemos perceber que para a AN possui duas famílias, ou a presença de um agregados não dissociados.

A tendência de queda da M_w e $[\eta]$ e aumento do valor de M_w de acordo com crescente grau de oxidação da macromolécula também foi observado para as amostras de alfarroba, como descritas na TABELA 13. No caso da alfarroba esta afirmativa foi válida até a amostra 4. A amostra 5 apresentou além de uma aumento da M_w um aumento da $[\eta]$ e conseqüentemente um valor maior de raio de giração (R_g).

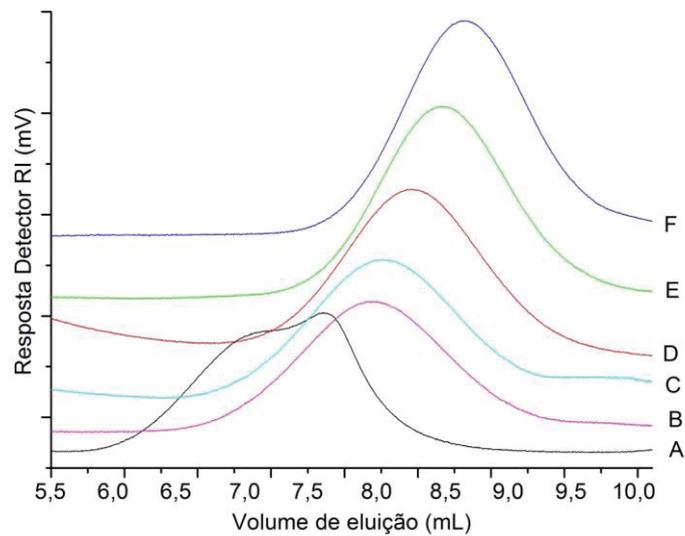


FIGURA 25 – PERFIL DE ELUIÇÃO DO SEC PARA A GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA E AMOSTRAS OXIDADAS ⁽¹⁾.

LEGENDA: Alfarroba nativa (A); amostra 1 (B); amostra 2 (C); amostra 3 (D); amostra 4 (E); amostra 5 (F).

(1) utilizando como fase móvel Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 8,0, contendo 200 ppm de azida, a um fluxo de 0,4 mL/min, coluna Shodex OH pack 806-HQ, 40oC.

O R_g para as amostras oxidadas mostraram-se menores em relação as nativas. Estes foram obtidos através da equação de Flory-Fox (1953). Frequentemente a determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ é utilizada indiretamente para determinar a massa molar através da utilização da relação de Mark-Houwink, $[\eta] = KM^\alpha$. A partir dessa relação podem-se avaliar as variações arquitetônicas, como ramificação, rigidez ou a formação de agregados. Se α estiver entre 0-0,3 considera-se a molécula como esferas compactas, valores entre 0,5-0,8 foram encontrados para conformações de cadeias flexíveis de conformação ao acaso (*random coil*), enquanto que 1,8 para moléculas rígidas em forma de bastão ou alongadas (STRIEGEL, 1967).

De acordo com o parâmetro α , para avaliação das variações arquitetônicas, as amostra de galactomananas de guar oxidada 1, 2, 5 e as amostras de galactomananas de alfarroba 1, 2, 3 estão na forma de esferas compactas. A galactomanana de AN e GN, como esperado, possuem uma conformação flexível como já foi descrito por Robinson, Ross Murphy e Morris (1982). As amostras de galactomanana de alfarroba oxidada 4 e 5 e guar oxidada 3 também apresentaram a mesma conformação. Entretanto a amostra 4 da guar oxidada teve um valor correspondente ao de moléculas rígidas.

TABELA 13 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ALFARROBA NATIVA E AMOSTRA 1, AMOSTRA 2, AMOSTRA 3, AMOSTRA 4, AMOSTRA 5 ⁽¹⁾

	Amostras					
	AN	1	2	3	4	5
Vol. Eluição (mL)	7,85	8,2	8,2	8,5	8,6	8,6
M_w (g.mol⁻¹)	2,7x10 ⁵	1,5x10 ⁵	1,47x10 ⁵	0,74x10 ⁵	0,43x10 ⁵	0,72x10 ⁵
M_w/M_n	1,5	2,6	1,6	1,9	1,7	2,0
[η] (dL/g)	4,9	4,0	1,2	0,8	0,6	1,04
R_g (Flory-Fox) (nm)	35	25	17	11,5	9	12
L_p (nm)	6,15	3,75	2,60	2,4	2,5	2,7
Mark-Houwink a	0,6	0,2	0,3	0,2	0,7	0,8
dn/dc	0,193	0,135	0,134	0,157	0,185	0,185
Recuperação (%)	69	93	85	89	82	87

1 por GPC Viscotek 270 Dual Detector, colunas SB-806M-HQ, fluxo 0,4 ml/min, a 40 °C

Freitas et al. (2004) oxidou seletivamente com reagente TEMPO a galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* L. e observou que houve uma diminuição do valor de M_w das galactoxiloglucanas oxidadas em relação à nativa. O trabalho também demonstrou que o processo de oxidação gerou moléculas mais rígidas em comparação à nativa, o que pode ser explicado pela presença e repulsão de cargas sobre a superfície da molécula, não eliminadas completamente pelo solvente utilizado.

