

RILTON ALVES DE FREITAS

**ESTRUTURA E INTERAÇÕES ENTRE GALACTOXILOGLUCANAS
E AMIDOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rita Sierakowski

CURITIBA

2003

RILTON ALVES DE FREITAS

ESTRUTURA E INTERAÇÕES ENTRE GALACTOXILOGLUCANAS E AMIDOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rita Sierakowski

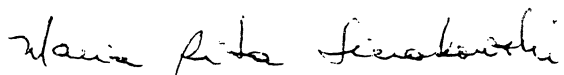
CURITIBA

2003

**ESTRUTURAS E INTERAÇÕES ENTRE GALACTOXILOGLUCANAS E
AMIDOS**

RILTON ALVES DE FREITAS

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão composta pelos professores:



Dr^a Maria Rita Sierakowski (Orientadora)
Departamento de Química/Grupo de Carboidratos – UFPR



Dr^a Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr^a Nery Nishimura de Lima
Curso de Engenharia de Alimentos – PUC, PR



Dr^a Marli Miriam de Souza Lima
Departamento de Farmácia – UEM



Dr. Marcos S. Buckeridge
Instituto de Botânica - USP

Curitiba, 11 de dezembro de 2003

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski

Parte desse trabalho foi desenvolvido:

- Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) com a colaboração de Maria Lenita de Rosso, Ana Paula Palka Rocha e Beatriz César.
- Departamento de Química Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, com a colaboração das Prof. Dra. Regina C. Paula e Judith P. A. Feitosa.
- Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, Instituto de Botânica de São Paulo com a colaboração do Prof. Dr. Marcos S. Buckerigde.

“Um nada, se comparado ao infinito, um tudo se comparado ao nada; um meio entre nada e tudo. Infinitamente afastado da compreensão dos extremos, o fim das coisas e seu principio estão invencivelmente escondidos num segredo impenetrável, igualmente incapaz de ver o nada de onde é tirado e o infinito pelo qual é absorvido”

(PASCAL)

A minha família: meus pais Levi Alves de Freitas, Maria Inês Alves de Freitas e irmãos Eliane, Aroldo e Gustavo, Jacildo Lara Martins e Prof. Maria Rita Sierakowski.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Rita Sierakowski, por todos os ensinamentos, confiança, apoio, orientação segura e liberdade científica concedida e por ceder sua experiência de vida, amizade e companherismo aos seus pupilos.

À professora Fany Reicher e Carmem L. de Oliveira Petkowicz do Laboratório de Carboidratos Vegetais pelo apoio e pela possibilidade de utilização do reômetro HAAKE e do aparelho de espalhamento de luz, que foram de fundamental importância para realização deste trabalho.

À Maria Lenita de Rosso, Ana Paula Palka Rocha e Beatriz César pelo apoio no desenvolvimento do trabalho junto ao TECPAR, nas análises de composição química e cultivo celular.

Às professoras Regina C. Paula e Judith P. A. Feitosa da Universidade Federal do Ceará pelo apoio no desenvolvimento das análises térmicas.

Ao professor Marcos S. Buckeridge do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, Instituto de Botânica de São Paulo pela colaboração da análise da composição em oligossacarídeos por hidrólise enzimática.

À Dra. Sônia Cachoeira Stertz do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de alimentos.

Aos alunos Juliana Neves e Gustavo Leme dos Santos, pela amizade e apoio nos experimentos, uma vez que sem eles, seria impossível realizar o trabalho em tão pouco tempo.

Às amigas do coração Sandra Martin, Lucy Ono, Andréia, Ana Paula, Ana Cristina F. Brito e Paula Cristina de Souza Faria, pela amizade e apoio incondicional.

Aos colegas de laboratório Adriana Salamoni, Cristiane Ribeiro, Francine Valenga, Helena Wihelm, Milena H. Homma, Neoli Lucyszyn pelo apoio e horas de descontração.

À todos os professores, colegas de curso e trabalho, funcionários e amigos que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Capes - PROCAD, CNPq e PRONEX-Carboidratos e Programa Paraná Agroindustrial pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS.....	ix
	LISTA DE FIGURAS.....	x
	LISTA DE ABREVIACÕES.....	xvii
	RESUMO.....	xix
	ABSTRACT.....	xxi
1.0.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	AMIDO.....	1
1.2.	GALACTOXILOGLUCANAS	7
1.3.	REOLOGIA.....	11
1.4.	MASSA E CONFORMAÇÃO MOLECULAR.....	22
1.4.1.	CROMATOGRÁFICA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (SEC).....	23
1.4.2.	ESPALHAMENTO DE LUZ	25
1.4.2.1.	Espalhamento de luz para partículas pequenas.....	26
1.4.2.2.	Espalhamento de luz para partículas grandes.....	28
1.4.3.	DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO MACROMOLECULAR EM SOLUÇÃO.....	29
2.0.	OBJETIVOS.....	34
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	34
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3.0.	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1.	OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	35
3.1.1.	GALACTOXILOGLUCANAS.....	35
3.1.2.	AMIDOS.....	35
3.2.	OXIDAÇÃO SELETIVA POR TEMPO (2,2,6,6- tetrametilpiperidina-1-oxil).....	36
3.3.	ANÁLISES QUÍMICAS.....	36
3.3.1.	TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS, ÁCIDOS URÔNICOS E PROTEÍNAS.....	36
3.3.2.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMIOLOSE.....	37

3.3.2.1.	Interação galactoxiloglucana – amilose: ensaio competitivo com iodo.....	37
3.3.3.	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA.....	37
3.3.3.1.	Hidrólise com H ₂ SO ₄	37
3.3.3.2.	Redução, acetilação e análise por cromatografia gasosa.....	38
3.3.4.	METILAÇÃO.....	38
3.4.	MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS.....	39
3.4.1.	UMIDADE, CINZAS e LIPÍDEOS.....	39
3.4.2.	DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR.....	39
3.4.2.1.	Refratometria diferencial	39
3.4.2.2.	Cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC).....	39
3.4.2.3.	Determinação da concentração crítica por HPSEC-MALLS/IR.....	40
3.4.2.4.	Efeito do aquecimento sobre o comportamento hidrodinâmico.....	40
3.4.2.5.	Determinação da flexibilidade intrínseca da cadeia – Razão Característica (C _∞) e Comprimento de Persistência (L _p).....	41
3.4.2.6.	Análises em batelada (gráfico de Zimm).....	43
3.4.3.	POLARIMETRIA.....	43
3.4.4.	ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE FTIR.....	44
3.4.5.	ANÁLISE DE RMN ¹³ C E ¹ H.....	44
3.4.6.	ANÁLISES TÉRMICAS.....	44
3.4.6.1.	Análises termogravimétricas.....	45
3.4.6.1.1.	Análises cinéticas da termogravimetria.....	45
3.4.6.2.	Análise de varredura diferencial de temperatura (DSC).....	46
3.4.6.2.1.	Análises cinéticas do DSC.....	46
3.4.7.	ANÁLISES REOLÓGICAS.....	47

3.4.7.1.	Viscosidade intrínseca.....	47
3.4.7.2.	Determinação da concentração crítica.....	47
3.4.7.3.	Análises dinâmicas oscilatórias.....	47
3.4.8.	ENSAIOS BIOQUÍMICOS: ENZIMÁTICOS E CELULARES.....	48
3.4.8.1.	Obtenção e análise dos oligossacarídeos.....	48
3.4.8.2.	Análise de citotoxicidade dos polissacarídeos nativos e modificados.....	48
3.4.8.2.1.	Ensaio teste de difusão em ágar (USP XXII).....	48
3.4.8.2.2.	Viabilidade celular utilizando corante vital azul de tripan.....	49
3.4.8.3.	Digestão pela α -amilase.....	50
4.0.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1.	GALACTOXILOGLUCANAS.....	51
4.1.1.	OBTENÇÃO DAS GALACTOXILOGLUCANAS NATIVAS.....	51
4.1.2.	ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTOXILOGLUCANAS.....	51
4.1.3.	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA GALACTOXILOGLUCANA (HC-I).....	57
4.1.4.	ANÁLISE por ^{13}C -RMN DE HC-I E HC-IOX.....	64
4.1.5.	ANÁLISES REOLÓGICAS DAS GALACTOXILOGLUCANAS....	68
4.1.6.	ANÁLISES POR HPSEC-MALLS.....	73
4.1.6.1.	Efeito do aquecimento sobre o comportamento macromolecular.....	73
4.1.6.2.	Determinação da flexibilidade intrínseca da cadeia polimérica – Razão Característica (C_{∞}).....	77
4.1.7.	ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS.....	79
4.1.7.1.	ANÁLISES CINÉTICAS DA TERMOGRAVIMETRIA.....	82
4.2.	AMIDOS.....	86
4.2.1.	ANÁLISES QUÍMICAS.....	86
4.2.2.	ANALISE POR ^{13}C RMN DAS AMOSTRAS DE AMIDO.....	88
4.2.3.	DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR (M_w), SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL (A_2) E RAIOS DE GIRO (R_g) PELO	

	MÉTODO DE ZIMM PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO.....	91
4.2.4.	ANÁLISE DE VARREDURA DIFERENCIAL DE TEMPERATURA (DSC).....	95
4.2.4.1.	Análises cinéticas das varreduras diferenciais de temperatura (DSC).....	98
4.3.	INTERAÇÃO AMIDOS – GALACTOXILOGLUCANA.....	101
4.3.1.	ENSAIO DE COMPETIÇÃO ENTRE A HC-I E IODO COM A AMIOSE.....	101
4.3.2.	ENSAIOS REOLÓGICOS DAS INTERAÇÕES HC-I E AMIDOS..	102
4.3.2.1.	Interação galactoxiloglucana (HC-I) – amido de milho com alto teor de amilose.....	102
4.3.2.2.	Interação galactoxiloglucana (HC-I) – amido de milho comum.....	107
4.3.2.3.	Interação galactoxiloglucana (HC-I) – amido de milho rico em amilopectina.....	109
4.3.2.4.	Interação Galactoxiloglucana (HC-I) – amido de cará e amido de mandioca.....	113
4.3.2.5.	Efeito da massa molecular sobre a interação galactoxiloglucanas- amilose.....	119
4.3.3.	INTERFERÊNCIA DA INTERAÇÃO NA DIGESTÃO PELA ENZIMA α- AMILASE.....	120
4.3.4.	AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GALACTOXILOGLUCANA – AMIOSE POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	123
4.4.	ANÁLISES DE CITOTOXICIDADE.....	125
4.4.1.	AGAR “OVERLAY”.....	125
4.4.2	ENSAIO DE CRESCIMENTO E VIABILIDADE CELULAR.....	127
5.0.	CONCLUSÕES.....	131
	REFERÊNCIAS.....	134
	ANEXOS.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química e rotação óptica específica das galactoxiloglucanas.....	52
Tabela 2 – Composição monossacarídica das galactoxiloglucanas.....	53
Tabela 3 – Proporção relativa dos oligossacarídeos componentes da galactoxiloglucanas de sementes de Jatobá e Tamarindo.....	55
Tabela 4 – Acetato de alditóis parcialmente metilados derivados das galactoxiloglucanas extraídas de sementes de <i>H. courbaril</i>	56
Tabela 5 – Determinação da porcentagem (m/m) de oxidação das amostras HC-IOX's	60
Tabela 6 – Concentração crítica (c^* g.L ⁻¹) para as amostras de galactoxiloglucanas.....	69
Tabela 7 – Massa molar, polidispersão, raio de giro, e viscosidade intrínseca para as amostras de galactoxiloglucanas solubilizadas por 16 h a 25°C.....	73
Tabela 8 – Massa molar, polidispersão, raio de giro, e viscosidade intrínseca para as amostras de galactoxiloglucana após o aquecimento a 85°C por 2 h e posterior resfriamento a temperatura ambiente.....	74
Tabela 9 – Razão característica (C_{∞}) e comprimento de persistência (L_p)....	78
Tabela 10 – Razão característica (C_{∞}) e comprimento de persistência (L_p) para soluções aquecidas a 85°C por 2 h e posterior resfriamento a temperatura ambiente.....	78
Tabela 11 – Temperaturas de degradação e porcentagem de perda de massa para a galactoxiloglucana nativa (HC-I) e modificadas (HCIOX 3, 5 e 10), em taxa de aquecimento de 2,5°C.min ⁻¹	81
Tabela 12 – Análise da composição química das amostras (g%) de amidos de diferentes fontes.....	86
Tabela 13 – Temperatura inicial (T_i), final (T_f), e do pico (T_m) do processo de gelatinização para as amostras de amido de cará, mandioca, amido comum de milho e amido de milho com altos teores de amilopectina em taxas de aquecimento de 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0°C.min ⁻¹	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da retrogradação da amilose (WURZBURG, 1986).....	6
Figura 2 – Escoamento de fluido em regime laminar (NAÉ, 1993).....	13
Figura 3 - Curva de fluxo (1) e Perfil de viscosidade (2) de fluidos com comportamento newtoniano e não newtoniano, onde A representa um fluido newtoniano; B pseudoplástico; C plástico e D dilatante (NAÉ, 1993).....	15
Figura 4 – Função de onda representando o comportamento de sólido elástico, líquido e material viscoelástico.....	19
Figura 5 - Módulo de cisalhamento complexo (G^*), módulo de armazenamento ou dinâmico (G') e módulo de perda (G'') em função da deformação (%) (NAÉ, 1993).....	20
Figura 6 – Módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento (G'); de perda (G'') e viscosidade dinâmica complexa (η^*) em função da frequência (Hz) para: (A) gel forte; (B) gel fraco ou rede emaranhada; (C) solução diluída (GIDLEY e ROBINSON, 1990).....	21
Figura 7 – Influência da massa molecular sobre os valores de M_w e M_n (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).	24
Figura 8 – Diagrama do espalhamento de luz (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).....	25
Figura 9 – Representação esquemática da distância ponta a ponta e raio de giro (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).	32
Figura 10 – Perfil de eluição dos oligossacarídeos limites obtidos por digestão com celulase da amostra de galactoxiloglucana obtida de sementes colhidas na reserva de Foz Chopim (HC-I).....	54
Figura 11 – Representação esquemática do processo de oxidação mediado por TEMPO. (a) radical TEMPO e (b) íon nitrosônio.....	59
Figura 12 – Volume da solução de NaOH ($0,0888 \text{ mol.L}^{-1}$) em função do tempo durante o processo de oxidação da galactoxiloglucana HC-I	59
Figura 13 – Espectro de FTIR para as amostras de galactoxiloglucana HC-I , HC-IOX3 , HC-IOX5 e HC-IOX10	61

Figura 14 – Perfil de eluição por HPSEC-espalhamento de luz (LS) (90°) para HC-I , HC-IOX3 , HC-IOX5 e HC-IOX10 . A – Nativo e B – Polissacarídeos oxidados. 2 – Perfil de eluição por HPSEC-IR.....	62
Figura 15 – R_g como uma função da massa molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) para as amostras HC-I e para os derivados oxidados HC-IOX3 e HC-IOX10	63
Figura 16 – Espectro de ^{13}C RMN, em D_2O , a 60°C , para a amostra de galactoxiloglucana HC-I . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.....	65
Figura 17 – Espectro de ^{13}C RMN, em D_2O , a 60°C , para a amostra HC-IOX3 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.....	66
Figura 18 – Espectro de ^{13}C RMN, em D_2O , a 60°C , para a amostra HC-IOX10 . Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.....	66
Figura 19 – Representação esquemática do nonassacarídeo (XLLG) da série antiga da galactoxiloglucana.....	68
Figura 20 – Representação gráfica da determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ em $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ para a amostra HC-I não aquecida (■) e aquecida a 85°C por duas horas (●).....	71
Figura 21 – Representação gráfica da determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ em $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ para a amostra HC-I aquecida a 120°C por 60 minutos.....	72
Figura 22 – Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/IR das galactoxiloglucanas obtidas de sementes de <i>H. courbaril</i> . A) HC-I ; B) HC-II ; C) HC-III ; D) HC-IV e E) HC-V . 1) Perfil de eluição pelo índice de refração (IR) e 2) Perfil de eluição por espalhamento de luz (LS).....	75
Figura 23 – Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/IR da galactoxiloglucana obtida de sementes de <i>T. indica</i> . 1) Perfil de eluição pelo índice de refração (IR) e 2) Perfil de eluição por espalhamento de luz (LS).....	76
Figura 24 – Gráfico de Roger: R_g^2/M_w como uma função da $M_w^{1/2}$ para as amostras de galactoxiloglucanas obtidas de sementes de <i>H. courbaril</i> solubilizadas a 25°C por 16 h (●), e solubilizadas a 25°C por 16 h e posteriormente aquecida a 85°C por 2 h (■).	77
Figura 25 – Curva de perda de massa para HC-I (A), HC-IOX3 (B), HC-IOX5 (C) e HC-IOX10 (D) em taxas de aquecimento de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e $40,0^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	80

Figura 26 - dTg do processo de perda de massa em função da temperatura, utilizando a taxa de aquecimento de 2,5°C.min ⁻¹ para as amostras HC-I e HC-IOX 3, 5 e 10	81
Figure 27 - Ln K com função de 1/T para as amostras HC-I (A), HC-IOX3 (B), HC-IOX5 (C), e HC-IOX10 (D). As retas representam o $\alpha\%$	83
Figura 28 – Relação entre a E _a das amostras HC-IOXs/HC-I em diferentes atores de conversão $\alpha\%$ (% de perda de massa).....	83
Figura 29 – Constante de velocidade para HC-I, HC-IOX 3, 5 e 10 em temperatura de 250°C (A) e 350°C (B).....	85
Figura 30 – Espectro de ¹³ C RMN, em DMSO- <i>d</i> ₆ , a 60°C, (A) amostra de amido milho com alto teor de amilose e (B) amido de milho com alto teore de amilopectina/SIGMA . Os deslocamentos são expressos em ppm.....	88
Figura 31 – Espectro de ¹³ C RMN, em DMSO- <i>d</i> ₆ , a 60°C, (A) amostra de amido de cará e (B) amostra de amido de mandioca cujos deslocamentos são expressos em ppm.....	90
Figura 32 – Gráfico de Zimm para a amostra de amido de milho com alto teor de amilose (SIGMA). Concentração de 0,125 g.L ⁻¹ a 1 g.L ⁻¹ , utilizando DMSO como solvente, a 25°C.....	92
Figura 33 – Gráfico de Zimm para a amostra de amido de milho comum (SIGMA) Concentração de 0,125 g.L ⁻¹ a 1 g.L ⁻¹ , utilizando DMSO como solvente, a 25°C.....	93
Figura 34 – Gráfico de Zimm para a amostra de amido de milho com alto teor de amilopectina (SIGMA). Concentração de 0,125 g.L ⁻¹ a 1 g.L ⁻¹ , utilizando DMSO como solvente.....	94
Figura 35 – Gráfico de Zimm para a amostra de amido de mandioca. Concentração de 0,125 g.L ⁻¹ a 1 g.L ⁻¹ , utilizando DMSO como solvente, a 25°C.....	94
Figura 36 – Gráfico de Zimm para a amostra de amido de cará. Concentração de 0,125 g.L ⁻¹ a 1 g.L ⁻¹ , utilizando DMSO como solvente, a 25°C.....	95

Figura 37 – Varredura diferencial de temperatura (DSC) em taxas de aquecimento de 2,5 – 5,0°C.min ⁻¹ para (A) amostras de amido de mandioca, (B) amido de cará, (C) amido comum de milho e (D) amido de milho com alto teor de amilopectina (5 mg de amido com 10 mg de água).....	96
Figura 38 - ln k (°C/min) como uma função do inverso da temperatura absoluta - 1/T (1/K) para: (A) amostra de amido de cará e (B) mandioca (5 mg com 10 mg de água).....	99
Figura 39 - E _a (kJ/mol) em função do grau de conversão ou grau de gelatinização (α%) para: (A) amostra de amido de cará, (B) amido de mandioca, (C) amido de milho comum e (D) amido de milho com alto teor de amilopectina.....	100
Figura 40 –Absorbância relativa a 620 nm para as misturas (galactoxiloglucana HC-I e amilose) e para a amilose isoladamente em presença de iodo.....	101
Figura 41 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para o amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L ⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.....	103
Figura 42 – Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a mistura entre o amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L ⁻¹)- galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.....	103
Figura 43 - Efeito da freqüência sobre os módulos de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica (η*) sob tensão de 0,5 Pa. (A) amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L ⁻¹); (B) amido de milho com alto teor de amilose (60 g.L ⁻¹); (C) mistura amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	104
Figura 44 - Efeito da freqüência sobre a tan de delta (δ) sob tensão de 0,5 Pa para o amido de milho com alto teor de amilose a 50 g.L ⁻¹ e 60 g.L ⁻¹ , e para a mistura amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	105
Figura 45 – Tan de delta (δ) em função da freqüência para as misturas entre galactoxiloglucana HC-I e amido de milho com alto teor de amilose, em proporções de 1:2,5; 1:5; 1:10 e 1:25, temperatura de 25°C.....	106

Figura 46 – Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para o amido de milho comum (50 g.L ⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.....	107
Figura 47 – Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a mistura do amido de milho comum (50 g.L ⁻¹) - galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.....	107
Figura 48 - Efeito da freqüência sobre os módulos de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica complexa (η^*) sob tensão de 0,1 Pa. (A) amido de milho comum (50 g.L ⁻¹); (B) amido de milho comum (60 g.L ⁻¹); (C) mistura amido de milho comum (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	108
Figura 49 - Efeito da freqüência sobre a tangente de delta (δ) sob tensão de 0,1 Pa para o amido de milho comum (60 g.L ⁻¹) e mistura amido de milho comum (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	109
Figura 50 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a amostra de amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L ⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.....	109
Figura 51 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a mistura amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.....	110
Figura 52 - Efeito da freqüência sobre os módulos de cisalhamento de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica (η^*), sob tensão de 0,1 Pa. (A) amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L ⁻¹); (B) amido de milho com alto teor de amilopectina (60 g.L ⁻¹); (C) mistura amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	111
Figura 53 - Efeito da freqüência sobre a tan de delta (δ) sob tensão de 0,1 Pa para o amido de milho com alto teor de amilopectina (60 g.L ⁻¹); e mistura amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	112

Figura 54 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para o amido de cará (50 g.L ⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.....	113
Figura 55 – Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a mistura do amido de cará (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.....	113
Figura 56 - Efeito da freqüência sobre os módulos de cisalhamento de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica (η^*), sob tensão de 0,5 Pa. (A) amido de cará (50 g.L ⁻¹); (B) amido de cará (60 g.L ⁻¹) e (C) mistura amido de cará (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	115
Figura 57 - Efeito da freqüência sobre a tan de delta (δ) sob tensão de 0,5 Pa para o amido de cará (60 g.L ⁻¹) e mistura amido de cará (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	116
Figura 58 - Efeito da freqüência sobre os módulos de cisalhamento de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica (η^*), sob tensão de 0,1 Pa. (A) amido de mandioca (50 g.L ⁻¹); (B) amido de mandioca (60 g.L ⁻¹) e (C) mistura amido de mandioca (50 g.L ⁻¹)-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹), temperatura de 25°C.....	118
Figura 59 - Efeito da freqüência sobre a tan δ sob tensão de 0,5 Pa para A mistura entre o amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L ⁻¹) - galactoxiloglucanas (10 g.L ⁻¹).....	120
Figura 60 – Porcentagem de redução de viscosidade para as amostras de amido (60 g.L ⁻¹); amido (50 g.L ⁻¹) e mistura galactoxiloglucana (10 g.L ⁻¹)-amido (50 g.L ⁻¹). (A) amido de milho com alto teor de amilose; (B) amido de milho comum; (C) amido de milho com alto teor de amilopectina; (D) amido de cará e (E) amido de mandioca.....	122
Figura 61 - Energia de ativação (E_a) em função do fator de conversão ($\alpha\%$) para a amostra liofilizada de amido de milho com alto teor de amilose (60 g.L ⁻¹) (■), galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹) (●) e mistura amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L ⁻¹) – galactoxiloglucana HC-I (10 g.L ⁻¹) (▼).....	124
Figura 62 – Análise esquemática de controle negativo (A), controle positivo (B) e galactoxiloglucana HC-I a 50 g.L ⁻¹ (C) do ensaio de citotoxicidade celular ágar “overlay”.....	126

Figura 63 – Viabilidade celular de células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com a amostra HC-I em concentrações de 0,2 a 0,0005% após 48 horas de cultivo em estufa de CO ₂ a 37°C.....	127
Figura 64 – Crescimento das células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com a amostra HC-I em concentrações de 0,2 a 0,0025% após 48 horas de cultivo em estufa de CO ₂ a 37°C.....	128
Figura 65 – Viabilidade celular de células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com a amostra HC-I em concentrações de 0,2 a 0,0005% após 96 horas de cultivo em estufa com 5% de CO ₂ a 37°C.	128
Figura 66 – Crescimento das células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com a amostra HC-I em concentrações de 0,2 a 0,0025% após 96 horas de cultivo em estufa de CO ₂ a 37°C.....	129
Figura 25 – Crescimento das células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com as amostras HC-I (0,05%) e HC-IOX5 (0,05%) após 48 horas de cultivo em estufa de CO ₂ a 37°C.....	130

LISTA DE ABREVIações

σ - tensão de cisalhamento
 η - viscosidade (mPas)
 η_{sp} - viscosidade específica
 η_{red} - viscosidade reduzida (mL/g)
 α - fator de expansão
 Φ - parâmetro de viscosidade
 $\alpha\%$ - fator de conversão em porcentagem
 $\dot{\gamma}$ - taxa de cisalhamento
 η^* - viscosidade dinâmica complexa (mPas)
 ΔH - entalpia (J/g)
 $[\eta]$ - viscosidade intrínseca (mL/g)
 $[\alpha]_D^{20}$ - rotação óptica específica
 $[\eta]_n$ - viscosidade intrínseca numérica média
 $[\eta]_{reologia}$ - viscosidade intrínseca determinada por viscosimetria
 $[\eta]_w$ - viscosidade intrínseca ponderal média
A - fator pré-exponencial da equação de Arrhenius
 A_2 - segundo coeficiente virial
 C_∞ - razão característica
CG-MS - cromatografia gasosa acoplada a detector de massa
 D_2O - água deuterada
Dept - distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO - dimetilsulfóxido
DMSO- d_6 - dimetilsulfóxido deuterado
 dn/dc - relação índice de refração pela concentração
DP - Grau de polimerização
DSC - varredura diferencial de temperatura
dTg - derivada da análise termogravimétrica
 E_a - energia de ativação (kJ/mol)
f - frequência [Hz]
 G^* - Módulo complexo de cisalhamento
 G' - módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento
 G'' - módulo viscoso ou de perda
G - gravidade
Galp - unidade de galactose na forma piranosídica
GlcP - unidade de glucose na forma piranosídica
HC-I - galactoxiloglucana de sementes de Jatobá de Foz do Chopim/PR
HC-II - galactoxiloglucana de sementes de Jatobá de Cuiabá/MT
HC-III - galactoxiloglucana de sementes de Jatobá de Sinop/MT
HC-IOX10 - galactoxiloglucana de jatobá com 9,5% de oxidação
HC-IOX3 - galactoxiloglucana de jatobá com 2,8% de oxidação
HC-IOX5 - galactoxiloglucana de jatobá com 5,4% de oxidação
HC-IV - galactoxiloglucana de sementes de Jatobá de Natal/RN

HC-V - galactoxiloglucana de sementes de Jatobá de Fortaleza/CE
HPSEC – cromatografia de exclusão estérica de alta performance
RI - índice de refração
k - constante de velocidade (s^{-1})
K - kelvin
k' - constante de Huggins
l - comprimento mínimo rígido
L_p – comprimento de persistência
LS – Espalhamento de luz
M - massa molecular
MALLS – detector de espalhamento de luz multiângulos
M_n - massa molecular numérica média (g/mol)
m₀ - massa do comprimento mínimo rígido
M_w - massa molecular ponderal média (g/mol)
M_w/M_n - grau de polidispersão
NA - número de avogrado
n_w - grau de polimerização
Pa – pascal
ppm = partes por milhão
R - constante universal dos gases
r - distância ponta a ponta ou distância extremo a extremo quadrática média
R_g = s² - raio de giro ou raiz quadrática média do raio (nm)
R_{gn} - raio de giro numérico médio
R_{gw} - raio de giro ponderal médio
RMN – ressonância magnética nuclear
Tan δ - relação G''/ G'
TEMPO - 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil
T_f - temperatura final
TGA - análises termogravimétricas
T_i - temperatura inicial
TM - galactoxiloglucana de Tamarindo
T_m - temperatura média
XG - galactoxiloglucana
XXXXG - nonassacarídeo da exclusivo da galactoxiloglucana
Xylp – unidade de xilose na forma piranosídica

RESUMO

As galactoxiloglucanas (**XG**) são polissacarídeos com potenciais aplicações industriais e, neste estudo, foram analisadas em termos de composição química, estrutura e algumas propriedades físico-químicas. As **XG** extraídas de sementes de *H. courbaril* (Jatobá), colhidas em diferentes regiões do Brasil, a saber: da reserva de Foz do Chopin, Estado do Paraná (**HC-I**), Cuiabá (**HC-II**) e Sinop/Estado do Mato Grosso (**HC-III**), Natal/Estado do Rio Grande do Norte (**HC-IV**), Fortaleza/Estado do Ceará (**HC-V**) e de *T. indica* (**TM**) de Conceição de Almeida/Estado da Bahia. Através das análises por HPSEC-MALLS e de viscosidade intrínseca observamos que as amostras aquecidas a 85°C por 2h apresentam redução da agregação molecular. O valor de razão característica (C_{∞}) para a **XG** de Tamarindo menor que o das amostras de Jatobá, provavelmente, é devido à presença de uma série única de oligossacarídeos em **XG** de sementes de jatobá (**XXXXG**), que gera, possivelmente, uma molécula mais rígida quando comparada com a de Tamarindo.

A oxidação seletiva da **HC-I** com o radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidínio-1-óxido) gerou produtos com 3,0; 5,4 e 9,5% de grupos carboxila em C-6, como determinado colorimetricamente e por titulação com NaOH. As análises de M_w dos polieletrólitos mostraram uma redução do seu valor, e o aumento do ângulo de inclinação entre o R_g e a M_w , mostrou que o processo de oxidação gera uma molécula mais rígida, partindo de uma conformação mais ao acaso (polímero nativo) para uma molécula com conformação em bastão (polímero oxidado), o que pode ser explicado pela presença e repulsão de cargas sobre a superfície da molécula. Nas cinéticas termogravimétricas, utilizando a equação de Arrhenius, foi observado um aumento na E_a do processo de degradação dos polímeros oxidados, o qual é diretamente proporcional ao grau de oxidação e coerente com o mecanismo de degradação.

O teor de amilose para diferentes amidos foram determinados colorimetricamente, como sendo 27% para o amido de milho comum, 80% para o amido de milho com altos teores de amilose, traços para o amido de milho com altos teores de amilopectina, 36% para o amido de cará, e 24% para o amido de

mandioca. Nas análises por DSC utilizando diferentes taxas de aquecimento (2,5; 3,0; 4,0 e 5,0°C/min), através da equação de Arrhenius, observou-se que o amido de cará tem uma maior E_a de gelatinização, quando comparado aos outros amidos e, também, uma menor constante de velocidade (s^{-1}), mostrando um processo de gelatinização relativamente lento a altas temperaturas e dependente do teor de amilose.

As misturas galactoxiloglucanas-amidos, avaliadas por medidas reológicas em sistema dinâmico oscilatório, mostraram uma interação sinérgica positiva quando em presença de amidos ricos em amilose (amido de cará e de milho rico em amilose), e negativa quando em presença de amidos com altos teores de amilopectina (amido de milho rico em amilopectina e de mandioca). As melhores propriedades das misturas foram comprovadas por análises reológicas dinâmicas e por digestão com α -amilase.

ABSTRACT

Galactoxyloglucan (**XG**) is a polysaccharide with potential industrial applications, which in this study was extracted from the seeds of *H. courbaril* (Jatobá) harvested from trees growing at different locations in Brazil. They were from Foz do Chopin Forest Reserve, State of Paraná (**HC-I**), Cuiaba (**HC-II**) and Sinop/State of Mato Grosso (**HC-III**), Natal/State of Rio Grande do Norte (**HC-IV**), Fortaleza/State of Ceará (**HC-V**) and *T. indica* (**TM**) from Conceição de Almeida/State of Bahia – Brazil. We observed by HPSEC-MALLS and intrinsic viscosities results that when samples were heated at 85°C for 2 h there was a reduction of aggregation. The Tamarind **XG** showed a lower value of C_{∞} in relation of that from Jatobá, probably due the presence of an unique oligossacharide series in the *H. courbaril* samples (**XXXXG**), that possibly generates a more rigid molecule when compared with that of *T. indica*.

Selective TEMPO radical oxidation (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) at C-6 of HCl galactoxyloglucan gave products with 3.0, 5.1 and 9.5% of carboxyl groups, as determined colorimetrically. Molecular mass analyses showed a decrease in the M_w of the oxidized galactoxyloglucans and an increase in angular fit from the RMS ratio versus molar mass plot. This indicated that the oxidation process generated a more rigid structure, going from a random coil in the native polymer to a rod conformation in the oxidized samples, probably due to the polyanionic structure. Thermogravimetric kinetics of degradation was obtained using the Arrhenius equation and an increase in the degradation rate, was apparently directly dependent on the oxidation level.

The amylose level in the starch samples were, 27% for corn starch; 80% for corn starch rich in amylose; traces of amylose for corn starch rich in amylopectin, 36% for yam starch and 24% for cassava starches. A gelatinization study were carried out from starch samples by DSC using different heating rates (2.5, 3.0, 4.0 and 5.0°C/min), to obtain, by the Arrhenius equation, the activation Energy (E_a) of this process. Yam starch show a more energetic process of gelatinization when compared

to others starches and have also a lower rate constant (s^{-1}), indicating a relative slow process of gelatinization at higher temperatures.

The mixtures galactoxyloglucan-starches showed a positive synergic interaction dependent of the amylose content (cara and amilose corn starch). These interactions were observed by dynamic rheological analysis and by digestion with α -amylose.

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. AMIDO

Os amidos apresentam propriedades químicas e físicas únicas e qualidades nutricionais características em relação a outros carboidratos. Depois da celulose, é o carboidrato produzido em maior quantidade pelas plantas, onde possui função de reserva. Também é responsável por 70-80% das calorias consumidas por humanos em todo o mundo. A sua utilização na preparação de produtos alimentícios é superior à soma de todos os hidrocolóides combinados, sem contar a da indústria de panificação (GUILBOT e MERCIER, 1985; ZOBEL e STEPHEN, 1995; WHISTLER e BeMILLER, 1997).

O amido não é uniforme, mas é uma mistura de polissacarídeos sendo a maioria composta por dois polímeros, um altamente ramificado, chamado amilopectina e o outro essencialmente linear (menor teor de substituição) chamado amilose (SCHOCH, 1945; WHISTLER e BeMILLER, 1997).

Em termos estruturais a amilopectina é o componente altamente ramificado do amido, formado por cadeias de unidades α -D-glucopiranosose unidas por ligação (1 \rightarrow 4), mas com 5-6% de ligações α -(1 \rightarrow 6) nos pontos de ramificação.

A amilopectina é uma molécula com alta massa molecular, constitui em torno de 75% dos amidos conhecidos (WHISTLER e BeMILLER, 1997). Apresenta alta capacidade de ligação à água e um lento processo de retrogradação, formando misturas claras com textura macia e com bom fluxo, com baixa tendência à formação de géis (ZOBEL e STEPHEN, 1995).

Os amidos ricos em amilopectina ou “waxy” são completamente constituídos de amilopectina e são denominados cerosos ou gordurosos. Apesar de tal denominação, os mesmos apresentam teor de gordura em torno dos 0,2%. O nome gorduroso é resultante do fato de que os grãos cortados apresentam aspecto vítreo ou gorduroso (WHISTLER e BeMILLER, 1997).

Já a amilose, é uma molécula essencialmente linear, apresentando uma cadeia constituída por unidades de α -D-glucopiranosose unidas por ligações

(1→4), com baixo teor de ligações α -(1→6), representando em torno de 0,3 a 0,5% do total de ligações (GUILBOT e MERCIER, 1985; WHISTLER e BeMILLER, 1997).

A presença de amilose em amidos está relacionada a viscosidade da pasta formada. Assim, amidos com alto teor de amilose formam géis relativamente rígidos e elásticos, e os com baixo teor de amilose formam géis fracos e não elásticos (ZOBEL e STEPHEN, 1995; CHEETHAM e LEPING TAO, 1998).

CHEETHAM e LEPING TAO (1998) observaram que a massa molecular da amilose diminui com o aumento do conteúdo de amilose no sistema, concluindo uma relação linear inversa entre essas variáveis. Outra observação importante foi que amidos ricos em amilose apresentam moléculas de amilopectinas com altos valores de DP, o que pode gerar um aumento da capacidade das amilopectinas em interagir com o iodo.

A combinação de unidades de α -D-glucopiranosose e suas ligações axiais e equatoriais gera uma molécula na forma de hélice. O interior da hélice contém predominantemente átomos de hidrogênio e é lipofílico, enquanto os grupos hidroxil estão posicionados para o exterior (WHISTLER e BeMILLER, 1997).

Comercialmente os amidos podem ser obtidos de sementes, em particular de milho comum, de milho com alto teor de amilopectina “waxy” e de milho com altos teores de amilose, de trigo e de vários genótipos de arroz. São obtidos também de tubérculos e raízes, em particular de batata, batata doce e mandioca (WHISTLER e BeMILLER, 1997). Outras fontes como cará possuem baixa aplicação industrial até o presente momento, e publicações científicas relacionadas a este amido são incipientes quando comparadas ao de milho (*Zea mays* L.), cuja produção mundial é próxima a 20.000 t/ano e aumenta rapidamente (ZOBEL e STEPHEN, 1995), sendo que nos Estados Unidos 95% do amido consumido provém da soma das diferentes variedades de milho (WURZBURG, 1986).

Na maioria dos tipos de amidos de endospermas de cereais, a proporção de massa relativa está entre 72 e 82% para a amilopectina e 18 a 33% para a amilose. Entretanto, alguns genótipos de milhos mutantes (*Zea Mays*)

contém mais que 70% de amilose, enquanto outros genótipos, chamados “waxy” ou amido com alto teor de amilopectina apresentam menos que 1% de amilose (ZOBEL e STEPHEN, 1995; BULÉON et al., 1998).

HOOVER e VASANTHAN (1994) observaram que o nível aparente de amilose no amido de cará foi de 27,1%, teor muito semelhante ao do amido de trigo e acima do amido de ervilha e batata. ALVES, GROSSMANN e SILVA (1999) e MALI et al. (2002) utilizaram o amido de cará para obter filmes com glicerol. Os autores utilizaram esse amido devido ao alto teor de amilose (30%), que melhora a capacidade de formação de filmes. WHISTLER e BEMILLER (1997) observaram 17 % de amilose para o amido de mandioca ou tapioca, e a formação de géis translúcido, com alta viscosidade e tendência média a retrogradação. GUANARATNE e HOOVER (2001) estudaram diferentes amidos de raiz e tubérculos. A análise comparativa da composição química mostrou para o amido de mandioca e amido de cará teor de amilose de 22,4% e 28,5%, respectivamente.

MCPHERSON e JANE (1999) compararam o amido de batata “waxy” com outros amidos de tubérculos e raízes como cará, amido de batata normal e batata doce. Nesse trabalho foi observado um teor de amilose aparente de 29,2% para o amido de cará. Os autores também observaram que as amilopectinas de amido de cará e batata doce apresentam altas porções de cadeias laterais curtas (DP 6-12) de 19,09 e 17,05%, respectivamente, quando comparadas a amilopectina de amido de batata normal e “waxy” (13,07 e 14,75%, respectivamente).

Os amidos nativos e modificados apresentam um grande espectro de aplicações industriais, incluindo ação de adesão, formação de filmes, geleificante, retentor de umidade, estabilizante, texturizante, e espessantes em geral. Algumas modificações podem gerar propriedades físicas que propiciam a redução do teor de gordura em alimentos, promovendo percepção sensorial similar (WHISTLER e BeMILLER, 1997; BELLO-PÉREZ et al., 1998).

Em amidos nativos, as moléculas de amilose, amilopectina e uma limitada quantidade de água estão organizadas em micelas, com uma durável e morfologicamente esclarecida estrutura microscópica chamada de grânulo. A

fusão ou rompimento de tal estrutura organizada é um pré-requisito para utilização de seus polímeros. A ordem de cristalinidade dos grânulos de amido nativos foi determinada por métodos de raio X. Estes padrões de cristalinidade são chamados de “A” para amidos nativos com teor de amilose inferior a 40%, “B” para amidos obtidos de tubérculos e amido de milho com altos teores de amilose. Esses apresentam duplas hélices à direita, paralelas e empacotadas antiparalelamente a outras duplas hélices. O amido tipo “A” apresenta-se mais anidro, com apenas 8 moléculas de água por célula, mostrando assim uma arranjo empacotado e compacto. O amido tipo “B” apresenta maior teor de água, com 36 moléculas de água e, conseqüentemente, uma estrutura menos compacta que o amido tipo A (GIDLEY e BULPIN, 1987). Amidos tipo “C” são obtidos de raízes e feijão. Esse padrão tipo “C” é uma combinação das formas polimorfos A e B (GIDLEY e BULPIN, 1987; McPHERSON e JANE, 1999). Outro padrão conhecido de cristalinidade é o tipo “V”, associado à fração de amilose, que não é rotineiramente encontrado em amidos comuns, sendo detectado juntamente com estruturas “A”, “B” e “C” em amidos de milho mutantes contendo 40% ou mais de conteúdo de amilose. É uma hélice à esquerda, com 6 unidades de glucose por volta-hélice. Maior cristalinidade é encontrada para amidos com padrão de cristalinidade “A” e “B” que para outros amidos (ZOBEL e STEPHEN, 1995).

A presença de regiões cristalinas nos grânulos de amido, devem-se principalmente às moléculas de amilopectina de alta massa molecular interconectadas. Já nas regiões amorfas estão localizadas predominantemente moléculas de amilose (ZOBEL e STEPHEN, 1995).

Sem processamento, os grânulos de amidos são parcialmente cristalinos; durante o aquecimento em presença de água se hidratam, gerando um aumento temporário da viscosidade, devido à fusão das regiões cristalinas e a hidratação das macromoléculas. Após resfriamento, a gelatinização é acompanhada pelo aumento da turbidez e da firmeza da pasta formada (WURZBURG, 1986). Assim, a gelatinização é acompanhada por dois fenômenos principais, o primeiro refere-se à perda da cristalinidade, refletindo a redução das interações intra e intermoleculares em ordem respectivas, e o segundo ao inchamento do grânulo de amido (MARCHANT e BLANSHARD, 1978).

A gelatinização é um processo endotérmico, onde a energia absorvida pode ser monitorada por varredura diferencial de temperatura (DSC) (WHISTLER e BEMILLER, 1997). Vários autores tem utilizado essa técnica para estudar amidos, entre eles tem-se: GHIASE et al. (1982); DONOVAN et al. (1983); BIZOT et al. (1997); LE LAY e DELMAS (1998); ROLE e LEMESTE (1999); YU e CHRISTIE (2001). Entretanto, até o momento, poucos estudos foram realizados sobre a cinética da gelatinização de amidos. Além disso, os estudos apresentados na literatura limitam-se ao amido de milho comum (BLATTACHARYA e HANNA, 1987; BURROS et al., 1987; KIM e WANG, 1999) e ao amido de batata (PIELICHOWSKI et al., 1998).

Tecnologicamente, o amido apresenta alguns inconvenientes, entre eles: altos picos de viscosidade durante seu aquecimento, sinerese, retrogradação e consistência indesejável da pasta fria (ZOBEL e STEPHEN, 1995).

As moléculas de amilose nativas sofrem rápido processo de retrogradação, isto é, formam géis opacos e parcialmente cristalinos. A retrogradação ocorre quando moléculas que se desordenam pelo aquecimento dos grânulos em água, formam dispersões moleculares que, rapidamente, precipitam ou formam géis. Isso ocorre quando cadeias longas e flexíveis de amilose que apresentam movimento aleatório (Browniano) colidem e formam ligações intermoleculares formando zonas de junção. Tal interação temporária, é fortalecida por segmentos de outras cadeias que colidem com esse núcleo e ligam-se a ele, formando uma rede tridimensional compacta, aumentando a ordem no sistema, gerando uma rede elástica e cristalina (Figura 1) (WURZBURG, 1986; WHISTLER e BeMILLER, 1997).

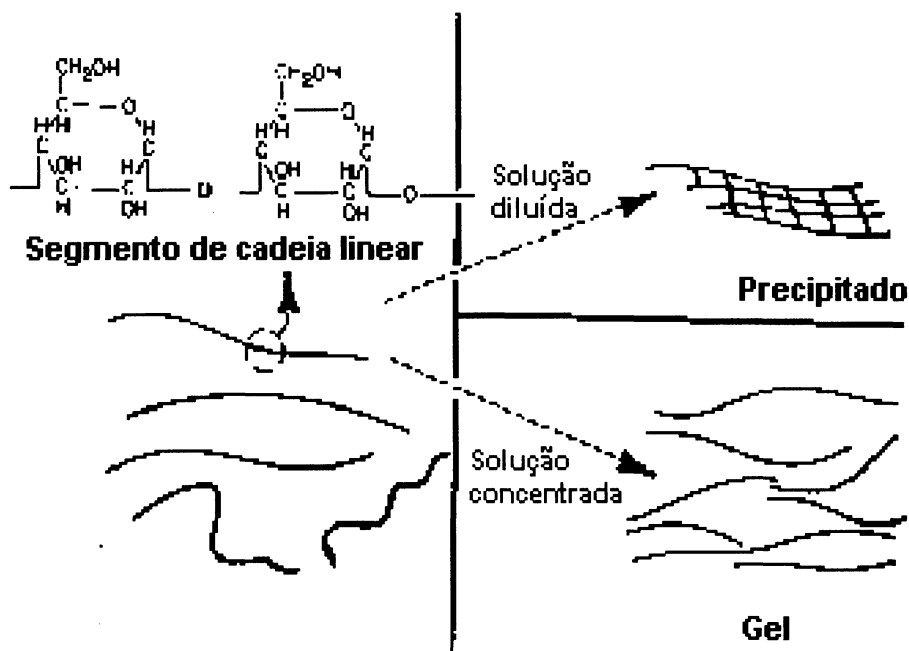


Figura 1 – Esquema da retrogradação da amilose (WURZBURG, 1986)

Em géis ricos em amilose, a formação de uma rede compacta gera exclusão de água do sistema, o que é indesejável, e o fenômeno é chamado de sinerese (WURZBURG, 1986; WHISTLER e BeMILLER, 1998).

Sabe-se que as características de polímeros em solução podem ser alteradas por certas misturas que podem gerar propriedades diferentes do sistema puro, possibilitando, por exemplo, evitar problemas de processamento e estocagem (SUDHAKAR et al., 1996). Diferentes hidrocolóides são utilizados para modificar e controlar a textura de alguns produtos, sendo utilizados para controlar a cinética da formação de géis de amido nativo (KULICKE et al., 1995). Esses géis mistos são utilizados em alimentos e passam por deformações de diferentes extensões, quando mastigados, dependendo de sua natureza estrutural e molecular e, conseqüentemente, conferem diferentes sensações organolépticas. Daí o interesse da aplicação industrial de polissacarídeos de diferentes fonte em misturas com amido, por exemplo. Entre tais hidrocolóides podemos citar as galactoxiloglucanas.

1.2. GALACTOXILOGLUCANAS

A caracterização macromolecular de polissacarídeos é de grande interesse devido ao seu uso, principalmente na indústria de alimentos. Um polissacarídeo com potenciais aplicações industriais é a galactoxiloglucana. Esse hidrocolóide pode ser encontrado em parede celular de plantas superiores (dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramíneas) e cotilédones de algumas sementes de dicotiledôneas, onde desempenha função de polissacarídeo de reserva (REID, 1985). Foi observado por REIS et al. (1987) que as galactoxiloglucanas de sementes se acumulam de forma exclusiva e transitória nas paredes dos tecidos dos cotilédones, protegidas por membranas finas, formando um compartimento de reserva, fracamente associados, sendo portanto, facilmente extraídas com água.

De interesse e uso comercial poderíamos citar a galactoxiloglucana de sementes de tamarindo (*Tamarindus indica*) (GIDLEY et al., 1991). Estruturalmente, apresentam uma cadeia celulósica β -(1,4)-D-glucana, cujas unidades de glucose são substituídas ou não por unidades de α -(1,6)-D-Xylp. Algumas unidades de Xyl podem estar substituídas em O-2 por β -D-Galp (HAYASHI, 1989).

Galactoxiloglucanas foram primeiramente detectadas em sementes de *Hymenaea courbaril* por KOOIMAN (1960). No Brasil, o primeiro estudo foi realizado por BUCKERIDGE e DIETRICH (1990) e, a estrutura química foi, subsequentemente, determinada por LIMA et al. (1993) por análises de metilação. Esses autores observaram que as ligações glicosídicas eram as mesmas que as obtidas para a de *Tamarindus indica*. Entretanto, nesses estudos, as amostras de sementes foram coletadas de populações isoladas no estado de São Paulo (uma no Jardim Botânico e outra no município de Teodoro Sampaio). Nesses trabalhos não foram utilizadas técnicas precisas de análise estrutural como a digestão a oligossacarídeos limites obtidos por ação de celulases, que tem sido utilizada recentemente para caracterizar galactoxiloglucanas obtidas de diferentes fontes e/ou regiões (BUCKERIDGE et al., 1992; LIMA et al., 1995 e TINÉ 2002).

Assim, em estudos com galactoxiloglucanas de *Copaifera langsdorfii*, de diferentes regiões como savana e floresta, BUCKERIDGE et al. (1992) observaram que essas apresentavam diferentes padrões de substituição nos oligossacarídeos obtidos por tratamento com celulases. Esse trabalho foi o primeiro a demonstrar diferenças na estrutura fina entre galactoxiloglucanas de uma mesma espécie.

Em galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* BUCKERIDGE et al. (1997) encontram a presença de uma nova família de oligossacarídeos, correspondendo a série XXXXG através do uso seqüencial de digestão enzimática com β -glucosidase e α -xilosidase oligossacarídeo específica (ambas extraídas de *Nasturtium*). Os autores também mencionaram que a diferença na estrutura primária de galactoxiloglucanas obtidas de jatobá pode ser responsável pela baixa capacidade desta de interagir com o iodo, quando comparada ao hidrocolóide obtido de tamarindo. Isso indica comportamentos físico-químicos diferentes em solução, quando comparados com as galactoxiloglucanas obtidas de sementes de *T. indica* e *Copaifera langsdorfii*. A nova família de oligossacarídeos (XXXXG), galactosilados, foi obtida e identificada por TINÉ (2002).

Outros estudos envolvendo estrutura e propriedades foram realizados com galactoxiloglucanas de sementes de *Hymenaea courbaril* colhidas em diferentes regiões do país (VARGAS-RECHIA et al. (1998); LIMA et al. (2000); MARTIN et al. (2000); TINÉ et al. (2000); DE LIMA e BUCKERIDGE (2003); LIMA et al. (2003); MARTIN et al. (2003); TINÉ, LIMA e BUCKERIDGE (2003)). O polissacarídeo extraído de sementes *Hymenaea courbaril* var. *Stilbocarpa* (Leguminosae), obtido com 45% de rendimento a partir das sementes colhidas em Teodoro Sampáio (SP) apresentou uma massa molecular ponderal de 3×10^5 g.mol⁻¹, rotação óptica específica de +79,3° e viscosidade intrínseca de 850 mL.g⁻¹ (LIMA et al., 1993). Os trabalhos de SOUZA-LIMA em 1997, MARTIN (1999 e 2003) e MARTIN et al. (2000), com galactoxiloglucana de sementes colhidas em Ribeirão Preto (SP), após tratamento do hidrocolóide com β -D-galactosidase específica, levaram a possibilidade de algumas unidades de β -D-Galp estarem

ligadas diretamente ao O-4 de unidades de β -D-Glcp, conforme análises por ^{13}C -RMN.

Entre os estudos com galactoxiloglucanas de sementes de *Tamarindus indica* podemos citar o de TAYLOR e ATKINS (1985) que verificaram por difração de raio X, um espaçamento repetitivo de 2,06 nm, referentes ao espaçamento de quatro unidades de glucose. GIDLEY et al. (1991) obtiveram pela técnica de espalhamento de luz a massa molecular, raio de giro (R_g), raio hidrodinâmico (R_h) e a razão característica (C_∞), determinadas como sendo $8,8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, 110 nm, 71 nm e 110, respectivamente. O alto valor de C_∞ obtida por GIDLEY et al. (1991) indica que as determinações do comportamento macromolecular em solução foram realizadas em presença de grandes agregados moleculares quando comparados aos estudos mais recentes. LANG e BURCHARD 1993 estudaram por análises de espalhamento de luz estático e dinâmico o comportamento de agregação lateral ao acaso de cadeias isoladas. Esse tipo de agregação forma partículas empacotadas e causa um extraordinário aumento da rigidez molecular. Esse comportamento foi confirmado por LANG e KAJIWARA (1993), que observaram agregação lateral de múltiplas cadeias poliméricas em solução aquosa. Para a galactoxiloglucana de *Detarium senegalense*, WANG et al. (1996 e 1997) obtiveram uma composição de oligossacarídeos similares ao obtido para tamarindo e observaram a presença de agregações laterais moleculares. PICCOUT et al. (2003) aumentaram a solubilidade das galactoxiloglucanas obtidas de sementes de detarium e tamarindo em água utilizando pressão e/ou aquecimento. Nesses experimentos foi observado que esse tratamento reduz substancialmente a agregação molecular da galactoxiloglucana.

SIMS et al. (1998), analisando galactoxiloglucanas de diferentes fontes (fumo; maçã; tamarindo), observaram que a viscosidade aumenta de forma dependente do aumento da massa molar. O efeito da temperatura sobre a viscosidade foi similar para todas, sugerindo que diferenças de M_w não geram alterações diferentes pelo aquecimento e não há alteração em função do pH. Esse estudo demonstrou que a massa molar é o principal fator de influência nas

propriedades das três moléculas analisadas, com semelhantes graus de substituição, e distribuição similar dos substituintes.

KAWASAKI et al. (1999), utilizando soluções aquosas de galactoxiloglucana de tamarindo, com 44% do seu teor de galactose removidos por β -galactosidasas, observaram a formação de géis fortes em concentrações de 1,0 a 1,5%, e que tais sistemas eram estáveis a temperatura de 37°C. Sob tal forma, foram utilizadas como veículos para medicamentos de administração oral como indometacina e diltiazem.

Outros estudos, como o realizado por ONYECHI et al. (1998), mostraram que o principal componente da farinha de *Detarium senegalense*, utilizada muito na África como alimento, é uma galactoxiloglucana com relação molar monossacarídica semelhante à de tamarindo. Os autores realizaram experimentos em que a farinha foi adicionada à alimentação de humanos, e observaram a redução pós-prandial da glucose sangüínea (38-62%) e do teor de insulina (36-43%). Aparentemente, a galactoxiloglucana interage com o amido do alimento, impedindo a sua digestão, agindo como barreira para a ação da amilase.

As galactoxiloglucanas também podem ser utilizadas em alimentos como agentes antimutagênicos e anticarcinogênicos de forma profilática contra diferentes tipos de câncer e doenças genéticas. Assim, HENSEL e MEIER (1999), observaram que pectinas e galactoxiloglucanas apresentam atividade antimutagênica, como inibição de 30 a 50% dose dependente contra o agente mutagênico 1-nitropireno. Alguns autores, como PAULY et al. (1999), sugeriram a utilização em formulações cosméticas, uma vez que apresentaram atividade anti-radical livre e ativação do crescimento de fibroblastos de forma dose dependente.

Sob o aspecto de aplicações de galactoxiloglucanas em interações com amido, muito pouco há relatado na literatura, onde foram encontrados apenas três trabalhos (PRABHANJAN e ALI, 1995; YOSHIMURA et al., 1999).

No primeiro PRABHANJAN e ALI (1995) realizaram misturas de galactoxiloglucanas de tamarindo nativa ou modificadas por carboximetilação e hidroxipropilação, com diferentes níveis de substituição, com o amido de milho. E, observaram que, nas interações entre o amido e a galactoxiloglucana nativa,

ocorreu uma diminuição da temperatura de pasta do amido, gerando pastas altamente viscosas e com características pseudoplásticas. Porém, as associações de derivados de galactoxiloglucana com o amido mostraram uma redução da viscosidade e diminuição da pseudoplasticidade, que pode ocorrer devido a expansão molecular, propriedades lipofílicas e ao número dos grupos substituintes, gerando diminuição de interações moleculares.

O efeito sobre a gelatinização e retrogradação do gel, de amido de milho e misturas galactoxiloglucana de tamarindo e amido de milho comum, foi analisado por YOSHIMURA et al. (1999) utilizando medidas reológicas dinâmicas, sinerese e microcalorimetria diferencial (DSC). Os autores concluíram que, não há interação sinérgica, por análise comparativa com o do gel de milho isolado, indicando neste caso que a galactoxiloglucana inibe a formação da estrutura tridimensional, responsável pela formação do gel. Também observaram que, a adição de galactoxiloglucana retarda a retrogradação, durante longos tempos de estocagem, e que a sinerese diminui com o aumento do teor do hidrocolóide no sistema.

FREITAS (2000) observou interações sinérgicas positivas entre galactoxiloglucana obtida de sementes de *H. courbaril* e amido de milho com 66% de amilose em sua composição. Entretanto, em interações com amido de milho rico em amilopectina observou interações sinérgicas negativas. O autor observou que, a mistura, em estudos de sinerese, reduzia a perda de água pela amostra de amido de milho rico em amilose.

É importante destacar que a grande maioria das propriedades acima mencionadas, especialmente a formação de gel, é estudada, predominantemente, dentro da parte da mecânica dos fluídos denominada de reologia, cujos aspectos gerais serão descritos a seguir.

1.3. REOLOGIA

O termo reologia foi criado pelo professor Bingham. É uma palavra derivada do grego "rheos" e significa o estudo da deformação e fluxo da matéria, sendo que tal definição foi aceita pela Sociedade Americana de Reologia quando

esta foi fundada 1929 (BARNES et al., 1989; LAPASIN e PRICIL, 1995a; KAVANAGH e ROSS-MURPHY, 1998).

Isaac Newton, em seu trabalho sobre líquidos, publicou o livro “Princípio” em 1687, em que propõe que a resistência de um líquido ao fluxo é igual a tensão aplicada a um fluido que é proporcional ao gradiente de velocidade entre as camadas líquidas. Em outras palavras, se dobrarmos a força aplicada sobre um líquido, dobra-se o gradiente de velocidade. A água e a glicerina são líquidos que seguem o postulado de Newton (BARNES et al., 1989).

Hoje sabe-se que tal resistência, chamada de fricção interna ou viscosidade é uma medida de resistência de um fluido ao fluxo. Dessa forma, o líquido seria a substância que muda continuamente de forma (flui), independente da magnitude da tensão aplicada (BARNES et al., 1989).

O postulado de Newton introduziu o conceito de viscosidade em que a tensão de cisalhamento (σ) foi relacionada a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), através da equação (BARNES et al., 1989).

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad (1)$$

No sistema corrente (SI), utilizamos Pascal-segundo, cujo símbolo é Pa.s, sendo anteriormente utilizado no sistema CGS o poise (BARNES et al., 1989).

Então, a viscosidade (η) é dada por:

$$\eta = \sigma / \dot{\gamma} \quad (2)$$

Onde: σ = força aplicada sobre uma área = **N/m² ou Pa**

$\dot{\gamma}$ = velocidade relativa das camadas líquidas dividida pela distância entre elas = **s⁻¹** (Figura 2) (BARNES et al., 1989)

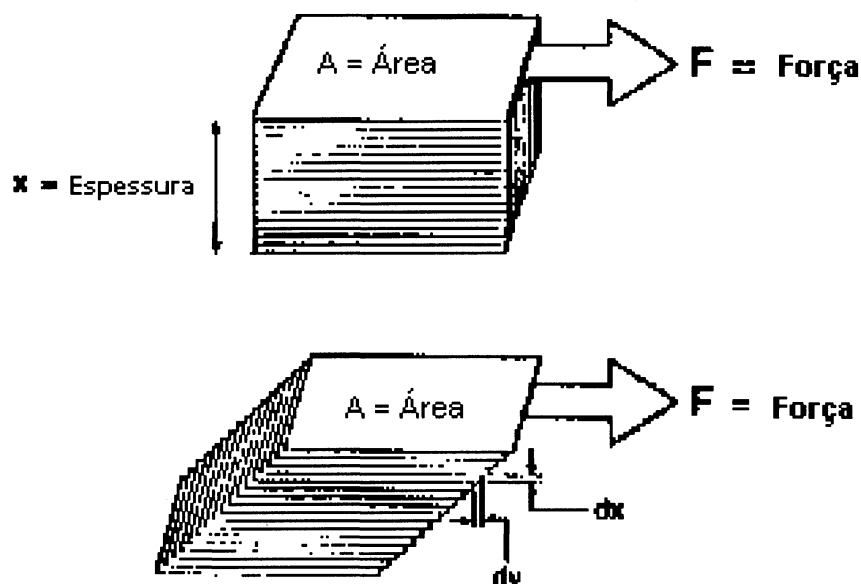


Figura 2 – Escoamento de fluido em regime laminar (NAÉ, 1993)

O conceito de líquido ideal ou Newtoniano é relativamente pouco aplicado, uma vez que a vasta maioria das soluções apresentam comportamento não Newtoniano, onde a viscosidade não é apenas uma constante da relação tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento, mas é uma função das mesmas (BARNES et al., 1989).

Dentre os comportamentos líquidos não Newtonianos, podemos citar a pseudoplasticidade, a dilatância e o caráter plástico.

Pseudoplasticidade é o comportamento no qual pela investigação da influência da taxa de cisalhamento sobre a viscosidade, pode-se observar em baixas taxas de cisalhamento, devido ao movimento browniano de todas as moléculas ou partículas aleatoriamente, um comportamento similar aos Newtonianos, conhecido como primeiro platô newtoniano. Ocorre, a partir de determinada taxa de cisalhamento, a diminuição abrupta da viscosidade, devido ao início da orientação molecular sobre o fluxo até que as moléculas apresentem um deslizamento entre si, gerando uma região de viscosidade constante referente ao segundo platô Newtoniano. A região em que se tem diminuição da viscosidade

com a tensão de cisalhamento aplicada é denominada de “lei das potências” e é definida pela equação:

$$\sigma = \eta \dot{\gamma}^\epsilon \quad (3)$$

Dilatância é o caráter em que pode ser observado, nos perfis de viscosidade, um aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo neste caso caracterizado como o inverso da pseudoplasticidade.

O comportamento de Bingham ou plástico, é aquele em que é necessária a aplicação de uma tensão inicial mínima, o ponto de ruptura para que o material comece a fluir. Ou seja, o sistema apresenta em repouso forças de ligações intermoleculares, dando à substância um caráter sólido, que o impede de fluir, até que a força externa seja superior à força da rede, onde podemos observar o ponto de ruptura. A equação que define o comportamento plástico é dada por:

$$\sigma = \sigma_0 + \eta \dot{\gamma} \quad \text{ou} \quad (4)$$

$$\sigma = \sigma_0 + \eta \dot{\gamma}^\epsilon \quad (5)$$

Onde σ_0 é o ponto de ruptura, e as equações são definidas para comportamento Newtoniano ou Pseudoplástico, respectivamente, para os sistemas em fluxo.

