

**Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*:
estrutura e propriedades**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

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

CURITIBA

2003

SANDRA MARTIN

**Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*:
estrutura e propriedades**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Bioquímica.

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

CURITIBA

2003

SANDRA MARTIN

**GALACTOXILOGLUCANA DE SEMENTES DE *Hymenaea courbaril*:
ESTRUTURA E PROPRIEDADES**

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



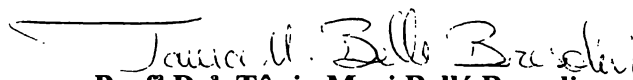
Profª Drª Maria Rita Sierakowski (Orientadora)
Departamento de Química
UFPR



Prof. Dr. Philip Albert James Gorin
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR



Profª Drª Leila Maria Beltrami
Instituto de Física de São Carlos
USP



Profª Drª Tânia Mari Bellé Bresolin
UNIVALI



Profª Drª Helena Maria Wilhelm
LACTEC

Curitiba, 23 de Setembro de 2003

Se pudesse recomeçar a vida, eu procuraria fazer meus sonhos ainda mais grandiosos, porque a vida é infinitamente mais bela e maior do que eu pensava, mesmo em sonho.

G. Bernanos

Aos meus pais, Evilásio e Edite, pelo maravilhoso dom da Vida, e às minhas irmãs Patricia, Eloisa e Liciê por me ensinarem que o melhor da Vida é saber compartilhar todos os momentos.

À profa. Maria Rita pelo exemplo de força, dedicação e amor à pesquisa científica, sem esquecer do lado humano e, dessa forma, contribuir para meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Àquele que não saiu do meu lado em nenhum momento dessa caminhada e, muitas vezes, deixou apenas um par de pegadas na areia.

Aos meus pais Evilásio e Edite, minhas irmãs Patricia, Eloisa e Liciê pelo apoio, força, encorajamento, por me escutarem nos momentos de fraqueza e desânimo e compartilharem todos os momentos de alegria como se também fossem seus.

Aos meus avós pelo exemplo de luta, pelo incentivo aos estudos e por me darem pais tão maravilhosos.

À Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski pela orientação, incentivo, apoio, paciência nos meus momentos de desânimo e por ser a principal responsável pelo meu crescimento profissional.

À Profa. Dra. Carem Gledes de Vargas Rechia, da USP – Ribeirão Preto pela coleta e doação das sementes utilizadas nesse trabalho.

À Coordenação e Colegiado do Curso de Pós-graduação em Bioquímica.

À Profa. Dra. Fany Reicher pelo acesso ao reômetro HAAKE que foi de fundamental importância para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Philip Gorin pela correção dos relatórios, sugestões, orientação no estágio de docência, paciência nas inúmeras revisões dos trabalhos em inglês, além de ser um exemplo de dedicação e amor à pesquisa.

Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará por parte das análises de RMN (Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira) e por possibilitar a realização das análises termogravimétricas (Profa. Dra. Judith Feitosa)

Ao Prof. Dr. Marcelo Aguiar do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela realização das análises de fluorescência.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela utilização do espectrofotômetro e infra-vermelho.

Ao Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge do Instituto de Botânica da USP-SP por possibilitar a hidrólise enzimática e as análises em HPLC dos oligossacarídeos da galactoxiloglucana.

Ao Prof. Dr. Philip A. J. Gorin e à Profa. Dra. Selma Faria Zawadzki Baggio pela paciência na correção desse trabalho e pelas valiosas correções e sugestões.

À Dra. Helena M. Wilhelm do LACTEC, pela amizade de tantos anos, pelas inúmeras discussões científicas, não científicas e auxílio durante a execução dessa tese e na elaboração do artigo.

Ao amigo Rilton A. Freitas pela amizade, discussões científicas e nada científicas, pelas muitas risadas e pela execução e auxílio na interpretação das análises termogravimétricas realizadas na UFC, pela obtenção e separação dos oligossacarídeos da galactoxiloglucana no laboratório do Prof. Dr. M.S. Buckeridge, sem os quais esse trabalho não ficaria completo.

À amiga Lucy Ono, a quem não tenho palavras de gratidão suficiente para agradecer pela amizade e confiança, que me são muito caras, pela boa companhia nas minhas poucas “noitadas”, pela ajuda tanto aqui em Curitiba, como, por estar com um pé no Ceará e outro aqui me ajudando no trabalho.

À estagiária Eliane Obayashi e à aluna de iniciação científica Francine Valenga que foram muito importantes no desenvolver do trabalho, pela paciência quando nem tudo dava certo e pela amizade.

A todos os demais alunos e ex-alunos de pós-graduação e graduação do Laboratório de Biopolímeros por compartilharem comigo bons e maus momentos, pela amizade e ajuda sempre que foi preciso: Nery, Neoli, Adriana, Wagner, Odivânia, Moisés, Gustavo, Milena, Cristiane e também ao Joselito do curso de Farmácia e Bioquímica da Uniandrade.