Para determinação da rigidez intrínseca da cadeia polimérica, foram determinados os valores do comprimento de contorno (L), obtidos tomando-se como base que cada mero da galactomanana possui um comprimento de 0,52 nm (uma unidade monossacarídica). Para o cálculo da massa molar do mero (M_o) (FIGURA 26), o número desses seguimentos foi obtido através da razão entre a Gal/Man determinada a partir da quantificação dos açúcares pelo HPAEC-PAD, alfarroba 1:4 e guar em torno de 1:2. Sendo assim os valores obtidos para a guar e alfarroba estão demonstrados abaixo.

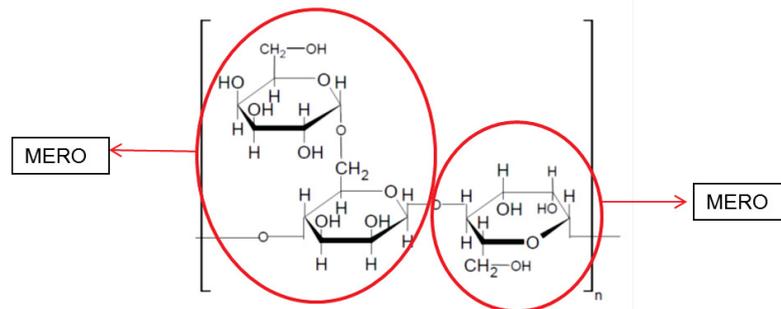


FIGURA 26 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA GALACTOMANANA E SEUS RESPECTIVOS MEROS.

FONTE: O autor.

$$Mo_{\text{Alfarroba}} = \frac{(25\% \times 324 \text{ g/mol}) + (75\% \times 162 \text{ g/mol})}{100} = 202,5 \text{ g/mol}$$

$$Mo_{\text{Guar}} = \frac{(50\% \times 324 \text{ g/mol}) + (50\% \times 162 \text{ g/mol})}{100} = 243 \text{ g/mol}$$

em que: o valor de 324 g/mol corresponde a massa molar do mero representado pela Man ligada a Gal e 162 g/mol a massa molar da manose, sem uma molécula de água, devido a formação de ligação glicosídica.

Os dados de comprimento de persistência (L_p) foram calculados a partir da equação 11 na pag. 36, ideal para cadeias semi-flexíveis ou “worm like”. Estes dados foram semelhantes aos encontrados por Picout e colaboradores (2002) utilizando o método de Burchard-Stockmayer-Fixman (BSF) e o método de Hearst, 3 nm e 7 nm respectivamente. Petkowicz e colaboradores (1998) obtiveram o valor de L_p para a galactomanana de 9,6 nm utilizando como o modelo “worm like”, enquanto que Morris e colaboradores (2008) utilizando a técnica desenvolvida por Ortega e Torra (2007), a qual utiliza o software multi-HYDFIT que fornece uma estimativa global dos parâmetros para cadeia *worm-like* como o L_p (comprimento de persistência) e o ML (massa por unidade de comprimento), e esses autores obtiveram valores de L_p para a guar e alfarroba de 8 nm e 9 nm, respectivamente.

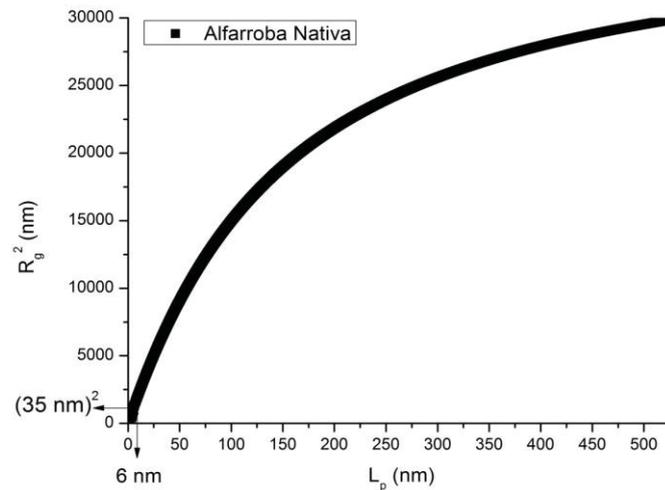


FIGURA 27 – RELAÇÃO ENTRE O RAIOS DE GIRAÇÃO (R_g^2) E O COMPRIMENTO DE PERSISTÊNCIA (L_p) PARA A ALFARROBA NATIVA (AN).

O L_p determinado a partir do R_g viscosimétrico obtido pela SEC possibilitou encontrar valores de L_p semelhantes aos de Patel e colaboradores (2006), entre 3-4 nm. Sugerindo que os entrelaçamentos e agregação das moléculas de galactomananas podem ser reduzidos pelo viscosímetro, sem nenhum processo de tratamento prévio como aquecimento ou pressão.