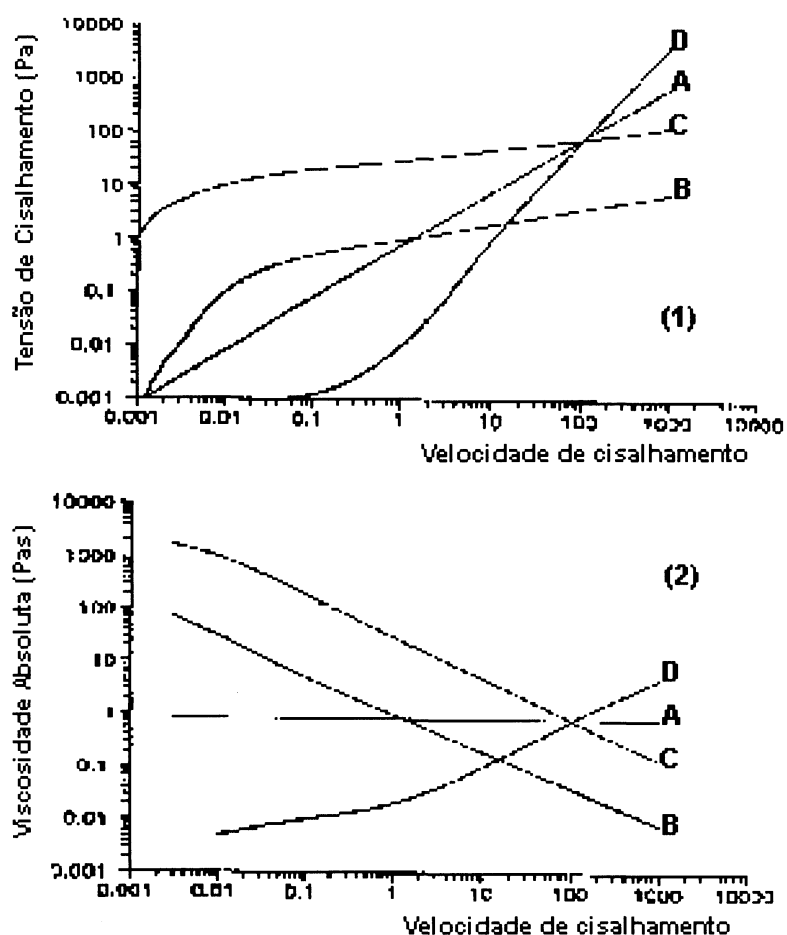


Figura 3 - Curva de fluxo (1) e Perfil de viscosidade (2) de fluidos com comportamento newtoniano e não newtoniano, onde **A** representa um fluido newtoniano; **B** pseudoplástico; **C** plástico e **D** dilatante (NAÉ, 1993).

Como citado anteriormente, existem comportamentos, como os plásticos, em que os sistemas não apresentam apenas componentes viscosos, mas uma estrutura que necessita de uma tensão inicial para fluir, o que indica um comportamento de sólido do sistema até certo valor de tensão de cisalhamento.

Tais níveis de organização de soluções, ou em particular redes intermoleculares, podem ser investigadas por estudos reológicos dinâmicos, uma vez que análises viscosas em sistemas não oscilatórios, apresentam limitada amplitude de aplicação.

Dentro dos marcos históricos dos compostos sólidos, tem-se que em 1678, Robert Hooke desenvolveu a “Verdadeira Teoria da Elasticidade”, onde propôs que para um sólido perfeitamente elástico, a tensão e deformação são diretamente proporcionais, ou seja, se aplicarmos uma tensão em uma mola, ela será estendida em um determinado valor x . Se aplicarmos o dobro da tensão a sua extensão será $2x$, sendo essa a premissa básica da teoria da elasticidade clássica (BARNES et al., 1989).

Tradicionalmente, certos materiais a uma determinada temperatura e pressão eram classificados entre sólidos e líquidos, e propriedades isoladas eram atribuídas para tais sistemas, dependendo da tensão aplicada. O conceito de elasticidade era intrinsecamente relacionado ao corpo sólido, enquanto que viscosidade era sinônimo de estado líquido. Conseqüentemente, um material pode apresentar comportamento sólido ou líquido, dependendo da tensão aplicada. Então, poderíamos substituir a classificação de sólidos e líquidos com uma distinção entre propriedades sólidas e líquidas (LAPASIN e PRICL, 1995a). Assim, por exemplo o vidro não é um sólido ao todo, mas um líquido muito viscoso ($\eta = 10^{12}$ Pa.s). Por outro lado, a água em freqüências extremamente altas (10^8 s⁻¹) apresenta comportamento sólido (KAVANAGH e ROSS-MURPHY, 1998).

Sabe-se que a vasta maioria das substâncias apresentam um comportamento intermediário entre as respostas de um sólido Hookeano e o comportamento de um líquido Newtoniano (BARNES et al., 1989, LAPASIN e PRICL, 1995a).

Para um sólido Hookeano, a tensão aplicada a uma superfície resulta em uma deformação instantânea. Não há movimento durante a deformação, mas a deformação persiste enquanto lhe for aplicada a tensão e, por definição, um sólido não sofre modificações contínuas na sua forma para uma mesma tensão aplicada (BARNES et al., 1989; LAPASIN e PRICL, 1995a). Apresentam uma deformação máxima, quando a tensão for máxima, ou seja, tensão e deformação estão em fase (diferença de ângulo entre tensão e deformação de 0°) (REES, 1969).

Para um líquido Newtoniano a tensão não é proporcional a deformação (fora de fase 90°), e sim proporcional à velocidade de cisalhamento. Desta forma, tensão e deformação estão fora de fase para um líquido perfeito, mas a tensão está em fase com a velocidade de cisalhamento (REES et al., 1969).

Como citado anteriormente, a maioria dos sistemas apresentam um comportamento intermediário entre sólidos e líquidos, então, se for medido o ângulo de fase entre tensão e deformação teremos uma medida do grau do comportamento sólido ou líquido, quantificados através do módulo de cisalhamento dinâmico ou de estocagem G' e módulo de perda G'' (REES et al., 1969; RAO, 1992).

Para definir tais módulos, é necessário entender alguns conceitos, dentre eles o módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total a deformação do sistema, é definido como:

$$G^* = \sigma^o / \gamma^o \quad (6)$$

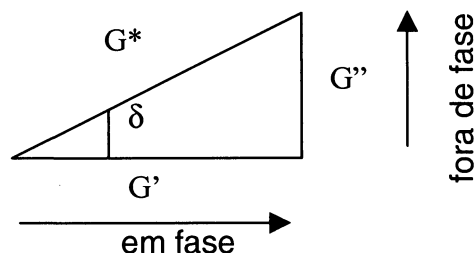
Onde σ^o e γ^o representam a tensão total e a deformação total do sistema.

O módulo de cisalhamento complexo pode ser subdividido em dois componentes:

$$G^* = G' + G'' \quad (7)$$

Onde G' é o módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento e G'' o módulo de perda ou de viscosidade (NAÉ, 1993).

Geometricamente, os componentes do módulo de cisalhamento complexo (G^*), módulo de cisalhamento dinâmico (G') e módulo de perda (G'') são obtidos pelo triângulo retângulo:



Então, o ângulo de fase pode ser calculado matematicamente por:

$$\text{Tan } \delta = G'' / G' \quad (8)$$

Ou seja, a tangente de δ é uma forma de relacionar o teor de energia perdida e armazenada.

Para um sólido puramente elástico, o G'' é igual a zero, e o módulo de armazenamento (G') é igual ao módulo de cisalhamento complexo (G^*), o ângulo de fase é igual a zero, ou seja, toda a energia aplicada ao sistema é armazenada a cada ciclo.

$$G^* = G' \quad (9)$$

Já para um fluido Newtoniano, a viscosidade dinâmica complexa (η^*) é igual ao módulo de perda (G'') e ao módulo de cisalhamento complexo (G^*), o ângulo de fase é igual a 90° , ou seja, toda energia aplicada ao sistema é dissipada na forma de calor.

$$G^* = G'' = \eta^* \quad (10)$$

A viscosidade dinâmica complexa é uma análoga da viscosidade dinâmica absoluta, porém a taxa de cisalhamento é substituída pela velocidade angular, assim:

$$\eta^* = \sigma^o / \omega \quad (11)$$

Os ângulos de fase entre tensão e deformação, para sólidos ideais, líquidos Newtonianos e compostos viscoelásticos, podem ser observados na Figura 4, a qual representa a função de onda entre tensão e deformação.



Figura 4 – Função de onda representando o comportamento de sólido elástico, líquido e material viscoelástico.

Uma das mais importantes técnicas reológicas é a de análises em sistemas viscoelásticos lineares, em que uma tensão oscilatória é aplicada à amostra e a resistência à deformação é medida, e mostra-se independente da mesma. Em tais sistemas, pode-se observar uma independência do módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total à deformação do sistema em análise, da tensão aplicada ou da deformação. Geralmente, assume-se como ideais deformações abaixo de 10%. Na Figura 5, pode-se observar a

linearidade do módulo de cisalhamento complexo (G^*) em função da deformação imposta.

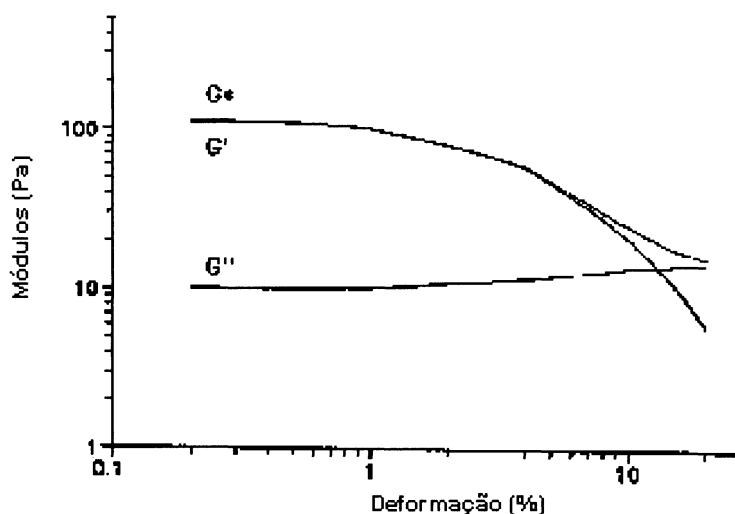


Figura 5 - Módulo de cisalhamento complexo (G^*), módulo de armazenamento ou dinâmico (G') e módulo de perda (G'') em função da deformação (%) (NAÉ, 1993).

O estudo mais apurado dos diferentes sistemas é baseado na dependência do G' e G'' em função da frequência. Para géis verdadeiros o G' é muito maior que o G'' e ambos mostram pequena dependência da frequência (REES, 1969; KAVANAGH e ROSS-MURPHY, 1998)

Em altas frequências de oscilação, soluções concentradas de polímeros desordenados apresentam comportamento semelhante ao de géis, entretanto, em baixas frequências o G'' torna-se predominante. Isso ocorre devido ao emaranhamento das cadeias gerando uma rede estrutural transiente. A principal resposta quando deformações são lentamente aplicadas, é uma reorganização da rede. Quando a escala de deformação é relativamente alta (altas frequências) em relação a reorganização molecular, o efeito predominante é a distorção da rede, com recuperação substancial da estrutura original perdida. Assim, em altas frequências, o principal efeito é a distorção de cadeias individuais, e o G' e G'' tornam-se praticamente iguais, conforme pode ser

observado na Figura 6 (B) (LAPASIN e PRICL 1995a; KAVANAGH e ROSS-MURPHY, 1998).

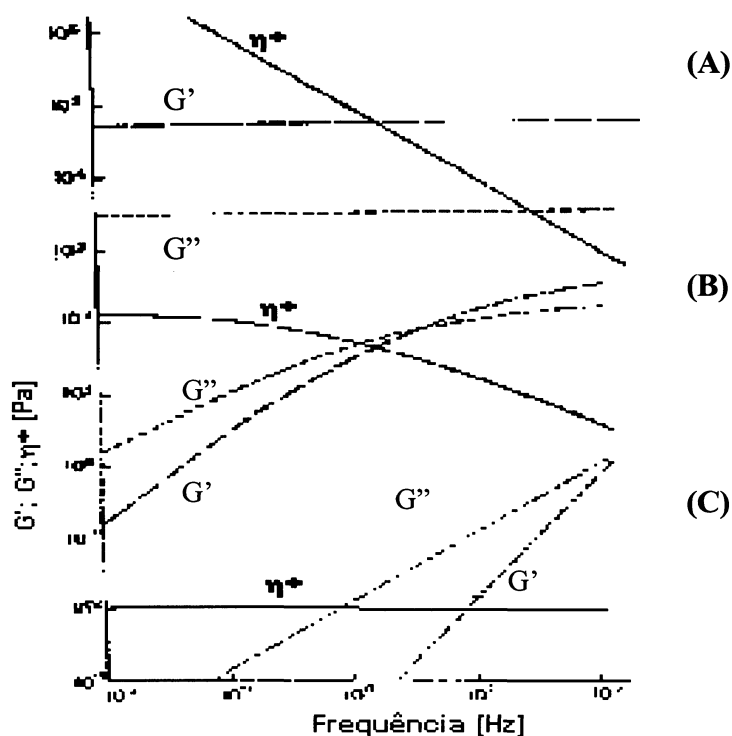


Figura 6 – Módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento (G'); de perda (G'') e viscosidade dinâmica complexa (η^*) em função da frequência (Hz) para: **(A)** gel forte; **(B)** gel fraco ou rede emaranhada; **(C)** solução diluída (GIDLEY e ROBINSON, 1990).

Para soluções poliméricas o G' e G'' tendem a zero quando a velocidade angular (ω) ou a frequência (f) tendem a zero (Figura 6C). Por outro lado, sistemas estruturais fracos apresentam dependência da velocidade angular ou frequência, com tendência à formação de um platô em baixas frequências (Figura 6B): Em baixas frequências o G'' apresenta coeficiente angular igual a 1 e o G' coeficiente angular igual a 2, indicando grande dependência da frequência. Já em géis fortes o G' e G'' são independentes da frequência, ou seja, consistem de duas linhas horizontais, onde o G' é tipicamente de 1 a 2 vezes maior que o

G'' , e com discreto aumento em altas frequências, entretanto o coeficiente angular para o G' é igual a zero (Figura 6A) (LAPASIN e PRICL, 1995a).

As características de fluxo de soluções poliméricas podem ser reguladas pelo tamanho e pela forma que as moléculas adquirem. Assim, as propriedades como massa e conformação serão descritas a seguir.

1.4. MASSA E CONFORMAÇÃO MOLECULAR

A caracterização macromolecular é de grande importância para o uso de polissacarídeos na indústria de alimentos, uma vez que as propriedades desses polímeros, como por exemplo a gelatinização e o espessamento de soluções, estão relacionadas às suas características macromoleculares, ou em outras palavras à massa e ao volume ocupado pela cadeia polimérica em solução. Outro fator relevante é o fato de que os líquidos utilizados em indústrias de alimentos são, principalmente, à base de água, o que sobressalta o interesse em obter mais informações sobre o comportamento macromolecular de polímeros utilizados nesses veículos (ROGER, AXELOS e COLONNA, 2000). Assim, uma técnica adequada para o estudo do comportamento de macromoléculas em solução é o uso da cromatografia de exclusão estérica acoplada ao detector de espalhamento de luz. Tal sistema apresenta várias vantagens em relação ao espalhamento de luz isoladamente, como exemplo as análises são mais rápidas e permite-se o uso de apenas uma solução para realização do ensaio. A incerteza é considerada ser de 3-5% para a determinação da massa molecular ponderal média (M_w) e 5-10% para o raio de giro (R_g). Uma outra grande vantagem deve-se ao fato de se obter em um único ensaio a distribuição da massa molar completa (ROGER, AXELOS e COLONNA, 2000). Esta combinação de técnicas é conhecida por ser muito sensível à presença de agregados poliméricos em solução (WITTGREN e PORSCH, 2002).

1.4.1. CROMATOGRÁFICA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA (SEC)

Uma das características mais importante dos polímeros é a sua massa molecular, pois a alta massa e a estrutura química dos materiais poliméricos são os principais responsáveis pelas suas propriedades e, conseqüentemente, pela sua utilização (ROGER, AXELOS e COLONNA, 2000; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

O processo de retenção de moléculas por SEC é baseado no volume da cadeia polimérica em solução. Flory propôs que a massa molecular é relacionada ao seu volume hidrodinâmico pela equação:

$$\text{Volume hidrodinâmico} = [\eta] \times M_w / \Phi \quad (12)$$

Onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, M_w a massa molecular ponderal média e Φ a constante de viscosidade. Assim, um gráfico que relaciona a $[\eta] \times M_w / \Phi$ em função de diferentes volumes de eluição fornece uma curva universal para a coluna cromatográfica.

Entretanto a massa molecular de um polímero não pode ser calculada como normalmente é feita com compostos puros e de baixa massa, pois apresentam, em geral, uma distribuição de suas massas, sendo denominados polidispersos. Essa característica tende a complicar a determinação da massa (ATKINS, 1992; ROGER, AXELOS e COLONNA, 2000; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Ao se considerar uma distribuição típica de massas moleculares, é possível definir valores de massa molecular como:

- Utilizando medidas baseadas no número de moléculas (N) de massa molecular (M), obtendo-se os valores de massa molecular numérico médio M_n que é definido como:

$$M_n = \sum N.M / \sum N \quad (13)$$

Essa definição corresponde ao clássico conceito de massa molecular, aplicado a moléculas de baixa massa.

- Medidas baseadas na fração em massa (w) das moléculas de uma determinada massa molecular (M), conduzem à definição de massa molecular ponderal média M_w descrita abaixo:

$$M_w = \frac{\sum w.M}{\sum w} = \frac{\sum N.M^2}{\sum N.M} \quad (14)$$

Os valores de massa molecular ponderal média são obtidos através de métodos analíticos como o espalhamento de luz, que é mais sensível à presença de moléculas de tamanho maior (ROGER, AXELOS e COLONNA, 2000; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Assim, conforme a Figura 7, pode-se observar que baixas massas moleculares afetam mais os valores de M_n , enquanto que moléculas de massa molecular mais elevadas influenciam mais os valores de M_w (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

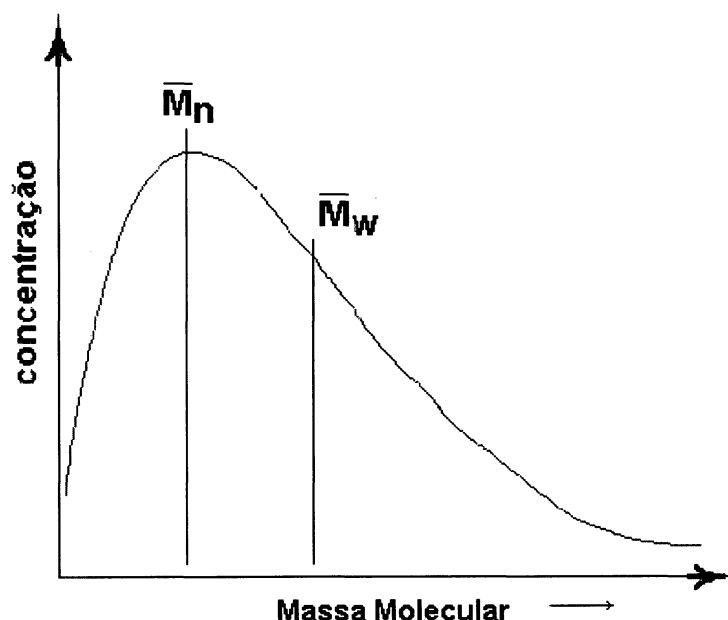


Figura 7 – Influência da massa molecular sobre os valores de M_w e M_n (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

1.4.2. ESPALHAMENTO DE LUZ

O espalhamento de luz é uma interação da radiação com partículas suspensas em um meio através do qual a radiação é transmitida. Ao incidir na partícula, parte da radiação é espalhada e a intensidade do espalhamento depende, basicamente do tamanho da partícula e da concentração (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Um meio perfeitamente homogêneo não é capaz de espalhar a luz. Isto seria uma situação ideal. No caso de um meio não homogêneo, a luz é espalhada para todas as direções. Esta é a situação mais comum, visto que mesmo solventes puros, como a água e o tolueno espalham a luz devido as flutuações locais de densidade promovidas pelo movimento browniano molecular (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

A teoria do espalhamento de luz foi inicialmente proposta em 1871 por Lord Rayleigh que aplicou a teoria eletromagnética clássica para explicar o fenômeno para moléculas de gases. Ele demonstrou que as partículas dispersas em um meio qualquer atuam como fontes de luz, cuja intensidade por unidade de volume do material espalhante é dada quando observada a uma distância (r) e a um ângulo (θ), em relação ao feixe incidente, conforme apresentado na Figura 8 (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

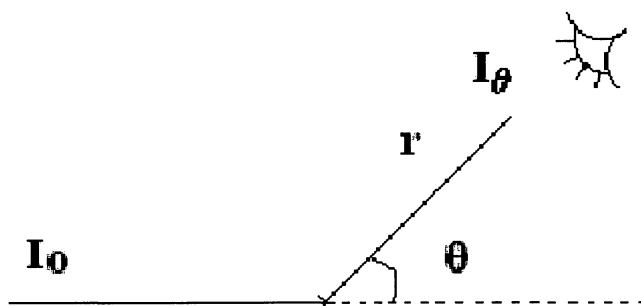


Figura 8 – Diagrama do espalhamento de luz (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

O espalhamento de luz é um dos métodos mais efetivos de investigar a cinética de variações moleculares e interações macromoleculares,

fornecendo informações sobre a massa molecular, dimensões e forma (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

1.4.2.1. Espalhamento de luz para partículas pequenas

Para partículas pequenas ($\lambda/20$) a intensidade de luz espalhada (I_θ) é a mesma em todas das direções. A razão entre a luz espalhada (I_θ) e a luz incidente (I_0), para uma coleção de pequenas partículas iluminadas com uma luz polarizada, é dada como (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999):

$$I_\theta/I_0 = 16.\pi^4 . \alpha^2 . \text{sen}^2 \theta / \lambda_0^4 . r^2 \quad (15)$$

Onde θ é o ângulo entre a luz espalhada e a luz incidente, r é a distância entre o centro de espalhamento e o observador (detector), e λ_0 é o comprimento de onda da luz no vácuo (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

O α é conhecido como polarizabilidade e é dado como:

$$\alpha = c.(dn/dc) / 2.\pi.N \quad (16)$$

Onde c e N são a concentração (g/mL) e o número de partículas espalhantes de luz, respectivamente. A relação dn/dc é uma constante e conhecida como o aumento do índice de refração específico e leva em consideração as mudanças do índice de refração do meio devido à concentração de partículas espalhantes (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

O número de partículas espalhantes pode ser expresso como:

$$N = c.NA/M \quad (17)$$

Onde NA é o número de Avogrado. Substituindo-se na equação 15 as variáveis definidas em 16 e 17, utilizando um ângulo de referência de 90° tem-se (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999):

$$(I_{\theta}/I_0)r^2 = 4\pi^2 \eta_0^2 (dn/dc)^2 cM / \lambda_0^2 NA \quad (18)$$

Onde η_0 é o índice de refração do meio. Isolando-se as constantes tem-se:

$$K = 4\pi^2 \eta_0^2 (dn/dc)^2 / \lambda_0^4 NA \quad (19)$$

Então a equação que relaciona a razão de Rayleigh com a massa molecular da molécula em solução pode ser simplificada como (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999):

$$Kc/\Delta R_{\theta} = 1/M \quad (20)$$

Onde ΔR_{θ} é a diferença entre as razões de Rayleigh da solução e do solvente puro. Esta equação só é válida para concentrações infinitamente diluídas (concentração tendendo a zero) (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

A fim de reduzir os efeitos causados pelas interações macromoleculares, utiliza-se a variação da razão de Rayleigh da solução com relação ao solvente puro expressa pela expansão virial (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

$$Kc/\Delta R_{\theta} = 1/M + 2 A_2c + 3 A_3c^2 \quad (21)$$

Onde A_2 e A_3 são conhecidos como o segundo e o terceiro coeficientes viriais, respectivamente, e descrevem as mudanças na propriedade de espalhamento causadas pelas interações intermoleculares e concentrações finitas. O A_3 , em geral, é desprezado e o A_2 com valores positivos indica uma boa interação polímero-solventes; já valores negativos indicam que as interações polímero-polímero são maiores do que as interações polímero-solvente, isto é, o solvente utilizado é um mau solvente para a macromolécula (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

Assim, de forma resumida, através da medida da intensidade de espalhamento de luz em um único ângulo, para partículas menores que $\lambda/20$, pode ser obtida a massa molecular. Isto ocorre em muitas proteínas e para polímeros lineares de baixa massa molecular em maus solventes. Nesses casos utilizam-se ângulos próximos a noventa graus (90°) para realização dos experimentos, e considera-se que a molécula apresenta simetria esférica onde $R_\theta = R_0 \cdot P_\theta$ (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

1.4.2.2. Espalhamento de luz para partículas grandes

Para macromoléculas, cujo tamanho do novelo molecular é maior que $\lambda/20$, a intensidade de luz espalhada (I_θ) varia com o ângulo de observação, não sendo considerada então a simetria esférica, sendo válida para esferas maciças. Isso ocorre porque o espalhamento poderá ocorrer a partir de vários centros da mesma partícula. Neste caso pode-se observar uma diferença de fases que é originada da diferença entre as distâncias dos centros espalhantes e o observador (detector). Esta diferença pode ser de zero (0) a $\lambda/2$. Considerando-se essas diferenças de intensidade de luz espalhada, é necessário introduzir um fator de espalhamento ou de forma, $P(\theta)$ aos cálculos (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

O fator de espalhamento ou de forma, é definido como a razão entre a intensidade de luz espalhada, medida a um ângulo θ (R_θ) e a intensidade de luz espalhada extrapolada a um ângulo zero (R_0). Assim, o fator pelo qual a intensidade de luz espalhada (I_0) é diminuída pela interferência do ângulo (θ) é chamada de fator de forma ou fator de espalhamento P_θ (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

O fator de forma $P(\theta)$ é relacionado ao raio de giro médio quadrático (s^2) e depende da forma da macromolécula, por exemplo esferas, discos finos, bastões, novelos aleatórios, etc (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

O fator de forma relacionado ao raio de giro de uma macromolécula que apresenta conformação de um novelo aleatório, ou distribuído ao acaso é considerada abaixo (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999):

$$1/P(\theta) = 1 + 16 \pi^2 n_o^2 / 3\lambda_o^2 (s^2) \text{ sen}^2 (\theta/2) \quad (22)$$

Incorporando-se as correções impostas pelo fator de espalhamento, chega-se à equação conhecida por equação de Zimm (ATKINS, 1992; GHAZY et al., 1999).

$$Kc/\Delta R\theta = 1/M [1 + 16 \pi^2 \eta_o^2 / 3\lambda_o^2 (s^2) \text{ sen}^2 (\theta/2)] + 2 A_2c + 3 A_3c^2 \quad (23)$$

Análises para determinação de massa molecular por Zimm (equação 23) podem ser realizadas em experimentos em batelada (“Batch”), onde a massa molecular é obtida através do espalhamento de luz envolvendo extrapolações a concentração zero e a ângulo zero. Nessas condições, considerando o ângulo constante e extrapolando à concentração zero, o coeficiente angular fornece o segundo coeficiente angular (A_2) e ao se considerar a concentração constante e extrapolando-se ao ângulo zero o coeficiente angular fornece o raio de giro. Pode ser utilizado também o detector de multiângulos de espalhamento de luz (MALLS) acoplado a sistemas de cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) (WYATT, 1993; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001). Nesse caso, utiliza-se na equação 23 o valor de A_2 igual a zero. Assim para moléculas grandes como hidrocolóides, pode-se determinar a massa molecular e o raio de giro quadrático médio e a forma molecular através da determinação do fator de espalhamento $P(\theta)$ utilizando-se apenas uma concentração do polímero em estudo.

1.4.3. DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO MACROMOLECULAR EM SOLUÇÃO

Sabe-se que a viscosidade de soluções de polímeros é função das propriedades hidrodinâmicas, ou seja, estão relacionadas ao movimento de uma macromolécula em solução.

A viscosidade é proporcional ao volume efetivo da macromolécula em solução, isto é, do seu volume hidrodinâmico. Dessa forma, as medidas de viscosidade fornecem dados sobre o volume molecular que o polímero assume em solução. Quando a viscosidade é determinada em condições teta (solvente ou temperatura), o fator de expansão do novelo (α) é igual a um e a equação de viscosidade pode ser escrita por (ROBINSON, ROSS-MURPHY e MORRIS, 1982; GIDLEY et al., 1991; ROGER, AXELOS e COLONNA, 2000; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CHENG, FRINGANT e RINAUDO, 2002):

$$[\eta]_{\theta} = K_{\theta} M^{1/2} \quad (24)$$

Sendo:

$$K_{\theta} = \Phi_{\theta} [r_o^2/M]^{3/2} \quad (25)$$

Onde r_o representa a distância extremo a extremo quadrática média entre as extremidades da cadeia de uma macromolécula linear em condições theta.

Assim a viscosidade intrínseca pode ser escrita como:

$$[\eta]_{\theta} = \Phi_{\theta} [r_o^2]^{3/2} / M \quad (26)$$

As dimensões de uma macromolécula em solução não podem ser definidas de forma absoluta, porque a forma do novelo molecular altera-se em função do tempo e das interações polímero e solvente. O tamanho molecular varia de molécula para molécula, mesmo com estruturas e massas moleculares idênticas. Portanto, pode ser definido somente em termos de propriedades médias (ROBINSON, ROSS-MURPHY e MORRIS, 1982; GIDLEY et al., 1991; ROGER, AXELOS e COLONNA, 2000; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001; CHENG, FRINGANT e RINAUDO, 2002).

Para uma macromolécula em solução que assume uma forma enovelada, as dimensões deste novelo dependerão das interações polímero-solvente. Quando existe uma boa interação entre o polímero e o solvente, as

moléculas de solvente penetram facilmente no novelo polimérico, expandindo-o. Com isto, o tamanho molecular é bem maior do que seria se o novelo estivesse encolhido. Por outro lado, se as interações entre as moléculas do solvente e as do polímero não forem muito eficientes, o novelo polimérico tende a ficar menor, porque a tendência das moléculas do solvente em penetrar no novelo é menor (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

O tamanho que uma macromolécula assume em solução diluída é denominado volume hidrodinâmico.

Os principais parâmetros que definem o tamanho molecular de uma macromolécula linear em solução são:

- Distância ponta a ponta ou extremo a extremo quadrática média (r^2): Representa o módulo do vetor que conecta duas pontas de uma cadeia polimérica, conforme apresentado na Figura 9 (IUPAC 1989; PETKOWICZ, 1998). O termo r é definido como a distância entre as extremidades da cadeia. O parâmetro r só pode ser utilizado para macromoléculas lineares (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).
- Raio de giro (s ou R_g): O raio de giro de uma molécula corresponde a raiz quadrática média $\langle s^2 \rangle^{1/2}$ entre um elemento do polímero e o centro de gravidade (PETKOWICZ, 1998; IUPAC, 1989). Assim, conforme observado na Figura 9, o raio de giro (s) corresponde à distância entre o centro de gravidade (O) e os raios que encontram os fragmentos de massa da macromolécula do novelo. O raio de giro fornece informações sobre as dimensões globais da cadeia e depende da distância ponta a ponta. Macromoléculas ramificadas apresentam várias extremidades de cadeia e, portanto, o seu tamanho molecular só pode ser definido pelo raio de giração (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

A figura 9 mostra uma representação de um novelo molecular simples para uma macromolécula linear, onde o centro de gravidade está localizado no ponto O.

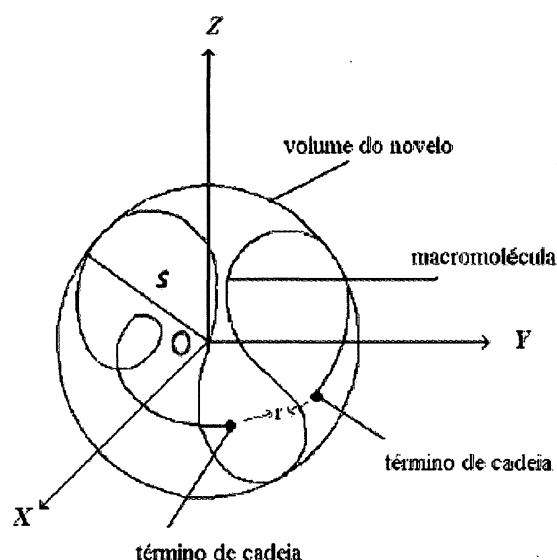


Figura 9 – Representação esquemática da distância ponta a ponta e raio de giração (LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

A distância extremo a extremo quadrática média entre as extremidades da cadeia de uma macromolécula linear é relacionada ao raio de giro, para polímeros lineares, utilizando-se a seguinte relação entre r e s : (CHENG, FRINGANT e RINAUDO, 2002)

$$r^2 = 6 s^2 \quad (27)$$

As dimensões perturbadas são as dimensões da cadeia em um determinado solvente onde ocorrem interações intermoleculares entre o polímero e o solvente. Já as dimensões não perturbadas são aquelas influenciadas somente pelos comprimentos de ligação e ângulos de ligação da molécula. As dimensões não perturbadas são alcançadas quando as interações polímero-polímero e polímero-solvente e solvente-solvente são semelhantes, ou seja, não existe interação preferencial. Essa condição é definida como condição teta (θ), e depende do par polímero-solvente e temperatura. Soluções sob condições teta apresentam comportamento ideal.

As dimensões de uma macromolécula são definidas a partir de dois tipos básicos de interação descritos a seguir.

- Interações de curto alcance – Essas influenciam a rotação interna da macromolécula, devido à restrições de ângulos de ligação e estereopimpimento. A medida do efeito destas interações de curto alcance é dada pela razão característica (C_∞):

$$C_\infty = \lim_{n \rightarrow \infty} r_o^2 / \sum n l \quad (28)$$

Onde n é o número de ligações de comprimento l .

- Interações de longo alcance – São as que dependem das interações polímero–solvente e são determinadas pelo coeficiente de expansão (α) e pelo parâmetro de volume excluído (z). O fator de expansão (α) é definido como a razão das dimensões da cadeia em um determinado solvente (perturbadas), e em solvente teta (não perturbadas) a uma temperatura específica. O fator de expansão é, também, uma função da qualidade do solvente. Se o polímero está em um bom solvente, o fator de expansão é maior do que a unidade. Isto significa que as dimensões perturbadas reais são maiores do que as dimensões não perturbadas (ROBINSON, ROSS-MURPHY e MORRIS, 1982; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

O fator de expansão aumenta com a massa molecular. Isso ocorre porque o número de interações não compensadas entre os segmentos da cadeia aumenta com o número de segmentos quando a temperatura é maior do que a temperatura teta (ROBINSON, ROSS-MURPHY e MORRIS, 1982; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Moléculas em solução muito diluída, em um bom solvente, possui uma tendência a excluir todas as outras do volume que ela ocupa. A partir deste fenômeno é definido o termo volume excluído, o qual é o resultado da repulsão entre as moléculas do polímero devido a requisitos espaciais (ROBINSON, ROSS-MURPHY e MORRIS, 1982; LUCAS, SOARES e MONTEIRO, 2001).

Sabendo-se que as características estruturais são determinantes para o comportamento e propriedades das soluções, o presente trabalho foi desenvolvido levando em consideração os objetivos propostos na seqüência.

2.0. OBJETIVOS E METAS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar as galactoxiloglucanas de Jatobá e Tamarindo e os amidos de milho, cará e mandioca, em sistemas isolados e misturas para interpretar as interações envolvidas entre os polissacarídeos utilizados como modelos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o possível mecanismo de interação amido-galactoxiloglucana através da relação estrutura/propriedades das macromoléculas isoladas e/ou em misturas, através das seguintes metas:

- Determinar a composição química e estrutural das galactoxiloglucanas;
- Comparar as propriedades físico-químicas como massa molecular, conformação e estabilidade térmica da galactoxiloglucana nativa e modificada seletivamente em C-6;
- Analisar a agregação macromolecular das galactoxiloglucanas e a influência da composição em oligossacarídeos sobre os valores de viscosidade intrínseca, massa molecular ponderal média, raio de giro, razão característica e comprimento de persistência;
- Avaliar a ação citotóxica e a viabilidade celular sobre fibroblastos murinos (L929) da galactoxiloglucana nativa e modificada por oxidação;
- Determinar a composição química e estrutural dos amidos de milho com altos teores de amilose, amido de milho com altos teores de amilopectina, amido de milho comum, amido de mandioca e amido de cará;
- Avaliar a influência do teor de amilose dos amidos modelos sobre os valores de massa molecular, raio de giro e de energia de ativação do processo de gelatinização;
- Analisar a interação galactoxiloglucanas-amidos através de análises de complexação com iodo, análises reológicas dinâmico-oscilatórias e avaliação da interação através da digestão com α -amilase.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.1.1. GALACTOXILOGLUCANAS

Sementes de *H. courbaril* foram colhidas na reserva de Foz do Chopin, no estado do Paraná (**HC-I**), Cuiabá (**HC-II**) e Sinop/estado do Mato Grosso (**HC-III**), Natal/estado do Rio Grande do Norte (**HC-IV**), Fortaleza/ estado do Ceará (**HC-V**) e *T. indica* (**TM**) de uma fonte comercial proveniente de Conceição do Almeida/estado da Bahia. As galactoxiloglucanas (**XG**) foram obtidas por extração aquosa exaustiva a 25°C à partir de sementes que foram previamente aquecidas em banho maria fervente por 30 min, descascadas e moídas (40g.L⁻¹ para cada processo de extração). O extrato viscoso foi filtrado por pano de Nylon, centrifugado a 10.000xg e o sobrenadante seqüencialmente passado através de membranas filtrantes Millipore com poros de 3 e 0,8 µm. Os polímeros foram obtidos após precipitação com dois volumes de etanol 96°GL e tratamento com acetona e secagem (FREITAS, 2003).

3.1.2. AMIDOS

As amostras de amido de milho com alto teor de amilose, amido de milho comum e amido de milho com alto teor de amilopectina foram obtidos comercialmente da SIGMA.

A amostra de amido de cará (*Dioscorea alata*) foi uma doação da Prof. Dra. Maria Vitória E. Grossmann da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sendo extraída e purificada conforme descrito por ALVES et al. (1999). O amido de mandioca (*Manihot utilissima*) foi obtido utilizando o procedimento descrito por WILLINGER (1964) e foi um presente do Prof. Dr. José Domingos Fontana.

3.2. OXIDAÇÃO SELETIVA POR TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil)

A amostra **HC-I** (1 g) foi solubilizada a 25°C em 500 mL de água. A solução foi tratada com TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) (0,53 mg), NaBr (4,64 mg), e hipoclorito de sódio (0,26 mL a 12%), para converter 0,1 mmol de álcool primário da galactoxiloglucana em ácido. A mistura reacional foi mantida a 3°C sob agitação e atmosfera de nitrogênio. Ao final do processo oxidativo, 16 mg de NaBH₄ por 0,1 mmol de álcool primário e 20 ml de etanol foram usados para reduzir o excesso do agente oxidante no meio (De NOOY, BESEMER, BEKKUM, 1994 e 1995).

A conversão do álcool em ácido foi estimada por titulação com NaOH (0,0888 mol.L⁻¹) durante o processo de oxidação. O pH inicial de ~9,5 foi mantido pela titulação com a solução aquosa de NaOH. A formação dos grupos carboxila correspondem desta forma a quantidade de NaOH utilizado no processo titulométrico (De NOOY, BESEMER e BEKKUM, 1994 e 1995). Assim, foram utilizados 7, 14 e 28 mL de NaOH 0,0888 mol.L⁻¹ para obter razões teóricas de oxidação de 3, 6 e 12%, respectivamente.

3.3. ANÁLISES QUÍMICAS

3.3.1. TEOR DE CARBOIDRATOS TOTAIS, ÁCIDOS URÔNICOS E PROTEÍNAS.

As determinações de carboidratos foram realizadas pelo método do fenol – ácido sulfúrico segundo DUBOIS et al. (1956), com algumas modificações. Para as amostras de galactoxiloglucanas foi utilizada uma mistura de padrões na mesma proporção da composição monossacarídica determinada por CG-MS. Já as amostras de amidos foram solubilizadas em DMSO e diluídas em água, assim como os padrões de glucose e o branco (DMSO:água 1:10). Os ácidos urônicos foram determinados pelo método do m-hidroxibifenil (BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN, 1973). As proteínas foram determinadas pelo método de HARTREE (1972).

3.3.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AMILOSE

As amostras e padrões de amilose foram deslipidificadas para determinação do teor de amilose, utilizando extração em refluxo com éter etílico fervente por 5 horas. Após a remoção dos lipídeos, as amostras foram secas a 100°C (AOAC, 1995).

O conteúdo de amilose foi então determinado utilizando-se o método de CHRASTIL (1987) com modificações, utilizando amilose e amilopectina SIGMA como padrões em misturas com proporções intermediárias de amilose e amilopectina (100, 80, 70, 50, 40, 20, 0% de amilose). A equação da reta obtida foi utilizada para determinar o conteúdo de amilose das demais amostras. O método proposto por CHRASTIL que utiliza um fator de multiplicação para obter o teor de amilose em $g.L^{-1}$ gera erros na determinação do teor de amilose e, por isso, tal metodologia não foi utilizada nesta tese.

3.3.2.1. Interação galactoxiloglucana – amilose: ensaio competitivo com iodo

A medida da interação entre galactoxiloglucana – amilose foi determinada utilizando-se o método de CHRASTIL, 1987. Nestes ensaios foram avaliadas as interferências das misturas hidrocolóide-amido sobre a capacidade da amilose em interagir com o iodo, que é um ligante conhecido para a amilose. Os ensaios foram realizados em triplicata de amostras independentes.

3.3.3. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

3.3.3.1. Hidrólise com H_2SO_4 (SELVENDRAN, MARCH e RING, 1979)

Os polissacarídeos (10 mg) foram dissolvidos em 0,5 ml de solução de ácido sulfúrico a 72% (v/v), em banho de gelo no qual permaneceram 1 h. Em seguida, as soluções ácidas foram diluídas para 8% e mantidas a 100°C por 5 h. O excesso de ácido sulfúrico foi neutralizado com carbonato de bário e o sulfato de bário resultante foi removido por filtração.

3.3.3.2. Redução, acetilação e análise por cromatografia gasosa

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram reduzidos na presença de boroidreto de sódio (NaBH_4), à temperatura de 50°C , por 12 horas. A reação foi neutralizada pela adição de ácido acético diluído, e o excesso de íons sódio retirados pela adição de resina catiônica Lewatit S-100 (H^+), seguida por filtração e secagem em rota-evaporador. O resíduo foi então lavado com metanol, formando borato de trimetila, que é destilado com o metanol em excesso. Os alditóis secos foram então acetilados em presença de piridina-anidrido acético (1:1, v/v), à temperatura ambiente por 15 horas. A reação foi interrompida pela adição de gelo, e a piridina residual retirada pela adição de sulfato de cobre e os acetato de alditóis extraídos com clorofórmio. Os produtos foram analisados por cromatografia líquida-gasosa segundo WOLFROM e THOMPSON (1963), em cromatógrafo HP modelo 5890 série 2, com detector e injetor a 250°C e coluna capilar DB-225 a 220°C , utilizando o nitrogênio como gás de arraste.

3.3.4. METILAÇÃO

Os polissacarídeos foram metilados segundo o método de CIUCANU E KEREK (1984). As amostras (20 mg) foram solubilizadas em 2 mL de DMSO às quais acrescentou-se 20 mg de NaOH em pó, seguido de agitação e posterior adição de 0,1 mL de iodeto de metila, continuando-se a agitação. O processo descrito acima foi repetido 3 vezes. Após, os sistemas foram neutralizados com ácido acético e os polissacarídeos parcialmente metilados foram dializados por 12 horas contra água destilada. Todo o procedimento acima foi repetido até o desaparecimento da banda de $-\text{OH}$ em 3.400 cm^{-1} , verificado por infravermelho. As amostras parcialmente metiladas foram hidrolisadas segundo SELVENDRAN, MARCH e RING, 1979, reduzidas com boroidreto de sódio deuterado, acetiladas e analisadas em cromatógrafo gasoso, modelo VARIAN 3300, acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN MAT, utilizando coluna capilar OV-225, temperatura de 220°C e utilizando hélio como gás de arraste.

3.4. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS

3.4.1. UMIDADE, CINZAS e LIPÍDEOS

Para as amostras de galactoxiloglucana, o teor de umidade foi determinado utilizando-se um aparelho de Análise Termogravimétrica Shimadzu 50 H (TGA), com massa de $9,9 \pm 0,1$ mg. A umidade foi considerada como a perda de massa observada em uma rampa de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando-se temperaturas de 25 a 200°C . Todos esses ensaios foram realizados no Laboratório de Polímeros/Departamento de química/UFC-Fortaleza.

O teor de umidade, cinzas e lipídeos das amostras de amido foram determinados pelas metodologias propostas pela AOAC (1995).

3.4.2. DETERMINAÇÃO DA HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR

3.4.2.1. Refratometria diferencial

O índice de refração (IR) foi determinado utilizando-se concentrações entre 1,0 e $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, para amostras solubilizadas em nitrato de sódio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ contendo 200 ppm de azida e filtradas em membranas de $0,45 \mu\text{m}$, analisadas em comprimento de onda de 546 nm. A análise do índice de refração em função da concentração forneceu uma constante para cada polissacarídeo em estudo, o dn/dc , uma constante que é utilizada no cálculo da massa molecular. O dn/dc foi determinado em duplicata para cada amostra em estudo.

3.4.2.2. Cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC)

As soluções aquosas dos polissacarídeos a $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ foram filtradas através de membranas de acetato de celulose da marca Millipore, com diâmetro médio dos poros de $0,22 \mu\text{m}$.

Injetou-se então 0,5 ml de amostra no cromatógrafo de exclusão estérica, contendo colunas ultrahydrogel 2000, 500, 250 e 120, acopladas a um refratômetro diferencial, modelo Waters 2410 e um detector de espalhamento de laser multiângulo (MALLS) à 632,8 nm, modelo DAWN DSP-F, Wyatt technology, que promove uma leitura do espalhamento de luz que é captada em diferentes intensidades, por diferentes ângulos.

Como eluente utilizou-se o nitrato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ contendo 200 ppm de azida, com fluxo controlado de 0,6 mL.min⁻¹.

As análises acima também foram realizadas para as amostras solubilizadas por 16 horas e posteriormente aquecidas a 85°C por 2h em um tubo selado para evitar a evaporação. Então após o resfriamento das amostras a 25°C as mesmas foram injetadas no HPSEC-MALLS/IR.

Todas essas análises foram realizadas em duplicatas.

3.4.2.3. Determinação da concentração crítica por HPSEC-MALLS/IR

A determinação da concentração crítica, referente ao limite de concentração entre o regime semidiluído e diluído, foi realizada utilizando-se parâmetros determinados por HPSEC-MALLS/IR, conforme a seguinte equação:

$$c^* = M_w / 4/3 \pi \times NA \times R_{gw}^3 \quad (29)$$

Onde:

M_w é a Massa molecular ponderal media (g.mol⁻¹);

NA é o número de Avogrado;

R_{gw} Raio de giro (nm)

3.4.2.4. Efeito do aquecimento sobre o comportamento hidrodinâmico

Através da determinação do raio de giro e da massa molecular por HPSEC-MALLS, foi possível fazer a predição da viscosidade intrínseca utilizando a equação de Flory – Fox (FLORY, 1953).

$$[\eta] = \Phi_0 \bar{v}^{3/2} R_g^3 / M \quad (30)$$

Onde:

Φ_0 é o parâmetro de viscosidade;

R_g é o raio de giro (nm);

M é a Massa molecular ponderal media (g.mol^{-1})

A teoria de Flory-Fox foi desenvolvida para moléculas monodispersas, e isto pode causar valores preditivos de viscosidade intrínseca maiores que os valores determinados por análises reológicas. O R_g de acordo com GIDLEY et al. (1991) é influenciado pelo volume excluído e pelo fator de expansão, e essas variáveis também podem causar aumento do valor de viscosidade. A correção da viscosidade pode ser realizada utilizando-se as equações a seguir:

$$[\eta] = \Phi_{(\varepsilon)} \bar{v}^{3/2} R_g^3 / M \quad (31)$$

$$\Phi_{(\varepsilon)} = \Phi_0 (1 - 2.63\varepsilon - 2.86\varepsilon^2) \quad (32)$$

$$\varepsilon = 2\alpha - 1 \quad (33)$$

Onde:

α =coeficiente angular do gráfico entre o R_g em função da massa molecular ponderal media (M_w).

3.4.2.5. Determinação da flexibilidade intrínseca da cadeia – Razão Característica (C_∞) e Comprimento de Persistência (L_p)

O método utilizado para obter a razão característica e o comprimento de persistência a partir do R_g e da massa molecular é mostrado na equação 36 de acordo com ROGER, AXELOS e COLONNA (2000), onde C_∞ pode ser matematicamente definida como:

$$C_\infty = \lim_{(n \rightarrow \infty)} r/n_w l^2 \quad (34)$$

Onde:

- r é a distância ponta a ponta;
- l é a comprimento rígido mínimo do polímero;
- $n_w = M_w/m_0 =$ grau de polimerização.

Para uma molécula com distribuição ao acaso ou “random coil”, r é proporcional a:

$$r = 6R_g^2 \quad (35)$$

Assim, a razão característica pode ser obtida utilizando-se a seguinte equação:

$$C_\infty = 6R_{gw}^2/n_w l^2 = 6R_{gw}^2 m_0/M_w l^2 \quad (36)$$

ROGER, AXELOS e COLONNA (2000) propuseram uma metodologia para se obter graficamente os valores de C_∞ (Equação 39). O coeficiente linear da reta descrita pela equação 39, que relaciona a variação do R_{gw}^2/M_w como uma função da $M_w^{1/2}$ fornece o $C_\infty l^2 / m_0$. Utilizando o comprimento monomérico (l) como o comprimento mínimo rígido na molécula, que para galactoxiloglucana é de 0,52 nm e o m_0 de 360 g.mol⁻¹ foi possível calcular os valores de C_∞ (GIDLEY et al, 1991).

$$R_{gw}^2/M_w = C_\infty l^2 / 6 m_0 (1+c'M_w^{1/2}) \quad (37)$$

Uma vez obtidos os valores de razão característica foi possível estimar o comprimento de persistência:

$$C_\infty = 2 (L_p/l) - 1 \quad (38)$$

l = comprimento rígido mínimo do polímero;

L_p = comprimento de persistência.

A mesma abordagem matemática citada acima foi utilizada para obter a razão característica e o comprimento de persistência para cada uma das galactoxiloglucanas em estudo (jatobá e de tamarindo), utilizando para tal a fração de massa molecular e raio de giro obtido através do gráfico de Zimm ($Kc/R\theta$ como uma função do $\sin^2\theta/2$) em volumes de eluição obtidos pelo HPSEC de 19,8; 20,4; 21; 21,6; 22,2; 22,8; 23,4; 24; 24,6 e 25,2 mL (BEER, WOOD e WEISZ, 1999; WANG et al., 2001 e ROGER, AXELOS e COLONNA, 2000).

3.4.2.6. Análises em batelada (gráfico de Zimm)

As amostras de galactoxiloglucanas e amidos foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 200 ppm de azida e DMSO respectivamente, em concentrações entre $1,0$ e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, para experimentos realizados em batelada, medindo-se o R_θ para as várias concentrações. Para análise dos dados foi plotado o gráfico de Zimm que relaciona $Kc/\Delta R_\theta$ em função de $Kc + \sin^2(\theta/2)$, onde K é definido por $(2\pi^2n^2/\lambda_o^4N)/ (dn/dc)^2$, c é a concentração do polímero e ΔR_θ que refere-se a diferença entre a intensidade do feixe de luz espalhado dividida pela sua intensidade da solução e do solvente, θ refere-se ao ângulo do feixe espalhado. O resultado é um diagrama de dupla extrapolação para ângulo e concentração nula, que nos fornece a massa molecular ponderal (M_w), o raio de giro (R_g) e o coeficiente virial (A_2).

Os resultados foram fornecidos diretamente através de um computador acoplado ao sistema, utilizando o software ASTRA 4.70.07.

3.4.3. POLARIMETRIA

A rotação óptica específica foi determinada após solubilização do polissacarídeo em concentração de 5 g.L^{-1} . As amostras de galactoxiloglucana foram solubilizadas em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo 200 ppm de azida. As análises foram realizadas em aparelho AUTOPOL III, marca Rudolf Research.

A rotação óptica específica é dada pela equação (EWING, 1982):

$$[\alpha]_{20}^D = \alpha_{20} \cdot 100 / L \cdot c \quad (39)$$

Onde:

α_{20} – ângulo da rotação da luz polarizada em graus a 20°C

L – caminho óptico em dm = 1

c – concentração da solução em g%

3.4.4. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE FTIR

As amostras de polissacarídeos nativos, modificados por oxidação seletiva e dos polissacarídeos parcialmente metilados foram analisadas por FTIR, em um espectrômetro Hartmann & Braum série MB, com KBr como suporte em uma faixa de 400 a 4.000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e 19 leituras a uma velocidade de 10 leituras por minuto. Todas essas análises foram realizadas no Departamento de química da UFPR.

3.4.5. ANÁLISE DE RMN ^{13}C E ^1H

Os espectros de RMN de carbono 13 (^{13}C) e próton (^1H) foram feitos utilizando um espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE-DRX-500 MHz, utilizando DMSO- d_6 e D_2O como solvente, para as amostras de amido e de galactoxiloglucana, respectivamente. Todas as análises foram realizadas a 60°C e os deslocamentos químicos baseados no da acetona, utilizada como padrão interno (δ 30,2). Esses experimentos foram realizados no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR e no CENAUREM/UFC.

3.4.6. ANÁLISES TÉRMICAS

Os experimentos de análise térmica (TGA e DSC) foram realizados no Laboratório de Polímeros do Departamento de Química da UFC, com a colaboração das prof. Dra. Regina C. Paula e Judith P.A. Feitosa.

3.4.6.1. Análises termogravimétricas

As análises termogravimétricas foram realizadas utilizando um analisador termogravimétrico Shimadzu 50 H (TGA), utilizando massas de amostra de $9,9 \pm 0,1$ mg. Todas as análises foram mantidas sob atmosfera inerte de nitrogênio em um fluxo de $50 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Os experimentos foram realizados em cinco taxas de aquecimento 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e $40,0 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ com aquecimento de 25°C a 600°C . Como suporte para as amostras foi utilizado um cadinho de platina (BROWN, 1988 e OZAWA, 1965)

As amostras foram mantidas a 105°C por 3 h antes dos experimentos, para diminuir o conteúdo diferencial de umidade, utilizando assim a mesma massa de polissacarídeos para as análises. As curvas de perda de massa foram normalizadas para 100% a 200°C para retirar a umidade residual presente nas amostras.

3.4.6.1.1. Análises cinéticas da termogravimetria

Vários modelos teóricos e empíricos são utilizados para representar as transições de massas observadas. Em cada modelo, a velocidade de reação pode ser expressa como uma função $f(\alpha)$, onde α é o valor de conversão, neste caso de degradação. A dependência da constante de velocidade em função da temperatura pode ser obtida pela equação de Arrhenius (Eq. 42). Para determinar a energia de ativação (E_a), o \ln das taxas de aquecimento (K) foi plotado como uma função do recíproco da temperatura absoluta, para diferentes perdas de massa ($\alpha\% = 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60$ e 80%). O coeficiente angular desse gráfico fornece a razão $-E_a/R$ onde R é a constante universal dos gases. O coeficiente linear obtido fornece o fator pré-exponencial da equação de Arrhenius (A) (DICKENS e FLYNN, 1983, BROWN, 1988 e OZAWA, 1965) (Equação 43).

$$\ln K = \ln A - E_a / R.T \quad (40)$$

Para cada E_a e o seu valor correspondente de α , a constante de velocidade foi calculada a 250 e 350°C.

3.4.6.2. Análise de varredura diferencial de temperatura (DSC)

As análises de DSC foram realizadas em um analisador térmico Shimadzu DSC-50, utilizando amostras de ~5 mg de amido e 10 mg de água. As taxas de aquecimento utilizadas foram de 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0°C/min. A atmosfera inerte foi mantida utilizando nitrogênio gasoso em um fluxo de 50 mL.min⁻¹. A calibração do DSC foi realizada utilizando um cadinho com Indium. As amostras foram pesadas diretamente no cadinho de alumínio, e a massa de água adicionada utilizando uma micro-seringa Hamilton. Após selar o cadinho, o mesmo foi deixado equilibrar por 30 min, e pesado antes e após o aquecimento, afim de observar a perda de água durante os ciclos de aquecimento, uma vez que alguns cadinhos selados não suportaram a temperatura e pressão principalmente em altas temperaturas. Todos os experimentos acima foram realizados em triplicata.

3.4.6.2.1. Análises cinéticas do DSC

A dependência da constante de velocidade em função da temperatura de gelatinização das amostras de amido pôde ser obtida pela equação de Arrhenius (Eq. 42). Para determinar a Energia de ativação (E_a) do processo de gelatinização do amido, PIELICHOWSKI, TOMASIK e SIKORA (1998) propuseram a construção de um gráfico do ln da taxa de aquecimento (2,5; 3,0; 4,0 e 5,0°C.min⁻¹), ao invés da constante de velocidade (K), como uma função do recíproco da temperatura absoluta em diferentes porcentagens de gelatinização, obtidas pelas áreas parciais do espectro endotérmico por DSC, representados como α (%) para 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 e 100% de gelatinização. O coeficiente angular fornece a $-E_a/R$, e o coeficiente linear o fator pré-exponencial (equação 42)

De posse dos valores de E_a e A foi possível obter as constantes de velocidade dos processos de gelatinização para amido de mandioca, cará, amido de milho comum, amido de milho rico em amilose e amido de milho rico em amilopectina.

3.4.7. ANÁLISES REOLÓGICAS

3.4.7.1. Viscosidade intrínseca

Para as análises reológicas não oscilatórias, as galactoxiloglucanas foram solubilizadas em concentração de 2 g.L^{-1} por 16 h em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e 200 ppm de azida. As análises foram realizadas em reômetro Brookfield, modelo LV DV-III, cone-placa, spindle cp-40, com controle de temperatura (25°C) utilizando um banho Brookfield TC-500.

Através do gráfico que representa a equação de Huggins, foi possível obter a viscosidade intrínseca $[\eta]$ pela extrapolação da viscosidade reduzida (η_{red}) a uma concentração limite, tendendo a zero ($c \rightarrow 0$).

A constante de Huggins (k') pôde ser determinada através do gráfico utilizado para obtenção da viscosidade intrínseca, onde o coeficiente angular representa o $k'[\eta]^2$.

3.4.7.2. Determinação da concentração crítica

A concentração crítica foi obtida graficamente através da relação do Log da viscosidade específica (η_{sp}) como uma função do Log da concentração x $[\eta]$ (parâmetro de recobrimento). Através da inclinação desse gráfico foi possível identificar a transição dos regimes semi-diluído para diluído.

3.4.7.3. Análises dinâmicas oscilatórias

Para as análises dinâmico oscilatórias foi utilizada a solubilização em água destilada e agitação por 16 horas à temperatura ambiente. As amostras

de amido foram transformadas em pasta por dispersão em água por 30 minutos, seguida de autoclavação (120°C) por 30 minutos, exceto para a amostra de amido de milho rico em amilose (Sigma) que foi mantido por 1 hora em autoclave. As misturas entre o hidrocolóide e as amostras de amido foram realizadas previamente, solubilizando-se a galactoxiloglucana em água na concentração desejada e transformando em pasta o amido nesta solução. Os géis obtidos em diferentes concentrações de amido e galactoxiloglucana, após autoclavação e refrigeração a 5°C por 24 h, foram analisados em reômetro oscilatório Haake, modelo RS 75, sensor C60/2º Ti, utilizando sistema peltier como controle de temperatura a temperatura de 25°C. A tensão utilizada nas varreduras de frequência (0,01 – 10 Hz) são referentes a região viscoelástica linear.

3.4.8. ENSAIOS BIOQUÍMICOS: ENZIMÁTICOS E CELULARES

3.4.8.1. Obtenção e análise dos oligossacarídeos

As amostras de galactoxiloglucanas foram hidrolizadas com *Trichoderma viride* “celulase” da Megazyme Austrália, por 32 h a 30°C em pH 5,0. Os produtos da hidrólise enzimática foram analisados por sistema de troca iônica, sistema Dionex DX 500, utilizando coluna Carbopack e detector de pulso amperométrico. O eluente utilizado foi NaOH 88 mmol.L⁻¹ com gradiente de NaOAc 0,5 mol.L⁻¹ de 7 a 15%. Estes experimentos foram realizados no Instituto de Botânica-São Paulo, com a colaboração do Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge.

3.4.8.2. Análise de citotoxicidade dos polissacarídeos nativos e modificados

3.4.8.2.1. Ensaio teste de difusão em ágar (USP XXII)

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pelo teste de difusão em ágar USP XXII, utilizando células de fibroblastos de mamíferos L929 e diferentes concentrações da amostra de galactoxiloglucana **HC-I**. As células

foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas, e observadas microscopicamente em termos de homogeneidade e formação de monocamada. O meio de cultura DMEM suplementado com L-glutamina foi retirado da monocamada e substituído por meio de cultura suplementado com soro fetal bovino a 10% e ágar a 1,8%. Nos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas como controle negativo borrachas de látex com 5 mm de diâmetro, para controle positivo papéis de filtro com diâmetro de 5 mm autoclavados, e, para aplicação das amostras de galactoxiloglucana **HC-I** nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5,0%, os papéis de filtro de 5 mm previamente autoclavados foram embebidos nas respectivas soluções e aplicados sobre a camada de ágar. A toxicidade celular é proporcional ao diâmetro do halo formado na monocamada, sendo atribuída uma escala de 0 a 4, onde em 0 (não tóxico) não há detecção de halo, 1 (levemente tóxico) para amostras com uma zona limitada à área da aplicação do papel, 2 (suavemente tóxico) para halos de 0,5 cm, 3 (moderadamente tóxico) entre 0,5 e 1,0 cm, e 4 (severamente tóxico) para zonas maiores de 1,0 cm. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Toxicologia do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), com a colaboração da Ms Beatriz César.

3.4.8.2.2. Viabilidade celular utilizando corante vital azul de tripan

Nos ensaios de viabilidade celular, quarenta mil células L929 de fibroblasto murino foram plaqueadas por poço em placas de 24 poços, utilizando meio de cultura DMEM suplementado com L-glutamina 2% e Soro Fetal Bovino 10%. Os sistemas foram incubados por 24, 48 e 96 horas, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Nesses ensaios foram adicionados aos meios de cultura diferentes concentrações da amostra de galactoxiloglucana **HC-I** (0,2 – 0,0005%). Utilizando o corante vital Azul de tripan a 4% foram avaliados o crescimento celular através da contagem do número de células vivas presentes em cada poço. A avaliação da viabilidade celular representa a porcentagem de células vivas em relação ao total de células no sistema. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

3.4.8.3. Digestão pela α -amilase

As amostras de amido a 50 g.L^{-1} e galactoxiloglucanas isoladas ou em misturas com amido, solubilizadas em tampão acetato pH 5,5, foram digeridas com a enzima α -amilase de *Aspergillus niger*, Novozyme – Brasil. Em 2 mL de amostra foram aplicados 100 μL de solução enzimática (unidades de enzima de $0,8 \mu\text{mol/min}$). A degradação enzimática foi controlada através do acompanhamento do decréscimo da viscosidade a uma velocidade de cisalhamento de 60 s^{-1} , semelhante ao valor de velocidade produzido durante o processo de mastigação e deglutição. Utilizou-se reômetro Haake, modelo RS 75, sensor C60/2° Ti e sistema Peltier para controle de temperatura a 37°C .

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. GALACTOXILOGLUCANAS

4.1.1. OBTENÇÃO DAS GALACTOXILOGLUCANAS NATIVAS

Após extração e purificação por centrifugação a 10.000xg e filtração através de membranas filtrantes Millipore (3,0 e 0,8 μm), foi obtido, em relação as sementes totais, um rendimento de ~17% para todas as galactoxiloglucanas. Considerando as perdas dos processos de filtração por membranas para obtenção de amostras mais puras, o rendimento obtido pode ser considerado bom. Para polissacarídeos hidrossolúveis como galactomananas, sem processo de purificação por centrifugação e microfiltração os rendimentos obtidos são de ~30% para *Mimosa scabrella* (30%) (GANTER, 1991); *Senna multijuga* (23%) (RECHIA, 1992), *Cassia fastuosa* (36%) (AMARAL, 1999) e para galactoxiloglucanas de *Hymenaea courbaril* sem purificação tem-se 42-45% de rendimentos (LIMA, 1993 e SOUZA-LIMA, 1997). Esses valores de rendimento, com relação a sementes totais, são semelhantes aos encontrados para as galactoxiloglucanas em estudo antes do processo de centrifugação e filtração (~40%).