À amiga Ana Cristina, doutoranda do DQOI/UFC, pelo auxílio, amizade, confiança, cumplicidade, pela companhia constante nas festas, nos congressos e no laboratório que me deixam muitas saudades.

Aos laboratórios de Química de Carboidratos de Gomas e Líquens, sob responsabilidade do prof. Dr. Marcello Iacomini e prof. Dr. Philip Gorin (especialmente à Carol, Fernanda, Lucimara e Juliana), Química de Carboidratos de Algas Marinhas, sob a responsabilidade do prof. Dr. Miguel Nosedá e profa. Dra. Maria Eugênia Duarte (especialmente à Rosiane, Paulinha, Adriano e Márcia, do Ceará) e Química de Carboidratos Vegetais, sob responsabilidade da profa. Dra. Fany Reicher (especialmente à Ana Paula, Andréia, Renato e Daniele, do Ceará) pela ajuda sempre que foi necessário e pelas conversas na hora do café.

À dp UNION, nas pessoas de Abel Ribeiro e Frederico Mendes Júnior pelo empréstimo do reômetro TA Instruments AR 2000, exatamente na hora certa.

Ao César Tischer pela ajuda na interpretação dos RMNs bidimensionais e análises de RMN de ^{11}B , e também pelo encorajamento quando as coisas não estavam indo muito bem.

Ao Lauro, pelas análises de CG-EM, em meio às suas disciplinas do mestrado.

À toda equipe da biblioteca do Setor de Ciências Biológicas especialmente à Ana, Clarice, Izabella, Ruth e Telma pelo auxílio constante e simpatia.

Ao Prof. Nei Ferreira Camargo Neto, da Uniandrade, pela confiança, estímulo e simpatia.

Às Profas. Maria Luíza (Malu) e Renata Correia e ao Prof. Gabriel, da Uniandrade, por me acompanharem e me darem força e estímulo na parte mais difícil dessa caminhada que foi a escrita da tese, terminando experimentos, preparando e ministrando aulas.

À Marilza do Departamento de Bioquímica, Diel e Juní do Departamento de Química, pela atenção e auxílio.

Aos amigos Rodrigo Lazzari e Marcelo Liteka por me “aguentarem”, me darem força e me acompanharem durante todo o doutorado, sempre me fazendo esquecer um pouco as preocupações e dar boas risadas.

Aos professores Dr. Philip Albert James Gorin, Dra. Tânia Mari Bellé Bresolin, Dra. Leila Maria Beltramini, Dra. Helena Maria Wilhelm, membros da comissão examinadora pela excelente discussão dos resultados, sugestões e críticas que contribuíram para o enriquecimento desse trabalho, bem como para trabalhos futuros.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigada.

Ao CNPq e Pronex-Carboidratos pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Polissacarídeos.....	1
1.1.1.Xiloglucanas: fontes e caracterização estrutural.....	1
1.1.2.Xiloglucanas: utilizações e propriedades.....	6
1.1.3.Estudos da xiloglucana de <i>H. courbaril</i> pelo Grupo de Carboidratos da UFPR.....	10
1.2.Interação de polissacarídeos com íons borato.....	12
1.3.Reologia.....	21
2.OBJETIVOS.....	29
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1.Fonte de polissacarídeo.....	30
3.2.Extração e purificação.....	30
3.3.Análises químicas, físico-químicas e espectroscópicas do polissacarídeo.....	31
3.3.1.Determinação da quantidade de açúcar total, ácido urônico e proteínas.....	31
3.3.2.Determinação da composição monossacarídica.....	31
3.3.3 Análise de Metilação.....	32
3.3.4. Análises de Ressonância Nuclear Magnética (RMN) de ¹³ C e ¹ H, mono- e bidimensionais e de ¹¹ B.....	33
3.3.5.Análises de HPSEC-MALLS.....	33
3.3.6.Determinação da rotação óptica específica.....	35
3.3.7.Obtenção de oligossacarídeos da HXGRP por hidrólise enzimática e separação por HPAEC-PAD.....	35
3.3.8.Análise de fluorescência.....	35
3.4.Oxidação específica em O-6.....	36
3.5.Preparo das amostras para reologia.....	36
3.5.1.Preparo das amostras para análise de viscosidade intrínseca.....	36