O L_p pode ser estimado fazendo-se uma relação com o raio de giração ao quadrado (R_g^2), como demonstrado na FIGURA 27. A flexibilidade da cadeia aumentou com o grau de oxidação da molécula. As amostras oxidadas de alfarroba 2, 3, 4 e 5 apresentaram valores semelhantes de L_p de 2,6 nm, 2,4 nm, 2,5 nm e 2,7 nm. Apenas a amostra 1 não teve um valor tão baixo (3,75 nm) devido a seu menor grau de oxidação. O mesmo ocorreu com a amostra 1 da guar oxidada (3,80 nm). A amostra 3, da guar oxidada, apresentou um valor de L_p extremamente pequeno (1,5 nm) indicando que esta molécula é muito flexível. Esta flexibilidade pode estar relacionada principalmente a oxidação da manose, levando a desestruturação de interações intracadeia, resultando no aumento da flexibilidade do mero.

5.3.4 Espalhamento de Luz estático e Gráfico de Zimm

A partir do gráfico da razão Kc/R_θ versus $\sin^2(\theta/2) \times \text{constante} \times c$, obteve-se os valores de massa molar, raio de giração e segundo coeficiente virial (A_2) para a GN e AN, respectivamente (FIGURA 28 e 29). Os valores de massa molar, raio de giração e comprimento de persistência foram maiores que os obtidos através da técnica de cromatografia de exclusão por tamanho o que indica a formação de agregados ou entrelaçamentos moleculares.

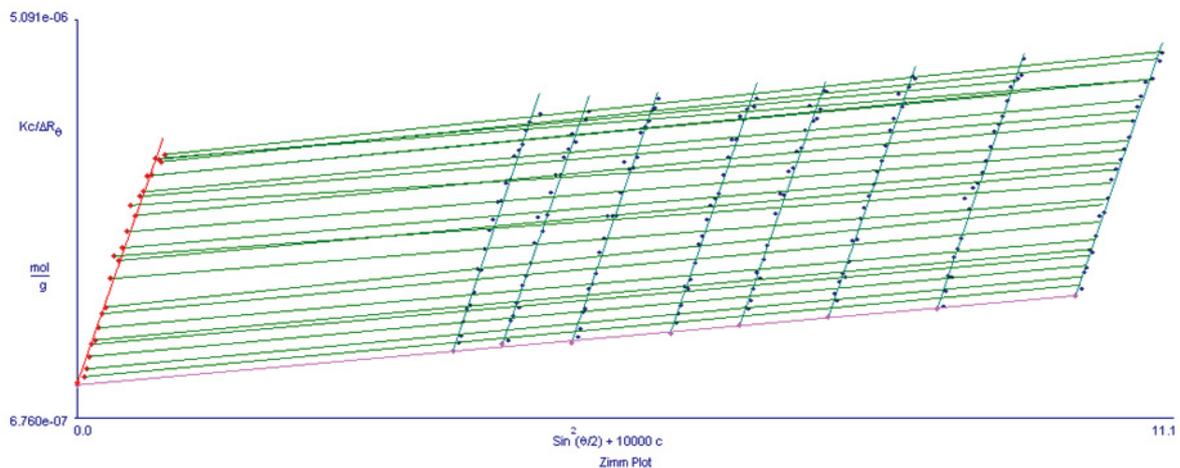


FIGURA 28 - GRÁFICO DE ZIMM DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA NATIVA (AN) EM TRIS-HCl 0,1 MOL/L, pH 8,0, UTILIZANDO AZIDA A 200 PPM, EM TEMPERATURA DE 25°C. FONTE: O autor.

De acordo com os dados apresentados das 12 amostras de GN e AN e galactomananas oxidadas, observa-se um A_2 positivo ($A_2 > 0$), muito próximo de zero, mostrando que o TRIS-HCl a 0,1 mol/L/pH 8,0 é um bom solvente. Quando o $A_2 < 0$ é um indicativo de que a molécula prefere interagir com ela do que com o solvente. Esta interação pode levar a agregação e a precipitação molecular, bem como fazer com que haja um valor de massa molar maior do que o real devido à presença de particulados que espalham mais que a luz. Este parâmetro termodinâmico é um importante dado que é utilizado no cálculo da massa molar média-ponderal no SEC, pois nem sempre é possível utilizar um solvente θ (theta) como fase móvel, o que fatalmente contamina os dados de raio de giração. Por isso faz-se necessário este valor para a correção dos cálculos, principalmente se tratando de macromoléculas

cuja expansão devido à interação entre a molécula e o solvente pode aumentar o valor de raio de giração (STRIEGEL, 2003).

Dentre as galactomananas oxidadas, as amostras de guar 1 e 5 apresentaram o A_2 mais próximo de zero $6,0 \times 10^{-6}$ e $4,4 \times 10^{-6}$, o que indica que estas são as que menos sofrem influência do solvente sobre sua conformação.