As amostras de galactoxiloglucana (**XG**) obtidas de sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá), colhidas em diferentes locais do Brasil, foram comparadas entre si em termos estruturais e físico-químicos e, também, em relação à **XG** obtida de sementes de *T. indica*. Esse estudo comparativo é importante uma vez que a diferença na estrutura primária dos polímeros pode gerar diferenças nas propriedades macromoleculares em solução.

4.1.2. ANÁLISES QUÍMICAS DAS GALACTOXILOGLUCANAS

A tabela 1 mostra o conteúdo de proteínas, carboidratos, umidade, cinzas e rotação óptica das amostras de galactoxiloglucana de sementes de *H. courbaril* e *T. indica*.

Tabela 1 – Composição química e rotação óptica específica das galactoxiloglucanas.

Amostras	% (m/m)			[α] _d ²⁰
	Carboidratos ^a	Proteínas ^b	Umidade ^c	
HC-I	84,8	2,9	10,8	+80,1
HC-II	86,0	2,9	7,3	+77,8
HC-III	85,2	2,2	9,2	+75,5
HC-IV	87,8	2,4	7,0	+97,8
HC-V	90,1	2,6	8,9	+78,4
TM	83,9	3,0	10,5	+80,0

^a – Método de DUBOIS et al. (1956);

^b – Método de HARTREE (1972);

^c – Método termogravimétrico.

Na Tabela 1 tem-se as amostras de galactoxiloglucanas obtidas de sementes de *H. courbaril* que foram colhidas na reserva de Foz do Chopin/PR (HC-I), Cuiabá (HC-II) e Sinop/MT (HC-III), Natal/RN (HC-IV), Fortaleza/CE (HC-V) e *T. indica* (TM) de Conceição do Almeida/BA. É possível verificar na Tabela 1 que os conteúdos de proteínas e carboidratos entre as amostras não apresentam diferenças significativas. Uma das maiores diferenças apresentadas nesta tabela é o alto valor de rotação óptica para a amostra HC-IV. Desta forma, essa análise mostrou que a galactoxiloglucana obtida de sementes provenientes de Natal apresenta uma maior exposição das suas ligações α , o que poderia explicar o aumento do valor da rotação óptica específica indicando, possivelmente, conformação molecular diferente das demais galactoxiloglucanas em estudo. Estudos complementares serão avaliados por HPSEC-MALLS.

A composição monossacarídica das amostras de galactoxiloglucanas e amidos foi realizada após hidrólise ácida, redução e acetilação, e posterior análise por cromatografia líquido gasosa. Na Tabela 2 está indicada a composição monossacarídica para as amostras de galactoxiloglucana, representados como a média de triplicatas de amostras independentes.

Tabela 2 – Composição monossacarídica das galactoxiloglucanas

Amostras	Monossacarídeos (mol%)*					
	Glc	Xyl	Gal	Man	Ara	Fuc
HC-I	43,0	36,3	16,0	-	4,8	-
HC-II	39,0	42,0	16,8	-	2,3	-
HC-III	44,1	38,6	16,1	-	1,2	-
HC-IV	49,0	32,0	14,0	2,1	1,3	1,3
HC-V	45,0	37,3	16,2	-	1,5	-
TM	38,0	35,5	22,0	-	4,7	-

* por CG, coluna DB-225 a 220°C.

Analisando a Tabela 2 é possível observar a presença de manose e fucose na amostra **HC-IV**, obtida de sementes de Natal. Esta amostra apresenta, aparentemente, um perfil de eluição homogêneo por HPSEC-MALLS (Figura 28D, página 80). Porém, em volume de eluição próximo ao volume total do sistema de quatro colunas, utilizadas em série, ou seja entre 38-40 mL, pôde ser observado uma pequena quantidade de material detectada por IR. Tal composto não foi determinado por LS devido à sua baixa massa molecular e baixa concentração no sistema, menos que 5% do total de massa determinado pelo IR. Estes açúcares podem então ser de um contaminante com baixa massa molecular, proveniente da casca, por exemplo. A amostra **HC-I** mostra um alto teor de arabinose, quanto comparado as outras galactoxiloglucanas obtidas de jatobá e um teor comparável ao de arabinose da amostra de tamarindo (**TM**).

Afim de melhor compreender a possível diferença estrutural entre as galactoxiloglucanas, foi realizada a análise da composição dos oligossacarídeos por tratamento enzimático das biomoléculas com celulase/endoglucanase (Megazyme-Austrália), de acordo com BUCKERIDGE et al. (1997) e TINÉ (2002). A identificação dos oligossacarídeos foi realizada por comparação aos resultados obtidos por TINE (2002), que obteve os oligossacarídeos da série nova após fracionamento em Biogel P-4, sendo posteriormente analisados em termos de composição monossacarídica, metilação e análise por espectrometria de massa (electrospray), onde o oligossacarídeo XXXXG apresentou relação massa/carga

(m/z) de 1379, os oligossacarídeos XLXXG/XXLXG/XXXLG (m/z= 1541), que posteriormente foram caracterizados pelo segundo padrão de fragmentação. O oligossacarídeo XLXXG foi identificado após hidrólise enzimática com β -galactosidase obtida de cotilédones de *Copaifera langsdorffii*, uma vez que essa enzima hidrolisa apenas a galactose mais terminal (XL---). O perfil dos oligossacarídeos da série antiga foram comparados aos obtidos da galactoxiloglucana de tamarindo e copaífera, previamente isolados e caracterizados por espectrometria de massa.

Na Figura 10 está representado apenas o perfil de eluição da amostra **HC-I** uma vez que para as demais amostras de jatobá os perfis obtidos foram praticamente idênticos, havendo apenas variação nas proporções dos oligossacarídeos. A proporção relativa dos oligossacarídeos para todas as amostras após digestão com endoglucanase “celulase”, estão resumidas na Tabela 3.

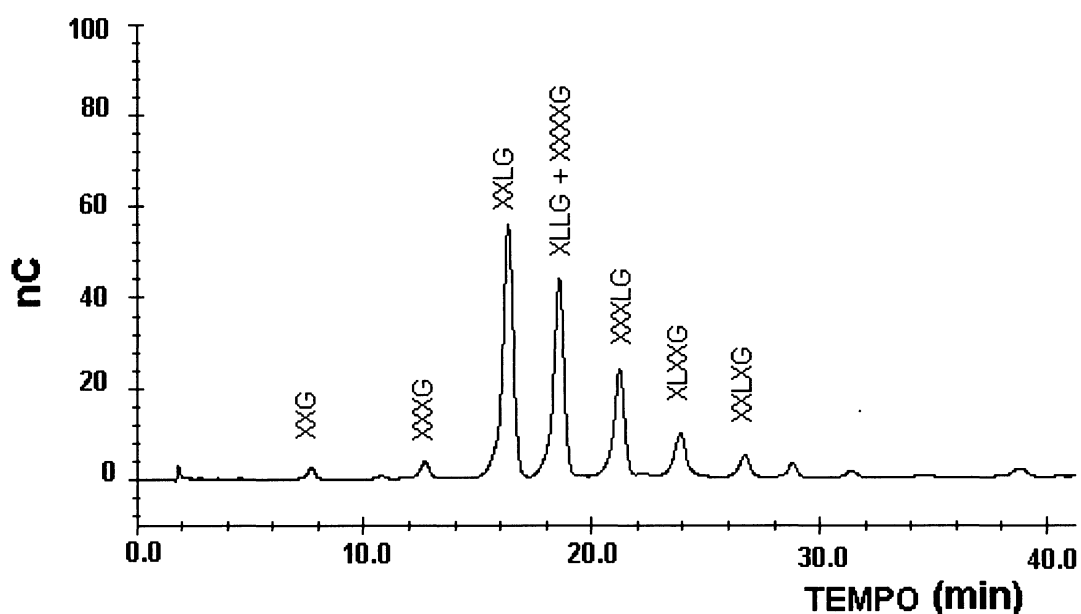


Figura 10 – Perfil de eluição dos oligossacarídeos limites obtidos por digestão com celulase da amostra de galactoxiloglucana obtida de sementes colhidas na reserva de Foz Chopim (**HC-I**).

Tabela 3 – Proporção relativa dos oligossacarídeos componentes da galactoxiloglucanas de sementes de jatobá e tamarindo.

Oligossacarídeos*	Amostras					
	HC-I	HC-II	HC-III	HC-IV	HC-V	TM ^a
XXG	1,4	1,2	1,5	0,6	1,1	Traços
XXXG	2,1	2,6	1,9	2,3	2,4	24,4
XLXG	Traços	Traços	Traços	Traços	Traços	8,0
XXLG	38,5	41,5	42,7	44,3	41,9	36,0
XLLG+XXXXG	30,5	30,3	25,8	27,6	29,6	-
XLLG	-	-	-	-	-	31,6
XXXLG	16,7	14,5	14,5	15,5	14,5	-
XLXXG	7,7	7,5	7,4	7,3	8,4	-
XXLXG	3,2	2,3	3,2	2,3	2,2	-

* Obtidos por hidrólise enzimática com celulase-endoglucanase e análise por HPLC/DIONEX – detecção amperométrica.

^a Dados referentes a TINÉ (2003).

Quando comparados, os resultados obtidos para as amostras de galactoxiloglucana de *H. courbaril*, não apresentam grandes diferenças em termos do conteúdo de oligossacarídeos. Porém, algumas das pequenas diferenças apresentadas podem ocasionar alterações na estrutura fina, conformação e comportamento em solução. Os oligossacarídeos identificados como XXG, XXXG, XXLG, XLLG, correspondem aos chamados de série velha, devido à sua presença em galactoxiloglucana de tamarindo. A série nova, aparentemente exclusiva de sementes de jatobá, como observado na Tabela 3, foi descrita por BUCKERIDGE et al. (1997) e TINÉ (2002), e refere-se aos oligossacarídeos da série 5, a saber XXXXG, XXXLG, XLXXG e XXLXG. Observou-se, na Tabela 3, uma variação de 7 a 13% no conteúdo do octassacarídeo XXLG para as amostras de jatobá em relação ao de tamarindo. Uma outra diferença foi a redução de ~50% do pentassacarídeo XXG na amostra **HC-IV** em relação as demais amostras de *Hymenaea courbaril*. As pequenas diferenças apresentadas na composição dos oligossacarídeos podem alterar o comportamento hidrodinâmico das macromoléculas em solução, em especial para a amostra **HC-IV** que,

apresenta menos pontos de flexibilidade na cadeia polissacarídica, devido ao reduzido teor do pentassacarídeo XXG. Uma outra observação importante foi a ausência da série nova de oligossacarídeos em tamarindo e o conteúdo em percentagem dos oligossacarídeos, o que, também, pode gerar uma grande diferença no comportamento físico-químico desses polímeros em solução quando comparados ao do jatobá. Em princípios teóricos, observando-se a composição dos oligossacarídeos, a molécula de tamarindo deveria apresentar uma rigidez molecular inferior a de jatobá.

Afim de melhor compreender as diferenças estruturais das galactoxiloglucanas em estudo, foram realizadas análises por metilação. A análise dos acetato de alditóis parcialmente metilados por cromatografia gasosa acoplada a detecção por espectrometria de massas, está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Acetato de alditóis parcialmente metilados derivados das galactoxiloglucanas extraídas de sementes de *H. courbaril* e *Tamarindus indica*.

O-metil alditol*	Amostras					
	(mol%)					
	HC-I	HC-II	HC-III	HC-IV	HC-V	TM
2,3,4 tri-O-metil xilitol	30	34	21	27	40	25
2,3,4,6 tetra-O-metil galactitol	15	10	13	8	6	10
3,4 di-O-metil xilitol	17	12	16	15	11	20
2,3,4 tri-O-metil glucitol	19	5	11	12	6	21
2,3,6 tri-O-metil glucitol	5	10	14	13	10	6
2,3 di-O-metil glucitol	14	29	25	25	30	18

*Obtido pelo método de CIUCANU e KEREK (1984). Analisado em CG-MS, coluna DB 225, temperatura de 180°C.

Principalmente para as amostra **HC-I** e **TM** não foram identificadas porcentagens de derivados parcialmente metilados quantitativos, quando comparados à relação de carboidratos obtida pelo acetato de alditol (Tabela 2, pagina 54). Porém pode ser confirmada a presença das principais ligações glicosídicas das galactoxiloglucanas em estudo. O derivado 2,3,4 tri-O-metil xilitol indica a presença de unidades de xilose não substituídas, ligadas apenas pelo

seu C-1. O 2,3,4,6 tetra-*O*-metil galactitol indica a presença de unidades terminais não redutoras de galactose. O derivado 3,4 di-*O*-metil xilitol indica a presença de xilose substituída em C-2. Utilizando como modelo a estrutura clássica proposta para galactoxiloglucanas, provavelmente, estas unidades de xilose apresentam-se substituídas por unidades de galactose (2,3,4,6-tetra-*O*-metil galactitol). O 2,3,6 tri-*O*-metil glucitol indica unidades de glucose não substituídas ou seja com seu C-6 livre, o 2,3,4 tri-*O*-metil glucitol refere-se as unidades de glucose terminais substituídas em seu C-6 e o 2,3 di-*O*-metil glucitol, referente as unidades de glucose substituídas em seu C-6, possivelmente por unidades de xilose (2,3 e/ou 3,4 di-*O*-metil xilitol). Exceto para amostra **HC-I**, em todas as demais amostras de jatobá foi observado a presença dos fragmentos 117 e 118, referentes aos derivados parcialmente metilados 3,4 e 2,3 Me₂-pentitol, indicando, possivelmente galactose ligada no carbono 4 ao invés do carbono 2 da xilose (SOUZA-LIMA, 1997 e MARTIN, 2003).

Os valores encontrados para as amostras de galactoxiloglucana em estudo foram similares, mas não idênticos, aos encontrados por SOUZA-LIMA (1997) e MARTIN (1999, 2003), o que poderia indicar diferenças em sua estrutura química fina.

4.1.3. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA GALACTOXILOGLUCANA (HC-I)

A oxidação química seletiva em CH₂OH-6 das cadeias polissacarídicas, transformando esse álcool primário em ácido carboxílico (CO₂H), pode gerar derivados que auxiliem na elucidação estrutural do polímero nativo, através da geração de novos deslocamentos químicos, devido a alterações da polaridade molecular, permitindo a observação de sinais anteriormente sobrepostos. Durante a modificação química com o reativo TEMPO (2,2,6,6 – tetrametilpiperidina-1-oxil) são gerados derivados aldeídicos que podem ser condensados com grupos amino-alquílicos, afim de gerar moléculas anfifílicas com atividade tensoativa, conforme observado por SIERAKOWSKI et al. (2000). Pode-se utilizar também a modificação química para compreender o mecanismo de interação entre moléculas modelo, como exemplo galactoxiloglucanas e

amidos. Esse derivado deve possuir como um pré-requisito parcial, propriedades hidrodinâmicas semelhantes à do polissacarídeo nativo, como massa molecular e conformação, para poder observar a diferença da polaridade molecular sobre a interação com o amido (PRABHANJAN e ALI, 1995)

Para obter a galactoxiloglucana modificada (**HC-IOX**), utilizou-se a metodologia de oxidação com reativo TEMPO, onde para o polissacarídeo em estudo os pontos de oxidação pelo reativo TEMPO podem ser encontrados no C-6 da galactose e, também, no C-6 da glucose da cadeia celulósica não substituída (Figura 19) chamada unidade de glucose D. Foram utilizadas apenas as unidades de galactose para calcular as porcentagens teóricas de oxidação. Nesses experimentos foi utilizada a amostra **HC-I**, que apresenta relação molar Gal: Xyl: Glc de ~1:1,2:2,4 e 9,8 mol% de unidades de arabinose. Desta forma, para obter 3, 6 e 12% de galactose oxidada no polímero, seriam necessários 0,166 mmol, 0,333 mmol e 0,666 mmol de álcool primário livre, respectivamente.

O TEMPO (radical estável, Figura 11a) pode ser oxidado por vários agentes para gerar o íon nitrosônio, Figura 11b. Este é um oxidante forte e mostra seletividade em oxidar funções hidroxilas primárias em relação às secundárias. Obviamente há uma reação de competição, devido à oxidação indesejada de grupos alcoólicos secundários pelo hipoclorito e hipobromito, ocorrendo preferencialmente em $\text{pH} < 9$. Utilizando valores mais altos de pH (9,2 – 9,5) e baixa temperatura a seletividade é maior que 95% (de NOOY, BESEMER e BEKKUM, 1994 e 1995).

A representação esquemática do processo oxidativo é mostrada na Figura 11.

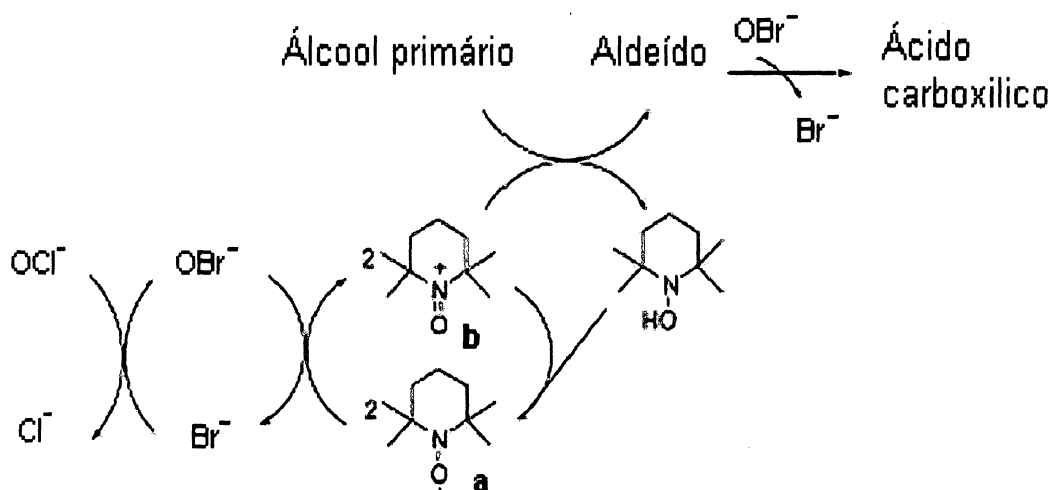


Figura 11 – Representação esquemática do processo de oxidação mediado por TEMPO. (a) radical TEMPO e (b) íon nitrosônio.

Durante o processo de oxidação, o tempo de reação e o volume de NaOH adicionados, foram usados para controlar o processo de derivatização. A adição de NaOH também foi utilizada para manter o pH do meio reacional em ~9,5 que é, também, mais seletivo para oxidação de álcoois primários. Na Figura 12 tem-se a curva do processo titulométrico em função do tempo de reação.

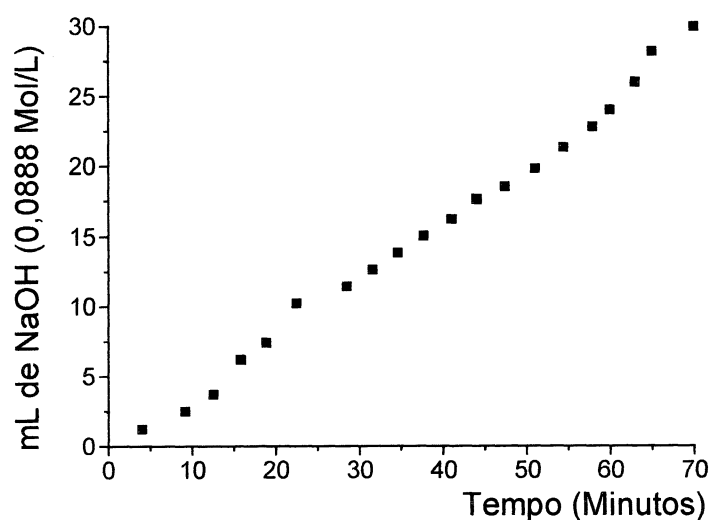


Figura 12 – Volume da solução de NaOH (0,0888 mol.L⁻¹) em função do tempo durante o processo de oxidação da galactoxiloglucana HC-I.

Assim, nos volumes de 7, 14 e 28 mL da solução $0,0888 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH adicionados durante o processo oxidativo, pode-se obter razões teóricas de oxidação de aproximadamente 3, 6 e 12 %, respectivamente.

O grau real de oxidação foi confirmado por método colorimétrico para quantificação de ácidos urônicos, utilizando a amostra de galactoxiloglucana nativa como controle negativo. Os teores de oxidação para as amostras derivatizadas estão apresentados na Tabela 5. A mesma abordagem de quantificação dos grupos urônicos por BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973) foi utilizada por de NOOY, BESEMER e BEKKUM (1994, 1995) e de NOOY et al. (1996).

As denominações dadas aos produtos oxidados na Tabela 5 correspondem aproximadamente à % de oxidação.

Tabela 5 – Determinação da porcentagem (m/m) de oxidação das amostras HCIOX's

Amostras	% (m/m)^a
HC-IOX3	<i>2,8</i>
HC-IOX5	<i>5,4</i>
HC-IOX10	<i>9,5</i>

a- Método colorimétrico para ácidos urônicos (BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN, 1973).

A presença de ácidos urônicos também foi qualitativamente confirmada por espectroscopia de infravermelho, onde foi observada uma banda em 1750 cm^{-1} , correspondente ao estiramento vibracional de grupos carbonila (C=O) de ácidos carboxílicos (Figura 13).

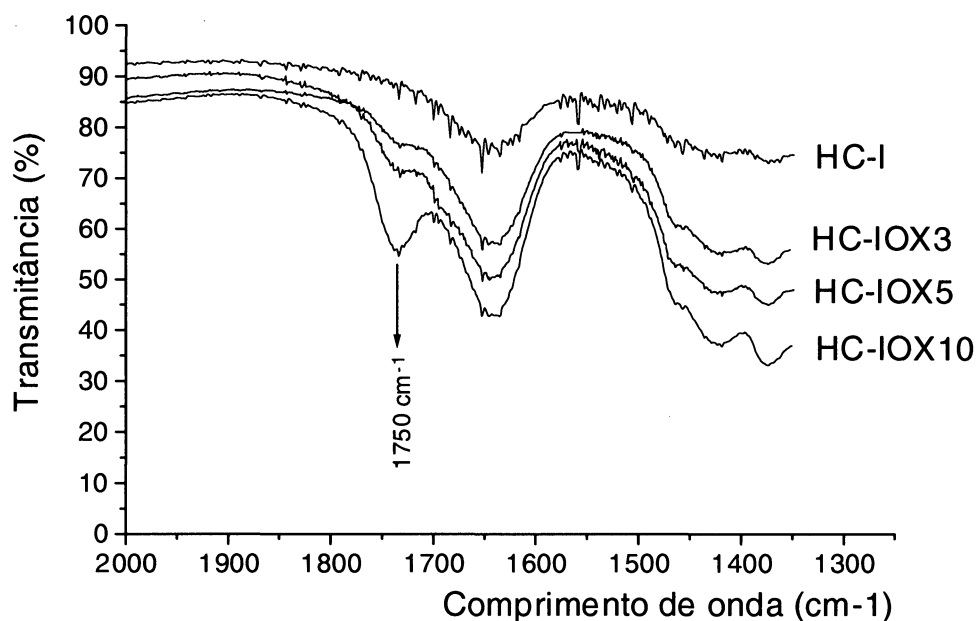


Figura 13 - Espectro de FTIR para as amostras de galactoxilogucana **HC-I**, **HC-IOX3**, **HC-IOX5** e **HC-IOX10**.

Como citado acima, as análises de CG-MS dos acetato de alditóis mostraram em termos de porcentagem, uma relação molar de Glc:Xyl:Gal:Ara de 51:27:21:1. Para o polissacarídeo oxidado em 9,5% das suas unidades de galactose, o processo de hidrólise sob condições idênticas ao do polímero nativo, mostrou valores de 58:31:10:1. O teor de glucose e xilose, aumentou em ~ 6%, mas o nível de galactose reduziu em 11,6%, indicando que o processo de oxidação ocorreu, principalmente, nessa unidade, devido à formação de ácido galacturônico.

No item 4.1.4 pode-se observar os espectros de ^{13}C RMN das amostras **HC-IOX3** e **HC-IOX10**, que confirmam a oxidação preferencial em C-6 da galactose pela redução do δ referente ao C-6 livre da galactose.

Afim de observar as alterações físicas ocorridas na cadeia polissacarídica, após o processo oxidativo, foram avaliados a massa molar, o R_g , o grau de polidispersão e a conformação da cadeia da galactoxilogucana, nativa e modificada. Primeiramente, foram calculados os valores de dn/dc para as

amostras, **HC-I** e **HC-IOXs** onde os valores obtidos experimentalmente foram de 0,113 e 0,130, respectivamente.

O perfil de eluição dos polímeros oxidados por HPSEC-MALLS/IR (Figura 14-1) mostra que a conversão do polímero nativo para a forma oxidada foi praticamente completa, uma vez que pelo índice de refração (IR) foi observado um mesmo perfil de eluição. O espalhamento de luz detectou, para as amostras oxidadas, dois sistemas poliméricos. Primeiramente, uma molécula com alta massa molar, com o mesmo tempo de eluição que o polímero nativo (35-45 min – pico A), porém em uma concentração que não pôde ser detectada pelo índice de refração (IR); e um novo pico, em tempo de eluição maior ao do polímero nativo (38,5 – 56 min – pico B), que apresentou-se homogêneo por IR (Figura 14-2).

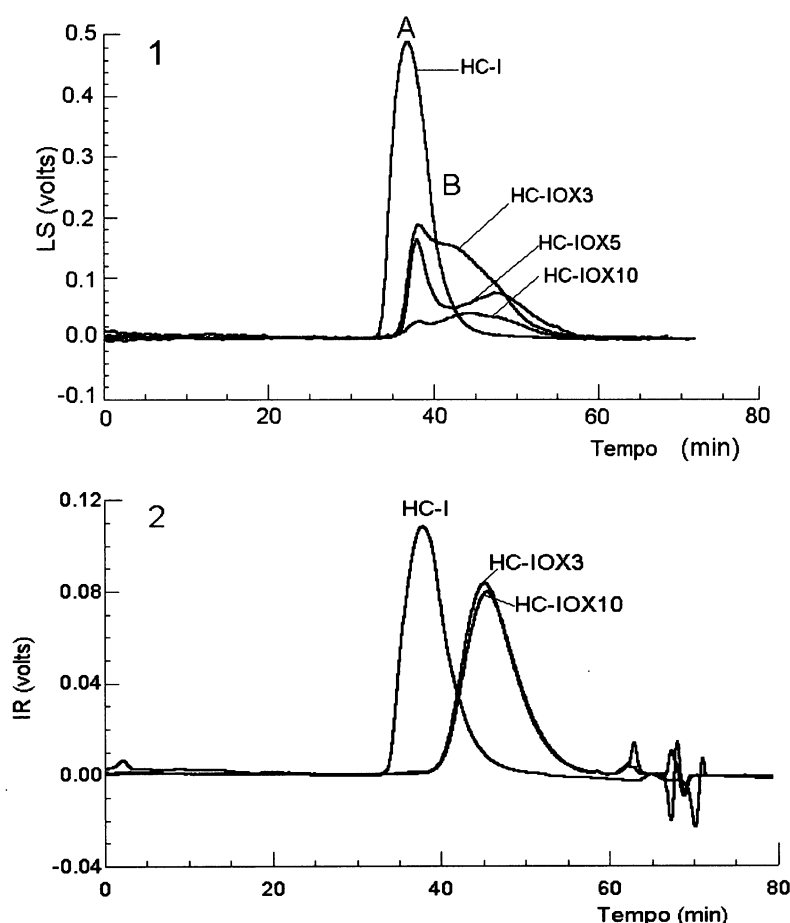


Figura 14 – 1 - Perfil de eluição por HPSEC - espalhamento de luz (LS) (90°) para **HC-I**, **HC-IOX3**, **HC-IOX5** e **HC-IOX10**. A – Nativo e B – Polissacarídeos oxidados. 2 - Perfil de eluição por HPSEC-IR.

Na Figura 14 pode-se observar que a amostra **HC-IOX10** (maior teor de oxidação) apresenta a menor proporção do pico A, quando comparada, por exemplo, com a amostra **HC-IOX3**. Ao se observar o perfil de eluição por IR (Figura 14-2), o pico A não é mais detectado nas amostras oxidadas, obtendo-se apenas o pico B, que apresenta um perfil homogêneo de distribuição da massa, porém com alto grau de polidispersão (M_w/M_n) de 1,4 no polímero nativo para 3,0 nos polímeros oxidados. Os valores de M_w obtidos foram de $1,4 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^5$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectivamente, para a amostra **HC-I** e **HC-IOXs**. Ou seja, o processo de oxidação reduziu a massa molecular em 10X. Isto pode significar que a oxidação degradou a cadeia polissacarídica ou que apenas ocorreu a desagregação completa da cadeia da galactoxiloglucana.

Outra observação importante foi obtida através do gráfico que relaciona os valores de R_g em função da massa molar (Figura 15), fornecendo informações sobre a conformação em solução das macromoléculas.

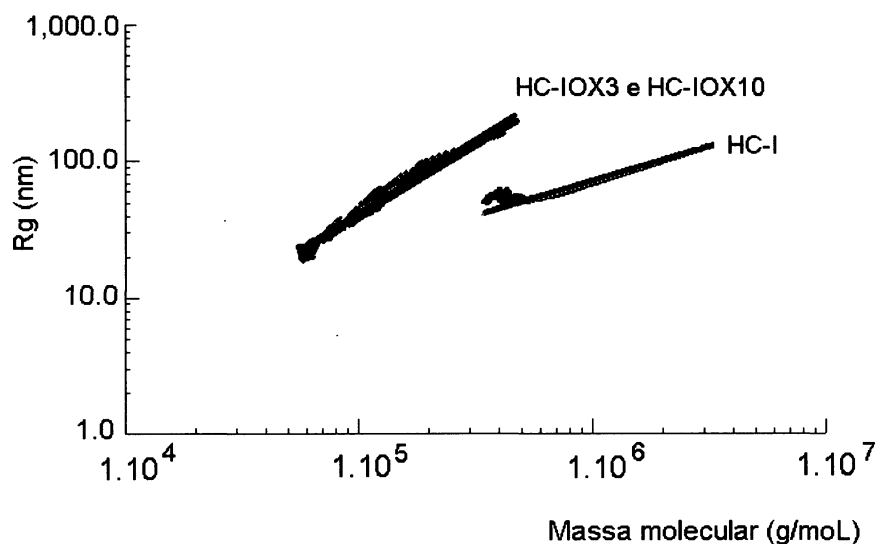


Figura 15 – R_g como uma função da massa molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) para a amostra **HC-I** e para os derivados oxidados da **HC-IOX3** e **HC-IOX10**.

A Figura 15 mostra que o polímero nativo passa de uma conformação ao acaso ou “random coil”, cujo ângulo de inclinação nesse gráfico foi de 0,5, para após a oxidação para uma molécula com estrutura em bastão, com ângulo de inclinação ~1,0 (WYATT, 1993). Essa estrutura é atribuída a um pequeno aumento de massa molecular proporcionar um grande aumento no raio de giro (R_g), provavelmente gerado pela repulsão eletrostática das cargas do polieletrólito, gerando uma expansão do volume molecular e aumento da sua rigidez.

Afim de melhor caracterizar os polieletrólitos em estudo, realizaram-se análises termogravimétricas comparativas do polímero nativo e dos modificados. As análises termogravimétricas são utilizadas para identificar polímeros em estado sólido, conforme publicado por STIVALA, JUNICHI E REICH (1981); VARMA e CHAVAN (1995) e VARMA et al. (1997). VARMA et al. (1997), por exemplo, utilizaram estas análises para caracterizar galactomananas com diferentes graus de oxidação. Os dados referentes aos ensaios de análises termogravimétricas estão apresentados no item 4.1.8.

4.1.4. ANÁLISE por ^{13}C -RMN DE HC-I E HC-IOX

Para melhor compreender as alterações estruturais causadas pelo processo oxidativo em C-6 na cadeia da galactoxiloglucana foram realizados espectros de ^{13}C RMN para as amostras **HC-I e HC-IOX3, 5 e 10**. As Figuras 16, 17 e 18 representam os espectros de ^{13}C para as amostra nativa, com 3 e 10% de oxidação, respectivamente.

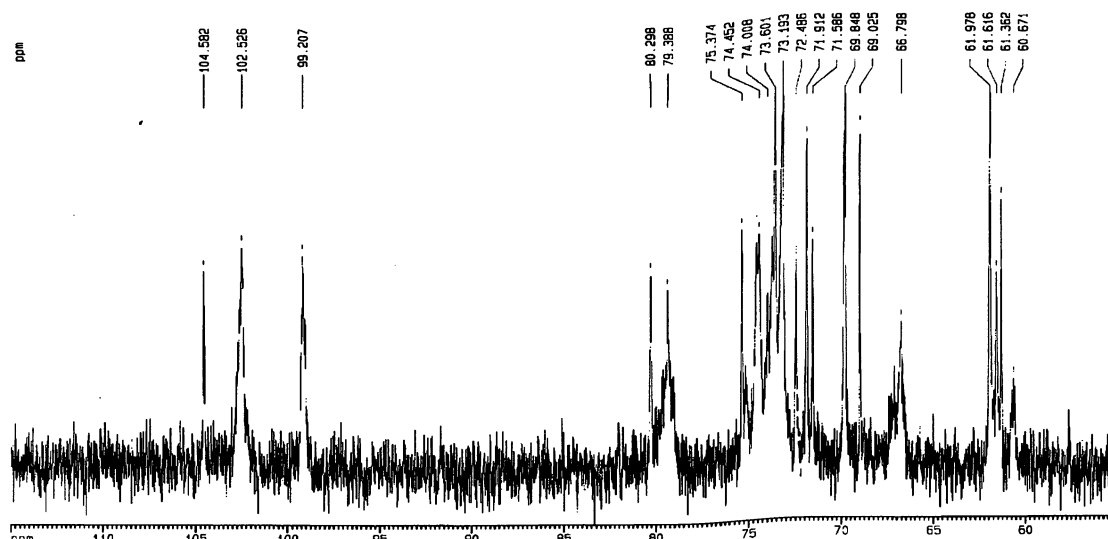


Figura 16 – Espectro de ^{13}C RMN, em D_2O , a 60°C , para a amostra de galactoxiloglucana **HC-I**. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

Na Figura 16 pode-se observar o espectro de ^{13}C RMN da amostra de galactoxiloglucana **HC-I**. Na região de C-1 observa-se os deslocamentos químicos em δ 104,6; 102,5 e 99,2 referentes às unidades de β -D-Galp, β -D-Glcp e α -D-Xylp, respectivamente. Na região em campo alto, pode-se observar em δ 60,7 o deslocamento referente ao C-6 livre de β -D-Galp. Em δ 66,8 pode-se observar sinal referente ao C-6 substituído de β -D-Glcp, e em 62,0 deslocamento referente ao C-6 livre das unidades de glucose não substituídas por xilose, sobreposto ao deslocamento do C-5 de unidades de xilose internas.

Foram observados deslocamentos químicos em δ 61,9; 61,6 e 61,4 referentes ao C-5 de unidades de α -D-Xylp, nas posições B, A, C, respectivamente, conforme indicado na Figura 19 que representa a estrutura esquemática do oligossacarídeo XLLG da galactoxiloglucana.

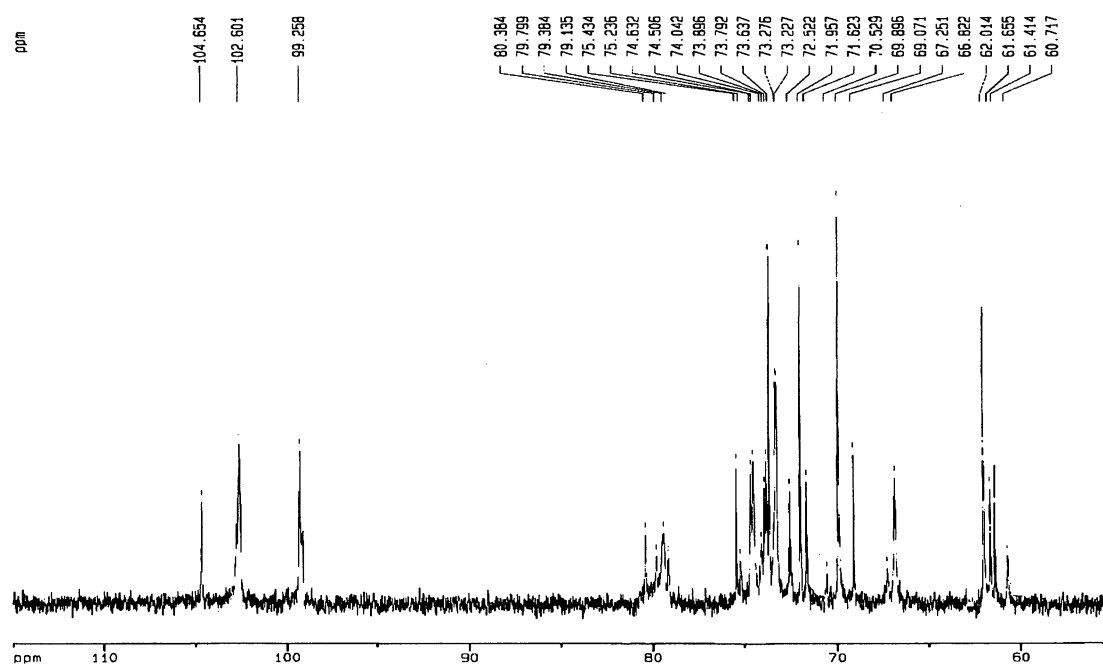


Figura 17 – Espectro de ^{13}C RMN, em D_2O , a 60°C , para a amostra **HC-IOX3**. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

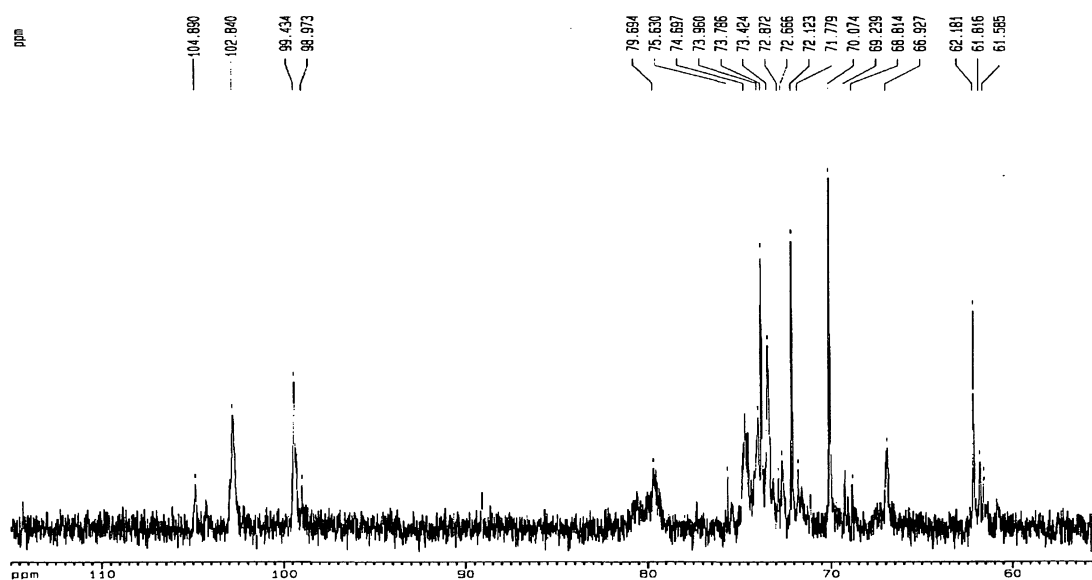


Figura 18 – Espectro de ^{13}C RMN, em D_2O , a 60°C , para a amostra **HC-IOX10**. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm.

Analisando as Figuras 17 e 18, pode-se observar a redução da intensidade relativa dos deslocamentos químicos atribuídos às unidades de galactose. Isto pode ser evidenciado na região de C-1, onde o deslocamento químico em 104,6 ppm, referente ao C-1 de β -D-Gal apresentou menor intensidade, quando comparado ao da amostra nativa (Figura 16, pagina 66). Pode-se observar, também, a redução do deslocamento químico em δ 60,7; referente ao C-6 livre de β -D-Gal. As reduções de intensidade, aparentemente, tanto no C-1 como no C-6 das unidades de β -D-Gal, foram maiores, onde havia maior grau de oxidação, ou em ordem **HC-IOX10** > **HC-IOX5** > **HC-IOX3**. Na Figura 17 pode-se observar que ocorre, também, a redução da intensidade do sinal em 102,8 ppm, referente ao C-1 de unidades de β -D-Glc ρ . Isto foi confirmado, realizando-se um outro espectro de RMN de ^{13}C , utilizando amostras independentes, onde foi observado que, realmente, a intensidade desse deslocamento se reduzia em relação ao C-1 das unidades de α -D-Xyl. Isso possivelmente indica que com o aumento da oxidação, reações de oxidação também ocorreram no C-6 livre da Glc ρ (Unidade D – Figura 19).

Pôde-se observar, também, na amostra **HC-IOX10** redução significativa da intensidade dos deslocamentos químicos em δ 61,9 e 61,4 ppm referentes ao C-5 nas posições internas de xilose, chamadas de unidades B e C (Figura 19), fato este devido à substituição destas por unidades de β -D-Galp transformadas em parte em unidades de ácido galacturônico.

Em δ 62 pode ser observado o deslocamento químico referente ao C-5 de xilose B e C-6 de β -D-Glc ρ não substituída em seu C-6 (Unidade D-Figura 19) para as amostras **HC-I** (Figura 16), **HC-IOX3** (Figura 17) e **HC-IOX10** (Figura 18). Este mesmo deslocamento também pode ser referente ao C-6 das unidades de galactose ligadas na posição 4 às unidades de xilose, conforme observado por MARTIN (2003). Observa-se que, relativamente, ocorreu uma menor intensidade desse sinal para o espectro da amostra **HC-IOX10** em relação a amostra **HC-IOX3** e **HC-I** (nativa). Isto mostra que a substituição no C-6 da glucose não substituída por xilose, ocorreu apenas quando houve maiores teores de oxidação.

Apesar da identificação de uma banda em 1750 cm^{-1} (Figura 13, página 62) referente ao grupo ácido por espectrofotometria de infravermelho, não foi possível detectar em campo baixo ($\sim 170\text{ ppm}$) o deslocamento químico referente ao C-6 ácido. Isto se deve, provavelmente, ao baixo teor de grupos ácidos no sistema, uma vez que variaram entre 2,8 e 9,5 g%, ou a questões operacionais de equipamento para se poder ter o aparecimento de grupamentos carboxila.

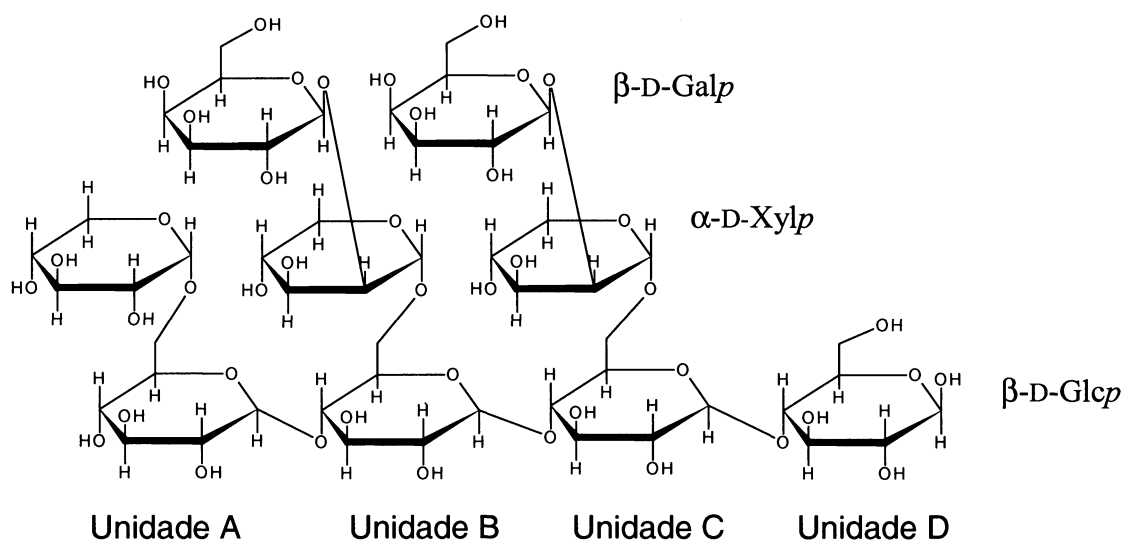


Figura 19 – Representação esquemática do nonassacarídeo (XLLG) da série antiga da galactoxiloglucana.

4.1.5. ANÁLISES REOLÓGICAS DAS GALACTOXILOGLUCANAS

Primeiramente, foi determinada a concentração crítica (c^*) para se poder analisar as macromoléculas em solução diluída. Em outras palavras, saber o intervalo de concentração onde a influência da interação polímero-polímero no sistema pode ser negligenciada.

A dependência da viscosidade pela concentração foi determinada em dois sistemas diferentes, o semi-diluído e o diluído. No semi-diluído a dependência foi de $c^{1,56}$ e no sistema diluído de $c^{1,1}$. WANG et al. (1997) observou que a galactoxiloglucana de *Detarium* apresenta dois sistemas bem definidos, onde para o regime diluído a η_{sp} é proporcional a $c^{1,3}$. Através do gráfico que

relaciona o $\text{Log}\eta_{\text{sp}}$ como uma função do parâmetro de recobrimento $c[\eta]$, foi possível determinar a concentração crítica por reologia. Os valores de c^* também foram obtidos através do M_w e R_{gw} , pelo uso da equação (equação 29, página 40). Os resultados estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração crítica (c^* g.L⁻¹) para as amostras de galactoxiloglucanas

Amostras	Metodologia	
	Calculado a partir da M_w e R_w^*	Viscosimetria**
HC-I	0,9	0,7
HC-II	0,6	0,7
HC-III	0,9	1,3
HC-IV	1,1	1,3
HC-V	0,8	0,8
TM	0,9	1,0

*HPSEC-MALLS/IR e ** Reômetro Brookfield, LVDVIII, cone-placa, spindle CP40.

Segundo a Tabela 6, foi possível observar uma boa correlação entre os dados obtidos pela metodologia clássica reológica-viscosimétrica e os valores preditos pela equação 31 através dos dados obtidos por HPSEC-MALLS/IR.

Uma vez tendo-se determinada a c^* , fez-se a determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ para as amostras de galactoxiloglucanas, utilizando-se também a metodologia de determinação viscosimétrica e por HPSEC-MALLS/RI. Nesses experimentos utilizaram-se concentrações até valores inferiores ao da c^* , e avaliou-se duas situações: a primeira com as amostras solubilizadas por 16 horas (Tabela 7), e a segunda para as amostras que após 16 horas de solubilização, foram aquecidas a 85°C por 2h e resfriadas à temperatura ambiente e posteriormente utilizadas para análises de viscosidade (Tabela 8). Na Figura 20 têm-se a representação gráfica da determinação da viscosidade intrínseca para a amostra **HC-I**.

Quando uma molécula entra em movimento, em um fluxo laminar, devido à uma velocidade de cisalhamento aplicada, os diferentes segmentos da

molécula movem-se com velocidades diferentes. Isto se deve ao gradiente de velocidade causado pelo fluxo. Essa influência do gradiente de velocidade, com fluxos mais rápidos e mais lentos causam a rotação da cadeia polimérica. Os movimentos rotacionais e translacionais das cadeias moleculares causam atrito entre a molécula e o solvente do sistema em estudo, e isto provoca o aumento da viscosidade do solvente. A viscosidade intrínseca $[\eta]$, que se refere à viscosidade em concentração infinitamente diluída, tendendo a concentração nula, refere-se ao movimento rotacional e translacional de apenas uma única molécula no sistema.

Pode-se observar na Figura 20 que a viscosidade intrínseca determinada por viscosimetria para a amostra **HC-I** diminui com o aquecimento pois o valor de $[\eta]$ foi de $750 \pm 30 \text{ mL.g}^{-1}$ antes do aquecimento e após o aquecimento passou para $590 \pm 15 \text{ mL.g}^{-1}$. Uma outra observação importante é a redução do coeficiente angular da reta com o aquecimento. Isso indica, conseqüentemente, uma redução da constante de Huggins (k') do sistema, ou seja a constante de Huggins passa de 0,9 sem aquecimento para 0,7 após o aquecimento por 2 h a 85°C . Isto mostra que ocorreu uma diminuição da agregação molecular do sistema, uma vez que valores de constante de Huggins (k') superiores a 0,3-0,4 indicam uma qualidade reduzida do solvente, permitindo agregações moleculares (HUGGINS, 1942). WANG et al. (2001) observaram que os valores de constante de Huggins de soluções aquosas de galactoxiloglucanas de *Detarium* após autoclavação a 120°C por 15 minutos reduzem de 0,63 para 0,56, indicando redução da desagregação molecular.

O mesmo comportamento foi observado para todas as galactoxiloglucanas em estudo, ou seja, ocorreu uma redução da agregação molecular com o aquecimento, indicado pela redução da constante de Huggins e dos valores da $[\eta]$.

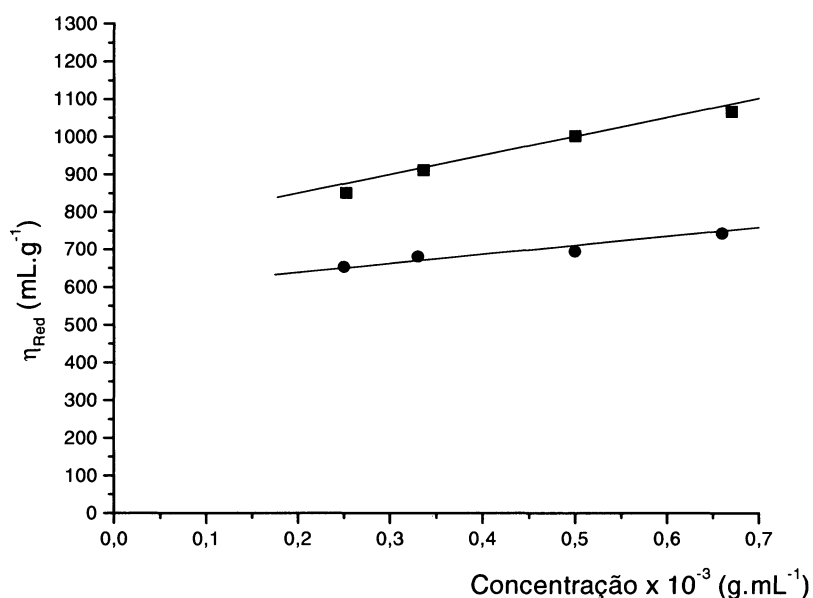


Figura 20 – Representação gráfica da determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ em mL.g⁻¹ para a amostra HC-I não aquecida (■) e aquecida a 85°C por duas horas (●).

Na Figura 21 é possível observar que o aquecimento a 120°C em autoclave por 60 minutos gerou uma diminuição da viscosidade intrínseca, que foi determinada como sendo de 622 ± 22 mL.g⁻¹, um valor que é superior ao determinado após o aquecimento a 85°C por 2 horas. Porém, utilizando apenas o processo de autoclavação para reduzir a agregação macromolecular, obteve-se o valor de 0,9 para a constante de Huggins (k') que é superior a 0,7 encontrado após o aquecimento a 85°C por duas horas sob agitação constante. Pelo processo após 24 horas de aquecimento a 85°C, sob agitação constante, também, não foi observada diminuição da viscosidade intrínseca, e também não foi observada diminuição da viscosidade intrínseca e da constante de Huggins.

WANG et al. (1996) observaram valores de viscosidade intrínseca para a galactoxiloglucana de *Detarium* de ~ 890 mL.g⁻¹, sendo superiores aos valores citados para xiloglucana de Tamarindo de 600 mL.g⁻¹. Nesse trabalho os autores citam a tendência das galactoxiloglucanas em formar agregados moleculares, o que poderia causar um aumento da rigidez do polímero, mas gera menores influências sobre a viscosidade intrínseca. PICOUT et al. (2003) observou redução da viscosidade intrínseca das galactoxiloglucanas de tamarindo

e *Detarium* após diferentes tratamentos por aquecimento e/ou pressão, indicando redução da desagregação.

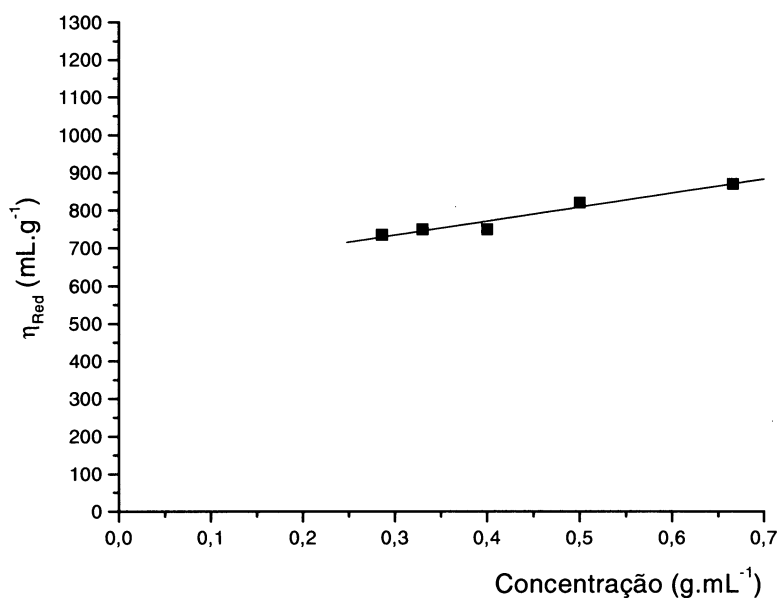


Figura 21 – Representação gráfica da determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ em mL.g⁻¹ para a amostra **HC-I** aquecida a 120°C por 60 minutos.

Dessa forma, o aquecimento das soluções polissacarídicas à 85°C por 2 horas, foi avaliado como o melhor tratamento para a desagregação macromolecular.

4.1. 6. ANÁLISES POR HPSEC-MALLS

4.1.6.1. Efeito do aquecimento sobre o comportamento macromolecular

Na tabela 7 estão mostrados os valores de massa molecular ponderal média (M_w); massa molecular numérica média (M_n); grau de polidispersão (M_w/M_n); raio de giro ponderal médio (R_{gw}); raio de giro numérico médio (R_{gn}); viscosidade intrínseca ponderal média ($[\eta]_w$) determinada através da equação de 30 (pagina 41), utilizando os valores de M_w e R_{gw} ; viscosidade intrínseca numérica média ($[\eta]_n$) determinada pela equação 30, utilizando os valores e M_n e R_{gn} e a viscosidade intrínseca reológica ($[\eta]_{reologia}$). Esses dados foram obtidos para as amostras de galactoxiloglucanas após a solubilização em nitrito de sódio 0,1 mol.L-1 e 200 ppm de azida por 16 horas a 25°C.

Tabela 7 – Massa molar, polidispersão, raio de giro, e viscosidade intrínseca para as amostras de galactoxiloglucanas solubilizadas por 16 h a 25°C.

Amostras	M_w	M_n	M_w/M_n	R_{gw}	R_{gn}	$[\eta]_w$	$[\eta]_n$	$[\eta]_{reologia}$
HC-I	$1,5 \times 10^6$	$8,7 \times 10^5$	1,7	87,0	69,2	1780	1515	750
HC-II	$2,2 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	1,4	110,4	93,7	2626	2322	1054
HC-III	$1,05 \times 10^6$	$6,2 \times 10^5$	1,7	76,4	60,2	1329	1105	680
HC-IV	$1,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	1,6	88,8	69,5	1719	1320	710
HC-V	$8,5 \times 10^5$	$5,3 \times 10^6$	1,6	67,2	53,6	1346	1090	886
TM	$1,1 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$	1,5	68,6	55,4	1233	990	522

As discrepâncias observada entre os valores de $[\eta]_w$ e $[\eta]_{reologia}$, mostradas na Tabela 7, podem ser devidas à polidispersão e ao volume excluído que podem interferir no valor do raio de giro e aos efeitos de inchamento nas macromoléculas que afetam o parâmetro Φ (GIDLEY et al., 1991). Uma outra informação importante é a de que a agregação macromolecular gera uma menor influência na determinação da viscosidade intrínseca pela técnica reológica, quando comparada à interferência nos valores observados por HPSEC-MALLS (WANG et al., 2001). Desta forma, a redução da agregação tende, teoricamente,

a aproximar os valores de $[\eta]$ obtidos por HPSEC-MALLS e reologia, conforme pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Massa molar, polidispersão, raio de giro, e viscosidade intrínseca para as amostras de galactoxiloglucana após o aquecimento a 85°C por 2 h e posterior resfriamento a temperatura ambiente.

Amostras	M_w	M_n	M_w/M_n	R_{gw}	R_{gn}	$[\eta]_w$	$[\eta]_n$	$[\eta]_{reologia}$
HC-I	$8,7 \times 10^5$	$5,4 \times 10^5$	1,6	60,2	46,7	1001	747	590
HC-II	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	1,4	85,4	70,8	1143	947	994
HC-III	$8,0 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	1,7	60,9	44,1	877	573	605
HC-IV	$9,4 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	1,6	65,6	45,9	726	418	487
HC-V	$6,0 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	1,5	52,0	42,0	870	709	860
TM	$9,3 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	1,5	57,4	44,7	825	580	418

A agregação supramolecular de polissacarídeos solúveis em água em soluções aquosas é uma barreira crítica para a caracterização apurada das propriedades moleculares destes polímeros pela técnica de HPSEC-MALLS. Tentando minimizar essa agregação pode ser utilizado o tratamento através do aquecimento e/ou pressão, para dispersar completamente as moléculas poliméricas. O pré-requisito para este método é de que não ocorra despolimerização através da quebra de ligações covalentes devido ao aquecimento e pressão aplicadas (WANG et al., 2001). Assim, tentando-se estudar a agregação macromolecular das galactoxiloglucanas, foram avaliadas a massa molar, o R_g e a $[\eta]$, após um período de aquecimento a 85°C, por 2 horas sob constante agitação. O aquecimento a 85°C também foi mantido por 4, 6, 8 e 24 h, para as mesmas soluções sem alterar os parâmetros obtidos após somente 2 h.

As figuras 22-23 mostram o perfil por HPSEC/MALLS para as amostras de galactoxiloglucanas obtidas de sementes de jatobá e de tamarindo, onde pode-se observar o deslocamento no pico de eluição médio para volumes maiores, tanto por IR como por MALLS (90°), porém não sofre alteração do padrão de distribuição das massas moleculares menores nos sistemas em

estudo. Tal comportamento já havia previamente sido observado por WANG et al. (2001) ao estudarem as galactoxilolucanas de sementes de *Detarium*.

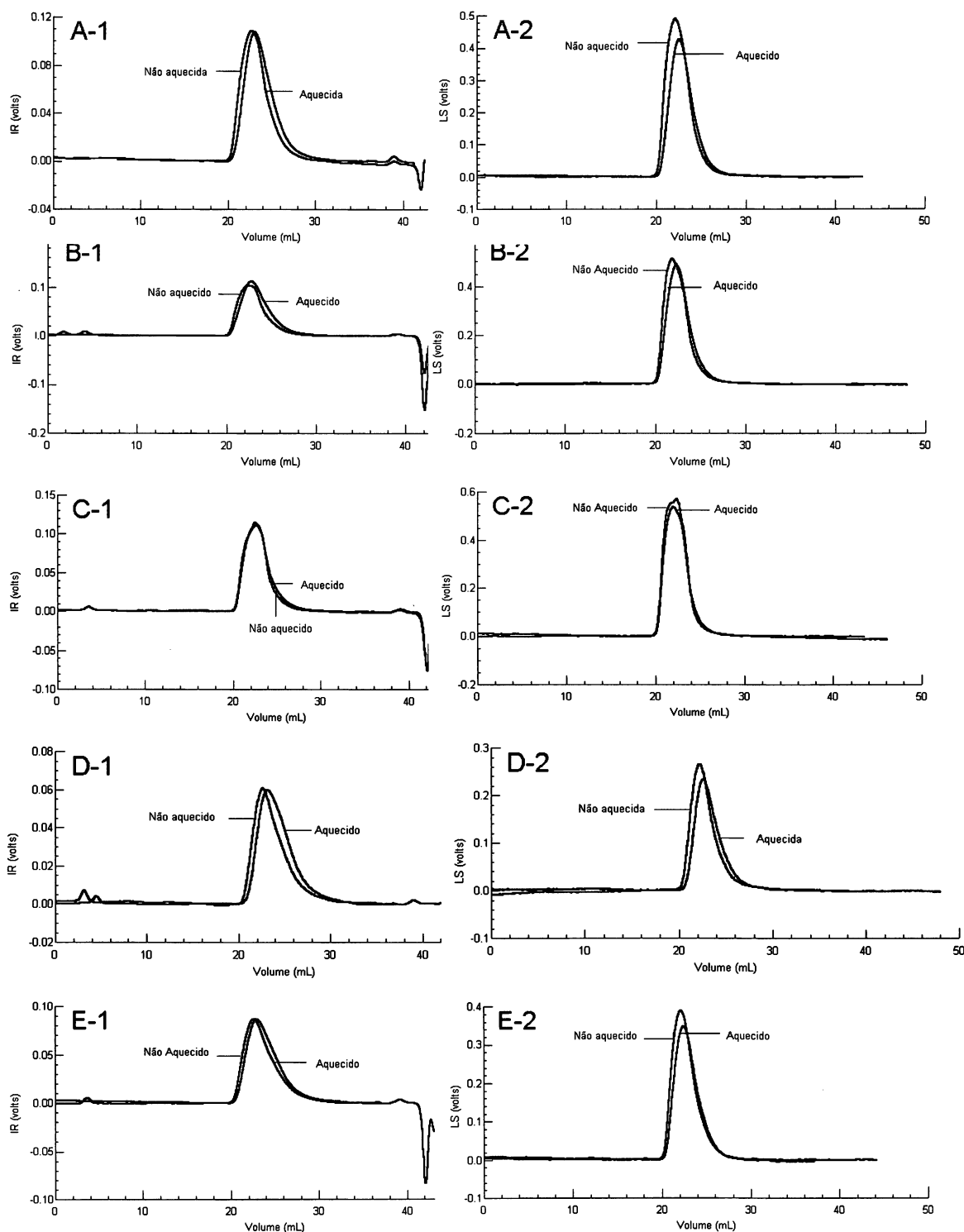


Figura 22 - Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/IR das galactoxiloglucanas obtidas de sementes de *H. courbaril*. **A) HC-I; B) HC-II; C) HC-III; D) HC-IV e E) HC-V.** 1) Perfil de eluição pelo índice de refração (IR) e 2) Perfil de eluição por espalhamento de luz (LS)

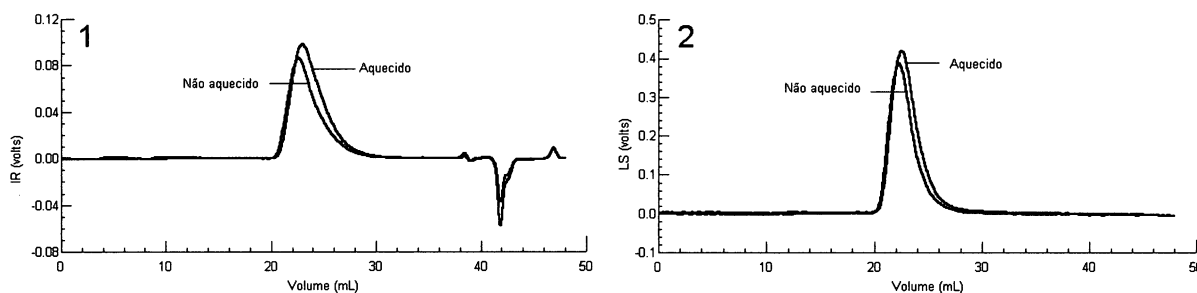


Figura 23 – Perfil de eluição por HPSEC-MALLS/IR da galactoxiloglucana obtida de sementes de *T. indica*. **1)** Perfil de eluição pelo índice de refração (IR) e **2)** Perfil de eluição por espalhamento de luz (LS).