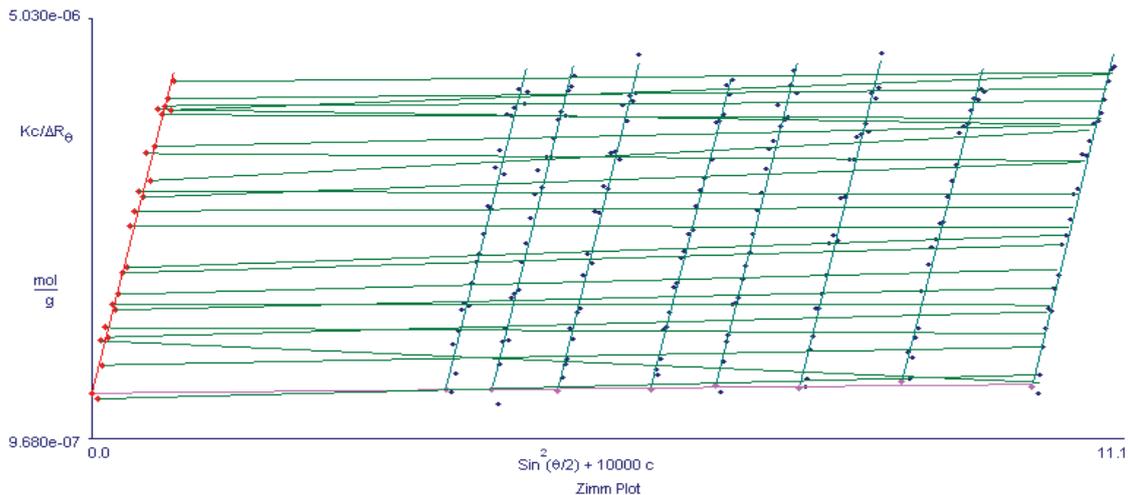


FIGURA 29 - GRÁFICO DE ZIMM DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA OXIDADA AMOSTRA 5, EM TRIS-HCl 0,1 MOL/L, pH 8,0, UTILIZANDO AZIDA A 200 PPM, EM TEMPERATURA DE 25°C. FONTE: O autor.

Nos dados de cromatografia por exclusão de tamanho, o R_g é calculado utilizando-se os detectores de espalhamento de luz em vários ângulos e o viscosimétrico para se obter os valores de viscosidade intrínseca $[\eta]$ (STRIEGEL, 2003). Através da equação de Flory-Fox (FLORY, 1953) foi obtido o R_g , que não é significativamente afetado pela presença de particulados, agregados moleculares ou outros contaminantes presente na amostra. A técnica de espalhamento de luz é fortemente afetada pela presença desses particulados, por isso os valores de R_g , M_w e L_p são maiores, comparando-se com os obtidos pelo SEC, como mostrado nas TABELAS 14 e 15.

A técnica de espalhamento de luz estática foi realizada com a finalidade de se comparar os valores de R_g e L_p com os valores obtidos no gráfico de Zimm. Apesar destes valores não serem iguais, há uma tendência similar. Como se pode ver com relação a amostra 1, tanto através do espalhamento de luz estático, como no gráfico de Zimm, foi a amostra que teve o maior R_g , 154 nm e 137 nm, respectivamente. Comparando-se o R_g da amostra 1 pelo espalhamento de luz com o valor obtido pelo

espalhamento de luz e o calculado a partir do dado de $[\eta]$, observa-se que este é cerca de 6 vezes superior ao obtido pela $[\eta]$, o que indica a presença de estruturas supramoleculares em solução, influenciando os resultados obtidos. Das amostras oxidadas de alfarroba a 4 foi a qual apresentou o maior valor de M_w ($1,1 \times 10^6$ g/mol), apesar de os dados de SEC desta amostra, terem apresentado o menor M_w e R_g . Dentre as amostras de alfarroba oxidadas esta é a que apresenta a maior razão de Ác. Man/Ác. Gal 5,03:1, o que pode explicar o motivo da grande agregação

TABELA 14 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS DE ALFARROBA NATIVA E AMOSTRA 1 , AMOSTRA 2 , AMOSTRA 3 , AMOSTRA 4 , AMOSTRA 5 A PARTIR DOS GRÁFICOS DE ZIMM OBTIDOS PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO ⁽¹⁾

Gráfico de Zimm				
Amostras	R_g (nm)	L_p (nm)	M_w (g/mol)	A_2 (cm³mol/g²)
AN	112,3	12,87	$9,3 \times 10^5$	$(4,9 \pm 0,14) \times 10^{-4}$
1	137	-*	$1,48 \times 10^5$	$(1,2 \pm 2,8) \times 10^{-4}$
2	94,9	12,53	$9,4 \times 10^5$	$(9,5 \pm 3,7) \times 10^{-5}$
3	95,8	36,49	$3,7 \times 10^5$	$(9,2 \pm 0,83) \times 10^{-4}$
4	120,8	17,8	$1,1 \times 10^6$	$(1,6 \pm 0,41) \times 10^{-4}$
5	101,9	20,1	$6,9 \times 10^5$	$(1,7 \pm 3,0) \times 10^{-5}$

(1) Espalhamento de luz multi-ângulos Brookhaven Instrumentos BI-9000, He-Ne laser a 632,8 nm, com 23 ângulos de espalhamento entre 30° a 140°.