Através desse comportamento observou-se que, após o aquecimento, ocorreu redução de massa molecular e raio de giro. Como exemplo, para a amostra **HC-I** (Figura 22A), pode-se observar uma redução de ~41% na massa molar e de ~31% no raio de giro, porém sem alterar a relação M_w/M_n .

Na análise conformacional, se a agregação de cadeias estiradas ou rígidas fosse considerada, então apenas um bastão molecular seria constituído, e o raio de giro não aumentaria com o aumento da massa molecular. Em outras palavras, ocorreria um aumento da massa molecular, porém sem ocorrer na mesma proporção um aumento do R_g , o que poderia indicar uma agregação em zonas centrais da molécula, em relação às cadeias laterais (ALONSO-MOUGÁN et al., 2003). Em nosso estudo foi observado que, concomitantemente, com a redução da massa ocorreu uma grande diminuição do raio de giro indicando, preferencialmente, agregações laterais. Um comportamento similar foi observado para as outras galactoxiloglucanas em estudo. A viscosidade intrínseca mostrou, também uma redução de no mínimo ~35 % para **HC-III** e **HC-IV**, e no máximo de ~56% como observado para as amostras **HC-II** e **HC-V**. Estes dados mostram que, com o aquecimento, aparentemente, ocorre um processo de desagregação das galactoxiloglucanas, e gerando estruturas com menores massas moleculares, R_g e $[\eta]$. Esses dados estão de acordo com os valores de agregação lateral apresentados por LANG e BURCHARD (1993), LANG e KAJIWARA (1993) para a galactoxiloglucana de semente de tamarindo e por WANG et al. (1997 e 2001) para a de sementes de *Detarium*.

4.1.6.2. Determinação da flexibilidade intrínseca da cadeia polimérica – Razão Característica (C_∞)

Utilizando o gráfico proposto ROGER, AXELOS e COLONA (2000) e os valores de M_w e R_{gw} para as galactoxiloglucanas solubilizadas em nitrato de sódio/azida a 25°C por 16 h, foi obtido através do coeficiente linear da reta da Figura 24 o valor de $5,15 \times 10^{-3} \pm 0,63 \times 10^{-3}$ que gerou os valores de C_∞ e do comprimento de persistência como sendo 41 e 11 nm, respectivamente. Porém, após o aquecimento a 85°C por 2 h e resfriamento a temperatura ambiente as amostras apresentaram um valor de C_∞ de 33, e comprimento de persistência de 8,4 nm.

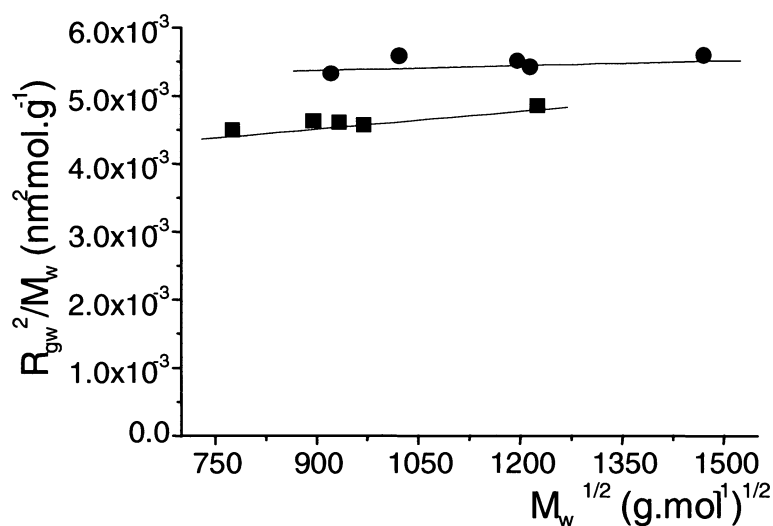


Figura 24 – Gráfico de Roger: R_{gw}^2/M_w como uma função da $M_w^{1/2}$ para as amostras de galactoxiloglucanas obtidas de sementes de *H. courbaril* solubilizadas a 25°C por 16 h (●), e solubilizadas a 25°C por 16 h e posteriormente aquecida a 85°C por 2 h e posterior resfriamento a temperatura ambiente (■).

Essa mesma metodologia foi utilizada para determinar a razão característica e o comprimento de persistência para cada uma das XG em estudo, isoladamente, utilizando as frações de massas moleculares e raios de giro para diferentes volumes de eluição.

A agregação nas amostras foi determinada comparando-se os valores de C_{∞} e do comprimento de persistência antes e após o aquecimento das soluções de galactoxiloglucanas a 85°C por 2 h. Se a agregação está presente, teoricamente esses valores devem ser maiores nas amostras não submetidas ao processo de desagregação, neste caso o aquecimento. Os resultados obtidos por esses métodos são sumarizados nas Tabelas 9 e 10, onde é possível observar uma redução nos valores de C_{∞} e L_p em no mínimo 34% para as amostras de *H. courbaril*, e 30% para a de tamarindo. A diminuição da C_{∞} após o aquecimento, indica dissociação molecular e esta desagregação pode fornecer as reais características macromoleculares (WANG et al., 2001).

Tabela 9 – Razão característica (C_{∞}) e comprimento de persistência (L_p)

Amostras	Razão Característica (C_{∞})	Comprimento de Persistência (L_p) nm
HC-I	$33,5 \pm 0,9$	$8,9 \pm 0,3$
HC-II	$41,2 \pm 0,8$	$10,9 \pm 0,2$
HC-III	$37,5 \pm 1,0$	$10,1 \pm 0,2$
HC-IV	$54,4 \pm 4,4$	$14,5 \pm 1,0$
HC-V	$31,1 \pm 3,2$	$8,4 \pm 0,8$
TM	$21,8 \pm 1,1$	$6,2 \pm 0,2$

Tabela 10 – Razão característica (C_{∞}) e comprimento de persistência (L_p) para soluções aquecidas a 85°C por 2 h e posterior resfriamento a temperatura ambiente.

Amostras	Razão Característica (C_{∞})	Comprimento de Persistência (L_p) nm
HC-I	$23,2 \pm 1,4$	$6,5 \pm 0,3$
HC-II	$27,2 \pm 1,3$	$7,5 \pm 0,2$
HC-III	$25,5 \pm 3,8$	$7,1 \pm 0,2$
HC-IV	$43,2 \pm 1,3$	$11,7 \pm 1,0$
HC-V	$24,8 \pm 3,0$	$6,9 \pm 0,8$
TM	$15,2 \pm 1,0$	$4,4 \pm 0,8$

As diferenças observadas entre os valores de C_{∞} e L_p para as XG obtidas de *H. courbaril* e *Tamarindus indica* podem ser explicadas devido à diferença na estrutura primária, que gera galactoxiloglucanas mais rígidas devido a presença da série nova de oligossacarídeos para o jatobá, em relação à molécula de tamarindo que não apresenta os oligossacarídeos da série XXXXG. Assim, o aumento de uma unidade de glucose, substituída por xilose, aumenta o comprimento de persistência em ~1,6 vezes, mostrando que a diferença na estrutura primária pode alterar o comportamento hidrodinâmico. As diferenças entre as moléculas de galactoxiloglucanas de jatobá, principalmente para **HC-IV** pode ser devido ao reduzido teor de XXG em 50% nessa amostra, o que, teoricamente, reduz o número de pontos de mobilidade da galactoxiloglucana (glucose não substituída), gerando uma molécula mais rígida em relação às outras. O valor de L_p para a amostra de tamarindo após o aquecimento foi praticamente o mesmo obtido por PICOUT et al. (2003), que utilizou o gráfico de Stockmayer-Fixman para obter os valores de C_{∞} e L_p , mostrando uma boa correlação com os dados obtidos pelo gráfico proposto por ROGER, AXELOS e COLONNA (2000).

4.1.7. ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS

Para tentar compreender melhor as diferenças estruturais da molécula de galactoxiloglucana (**HC-I**) após o processo oxidativo foram realizadas análises termogravimétricas. Em outras palavras, foi avaliada a perda de massa pelo polímero em função da temperatura. Esta metodologia já vem sendo utilizada para o estudo de polissacarídeos nativos e modificados conforme publicado por STIVALA, JUNICHI e REICH (1981); VARMA e CHAVAN (1995) e VARMA et al. (1997). No estudo de VARMA et al. (1997) esses utilizaram as análises termogravimétricas para avaliar diferenças entre galactomananas com diferentes graus de oxidação que não foram diferenciadas por infravermelho.

Na Figura 25 estão representadas as degradações térmicas das amostra **HC-I** (A), **HC-IOX3** (B), **HC-IOX5** (C) e **HC-IOX10** (D) em taxas de

aquecimento de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0°C.min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio, utilizando uma faixa de temperatura entre 200 e 600°C.

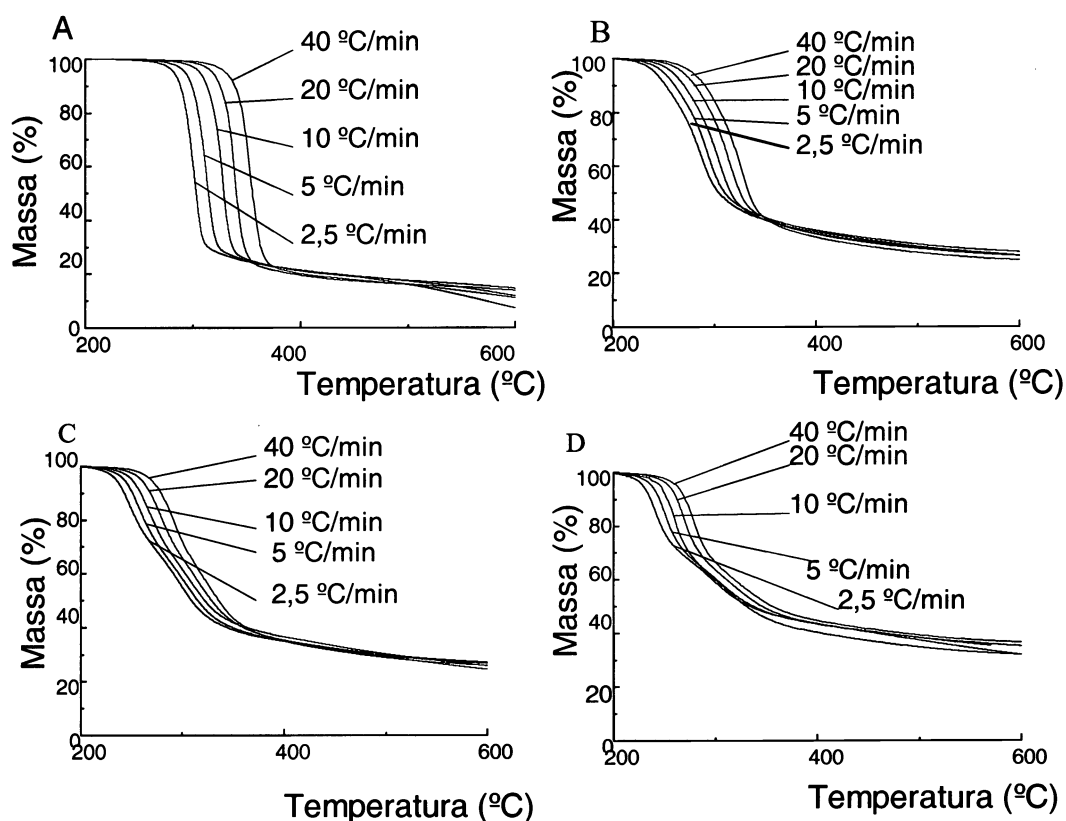


Figura 25 – Curva de perda de massa para **HC-I (A)**, **HC-IOX3 (B)**, **HC-IOX5 (C)** e **HC-IOX10 (D)** em taxas de aquecimento de 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0°C.min⁻¹.

Para poder melhor avaliar os eventos de perda de massa foi aplicada a derivada do processo degradativo. A Figura 26 mostra a sobreposição das curvas derivadas dos processos de perda de massa (dTG) em taxa de aquecimento de 2,5°C.min⁻¹ para as amostras **HC-I** e para **HC-IOX** com 3, 5 e 9,5% de oxidação.

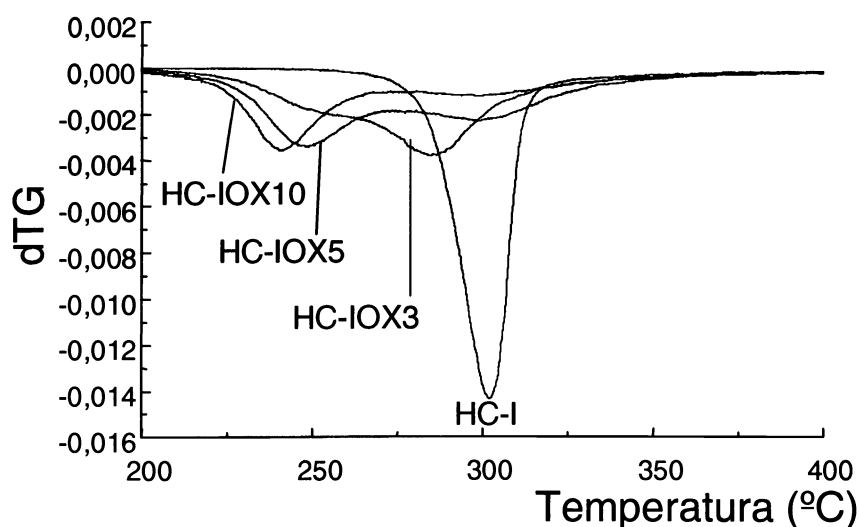


Figura 26 - dTg do processo de perda de massa em função da temperatura, utilizando a taxa de aquecimento de $2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ para as amostras **HC-I** e **HC-IOX 3, 5 e 10**.

A Figura 26 demonstra que com um aumento do grau de oxidação, a temperatura de início do processo de degradação torna-se menor. Isso indica que a oxidação reduz a estabilidade térmica no início do processo degradativo. As temperaturas iniciais (T_i), finais (T_f) e médias (T_m) do processo de degradação, bem como as perdas de massas, estão resumidas na Tabela 11.

Tabela 11 – Temperaturas de degradação e porcentagem de perda de massa para a galactoxiloglucana nativa (**HC-I**) e modificadas (**HC-IOX 3, 5 e 10**), em taxa de aquecimento de $2,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Amostras	T_i (°C)	T_f (°C)	T_m (°C)	Perda de massa (%)
HC-I	<i>277</i>	<i>317</i>	<i>300</i>	<i>70,4</i>
HC-IOX3 1º evento	<i>232</i>	<i>260</i>	<i>247</i>	<i>12,9</i>
HC-IOX3 2º evento	<i>264</i>	<i>309</i>	<i>284</i>	<i>42,8</i>
HC-IOX5 1º evento	<i>231</i>	<i>263</i>	<i>248</i>	<i>30,5</i>
HC-IOX5 2º evento	<i>277</i>	<i>327</i>	<i>298</i>	<i>29,9</i>
HC-IOX10 1º evento	<i>226</i>	<i>253</i>	<i>241</i>	<i>28,5</i>
HC-IOX10 2º evento	<i>275</i>	<i>329</i>	<i>299</i>	<i>18,8</i>

A Figura 26 e a Tabela 11 simplificam a observação de que um novo evento de degradação ocorreu no polissacarídeo modificado, em temperaturas menores de degradação, chamado de 1º evento de perda de massa, entre ~ 230 – 278 °C, quando comparado com o polímero não modificado. O 2º evento nos polissacarídeos oxidados é referente, aparentemente, ao polímero não modificado, uma vez que apresentam praticamente a mesma temperatura de início, final e médias de degradação.

As áreas do novo evento de degradação (1º evento) do polímero oxidado, mostrados na Tabela 11, aumentam com o aumento da oxidação, e o inverso pode ser observado para o 2º evento. Ao final do processo de degradação, a quantidade total de perda de massa das moléculas oxidadas diminui com o aumento do processo oxidativo (soma do 1º e 2º evento). Em outras palavras, o polissacarídeo com 9,5% de oxidação apresenta menor perda de massa quando comparado aos outros oxidados e ao polímero nativo na seguinte ordem **HC-IOX10 < HC-IOX5 < HC-IOX3 < HC-I**. Dessa forma pode-se concluir que no começo do processo degradativo, o nível da oxidação aumenta a degradação, e ao final gera produtos mais estáveis à degradação térmica.

4.1.7.1. ANÁLISES CINÉTICAS DA TERMOGRAVIMETRIA

A Figura 27 mostra o ln das taxas de aquecimento ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) como uma função do recíproco da temperatura absoluta. O coeficiente angular deste gráfico foi utilizado para obter a energia de ativação (E_a) em diferentes valores de conversão (α %) que representam, neste caso, as porcentagens de degradação dos polímeros em estudo.

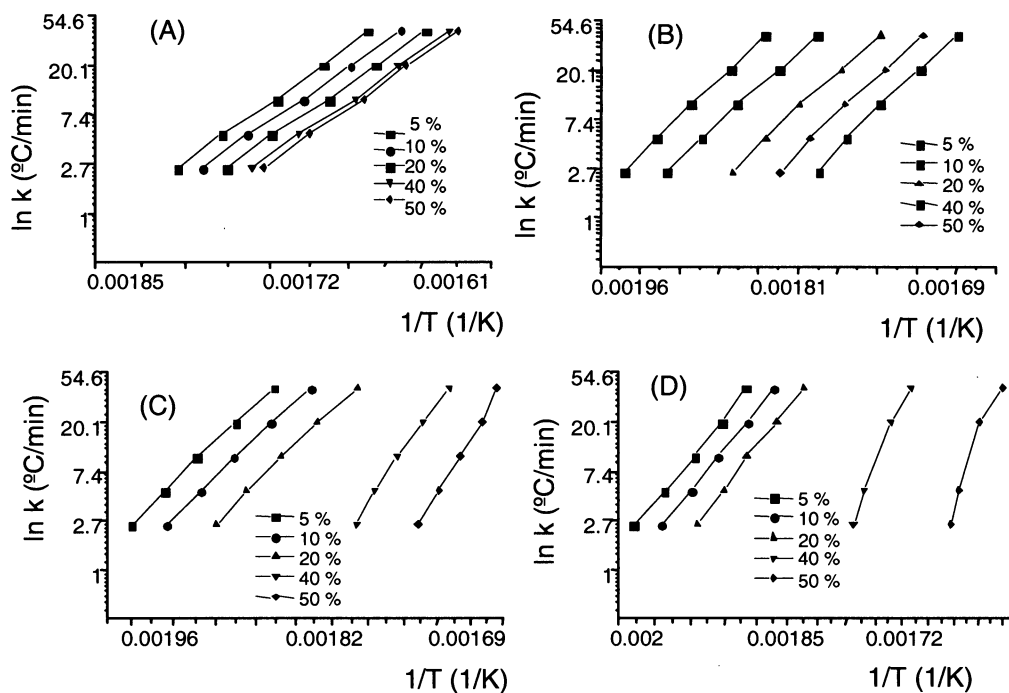


Figura 27 - $\ln k$ com função de $1/T$ para as amostras **HC-I** (A), **HC-IOX3** (B), **HC-IOX5** (C), e **HC-IOX10** (D). As retas representam o $\alpha\%$.

Na Figura 28 está representada a relação entre a energia de ativação (E_a) das amostras oxidadas (**HC-IOXs**) e a amostra nativa (**HC-I**), para as diferentes porcentagens de perda de massa ($\alpha\% = 5, 10, 20, 30, 40$ e 50%).

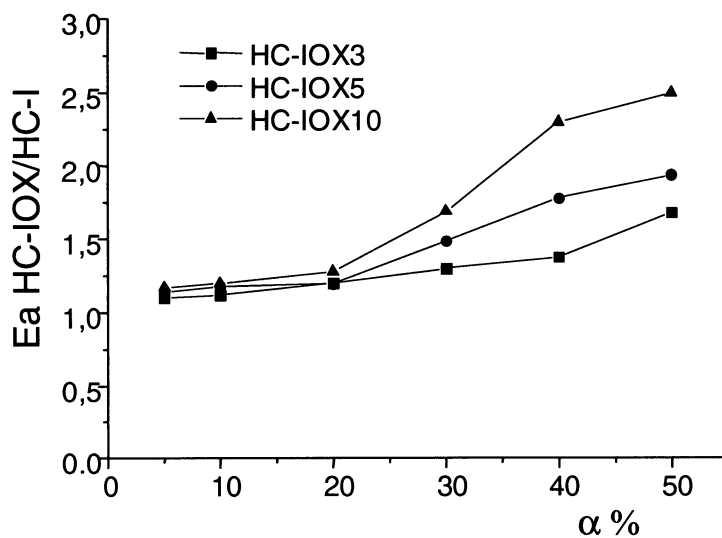


Figura 28 – Relação entre a E_a das amostras **HC-IOXs/HC-I** em diferentes fatores de conversão $\alpha\%$ (% de perda de massa).

Os resultados da Figura 28 mostram que durante o processo degradativo das galactoxiloglucanas oxidadas o aumento da E_a é dependente de grupos ácidos ou teor de oxidação gerados nessas moléculas. Assim a E_a apresenta um aumento de até 1,68 vezes para a amostra **HC-IOX3**, de até 1,94 vezes para a **HC-IOX5** e de até 2,5 vezes para a **HC-IOX10**, quando comparadas ao polissacarídeo nativo. A E_a também confirma a maior estabilidade após 20% de perda de massa para os polissacarídeos oxidados, devido a um aumento da energia necessária para ocorrer o processo degradativo.

Utilizando as equações de reta obtidas na Figura 28 foi possível observar que entre 5-20% de degradação todas as amostras apresentam praticamente a mesma relação entre a E_a /degradação. Entretanto, em perdas de massa entre 20-50%, o coeficiente angular obtido pela equação da reta para as razões **HC-IOX/HC-I** foram de 0,0152; 0,0252 e 0,0427, respectivamente, para as amostras com 3, 5 e 10% de oxidação. A relação entre esses coeficientes angulares indica que o aumento da E_a depende diretamente do teor de oxidação ou carboxilação da molécula. Como exemplo, se o processo oxidativo aumentou em uma razão de 1,7 vezes, obtido através da relação entre **HC-IOX5** por **HC-IOX3**, ocorre um aumento da relação dos coeficientes angulares das retas mostradas na Figura 34 na mesma proporção (1,65 vezes). Isso indica que a energia utilizada no processo degradativo é diretamente dependente do teor de oxidação molecular.

A Figura 29 mostra as constantes de velocidade obtidas para as amostras **HC-I** e **HC-IOX's** obtidas a 250°C (Figura 29 A) e a 350°C (Figura 29 B).

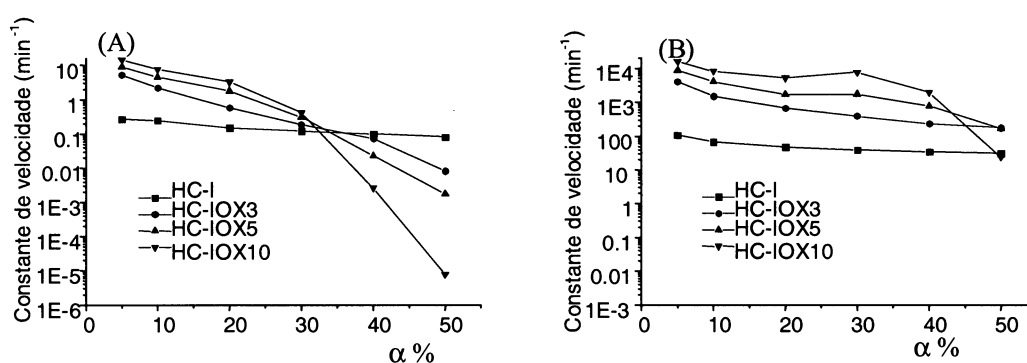


Figura 29 – Constante de velocidade para **HC-I**, **HC-IOX 3**, **5** e **10%** em temperatura de **250°C** (A) e **350°C** (B).

Um efeito notável ocorre quando a constante de velocidade é obtida a **250°C** (Figura 29 A), onde em baixos valores de perda de massa, a constante de velocidade é maior que a do polissacarídeo não modificado em 19, 33 e 53 vezes, respectivamente, para as amostras com 3, 5 e 10% de oxidação. Em um valor de perda de massa superior a 30% pode-se observar um efeito contrário e, neste caso, a relação entre a velocidade de perda de massa dos polissacarídeos oxidados em relação à amostra nativa foi de 0,1; 0,02 e $9,4 \times 10^{-5}$ vezes, respectivamente, para **HC-IOX3**, **HC-IOX5** e **HC-IOX10**. Isto mostra que uma enorme redução da constante de velocidade ocorre no sistema, dependendo do grau de oxidação, provavelmente, devido a formação dos produtos estáveis a degradação térmica.

A Figura 29B mostra que em uma perda de massa de 5% para as amostras **HC-IOX3**, **HC-IOX5** e **HC-IOX10** ocorre, respectivamente, um aumento de 36, 79 e 146 vezes na constante de velocidade em relação a amostra **HC-I**. Pode-se ser observado também que com o aumento da temperatura de 250 para **350°C**, para se obter a constante de velocidade, isso gera praticamente uma constância nos valores de velocidade de degradação em função da massa molar. A redução dessa velocidade ocorre aproximadamente entre 40-50% de degradação para essa temperatura. Isso indica que o aumento da temperatura, aumenta, conseqüentemente, a energia disponível no processo de degradação, mantendo constante a velocidade do processo de degradação.

4.2. AMIDOS

4.2.1. ANÁLISES QUÍMICAS

A análise da composição monossacarídica dos amidos mostraram pelos acetato de alditóis a presença apenas de unidades de glucose em sua composição. Na Tabela 12 estão sumarizados os dados da análise da composição química em termos do conteúdo de carboidratos, proteínas, umidade, cinzas, teor de amilose e lipídeos das amostras de amido de milho Sigma (amilose, amido comum e amilopectina), do amido de cará e de mandioca.

Tabela 12 – Análise da composição química das amostras (g%) de amidos de diferentes fontes.

Amostras	% (m/m)					
	Carboidratos ^a	Proteínas ^b	Umidade ^c	Cinzas ^c	Amilose ^d	Lipídeos ^c
Amilose	83,9	0,44	9,4	0,064	80	1,25
Amido de milho comum	88,0	0,2	10,7	traços	27,5	1,03
Amilopectina	90,1	0,22	9,4	traços	traços	0,41
Cará	88,0	0,1	12,9	0,09	36,0	1,1
Mandioca	87,4	0,1	12,0	0,08	23,0	1,2

^a Método de DUBOIS *et al.*, (1956)

^b Método de HARTREE (1972)

^c Método de AOAC (1995)

^d Método de CHRASTIL (1997)

A análise da composição química dos amidos mostrou teor de amilose variando entre 23 a 80%. Esta diferença foi observada com interesse uma vez que é necessária para a avaliação da real capacidade da galactoxiloglucana em interagir com os amidos, e qual a dependência das proporções de amilose/amilopectina nos amidos modelos no processo. O conteúdo de amilose foi determinado utilizando-se como padrão o amido de milho sigma com alto teor de amilose (80%). Como controle utilizou-se o amido de milho comum (27,5% de amilose) e a amilopectina que apresenta apenas traços de amilose.

O conteúdo de amilose da amostra de amido de cará foi superior ao do amido de mandioca e amido de milho comum Sigma. Para a determinação desses teor de amilose, utilizou-se o método de Chrastil com modificações, com amilose e amilopectina Sigma como padrões, em misturas entre diferentes proporções dessas moléculas. O coeficiente de correlação entre os dados obtidos experimentalmente com as misturas de amilose e amilopectina em diferentes proporções foi de 0,990. Utilizando a curva padrão desse método modificado, após a deslipidificação com éter etílico, os teores de amilose obtidos para o cará e mandioca foram de 36,2 e 23,0%, respectivamente.

O conteúdo de amilose das amostras de amido aqui estudadas, principalmente, para o amido de cará foi superior ao obtido por outros autores. Como exemplo WHISTLER e BEMILLER (1997) citaram 17% de amilose para o amido de mandioca e 28% para o amido de milho comum; 29% para o amido de cará segundo MCPHERSON e JANE (1999); 27% para o amido de cará segundo HOOVER e VASANTHAN (1994); 28,5% e 19,8% para cará e mandioca, respectivamente, segundo GUANARATNE e HOOVER (2002); e 30% para o cará conforme citado por MALI et al. (2002) e ALVES et al. (1999). Estas diferenças nas quantificações podem ser explicadas devido às condições de plantio, principalmente para os amidos de cará e mandioca, e aos diferentes métodos de extração de lipídeos e de determinação de amilose utilizados nos trabalhos citados (MALI et al., 2002).

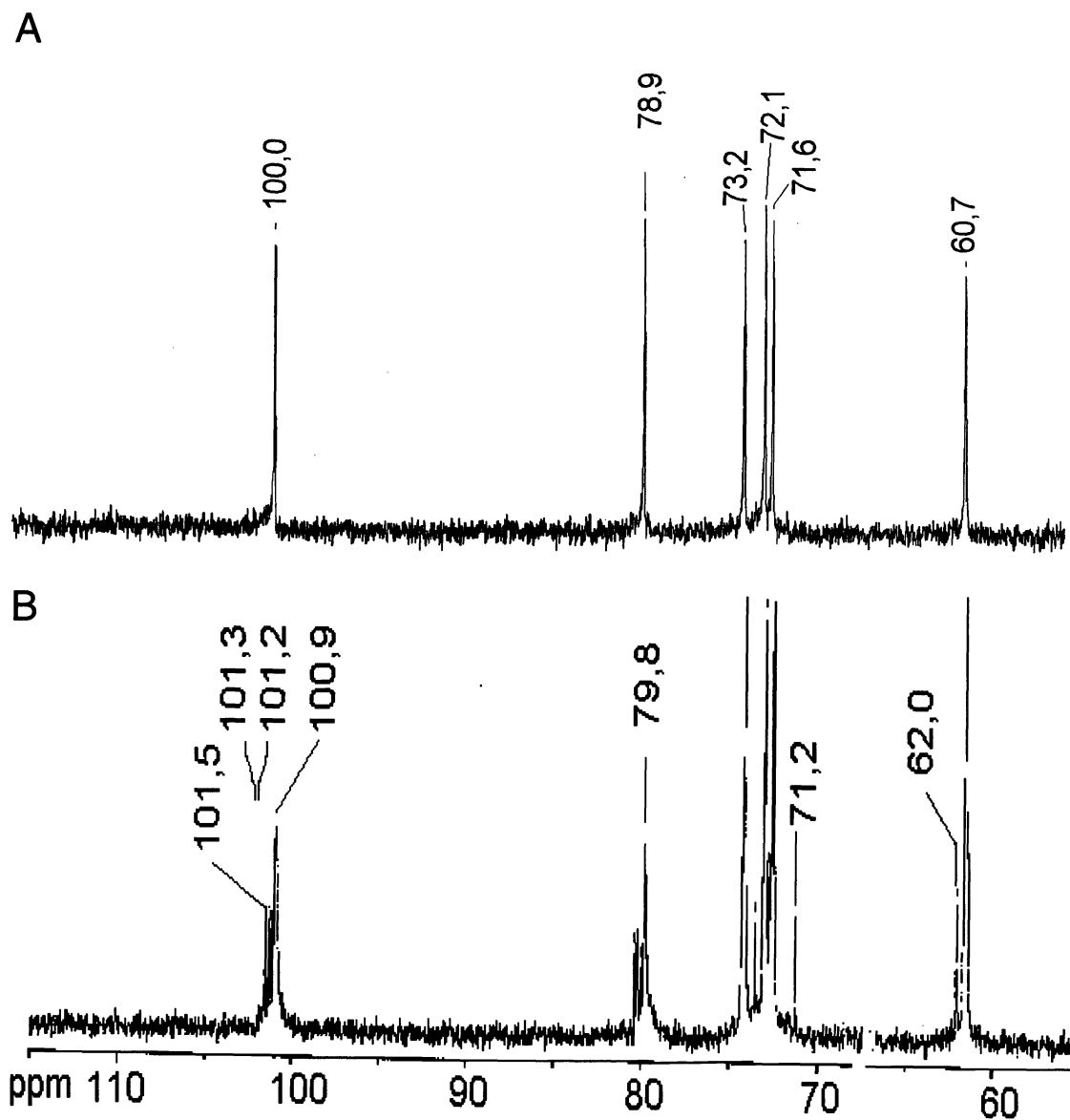
4.2.2. ANÁLISE POR ^{13}C RMN DAS AMOSTRAS DE AMIDO

Figura 30 – Espectro de ^{13}C RMN, em $\text{DMSO-}d_6$, a 60°C , A- amostra de amido milho com alto teor de amilose e B- amido de milho com alto teor de amilopectina/SIGMA . Os deslocamentos são expressos em ppm.

Na Figura 30A tem-se o espectro de ^{13}C RMN do amido de milho com alto teor de amilose, onde pode-se observar que ocorre a ausência de deslocamentos químicos referentes à substituição por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ nas unidades de Glc_p unidas por ligação do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$. Isto vem a confirmar que praticamente esse amido apresenta ausência de contaminação por amilopectina. Na região de C-1 em δ 100,0 pode-se observar um deslocamento químico que se sobressai, referente às unidades de $\alpha(1\rightarrow4)$ Glc_p cujo C-6 não está substituído. O sinal referente ao C-6 livre dessas unidades aparece em δ 60,7. Em δ 78,9 aparece o deslocamento referente ao C-4 de unidades de $\alpha\text{-D-Glc}_p$ não substituídas. Os deslocamentos em δ 73,2; 72,1 e 71,6 referem-se, respectivamente, aos carbonos 3,4 e 5 das unidades de $\alpha\text{-D-Glc}_p$.

Para a amostra de amido de milho rico em amilopectina (Figura 30B), Na região dos carbonos anoméricos os deslocamentos em δ 101,3 e 101,2 referentes, provavelmente, ao C-1 de unidades presentes nas ramificações como terminais não redutores. O deslocamento em 100,9 ppm refere-se à presença de unidades de $\alpha\text{-D-Glc}_p$ unidas por ligação do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$. O deslocamento químico em δ 101,5 refere-se ao C-1 de unidades de $\alpha\text{-D-Glc}_p$ que estão substituídas em C-6.

O deslocamento em δ 79,8 refere-se ao C-4 de unidades de $\alpha\text{-D-Glc}_p$ não substituídas. Os deslocamentos nessa região, em campo mais alto (δ 80,4 – 80,0), provavelmente, referem-se ao C-4 das unidades de Glc_p substituídas em C-6. Na região de campo alto, em 61,6 ppm podemos observar um sinal referente ao C-6 livre das unidades de $\alpha\text{-D-Glc}_p$ e um deslocamento químico em 62,0 ppm, referente ao C-6 de $\alpha\text{-D-Glc}_p$ unida por ligação $1\rightarrow6$. Já em campo mais baixo, é possível observar um deslocamento químico em δ 71,2, possivelmente referente ao C-4 relativamente móvel de $\alpha\text{-D-Glc}_p$ de terminal não redutor. Uma vez que não foram observados os deslocamentos em campo alto, referentes ao C-6 de Glc_p substituída, foi realizado o dept-135 para confirmar se o deslocamento em δ 71,2 referia-se ao C-4 de terminal não redutor ou ao C-6 substituído da $\alpha\text{-Glc}_p(1\rightarrow4)$.

Na Figura 31A e B são apresentados os espectros de ^{13}C RMN das amostras de amido de mandioca e cará, respectivamente. Na Figura 31C pode ser observado o dept-135 da amostra de amido de cará.

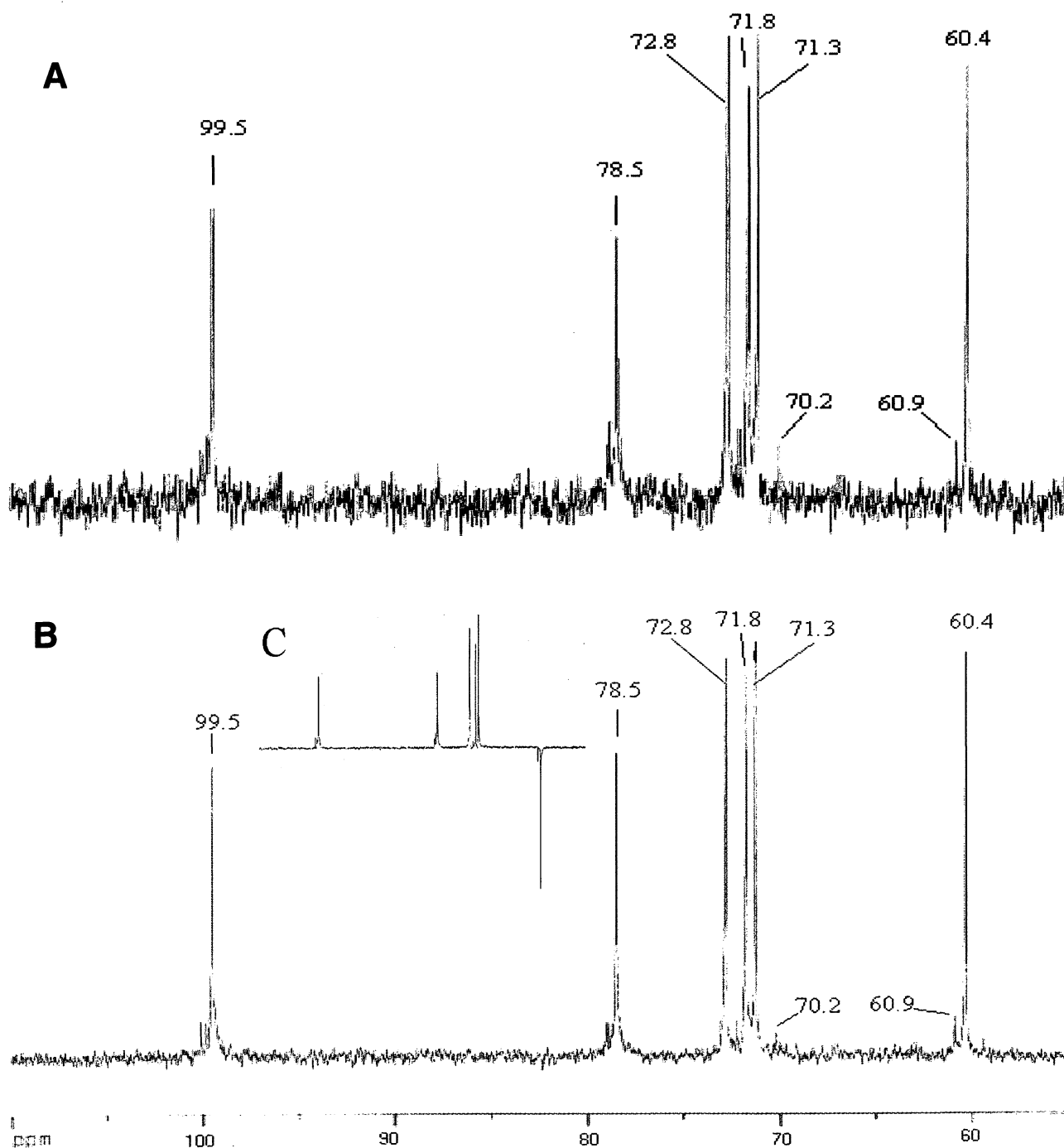


Figura 31 – Espectro de ^{13}C RMN, em $\text{DMSO-}d_6$, a 60°C , A - amostra de amido de mandioca, B- amostra de amido de cará e C- dept-135 da amostra de amido de cará. Os deslocamentos são expressos em ppm.

Pode-se observar, na Figura 31A, que o deslocamento químico referente às unidades de glucose substituídas em seu C-6 em δ 60,9 (C-6 de α -D-Glcp unida por ligação 1 \rightarrow 6 apresenta-se com menor intensidade na amostra de amido de cará que no amido de mandioca, em relação ao C-6 de unidades de glucose não substituída e unida por ligações α (1 \rightarrow 4). Confirmando assim o menor teor de substituição em C-6 do amido de mandioca em relação ao amido de cará. Na Figura 31A e B pode-se observar um deslocamento químico em 70,2 ppm, que poderia ser relacionado ao C-4 de extremidades não redutoras de unidades de glucose presentes em maior proporção na amilopectina ou ao C-6 substituído que não havia sido identificado. Realizou-se então o dept-135 (Figura 31C), onde, devido a não inversão do sinal, pode-se observar que esse deslocamento refere-se portanto ao C-4 de unidades não redutoras.

Comparando-se os espectro da Figura 31A e B pode-se observar que a intensidade relativa dos sinais referentes à substituição apresentam maior intensidade na amostra de amido de mandioca, quando comparado ao amido de cará.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR (M_w), SEGUNDO COEFICIENTE VIRIAL (A_2) E RAIOS DE GIRO (R_g) PELO MÉTODO DE ZIMM PARA AS AMOSTRAS DE AMIDO

Para melhor caracterizar as amostras de amido em estudo, foram realizados ensaios para determinação da massa molecular ponderal média (M_w), raio de giro (R_{gz}) e segundo coeficiente virial (A_2), utilizando como solvente DMSO.

Na Figura 32, tem-se a determinação da massa molecular pelo método de Zimm para a amostra de amido de milho com alto teor de amilose, onde pode-se observar uma boa correlação entre as concentrações utilizadas e o espalhamento de luz em 10 detectores. A massa molecular ponderal média-massa (M_w) foi de $1,29 \pm 0,28 \times 10^6$ g.mol⁻¹. O R_{gz} determinado foi de 124 ± 13 nm. O A_2 foi de $\sim 10^{-5}$ mol.mL.g⁻², indicando que o solvente utilizado, DMSO foi um bom solvente. BELLO-PÉREZ et al. (1998) utilizando análises por espalhamento de luz dinâmico, encontraram para o amido Eurylon 7 (Lestrem-France), que é um

amido de milho rico em amilose, uma M_w de $8,8 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, R_{gz} de 133 nm e R_H de 152 nm. Os valores de massa encontrados por BELLO-PÉREZ et al. (1998), portanto, foram superiores ao encontrado neste trabalho, porém há várias fontes comerciais e várias linhagens genéticas (Eurylon 5, Eurylon 7 etc) de amido de milho rico em amilose, com massas moleculares completamente diferentes. Um outro importante fator deve-se ao fato da utilização de sistemas de determinação de massas moleculares diferentes, a saber estático e dinâmico, solventes diferentes, tempo e técnica de preparo da amostra.

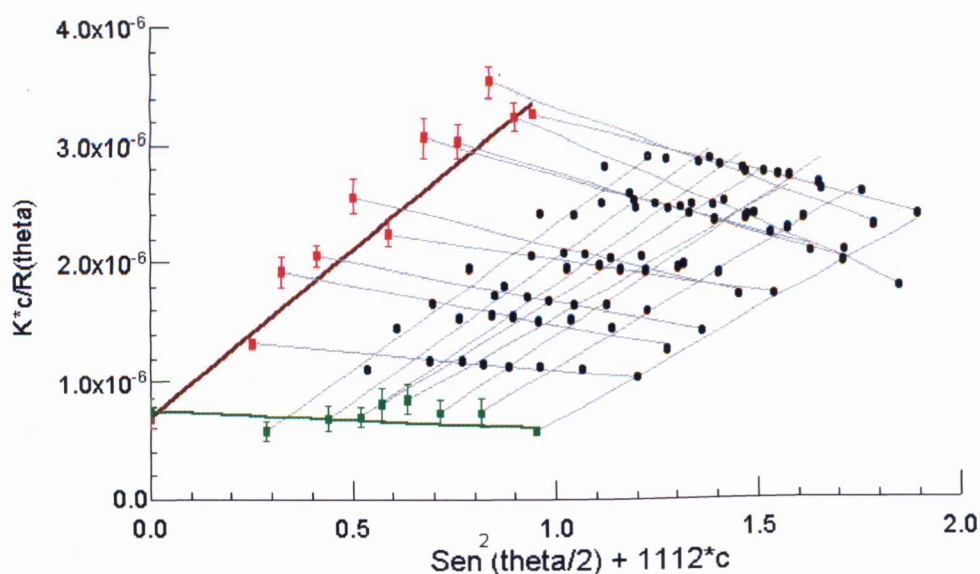


Figura 32 – Gráfico de Zimm para a amostra de amido de milho com alto teor de amilose (SIGMA). Concentração de $0,125 \text{ g.L}^{-1}$ a 1 g.L^{-1} , utilizando DMSO como solvente, a 25°C .

A amostra de amido de milho comum (Figura 33) apresentou valores de M_w de $8,0 \pm 0,3 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ e R_{gz} de $148,5 \pm 20 \text{ nm}$. O A_2 foi de $3,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L.mL.g}^{-2}$, indicando ser o DMSO um bom solvente. Uma vez que o amido de milho comum apresenta alto teor de amilopectina em sua composição, a presença dessa família de moléculas, com altas massas moleculares gera um aumento do M_w e R_{gz} em relação à amilose. BELLO-PÉREZ et al. (1998) obtiveram valores de M_w e R_{gw} de $1,1 \times 10^8 \text{ g.mol}^{-1}$ e 223 nm, respectivamente. As possíveis causas das diferenças apresentadas, já foram citadas anteriormente. Essas análises confirmam que a amostra de amido de milho com alto teor de amilose apresenta,

praticamente, a molécula essencialmente linear do amido, devido aos baixos valores de M_w encontrados.

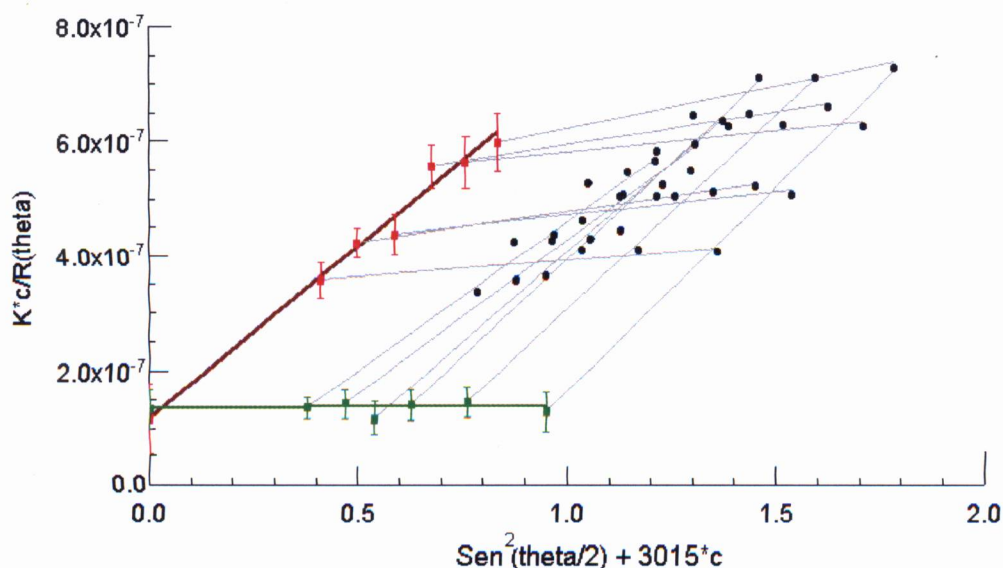


Figura 33 – Gráfico de Zimm para a amostra de amido de milho comum (SIGMA) Concentração de $0,125 \text{ g.L}^{-1}$ a 1 g.L^{-1} , utilizando DMSO como solvente, a 25°C .

A M_w , R_{gz} e A_2 determinadas na Figura 34 para a amostra de amilopectina foi de $1,35 \pm 0,48 \times 10^7 \text{ g.mol}^{-1}$, 170 nm e $2,2 \times 10^{-4} \text{ mol.mL.g}^{-2}$, respectivamente. BELLO-PÉREZ et al. (1998) obtiveram valores de massa 10 vezes maiores e raio de giro de 224 nm . HANSELMANN et al. (1995) obtiveram valores de M_w e R_{gz} de 37 a $360 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ e 120 - 320 nm , respectivamente, em água após autoclavação a 175°C . Estes valores estão mais próximos aos obtidos experimentalmente em nosso trabalho. MILLARD et al. (1997), utilizando como solvente uma mistura DMSO:água (90:10 – v/v) observou massas moleculares entre $3,0 - 7,0 \times 10^8 \text{ g.mol}^{-1}$ para as amostras de amilopectina em estudo. Porém, os autores afirmam que podem as massas maiores representar agregados ou amilopectina não completamente solúvel.

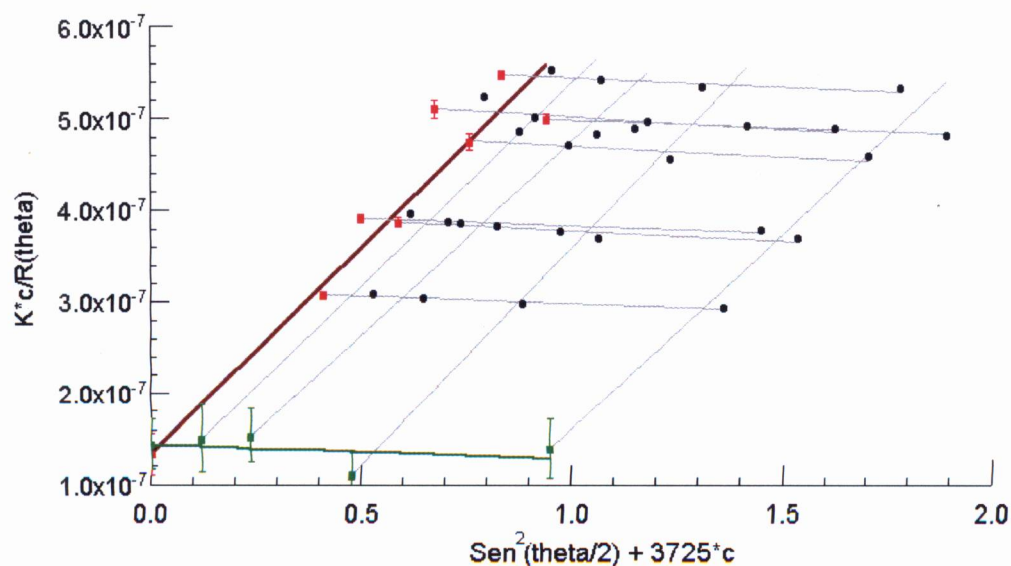


Figura 34– Gráfico de Zimm para a amostra de amido de milho com alto teor de amilopectina (SIGMA). Concentração de $0,125 \text{ g.L}^{-1}$ a 1 g.L^{-1} , utilizando DMSO como solvente.

Na Figura 35 pode-se observar o gráfico de Zimm para a amostra de amido de mandioca. Os valores encontrados para a M_w , R_g e A_2 foram de $5,05 \pm 1,8 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, 131 nm e $\sim 10^{-5} \text{ mol.mL.g}^2$, respectivamente.

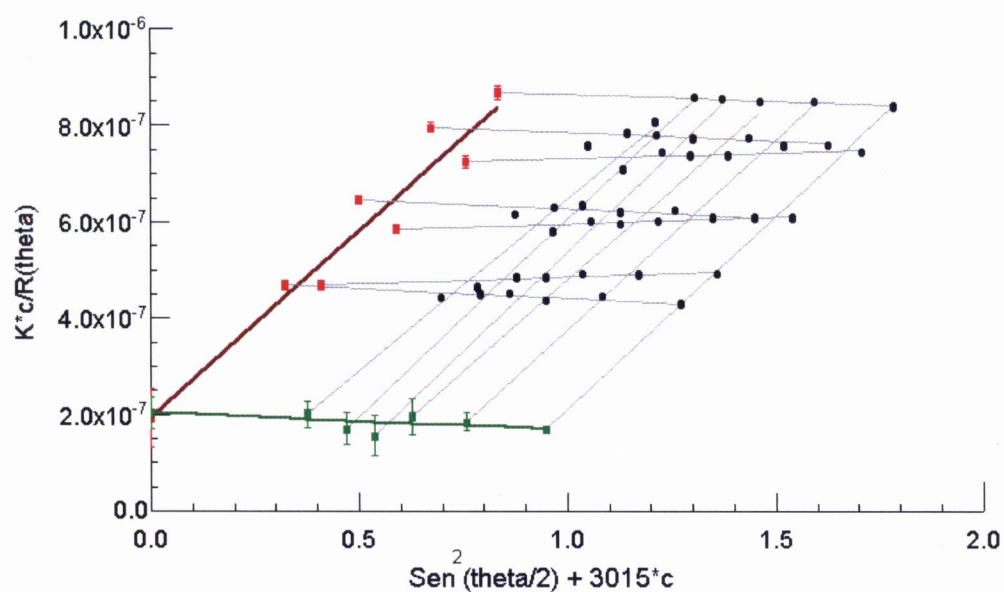


Figura 35 – Gráfico de Zimm para a amostra de amido de mandioca. Concentração de $0,125 \text{ g.L}^{-1}$ a 1 g.L^{-1} , utilizando DMSO como solvente, a 25°C .

Comparando-se o amido de mandioca (Figura 35) e o amido de cará (Figura 36), que apresenta maior teor de amilose, aparentemente apresenta uma amilopectina com menor massa uma vez que a determinada foi de $3,4 \pm 0,9 \times 10^6$ g.mol⁻¹ e o R_{gz} de 106 nm. O segundo coeficiente virial foi de $\sim 10^{-4}$ mol.mL.g². Comparativamente o amido de batata, apresenta valores de M_w entre $14 - 195 \times 10^5$ g.mol⁻¹ e de R_g entre 44 – 195 nm (BULÉON et al., 1998). Essa observação apresenta-se em acordo como proposto por CHEETHAN e LEPING TAO (1997) que observaram massas moleculares menores para a amilopectina em amidos com altos teores de amilose.

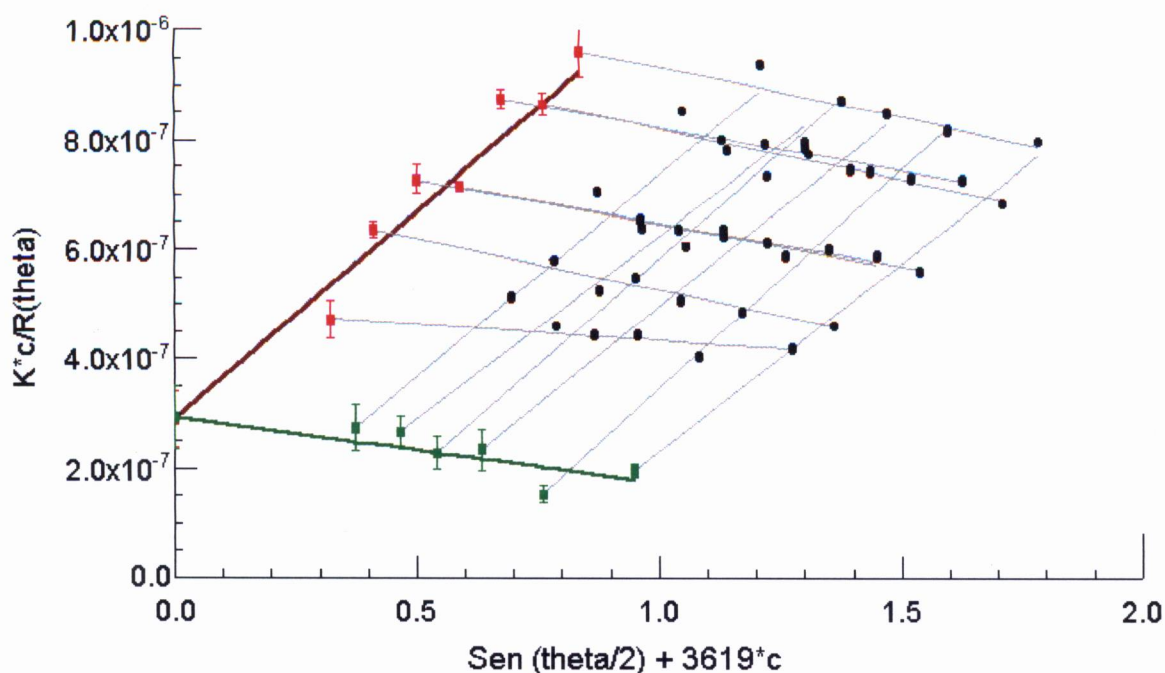


Figura 36– Gráfico de Zimm para a amostra de amido de cará. Concentração de 0,125 g.L⁻¹ a 1 g.L⁻¹, utilizando DMSO como solvente, a 25°C.

4.2.4. ANÁLISE DE VARREDURA DIFERENCIAL DE TEMPERATURA (DSC)

Foram realizadas análises térmicas de varredura diferencial de temperatura (DSC) para as amostras de amido em estudo. A amostra de amido de milho com alto teor de amilose - Sigma não pôde ser analisada por DSC, uma

vez que o sistema disponível para selamento, cadinhos de alumínio, utilizados para evitar a evaporação da água, não suportava temperaturas acima de 100°C, o que limitou as análises para os amidos com temperatura de gelatinização inferiores a 100°C.

Assim, a fim de melhor compreender a diferença estrutural das diferentes amostras de amido em estudo: amido de milho comum, amido de milho com alto teor de amilopectina, cará e de mandioca, foram avaliadas as temperaturas iniciais, pico e finais de gelatinização e entalpia do processo endotérmico, realizando ensaios utilizando diferentes taxas de aquecimento (2,5; 3,0; 4,0 e 5,0°C.min⁻¹), conforme apresentado na Figura 37.

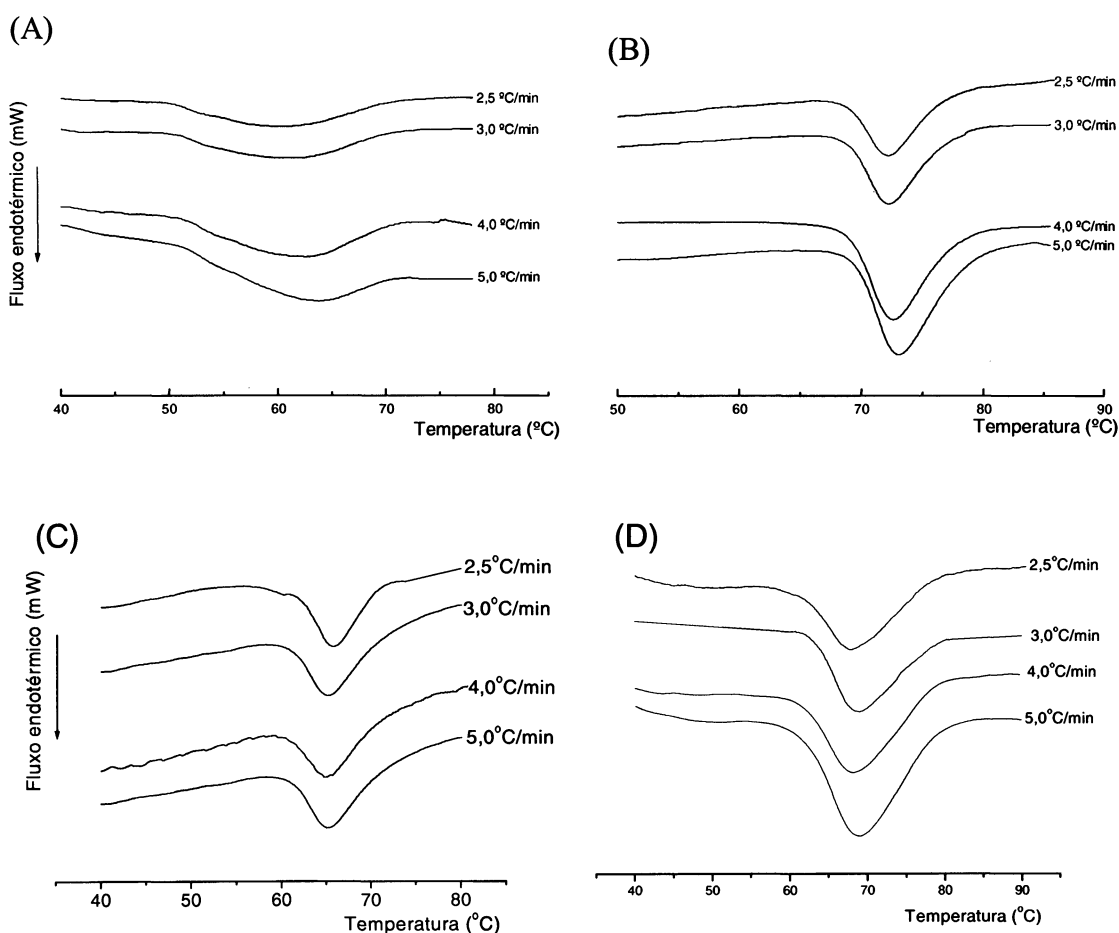


Figura 37 – Varredura diferencial de temperatura (DSC) em taxas de aquecimento de 2,5 – 5,0°C.min⁻¹ para (A) amostras de amido de mandioca, (B) amido de cará, (C) amido comum de milho e (D) amido de milho com alto teor de amilopectina (5 mg de amido com 10 mg de água).

As temperaturas iniciais (T_i), finais (T_f) e do pico (T_m) do processo de gelatinização estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 – Temperatura inicial (T_i), final (T_f), e do pico (T_m) do processo de gelatinização para as amostras de amido de cará, mandioca, amido comum de milho e amido de milho com alto teor de amilopectina em taxas de aquecimento de 2,5; 3,0; 4,0 e 5,0°C.min⁻¹.

Amostras	Taxas de aquecimento (°C.min⁻¹)	T_i (°C)	T_f (°C)	T_m (°C)	ΔH (J/g)
Amido de Cará	2,5	69,0	77,0	72,5	-11,5
	3,0	69,0	77,0	72,5	-11,5
	4,0	69,0	78,0	72,5	-12,0
	5,0	69,5	79,0	73,0	-11,5
Amido de Mandioca	2,5	50,5	70,0	60,5	-8,5
	3,0	51,0	69,5	61,5	-7,0
	4,0	52,0	69,5	62,5	-6,5
	5,0	51,5	71,0	63,5	-6,5
Amido de milho comum	2,5	61,1	71,1	64,8	-6,26
	3,0	60,9	72,31	65,0	-7,6
	4,0	62,2	70,9	65,7	-5,4
	5,0	61,9	72,8	66,8	-5,2
Amido de milho com alto teor de amilopectina	2,5	61,5	78,4	67,9	-9,6
	3,0	61,5	78,4	67,9	-9,6
	4,0	61,7	79,2	68,9	-11,1
	5,0	61,8	79,3	68,9	-11,9

Verificando os dados da Tabela 13 é possível observar que a amostra de amido de cará apresenta maior temperatura de início do processo de gelatinização. O amido com menor temperatura de gelatinização foi o de mandioca, que apresentou também um processo não muito bem definido de gelatinização. Também, pode ser observado na Tabela 13 que os valores de ΔH (J/g), obtidos em diferentes taxas de aquecimento, não sofrem grande variação

para uma mesma amostra de amido devido, provavelmente, a similaridade das taxas aplicadas (2,5 a 5°C/min).

Em comparação aos dados apresentados por ZOBEL e STEPHEN (1995) a amostra de amido de milho comum, apresenta valores muito próximos de temperaturas iniciais, finais e médias, como 62, 72 e 67°C respectivamente. Para o amido de milho com alto teor de amilopectina as temperaturas iniciais e médias são muito próximas, 63 e 68°C, respectivamente, e há uma diferença no valor da temperatura final do evento endotérmico, como de 72°C para ZOBEL e STEPHEN (1995) e 78-79°C neste trabalho (Tabela 13).

Segundo MCPHERSON e JANE (1999), as temperaturas de gelatinização para o amido de cará foram determinadas como sendo de 64,6, 70,9 e 77,8°C, respectivamente para as iniciais, médias e finais. Na Tabela 13 pode-se observar que os valores encontrados foram de T_i 69,5; T_m 73,0 e T_f de 79°C. Os valores obtidos nas endotermas também foram próximos, 13,3 J/g por MCPHERSON e JANE (1999) e 11,5 J/g para os obtidos e apresentados na Tabela 13. Os valores de temperatura de gelatinização e entalpia do processo de gelatinização apresentam uma boa correlação ao avaliado por GUANARATNE e HOOVER (2002).

Para o amido de mandioca pode-se observar valores T_i , T_m e T_f de 51, 69 e 72°C, respectivamente. GUANARATNE e HOOVER (2002) obtiveram valores de 63; 71,5 e 81,5°C, respectivamente. O ΔH do processo endotérmico determinado por estes autores foi de 12,3 J/g. Tais valores, exceto pelo alto valor de ΔH , apresentam boa correlação aos obtidos neste trabalho.

4.2.4.1. Análises cinéticas das varreduras diferenciais de temperatura (DSC)

Utilizando as áreas representadas na Figura 38 (pagina 100) foi construído um gráfico que relaciona as taxas de aquecimento como uma função do recíproco da temperatura absoluta, utilizando diferentes fatores de conversão ($\alpha\%$) ou diferentes porcentagens de gelatinização. Através desse gráfico foi possível determinar os valores de E_a do processo de gelatinização para cada fator de conversão ou gelatinização avaliado.

Na Figura 38 está representado o \ln da taxa de aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) em função do recíproco da temperatura absoluta ($1/\text{K}$) para as amostras de amido de cará (A) e amido de mandioca (B). O mesmo procedimento foi utilizado para as amostras de amido de milho comum e amido de milho com alto teor de amilopectina, cujos resultados não estão apresentados. Os coeficientes angulares das retas representam o valor de $-E_a/R$, onde E_a é a energia de ativação do processo de gelatinização e R é a constante universal dos gases.

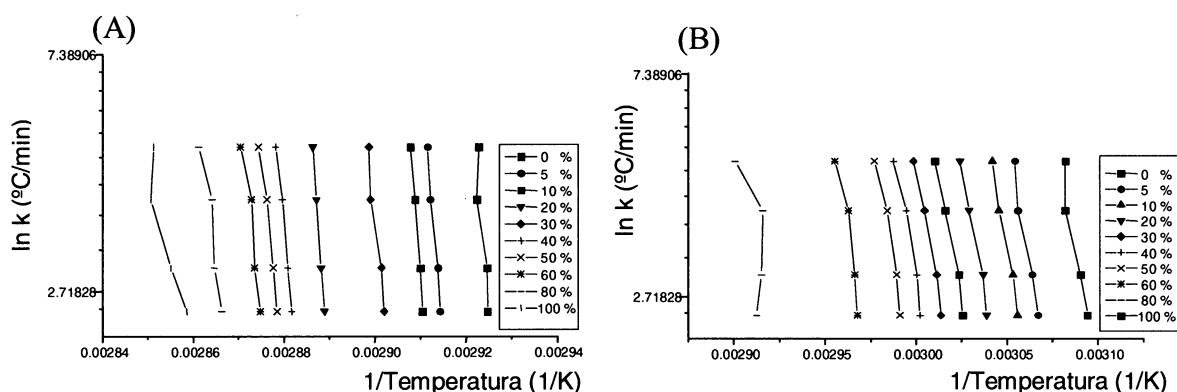


Figura 38 - $\ln k$ ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) como uma função do inverso da temperatura absoluta - $1/T$ ($1/\text{K}$) para: (A) amostra de amido de cará e (B) mandioca (5 mg com 10 mg de água).

As Figuras 39A a 39D mostram a E_a (kJ/mol) como uma função do grau de conversão ou gelatinização ($\alpha\%$). A Figura 39A demonstra que ocorre um aumento da E_a entre 0 a 20% de gelatinização para a amostra de amido de cará. O perfil gráfico obtido é muito similar ao obtido por PIELICHOWSKI, TOMASIK e SIKORA (1998) em seu estudo sobre a cinética de gelatinização do amido de batata. Entretanto, os valores de E_a obtidos pelos autores são menores que os encontrados neste trabalho. Uma observação importante é a de que a faixa de temperatura analisada no trabalho acima referido foi maior que a deste trabalho. Comparando-se as Figuras 39 A-C é possível observar que o amido de cará apresenta maior energia de ativação, em relação às amostras de amido de milho comum e amido de mandioca, além de apresentar maior temperatura de início do processo de gelatinização, conforme mostrado na Tabela 13. A E_a da amostra de amido de cará é superior à do amido de milho com alto teor de amilopectina (Figura 39D). Isto ocorre, aparentemente, pelo maior conteúdo de amilose na

amostra de amido de cará, o que poderia explicar as diferenças nos valores de E_a apresentados.

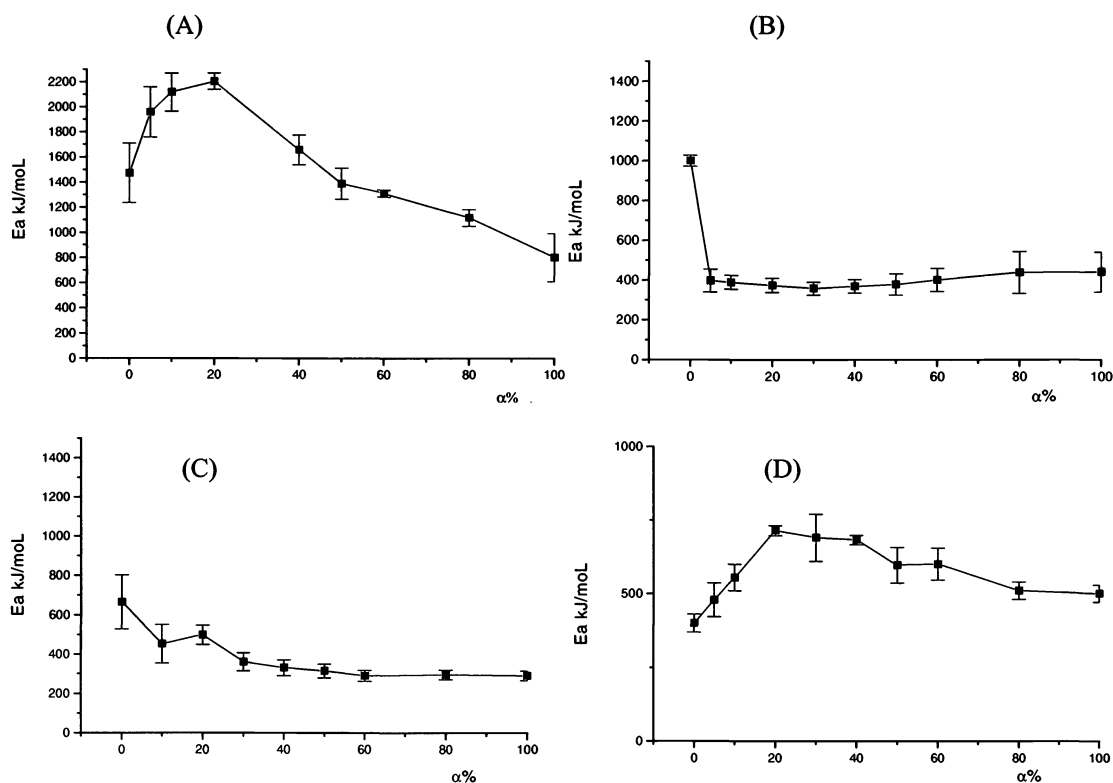


Figura 39 - E_a (kJ/mol) em função do grau de conversão ou grau de gelatinização ($\alpha\%$) para: (A) amostra de amido de cará, (B) amido de mandioca, (C) amido de milho comum e (D) amido de milho com alto teor de amilopectina.

Utilizando a Equação de Arrhenius, considerando como temperatura constante de gelatinização 70°C e 50% de conversão, ou seja, 50% de gelatinização dos sistemas polissacarídicos em estudo, pode-se obter a constante de velocidade do processo de gelatinização. Comparativamente, as constantes de velocidade obtidas foram 148, 117, 61 e $0,3 \text{ s}^{-1}$ para as amostra de amido de mandioca, amido de milho com alto teor de amilopectina, amido de milho comum e amido de cará, respectivamente. Utilizando os valores de constante de velocidade, considerando-se 50% de gelatinização, pode-se afirmar que o processo de gelatinização para a amostra de amido de cará, em temperatura de 70°C , ocorre 20 vezes mais lentamente que o amido de milho comum, e ~ 500 vezes mais lentamente que o amido de milho com alto teor de amilopectina. Isso pode ser explicado justamente pelo conteúdo diferencial de amilose nos sistemas em estudo.

4.3. INTERAÇÃO AMIDOS - GALACTOXILOGLUCANA

4.3.1. ENSAIO DE COMPETIÇÃO ENTRE A HC-I E IODO COM A AMIOSE

Foram realizados experimentos de competição entre o iodo e a galactoxiloglucana com a amilose. O íon triodeto apresenta uma interessante capacidade de se ligar à amilose e gerar coloração a 620 nm, entretanto, 100 g de amilopectina conseguem se ligar a menos de 1 mg de iodo. Essa baixa capacidade de ligação do iodo a amilopectina, deve-se a incapacidade de formação de um complexo de quatro átomos de iodo, mais ou menos arranjados linearmente em uma estrutura helicoidal contendo 11 unidades de glucose. Assim, nesses experimentos, a metodologia de CHRASTIL, 1987 foi adaptada para a determinação da capacidade de ligação entre o iodo e a amilose, na ausência e presença de diferentes concentrações de galactoxiloglucana (**HC-I**). Na Figura 40, pode-se observar a influência da interação do amido de milho rico em amilose na presença da **HC-I** em diferentes proporções, sobre a interação amilose-iodo.

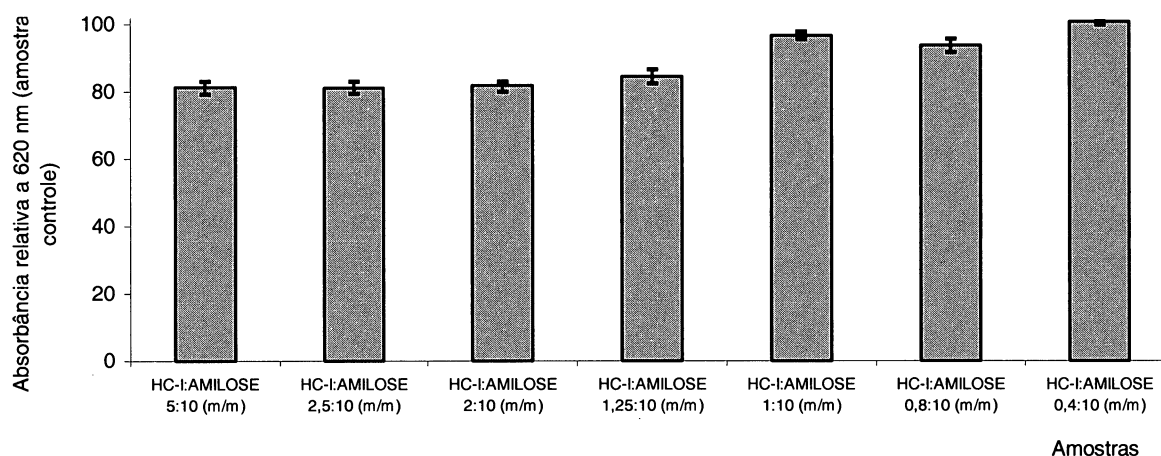


Figura 40—Absorbância relativa a 620 nm para as misturas (galactoxiloglucana **HC-I** e amilose) e para a amilose isoladamente em presença de iodo.

Pode-se observar na Figura 40 que ao se manter constante a concentração de amilose e aumentar o teor de galactoxiloglucana na mistura, verifica-se um ponto de máximo de interação, determinado pela redução da interação iodo-amilose. Esse ponto máximo de interação foi determinado pela

redução da absorvância em relação à amostra de amilose isoladamente próximo a relação **HC-I**:amilose de 2:10 (m/m) ou proporção de 1:5.

Para verificar a capacidade de interação da galactoxiloglucana com os amidos modelos, foram realizados ensaios utilizando amostras com diferentes proporções de amilose. Para as amostras de amido de milho comum, amido de milho com alto teor de amilose, amido de milho com alto teor de amilopectina, amido de cará e amido de mandioca foram realizados ensaios por análises reológicas dinâmico-oscilatórios utilizando a proporção no ponto máximo de interação, utilizando 1 parte de galactoxiloglucana para 5 partes de amido, conforme será mostrado no item a seguir.

4.3.2. ENSAIOS REOLÓGICOS DAS INTERAÇÕES HC-I E AMIDOS

Nesses experimentos, foi utilizada a amostra **HC-I** como modelo de interação entre amido–hidrocolóide. Primeiramente, foram realizados experimentos nas proporções teoricamente ideais de 1:5 entre a galactoxiloglucana e amido de milho rico em amilose. Posteriormente foram realizadas interações com diferentes proporções entre galactoxiloglucana e amilose, afim de confirmar os dados obtidos pela interação hidrocolóide-amilose-iodo.

4.3.2.1. Interação galactoxiloglucana (HC-I) – amido de milho com alto teor de amilose

Primeiramente foi determinado o comportamento viscoelástico linear para a amostra de amido de milho com alto teor de amilose a 50 g.L^{-1} (Fig. 41 A e B), e para a mistura entre a galactoxiloglucana (**HC-I**) e amido de milho com alto teor de amilose, na proporção 1:5 (Fig. 42 A e B). As determinações foram realizadas nos extremos da varredura de frequência (0,01 e 10 Hz).

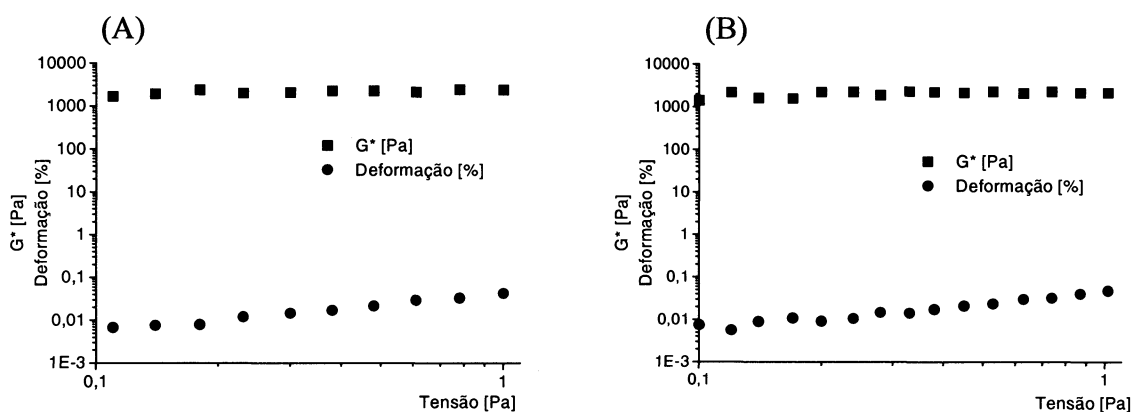


Figura 41 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para o amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L^{-1}). (A) Frequência de 0,01 Hz e (B) Frequência de 10 Hz, temperatura de 25°C .

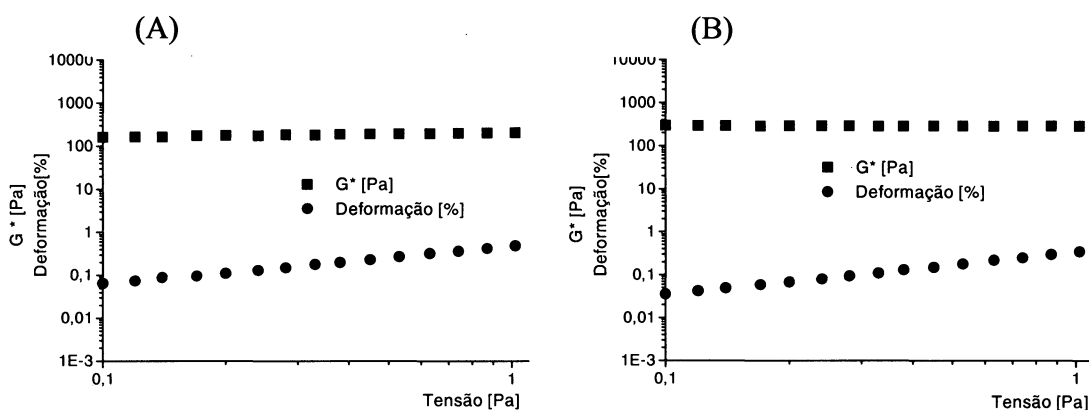


Figura 42 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a mistura entre o amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L^{-1}) – galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1}). (A) Frequência de 0,01 Hz e (B) Frequência de 10 Hz, temperatura de 25°C .

O valor de tensão escolhido para os testes de varredura de frequência foi de 0,5 Pa, onde a deformação nessa tensão foi inferior a 10%, tanto para a amostra de amido isoladamente, como para a mistura entre **HC-I** e amido de milho rico em amilose. Nas condições supra citadas, as amostras apresentam comportamento viscoelástico linear, ou seja, a tensão ou deformação aplicadas não alteram a estrutura física do sistema em estudo. Para os experimentos de varredura de frequência foi utilizada tensão de 0,5 Pa para a amostra de amido de milho com alto teor de amilose a 50 g.L^{-1} e 60 g.L^{-1} e para a mistura entre amido de milho com alto teor de amilose a 50 g.L^{-1} e galactoxiloglucana a 10 g.L^{-1} , conforme demonstrado na Figura 43.

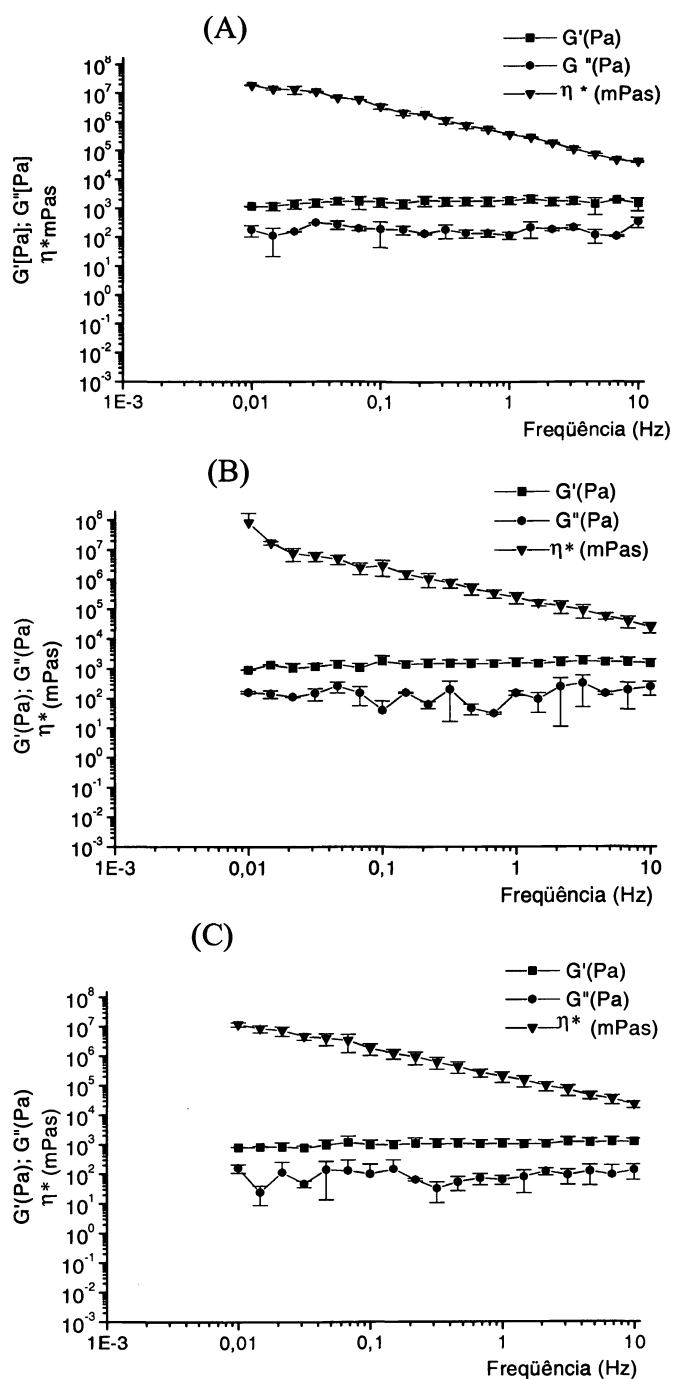


Figura 43 - Efeito da freqüência sobre os módulos de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica (η^*) sob tensão de 0,5 Pa. (A) amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L^{-1}); (B) amido de milho com alto teor de amilose (60 g.L^{-1}); (C) mistura amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C .

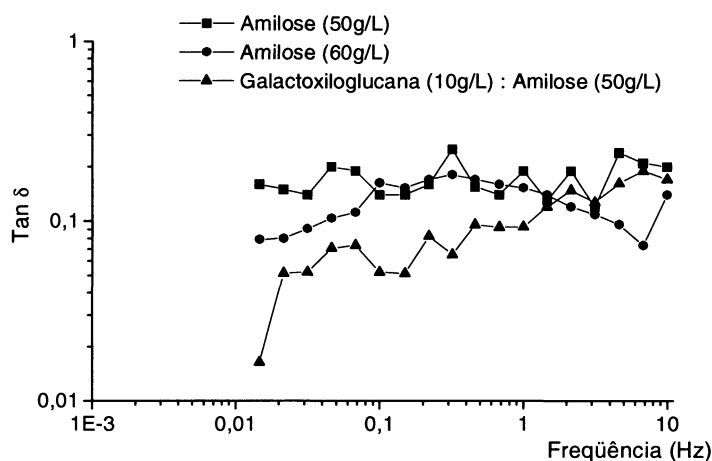


Figura 44 - Efeito da frequência sobre a tan de delta (δ) sob tensão de 0,5 Pa para o amido de milho com alto teor de amilose a 50 g.L^{-1} e 60 g.L^{-1} , e para a mistura amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C .

Para se determinar a força de um sistema gelatinizado, deve-se avaliar não apenas o módulo de armazenamento ou dinâmico (G') (Figura 43), mas a relação apresentada entre o módulo de perda ou viscoso (G'') e o módulo de armazenamento ou dinâmico (G'), obtendo-se assim a $\text{Tan } \delta$ (Figura 44), onde quanto menor for o valor dessa tangente, menor será o valor de G'' e maior o do G' , indicando assim uma estrutura mais rígida ou um gel mais forte. Na Figura 44 pode-se observar claramente que, os valores de $\text{Tan } \delta$ para a mistura entre o amido de milho rico em amilose (50 g.L^{-1}) e galactoxiloglucana (10 g.L^{-1}) são inferiores aos do amido rico em amilose isolados à 50 e 60 g.L^{-1} , em praticamente toda a faixa de frequência analisada, indicando, portanto, um caráter sólido mais acentuado para a mistura, que nos sistemas isolados.

Para confirmar os dados apresentados na Figura 40, onde teoricamente a relação aproximada de maior interação galactoxiloglucana: amilose foi determinado como sendo 1:5, foram realizadas análises utilizando relações galactoxiloglucana:amilose acima e abaixo do teórico proposto pelo ensaio de competição iodo/galactoxiloglucana com a amilose. Foram utilizadas

proporções de 1:25; 1:10 e 1:2,5 entre a galactoxiloglucana-amido de milho com alto teor em amilose, respectivamente. Na Figura 45 está representado a $\tan \delta$ em função da frequência para as proporções 1:25, 1:10, 1:5, 1:2,5.

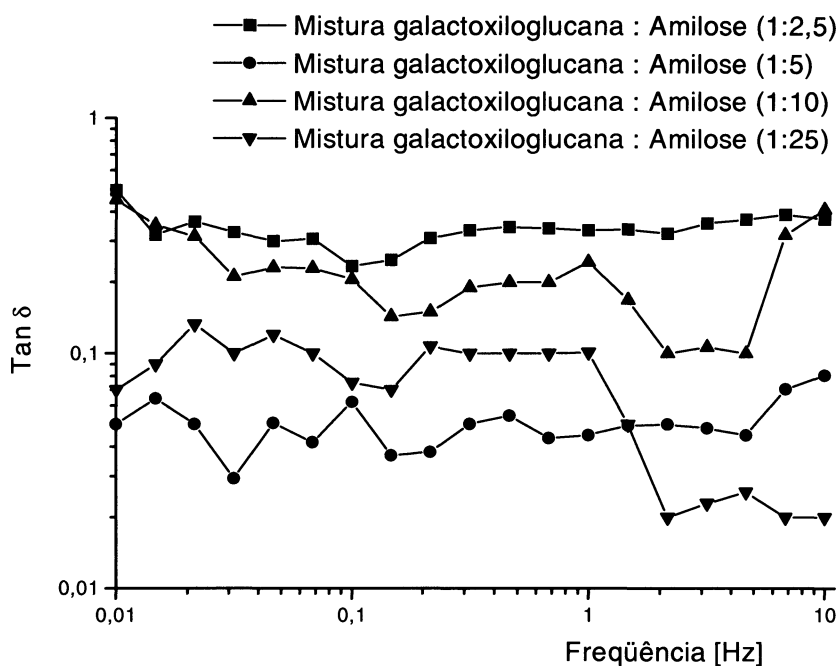


Figura 45 – Tan de delta (δ) em função da frequência para as misturas entre galactoxiloglucana HC-I e amido de milho com alto teor de amilose, em proporções de 1:2,5; 1:5; 1:10 e 1:25, temperatura de 25°C.

Pode-se observar, na Figura 45, que a relação de maior interação neste experimento foi a de 1:5 (galactoxiloglucana-amido de milho rico em amilose), uma vez que a $\tan \delta$ é menor que nas outras proporções. Para a galactoxiloglucana-amido de milho rico em amilose, na proporção 1:2,5 ocorre a formação do gel mais fraco, provavelmente, devido ao excesso do hidrocolóide na mistura que, por apresentar caráter viscoelástico com comportamento predominantemente viscoso, pode gerar um aumento do G'' e, conseqüentemente, aumentar o valor da $\tan \delta$. Já na proporção 1:25 entre galactoxiloglucana e amido de milho com altos teores de amilose, pode-se observar praticamente o mesmo comportamento da amostra de amido de rico em amilose isoladamente a 60 g.L⁻¹ onde, como pode ser observado na Figura 45, ocorre um aumento do caráter viscoelástico – sólido do sistema em altas frequências de cisalhamento.

4.3.2.2. Interação galactoxiloglucana (HC-I) – amido de milho comum

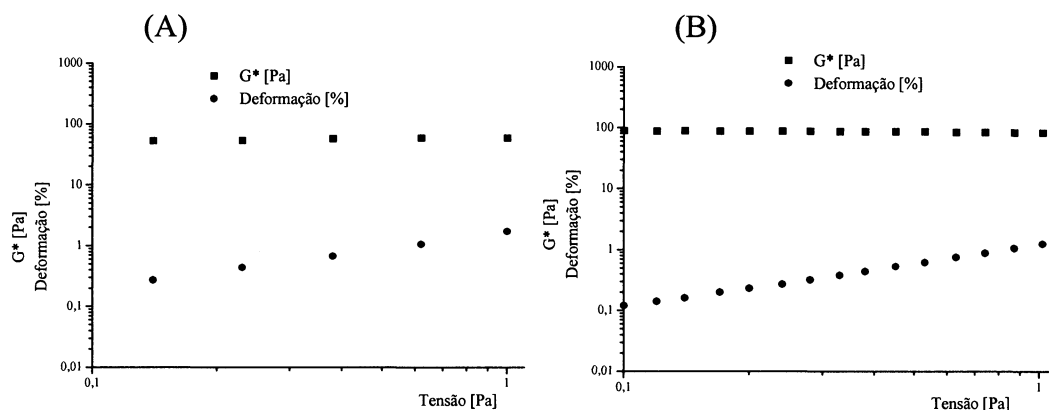


Figura 46 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para o amido de milho comum (50 g.L^{-1}). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C .

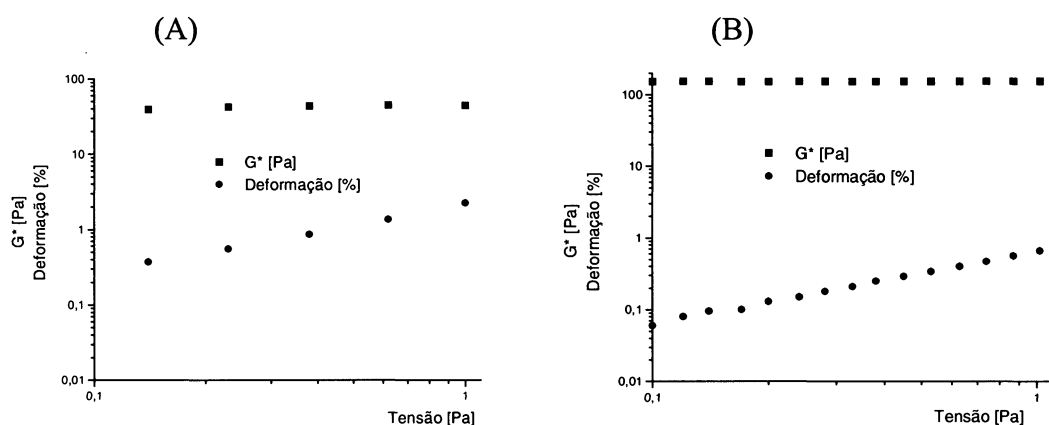


Figura 47 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a mistura do amido de milho comum (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L^{-1}). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C .

Foi determinada a região viscoelástica linear para as amostras de amido de milho comum a 50 g.L^{-1} (Figura 46 A e B) e para a mistura entre a galactoxiloglucana (10 g.L^{-1}) e amido de milho comum (50 g.L^{-1}) (Figura 47 A e B). A tensão escolhida para a realização dos experimentos de varredura de freqüência, tanto para a amostra de amido de milho comum como para a mistura com o hidrocolóide, foi de 0,1 Pa. Na Figura 48 está representada a varredura de freqüência para a amostra de amido de milho comum a 50 g.L^{-1} (A), amido de

milho comum a 60 g.L^{-1} (B), mistura entre a galactoxiloglucana (10 g.L^{-1}) e amido de milho comum a (50 g.L^{-1}) (C).

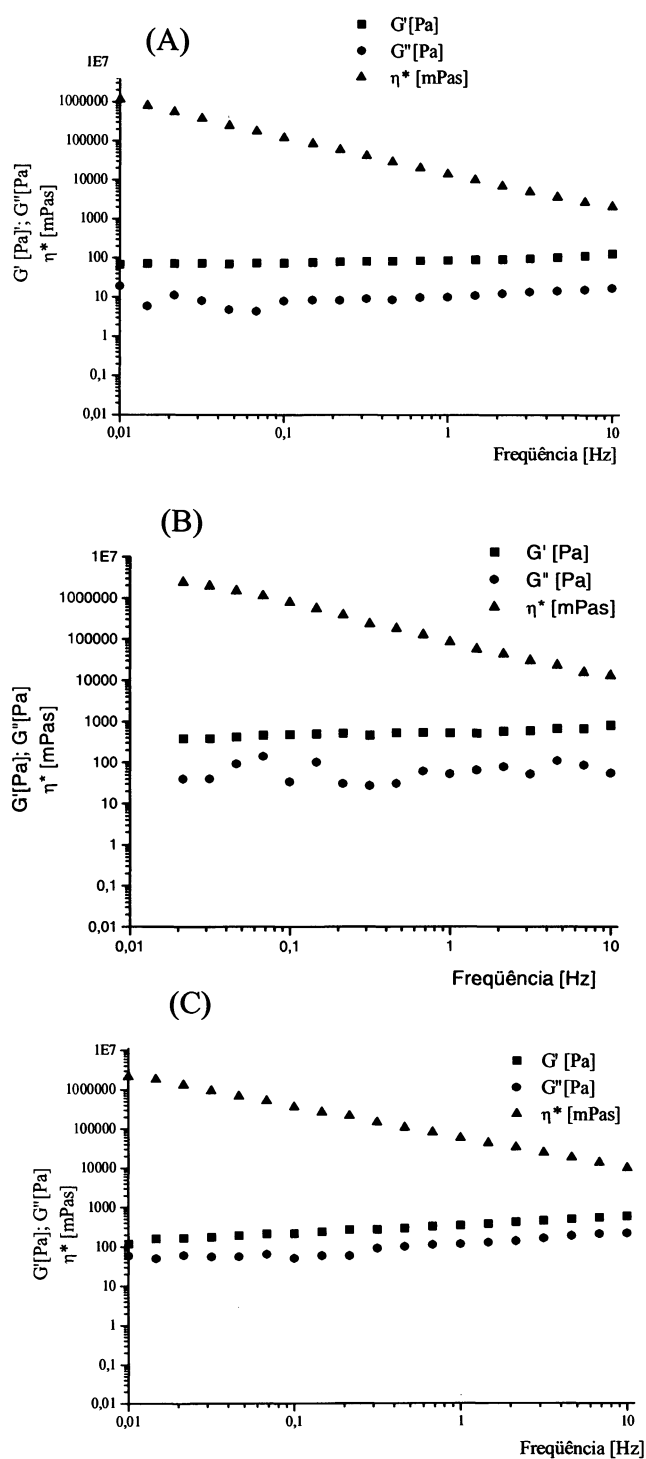


Figura 48 - Efeito da frequência sobre os módulos de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica complexa (η^*) sob tensão de $0,1 \text{ Pa}$. (A) amido de milho comum (50 g.L^{-1}); (B) amido de milho comum (60 g.L^{-1}); (C) mistura amido de milho comum (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C .

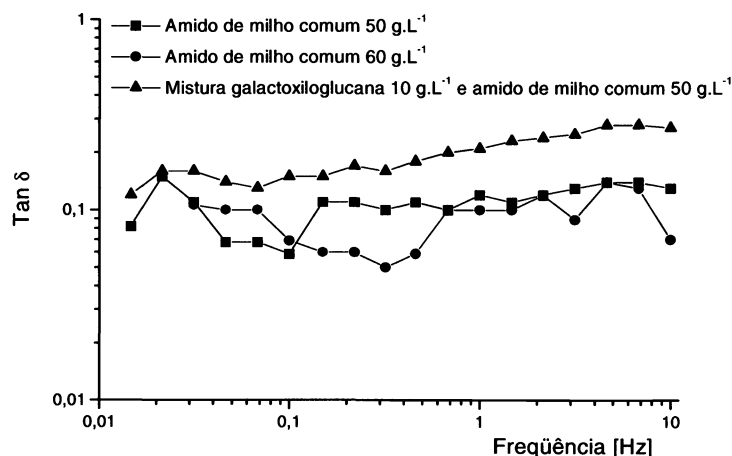


Figura 49 - Efeito da frequência sobre a tangente de delta (δ) sob tensão de 0,1 Pa para o amido de milho comum (60 g.L^{-1}) e mistura amido de milho comum (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C .

Pode-se observar na Figura 49 que a presença da galactoxiloglucana gerou a formação de um gel mais fraco, uma vez que os valores de tan de delta são menores para o amido de milho comum isoladamente a 50 e 60 g.L^{-1} em comparação com a mistura entre a galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1})-amido de milho comum (50 g.L^{-1}).

4.3.2.3. Interação galactoxiloglucana (HC-I) – amido de milho rico em amilopectina

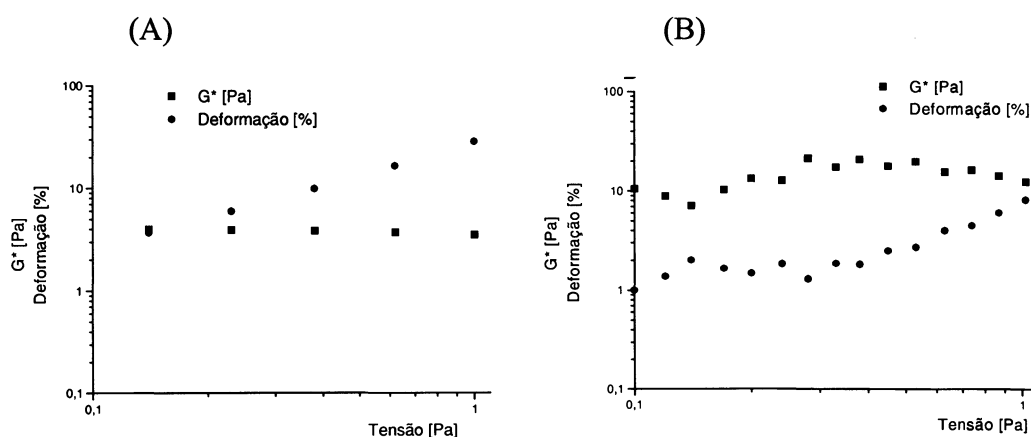


Figura 50 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a amostra de amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L^{-1}). (A) Frequência de $0,01 \text{ Hz}$ e (B) Frequência de 10 Hz , temperatura de 25°C .

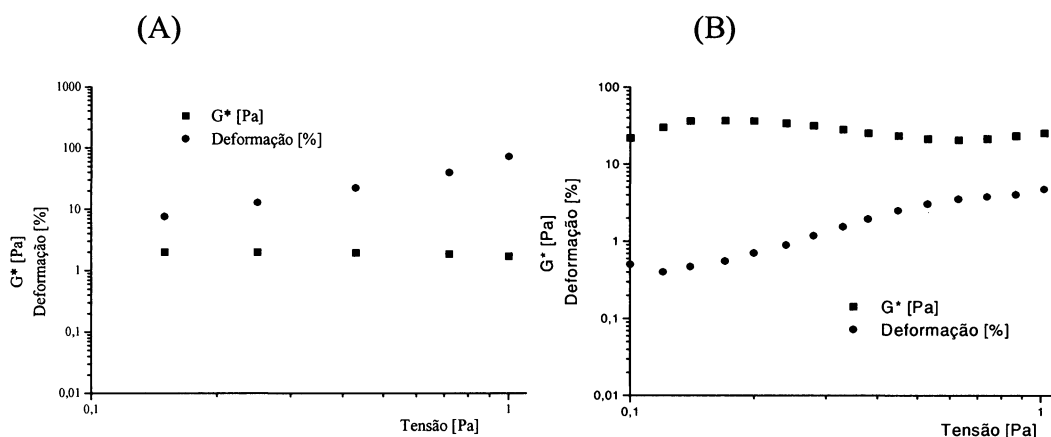


Figura 51 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a mistura amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1}). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C .

Uma vez realizados os experimentos de viscoelasticidade linear (Figuras 50 e 51), foi escolhida a tensão de 0,1 Pa para os experimentos de varredura de freqüência, conforme demonstrado na Figura 52. Estes experimentos foram efetuados para as amostras de amido de milho rico em amilopectina a 50 g.L^{-1} (Figura 52A), amido de milho rico em amilopectina a 60 g.L^{-1} (Figura 52B) e mistura galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1})-amido de milho rico em amilopectina (50 g.L^{-1}) (Figura 52C).

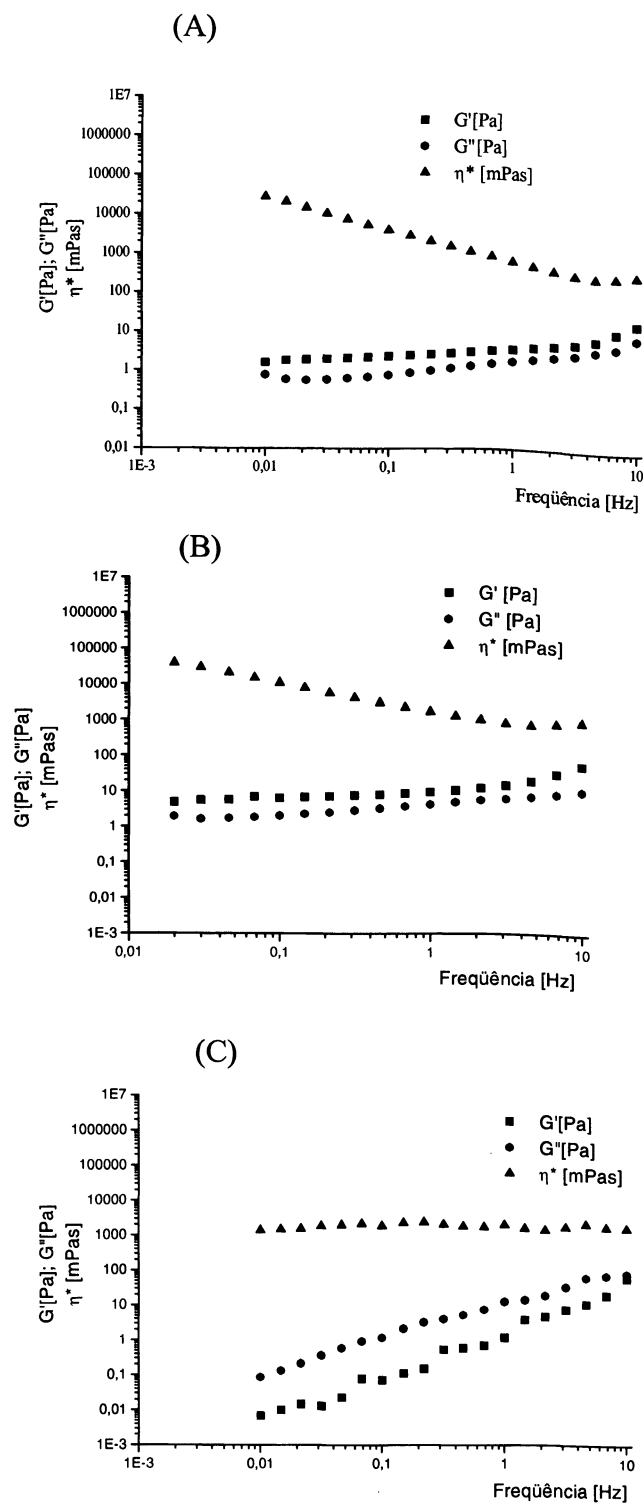


Figura 52 - Efeito da frequência sobre os módulos de cisalhamento de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica (η^*), sob tensão de 0,1 Pa. (A) amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L^{-1}); (B) amido de milho com alto teor de amilopectina (60 g.L^{-1}); (C) mistura amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C .

A Figura 52 (C) demonstra claramente que a presença da galactoxiloglucana interferiu na formação do gel. Na Figura 52A e B pode ser observado que os valores de G' são superiores aos do G'' em toda a faixa de frequência analisada. Para a mistura entre a galactoxiloglucana e amido de milho com alto teor de amilopectina (Figura 52C) os valores de G'' , que refletem a característica de perda ou viscosa do sistema, são superiores aos do G' para a mistura. Esse resultado pode explicar porque muitos autores afirmam que não há interação entre algumas fibras como as galactomananas e galactoxiloglucanas com o amido, provavelmente, devido ao alto conteúdo de amilopectina nas amostras de amido em estudo.

Na Figura 53 está representada a $\text{Tan } \delta$ para o amido de milho rico em amilopectina a 50 e 60 g.L^{-1} e para a mistura entre a galactoxiloglucana (10 g.L^{-1}) o amido de milho com alto teor em amilopectina (50 g.L^{-1}).

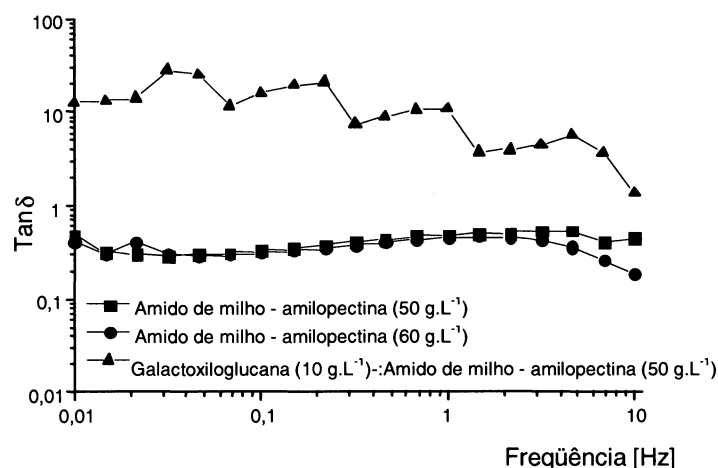


Figura 53 - Efeito da frequência sobre a $\text{tan } \delta$ sob tensão de 0,1 Pa para o amido de milho com alto teor de amilopectina (60 g.L^{-1}); e mistura amido de milho com alto teor de amilopectina (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C.

A Figura 53 mostra que ocorreu um grande aumento da $\text{tan } \delta$ para a mistura, confirmando a formação de uma estrutura com características sólidas menores que as do sistema de amido de milho rico em amilopectina isolado. Aparentemente, a presença da galactoxiloglucana causa um efeito sinérgico negativo na interação. Isso confirma a exclusão causada pela

amilopectina sobre a galactoxiloglucana. Essa exclusão foi observada por Freitas (2000) e Freitas et al. (2003), onde após centrifugação pode ser observado uma separação de fases do sistema que continha a mistura galactoxiloglucana e amido de milho rico em amilopectina.

4.3.2.4. Interação Galactoxiloglucana (HC-I) – amido de cará e amido de mandioca

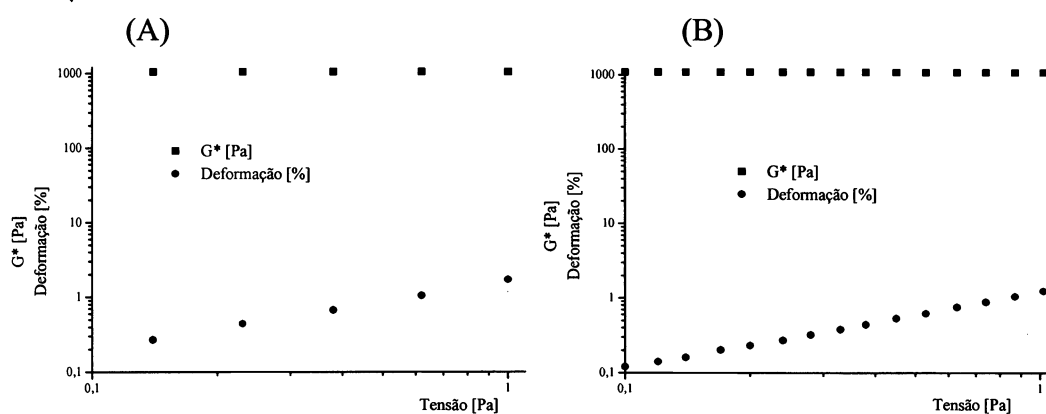


Figura 54 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para o amido de cará (50 g.L⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.

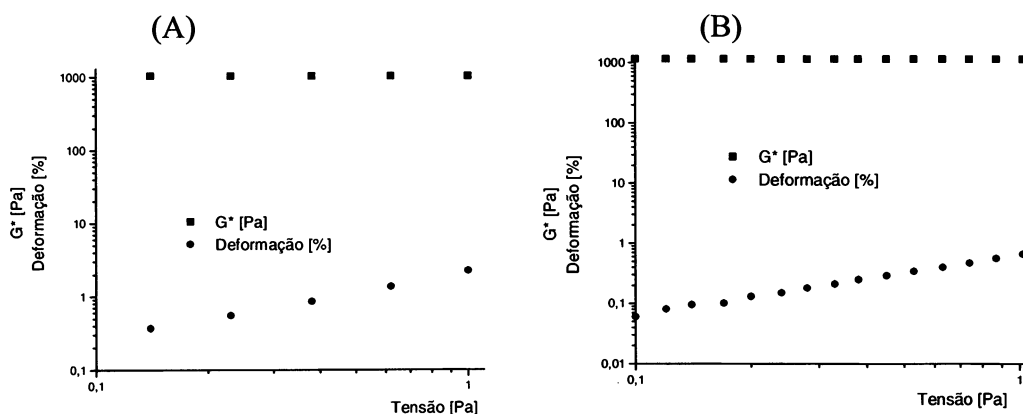


Figura 55 - Representação gráfica da região de comportamento viscoelástico linear para a mistura do amido de cará (50 g.L⁻¹) - galactoxiloglucana HC-I (10 g.L⁻¹). (A) Freqüência de 0,01 Hz e (B) Freqüência de 10 Hz, temperatura de 25°C.

A tensão escolhida para realização dos experimentos de varredura de frequência foi de 0,5 Pa tanto para as amostras de amido de cará isolados a 50 e 60 g.L⁻¹ (Figura 54), como para a mistura amido de cará (50 g.L⁻¹)-galactoxiloglucana (10 g.L⁻¹) (Figura 55).

Na Figura 56 tem-se o espectro mecânico do efeito da frequência sobre os módulos de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica complexa (η^*) em tensão de 0,5 Pa, para as amostras de amido de cará (50 g.L⁻¹) (A); amido de cará (60g.L⁻¹) (B), e mistura amido de cará (50 g.L⁻¹)-galactoxiloglucana (10 g.L⁻¹) (C).

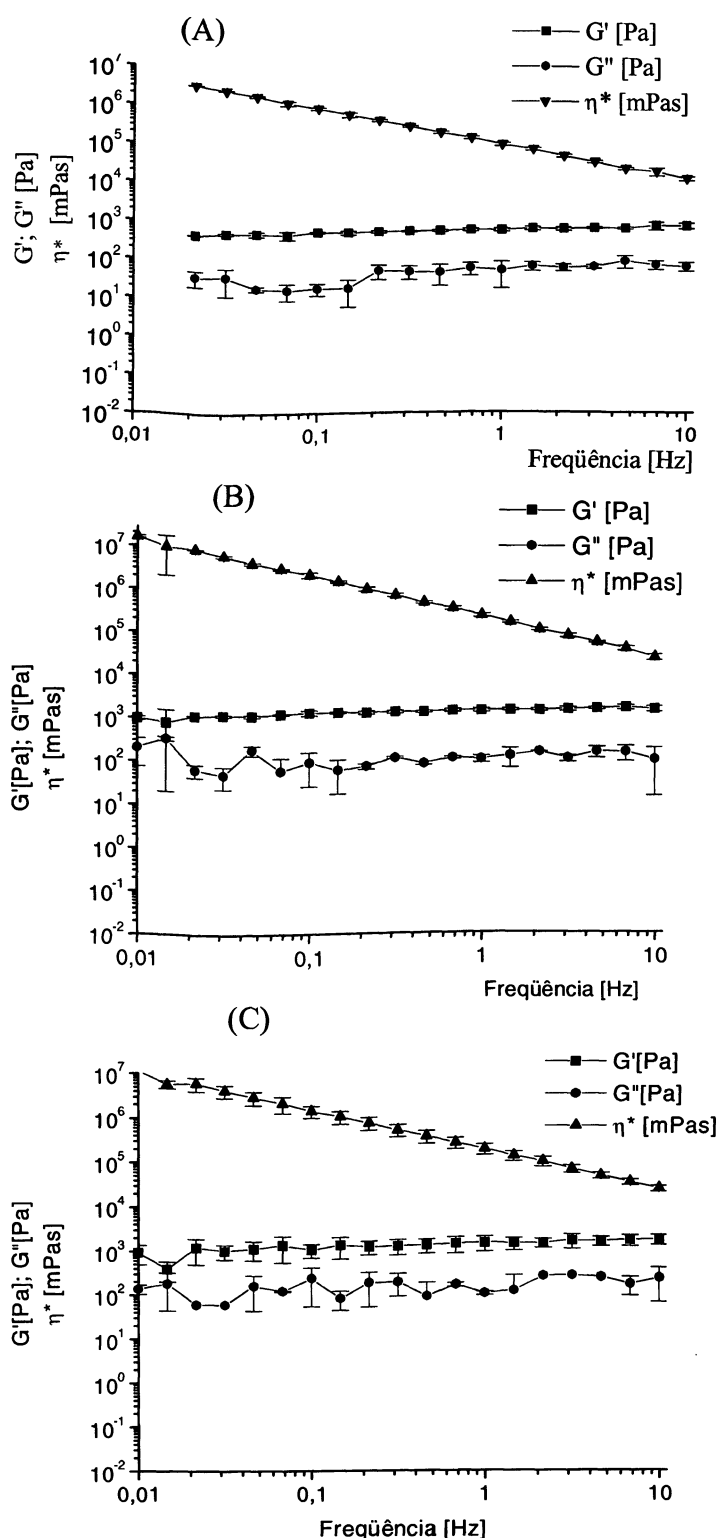


Figura 56 - Efeito da frequência sobre os módulos de cisalhamento de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica (η^*), sob tensão de 0,5 Pa. (A) amido de cará (50 g.L^{-1}); (B) amido de cará (60 g.L^{-1}) e (C) mistura amido de cará (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C .

Pode-se observar que a mistura galactoxiloglucana-amido de cará (Figura 56C) apresenta um valor de G' maior que o amido de cará a 50 g.L^{-1} e, praticamente, o mesmo valor obtido para o amido de cará a 60 g.L^{-1} . Afim de melhor visualizar o comportamento sólido do sistema amido de cará isolado (60 g.L^{-1}) e da mistura amido de cará (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana (10 g.L^{-1}), a $\tan \delta$ é mostrada na Figura 57.

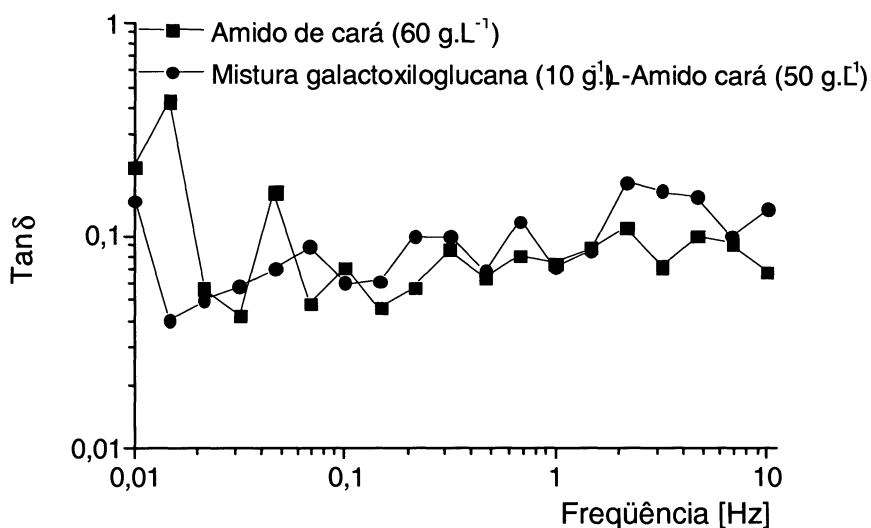


Figura 57 - Efeito da frequência sobre a $\tan \delta$ (δ) sob tensão de 0,5 Pa para o amido de cará (60 g.L^{-1}) e mistura amido de cará (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana HC-I (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C .

Na Figura 57 pode-se observar praticamente o mesmo comportamento sólido para os sistemas contendo amido de cará isoladamente e para a mistura. Isto indica que a galactoxiloglucana apresentou algum nível de interação com o amido de cará, uma vez que a $\tan \delta$ foi mantida praticamente constante em toda a faixa de frequência analisada. Essa sinergia pode ser explicada devido ao alto conteúdo de amilose presente nesse amido (36%).

Foram realizados, também, estudos de interação entre a galactoxiloglucana com amido de mandioca. A região de comportamento viscoelástico linear foi determinada tanto para as amostras de amido de mandioca isoladas como para com a mistura amido de mandioca-galactoxiloglucana. A

tensão escolhida para esses experimento foi de 0,1 Pa. Na figura 58 está mostrado o espectro mecânico que representa o efeito da frequência sobre o módulo de armazenamento, de perda e viscosidade dinâmica para as amostras de amido de mandioca a 50 e 60 g.L⁻¹ e para a mistura entre a galactoxiloglucana (10 g.L⁻¹) - amido de mandioca (50 g.L⁻¹).

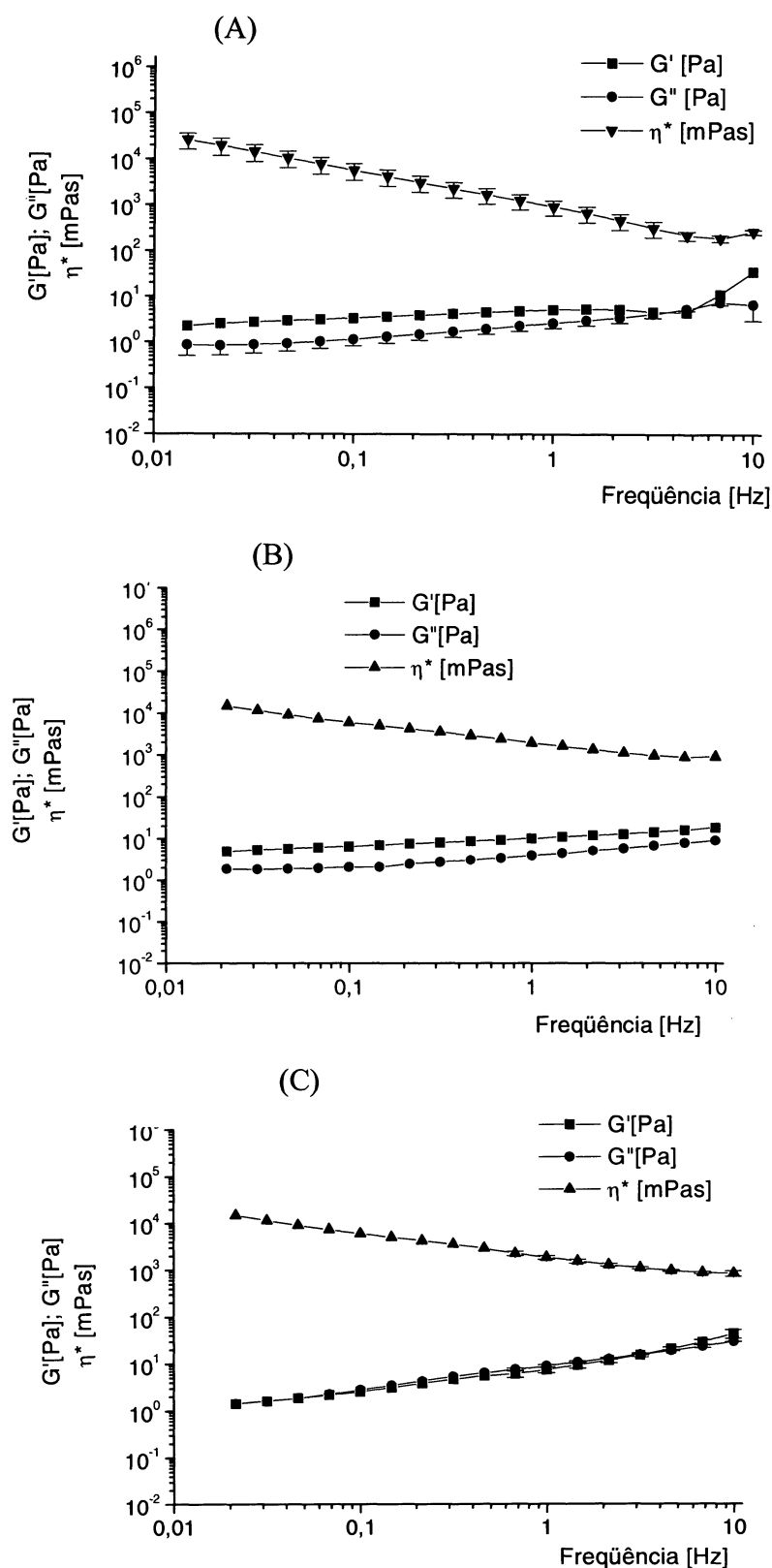


Figura 58 - Efeito da frequência sobre os módulos de cisalhamento de armazenamento (G'), de perda (G'') e viscosidade dinâmica (η^*), sob tensão de 0,1 Pa. (A) amido de mandioca (50 g.L^{-1}); (B) amido de mandioca (60 g.L^{-1}) e (C) mistura amido de mandioca (50 g.L^{-1})-galactoxiloglucana **HC-I** (10 g.L^{-1}), temperatura de 25°C .

Pode-se observar na Figura 58 que a amostra de amido de mandioca apresenta um valor de G' superior quando em sistemas isolados a 50 g.L^{-1} e 60 g.L^{-1} . Aparentemente, por esse amido apresentar um alto teor de amilopectina, isto pode gerar uma interação negativa com a galactoxiloglucana, conforme já observado para as outras amostras de amido com alto teor de amilopectina.

4.3.2.5. Efeito da massa molecular sobre a interação galactoxiloglucanas-amilose.

Para melhor compreender a interação galactoxiloglucana – amidos, foram realizados experimentos utilizando hidrocolóides com diferentes massas moleculares e a mesma concentração de amido de milho sigma rico em amilose (50 g.L^{-1}).

Pode-se observar na Figura 59 que a massa molecular apresenta um importante papel na interação entre a galactoxiloglucana–amilose. As amostras de galactoxiloglucana **HC-I** e **HC-II** que apresentam maior massa molecular, $8,7 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, respectivamente, apresentam as menores $\tan \delta$, indicando interações mais fortes. Já a amostra **HC-V** que mostra menor interação, é a mesma que apresenta menor valor de massa molecular ($6,0 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$). A amostra **TM**, extraída de *Tamarindus indica*, apresenta uma menor interação, mesmo apresentando massa molecular de $9,2 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. Assim além das interações galactoxiloglucana-amido de milho comum apresentadas em literatura por PRABHANJAN e ALI (1995) e YOSHIMURA, TAKAYA e NISHINARI (1999) utilizarem amido de milho com baixo teor de amilose. Assim a amilose, que é molécula responsável pelas interações amido-galactoxiloglucana está em baixa concentração na mistura e a amilopectina, que apresenta efeitos sinérgicos negativos, está em alta concentração. Os autores utilizaram também a galactoxiloglucana obtida de sementes de tamarindo, que devido à ausência da série nova de oligossacarídeos (XXXXG), encontradas até o presente momento apenas em jatobá, apresentaram uma menor rigidez molecular em solução. Essa diferença de 2-3 nm no comprimento de persistência molecular

(L_p), comparando-se moléculas de massas moleculares semelhantes, interfere na sinergia da interação entre os polissacarídeos em estudo.

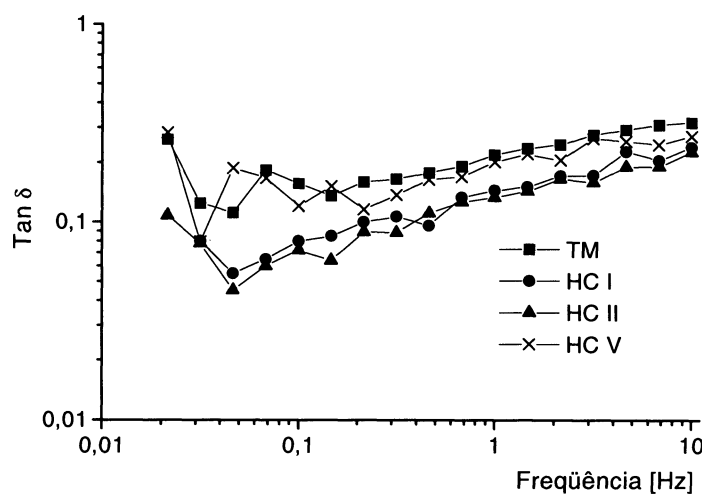


Figura 59 - Efeito da frequência sobre a $\tan \delta$ sob tensão de 0,5 Pa para a mistura entre o amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L^{-1}) - galactoxiloglucanas (10 g.L^{-1}).

4.3.3. INTERFERÊNCIA DA INTERAÇÃO NA DIGESTÃO PELA ENZIMA α -AMILASE

O estudo da interferência da interação sobre a digestão do amido pela enzima α -amilase foi utilizada como estratégia para confirmar a interação entre a galactoxiloglucana e os amidos com alto teor de amilose, uma vez que, teoricamente, a interação reduziria a digestão enzimática do amido que estivesse interagindo com o hidrocolóide. Esses ensaios podem auxiliar a esclarecer os resultados obtidos por ONYECHI, JUDD e ELLIS (1992) sobre a influência da farinha de *Detarium senegalense*, rica em galactoxiloglucana, na redução dos níveis pós-prandiais de glucose e insulina em misturas com alimentos ricos em amidos.