* Não foi possível realizar o cálculo de L_p para esta amostra.

TABELA 15 – PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS GALACTOMANANAS DE GUAR NATIVA E AMOSTRA 1, AMOSTRA 2, AMOSTRA 3, AMOSTRA 4, AMOSTRA 5 A PARTIR DOS GRÁFICOS DE ZIMM OBTIDOS PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO ⁽¹⁾.

Gráfico de Zimm				
Amostras	R_g (nm)	L_p (nm)	M_w (g/mol)	A₂ (cm³mol/g²)
GN	107,3	18,9	9,7 x 10 ⁵	(4,4 ± 0,13)x10 ⁻⁴
1	78,2	11,7	8,3 x 10 ⁵	(6,0 ± 0,28)x10 ⁻⁶
2	83,8	23,7	4,9 x 10 ⁵	(5,0 ± 0,42)x10 ⁻⁴
3	63,1	24,2	2,9 x 10 ⁵	(6,6 ± 0,91)x10 ⁻⁴
4	73,8	26,7	3,5 x 10 ⁵	(3,4 ± 0,61)x10 ⁻⁴
5	83,1	25,3	4,6 x 10 ⁵	(4,4 ± 0,44)x10 ⁻⁶

1. - Espalhamento de luz multi-ângulos Brookhaven Instrumentos BI-9000, He-Ne laser a 632,8 nm, com 23 ângulos de espalhamento entre 30° a 140°.

A amostra de guar oxidada 3 apresentou um valor de M_w (2,9 x 10⁵ g/mol) semelhante ao obtido por SEC. Esta amostra também apresentou o menor valor de R_g, tanto no gráfico de Zimm quanto no espalhamento de luz estática, de 63,1 nm e 54,9 nm. As demais todas tiveram um valor de M_w e R_g superiores aos obtidos por SEC, como detalhado na TABELA 15.

De acordo com Freitas e colaboradores (2005, 2010 e 2011), os valores de $[\eta]$ são os mais indicados para se realizar os cálculos do comprimento de persistência, pois este parâmetro não sofre a influência da formação de agregados moleculares. Por este motivo apesar dos valores de L_p terem sido calculados por espalhamento de luz, e apresentados nas tabelas 14 e 15, eles não foram considerados como indicativo para determinar a flexibilidade da cadeia polimérica, por terem sido fortemente afetados pela presença de agregados ou entrelaçamentos moleculares das galactomananas nativas e oxidadas.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados da cinética da reação de oxidação da goma guar e alfarroba pode-se concluir que há uma preferência em oxidar primeiro a manose e posteriormente a galactose na goma de alfarroba. Na cinética da goma guar inicialmente há uma oxidação na galactose, cuja oxidação decresce com o aumento da oxidação da manose, e por fim, a galactose volta a ser novamente oxidada.

A oxidação foi confirmada através dos espectros de Infravermelho onde se observou nas amostras oxidadas a banda em 1730 cm^{-1} , referente aos ácidos carboxílicos. A determinação de ácidos urônicos foi utilizada como uma prova da oxidação dos monossacarídeos das galactomananas.

Os dados de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) também auxiliaram na confirmação da oxidação. Através dos espectros bidimensionais de HMQC (C-H), pode-se observar o desaparecimento do deslocamento químico (δ) em 61 e 62 ppm referentes ao C-6. Comprovando assim a seletividade do reagente a hidroxila primária do carbono C-6 durante a oxidação. Nos espectros de RMN ^1H os sinais dos hidrogênios anoméricos sem modificação encontraram-se em 5,44 ppm e 5,16 ppm para a galactose e manose. Os sinais dos prótons do monossacarídeo que possui a oxidação foram encontrados em 5,61 ppm e 5,29 ppm. Além desses sinais foram encontrados nas amostras oxidadas sinais referentes a hidrogênios anoméricos intermediários, relacionados a aldeídos formados durante a reação. Para a galactomanana de alfarroba esses sinais estão em 5,21 ppm e 5,20 ppm amostra 1, 2, 4 e 3. Nas amostras de galactomanana de guar parcialmente oxidadas 1, 2, 3 e 4 esses sinais apareceram em 5,20 ppm, 5,31 ppm, 5,30 e 5,32 ppm.

A razão Man/Gal da AN e as amostras oxidadas 1, 2, 3, 4, e 5 obtida pela cromatografia de troca iônica HPAEC-PAD foram 3,78:1; 1,98:1; 1,90:1; 1,77:1; 1,49:1 e 3,93:1. Esta queda nos indica que durante a reação a manose é preferencialmente oxidada e posteriormente a galactose. A razão Man/Gal para a guar nativa e oxidadas 1, 2, 3, 4 e 5 foram de 1,23:1; 1,59:1; 1,54:1; 1,59:1; 1,48:1 e 5,37:1, indicando uma oxidação inicial na galactose e posteriormente na manose, e ao final da reação, novamente a preferência por oxidação em galactose.