Na Figura 60 estão mostrados os resultados da digestão com enzima α -amilase em sistemas isolados e misturas galactoxiloglucana **HC-I** e amidos. Nesses experimentos as amostras foram submetidas a uma taxa de

cisalhamento de 60 s^{-1} , na ausência e presença da enzima α -amilase (Novozyme), sendo avaliada a redução da viscosidade como um parâmetro da atividade enzimática. Para facilitar a visualização da perda de viscosidade e quantificar a ação enzimática, foram construídos gráficos que relacionam a viscosidade antes e após o tratamento enzimático. Para a mistura, foram descontados dos valores de viscosidade do sistema galactoxiloglucana-amido, a viscosidade da galactoxiloglucana **HC-I** isolada.

A Figura 60 (A, B, C, D e E) mostra a % de perda de viscosidade para as amostras de amido de milho com alto teor de amilose (Fig. 60A), amido de milho comum (Fig. 60B), amido de milho com alto teor de amilopectina (Fig. 60C), amido de cará (Fig. 60D) e amido de mandioca (Fig. 60E).

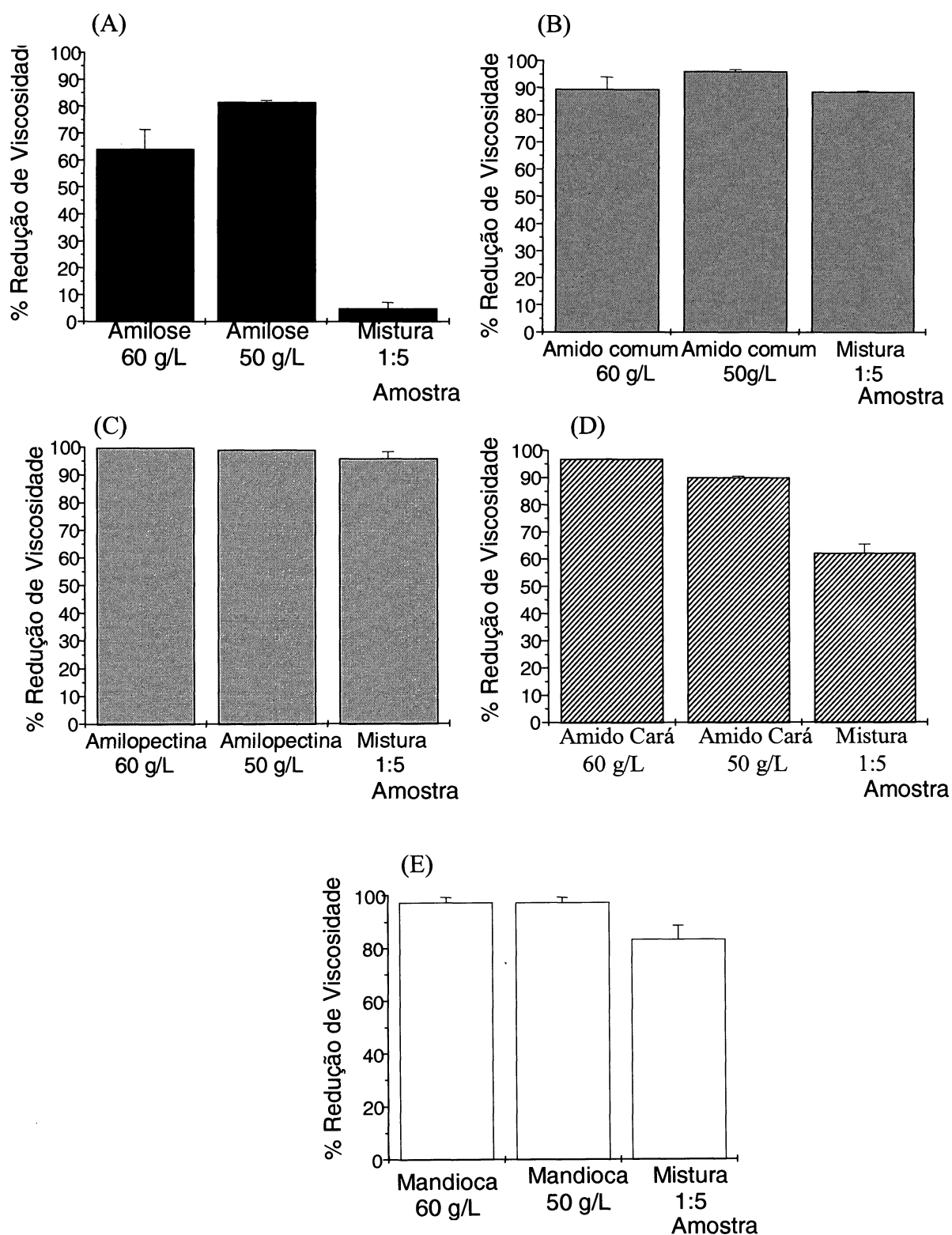


Figura 60 - Porcentagem de redução de viscosidade para as amostras de amido (60 g.L^{-1}); amido (50 g.L^{-1}) e mistura galactoxiloglucana (10 g.L^{-1})-amido (50 g.L^{-1}). (A) amido de milho com alto teor de amilose; (B) amido de milho comum; (C) amido de milho com alto teor de amilopectina; (D) amido de cará e E – amido de mandioca.

Pode-se observar na Figura 60A que o amido rico em amilose foi muito pouco hidrolisado (< 7%) pela enzima α - amilase quando em mistura com a galactoxiloglucana, enquanto o amido isoladamente apresentou ~82 % de redução de viscosidade para a amostra a 50 g.L⁻¹ e ~60 % para a concentração de 60 g.L⁻¹. A amostra de amido de milho comum (Figura 60B) em mistura com a galactoxiloglucana apresentou valores de redução de viscosidade quase iguais ao do amido comum a 60 g.L⁻¹ (~90%). A amostra de amido de milho com alto teor de amilopectina (Figura 60C) foi praticamente 100% hidrolisada, pois, quando descontada a viscosidade da galactoxiloglucana no sistema, observa-se que ocorreu quase 100% de redução de viscosidade.

Na Figura 60D, a amostra de amido de cará apresentou uma redução de 62% de viscosidade. Assim, o amido de cará que apresenta 36% de amilose em sua composição tem a capacidade de interagir com a galactoxiloglucana (determinado reologicamente). O sistema amido-hidrocolóide gelatinizado gerou a inibição da degradação enzimática. Na Figura 60E observa-se que ocorreu a redução de 83% da viscosidade da amostra de amido de mandioca, que como demonstrado anteriormente apresenta alto teor de amilopectina.

Assim, as amostras com altos teores de amilose sofreram uma menor degradação enzimática que as amostras mais ricas em amilopectina, indicando que a galactoxiloglucana interfere na digestão de amidos com altos conteúdos de amilose.

4.3.4. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GALACTOXILOGLUCANA – AMILOSE POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.

E por fim, para confirmar a interação da galactoxiloglucana – amilose foram preparados géis de amido de milho com alto teor de amilose a 50 e 60 g.L⁻¹, isoladamente e em misturas de galactoxiloglucana-amido de milho rico em amilose nas mesmas proporções estudadas por reologia. Após 24 horas sob refrigeração as amostras foram liofilizadas. Realizou-se a análise

termogravimétrica dos sistemas isolados ou em misturas em taxas de aquecimento de 5,0; 10; 20 e 40°C.min⁻¹ e foram calculadas as E_a envolvidadas nas perdas de massas.

Na Figura 61 pode-se observar a E_a das amostras de amido de milho com alto teor de amilose a 60 g.L⁻¹, galactoxiloglucana HC-I (10 g.L⁻¹) e mistura entre galactoxiloglucana (10 g.L⁻¹)-amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L⁻¹), em porcentagens de conversão ou perdas de massas de 5, 10, 20, 30, 40 e 50%.

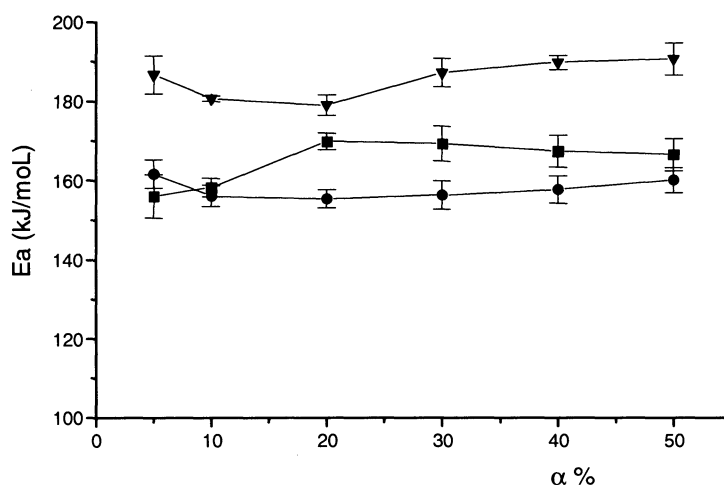


Figura 61 - Energia de ativação (E_a) em função do fator de conversão ($\alpha\%$) para a amostra liofilizada de amido de milho com alto teor de amilose (60 g.L⁻¹) (■), galactoxiloglucana HC-I (10 g.L⁻¹) (●) e mistura amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L⁻¹) - galactoxiloglucana HC-I (10 g.L⁻¹) (▼).

Como é possível observar na Figura 61, a E_a em função dos fatores de conversão apresentados é superior para a mistura galactoxiloglucana (10 g.L⁻¹) – amido de milho com alto teor de amilose (50 g.L⁻¹). Apesar dessa análise ter sido realizada em estado sólido, a mistura hidrocolóide-amido mostrou uma maior agregação molecular, o que poderia resultar em um aumento da E_a necessária para a degradação do sistema. Esses resultados confirmam a interação galactoxiloglucana–amido de milho rico em amilose.

As diferentes técnicas utilizadas nesse trabalho vem a colaborar com a confirmação da hipótese de que a interação entre as galactoxiloglucanas e amidos é dependente do teor de amilose presente no amido, e que essa interação

pode apresentar aspectos sinérgicos negativos, caso o amido apresente altos teores de amilopectina. Esses dados vem a confirmar o trabalho iniciado por FREITAS (2000), e contradizer os dados apresentados por YOSHYMURA, TAKAYA e NISHINARI (1999) de que a galactoxiloglucana não apresenta interações sinérgicas com amidos. Outras perspectivas de avaliação da interação também podem ser importantes, como a utilização de análises térmicas e os ensaios de competição entre a galactoxiloglucana-iodo pela amilose, como novas abordagens para confirmar a interação entre os polissacarídeos, assim como as análises de digestão enzimática pela α -amilase, que além de auxiliarem na confirmação do mecanismo de interação, mostrando efeito redutor da digestão dos amidos com altos teores de amilose, quando misturados com galactoxiloglucana, podem explicar os trabalhos de literatura que mostram redução de glicemia em alimentos ricos em amidos cozidos na presença da galactoxiloglucana (ONYECHI, JUDD e ELLIS, 1998).

4.4. ANÁLISES DE CITOTOXICIDADE

4.4.1. AGAR “OVERLAY”

A avaliação toxicológica compreende a análise dos dados toxicológicos de uma substância ou composto químico com o objetivo de classificá-lo toxicologicamente, e ao mesmo tempo, fornecer informações a respeito da forma correta de seu emprego, assim como medidas preventivas e curativas quando do uso inadequado. Essa metodologia é alternativa a experimentação animal para irritação ocular e de mucosas (INVITTOX, 1990), sendo utilizada até o presente, principalmente para análise de excipientes, produtos cosméticos e detergentes (O'BRIEN et al., 1990). Para explorar as possíveis aplicações futuras em alimentos, cosméticos ou outras aplicações biotecnológicas, iniciou-se um estudo da citotoxicidade da galactoxiloglucana nativa obtida de sementes de *Hymenaea courbaril* (**HC-I**) e do polissacarídeo oxidado **HC-IOX5** em concentrações de 1,25 - 50 g.L⁻¹. Observa-se que a 50g.L⁻¹ o polissacarídeo forma um gel extremamente forte, o que limitou os testes a essa concentração (50 g.L⁻¹) máxima de **HC-I**.

As células utilizadas nestes ensaios, os fibroblastos, são o principal tipo celular encontrado na derme. A função primária deste tipo de célula é a síntese de proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno, a fibronectina, a elastina, as proteoglicanas e suas enzimas degradativas. Elas têm sido utilizadas por seu vigor e capacidade de crescimento em culturas, comparando-as a outros tipos celulares.

A Figura 62 mostra uma placa controle do teste ágar "overlay". Na Figura 62A é mostrado o controle negativo com solução salina, onde não pode ser observada a formação do halo de citotoxicidade. A Figura 62B mostra controle positivo, com discos de látex, que apresentam alto grau de citotoxicidade, gerando, como pode ser observado, um halo de citotoxicidade, onde as células mortas não incorporam mais o corante vital vermelho neutro, apresentando-se esbranquiçadas. A Figura 62C mostra uma placa com ausência de halo de citotoxicidade, referente a amostra **HC-I** a 50 g.L^{-1} .

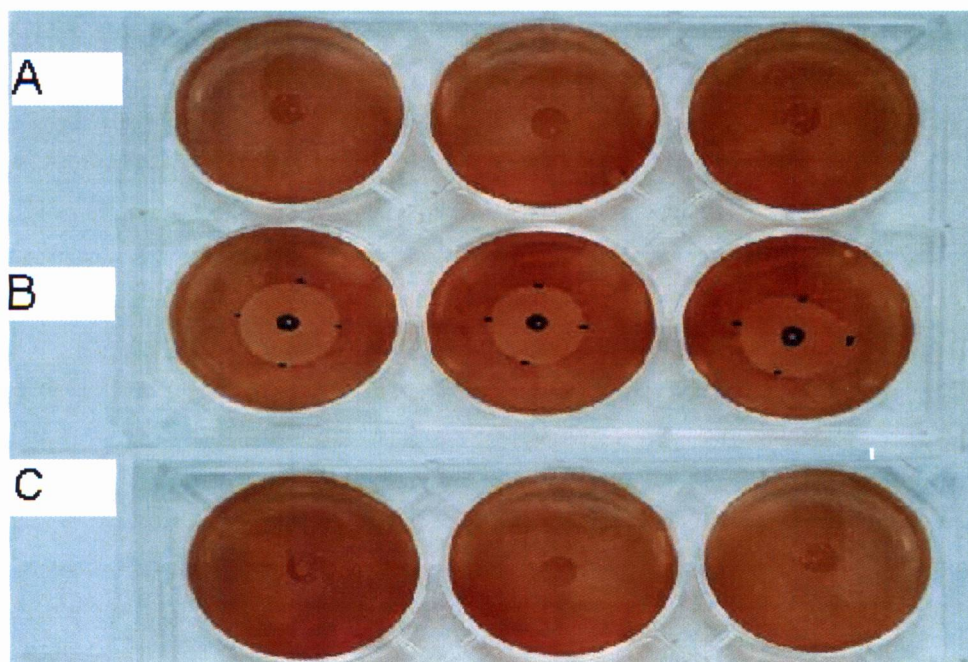


Figura 62 – Análise esquemática de controle negativo (A), controle positivo (B) e galactoxiloglucana **HC-I** a 50 g.L^{-1} (C) do ensaio de citotoxicidade celular ágar "overlay".

Os resultados obtidos demonstraram que nenhuma das amostras testadas apresentou sinais de citotoxicidade, mesmo em altas concentrações de polissacarídeo. Apesar desses resultados, para confirmar a ausência, foram realizados ensaios de crescimento e viabilidade celular, utilizando células de fibroblasto murino L929, conforme apresentado a seguir.

4.4.2. ENSAIO DE CRESCIMENTO E VIABILIDADE CELULAR

Foram realizados ensaios de crescimento e viabilidade celular por 48 e 96 horas, conforme apresentado nas Figuras 63 a 67, realizando ensaios em triplicata de amostras independentes, totalizando 9 análises. Os resultados apresentados nas Figuras 63 a 67 representam a média e o erro padrão dos ensaios.

A análise da viabilidade foi realizada comparando o número de células vivas pelo número total de células e multiplicando o resultado obtido por 100. Pode-se observar que as soluções de galactoxiloglucana **HC-I**, em diferentes concentrações, apresentaram a mesma viabilidade do controle em 48h de incubação em estufa com 5% de CO₂, a 37°C.

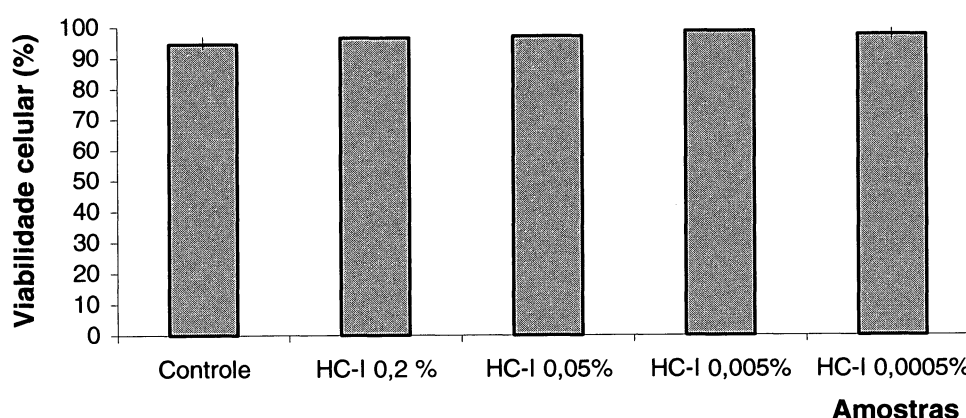


Figura 63 – Viabilidade celular de células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com a amostra **HC-I** em concentrações de 0,2 a 0,0005% após 48 horas de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C.

Pode-se observar na Figura 64 que o crescimento celular, monitorado pela contagem das células viáveis, utilizando o corante vital Azul de tripan, após 48 horas, não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

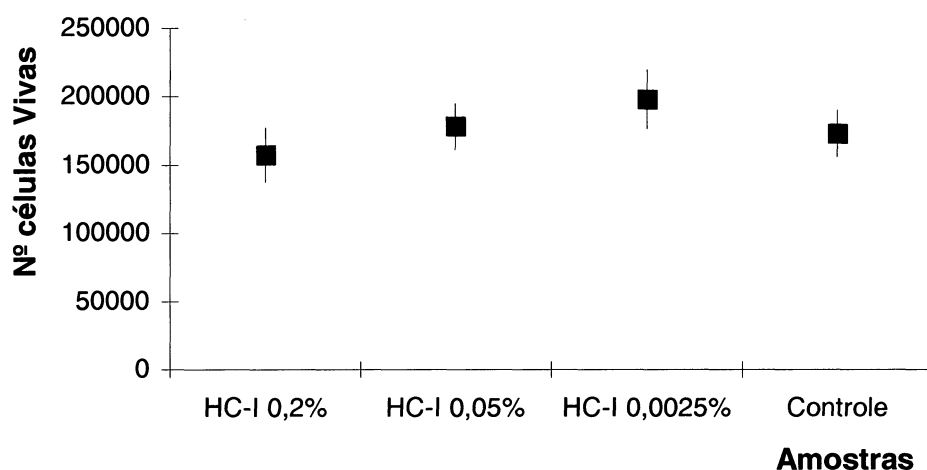


Figura 64 – Crescimento das células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com a amostra **HC-I** em concentrações de 0,2 a 0,0025% após 48 horas de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C.

A análise da viabilidade celular após 96 horas de cultivo, mostrada na Figura 65, demonstra que a galactoxiloglucana não alterou o perfil de viabilidade das células em estudo.

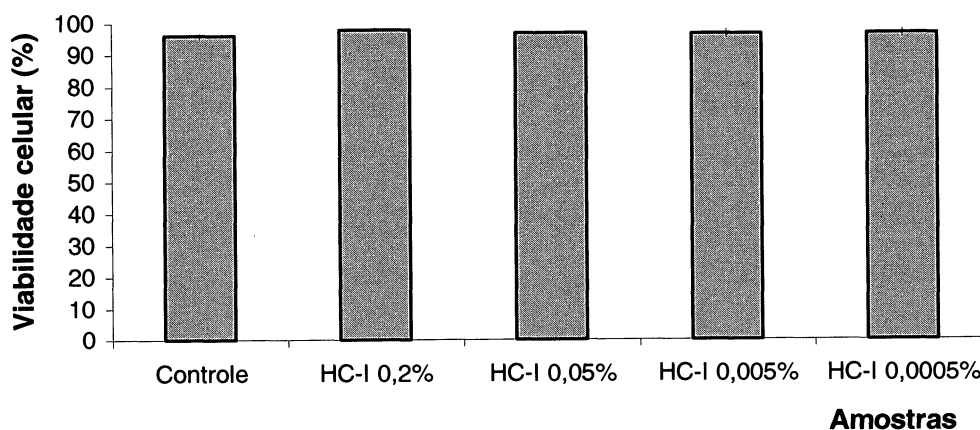


Figura 65 – Viabilidade celular de células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com a amostra **HC-I** em concentrações de 0,2 a 0,0005% após 96 horas de cultivo em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

Pode-se observar na Figura 64 que ocorreu uma redução do número de células viáveis após 96 horas de cultivo para as soluções de galactoxiloglucana em estudo, porém não houve interferência na viabilidade celular (Figura 65), que se manteve constante em praticamente 100%. Uma vez que o número de células viáveis não foi reduzido, entende-se que a galactoxiloglucana de alguma forma interage, direta ou indiretamente, com as células de fibroblasto murino L929, reduzindo o crescimento celular, porém sem alterar a viabilidade, não sendo considerado como citotóxico.

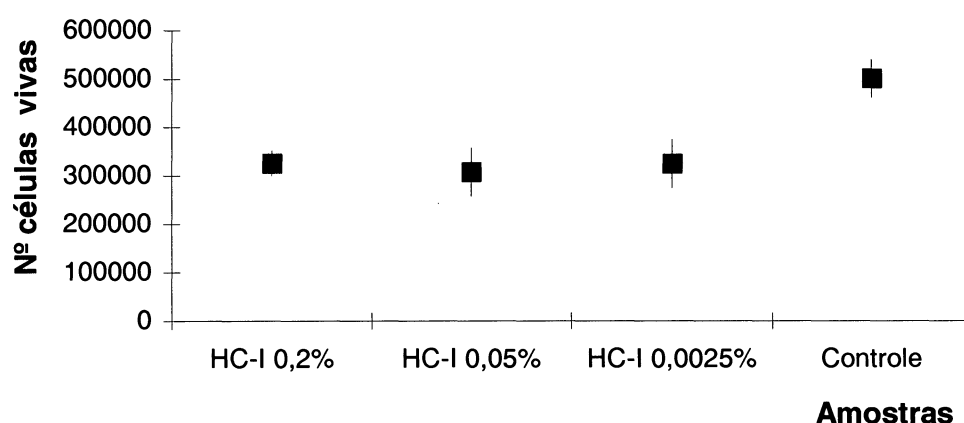


Figura 66 – Crescimento das células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com a amostra **HC-I** em concentrações de 0,2 a 0,0025% após 96 horas de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C.

Na Figura 67 pode ser observado para a amostra oxidada **HC-IOX5** um ligeiro aumento no crescimento celular, sem significado estatístico, quando comparada a uma mesma concentração de **HC-I**. Os valores de crescimento após 96 horas de cultivo apresentam-se inferiores aos da amostra controle. Também, neste caso não ocorreu redução da viabilidade celular, cujo valor é de, aproximadamente, 100%.

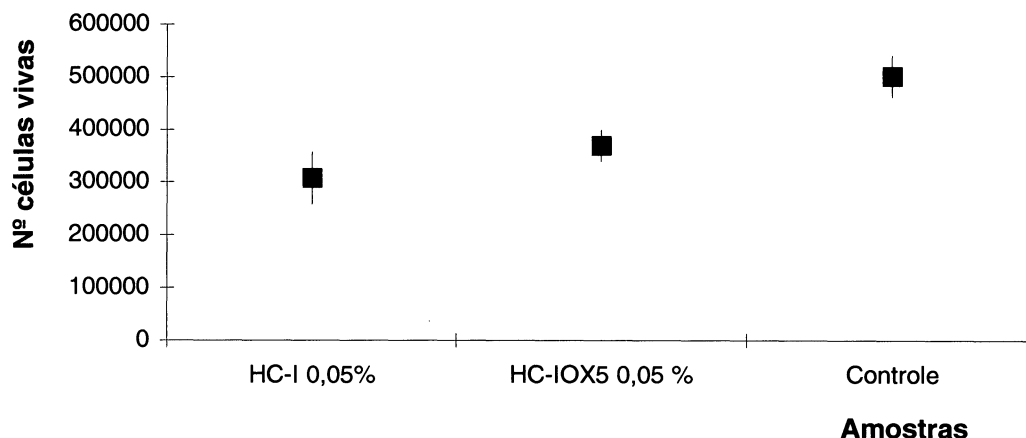


Figura 67 – Crescimento das células de fibroblasto murino (L929) em meio controle e suplementado com as amostras **HC-I** (0,05%) e **HC-IOX5** (0,05%) após 48 horas de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C.

Dessa forma foi possível observar que a galactoxiloglucana obtida de sementes de *H. courbaril* (Jatobá) não apresenta citotoxicidade nas concentrações utilizadas, o que demonstra que esse polissacarídeo poderia ser utilizado para fins de aplicação tópica em pele, mucosas e conjuntiva, sem apresentar toxicidade. Entretanto para confirmar os estudos de toxicidade, principalmente para avaliação da toxicidade oral, seria necessário realizar os testes de toxicidade aguda e crônica em modelos animais, através da determinação da DL₅₀ ou da dose máxima não letal (DMNL).

5.0. CONCLUSÕES

As galactoxiloglucanas de sementes de *H. courbaril* de diferentes locais do Brasil apresentam diferenças pouco significativas em termos de composição dos oligossacarídeos, sendo a série nova (XXXXG), exclusiva dessa espécie, quando comparada com a de *T. indica*.

As análises por HPSEC-MALLS/IR das galactoxiloglucanas de *H. courbaril* mostraram presença de agregados em solução. Porém, após o aquecimento a 85°C por 2 h durante a etapa de solubilização das amostras, apresentaram redução da M_w e do R_{gw} , o que poderia indicar agregações laterais. Após o aquecimento, a viscosidade intrínseca predita é comparável às obtidas por análises viscosimétricas. A confirmação da presença de agregados macromoleculares foi obtida pela redução, após o aquecimento, da razão característica (C_∞) e do comprimento de persistência (L_p).

A diferença na distribuição das unidades de xilose ao longo da cadeia principal resulta também em uma maior distribuição das unidades de galactose, que é, provavelmente, a responsável pela diferença na rigidez molecular entre as galactoxiloglucanas obtidas de sementes de *H. courbaril* e de *T. indica*.

A galactoxiloglucana **HC-I**, após oxidação seletiva, formou poliânions com 2,8; 5,4 e 9,5% de ácidos urônicos. Nas análises por HPSEC-MALLS foi observada uma redução da M_w , em todos os derivados oxidados, e a inserção de grupos ácidos na molécula, também, gerou uma alteração da conformação passando de ao acaso no polímero nativo, para estruturas em bastão nos modificados. Análises da cinética de degradação térmica das amostras **HC-IOX3**, **5** e **10** mostraram que, o aumento do nível de oxidação, resulta em um aumento da E_a do processo degradativo. A constante de velocidade da degradação, no começo do processo de perda de massa, aumenta de forma dependente do teor de oxidação e pode ser utilizada como uma técnica para diferenciar polímeros oxidados, com pequenas diferenças no grau de oxidação. Uma vez que ocorreu grande alteração da conformação e massa molecular, esse poliânion não foi utilizado para estudar o mecanismo de interação galactoxiloglucana-amidos.

Os teores de amilose foram determinados como sendo para o amido de milho comum (27,5%), amido de milho com altos teores de amilose (80%), amido de milho com altos teores de amilopectina (traços), amido de cará (36%) e amido de mandioca (23%). Nos estudos de cinética de gelatinização, observou-se que a E_a do processo depende diretamente do conteúdo de amilose no sistema, sendo entre os amidos estudados maior para a amostra de amido de cará.

Através dos ensaios de competição entre a galactoxiloglucana (**HC-I**)-iodo-amilose determinou-se as proporções teóricas de maior interação entre hidrocolóide-amido, e que foram confirmadas por ensaios reológicos dinâmicos, onde a melhor interação ocorreu em proporção amido-galactoxiloglucana de 5:1. Estudos comparativos com os outros amidos mostraram uma dependência do teor amilose para as interações sinérgicas.

Nos estudos de interação galactoxiloglucana-amido de milho rico em amilose, observamos que é dependente, de forma direta, da M_w do hidrocolóide. Porém, moléculas de tamarindo, com massas moleculares similares as de uma galactoxiloglucana de Jatobá, apresentam interações menos sinérgicas, provavelmente, devido à menor rigidez para a molécula de Tamarindo.

A digestão pela α -amilase das amostras de amido rico em amilose é reduzida quando em misturas com galactoxiloglucana (**HC-I**). Entretanto, para as misturas contendo amido rico em amilopectina observou-se um efeito menos pronunciado quanto à inibição da degradação enzimática.

As análises térmicas de amostras no estado sólido mostraram que as misturas amido de milho rico em amilose-galactoxiloglucana (**HC-I**) apresentam a formação de agregados moleculares estáveis, que foram mantidos após a liofilização, e que geraram uma estrutura com propriedades térmicas diferentes das amostras iniciais, apresentando maior E_a para degradação.

Dessa forma podemos concluir que por diferentes métodos analíticos foi comprovada a interação sinérgica positiva entre a galactoxiloglucana e amidos com altos teores de amilose e interação sinérgica negativo em amidos com altos teores de amilopectina. Essa interação molecular é mais pronunciada com o aumento da massa molecular e da rigidez da galactoxiloglucana. Essa interação física é estável, uma vez que em estudos de degradação térmica a

mistura apresenta uma maior E_a quando comparada aos sistemas isolados, indicando que a interação permanece estável mesmo em análises por estado sólido. A interação também reduz a digestão dos amidos pela enzima α -amilase, de forma dependente do conteúdo de amilose na mistura. Assim, a galactoxiloglucana aparentemente atua através de um mecanismo de inibição não competitivo, pois em sistemas ricos em amilopectina não foi observada a inibição da atividade enzimática devido apenas a presença do hidrocolóide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, J. **Estrutura e interação de galactomanana de *Cassia fastuosa* – xantana**. Curitiba, 1999. Tese de mestrado em Ciências-Bioquímica, UFPR
- ALONSO-MOUGÁN, M.; FRAGA, F.; MEIJIDE, F.; RODRÍGUEZ-NÚÑEZ; E. e VÁZQUEZ-TATO, J. Aggregation behaviour of polygalacturonic acid in aqueous solution. **Carbohydr. Polymers**, v. 51, n.1, p.37-45, 2003.
- ALVES, R.M.L.; SILVA, R.S.S.F. e GROSSMANN, M.V.E. Gelling properties of extruded yam (*Dioscorea alata*) starch. **Food Chem.**, v. 67, n. 2, p. 123-127, 1999.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed., Arlington, TX: Association of Official Analytical Chemistry, 1995.
- ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**. Oxford University, 4^a ed., 1992.
- BARNES, A.; HUTTON, J.F. e WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. Netherlands: Elsevier, 1989, 199p.
- BEER, M.U.; WOOD, P.J. e WEISZ, J. A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constant of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. **Carbohydr. Polymers**, v. 39, p. 377-380, 1999.
- BELLO-PÉREZ, L.A.; PARADES-LÓPES, O.; ROGER, P. e COLONNA, P. Molecular characterization of some amylopectins. **Cereal Chem.**, v. 73, n. 1, p. 12-17, 1996.
- BELLO-PÉREZ, L.A.; ROGER, P.; COLONNA, P. PARADES-LÓPES, O. Laser light scattering of high amylose and high amylopectin materials, stability in water after microwave dispersion, **Carbohydr. Polymers**, v. 37, p. 383-394, 1998.
- BHATTACHARYA, M. e HANNA, M.A. Kinetics of starch gelatinization of cooked rice. **Starch/Stärke**, v. 52, p. 764-766, 1987.
- BIZOT, H.; LE BAIL, P.; LEROUX, B.; DAVY, J.; ROGER, P. e BULEON, A. Calorimetric evaluation of the glass transition in hydrated, linear and branched polyanhydroglucose compounds. **Carbohydr. Polymers**, v. 32, p. 33-50, 1997.
- BLUMENKRANTZ, N. e ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acid. **Anal. Biochem.**, v. 54, p. 484-489, 1973.
- BROWN, M.E. **Introduction to thermal Analysis – Techniques and applications**. London, Chapman and Hall, p. 1-21, 1988.

BURROS, B. C.; YOUNG, L.A. e CARROAD, P.A.. Kinetics of corn meal gelatinization at high temperature and low moisture. **J. of Food Sci.**, v. 52, p. 1372-1376, 1987.

BUCKERIDGE, M.S. e DIETRICH, S.M.C. Galactomannan from Brazilian legume seeds. **Revta. Brasil. Bot.**, v. 13, p. 109-113, 1990

BUCKERIDGE, M. S.; ROCHA, D. C.; REID, J. S. G. e DIETRICH, S. M. C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfii* from savanna and forest populations. **Physiol. Plantarum**, v. 86, p. 145-151, 1992.

BUCKERIDGE, M.S.; CROMBIE, H.J.; MENDES, C.J.M.; REID, J.S.G.; GIDLEY, M.J. e VIEIRA, C. C. J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydr. Res.**, v. 303, p. 233-237, 1997.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V. e BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **Int. J. of Biol. Macrom.**, v. 23, p. 85-112, 1998.

CHEETHAM, N.W.H. e TAO, L. Amylose conformational transitions in binary DMSO/water mixtures. **Carbohydr. Polymers**, v. 35, p. 287-295, 1998.

CHEN, Y.; FRINGANT, C.; RINAUDO, M. Molecular characterization of starch by SEC: dependance of the performances on the amylopectin content. **Carbohydr. Polymers**, v. 33, p. 73-78, 1997.

CHENG, Y.; BROWN, K.M. e PRUD'HOMME, R.K. Characterization and intermolecular interactions of hydroxypropyl guar solutions. **Biomacromol.**, v.3, p. 456-461, 2002.

CHRASTIL, J. Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. **Carbohydr. Res.**, v. 159, p. 154-158, 1987.

DE LIMA, D.U. e BUCKERIDGE, M.S. **Carbohydr. Polymers**, v.46, p. 157-163, 2003.

De NOOY, A.E.J.; BESEMER, A.C. e BEKKUM, H.V. Highly selective TEMPO mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.**, v. 113, p. 165-166, 1994.

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

De NOOY, A.E.J.; BESEMER, A.C.; BAKKUM, H. V.; DIJK, J.A.P.P.V. e SMIT, J.A.M. TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on dimensions of the obtained polyelectrolyte chains.

Macromol., v.29, p. 541-6547, 1996.

DICKENS, B e FLYNN, J.H. **Thermogravimetric Applied to Polymer Degradation Kinetics**. In: Polymer Characterization. ACS, New York. p. 209-232, 1983.

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

DONOVAN, J. W.; LORENZ, K. e KULP, K. Differential scanning calorimetry of heat-moisture treated wheat and potato starches. **Cereal Chem.**, v. 60, n.5, p.381-387, 1983.

EWING, G.M. **Polarimetria e dispersão óptico-rotatória**. In: Métodos instrumentais de análise química. v. 1. São Paulo: Edgard Blucher. 1982, p. 189.

FLORY, P.J. **Principles of polymer chemistry**. Cornell University Press: Ithaca, NY, 1953.

FREITAS, R. A. **Estrutura e interação de galactoxiloglucana – amido de milho**. Curitiba, 2000. Tese de Mestrado em Ciências – Bioquímica, UFPR.

GANTER, J.L.M.S. **Estudos dos carboidratos de sementes de Mimosa scabrella (Baracatinga): Análise estrutural e propriedades reológicas**. Curitiba, 1991. Tese de Doutorado em Ciências – Bioquímica, UFPR.

GHAZY, F.; EL-BARADIE, B.; EL-CHAER AL. e EL-MEKAWAY, F. Static laser light scattering (SLLS) investigations of the scattering parameters of a synthetic polymer. **Optics & Lasers Technology**, v. 31, p. 447-453, 1999.

GHIASI, K.; HOSENEY, C. e VARRIANO-MARSTON, E. Gelatinization of Wheat Sarch. III. Comparison by Differential Scanning Calorimetry and Light Microscopy. **Cereal Chem.**, v. 59, n. 4, p. 258-262, 1982.

GIDLEY, M.J.; LILLFORD, P.J.; ROWLANDS, D.W.; LANG, P.; DENTIN, M.; CRESCENZI, V.; EDWARDS, M.; FANUTTI, C. e REID, J.S.G. Structure and solution properties of tamarind seed polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, v. 214, p. 299-314, 1991.

GIDLEY, M.J. e ROBINSON, N.J. **Techniques for studying interaction between polysaccharides**. In: Methods in Plant Biochemistry. v.2 DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. (Ed.) New York: Academic Press, 1990, p. 607-642.

GIDLEY, M.J. e BULPIN, P.V. Crystallisation of malto-oligosaccharides as models of the crystalline forms of starch: Minimum chain –length requirement for the formation of double helices. **Carbohydr. Res.**, v.161, p. 291-300, 1987.

GUILBOT, A. e MERCIER, C. **Starch**. In: *The Polysaccharides*. v. 3 ASPINALL, G.O. (Ed.) London: Academic Press, 1985, p. 210-283.

GÓMEZ, C.; NAVARRO, A.; MANZANARES, P.; HORTA, A. e CARBONELL, J.V. Physical and structural properties of barley (1→3), (1→4)-β-D-glucan. Part II. Viscosity, chain stiffness and macromolecular dimensions. **Carbohydr. Polymers**, v. 32, p. 17-22, 1997.

GUNARATNE, A. e HOOVER, R. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. **Carbohydr. Polymers** (In press), 2002.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annu. Rev. Plant Mol. Biol.**, v. 40, p. 139-168, 1989.

HENSEL, A. & MEIER, K. Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds. **Planta Medica**, v. 65, p. 395-399, 1999.

HOOVER, R. & VASANTHAN, T. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical of cereal, legume, and tuber starches. **Carbohydr. Res.**, v. 252, n. 22-53, 1994.

HUGGINS, M. Theory of solutions of high polymers. **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 64, p. 1712, 1942.

JODELET, A., RIGBY, N.M. & COLQUHOUN, I.J. Separation and NMR structural characterisation of singly branched α-dextrins which differ in the location of the branch point. **Carbohydr. Res.**, v. 312, p. 139-151, 1998.

KAVANAGH, G.M e ROSS-MURPHY, S.B. Rheological characterization of polymer gels. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, p. 533-562, 1998.

KAWASAKI, N.; OHKURA, R.; MIYAZAKI, S.; UNO, Y.; SUGIMOTO, S. e ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. **Internat. J. Pharm.**, v. 181, p. 227-234, 1999.

KIM, Y. e WANG, S. S. Starch cooking with limited water as affected by zein and guar gum. **J. of Food Sci.**, v. 64, n. 1, p. 133-135, 1999.

KULICKE, W-M.; EIDAM, D.; KATH, F.; KIX, M. e KULL, A.H. Hydrocolloids and rheology: regulation of visco-elastic characteristics of waxy rice starch in mixture with galactomannans. **Starch/Starke**, v. 48, n. 3, p. 105-114, 1996.

KOOIMAN, P. On the occurrence of amyloids in plant seeds. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 9, p. 208-219, 1960.

LANG, P. e BURCHARD, W. Structure and aggregation behavior of tamarind seed polysaccharide in aqueous solution. **Makromol. Chem.**, v. 194, p. 3157-3166, 1993.

LANG, P. e KAJIWARA, K. Investigations of the architecture of tamarind seed polysaccharide in aqueous solution by different scattering techniques. **J. Biomater. Sci. Polymer Edn.**, v. 4, n. 5, p. 517-528, 1993.

LAPASIN, R. e PRICL, S. **Rheology**. In:____ Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications. London: Blackie Academic & Professional, 1995a, p. 164-249.

LAPASIN, R. e PRICL, S. **Rheology of polysaccharide systems**. In:____ Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications. London: Blackie Academic & Professional, 1995b, p. 251-293.

LE LAY, P. e DELMAS, G. Investigation of the physical network of amorphous amylose by slow calorimetry. **Carbohydr. Polymers**, v. 37, p. 49-60, 1998.

LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S. e SIERAKOWSKI, M.R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Jatobá). **Ciência e Cultura**, v. 45, n. 1, p. 22-26, 1993.

LIMA, N.N.; RECHIA, C.G.V.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. e SIERAKOWSKI, M.R. Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n. 6, p. 413-415, 1995.

LIMA, N.N.; QUOIRIN, M.; WOLLINGER, W.; KRÜGER, O. e SIERAKOWSKI, M.R. Binary agar-galactoxyloglucan gels as supports for plant tissue culture. **Nat. Polymers Composites**, p. 114-118, 2000.

LIMA, N.N.; QUOIRIN, M.; NADDAF, Y.G.; WILHELM, H.M.; RIBAS, L.L.F. e SIERAKOWSKI, M. -R. A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species *Hymenaea courbaril* for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. **Plant Cell Rep.**, v. 21, p. 402-407, 2003.

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

MALI, S.; GROSSMANN, V.E.; GARCIA, M.A.; MARTINO, M.N. e ZARITZKY, N.E. Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydr. Polymers**, v. 50, p. 379-386, 2002.

MARCHANT, J.L e BLANSHARD, J.M.V. Studies of the dynamics of the gelatinization of starch granules employing a small angle light scattering system. **Starch/Stärke**, 30, p. 257-264, 1978

MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: estrutura, modificações e propriedades**. Curitiba, 1999. Tese de Mestrado em Bioquímica, UFPR.

MARTIN, S.; SOUZA-LIMA, M.M.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Treatment of jatoba seed galactoxyloglucan with β -D-galactosidase. **Nat. Polymers Composites**, p. 166-170, 2000.

MARTIN, S.; FREITAS, R.A.; OBAYASHI, E. e SIERAKOWSKI, M. –R. Physico-Chemical aspects of galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* and its tetraborate complex. **Carbohydr. Polymers**, v.54, n.3, p. 287-295, 2003.

MCPHERSON, A.E. e JANE, J. Comparison of waxy potato with other root and tuber starches. **Carbohydr. Polymers**, v. 40, p. 57-70, 1999.

MILLARD, M.M.; DINTZIS, F.R.; WILLETT, J.L. e KLAVONS, J.A. Light-Scattering molecular weights and intrinsic viscosities of processed waxy maize starches in 90% dimethyl sulfoxide and H₂O. **Cereal Chem.**, v. 74, n. 5, p. 687-691, 1997

NAÉ, H.N. **Introduction of rheology**. In: Rheological properties of cosmetics and toiletries. LABA, D. (Ed.) New York: Rheox, Inc, p. 9-33, 1993.

ONYECHI, U. A.; JUDD, P.A. e ELLIS, P.R. African plant foods rich in non-starch polysaccharides reduce postprandial blood glucose and insulin concentrations in healthy human subjects. **Brit. J. Nut.**, v. 80, p. 419-428, 1998.

PAULY, M.; FREIS, O. e PAULY, G. Galactomannan and xyloglucan: bio-active polysaccharides. **Cosmetics & Toiletries**, v. 114, n. 7, 1999.

PETKOWICZ, C.L.O. **Polissacarídeos de Sementes de Leguminosae-Caseaplinoideae e análise conformacional de galactomananas**. Curitiba, 1998. Tese de Doutorado em Bioquímica, UFPR

PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.B.; ERRINGTON, N. e HARDING, S.E. Pressure cell assisted solubilization of xyloglucans: Tamarind Seed Polysaccharide and Detarium Gum. **Biomacromol.**, v. 4, p. 799-807, 2003.

PIELICHOWSKI, K.; TOMASIK, P. e SIKORA, M. Kinetics of gelatinization of potato starch studied by non-isothermal DSC. **Carbohydr. polymers**, v. 35, p. 49-54, 1998.

PRABHANJAN, H. e ALI, S.Z. Studies on rheological properties of tamarind kernel powder, its derivatives and their blends with maize starch. **Carbohydr. Polymers**, v. 28, p. 245-253, 1995.

RAO, M .A. **Measurement of Viscoelastic Properties of Fluid and Semisolid Food**. In: *Viscoelastic Properties of Foods*. RAO, M. A., STEFFE, J.F. (Ed.) London: Elsevier, 1992, p.207-231.

RECHIA, C.G.V. **Estudo de polissacarídeos de sementes de *Senna multijuga***. Curitiba, 1992. Tese de mestrado em Ciências-Bioquímica, UFPR.

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

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

REIS, D.; VIAN, B.; DARZENS, D. e ROLAND, C.J. Sequential patterns of intramural digestion of galactoxyloglucan in tamarind seedlings. **Planta**, v. 170, p. 60-73, 1987.

RING, S.G.; COLONNA, P.; l'ANSON, K.J.; KALICHEVSKY, M.T.; MILES, M.J.; MORRIS, V.J. e ORFORD, P.D. The gelation and crystallisation of amylopectin. **Carbohydr. Research**, v. 162, p. 277-293, 1987.

ROLEE, A. e LeMESTE, M. Effect of moisture content on thermomechanical behavior of concentrated wheat starch – water preparations. **Cereal Chem.**, v. 76, n. 3, p. 452-458, 1999.

ROGER, P.; AXELOS, M.A.V. e COLONNA, P. SEC-MALLS and SANS studies applied to solution behavior of linear α -glucans. **Macromol.**, v. 33, p. 2446-2455, 2000.

ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S e 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.

SCHOCH, T.J. Fractionation of starch. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 1, p. 247-277, 1945.

SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F. e RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetal fiber. **Anal. Biochem.**, v. 96, p. 282-292, 1979.

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

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

SIMS, I. M.; GANE, A. M.; DUNSTAN, D.; ALLAN, G.C.; BOGER, D.V.; MELTON, L.D. e BACIC, A. Rheological properties of xyloglucans from different plant species. **Carbohydr. Polymers**, v. 37, p. 61-69, 1998.

SOUZA-LIMA, M.M. **Polissacarídeos Nativos e Modificados das Sementes de *Hymenaea courbaril***. Curitiba, 1997. Tese de Mestrado em Bioquímica, UFPR.

STIVALA, S.S.; JUNICHI, K. e REICH, L. **Thermochim. Acta**, v.50, p. 111-122, 1981.

SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R.S. e KULKARNI, P.R. Starch-galactomannan interactions: functionality and rheological aspects. **Food Chem.**, v. 55, n. 3, p.259-264, 1996.

TAYLOR, I.E.P. e ATKINS, E.D.T.X-ray diffraction studies on the xyloglucan from tamarind (*Tamarindus indica*) seed. **FEBS letters**, v. 181, n. 2, p. 300-302, 1985.

TÍNÉ, M.A.S.; CORTELAZZO, A. L., e BUCKERIDGE, M.S. Xyloglucan moilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Casealpinoideae). **Plant Science**, v. 154, p. 117-126, 2000.

TINÉ, M.A.S. **O conteúdo informacional da molécula de xiloglucana de cotilédones de *Hymenaea courbaril* reflete suas funções em nível celular**. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII. Rokville: United States Pharmacopeial Convention Inc., p. 1495-1499, 1990.

VARGAS-RECHIA, C. G.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; HEYRAUD, A., DRIGUEZ, H. e LIÉNART, Y. Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 1013-1021, 1998.

VARMA, A.J. e CHAVAN, V.B. A study of crystallinity changes in oxidised celluloses. **Polymer Degradation and Stability**, v. 49, p. 245-250, 1995.

VARMA, A. J.; KOKANE, S.P.; PATHAK, G. e PRADHAN, S.D. Thermal behavior of galactomannan guar gum and its periodate oxidation products. **Carbohydr. Polymers**, v. 32, p. 111-114, 1997.

WANG, Q.; ELLIS, P.R.; ROSS-MURPHY, S.B. e REID, J.S.G. A new polysaccharide from a traditional Nigerian plant food: *Detarium senegalense* Gmelin. **Carbohydr. Res.**, v. 284, p. 229-239, 1996.

WANG, Q.; ELLIS, P.R.; ROSS-MURPHY, S.B. e BURCHARD, W. Solution characteristics of the xyloglucan extracted from *Detarium senegalense* Gmelin. **Carbohydr. Polymers**, v. 33, p.115-124, 1997.

WANG, Q.; WOOD, P.J.; CUI, W. e ROSS-MURPHY, S.B. The effect of autoclaving on the dispersibility and stability of three neutral polysaccharides in dilute aqueous solutions. **Carbohydr. Polymers**, v. 45, p. 355-362, 2001.

WHISTLER, R.L. e BeMILLER, J.N. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. St Paul: Eagan Press, p. 117-151, 1997.

WITTGREN, B. e PORSCHE, B. Molar mass distribution of hydroxypropyl cellulose by size exclusion chromatography with dual light scattering and refractometric detection. **Carbohydr. Polymers**, v. 49, p. 457-469,2002.

WILLINGER, A. H. A. **Potato Starch**. In R.L. Wistler (Ed.), *Method in carbohydrate chemistry*, New York: Academic Press, v. 4, p. 9-13, 1964.

WOLFROM, M.L. e THOMPSON, A. Acetylation methods. **Methods carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963.

WURZBURG, M.S. **Starch**. In:_____ *Modified Starches: Properties and Uses.*, Boca Raton, USA: CRC PRESS, INC., p. 3-16, 1986.

WYATT, J. P. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Anal. Chim. Acta**, v. 272, p. 1-40, 1993.

YOSHIMURA, M.; TAKAYA, T. e NISHINARI, K. Effects of xyloglucan on the gelatinization and retrogradation of corn starch as studied by rheology and differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 101-111, 1999.

YU, L. e CHRISTIE, G. Measurement of starch thermal transitions using differential scanning calorimetry. **Carbohydr. Polymers**, v. 46, p. 179-184, 2001.

ZOBEL, H.F. e STEPHEN, A. M. **Starch: Structure, Analysis, and Application**. In: *Food Polysaccharides and their Applications*. (Ed.) STEPHEN, A.M. (Ed) New York, p. 19-65, 1995.

ANEXOS

- A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. *Carbohydrate Polymers* 51 (2003), 25-32.
- Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches. Aceito para publicação em *Carbohydrate Polymers* (2003)
- Effect of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of an oxidized galactoxyloglucan from *Hymenaea courbaril* (Jatobá) seeds. Aceito para publicação em *Thermochemica Acta* (2003)
- Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources as support to the hypothesis of molecular aggregates. Enviado para publicação em Julho (2003) em *Polymer*.

A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches

R.A. Freitas^{a,b}, P.A.J. Gorin^b, J. Neves^a, M.-R. Sierakowski^{a,*}

^aLaboratório de Biopolímeros, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, P.O. Box 19081, 81531-990 Curitiba PR, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, P.O. Box 19046, 81531-990 Curitiba PR, Brazil

Received 13 March 2001; revised 12 December 2001; accepted 10 April 2002

Abstract

A galactoxyloglucan hydrocolloid (HXG) was extracted with water from endosperms of seeds of *Hymenaea courbaril* and purified (18.5% yield). It contained galactose, xylose, and glucose in a ~ 1:3:4 molar ratio. HXG was mixed with a high amylose (66%) (CSM) and waxy corn starch (CSP). Each gel mixture, under static rheological conditions, showed an increase in the paste viscosity, when compared with those of starches or HXG alone. Dynamic rheological analysis showed an interaction occurred in the HXG–CSM mixture resulting in an increased thermal stability of its gel, when compared with that of CSM alone. © 2003 Published by Elsevier Science Ltd.

Keywords: Galactoxyloglucan; Starches; *H. courbaril*; Gels; Physicochemical interactions

1. Introduction

Starches have an enormous number of uses in the food industry and in other areas, including capacity of adhesion, binding, film-formation, gelling and thickening (Whistler & BeMiller, 1997). However, they have negative aspects such as syneresis, retrogradation, and on heating of granules with excess water, high viscosity during paste formation. This is often not desirable, and can be controlled by chemical modifications or mixing with hydrocolloids (Sudhakar, Singhal, & Kulkarni, 1996; Wurzburg, 1986; Yoshimura, Takaya, & Nishinari, 1999).

There are many reports on rheological properties resulting from interaction between starches and hydrocolloids (Abdulmola, Hember, Richardson, & Morris, 1996; Alloncle, Lefebvre, Llamas, & Doublier, 1989; Kulicke, Eidam, Kath, Kix, & Kull, 1995; Rayment, Ross-Murphy, & Ellis, 1995; Sudhakar et al., 1996; Yoshimura et al., 1999). However, there are only two specifically on the interaction between starch and galactoxyloglucan. Prabhanjan and Ali (1995) found that mixing of solutions of tamarind galactoxyloglucan and corn starch resulted in a high viscosity, an increase in pseudoplasticity and a decrease in the paste temperature. The level of carboxymethylation and

hydroxypropylation of the galactoxyloglucan diminished the interaction. Yoshimura et al. (1999) showed by rheological analysis that the interaction did not exist but the hydrocolloid decreased the retrogradation and syneresis of the starch paste.

In our Carbohydrate Group, considerable attention has been paid to the galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril*, which were obtained from different Brazilian locations and whose structure and properties have been determined (Freitas, 2000; Lima, Quoirin, Wollinger, Krüger, & Sierakowski, 2000; Lima, Reicher, Corrêa, Ganter, & Sierakowski, 1993; Lima, Rechia, Ganter, Reicher, & Sierakowski, 1995; Martin, 1999; Martin, Souza-Lima, Gorin, Reicher, & Sierakowski, 2000; Souza-Lima, 1997; Vargas-Rechia et al., 1998).

We now investigate some structural characteristics necessary to result in interaction between starches and our galactoxyloglucan. To this end, corn starches with a high (66%) and zero levels of amylose were utilized and the rheological characteristics of the mixtures compared.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Seeds of *H. courbaril* were harvested from the Foz do

* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-3260; fax: +55-41-361-3186.
E-mail address: mrobiopol@quimica.ufpr.br (M.R. Sierakowski).

Table 1
Percentage chemical composition (g%) of galactoxyloglucan and corn starch samples

Samples	Carbohydrate ^a	Protein ^b	Moisture ^c	Ash ^c
HXG	81	2.00	15	0.40
CSM	91.5	0.19	8.5	0.045
CSP	89	0.26	9	0.04

^a Method of Dubois et al. (1956).

^b Method of Hartree (1972).

^c Method of Zobel and Stephen (1996).

Chopin Forest Reserve, State of Paraná, Brazil. The galactoxyloglucan (HXG) was obtained by exhaustive aqueous extraction from pooled and milled *H. courbaril* seeds (40 g l⁻¹ for each extraction process). The viscous extracts were purified by centrifugation at 30,200g and the supernatant sequentially passed through Millipore filter membranes with pore sizes of 3 and 0.8 μm.

Corn starch rich in amylose (CSM) and exclusively amylopectin (CSP) were supplied by Corn Products Brasil Ingredientes Industriais Ltda, Balsa Nova, State of Paraná, Brazil.

2.2. Chemical analysis

Total carbohydrate was assayed by the phenol–H₂SO₄ method, with a necessary modification for starch samples (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956), protein by the method of Hartree (1972), ash and moisture by that of Zobel and Stephen (1996), and amylose content was by the method of Chrastil (1987).

¹³C and ¹H NMR spectra were obtained using a BRUKER, model AVANCE-DRX-400 instrument, using D₂O as solvent for the galactoxyloglucan and DMSO-d₆ for starch samples. All analyses were carried out at 60 °C and chemical shifts are in ppm based on that of acetone, as internal standard (δ 30.2).

Monosaccharide contents of starches were determined on complete acid hydrolysis with M TFA at 100 °C for 5 h (Adams, 1965). The solutions were evaporated to a residue, which was repeatedly dissolved in H₂O and evaporated. For the galactoxyloglucan, better quantitation was obtained as follows. The polysaccharide was dissolved and partially hydrolyzed with H₂SO₄–H₂O (1:1, v/v) at 4 °C for 1 h, H₂O added to give a dilution of 8% and complete hydrolysis effected at 100 °C for 5 h. The solution was neutralized (BaCO₃), the suspension filtered and the filtrate evaporated to dryness (Selvendran, March, & Ring, 1979). The products from each hydrolysis procedure were reduced with NaBH₄ and acetylated with pyridine–Ac₂O (1:1 v/v) for 12 h at 25 °C (Wolfrom & Thompson, 1963). The resulting alditol acetates were analysed by GLC using an HP model 5890-2, with a DB-225 capillary column

at 220 °C, a flame ionization detector at 250 °C, and nitrogen as carrier gas.

2.3. Average molar mass (M_w) and R_g

The dn/dc of the galactoxyloglucan was determined using a Waters differential refractometer, model 2410 at a wavelength of 546 nm, the concentrations used being 1.0; 0.5; 0.25 and 0.125 g l⁻¹ (filtered by Millipore filter 0.45 μm). The ratio of refractive index to concentration gives the constant dn/dc that is used to calculate the molar mass.

Aqueous solutions of galactoxyloglucan (0.5 g l⁻¹) were filtered through a 0.22 μm pore Millipore filter and injected into a GPC having 2000, 500, 250 and 120 ultragel columns. Detection was carried out using the above Waters refractometer and a DAWN DSP-F Wyatt Technology model controlled at a light scattering multiangle of 632.8 nm. The eluent was 0.5 g l⁻¹ aq. sodium nitrite containing 200 ppm of sodium azide at a flux of 0.6 ml min⁻¹.

2.4. Syneresis

Syneresis in the samples was estimated using a centrifuge tube of 10 ml capacity with a graduated scale of 0.1 ml. A Fanem centrifuge, model 208, was used at 1800 rpm for 30 min. After 1, 24, 48 and 72 h of refrigeration, syneresis was determined by the ratio of separated water after centrifugation to the initial volume of liquid (10 ml) (Zheng & Sosulski, 1998).

2.5. Rheological properties

For rheological analyses, the galactoxyloglucan (5 g l⁻¹) was solubilised over 16 h in distilled H₂O at 25 °C. Samples of starch alone were solubilised in closed tubes at 96 ± 1 °C for 30 min and the solutions cooled to 5 °C and maintained over periods of 1, 24, 48 and 72 h. Each mixture of CSM or CSP (40 g l⁻¹) with HXG (10 g l⁻¹), at a v/v mixture of 1:1, was prepared with or without heating at 96 °C for 30 min, and then maintained at 5 °C for 24 h.

Non-oscillatory analyses were performed with a model LV DV-III Brookfield rheometer fitted with cone and plate geometry. The apparent viscosity was determined at a shear rate of 1.5 s⁻¹. The temperature of the systems was controlled with a model TC-500 Brookfield circulatory bath.

Oscillatory analyses were carried out using a model RS 75 Haake Rheometer with a C-60/2° sensor. For constant temperature studies at 25 °C was controlled with a model BC-5 Haake bath and with variation of temperature was achieved with a Peltier system with heating (20–90 °C) and cooling gradients (90–20 °C) at a rate of 0.033 °C s⁻¹.

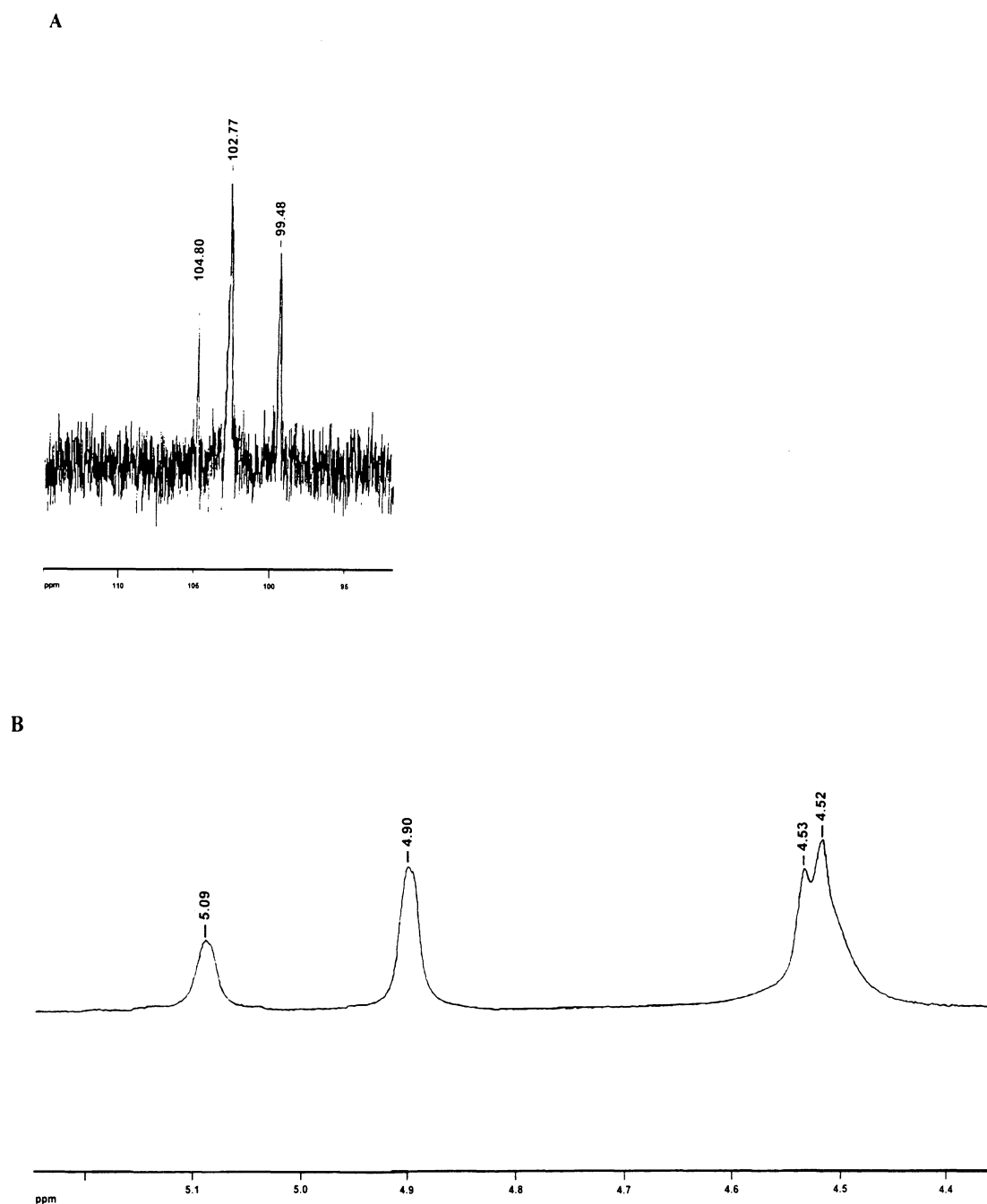


Fig. 1. Anomeric region of ^{13}C (1A) and ^1H NMR (1B) spectra of the galactoxyloglucan of *Hymenaea courbaril* in D_2O at 60°C (δ in ppm).

3. Results and discussion

3.1. Chemical and physicochemical analysis of galactoxyloglucan and starches

Milled endosperms of *H. courbaril* seeds were subjected to aqueous extraction at 25°C , and after purification using Millipore filters, a water-soluble galactoxyloglucan (HXG) was obtained (18.5% yield). The starches CSM and CSP contained 66% and zero amylose, respectively. The composition of the starches and HXG, in terms of carbohydrate, protein, ash and moisture, is summarized in Table 1.

The starches contained exclusively glucose. Comparison of the ^{13}C NMR spectra of CSM and CSP in DMSO-d_6 showed only one C-1 signal (δ 101.54) for CSM and a small additional signal from CSP at δ 100.94, due to 6-*O*-substitution.