Os valores de M_w , $[\eta]$ e R_g diminuíram com o aumento do grau de oxidação. Enquanto que o valor de M_w/M_n foi maior que o valor da galactomanana nativa. As amostras oxidadas de alfarroba 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram L_p de 3,75 nm, 2,6 nm, 2,4

nm, 2,5 nm e 2,7 nm, enquanto que a alfarroba nativa teve um valor de 6,15 nm. A goma guar nativa teve um L_p de 4,15 nm enquanto que as oxidadas apresentaram valores menores de 3,8 nm, 2,55 nm, 1,5 nm, 1,86 nm e 2,80 nm referentes as amostras 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Conclui-se a partir desses dados que a flexibilidade da cadeia aumenta devido à oxidação das hidroxilas primárias do C-6 com o reagente seletivo TEMPO.

Os valores de massa molar, raio de giração e comprimento de persistência obtidos através da técnica de espalhamento de luz foram maiores que os adquiridos pela cromatografia de exclusão por tamanho o que indica a formação de agregados ou entrelaçamentos moleculares em solução, sugerindo que a viscosimetria é uma boa técnica para análise de galactomananas, sendo menos susceptível a interferência devido a presença de agregados moleculares.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, E. Endosperm mucilages of legumes. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 41, p. 2887–2890, 1949.

ASPINALL, G.O.; NICOLSON, A.J. The Catalytic Oxidation of European Larch Galactan. **Journal of the Chemical Society**, p. 2503-2507, 1960.

BEKKUM, H. van. F.W. Lichtenthaler (Ed.), **Carbohydrates as Organic Raw Materials**, VCH, Weinheim, pg. 289-310, 1991.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, v. 54, p. 484-489, 1973.

BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; MAIA, J.M.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A. A Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: Comparison with guar gum and locust bean gum. **Food Hydrocolloids**. V. 24, p. 184–192, 2010.

BRAGD, P.L.; BESEMER, A.C.; BEKKUM, H. V. Bromide-free TEMPO-mediated oxidation of primary alcohol groups in starch and methyl α -D-glucopyranoside. **Carbohydrate Research**, v. 328, p. 355-363, 2000.

BRESOLIN, T.M.B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, p.131-138, 1997.

BROWN, L.S.; HOLME, T.A. Cinética química. In: _ **Química Geral aplicada à Engenharia**. Cengage Learning 2005, p 416-459.

BUCKRIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 141-156, 2000.

CERQUEIRA, M.A.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; MARTINS, J.T.; SOUZA, B.W.S.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**. v. 22, p. 662-671, 2011.

CHUDZIKOWSKI, R.J. Guar gum its applications. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**. V. 22, p. 43-60, 1971.

CUNHA, P.L. da; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.A.P. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico **Química Nova**, vol. 32, No. 3, p. 649-660, 2009.

CUNHA, P.L.R.; VIEIRA, I.G.P.; ARRIAGA, A.M.C.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, v. 23, pg. 880-885, 2008.

DAAS, P.J.H.; SCHOLS, H.A.; DE JONGH, H.H. On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 329, p. 609–619, 2000.

DAKIA, P.A.; BLECKER, C.; ROBERT, C.; WATHLET, B.; PAQUOT, M. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. **Food hydrocolloids**, v. 22, p. 807-818, 2008.

DEA, I.C.M. Industrial Polysaccharides, Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications Progress in Biotechnology; Yalpani, M., ed.; **Elsevier Science: Amsterdam**, vol. 3, 1987.

DEA, I.C.M.; CLARK, A.H.; MCCLEARY, B.V. Effect of galactose-substitution patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 147, p. 275-294, 1986.

DEA, C.M.; MORRISON A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, p. 241–312, 1975.

DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 35, p. 341-376, 1978.

ELIASSON, A.C. **Carbohydrates in food**. 2nd ed. Series: Food science and technology. p. 233, 2006.

FILISSETTI-COZZI, T.M. C. C.; CARPITA, N.C. Measurement of Uranic Acids without Interference from Neutral Sugars. **Analytical Biochemistry**. V. 197, p. 157-162, 1991.
FLORY, P.J. **Principles of Polymer chemistry**. Cornell University Press: Ithaca, NY, 1953.

FREITAS, R. A. **Estrutura e Interações entre Galactoxiloglucanas e amido**. Curitiba, 2003. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FREITAS, R. A.; MARTIN, S.; PAULA, R.C.; FEITOSA, J.P.A.; SIERAKOWSKI, M-R. Effect of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of an oxidized galactoxyloglucan from *Hymenaea courbaril* (Jatobá) seeds. **Thermochimica Acta**, v. 409, p. 41–47, 2004.

FREITAS, R. A.; DRENSKI, M. F., ALB, A. M., REED, W. F. Characterization of stability, aggregation, and equilibrium properties of modified natural products; The case of carboxymethylated chitosans. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, p. 34-41, 2010.