The ^{13}C NMR spectrum of HXG in deuterium oxide contained signals at δ 104.8, 102.77 and 99.48, which can be assigned to C-1 of $\beta\text{-D-Galp}$, $\beta\text{-D-Glcp}$, and $\alpha\text{-D-Xylp}$ units, respectively. In the C-6 region, the signal at δ 67.15 arose from 6-*O*-substituted $\beta\text{-D-Glcp}$ units, while that at δ 61.14 was from unsubstituted units. The areas of the C-1 signals showed Gal, Xyl, and Glc to be present in a $\sim 1:3:4$ molar ratio (Fig. 1(A)), a value that agreed with those of H-1

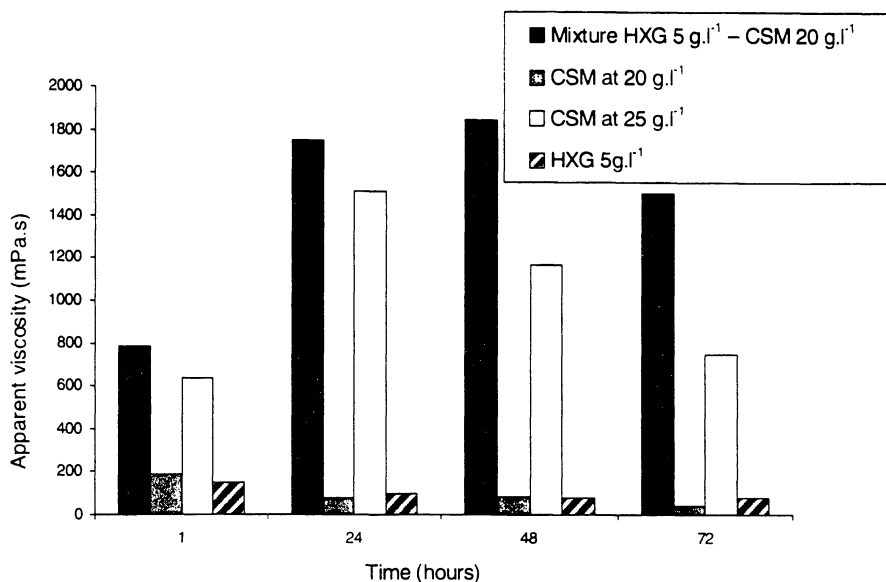


Fig. 2. Effect of storage time at 5 °C on the apparent viscosity of various solutions, involving CSM.

signals in the ¹H spectrum, although some overlapping was present (Fig. 1(B)), and the ratio obtained on acid hydrolysis.

The galactoxyloglucan had an intrinsic viscosity of 700 ml g⁻¹ in water and an average molar mass (M_w) obtained by gel permeation (GPC), detected by refractive index and light scattering, of 1.44×10^6 g mol⁻¹ and R_g of 75.8 nm. The degree of polydispersion was 1.7 and the dn/dc , determined experimentally for the macromolecule, was 0.113 ml g⁻¹.

3.2. Rheological properties of starches and starch–galactoxyloglucan mixtures

In order to check that gelling of the starches rich in

amylose and amylopectin was complete the samples were treated for 15, 30 and 60 min at 96 ± 1 °C. No difference was found between the pastes obtained after 30 and 60 min of heating (data not shown). The paste-forming temperature for the starch alone and in the presence of galactoxyloglucan was determined by rheology, using a constant frequency of 1 Hz and by measurement of the G' value as a function of the temperature. No appreciable difference in the gelatinization temperature (~ 70 °C) was observed (data not shown).

The effect of HXG on the apparent viscosity of mixtures with CSM and CSP is shown in Figs. 2 and 3, respectively. The value of apparent viscosity at 1.5 s⁻¹ was greater for both mixtures, the increase being the greatest after 20 h storage at 5 °C of CSM and CSP solutions at a concentration

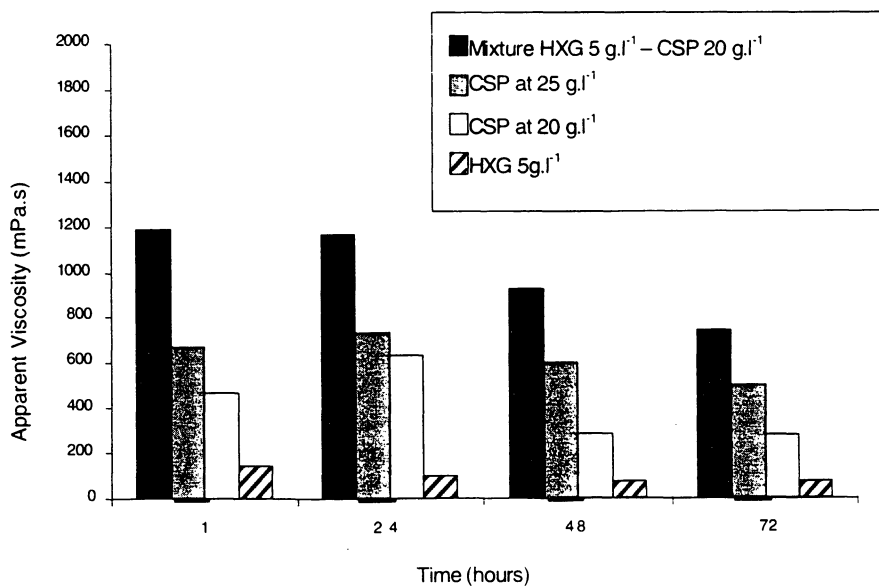


Fig. 3. Effect of storage time at 5 °C on the apparent viscosity of various solutions, involving CSP.

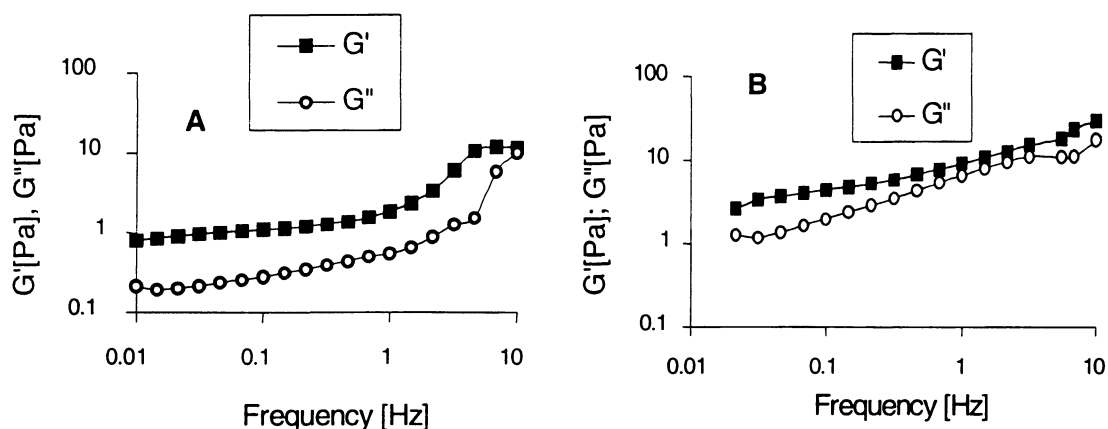


Fig. 4. Frequency dependence of the storage (G'), loss modulus (G'') at stress 0.1 Pa for: (A) CSM (25 g l^{-1}) and (B) the HXG (5 g l^{-1})–CSM (20 g l^{-1}) mixture heated together.

of 25 g l^{-1} . Therefore, in later experiments, comparative analysis were carried out after 24 h of cooling. However, increases in viscosity values, over those of CSP and CSM alone, after all times of cooling were found. In terms of the effect of the galactoxyloglucan on syneresis in high-amylose starch, after 1 h of refrigeration, the starch alone showed 30 and 60% of syneresis at concentrations of 25 and 20 g l^{-1} , respectively, these values being reduced to 6.25 % in the mixture (data not shown).

In the dynamic rheological analyses, the viscoelastic behavior was determined for starches and HXG–starch mixtures over a frequency range of 0.01–10 Hz. Linear G^* and deformations of less than 5% were observed under stresses of less than 0.4 Pa. Fig. 4 shows the variation of G' and G'' as a function of frequency under a stress of 0.1 Pa at 25°C for the HXG (5 g l^{-1})–CSM (20 g l^{-1}) CSM (25 g l^{-1}) and HXG (5 g l^{-1})–CSM (20 g l^{-1}) mixture.

These rheograms show that mixing increased the G' value five-fold at all the chosen frequencies, but that the ratio G''/G' ($\tan \delta$), was higher for starch alone (0.28 at 1 Hz): in the mixture, $\tan \delta$ was 0.54 at the same frequency.

A similar experiment depicted in Fig. 4 was carried out, but without heating CSM and HXG together. The results in

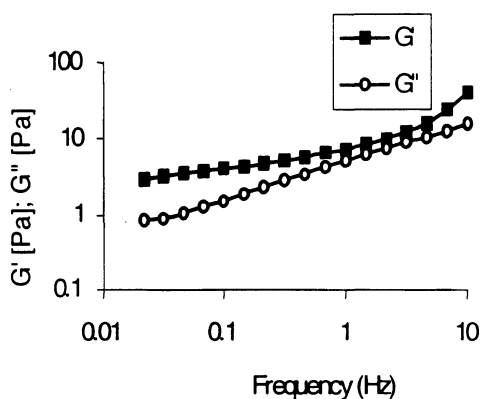


Fig. 5. Frequency dependence of storage (G') and loss modulus (G'') for the HXG (5 g l^{-1})–CSM (20 g l^{-1}) mixture not heated together.

Fig. 5 show that this did not apparently give rise to an increase in the interaction.

The dynamic viscosities (η^*) of the HXG–CSM mixture, together, and CSM alone, are presented in Fig. 6. One can observe that the values of η^* for mixtures are 5–6 times greater than for the starch rich in amylose, even at a greater concentration, under practically all the frequencies studied, and that the viscosity decayed linearly.

The unusual frequency behavior, presented in Figs. 4 and 6 at above $\sim 2 \text{ Hz}$ can be attributed to the presence of suspended solids, signifying that the amylose was probably retrograded. Another important observation was that this effect was less pronounced for the mixture.

Experiments to determine the interaction capacities of corn starches and HXG were also carried out on a mixture of HXG and CSP. The linear viscoelastic region for CSP (25 g l^{-1}) and CSP (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}) mixture was determined using a stress sweep of 0.088–1 Pa at frequencies of 0.01, 0.1, 1, and 10 Hz. The constant G^* and low deformation ($\pm 5\%$) at all of these frequencies was determined under stresses lower than 0.3 Pa. Thus, the value chosen was 0.1 Pa for CSP and the mixture. The influence of frequency on the G' and G'' values over the mixture range is shown in Fig. 7. It shows that the gel formed on cooling over

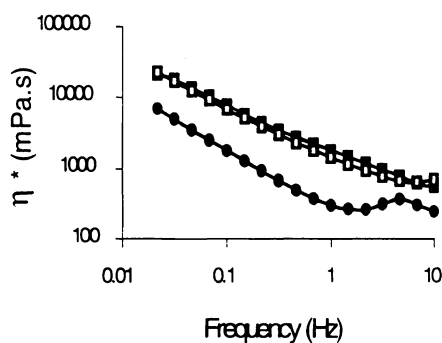


Fig. 6. Frequency dependence of dynamic viscosity (η^*) on: (•) CSM (25 g l^{-1}), (■) the HXG (5 g l^{-1})–CSM (20 g l^{-1}) mixture heated together, and (□) the mixture not heated together.

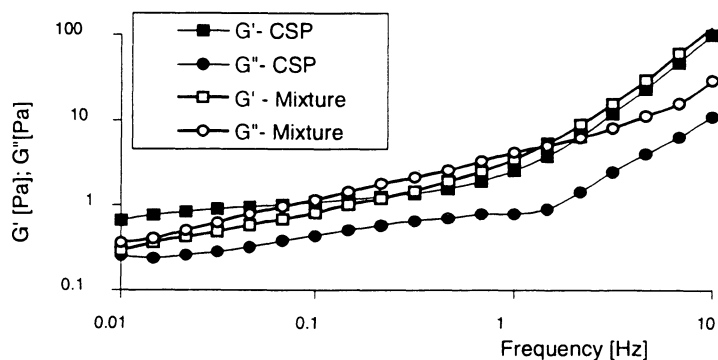


Fig. 7. Frequency dependence of storage (G') and loss modulus (G'') at stress 0.1 Pa on CSP (25 g l^{-1}) and HXG (5 g l^{-1})–CSP (20 g l^{-1}) mixture, prepared by heating.

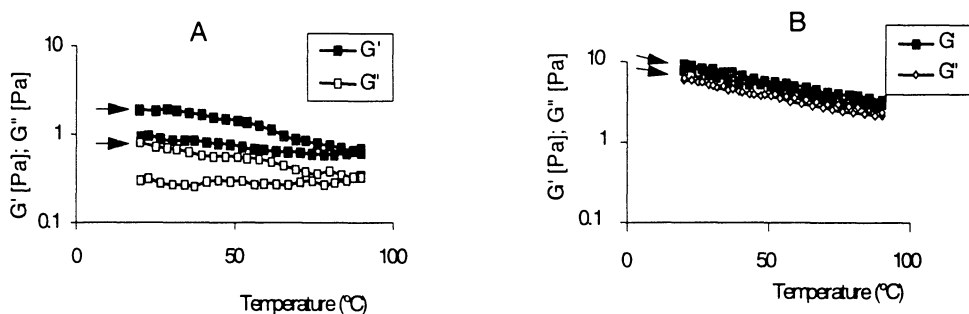


Fig. 8. Temperature dependence of storage (G') and loss modulus (G'') at 1 Hz and deformation of 5% on: (A) CSM at 25 g l^{-1} and (B) CSM (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}) mixture prepared by heating. (\rightarrow) shows the initial heating program.

24 h at 5°C of the CSP solution (25 g l^{-1}) did not occur for the CSP (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}) mixture, but that the storage moduli (G') are similar for CSP alone and the mixture. The greater difference is in the loss modulus (G'') that increased substantially when the mixture was examined. Thus, HXG does not apparently interact to the same degree with CSP than the amylose-rich CSM, showing that part of the branched molecule did not contribute (Fig. 4(B)).

3.3. Effect of temperature on the viscoelastic behavior of the gels

The rheogram depicted in Fig. 8(A) shows that with CSM at a concentration of 25 g l^{-1} , the gel did not melt, but that a proportionally greater decrease in G' and G'' occurred. Fig.

8(B), corresponding to the CSM (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}) mixture, shows that melting did not occur, but that the variation of G' and G'' was less than that shown in Fig. 8(A). The G' and G'' values are also greater for the mixture at all temperatures. The $\tan \delta$ values are shown in Fig. 9 for CSM alone and the mixture.

These results show that the G''/G' ratio did not vary appreciably on increasing and decreasing of temperature, but that the values of $\tan \delta$ are greater for CSM alone at 25 g l^{-1} concentration. This indicates that the starch gel is stronger than that formed by the mixture. On the other hand, the constant values observed for $\tan \delta$ demonstrate that the interaction of CSM with the hydrocolloid HXG increased the thermal stability of the gel, consistent with a stabler interaction.

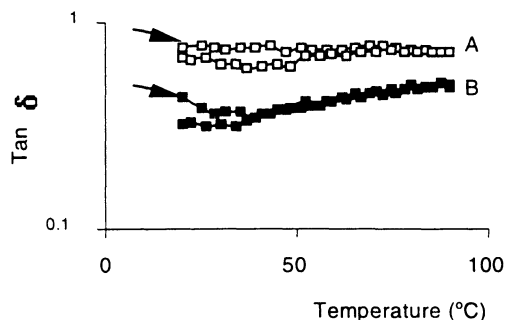


Fig. 9. Temperature dependence of $\tan \delta$ on: (A) CSM (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}) mixture and (B) CSM alone (25 g l^{-1}), prepared by heating. At 1 Hz and deformation of 5%. (\rightarrow) shows the initial heating.

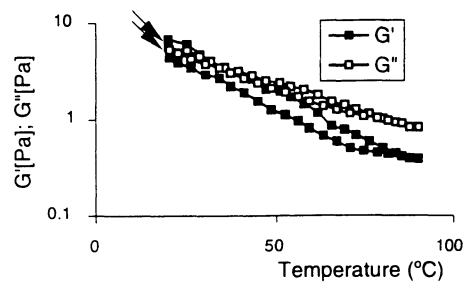


Fig. 10. Temperature dependence of storage (G') and loss modulus (G'') for the CSM (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}) mixture, not heated. At 0.1 Hz and deformation of 5%.

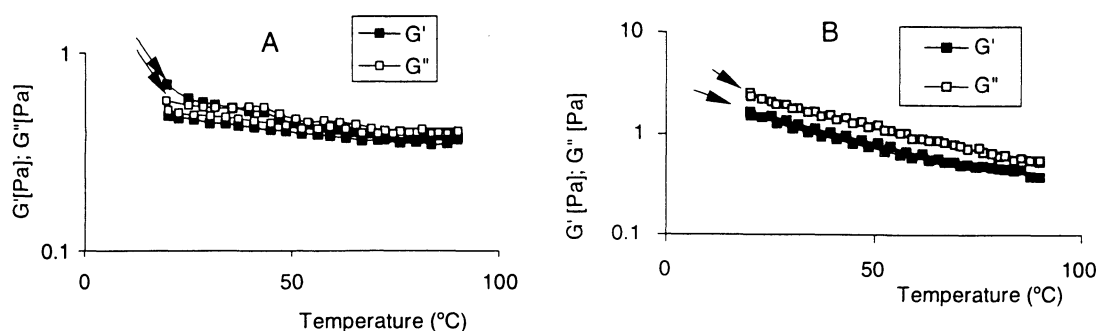


Fig. 11. Temperature dependence of storage (G') and loss modulus (G'') for: (A) CSP at 25 g l^{-1} and (B) CSP (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}) mixture, prepared by heating. At 1 Hz and deformation of 5%.

Fig. 10 shows the temperature dependence of the CSM (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}) mixture, prepared without heating of HXG with CSM together. The values of G' and G'' are identical at $35 \text{ }^\circ\text{C}$ in the heating program and the values of G'' became greater than G' at $39 \text{ }^\circ\text{C}$, indicating melting. Thus, the presence of the hydrocolloid HXG, when mixed with the high amylose starch CSM, increased the thermal stability of the gel.

Apparently, heating of the amylose-rich starch together with the HXG is necessary to give rise to a stable complex (Figs. 8 and 10). This could be through conformational modifications of the amylose (folding) resulting in a stable interaction with galactoxyloglucan.

Fig. 11(A) and (B) shows the temperature dependence of gels formed by CSP alone (25 g l^{-1}) and the weak gel formed by the mixture of CSP (20 g l^{-1})–HXG (5 g l^{-1}), respectively. Fig. 11(A) indicates that the gel formed by CSP alone at 25 g l^{-1} melted at $\sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$, and the structure was not regenerated on cooling. In addition, the mixture did not show hysteresis on cooling, but at the frequency employed (1 Hz), G'' was greater than G' at all temperatures. At this frequency, both G' and G'' values of the mixture are greater than those for CSP alone at 25 g l^{-1} .

4. Conclusions

Rheological measurements show that CSM and CSP interact with HXG. In both cases, an increase in the viscosity occurs, when compared with those of HXG or starches alone, due to interaction with the hydrocolloid. Oscillation experiment showed the interaction occurred to a greater degree with CSM, which contains 66% of linear amylose, when compared with CSP, whose amylose content is zero. With the latter, there was an increase in the loss modulus (G''), generating a weak gel. The presence of the hydrocolloid in the CSM–HXG mixture, increased the thermal stability of the gel, an indication of stable interactions.

Acknowledgments

The authors thank Mr C.A. Tischer and Prof. F. Reicher of the Biochemistry Department of the Federal University of

Paraná for preparation of ^{13}C NMR spectra and access to a Haake Rheometer, respectively. Thanks are also due to the Brazilian funding agencies, CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos, through PRONEX-CARBOIDRATOS), the Fundação Araucária for financial support, and TECPAR-(Programa Paraná Agroindustrial) for grant given to R.A. Freitas.

References

- Abdulmola, N. A., Hember, M. W. N., Richardson, R. K., & Morris, E. R. (1996). Effect of xanthan on the small-deformation rheology of crosslinked and uncrosslinked waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers*, *31*, 65–78.
- Adams, G. A. (1965). Complete acid hydrolysis. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, *5*, 269–276.
- Alloncle, M., Lefebvre, J., Llamas, G., & Doublier, J. L. (1989). A rheological characterization of cereal starch–galactomannan mixtures. *Cereal Chemistry*, *66*(2), 90–93.
- Chrastil, J. (1987). Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. *Carbohydrate Research*, *159*, 154–158.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350–356.
- Freitas, R. A. (2000). *Estrutura e interação de galactoxiloglucana-amido de milho*. Master's Thesis in Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, *48*, 422–427.
- Kulicke, W.-M., Eidam, D., Kath, F., Kix, M., & Kull, A. H. (1996). Hydrocolloids and rheology: Regulation of visco-elastic characteristics of waxy rice starch in mixture with galactomannans. *Starch*, *48*(3), 105–114.
- Lima, N. N., Quoirin, M., Wollinger, W., Krüger, & Sierakowski, M. -R. (2000). *Binary agar–galactoxyloglucan gels as supports for plant tissue culture*. Proceedings of the Third International Symposium on Natural Composites and Composites, São Pedro, SP, Brazil (pp. 114–118).
- Lima, N. N., Rechia, C. G. V., Ganter, J. L. M. S., Reicher, F., & Sierakowski, M.-R. (1995). Oligosaccharides derived from the xyloglucan isolated from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *17*(6), 413–415.
- Lima, N. N., Reicher, F., Corrêa, J. B. C., Ganter, J. L. M. S., & Sierakowski, M.-R. (1993). Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Jatobá). *Ciência e Cultura (Brasil)*, *45*(1), 22–26.

- Martin, S. (1999). *Galactoxiloglucana de sementes de Hymenaea courbaril: Estrutura, modificações e propriedades*. Master's Thesis in Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR, Brazil.
- Martin, S., Souza-Lima, M. M., Gorin, P. A. J., Reicher, F., & Sierakowski, M. R. (2000). *Treatment of jatoba seed galactoxyloglucan with β -D-galactosidase*. Proceedings of the Third International Symposium on Natural Composites and Composites, São Pedro, SP, Brazil (pp. 166–170).
- Prabhanjan, H., & Ali, S. Z. (1995). Studies on rheological properties of tamarind kernel powder, its derivatives and their blends with maize starch. *Carbohydrate Polymers*, 28, 245–253.
- Rayment, P., Ross-Murphy, S. B., & Ellis, P. R. (1995). Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures. I. Steady shear measurements. *Carbohydrate Polymers*, 28, 121–130.
- Selvendran, R. R., March, J. F., & Ring, S. G. (1979). Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Analytical Biochemistry*, 96, 282–292.
- Souza-Lima, M. M. (1997). *Polissacarídeos Nativos e Modificados das Sementes de Hymenaea courbaril*. Master's Thesis in Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR, Brazil.
- Sudhakar, V., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (1996). Starch–galactomannan interactions: Functionality and rheological aspects. *Food Chemistry*, 55(3), 259–264.
- Vargas-Rechia, C. G., Reicher, F., Sierakowski, M. R., Heyraud, A., Driguez, H., & Liénart, Y. (1998). Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. *Plant Physiology*, 116, 1013–1021.
- Whistler, R. L., & BeMiller, J. N. (1997). *Carbohydrate chemistry for food scientists*. St Paul: Eagan Press, pp. 117–159.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963). Acetylation methods. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 211–215.
- Wurzburg, M. S. (1986). *Modified starches: Properties and uses*. Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 3–16.
- Yoshimura, M., Takaya, T., & Nishinari, K. (1999). Effects of xyloglucan on the gelatinization and retrogradation of corn starch as studied by rheology and differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, 13, 101–111.
- Zheng, G. H., & Sosulski, F. W. (1998). Determination of water separation from cooked starch and flour pastes after refrigeration and freeze–thaw. *Journal of Food Science*, 63(1), 134–139.
- Zobel, H. F., & Stephen, A. M. (1995). Starch: Structure, analysis, and application. In A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 19–65). New York: Marcel Dekker Inc.



Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches

R.A. Freitas^{b,c,d}, R.C. Paula^a, J.P.A. Feitosa^a, S. Rocha^a, M.-R. Sierakowski^{c,*}

^aDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, UFC, P.O. Box 12. 200, CEP 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, P.O. Box 19046, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^cLaboratório de Biopolímeros, Departamento de Química, UFPR, P.O. Box 19081, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^dLaboratório de Alimentos, TECPAR, 81350-010, Curitiba, PR, Brazil

Received 25 April 2002; revised 26 February 2003; accepted 12 March 2003

Abstract

After defatting yam and cassava starches have amylose contents of 36.2 and 24.2%, respectively. Suspensions of these starches in water were analysed, in an oscillatory rheometer, using a heating rate of 4.0 °C min⁻¹, deformation of 1% and a frequency of 1 Hz, the initial temperatures of gelatinization being 71 and 62 °C for yam and cassava, respectively. A gelatinization study was also carried out by differential scanning calorimetry with different heating rates (2.5, 3.0, 4.0 and 5.0 °C min⁻¹), to give, by the Arrhenius equation, the activation Energy (E_a) of the process. Yam starch showed a more energetic gelatinization process of when compared to cassava starch and also had a lower rate constant (s⁻¹), indicating a relatively slow gelatinization process of at higher temperatures. Yam gels formed by autoclaving a suspension (50 g l⁻¹) showed after 24 h of refrigeration, a stronger structure than for a cassava gel.

© 2003 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Yam; Cassava; Gels; Activation energy; Rate constant

1. Introduction

Starch is a reserve carbohydrate in the plant kingdom, that worldwide 70–80% of the calories consumed by humans, and is generally deposited in the form of minute granules or cells ranging from 1 to 100 μm or more in diameter (Buléon, Colonna, Planchot, & Ball, 1998; Whistler & BeMiller, 1997; Wurzburg, 1986; Zobel & Stephen, 1995).

Starch is a polymeric carbohydrate consisting of anhydroglucose units linked primarily through α-D-(1 → 4) glucosidic bonds. While the detailed fine structure has not been fully elucidated, it has been firmly established that starch is a heterogeneous material consisting of varying proportions of amylose and amylopectin (Buléon et al., 1998; Whistler & BeMiller, 1997; Wurzburg, 1986; Zobel & Stephen, 1995).

Amylose is essentially a linear polymer in which the anhydroglucose units are linked through α-D-(1 → 4) glucosidic bonds whereas amylopectin is a branched polymer

with α-D-(1 → 4) glucosidic bonds, having periodic branches at the O-6 position (Buléon et al., 1998; Wurzburg, 1986).

Commercial starches are obtained from seeds (corn, waxy corn, high amylose corn, wheat and various rices) and from tubers and roots, particularly potato, sweet potato and cassava (Whistler & BeMiller, 1997). Other starches such as that of yam have less commercial applications, and publications on this starch are fewer in relation to those of corn starches. Hoover and Vasanthan (1994) studied the effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of cereal, legume, and tuber starches. They observed an apparent amylose content in yam starch of 27.1%, very similar to that of wheat starch and higher than that of oat and potato starches. Whistler and BeMiller (1997) have compared the general properties of some starch granules and pastes. Cassava or tapioca starches showed 17% of amylose, and the authors observe the formation of a translucent gel with high viscosity and a medium tendency to retrograde. Alves, Grossmann, and Silva (1999) and Mali, Grossmann, Garcia, Martino, and Zaritzky (2002) used yam starch to obtain films with

* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-3260; fax: +55-41-361-3186.
E-mail address: mariarita.sierakowski@ufpr.br (M.-R. Sierakowski).

glycerol. They used this starch due to its higher amylose content (30%), which gave rise to a film forming capacity as it is linear polymer. McPherson and Jane (1999) compared the starch of waxy potato with those of other root and tuber starches such as those of yam, normal potato and sweet potato. They observed that yam starch, have an apparent amylose content of 29.2% and that yam and sweet potato amylopectins had larger proportions (19.09 and 17.05%, respectively) of short branch chains (dp 6–12), when compared with those of normal and waxy potato amylopectins (13.07 and 14.75%, respectively).

Guanaratne and Hoover (2001) studied different starches from tuber and root. A comparative analysis of chemical compositions showed for those of yam and cassava amylose contents of 28.5 and 22.4%, respectively.

Starch gelatinization refers to the disruption of the molecular order within starch granules when they are heated in the presence of water. Evidence for the loss of an organized structure includes irreversible granule swelling, loss of birefringence and crystallinity. Gelatinization is an energy-absorbing process that can be followed by differential scanning calorimetry (DSC) (Whistler & BeMiller, 1997) and has been used to study starch (Bizot et al., 1997; Ghiasi, Honsey, & Varriano-Marston, 1982; Donovan, Lorenz, & Kulp, 1983; Le Lay & Delmas, 1998; Role & LeMeste, 1999; Yu & Christie, 2001).

To date, the few studies that have been carried out on the kinetics of gelatinization, have been on corn starch (Bhattacharya & Hanna 1987; Burros, Young, & Carroad, 1987; Kim & Wang, 1999) and potato starch (Pielichowski, Tomaski, & Sikora, 1998). We now investigate the composition, rheological properties, and kinetic analysis of gelatinization of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches, due the production of these plants in the Brazil, more specifically in economic terms in the State of Paraná.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Yam starch (*Dioscorea alata*), donated by Prof. Dra Maria Vitória E. Grossmann from Londrina State University was extracted and purified as described by Alves et al.

Table 1
Percentage chemical composition (g%) of yam and cassava starches

Starch	Carbohydrate ^a	Protein ^b	Moisture ^c	Ash ^c	Amylose ^d	Lipids ^c
Yam	88	0.1	8.8	0.09	36.0	1.1
Cassava	87.4	0.1	9.1	0.08	23.0	1.2

^a Method of Dubois et al. (1956).

^b Method of Hartree (1972).

^c AOAC (1995).

^d Method of Chrastil (1997).

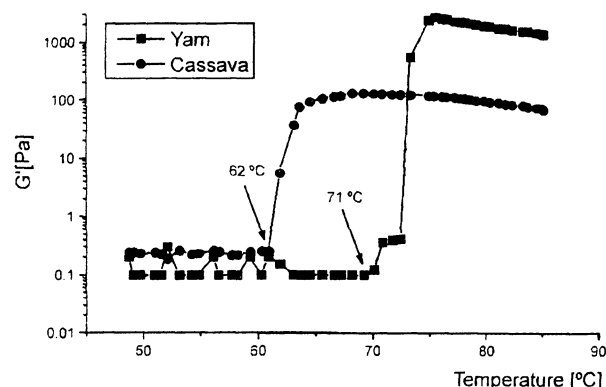


Fig. 1. G' as a function of the temperature at a heating rate of $4.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ at 50 g l^{-1} for suspension of yam and cassava starches, at a frequency of 1 Hz and deformation of 1%.

(1999). Cassava starch (*Manihot utilissima*) was obtained using the procedure of Willinger (1964) and was a gift of Prof. Dr José Domingos Fontana from UFPR.

2.2. Chemical analysis

Total carbohydrate was assayed by the phenol– H_2SO_4 method, with a necessary modification (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956), protein by the procedure of Hartree (1972), ash, moisture and lipids were determined according to the standard AOAC (1995).

Defatting prior to preparation of samples for amylose determination was carried out by reflux extraction with ether for 5 h. The products were then dried at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Amylose contents were determined by the method of Chrastil (1987) with a modification, using amylose and waxy amylopectin (Sigma) as standards. Intermediate amylose proportions were obtained by mixing the amylose and amylopectin (100, 80, 70, 50, 40, 20, 0% of amylose). A straight line plot was used to determine the contents of amylose in the samples. The use of the multiplication factor of 45.8 for absorbance proposed by Chrastil to obtain

Table 2
Temperatures at the beginning (T_{onset}), end (T_{end}), and peak (T_m) of yam and cassava starch gelatinization at heating rates of 2.5, 3.0, 4.0 and $5.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Starch	Heating rates ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{end} ($^{\circ}\text{C}$)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J g^{-1})
Yam	2.5	69.0	77.0	72.5	–11.5
	3	69.0	77.0	72.5	–11.5
	4	69.0	78.0	72.5	–12.0
	5	69.5	79.0	73.0	–11.5
Cassava	2.5	50.5	70.0	60.5	–8.5
	3	51.0	69.5	61.5	–7.0
	4	52.0	69.5	62.5	–6.5
	5	51.5	71.0	63.5	–6.5

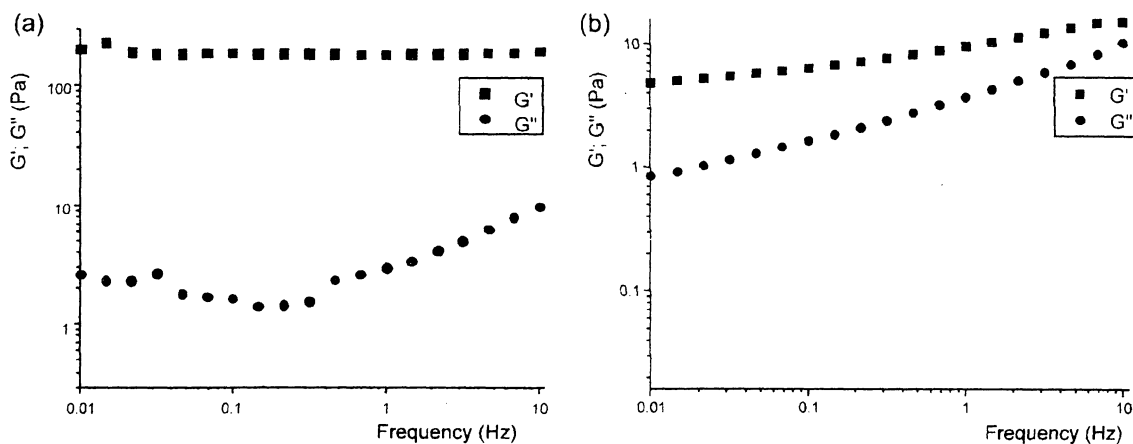


Fig. 2. Storage modulus (G'), loss modulus (G'') at 25 °C for yam (a) and cassava (b) starches pastes at 50 g l⁻¹.

the amylose content in g l⁻¹ in the cuvet generated errors and was not used in this work.

2.3. Rheological analysis

2.3.1. Dynamical oscillatory

Gelatinization experiments were carried out using a suspension of 50 g l⁻¹ starch in water, using a temperature range from 15 to 85 °C, heating rate of 4.0 °C min⁻¹, at a frequency of 1 Hz and a deformation of 1%.

Gels were also obtained at 50 g l⁻¹ after autoclaving by 30 min and cooling at 5 °C for 24 h. All experiments were carried out in triplicate. The analysis was performed using an oscillatory Haake rheometer, model RS 75, sensor C 60/2° using a Peltier system to control the temperature. The stress used in the frequency sweep experiments (0.02–10 Hz) was 0.5 Pa. This value refers to the viscoelastic-linear region, where the gel structure was preserved. Cooling was carried out in the rheometer, using a layer of mineral oil to avoid evaporation.

2.4. Thermal analysis

2.4.1. DSC analysis

DSC analysis was performed using a Shimadzu DSC-50, with a sample weight of ~5 mg of starch and 10 mg of water. The heating rate was 2.5, 3.0, 4.0 and 5.0 °C min⁻¹ in an inert atmosphere maintained with a nitrogen flux of 50 ml/min. The DSC calibration was performed with indium. The samples were weighed directly in the aluminium sample holder, and water was added with a Hamilton microsyringe. After sealing, the pan was left to equilibrate for 30 min, and weighed before and after the heating process to observe water loss during the heating cycle. As some of the pans did not support the temperature, pressure and loss of water, mainly at higher temperatures, these experiments were carried out in triplicate.

2.4.2. Kinetic analysis

The dependence of the rate constant on the temperature for gelatinization of starch samples was obtained using the Arrhenius equation (Eq. (1)). To determine the activation Energy (E_a), Ozawa (1965) and Pielichowski et al. (1998) proposed the plot of ln of the heating rates (2.5, 3.0, 4.0 and 5.0 °C min⁻¹), in place of the rate constant (K), as a function of the reciprocal of the absolute temperature at different gelatinization percentages, obtained by the slicing of the endothermic spectra and representing as α (%) for 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 and 100% of gelatinization. The angular fit of this plot gives the $-E_a/R$, and the linear fit the pre exponential factor (A), as shown in Eq. (1).

$$\ln K = \ln A - E_a/RT \quad (1)$$

where:

- K = rate constant (s⁻¹)
- A = pre exponential factor
- E_a = activation energy (kJ mol⁻¹)
- R = Gas universal constant
- T = absolute temperature (K)

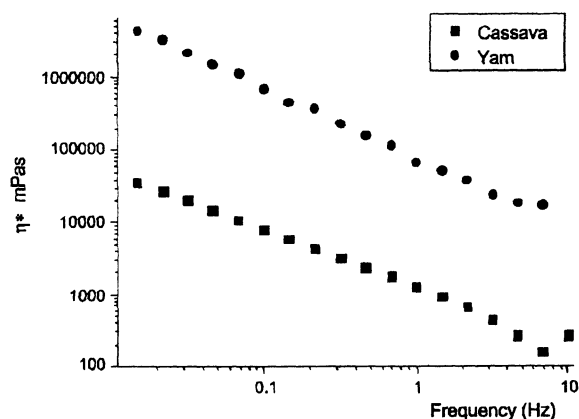


Fig. 3. Complex viscosity (η^*) at 25 °C for yam and cassava starches pastes at 50 g l⁻¹.

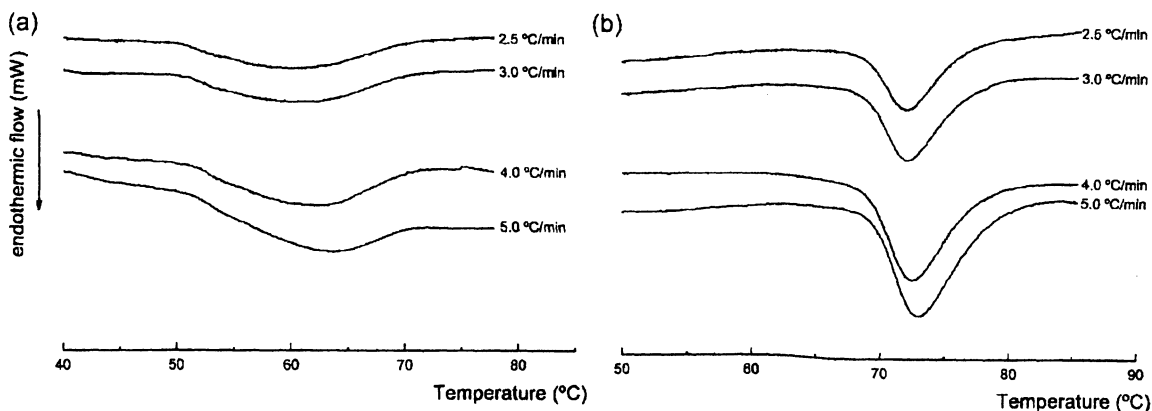


Fig. 4. DSC scans at 2.5–5.0 °C min⁻¹ of cassava (a) and yam (b) starches (5 mg with 10 mg of water).

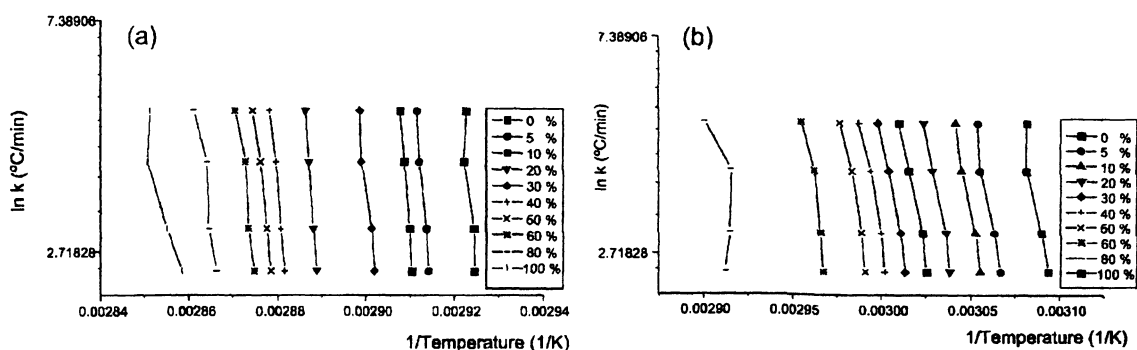


Fig. 5. $\ln k$ (°C min⁻¹) as a function of the inverse of the absolute temperature— $1/T$ (1 K^{-1}) to the yam (a) and cassava (b) starches (5 mg with 10 mg of water).

With the values of E_a and A , it is possible to obtain the rate constant, using constant temperatures of gelatinization of 65, 69, 71, 73 and 75 °C for yam and 50, 60, 65 and 70 °C for cassava starches. These temperatures refer to the beginning, middle and end of the gelatinization processes.

3. Results and discussion

3.1. Chemical analysis

The amylose content of yam starch is higher than that of cassava starch and also of common corn starch (Sigma) used here in a reference. The amylose contents of starch samples were determined by the method of Chrastil using an amylose and amylopectin standards, and the straight line obtained showed a correlation of 0.990. Using these modifications, after defating, the values obtained for common corn Sigma (used here as reference), yam and cassava starches, 27.5, 36.2 and 23.0%, respectively. Table 1 summarize the chemical composition of the samples.

The amylose content in starches were different to that reported by other authors: 17% for cassava and 28% for corn (Whistler & BeMiller, 1997), 29% for yam (McPherson & Jane, 1999), 27% for yam (Hoover & Vasanthan, 1994), 28.5

and 19.8% for yam and cassava, respectively (Gunaratne & Hoover, 2001), and 30% in yam by Mali et al. (2002) and Alves et al. (1999). These differences might be explained by the different growing conditions, the method of lipid extraction and amylose determination (Mali et al., 2002).

3.2. Rheological analysis

Fig. 1 shows the gelatinization temperature of yam and cassava starches as determined by oscillatory

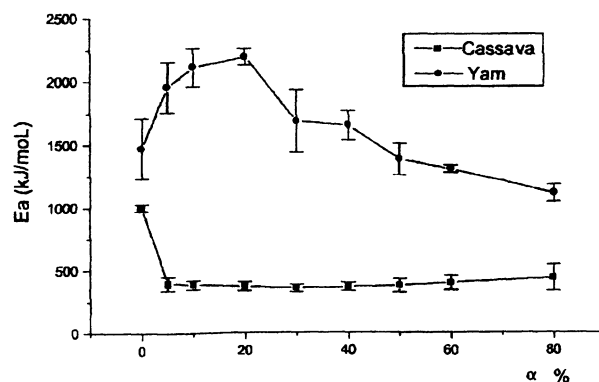


Fig. 6. Energy of activation (E_a) as a function of percentage gelatinization (α %) for yam and cassava starches.

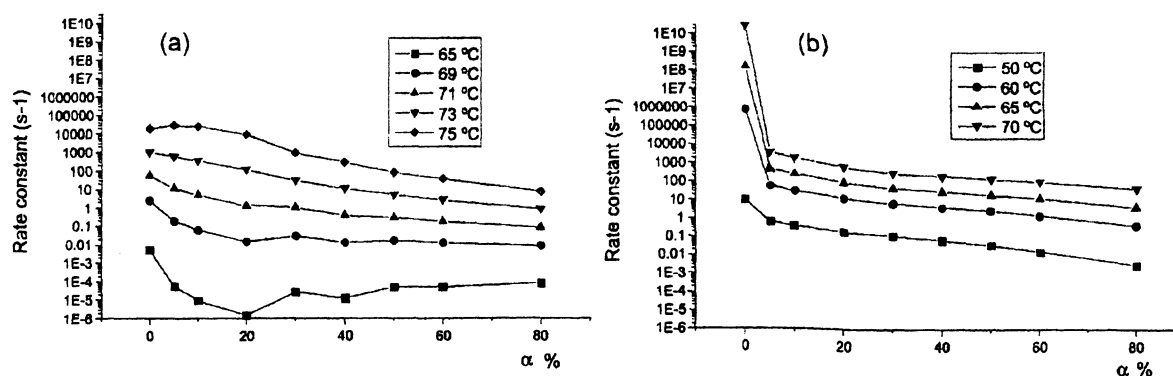


Fig. 7. Rate constant (s^{-1}) as a function of degree of gelatinization ($\alpha\%$) for yam (a) and cassava (b) starches.

rheometry, the initial temperatures being ~ 71 and ~ 62 °C, respectively. By DSC analysis, these were 69 and 52 °C. This disparity could be due to the difference in concentration. In the case of cassava, the process of gelatinization was a lower endothermic event, when analyzed by DSC (Table 2) and a spread gelatinization process (Fig. 4(a)). The yam starch had a better resolved process (Fig. 4(b)) and this probably generates a more accurate approximation in the DSC and rheological analyses.

In the dynamic rheological analysis, a viscoelastic behaviour was obtained over a frequency of 0.02–10 Hz. A linear G^* and deformation were less than 5% up to the stresses of 10 Pa for yam and 5 Pa for cassava starch (data not show). The currently used stress was 0.5 Pa.

The storage (G') and loss (G'') moduli after 24 h of refrigeration for yam and cassava starches at 50 g l^{-1} are shown in Fig. 2(a) and (b), where the formation of a true gel is shown, the G' value being three times greater than G'' . The mechanical spectra in Fig. 3 shows that yam starch gives a high viscosity paste (up to three times), when compared with the cassava starch gel, at the same concentration. The gel formed by yam had a great tendency to suffer retrogradation and to become opaque. This behavior is due to the higher content of amylose in yam than in cassava starch. Translucency of the gel of cassava starch has been reported by Whistler and BeMiller (1997).

3.3. DSC and kinetic analysis

DSC curves of yam starch at different heating rates of 2.5, 3.0, 4.0 and $5.0\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ are presented in Fig. 4.

T_{onset} , T_{end} and T_m values of the gelatinization process are shown the Table 2. It can be observed that the maximum values and those at the beginning and end of the process are identical for all DSC curves, probably due the similarity of the heating rates.

From the gradient of Fig. 5, $-E_a/R$ was obtained where E_a is the activation energy of the gelatinization process and R is the gas universal constant.

Fig. 6 shows E_a (kJ mol^{-1}) as a function of the degree of conversion or degree of gelatinization ($\alpha\%$). These data show that an increase of energy occurs in 0–20% of gelatinization, and, that prior to this, the E_a values are smaller for yam, but practically constant for the cassava sample. The profile of yam starch is similar to that obtained by Pieliowski et al. (1998) in their study on potato starch gelatinization. However, the values of E_a were lower than owns, but the temperature range was higher in their investigation.

Using the value of E_a , shown in Fig. 6, it was possible to calculate the rate constant (s^{-1}), for different temperatures (65, 69, 71, 73 and 75 °C), as depicted in Fig. 7(a) and (b) for yam, and cassava starches, where temperatures of 50, 60, 65 and 70 °C were used. As an example, heating of starch at 60 °C, when compared with the heating at 75 °C, generates a decrease in the rate constant in the order of 10^{-13} s^{-1} . The higher values of the rate constant for cassava indicate a more rapid process of gelatinization when compared with yam starch.

4. Conclusion

A more defined process of gelatinization occurs with yam starch which generates a stronger gel, as well as a higher E_a of gelatinization when compared with that of cassava. This behaviour is in accordance with and dependent on the amylose content in the starch samples.

Acknowledgements

The authors thank the Organic and Inorganic Chemistry Department of the Federal University of the State of

Ceará, Brazil for carrying out DSC analyses, Paraná Agroindustrial, and the Brazilian funding agencies: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), CAPES-PROCAD and FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos, through PRONEX-Carboidratos).

References

- Alves, R. M. L., Silva, R. S. S. F., & Grossmann, M. V. E. (1999). Gelling properties of extruded yam (*Dioscorea alata*) starch. *Food Chemistry*, *67*(2), 123–127.
- AOAC (1995) (16th ed.) (vol. 2). *Official methods of analysis of AOAC international*, Arlington, TX: Association of Official Analytical Chemistry.
- Bhattacharya, M., & Hanna, M. A. (1987). Kinetics of starch gelatinization of cooked rice. *Starch/Stärke*, *52*, 764–766.
- Bizot, H., Le Bail, P., Leroux, B., Davy, J., Roger, P., & Buléon, A. (1997). Calorimetric evaluation of the glass transition in hydrated, linear and branched polyhydroglucose compounds. *Carbohydrate Polymer*, *32*, 33–50.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., & Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *23*, 85–112.
- Burros, B. C., Young, L. A., & Carroad, P. A. (1987). Kinetics of corn meal gelatinization at high temperature and low moisture. *Journal of Food Science*, *52*, 1372–1376.
- Ghiasi, K., Hoseney, C., & Varriano-Marston, E. (1982). Gelatinization of wheat starch. III. Comparison by differential scanning calorimetry and light microscopy. *Cereal Chemistry*, *59*(4), 258–262.
- Chrastil, J. (1987). Improved colorimetric determination of amylose in starches or flours. *Carbohydrate Research*, *159*, 154–158.
- Donovan, J. W., Lorenz, K., & Kulp, K. (1983). Differential scanning calorimetry of heat-moisture treated wheat and potato starches. *Cereal Chemistry*, *60*(5), 381–387.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350–356.
- Guanaratne, A., & Hoover, R. (2001). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers*, in press.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, *48*, 422–427.
- Hoover, R., & Vasanthan, T. (1994). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical of cereal, legume, and tuber starches. *Carbohydrate Research*, *252*, 22–53.
- Kim, Y., & Wang, S. S. (1999). Starch cooking with limited water as affected by zein and guar gum. *Journal of Food Science*, *64*(1), 133–135.
- Le Lay, P., & Delmas, G. (1998). Investigation of the physical network of amorphous amylose by slow calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, *37*, 49–60.
- Mali, S., Grossmann, V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, *50*, 379–386.
- McPherson, A. E., & Jane, J. (1999). Comparison of waxy potato with other root and tuber starches. *Carbohydrate Polymers*, *40*, 57–70.
- Ozawa, T. (1965). A New method of analysing thermogravimetric data. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, *38*, 1881–1886.
- Pielichowski, K., Tomasik, P., & Sikora, M. (1998). Kinetics of gelatinization of potato starch studied by non-isothermal DSC. *Carbohydrate Polymers*, *35*, 49–54.
- Rolee, A., & LeMestre, M. (1999). Effect of moisture content on thermomechanical behavior of concentrated wheat starch-water preparations. *Cereal Chemistry*, *76*(3), 452–458.
- Whistler, R. L., & BeMiller, J. N. (1997). *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. St. Paul: Eagan Press, pp. 117–151.
- Willinger, A. H. A. (1964). In R. L. Whistler (Ed.), *Potato Starch* (vol. 4) (pp. 9–13). *Methods in Carbohydrate Chemistry*, New York: Academic Press.
- Wurzburg, M. S. (1986). *Starch. Modified Starches: Properties and Uses*. Boca Raton, USA: CRC Press, pp. 3–16.
- Yu, L., & Christie, G. (2001). Measurement of starch thermal transitions using differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, *46*, 179–184.
- Zobel, H. F., & Stephen, A. M. (1995). Starch: structure, analysis, and application. In A. M. Stephen (Ed.), *Food Polysaccharides and their Applications* (pp. 19–65). New York: Marcel Dekker Inc.



Effect of the oxidation level on the thermogravimetric kinetics of an oxidized galactoxyloglucan from *Hymenaea courbaril* (Jatobá) seeds

R.A. Freitas^{b,c,d}, S. Martin^{b,d}, R.C. Paula^a, J.P.A. Feitosa^a, M.-R. Sierakowski^{d,*}

^a Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, P.O. Box 12.200, CEP 60455-760 Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, P.O. Box 19046, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^c Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, P.O. Box 360, 88302-202 Itajaí, SC, Brazil

^d Laboratório de Biopolímeros, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, P.O. Box 19081, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

Received 6 March 2003; received in revised form 7 May 2003; accepted 10 June 2003

Abstract

A natural hydrocolloid extracted from *Hymenaea courbaril* seeds contains Glc:Xyl:Gal:Ara in a molar ratio of 51:27:21:1. Selective TEMPO radical oxidation (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) at C-6 of the polysaccharide gave products with 3.0, 5.1 and 9.5% of carboxyl groups as determined colorimetrically. Molecular mass analyses showed a decrease in the M_w of the oxidized galactoxyloglucans and an increase in angular fit from the RMS ratio versus molar mass plot. This indicated that the oxidation process generated a more rigid structure, going from a random coil in the native polymer to a rod conformation in the oxidized samples, probably due to the polyanionic structure. Thermogravimetric kinetics of degradation was obtained using the Arrhenius equation and an increase in the degradation rate, was apparently directly dependent on the oxidation level.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *H. courbaril*; Galactoxyloglucan; Polysaccharide; TEMPO oxidation; Thermogravimetry

1. Introduction

Galactoxyloglucans as hydrocolloid model can be present in the primary cell walls of higher plants (dicotyledons and non-graminaceous monocotyledons) and in the cotyledonary cell of some dicotyledonous seeds, where they function as a storage polysaccharide [1]. An example is that obtained from seeds of *Tamarindus indica*, which has a large number of commercial and industrial applications [2]. In Brazil, an abundant font of a galactoxyloglucan is seeds from *Hymenaea courbaril* (Jatobá), which Lima et al. [3,4] analyzed by methylation and found that its glycosidic linkages are practically the same as those of other seed galactoxyloglucans, which have a cellulose-like β -(1,4)-D-glucan backbone

to which single-unit α -D-Xylp substituents are attached at O-6. Some Xylp residues are substituted at O-2 by β -D-Galp.

In the Carbohydrate Group of Federal University of Paraná (UFPR) considerable attention has been paid to the galactoxyloglucan from the seeds of *H. courbaril*, which was obtained at different Brazilian locations and whose structure and properties have been determined (Lima et al. [3,4]; Souza-Lima et al. [5]; Vargas-Rechia et al. [6]; Martin et al. [7]; Freitas et al. [8]).

The structure and applications of polysaccharides and their oxidized products have been widely studied. Thermogravimetric analysis has been reported to be a promising and sensitive technique for characterizing structural modifications of natural polysaccharides (Stivala et al. [9]; Varma and Chavan [10] and Varma et al. [11]). As an example, Varma et al. [11] studied the galactomannan of guar gum and its periodate oxidation products, having 1.2, 3.1, 13, 26.7 and 54.9% of oxidation, and showed that the thermal analysis is a sensitive tool for differentiating periodate oxi-

* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-3260; fax: +55-41-361-3186.

E-mail address: mariarita.sierakowski@ufpr.br (M.-R. Sierakowski).

dized products. In this work, the authors observe that occur an intrinsic relation between molecular composition and oxidative stability.

Using the methodology of de Nooy et al. [12–14], Sierakowski et al. [15] studied the selective oxidation of a galactomannan from seeds of *Leucaena leucocephala* (Man:Gal ratio of 1:3) with TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) at CH₂OH-6 which gave rise to CO₂H-6 groups. Sierakowski et al. [16] studied the oxidation and characterization of a galactomannan extracted from seeds of *Cassia fastuosa* by the same method and investigated the adsorption behavior of the polyelectrolyte onto amino-terminated surfaces, by ellipsometry and contact angle measurements.

We now investigate the effect of oxidation levels on the structure, conformation and thermal properties of a galactoxyloglucan obtained from seeds of *H. courbaril*.

2. Experimental

2.1. Plant material

Seeds of *H. courbaril* were harvested in the Foz do Chopin Forest Reserve, Paraná State, Brazil. The galactoxyloglucan (HXG) was obtained by exhaustive aqueous extraction at 25 °C from pooled and milled seeds (40 g l⁻¹ for each extraction process). The viscous extracts were centrifuged at 10,000 × *g* and the supernatant passed sequentially through Millipore filter membranes with pore sizes of 3 and 0.8 μm and, then precipitated with two volumes of ethanol, washed with acetone and dried at 25 °C to give pure products [8].

2.2. Selective oxidation by TEMPO

Galactoxyloglucan (1 g) was solubilized at 25 °C in 500 ml of water. The solution was treated with TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) (0.53 mg), NaBr (4.64 mg), and sodium hypochlorite (0.26 ml at 12%), that each 0.1 mmol of primary alcohol was converted to acid. The reaction mixture was maintained at 3 °C, with stir-

ring under nitrogen. At the end of the oxidation process, 16 mg of NaBH₄/0.1 mmol of primary alcohol and 20 ml of ethanol was used to reduce the excess of oxidizing agent in the medium.

The alcohol to acid conversion was estimated by titration of the mixture with NaOH (0.0888 mol l⁻¹) during the oxidation process. The initial pH was ~9.5 and was maintained by titration with NaOH aqueous solution when the pH decreased to 9.2. The formation of carboxyl groups corresponded to the amount of titrated NaOH and then to obtain theoretical oxidation ratios of 3, 6 and 12%, we used 7.0, 14 and 28 ml of the standard NaOH aqueous solution.

The TEMPO (stable radical) (Fig. 1a) can be oxidized by several reagents to give a nitrosonium ion (Fig. 1b). This is a strong oxidant and shows selectivity towards primary hydroxyl functions over secondary ones. Obviously there will be a competing reaction due the undesired oxidation of secondary alcohols by hypochlorite and hypobromite that occur mainly at pH < 9. But using higher pH (9.2–9.5) and lower temperature the selectivity was more than 95% [12,13]. The schematic representation of the oxidation process was showed in the Fig. 1.

2.3. Chemical analysis

Total carbohydrate was assayed by the phenol–H₂SO₄ method [17], protein by the method of Hartree [18], ash and moisture by that of AOAC [19]. The uronic acid content was assayed by the *m*-hydroxybiphenyl method [20].

Monosaccharide contents of galactoxyloglucan (HXG) were determined on complete acid hydrolysis with M TFA at 100 °C for 5 h [21]. The solutions were evaporated to a residue that was repeatedly dissolved in H₂O and evaporated. The products from each hydrolysis were reduced with NaBH₄ and, then acetylated with pyridine–Ac₂O (1:1 (v/v)), for 12 h at 25 °C [22]. The resulting alditol acetates were analyzed by GC–MS Varian and detection with a Saturn 2000R mass spectrometer, gas chromatography, using a DB-225 capillary column at 220 °C with nitrogen as the carrier gas.

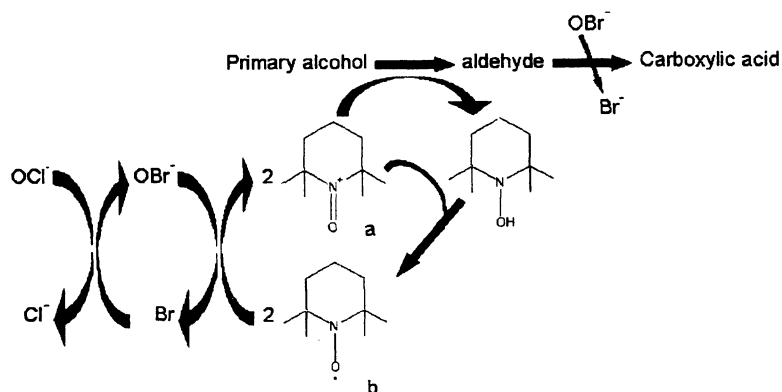


Fig. 1. Schematic representation of TEMPO oxidation process [12].

2.4. Infrared spectroscopy—FTIR

FTIR analysis was carried out using a spectrometer Hartmann and Braum MB-series, with KBr as support, at a range of 400–4000 cm^{-1} , a resolution of 2 cm^{-1} and 19 scans at a rate of 10 scans per minute. Solutions of oxidized samples were passed through a cationic resin (H^+) to give the acid form of the polymer.

2.5. Average molar mass (M_w) and R_g

To calculate the molar mass, the ratios of the refractive index to the concentration (dn/dc) of the galactoxyloglucan (HXG) and oxidized galactoxyloglucans (HXGOX) were determined using a Waters 2410 differential refractometer at wave length of 546 nm with concentrations of 1.0; 0.5; 0.25 and 0.125 g l^{-1} (filtered through Millipore filter 0.45 μm).

Aqueous solutions of HXG (0.5 g l^{-1}) and HXGOX (4.0 g l^{-1}) were filtered through a Millipore filter (0.22 μm) and injected into a GPC with 2000, 500, 250 and 120 Waters' ultrahydrogel columns. Detection was carried out with a Waters 2410 differential refractometer and a light scattering multiangle at 632.8 nm (DAWN DSP-F Wyatt technology model). The eluent used in this system was 0.1 mol l^{-1} sodium nitrite containing 200 ppm of azide at a flux of 0.6 ml min^{-1} .

2.6. Thermogravimetric analysis

The experiments were conducted using a Shimadzu 50 H Thermogravimetric Analyzer (TGA) with a sample weight of 9.9 ± 0.1 mg. All the experiments were performed under a flux of nitrogen, which was maintained at a constant flow rate of 50 ml min^{-1} . Experiments were conducted at five heating rates of 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 $^\circ\text{C min}^{-1}$ with the sample being heated from 25 to 600 $^\circ\text{C}$. The sample holder was a platinum pan [23,24]. The samples were kept at 105 $^\circ\text{C}$ for 3 h before each experiment (this precaution was taken due to the differential water content in the samples, using in this form the same mass of polysaccharides in the analysis) and the weight-loss curves were normalized to 100% of mass at 200 $^\circ\text{C}$, due to the residual moisture present in the sample.

2.7. Kinetic analysis

Various theoretical and empirical models are utilized to represent the observed transition. In each model, the velocity of reaction can be expressed as a function $f(\alpha)$, where α is the conversion value, in this case the degradation. The dependence of the constant rate on temperature can be obtained from the Arrhenius equation (Eq. (1)). To determine the activation energy (E_a), the \ln of heating rates (K) was plotted against the reciprocal of the absolute temperature for different weight-losses ($\alpha = 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60$ and 80%). The slope of the line gave $-E_a/R$, where R is the universal gas constant. The intersection of the line with the or-

denate gives the pre-exponential factor (A) in the Arrhenius equation [23–25] (Eq. (1)):

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (1)$$

For each E_a value corresponding to α , the constant rate at 250 and 350 $^\circ\text{C}$ was calculated.

3. Results and discussion

3.1. General physical and chemical analyses

Milled endosperms of *H. courbaril* seeds were submitted to aqueous extraction at 25 $^\circ\text{C}$ and, after fractionation using Millipore filters, a water-soluble galactoxyloglucan (HXG) was obtained (18.5% yield) [8].

Chemical analysis showed the presence of carbohydrate (81%), protein (2%), moisture (15%) and ash (0.4%) [8].

In the TEMPO oxidation process the polymer can be oxidized in the C-6 of galactose and also in C-6 of internal glucose units, but we calculate the percentage of oxidation only in relation to the C-6 content of galactose. The HXG in study has a molar relation Gal:Xyl:Glc of $\sim 1:1.2:2.4$ and traces of arabinose units. To generate 3, 6 and 12% of oxidized galactose, 0.166, 0.333 and 0.666 mmol were necessary, respectively.

GC-MS analysis of derived alditol acetates, showed that HXG contained Glc:Xyl:Gal:Ara in a molar ratio of 51:27:21:1. In 9.5% oxidized polysaccharide, carrying out hydrolysis under identical conditions, the values were 58:31:10:1. The level of glucose and xylose, thus increase by $\sim 6\%$, but the galactose level decrease by 11.6%, indicating that the oxidation process occurs mainly at this unit, due to the formation of the galacturonic acid.

During the oxidation process, the time and the volume of aqueous NaOH added was used to the control of the derivatization process (Fig. 2). The degree of oxidation was confirmed by a colorimetric method for quantification of

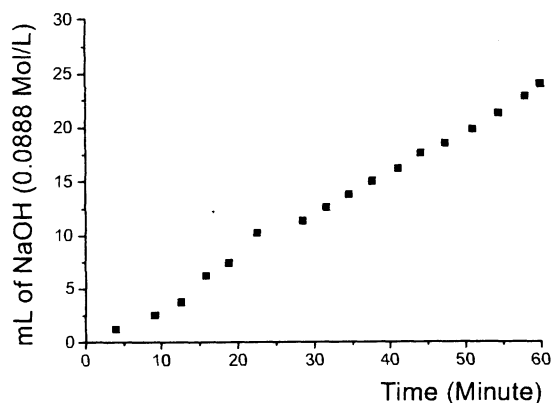


Fig. 2. Volume titrated of NaOH solution (0.0888 mol l^{-1}) as a function of the time during the oxidation process.

Table 1
Determination of oxidation levels of HXGs derived

Sample	Colorimetric method (%) ^a
HXGOX3	2.8 ± 0.4
HXGOX5	5.4 ± 0.5
HXGOX10	9.5 ± 0.15

^a Uronic acid colorimetric method [20]. Median ± standard derivation of three independent analysis.

uronic acids (Table 1) [20]. The same approach was used by de Nooy et al. [12–14]. The products with 2.8, 5.4 and 9.5% of oxidation are now named HXGOX3, HXGOX5 and HXGOX10, respectively.