FREITAS, R.A.; BUSATO, A.P.; MITCHELLA, D.A.; SILVEIRA, J.L.M. Degalatosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC–MALLS and viscosimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1636–1642, 2011.

GALAMBOS, J.T. The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. **Anal. Biochem.** V. 19, p. 119-132, 1967.

GANTER, J.L.M.S.; ZAWADSKI-BAGGIO, S.F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; REICHER, F. Structural studies of galactomannans from brazilian seeds. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 12, p. 753-767, 1993.

GIACOMELLI, F. **Tópicos em nanociência e nanotecnologia**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, v. 1, p. 93-106, 2008.

GOYCOOLEA, F.M.; MORRIS, E.R.; GIDLEY, M.J. Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of hyperentanglement in solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, pg. 69– 71, 1995.

HARTREE, E. F., Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives Linear Photometric Response. **Analytical Biochemistry**, 48, 422-427, 1972.

HERALD, C.T. Locust/Carob Bean Gum. **Food Hydrocolloids**, vol. 3, cap. 5, p.161-170, 1986.

INDIAN ACADEMY OF SCIENCES. **Light Scattering**. http://www.ias.ac.in/initiat/sci_ed/resources/chemistry/LightScat.pdf. Acesso em 30/10/2013.

ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 71-85, 2011.

KATO, Y.; MATSUO, R.; ISOGAI, A. Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p.69-75, 2003.

KOIZUMI K., KUBOTA Y., OZAKI H., SHIGENOBU K., FUKUDA M., TANIMOTO T. **J Chromatogr** 595: 340–345, 1992.

KOSTANSKI, L.K.; KELLER, D.M.; HAMIELEC, A.E. Size-exclusion chromatography - a review of calibration methodologies. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 58, p. 159-186, 2004.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, p. 1202, 2006.

LESCHZINER, C.; CEREZO, A.S. Correlation of chemical composition and optical rotation of water-soluble galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 11, pg. 113-118, 1969.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro – Ed, e-papers, 2001, 366p.

LUCYSZYN, N.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Carbohydrate Research at the UFPR. **Metals Materials and Processes**, Índia, v. 17, n. 3-4, p. 173-182, 2005.

LUCYSZYN, N. **Aplicação de galactomananas como substitutos parciais do agar no cultivo de tecidos vegetais**. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C.; MAQNUSON, K.; WHISTLER, R.L. Guar, Locust bean, Tara and Fenugreek gums. **Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives**. 3. ed. New York: Academic Press, p. 215-218, 1993.

MAURER, K.; DREFAHL, G. Oxidation with nitrogen dioxide, I. msgs. The representation of glyoxylic acid, glucuronic and galacturonic. **Ber. deut. chern. Ges**, v. 75 p. 1489-1491. 1942.

McCLEARY, B.V.; AMADO, R.; WARBEL, R.; NEUKOM, H. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 92, p. 269-285, 1981.

McCLEARY, B.V.; NURTHEN, E.; TARAVEL, F.R.; JOSELEAU, J.-P. Characterisation of the oligosaccharides produced on hydrolysis of galactomannan with β -D-mannanase. **Carbohydrate Research**, v. 118, pg. 91-109, 1983.

McCLEARY, B.V.; CLARK, A.H., DEA, I.C.M., REES, D.A. The fine structures of carob and guar galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 139, p. 237-260, 1985.

MATUDA, T.G.; MARIA NETTO, F. Partial chemical characterization of jatobá-do-cerrado seeds (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 353-357, 2005.

MONGE, E. S. Flora Agrícola Tomo I. Ministério da Agricultura, pesca e alimentacion – Secretaria General técnica. Madri: EDITA, p. 1294, 1994.

MORRIS, G.A.; PATEL, T.R.; PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.B.; ORTEGA, A.; TORRE, J.G. de la; HARDING, S.E. Global hydrodynamic analysis of the molecular flexibility of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 356–360, 2008.

NEUKOM, H. Galactomannan: properties and applications. **Lebensm-Wiss and Technol.**, London, v. 22, p. 41-45, 1989.

NOOY, A.E.J. DE; PAGLIARO, M.; BEKKUM, H. VAN.; BESEMER, A.C. Autocatalytic oxidation of primary hydroxyl functions in glucans with nitrogen oxides. **Carbohydrate Research**, v. 304, p. 117-123, 1997.

NOOY, A.E.J.; *et al.* TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on dimensions of the obtained polyelectrolyte chains. **Macromolecules**, v. 29, p. 6541-6547, 1996.

NOOY, A.E.J.; BESEMER, A.C.; BEKKUM, H.V. Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. **Carbohydrate Research**, v. 269, p. 89-98, 1995.

NOOY, A.E.J.; BESEMER, A.C.; BEKKUM, H.V. Highly selective TEMPO mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides. **Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas-Journal Of The Royal Netherlands Chemical Society**, v. 113, p. 165-166, 1994.