The presence of uronic acid was qualitatively confirmed in the products by infrared spectroscopy, where a band was observed at 1735 cm^{-1} arising from the stretching vibration of carbonyl group (C=O) (data not shown).

The dn/dc values for the HXG and HXGOXs were 0.113 and 0.130 ml g^{-1} , respectively. The molar mass by GPC-light scattering analysis showed that conversion to an oxidized polymer was practically complete, because light scattering detected a molecule with a higher molar mass and with the same elution time as that of the unmodified polymer (HXG: 35–45 min—peak A), but as the concentration in the oxidized polymer was so low it was impossible to detect by the refraction index. The new peak with larger elution time (38.5–56 min—peak B), in the Fig. 3, appears in the oxidized samples and represents the product. M_w values were 1.4×10^6 and $1.0 \times 10^5\text{ g mol}^{-1}$, respectively for HXG and HXGOXs. In the sample with high degree of oxidation (HXGOX10) the peak A, that represents the unmodified polymer, is smaller than that with 3% oxidation. On analyzing the elution profile with the refractive index detector (data not shown) of the modified polymers, it was only possible to observe peak B, and not the starting material (peak A). This indicated a homogeneous macromolecule, with highly polydisperse values of M_w/M_n from 1.4 for the original polymer, to ~ 3.0 for the product. Another important observation is that the plot of the RMS radius against molar mass (Fig. 4) gave information con-

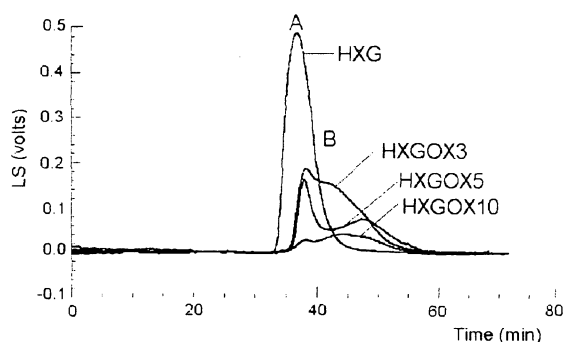


Fig. 3. GPC analysis with light scattering detector at 90° for HXG and HXGOX3, HXGOX5 and HXGOX10. (A) Native and (B) oxidized polysaccharides.

cerning conformation in solution. With the increase of the degree of oxidation, it changes from a random coil (angular fit of 0.5) to a rod-like structure (1.0) (Fig. 4).

3.2. Thermogravimetric analysis

Fig. 5 shows the thermal degradation of HXG (A), HXGOX3 (B), HXGOX5 (C) and HXGOX10 (D) at heating rates of $2.5, 5.0, 10.0, 20.0$ and $40.0\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ under nitrogen, starting from 200 to $600\text{ }^\circ\text{C}$.

Fig. 6 shows an overlapping of the derivative of the weight-loss curves (dTG) at $2.5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ for HXG, and 3, 5 and 10% HXGOX. It demonstrates that with an increasing degree of oxidation, the temperature at which degradation begins to be observed is lower. This indicates that the oxidation reduced the thermal stability at the beginning of the degradation process. The temperature at the beginning (T_{onset}), end (T_{end}) and middle point (T_m), and the mass loss in each part of the degradation process is shown in Table 2.

Fig. 6 and Table 2 simplify the observation that:

- A new process of degradation appears with the modified polysaccharide at lower temperatures (first event $\sim 230\text{--}278\text{ }^\circ\text{C}$), when compared with that of the unmodified one. The second event is referent to the unmodified polymer apparently.

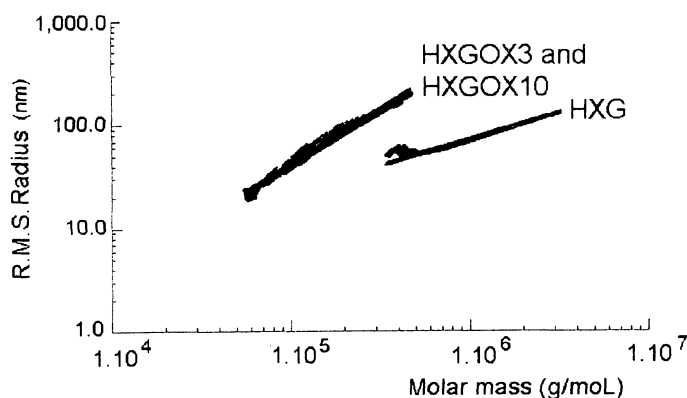


Fig. 4. rms radius (nm) as a function of molar mass (g mol^{-1}).

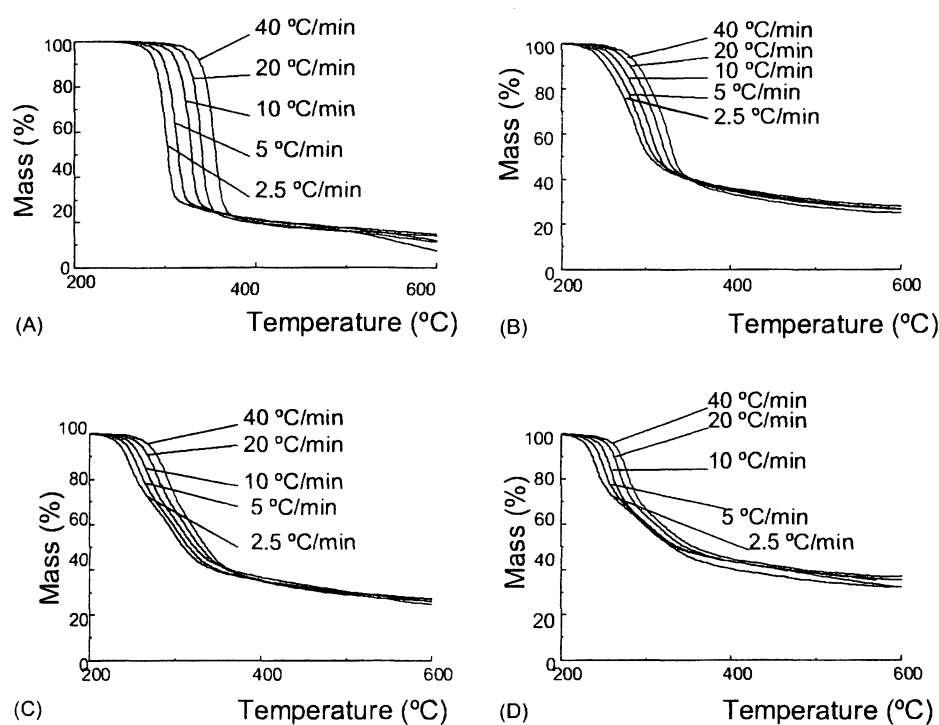


Fig. 5. Weight-loss curves for HXG (A), HXGOX3 (B), HXGOX5 (C) and HXGOX10 (D) at heating rates of 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 and 40.0 °C min⁻¹ under nitrogen.

Table 2
Degradation temperatures and weight-loss percentages of galactoxyloglucan and that with in 3, 5 and 10% oxidized, at a heating rate of 2.5 °C min⁻¹

Sample	T_{onset} (°C)	T_{end} (°C)	T_m (°C)	Weight-loss (%)
HXG	277	317	300	70.4
HXGOX3 first event	232	260	247	12.9
HXGOX3 second event	264	309	284	42.8
HXGOX5 first event	231	263	248	30.5
HXGOX5 second event	277	327	298	29.9
HXGOX10 first event	226	253	241	28.5
HXGOX10 second event	275	329	299	18.8

- The area of the new event (first event) in the modified polymer showed in Table 2, increases with the degree of oxidation.
- The Table 2 show that the total degree of degradation decreases with the increase of oxidation (first and second event). At the beginning heating process the oxidation level increase the degradation, and at the end generate products more stable to degradation.

3.3. Kinetic analysis

Fig. 7 shows \ln of the heating rates (°C min⁻¹) against the reciprocal of the absolute temperature. The slope of this plot was utilized to obtain the values of E_a at different α (%) values.

Fig. 8 shows the relation between the activation energy (E_a) of HXGOXs and HXG obtained at different α values (5, 10, 20, 30, 40 and 50%). The data indicate an increase in the energy of activation in the thermal degradation process is

dependent of the oxidation level of the molecule. With HXGOX3, the E_a was up to 1.68 times, HXGOX5 up to 1.94 times, and HXGOX10 up to 2.5 times increase, compared with that of the native polysaccharide. The data show that

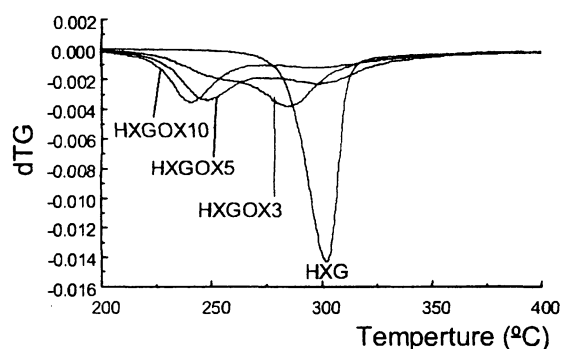


Fig. 6. dTG of weight-loss curves for HXG, HXGOX3, HXGOX5 and HXGOX10 at a heating rate of 2.5 °C min⁻¹ under nitrogen.

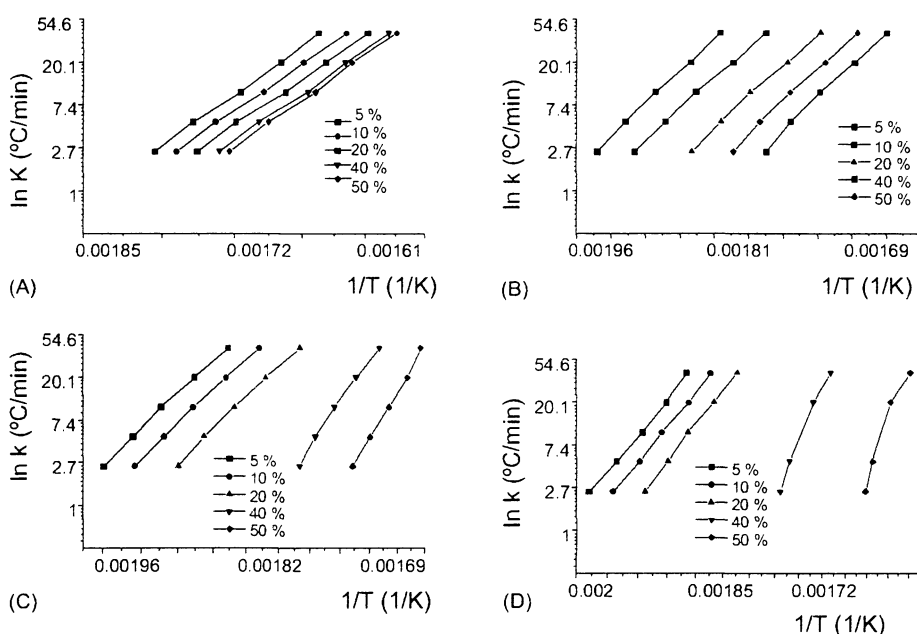


Fig. 7. $\ln k$ against $1/T$ for HXG (A), HXGOX3 (B), HXGOX5 (C), and HXGOX10 (D). The lines represent α (%).

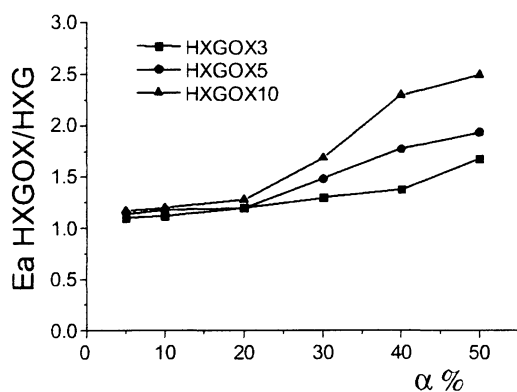


Fig. 8. Ratio between the E_a of HXGOXs to HXG at different α (%) values.

an increase in the oxidation level generates an increase in the energy necessary for thermal degradation. The E_a data also confirm a better thermal stability after 20% polyelectrolyte degradation, because of an increase in the E_a (after

this degradation percentage). A mathematical analysis, using the conversion values of 5–20%, it was possible to observe a linear equation fit for these data, without large deviation from the straight line for all the values of samples studied. However, at α of 20–50% a straight line fit was obtained with angular coefficient for the HXGOX/HXG ratio of 0.0152, 0.0252 and 0.0427, respectively for 3, 5 and 10% oxidation. The ratio among these data indicates that the increase in E_a depends on the oxidation level. As an example, if the oxidation increased by 1.7-fold (HXGOX5/HXGOX3), the increase of E_a obtained by the ratio between the angular coefficient also increased in a same proportion of 1.65. This is an indication that the energy used for degradation is directly dependent of the level of oxidation.

Fig. 9 shows the rate constant of HXG and HXGOX obtained at 250 °C (Fig. 9A) and 350 °C (Fig. 9B). A notable effect occurs when the rate was obtained at 250 °C (Fig. 9A); at a low loss mass (α %) the rate constant was larger than that of the unmodified polysaccharide by 19-, 33- and 53-fold, respectively, for samples with 3, 5 and 10%

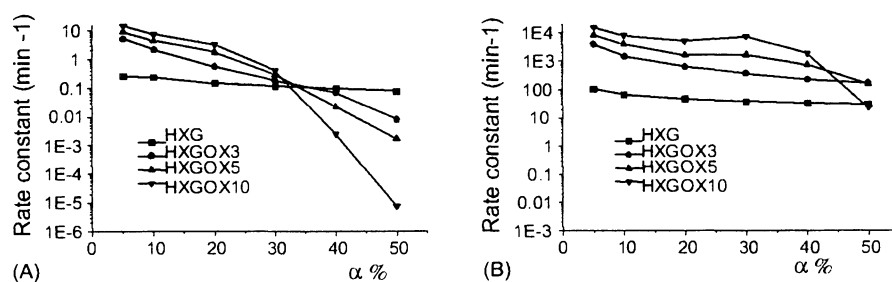


Fig. 9. Rate constant of HXG, HXGOX3, HXGOX5 and HXGOX10 at 250 °C (A) and 350 °C (B).

of oxidation. At higher level of loss mass (50%), the ratio appears to be the opposite from that found for a low mass loss. In this case, the loss of mass of modified in relation to unmodified polymer was 0.1, 0.02 and 9.4×10^{-5} times, respectively, for HXGOX3, HXGOX5 and HXGOX10. This shows a large reduction of the rate constant occurs in this system, depending on the level of oxidation, probably due the formation of a stable degradation product. This was observed when the α (%) value was higher than 40%, when the products appear to be more stable than the native polymer.

Fig. 9B shows that at a weight-loss of 5% for HXGOX3, HXGOX5 and HXGOX10 the ratios of increment are 36, 79 and 146 times at 350 °C, respectively. This increase in the rate at the beginning of the degradation process indicates that the selective oxidation produce uronic acid mainly at the galactose residue (monosaccharide composition by GC-MS and due by the fact that the xylose does not have a free CH₂OH group) generating less stable products to heating.

4. Conclusions

The galactoxyloglucans containing CO₂H-6 groups obtained by selective TEMPO oxidation of HXG contained 2.8, 5.4 and 9.5% uronic acid. The oxidations were confirmed by colorimetric and spectroscopic method (FTIR) which give related results, although the found is more accurate HXGOX3, HXGOX5 and HXGOX10 that suffered a reduction in the molar mass from 1.4×10^6 to $\sim 1.0 \times 10^5$ g mol⁻¹, as observed by refractive index and light scattering detectors. The introduction of uronic acid units also modifies the conformations from a random coil for HXG to a rod-like structure for the products. The kinetics of thermal degradation were directly dependent of the oxidation level, namely that with the increase in the oxidation level, increased proportionally E_a and the rate constant at the beginning of the process. This new application is important since it can be used to better differentiate oxidized polymers, with small differences in the degree of oxidation.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian funding agencies: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), CAPES (PROCAD,

UFPR/UFC) and FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos, through PRONEX-CARBOIDRATOS).

References

- [1] J.S.G. Reid, *Adv. Bot. Res.* 11 (1985) 125–155.
- [2] M.J. Gidley, P.J. Lillford, D.W. Rowlands, P. Lang, M. Dentin, V. Crescenzi, M. Edwards, C. Fanutti, J.S.G. Reid, *Carbohydr. Res.* 214 (1991) 299–314.
- [3] N.N. Lima, F. Reicher, J.B.C. Corrêa, J.L.M.S. Ganter, M.-R. Sierakowski, *Ciência e Cultura (Brasil)* 45 (1993) 22–26.
- [4] N.N. Lima, C.G.V. Rechia, J.L.M.S. Ganter, F. Reicher, M.-R. Sierakowski, *Int. J. Biol. Macromolecules* 17 (1995) 413–415.
- [5] M.M. Souza-Lima, L. Ono, F. Reicher, M.-R. Sierakowski, *Natural and sulfated polysaccharides from casealpiniaceae seeds*, *Latin Am. Appl. Res.* 26 (1996) 1–3.
- [6] C.G. Vargas-Rechia, F. Reicher, M.-R. Sierakowski, A. Heyraud, H. Driguez, Y. Liénart, *Plant Physiol.* 116 (1998) 1013–1021.
- [7] S. Martin, M.M. Souza-Lima, P.A.J. Gorin, F. Reicher, M.-R. Sierakowski, in: *Proceedings of the Third International Symposium on Natural Composites and Composites*, São Pedro, SP, Brazil, 2000, pp. 166–170.
- [8] R.A. Freitas, P.A.J. Gorin, J. Neves, M.-R. Sierakowski, *Carbohydr. Polym.* 51 (2003) 25–32.
- [9] S.S. Stivala, K. Junichi, L. Reich, *Thermochim. Acta* 50 (1981) 111–122.
- [10] A.J. Varma, V.B. Chavan, *Polym. Degrad. Stab.* 49 (1995) 245–250.
- [11] A.J. Varma, S.P. Kokame, G. Pathak, S.D. Pradhan, *Carbohydr. Polym.* 32 (1997) 111–114.
- [12] A.E.J. de Nooy, A.C. Besemer, H. van Bekkum, *Receuil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 113 (1994) 165–166.
- [13] A.E.J. de Nooy, A.C. Besemer, H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.* 269 (1995) 89–98.
- [14] A.E.J. de Nooy, A.C. Besemer, H. van Bekkum, J.A.P.P. van Dijk, J.A.M. Smith, *Macromolecules* 29 (1996) 6541–6547.
- [15] M.-R. Sierakowski, M. Milas, J. Desbrières, M. Rinaudo, *Carbohydr. Polym.* 42 (2000) 51–57.
- [16] M.-R. Sierakowski, R.A. Freitas, J. Fujimoto, D.F.S. Petri, *Carbohydr. Polym.* 49 (2002) 167–175.
- [17] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
- [18] E.F. Hartree, *Anal. Biochem.* 48 (1972) 422–427.
- [19] AOAC, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16 ed., Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, TX, 1995.
- [20] N. Blumenkrantz, G. Asboe-Hansen, *Anal. Biochem.* 54 (1973) 484–489.
- [21] G.A. Adams, *Methods Carbohydr. Chem.* 5 (1965) 269–276.
- [22] M.L. Wolfrom, A. Thompson, *Methods Carbohydr. Chem.* 2 (1963) 211–215.
- [23] B. Dickens, J.H. Flynn, *Polymer Characterization*, ACS, New York, 1983, pp. 209–232.
- [24] M.E. Brown, *Introduction to Thermal Analysis—Techniques and Applications*, Chapman and Hall, New York, 1988, pp. 7–21.
- [25] T. Ozawa, *Bull. Chem. Soc. Japan* 38 (1965) 1881–1886.

Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources as support to the hypothesis of molecular aggregates

Freitas, R. A.¹⁻³; Martin, S.²⁻³; Santos, G.L.³; Valenga, F.³; Buckeridge, M.S.⁴; Reicher, F.² and Sierakowski, M. -R^{3*}.

¹Curso de Farmácia - NIQFAR, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI),
P.O. Box 360, 88302-202, Itajaí, SC, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR),
P.O. Box 19046, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

³Laboratório de Biopolímeros, Departamento de Química, UFPR,
P.O. Box 19081, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

⁴Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica,
P.O.Box 4005, 01061-970, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

The properties of polysaccharides such as the gelation and thickening are related to their macromolecular features, in other words, to the molar masses and the volume occupied by the polymer chain in solution. Xyloglucan (**XG**) is a polysaccharide with potential industrial applications, which in this study was extracted from the seeds of *H. courbaril* (jatobá) harvested from trees growing at different locations in Brazil. They were from Foz do Chopin Forest Reserve, State of Paraná (**HC I**), Cuiaba (**HC II**) and Sinope/State of Mato Grosso (**HC III**), Natal/State of Rio Grande do Norte (**HC IV**), Fortaleza/State of Ceará (**HC V**) and *T. indica* (**TM**) from Conceição de Almeida/State of Bahia – Brazil. In the present work we observed by HPSEC-MALLS and intrinsic viscosities results that when samples were heated at 85°C for 2 h there was a reduction of aggregation. The comparative observation of molecules after they became less aggregated showed a higher value of C_{∞} in the xyloglucans from *H. courbaril*, probably due the presence of an unique oligossaccharide series present in the *H. courbaril* samples (**XXXXG**), that possibly generates a more rigid molecule when compared with that of *T. indica*.

Keywords: Xyloglucan, *H. courbaril*, aggregation

* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-3260

Fax: +55-41-361-3186

e-mail address: mariarita.sierakowski@ufpr.br

1. Introduction

The use of the macromolecular characterisation is a field of interest due to major uses of polysaccharides, specially, in food industries. A polysaccharide with potential industrial application is the xyloglucan. It can be found in the primary cell walls of higher plants (dicotyledons and non-graminaceous monocotyledons) and in the cotyledon of some dicotyledonous seeds, where they function as storage polysaccharide (Reid [1]). They have a cellulose-like β -(1,4)-D-glucan backbone to which single-unit α -(1,6)-D-Xylp substituents are attached. Some Xyl residues are further substituted at O-2 by β -D-Galp (Hayashi [2]).

Xyloglucan was firstly detected by in seeds of *H. courbaril* by Kooiman [3]. In Brazil the first study was made by Buckeridge and Dietrich [4] and the chemical structure was subsequently determined by Lima et al. [5] by methylation analysis. These authors found that the glycosidic linkages are practically the same as the ones obtained for xyloglucan from seeds of *Tamarindus indica*. However, in this studies, samples of seeds were collected from isolated populations in the state of São Paulo/Brazil (the Botanic Garden in the first and at the municipality of Teodoro Sampaio), and lacked accuracy concerning the composition of cellulose limit digest oligosaccharides, which have recently been used to characterise seed xyloglucans from different sources (Lima et al. [6]; Buckeridge et al. [7] and Tiné et al. [8]).

Buckeridge et al. [9] found in seeds of *Hymenaea courbaril* the presence of a new family of xyloglucan oligosaccharides (XXXXG) by usage of sequential enzymatic digestion with β -glucosidase and oligosaccharide specific α -xylosidase, both from nasturtium. The authors also mentioned that the difference in the primary structure of jatobá's xyloglucan was likely to be the feature responsible for a lower interaction with iodine. This indicated different physic-chemical behaviour in solution when compared the polymer from *H. courbaril* with xyloglucans from seeds of *T. indica* and *Copaifera langsdorffii*. The new family of oligosaccharides (XXXXG) but galactosilated was obtained and identified by Tine et al. [8].

Other studies were performed in which xyloglucan from *Hymenaea courbail* seeds were obtained from different location in Brazil and where their structure and properties have been determined (Vargas-Rechia, Reicher, Sierakowski, Heyraud, Driguez & Liènant [10]; Martin, Souza-Lima, Gorin, Reicher & Sierakowski [11]; Freitas, Gorin, Neves & Sierakowski [12]; Martin, Freitas, Obayashi & Sierakowski [13]; Lima, Quorin, Naddaf, Wilhelm, Ribas & Sierakowski [14]; Freitas, Martin, Paula, Feitosa and Sierakowski [15]; Tiné, M.A.S., Cortelazzo & Buckeridge [16]; De Lima & Buckeridge [17] and Tiné, Lima, & Buckeridge [8]).

Studies were also performed with xyloglucans obtained from seeds of *Tamarindus indica*. Taylor & Atkins [18] studied it by X-ray diffraction and observed a repeat lattice spacing of 2.06 nm referent to the space of four glucose residue. Gidley et al. [19] obtained by light scattering the molar mass, R_g , R_h and the C_∞ that was respectively $8.8 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$, 110 nm, 71 nm and 110. Lang & Burchard [20] studied by static and dynamic light scattering the random lateral aggregation

behaviour of single chains. This type of aggregation forms bundle-shaped particles and causes remarkable degree of particle stiffness. Such behaviour was confirmed by Lang & Kajiwara [21], that observed the multi stranded lateral aggregates in aqueous solution. For the xyloglucan from *Detarium senegalense*, Wang et al [22 and 23] obtained similar oligosaccharide composition as in tamarind and observe the presence of lateral branching in the molecule. Piccout et al. [24] improve the solubilization of the xyloglucans obtained from Detarium and Tamarind seed. The authors observed that the pressure and heating reduce substantially the molecular aggregation.

The use of light scattering to observe aggregation was utilised for other polysaccharides such as galactomannan (Robinson et al. [25] and Cheng et al. [26]), linear α -glucans (Roger et al. [27]) and polygalacturonic acid (Alonso-Mougán et al., [28]).

The use of the SEC-MALLS present several advantages in relation the static light scattering alone to the study of the macromolecular behaviour, such as faster analyses and also the use of only one solution. The uncertainty is usually considered to be 3-5% for M_w and 5-10% for R_{gw} . Another advantage is the fact that the complete molecular weight distribution can be obtained (Roger et al. [27]). The MALLS in combination with refractometer detection (RI) should be an optimal detector combination in size exclusion chromatography (SEC). This combination of techniques is well known as being very sensitive to the presence of aggregates in polymer solutions (Wittgren & Porsch [29]).

Although the chemical structure of seed galactomannans and xyloglucans are quite well known, studies of the variations in structure in plant material from different sources (or populations) are rare. As example, was the study for galactomannans from *Leucaena leucocephala* (Buckeridge et al. [30]) and for xyloglucans from seeds of *Copaifera langsdorffii* from populations of forest and savanna (Buckeridge et al. [31]). In the latter study, the authors found important differences in the fine structure of the xyloglucans from the two biomes and proposed that these differences might be related to possible environmental effects during polysaccharide biosynthesis.

In this work, after performing a comparative fine structural analysis in terms of oligosaccharides of xyloglucans from different sources in Brazil (Cuiabá and Sinope/State of Mato Grosso, Fortaleza/State of Ceará, Natal/State of Rio Grande do Norte, Foz do Chopin Forest Reserve, State of Paraná), we examined the macromolecular behaviour of the xyloglucans from *Hymenaea courbaril* and the results were compared with that from *Tamarindus indica* using the relation of the oligosaccharides content/hydrodynamic behaviour.

2.0. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material

Seeds of *Hymenaea courbaril* L. were harvested from the Foz do Chopin Forest Reserve, State of Paraná (**HC I**), Cuiaba (**HC II**) and Sinope/State of Mato Grosso (**HC III**), Natal/State of Rio Grande do Norte (**HC IV**), Fortaleza/State of Ceará (**HC V**) and *T. indica* (**TM**) from a commercial source, Conceição de Almeida /State of Bahia – Brazil. The xyloglucans (XGs) were obtained by exhaustive aqueous extraction at 25°C from pooled and milled seeds (40g.L⁻¹ for each extraction process). The viscous extracts were purified by centrifugation at 10,000xg, 20 min and the supernatant sequentially passed through Millipore filter membranes with pore size of 3 and 0.8 µm. The polymer was obtained after precipitation with 2 volumes of ethanol 96° and washed with acetone (Freitas et al. [12]).

2.2. Chemical analyses

Total carbohydrate was assayed by the phenol-H₂SO₄ method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith [32]), protein by the method of Hartree [33], and moisture by loss of water by thermogravimetric analysis from 25 to 200°C at 10°C.min⁻¹.

Monosaccharide contents of XGs were determined after complete acid hydrolysis with H₂SO₄ 72% for 1h on ice, diluted to 8% and heated at 100°C for 4 hours (Selvendran et al. [34]). The solutions were neutralised with barium carbonate. The products from each hydrolysis were reduced with NaBH₄,

acetylated with pyridine-Ac₂O (1:1 v/v) for 12 h at 25°C (Wolfrom & Thompson [35]), and the resulting alditol-acetates were analysed by GC–MS Varian and detected with a Saturn 2000R mass spectrometer. using a DB-225 capillary column at 220°C with nitrogen as the carrier gas.

2.3. Gel Permeation Chromatography (GPC) – Multiangle Laser-Light Scattering (MALLS)

To calculate the molar mass, the ratios of the refractive index and concentration (dn/dc) of the XGs (concentrations of 1.0; 0.5; 0.25 and 0.125 g.L⁻¹, filtered through Millipore filter 0.45 μm) were used a Waters 2410 differential refractometer at wave length of 546 nm.

For GPC analysis, aqueous solutions of HXG (0.5 g.L⁻¹) were filtered through a Millipore filter (0.22 μm) and injected in a series 2000, 500, 250 and 120 Waters' ultrahydrogel columns. Detection was carried out with a Waters 2410 differential refractometer and a light scattering multiangle at 632.8 nm (DAWN DSP-F Wyatt technology model). The eluent used in this system was 0.1 mol.L⁻¹ sodium nitrite containing 200 ppm of azide at a flux of 0.6 ml.min⁻¹.

The analyses mentioned above were also performed with the samples heated at 85°C for 2h in a sealed tube to avoid evaporation. After cooling to 25°C the samples were inject in the GPC.

To realize the GPC and rheological analyses was determined the critic concentration that is referent to the limit between the semi-diluted and diluted concentrations. A mathematical equation was used:

$$c^* = M_w / 4/3 \pi \times N_a \times R_g^3 \quad (\text{Equation 1})$$

Where:

M_w is ponderal molar mass (g/mol);

N_a is Avogadro Number and

R_g is giration radius (nm)

Knowing the radius of gyration and the M_w from HPSEC-MALLS, and working in concentration lower than the c^* , was possible to predict the intrinsic viscosity from the Flory – Fox equation (Flory [36]).

$$[\eta] = \Phi_o \delta^{3/2} R_{gw}^3 / M_w \quad (\text{Equation 2})$$

Where:

Φ_o is viscosity parameter

R_{gw} is radius of giration (nm) and

M_w is the ponderal molar mass (g/mol)

The R_{gw} in according with Gidley et al. [19] is influenced by the excluded volume and the expansion factor was calculated using the equation.

$$[\eta] = \Phi_{(\varepsilon)} \delta^{3/2} R_{gw}^3 / M_w \quad (\text{Equation 3})$$

$$\Phi_{(\varepsilon)} = \Phi_o (1 - 2.63\varepsilon - 2.86\varepsilon^2) \quad (\text{Equation 4})$$

$$\varepsilon = 2\alpha - 1 \quad (\text{Equation 5})$$

Where α is the angular fit between the R_g versus Molar mass (M).

The value of α was also confirmed calculating from the Mark-Houwink-Sakurada exponent (a) (double logarithmic plot of the intrinsic viscosity against M_w). The angular fit (a) gave the exponent of Mark-Houwink-Sakurada and can be used to calculate the α value. Using these different approaches the values of (α) are the same (data not shown).

To obtain the characteristic ratio (C_{∞}) and persistence length (L_p) was used a method using the R_g and M_w in the equation 6 is in accord with Roger et al. [27], where C_{∞} is:

$$C_{\infty} = \lim_{(n \rightarrow \infty)} L/n l^2 \quad (\text{Equation 6})$$

Where:

- L is mean square end to end distance;
- l is length of the rods and
- $n_w = M_w/m_0 =$ degree of polymerization = polymer molecular weight (M) to the residue molecular weight (m)

For a random coil molecule the value of L is proportional to:

$$L = 6R_{gw}^2 \quad (\text{Equation 7})$$

The characteristic ratio can be obtained using the following equation:

$$C_{\infty} = 6R_{gw}^2/n_w l^2 = 6R_{gw}^2 m_0/M_w l^2 \quad (\text{Equation 8})$$

These authors propose a methodology to obtain graphically the value of C_{∞} using the relation:

$$R_g^2/M_w = C_{\infty} l^2 / 6 m_0 (1+c'M_w^{1/2}) \quad (\text{Equation 9})$$

The linear fit of the R_{gw}^2/M_w variation as a function of the $M_w^{1/2}$ gives the linear coefficient $C_{\infty} l^2 / m_0$. Using a monomeric length (l) of 0.52 nm and m_0 of 360 was possible determine the value of C_{∞} . Another form to obtain the value of the C_{∞} is by the use of the Stockmayer-Fixman plot. This approach showed a good correlation with the Roger plot (data not shown).

With the values of characteristic ratio were possible estimate the value of persistence length, by a mathematical relation:

$$C_{\infty} = 2 (L_p/l) - 1 \quad (\text{Equation 10})$$

l = length of rods

L_p = persistence length

2.4. Oligosaccharide contents

The XGs samples were hydrolysed with *Trichoderma viride* "celulase" from Megazyme, Australia for 32 h at 30°C at pH 5.0. The products of the enzymatic hydrolysis were analysed by High Performance Ion Exchange Chromatography (HPAEC) Dionex system DX500, using a Carbopack PA-1 column and an amperometric pulse detector (PAD). The eluent used was NaOH 88 mmol.L⁻¹ with a gradient of NaOAc 0.5 mol.L⁻¹ from 7 to 15%.

2.5. Rheology

For rheological analysis, the XGs (2 g.L⁻¹) were solubilised for 16 h in 0.1 mol.L⁻¹ sodium nitrite containing 200 ppm of azide, at 25°C or after this proceeding the samples were heated for 2 h at 85°C, in a sealed tube to avoid evaporation. The analysis was performed at a Brookfield rheometer, model LV DV-III, cone-plate, spindle cp-40, and the temperature was controlled using a Brookfield TC500 batch at 25°C. The measurements of viscosity also were made at a capillary viscometer.

Plotting the Huggins equation was possible to obtain the intrinsic viscosity $[\eta]$ by the extrapolation of (reduced viscosity) η_{red} to limit of zero concentration ($c \rightarrow 0$) where the linear coefficient is the $[\eta]$.

3.0. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chemical analysis

The samples of XGs obtained from seeds of *H. courbaril* harvested in different locations in Brazil were compared among them and with XG obtained from *T. indica* seeds. This comparative study is relevant because of the difference in the primary structure of the polymer that can possibly generate a differential macromolecular behaviour in solution.

All the XGs after purification by centrifugation at 10,000xg and filtration through 3 and 0.8 μm Millipore filter gave an yield of ~17%. Table 1 shows the protein, carbohydrate, moisture content and optical rotation of the XGs. The results show that the protein and carbohydrate level are only slowly different. The comparative analysis of specific optical rotations indicated that XG obtained from Natal (HC IV) present probably higher presence of α linkages that increase the optical rotation.

The monossacharides contents are shown in Table 2, where it is possible to observe the presence of manose and fucose in the sample HC IV that appear homogeneous by HPSEC-MALLS (data not shown). Along with Tamarind the HC I shows a higher level (ca. 4 times) of arabinose when compared with the other samples. To understand further aspects of the fine structure of the xyloglucans from the samples used, we performed a comparative analysis using enzymatic digestion with celullase/endoglucanase (Megazyme-Austrália) according to Buckeridge et al. [9] and Tiné et al. [8]. The oligosaccharides obtained were

compared with the ones from Tamarind seeds. The relative proportions of the oligosaccharides were also determined, and in Figure 1 a typical elution profile of HPAEC analysis of the oligosaccharides (in this case HC I) is shown.

Apart from the already known differences found between XGs from *H. courbaril* and *Tamarindus indica* (Buckeridge et al. [9]), the different samples from the former polymer presented very similar structures as probed by oligosaccharide analysis. The oligosaccharides identified were the XXG, and the XXXG, XLG, XLLG, here named XXXG series together with the apparently exclusive of XXXXG series, that correspond to the oligosaccharides XXXXG, XXXLG, XLXXG and XXLXG. In table 3 it is possible to observe the relative proportions among the oligosaccharides from *H. courbaril* and *T. indica* with a difference of 7- 13% in the ratios XLG/XLXG. Another difference was the reduced content of XXG pentasaccharide in the HC IV sample (50%), but the much higher proportion of XXG found in *H. courbaril* in relation to *T. indica*. These observations strongly suggest that the distribution of galactose branching along the main β -glucan chain is quite different in the two polymers. Whereas in tamarind it appears to be more concentrated to certain regions, denoted by the concentration of galactoses in 4 or 5 oligosaccharide only, in *H. courbaril*, ca. 10 different oligosaccharides are detected and the proportion of the double-branched (XLLG) oligosaccharides is proportionally lower.

It is likely that these small variations in fine structure could generate changes in the hydrodynamic behaviour of the samples in solution so that those changes might be detectable by physico-chemical methods. Our hypothesis was

that the presence of the *XXXXG series* in the polymer of *H. courbaril* might show those chances so that it would help us to better understand the XGs solution behaviour. Thus, we performed comparative studies of the rheology of XGs solutions from different sources, by determining the intrinsic viscosity and the molar mass by SEC-MALLS/RI.

3.2. Rheological analysis

The determination of the critic concentration (c^*) was important due the possibility to analyse the macromolecular behaviour in a diluted solution. In other words, the influence of polymer-polymer interaction is minute and does not needed to be considered in the system.

The dependence on concentration was determined in two different systems. In the semi-diluted concentration was $c^{1.56}$, and at the diluted concentrations was $c^{1.1}$. By the plotting the $\text{Log } \eta_{sp}$ as a function of the coil overlap parameter $c[\eta]$ (data not show) it was possible also to determine the rheological critic concentration. These values and that obtained from M_w and R_{gw} by the equation 1 are shown in the Table 4.

The critic concentration (c^*) obtained from light scattering and rheological analyses are at all very similar. These limits between the semi-diluted and diluted solutions were used to realize the GPC and intrinsic viscosity determinations. So to determine the intrinsic viscosity, by rheology or HPSEC -MALLS we only use concentrations up to c^* (Table 5 and 6).

The intrinsic viscosity determined by analysis performed at a Brookfield rheometer present the same absolute value that the capillary determination (comparative data not shown).

In the table 5 was possible to observe the results to M_w , M_n , M_w/M_n , R_{gw} , R_{gn} , $[\eta]_w$, $[\eta]_n$ and $[\eta]_{\text{Rheology}}$ for the six samples of XGs.

The Flory-Fox theory was developed for a monodisperse polymer, and this can generate higher values of intrinsic viscosity obtained for the mathematical approach, in relation with the rheological data. The discrepancy between the values for $[\eta]_w$ and $[\eta]_{\text{Rheology}}$ may be due polydispersity and excluded volume that influence the radius of giration and draining effects that affect the parameter Φ (Gidley et al. [19]). Another important observation is the fact that the aggregation can generate a lower influence in the intrinsic viscosity by rheology (Wang et al., 2001). So the reduction in the aggregation must theoretically approximate the values of $[\eta]$ obtained from HPSEC-MALLS and Rheology (Table 6).

The supramolecular aggregation of water-soluble polysaccharides in aqueous solution is a critical barrier to the accurate characterisation of the molecular properties of these polymers by on-line light scattering technique. To minimise the aggregation the heating and pressure treatments in water can be used in fully disperse polymer molecules. The prerequisite for this method is that the polymer does not undergo depolymerisation through covalent bond scission during the heat and pressure treatment (Wang et al. [37]). To evaluate the aggregation of seed XGs from *H. courbaril* the polymers were studied regarding their molar mass, R_{gw} and $[\eta]$ after 16 hour of constant agitation at 25°C and a

period of 2 h at 85°C under constant stirring. The heating was also kept for 4, 6, 8 and 24 hours in the same sample without altering the parameters analysed with relation of 2 h of heating. In Figure 2 the results for the sample of HC I, show that it was possible to observe a change in the elution of peak, after the heating, to higher elution volumes, but without altering the standard of lower molar masses in the system. Its indicate a reduction in the molar mass of the molecule but without generate new polymers with lowers masses. The same behaviour has observed by Wang et al. [37] that studied Detarium's xyloglucan. After calculation of the molar mass we observed that HC I sample showed a reduction of molar mass of ~41% and gyration radio of ~31%, but without change in the relation M_w/M_n .

If the aggregation of stretched chains is considered, it is likely that a stick has been constituted and the radius of gyration does not increase with increasing molar mass. In other words, an increase in the M_w occurs, but not in the same proportion the R_{gw} , indicating a stronger aggregation in the central zone than on the ends and lateral chains (Alonso-Mougán et al. [28]).

Here we also observed a large reduction in the R_{gw} , which indicates the existence of lateral aggregation. A similar behaviour was observed for the other XGs from *H. courbaril*. The intrinsic viscosity shows a reduction of ~35 % for HC III and HC IV, and a maximum of 56% was obtained for HCII and HC V. This data indicated that under heating, a process of dissociation apparently occurs in the xyloglucan solution, generating a structure with a lower molar mass, R_{gw} and $[\eta]$. This confirms the observations of lateral aggregation by Lang & Burchard [20],

Lang & Kajiwara [21] for xyloglucan from tamarind seeds and of Wang et al. [23 and 37] for *Detarium* seeds.

Using the Roger plot and the values of M_w and R_{gw} of all the XGs solubilised at 25°C for 16 h was obtained by the linear intercept of the figure 2A the value of $5.15 \times 10^{-3} \pm 0.63 \times 10^{-3}$ that generate a value to C_∞ and persistence length of 41 and 11, respectively. But, after heating at 85°C for 2 h the samples showed a value of C_∞ of 31 and persistence length of 8.4 nm.

The characteristic ratio and the persistence length of each XG sample were obtained using a fraction of M_w and R_g obtained from the Zimm linear interpolation ($Kc/R\theta$ by the $\sin^2\theta/2$) at different elution volumes of 19.8, 20.4, 21, 21.6, 22.2, 22.8, 23.4, 24, 24.6 and 25.2 mL (Beer, Wood & Weisz [38] and Wang et al. [37]). The aggregation in the samples was determined measuring the values of C_∞ and persistence length before and after heating of the solution at 85°C for 2 hours. If aggregation is present, theoretically these values will be lower than that of the unheated solution. The results obtained are shown in Tables 7 and 8, where it is possible to observe a reduction in the characteristic ratio and persistence length of 34% for the samples of XGs from *H. courbaril* and of 30% tamarind XG. The decrease in C_∞ after heating treatment indicates dissociation of the molecular aggregates and is expected to improve the description of the molecular characteristics (Wang et al. [37]). The differences between the values of characteristic ratio and persistence length for XG obtained from *H. courbaril* and from tamarind can be generated due the primary structure of these molecules that generate a more rigid molecule in *H. courbaril* XG. This is supported by the

presence of the XXXXG series of oligosaccharides. So, the increase of one unit of glucose substituted by xylose increase the persistence length in 1.5 – 1.6 times, showing that the difference in the primary (fine) structure can alter the hydrodynamic behaviour. The differences among the xyloglucans from *H. courbaril*, mainly the sample IV, must be due the reduced level of XXG (50%), that theoretically reduce the number of points in which the structure are mobile (glucose non substituted), generating an even more rigid molecule. The L_p value for tamarind after heating was practically the same of that obtained by Picout et al. [24], showing a good correlation between the Roger and Stockmayer-Fixman plot. The value obtained of C_∞ was higher than other fibre has natural galactomannan of 11.8, and 13.8 for the modified molecule (Cheng et al. [26]), and 13-14 to the barley (1→3), (1→4)- β -D-glucan (Gómez et al. [39]).

4.0 CONCLUSION

We found that XGs of *H. courbaril* seed, from different sources, did no present great differences in the oligosaccharides composition, but that of tamarind were important. The possible consequences of such variations for industrial applications can be discussed in the future.

The XG from *H. courbaril* showed aggregation behaviour in solution, but after heating at 85°C for 2 h, the samples have a reduction in the molar mass and R_{gw} indicating lateral aggregation. After heating, the predicted intrinsic viscosity is compatible with the experimental rheological analysis. To confirm the presence of

aggregates, after calculation of C_{∞} and persistence length (L_p) values revealed that heating reduces both parameters, confirming the dissociation of the XG molecules in the samples.

These properties appear to be directly related to the distribution xylose residues in the main chain of the polymer, which results in a more spread distribution of galactose branches.

Acknowledgments

The authors thank the: EMBRAPA (PR and MT) for supply the seeds from Natal and Cuiabá, Prof. R. Moreira Department of Biochemistry, UFC, for the seeds from Fortaleza, COPEL for the seeds from Foz do Chopim reserve.

The Brazilian funding agencies: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos, through PRONEX-CARBOIDRATOS and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grand number 98/05124-8) for financial support.

REFERENCES

- [1] Reid, J.S.G. *Advance in Botanic. Research* 1985; 11: 125-155.
- [2] Hayashi, T. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 1989; 40: 139-168.
- [3] Kooiman, P. *Acta. Bot. Neerl.* 1960; 9: 208-219.
- [4] Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C. *Revta.brasil.Bot.* 1990; 13: 109-112.
- [5] Lima, N. N., Reicher, F., Corrêa, J. B. C., Ganter, J. L. M. S. & Sierakowski, M.-R. *Ciência e Cultura (Brasil)* 1993; 45 (1): 22-26.

- [6] Lima, N. N., Rechia, C. G. V., Ganter, J. L. M. S., Reicher, F. & Sierakowski, M.-R. *International Journal of Biological Macromolecules* 1995; 17 (6): 413-415.
- [7] Buckeridge, M.S., Rocha, D.C., Reid, J.S.G. & Dietrich, S.M.C. *Physiologia Plantarum* 1992; 86:145-151.
- [8] Tiné, M.A.S., Lima, D.U. & Buckeridge, M.S. *Carbohydrate Polymers* 2003; 52: 135-141.
- [9] Buckeridge, M.S., Crombie, H.J., Mendes, C.J.M., Reid, J.S.G., Gidley, M.J. & Vieira, C.C.J. *Carbohydrate Research* 1997; 303: 233-237.
- [10] Vargas-Rechia, C. G., Reicher, F., Sierakowski, M. R., Heyraud, A., Driguez, H. & Liénart, Y. *Plant Physiology* 1998; 116: 1013-1021.
- [11] Martin, S., Souza-Lima, M. M., Gorin, P. A.J., Reicher, F. & Sierakowski, M. R. *Proceedings - 3rd. International Symposium on Natural Composites and Composites*, São Pedro – SP., Brazil, 2000; 166-170.
- [12] Freitas, R. A., Gorin, P.A.J., Neves, J. & Sierakowski, M. –R. *Carbohydrate Polymer* 2003; 51: 25-32.
- [13] Martin, S., Freitas, R.A., Obayashi, E. & Sierakowski, M. –R. *Carbohydrate Polymer* 2003 (Accept to publication).
- [14] Lima, N.N., Quoirin, M., Naddaf, Y.G., Wilhelm, H.M., Ribas, L.L.F. & Sierakowski, M. –R. *Plant Cell Rep.* 2003; 21: 402-407.
- [15] Freitas, R.A., Martin, S., R. C. Paula, J. P. A. Feitosa, and M. –R. Sierakowski. *Thermochimica Acta* 2003 (accept to publication).
- [16] Tiné, M.A.S., Cortelazzo, A.L. & Buckeridge, M.S. *Plant Science* 2000; 154:117-126
- [17] De Lima, D.U. & Buckeridge, M.S. *Carbohydrate Polymers* 2003; 46 (2): 157-163.
- [18] Taylor, I.E.P. & Atkins, E.D.T. *FEBS letters* 1985; 181 (2): 300-302.
- [19] Gidley, M.J., Lillford, P.J., Rowlands, D.W., Lang, P. Dentini, M., Crescenzi, V., Edwards, M., Fanutti, C. & Reid, J.S.G. *Carbohydrate Research* 1991; 214: 299-314.
- [20] Lang, P. & Burchard, W. *Makromol Chem.* 1993; 194: 3157-3166.
- [21] Lang, P. & Kajiwara, K. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 1993; 4 (5): 517-528.

- [22] Wang, Q. Ellis, P.R., Ross-Murphy, S.B. & Grant Reid, J.S. *Carbohydrate Research* 1996; 284: 229-239.
- [23] Wang, Q., Ellis, P.R., Ross-Murphy, S.B. & Burchard, W. *Carbohydrate Polymer* 1997; 33: 115-124.
- [24] Picout, D.R., Ross-Murphy, S.B.; Errington, N. & Harding, S.E. *Biomacromolecules* 2003; 4: 799-807.
- [25] Robinson, G. Ross-Murphy, S & Morris, E. R. *Carbohydrate Research* 1982; 107:17-32.
- [26] Cheng, Yu, Brown, K.M. & Prud'homme, R.K. *Biomacromolecules* 2002; 3: 456-461.
- [27] Roger, P., Axelos, M.A.V. & Colona, P. *Macromolecules* 2000; 33: 2446-2455.
- [28] Alonso-Mougán, M., Fraga, F., Meijide, F., Rodríguez-Núñez, E. & Vázquez-Tato, J. *Carbohydrate Polymer* 2003; 51 (1): 37-45.
- [29] Wittgren, B & Porsch, B. *Carbohydrate Polymers* 2002; 49: 457-469.
- [30] Buckeridge, M. S., Panegassi, V. R., Rocha, D. C. & Dietrich, S. M. C. *Phytochemistry* 1995; 38 (4): 871-875.
- [31] Buckeridge, M. S., Rocha, D.C., Reid, J.S.G. & Dietrich, S.M.C. *Phys. Plant.* 1992; 86: 145-151.
- [32] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. *Analytical Chemistry* 1956; 28: 350-356.
- [33] Hartree, E. F. *Analytical Biochemistry* 1972; 48: 422-427.
- [34] Selvendran, R. R., March, J. F. & Ring, S. G. *Analytical Biochemistry* 1979; 96: 282-292.
- [35] Wolfrom, M. L. & Thompson, A. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 1963; 2: 211-215.
- [36] Flory, P.J. *Principles of polymer chemistry*. Cornell University Press: Ithaca, NY, 1953.
- [37] Wang, Q., Wood, P.J., Cui, W. & Ross-Murphy, S.B. *Carbohydrate Polymers* 2001; 45: 355-362.
- [38] Beer, M.U., Wood, P.J. & Weisz, J. *Carbohydrate Polymer* 1999; 39: 377-380.

[39] Gómez, C., Navarro, A., Manzanares, P. Horta, A. & Carbonell, J.V. Carbohydrate Polymers 1997; 32: 17-22.

Table 1 – Chemical composition and specific rotation of the galactoxyloglucans obtained from seeds of *T indica* and *H. courbaril* from different locations in Brazil.

Samples	% (m/v)			$[\alpha]_d^{20}$
	Total sugar ^a	Protein ^b	Moisture ^c	
HC I	85	2.9	10.8	80.1
HC II	86	2.9	7.3	77.8
HC III	85	2.2	9.2	75.5
HC IV	88	2.4	7.0	97.8
HC V	90	2.6	8.9	78.4
TM	84	3.0	10.5	80.0

^a – Method of DUBOIS *et al.*, 1956

^b – Method of HARTREE, 1972

^c – Thermogravimetric method

Table 2 – Monosaccharide composition* of galactoxyloglucans

Sample	Monosaccharides (mol %)					
	Glc	Xyl	Gal	Man	Ara	Fuc
HC I	43.0	36.3	16.0	-	4.8	-
HC II	39.0	42.0	16.8		2.3	
HC III	44.1	38.6	16.1		1.2	
HC IV	49.0	32.0	14.0	2.1	1.3	1.3
HC V	45.0	37.3	16.2		1.5	
TM	38.0	35.5	22.0		4.7	

* by GC , column DB-225 at 220°C.

Table 3 – Relative proportion of oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis with cellulose followed by analysis by High Performance Anion Exchange Chromatography in the samples of galactoxyloglucan from seeds of *Hymenaea courbaril* and *Tamarindus indica*.

Oligosaccharides	Samples					
	HC I	HC II	HC III	HC IV	HC V	TM*
XXG	1.4	1.2	1.5	0.6	1.1	Traces
XXXG	2.1	2.6	1.9	2.3	2.4	24.4
XLXG	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces	8.0
XXLG	38.5	41.5	42.7	44.3	41.9	36.0
XLLG+XXXXG	30.5	30.3	25.8	27.6	29.6	-
XLLG	-	-	-	-	-	31.6
XXXLG	16.7	14.5	14.5	15.5	14.5	-
XLXXG	7.7	7.5	7.4	7.3	8.4	-
XXLXG	3.2	2.3	3.2	2.3	2.2	-

* The data from Tine (2003).

Table 4 – Critic concentration (c^* g.L⁻¹) values for the galactoxyloglucans

Sample	Using M_w and R_w	Rheology
HC I	0.9	0.7
HC II	0.6	0.7
HC III	0.9	1.3
HC IV	1.1	1.3
HC V	0.8	0.8
TM	0.9	1.0

Table 5 – Molar mass, radius of giration and the $[\eta]$ values of galactoxyloglucans.

Sample	M_w	M_n	M_w/M_n	R_w	R_n	$[\eta]_w$	$[\eta]_n$	$[\eta]_{\text{rheology}}$
HC I	1.5×10^6	8.7×10^5	1.7	87	69.2	1780	1515	740
HC II	2.2×10^6	1.5×10^6	1.4	110.4	93.7	2626	2322	1054
HC III	1.05×10^6	6.2×10^5	1.7	76.4	60.2	1329	1105	680
HC IV	1.4×10^6	9.0×10^5	1.6	88.8	69.5	1719	1320	710
HC V	8.5×10^5	5.3×10^6	1.6	67.2	53.6	1346	1090	886
TM	1.1×10^6	7.2×10^5	1.5	68.6	55.4	1233	990	522

Table 6 – Molar mass, radius of giration and the $[\eta]$ values of galactoxyloglucans after heating at 85°C for 2 h.

Sample	M_w	M_n	M_w/M_n	R_w	R_n	$[\eta]_w$	$[\eta]_n$	$[\eta]_{\text{rheology}}$
HC I	8.7×10^5	5.4×10^5	1.6	60.2	46.7	1001	747	750
HC II	1.5×10^6	1.0×10^6	1.4	85.4	70.8	1143	947	994
HC III	8.0×10^5	4.7×10^5	1.7	60.9	44.1	877	573	605
HC IV	9.4×10^5	5.6×10^5	1.6	65.6	45.9	726	418	487
HC V	6.0×10^5	3.9×10^5	1.5	52.0	42.0	870	709	860
TM	9.3×10^5	6.2×10^5	1.5	57.4	44.7	825	580	418

Table 7 – Characterisitic ratio (C_x) and persistence length (L_p) value of the galactoxyloglucans using the Roger's plot.

Sample	Characteristic ratio (C_x)	Persistence length (L_p) nm
HC I	33.5 ± 0.9	8.9 ± 0.3
HC II	41.2 ± 0.8	10.9 ± 0.2
HC III	37.5 ± 1.0	10.1 ± 0.2
HC IV	54.4 ± 4.4	14.5 ± 1.0
HC V	31.1 ± 3.2	8.4 ± 0.8
TM	21.8 ± 1.1	6.2 ± 0.2

Table 8 – Characterisitic ratio (C_x) and persistence length (L_p) value of the galactoxyloglucan using the Roger's plot for the solutions heated at 85°C for 2 hours.

Sample	Characteristic ratio (C_x)	Persistence length (L_p) nm
HC I	23.2 ± 1.4	6.5 ± 0.3
HC II	27.2 ± 1.3	7.5 ± 0.2
HC III	25.5 ± 3.8	7.1 ± 0.2
HC IV	43.2 ± 1.3	11.7 ± 1.0
HC V	24.8 ± 3.0	6.9 ± 0.8
TM	15.2 ± 1.0	4.4 ± 0.8

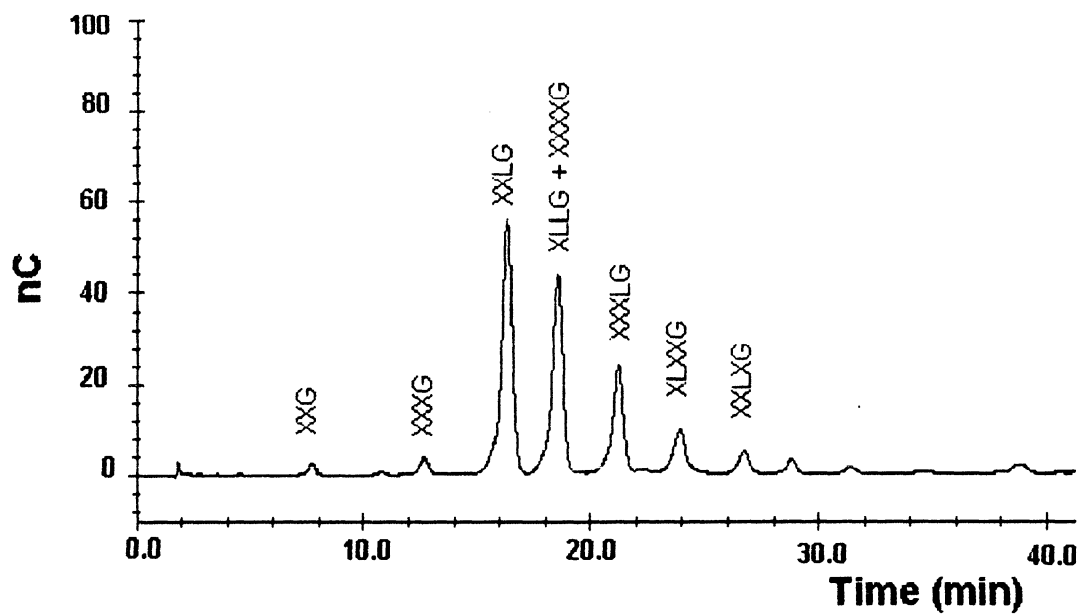


Figure 1– Elution profile of the limit digest oligosaccharides obtained by celulase digestion of the galactoxyloglucan obtained from Foz Chopim (HC I) reservation.

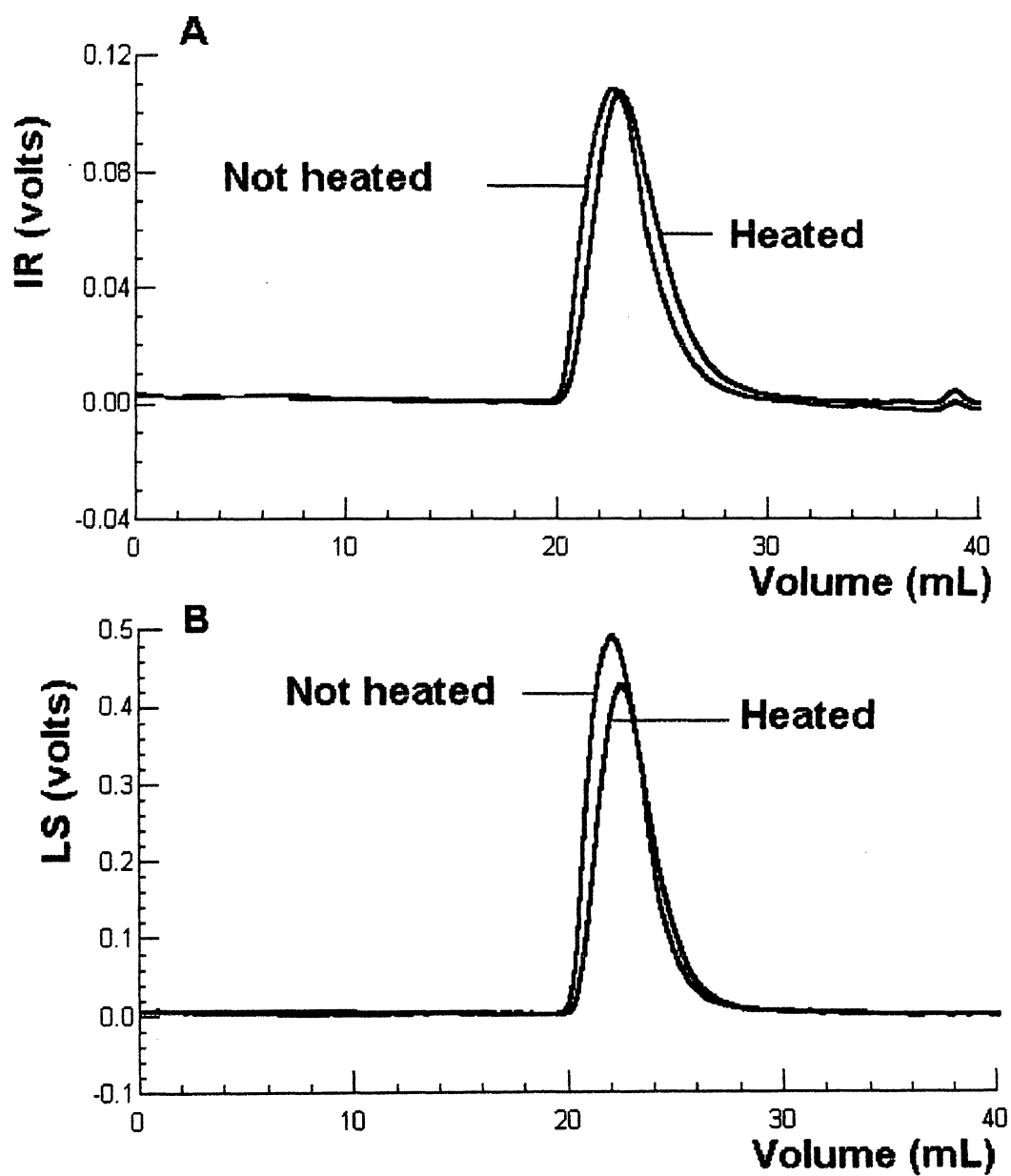


Figure 2 - SEC elution profile of HC I using detector IR (A) and LS (B) (MALLS) at 90°.

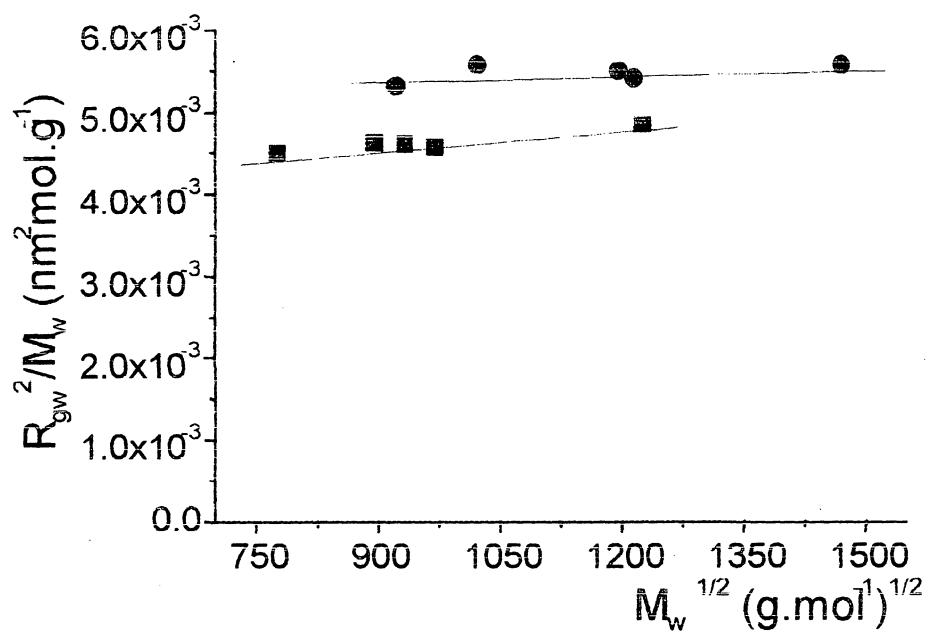


Figure 3 – Plot of R_g^2/M_w as a function of the $M_w^{1/2}$ for the galactoxyloglucans from *H. courbaril* seeds solubilised at 25°C for 16 h (●) and after solubilisation at 25°C for 16 h were heated at 85°C for 2 h (■).