ORTEGA, A.; TORRE, G. DE LA. Equivalent radii and ratios of radii from solution properties as indicators of macromolecular conformation, shape and flexibility. **Biomacromolecules**. v. 8, p. 2464-2475, 2007.

ONO, L. **Atividade antiviral de Galactomananas modificadas por Oxidação e/ou sulfatação**. Curitiba, 2004. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PATEL, T. R., PICOUT, D. R., ROSS-MURPHY, S. B., & HARDING, S. E. Pressure cell assisted solution characterisation of polysaccharides. 3. Application of analytical ultracentrifugation techniques. **Biomacromolecules**. V. 7, p. 3513–3520, 2006.

PAVIA, D.L. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

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

PICOUT, D. R., ROSS-MURPHY, S. B., JUMEL, K., & HARDING, S. E. Pressure cell assisted solution characterisation of polysaccharides. 2. Locust bean gum. **Biomacromolecules**. V. 3, p. 761–767, 2002.

PIRES, L.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. An active heparinoid obtained by sulphatation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 165-169, 2001.

PRAJAPATI, V. D., JANI, G. K., MORADIYA, N. G., RANDEIRA, N. P., & NAGAR, B. J. Locust bean gum: A versatile biopolymer, **Carbohydrate Polymers**. p. 814–821. 2013.

REID, J.S.G. & MEIER, H. Chemotaxonomic aspects of the reserve galactomannan in leguminous seeds. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, 62:89-92, 1970.

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

SEMMEHACK, M.F.; CHOU, C.S.; CORTES, D.A. Nitroxyl-Mediated Electro-oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, pg. 4492-4494. 1983.

SHARMAN, W.R.; RICHARDS, E.L.; MALCOLM, G.N. Hydrodynamic Properties of Aqueous solutions of galactomannans. **Biopolymers**, vol. 17, pg. 2817-2833, 1978.

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

SIERAKOWSKI, M. R.; FREITAS, R. A.; FUJIMOTO, J.; PETRI, D. F. S. Adsorption behavior of oxidized galactomannans onto amino-terminated surfaces and their interaction with bovine serum albumin. **Carbohydrate Polymers**. v. 49, n. 2, p. 167-175, 2002.

SIERAKOWSKI, M. R.; FREITAS, R. A.; FUJIMOTO, J.; PETRI, D. F. S. Adsorption behavior of oxidized galactomannans onto amino-terminated surfaces and their interaction with bovine serum albumin. **Carbohydrate Polymers**. v. 49, n. 2, p. 167-175, 2002.

SIERAKOWSKI, M.-R.; MILAS, M.; DESBRIÉRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 51-57, 2000.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 339-350, 2005.

SOUZA, M.V.N. Utilização do TEMPO (N-OXIL-2,2,6,6-TETRAMETILPIPERIDINA) na oxidação de alcoóis primários e secundários. **Química Nova**, v. 27, p. 287-292, 2004.

SOUZA, C.F.de. **Galactomanana de sementes de *Caesalpinia férrea* var, *Ferrea*: Estrutura, modificação química e caracterização de Propriedades**. Curitiba, 2009. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V.P. Seeds galactomannans: an overview. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, p. 295-317, 2005.

STRIEGEL, A.M. **Multiple Detection in Size-Exclusion Chromatography**. New Orleans, La: ACS Divisions of Analytical Chemistry, 2003.

SUN, S. F. **Physical chemistry of macromolecules: basic principles and issues** 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 1922.

TUCKER, A. The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae). **Am. J. Bot.** v. 79 (1992), p. 318–327, 1992.

TERAOKA, I. **Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties**. John Wiley & Sons, Inc. ISBNs: 0-471-38929-3 (Hardback); 0-471-22451-0 (Electronic). 2002.

TRATHINGG, B. Size-exclusion Chromatography of Polymers Bernd Trathnigg. IN **Encyclopedia of Analytical Chemistry** R.A. Meyers (Ed.) Ó John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000. p. 8008–8034.

VALENGA, F. **Estudos de interação entre galactomanana e alginato e possíveis aplicações**. Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

WANGA, Q.; ELLISA, P.R.; ROSS-MURPHY, S.B. Dissolution kinetics of guar gum powders—II. Effects of concentration and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**. V. 53, p. 75–83, 2003.

WHISTLER, R.L. Solubility of polyssaccharides and their behaviour in solution. **Carbohydrates in Solution. ACS Advances in Chemistry Series**, v. 117, p. 242, 1973.

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. Industrial Gums: Polysaccharides and their derivatives. **New York: Academic Press**, p. 53-67, 1993.

WU, Y.; LI, W.; CUI, W.; ESKIN, N. A. M.; GOFF, H. D. A molecular modeling approach to understand conformation functionality relationships of galactomannans with different mannose/galactose ratios. **Food Hydrocolloids**, v. 26, pg. 359-364, 2012.

YACKEL, E.C.; KENYON, W.O. The Oxidation of Cellulose by Nitrogen Dioxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64 p. 121-127, 1942.

ZIMM, B. H. The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. **Journal of Chemical Physics**, v.16 pg. 1093, 1948.