3.5.2.Preparo das amostras em solução aquosa e dos complexos HXGRP-B.....	36
3.6.Análises reológicas.....	37
3.7.Análises termogravimétricas.....	38
3.7.1.Análise cinética da degradação térmica.....	38
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1.Extração, purificação e análise da composição química e monossacarídica da HXGRP.....	39
4.2.Determinação da proporção entre os oligossacarídeos obtidos a partir da digestão da HXGRP com celulase.....	41
4.3.Análise estrutural da HXGRP por metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	43
4.3.1. Análise de metilação.....	43
4.3.2.Análise de ressonância magnética nuclear mono e bidimensional.....	45
4.4.Análises da HXGRP modificada por oxidação específica em O-6.....	54
4.5.Avaliação das propriedades de soluções de HXGRP antes e após aquecimento, por reologia, fluorimetria e HPSEC-MALLS.....	59
4.6.Análises reológicas.....	65
4.6.1.Determinação da viscosidade intrínseca e da constante de Huggins.....	65
4.6.2.Comportamento reológico de soluções de HXGRP em água e dos complexos HXGRP-B.....	67
4.7.Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{11}B para metil β -D-galactopiranosídeo e complexo HXGRP-B.....	84
4.8. Análise termogravimétrica (TGA) da HXGRP e dos complexos HXGRP-B.....	89
5.CONCLUSÕES.....	92
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
7.ANEXO.....	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de um dos grupos oligossacarídicos de xiloglucana (adaptado de YORK <i>et al.</i> , 1993).....	3
Figura 2 – Complexos de borato tridentados formados com <i>cis</i> -inositol (A) e 2,4-di-O-metil-D-manose (B) (GORIN e MAZUREK, 1973).....	14
Figura 3 - Complexos entre borato e metil α -D-galactopiranosídeo formados por anéis de 5 (A) e 6 (B) membros (KENNEDY e HOW, 1973).....	15
Figura 4 - Cadeia em movimento reptante através de obstáculos fixos (DOI e EDWARDS, 1986).....	25
Figura 5 – Movimento de uma cadeia polimérica através de um tubo imaginário, representado pelas linhas pontilhadas (DOI e EDWARDS, 1986).....	26
Figura 6 - Representação esquemática de um passo elementar da difusão da cadeia de um polímero. (A) Situação inicial: A cadeia P tem um ponto de ligação i com a cadeia P ₁ . (B) Situação final: o ponto de ligação i se desfaz e é criado um novo ponto de ligação f com a cadeia P ₂ . Durante essa troca, o centro de massa da secção cd da cadeia P é deslocado ao acaso (LEIBLER <i>et al.</i> , 1991).....	27
Figura 7 - Perfil de HPSEC-MALLS para a galactoxiloglucana de sementes de <i>H. courbaril</i> purificada, (A) detector de espalhamento de luz e (B) detector de índice de refração.....	39
Figura 8 - Perfil de eluição por HPAEC-PAD, da galactoxiloglucana de <i>H. courbaril</i> , tratada com <i>endocelulase</i>	42
Figura 9 - Fragmentos de massa da mistura de acetato de 3,4 e 2,3-Me ₂ -xilitol.....	44
Figura 10 - Padrão de fragmentação dos derivados metilados 3,4- (A) e 2,3- Me ₂ -pentitol (B) (Adaptado de CARPITA e SHEA, 1989).....	45
Figura 11 - Espectro de RMN de ¹³ C, em D ₂ O, 70°C, da HXGRP, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	46
Figura 12 - Espectro de DEPT-135 da HXGRP em D ₂ O, 70° C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	47
Figura 13 - Espectro de HMQC da região anomérica da HXGRP em D ₂ O, 70° C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	49
Figura 14 - Espectro de HMQC da HXGRP, em D ₂ O, 70°C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	50

Figura 15 - Espectro de COSY da HXGRP, em D ₂ O, à 70°C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	52
Figura 16 - Região de C-5 de α-D-Xylp e C-6 de β-D-Galp da HXGRP nativa (A) e tratada com a enzima β-galactosidase (B). Os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	53
Figura 17 - Espectro de RMN ¹³ C, em D ₂ O, 60°C, da xiloglucana de sementes de <i>Hymenaea courbaril</i> oxidada com o reagente TEMPO, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	55
Figura 18-Região de C-6 de ácido urônico do espectro de RMN ¹³ C da amostra de HXGRP oxidada, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	56
Figura 19 - Região de C-1 do espectro de RMN de ¹³ C da HXGRP nativa (A) e oxidada (B), os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	57
Figura 20 - Região de C-5 de α-D-xylp e C-6 de β-D-galp da HXGRP oxidada. Os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	58
Figura 21 - Perfil de HPSEC-MALLS para a galactoxiloglucana de sementes de <i>H. courbaril</i> oxidada com o reagente TEMPO, (A) detector de espalhamento de luz e (B) detector de índice de refração.....	58
Figura 22 - Curvas de viscosidade de soluções aquosas de HXGRP (10 mg/ml) (▲) sem aquecer e (■) aquecida a 85°C, por 2h e resfriada. Leituras em reômetro BROOKFIELD LV-DVIII, cone CP-51, à 25°C.....	60
Figura 23 - Espectro de fluorescência do pireno em água.....	61
Figura 24 - Perfil de eluição do HPSEC-MALLS, de soluções de HXGRP e HXGRP-AQ 1 mg/ml em solução aquosa de NaNO ₂ 0,1 mol/l contendo 0,2 g/l de NaN ₃ , utilizando o detector de difusão de luz.....	62
Figura 25 - Gráficos utilizados para a determinação da viscosidade intrínseca da HXGRP solubilizada em água (A) e em KCl 0,1 mol/l (B). Leituras realizadas em reômetro BROOKFIELD LV-DV III, cone CP-40, à 25°C.....	66
Figura 26 - Curvas de viscosidade da HXGRP a concentrações de (▲) 10, (◆) 7,5, (●) 5 e (■) 2,5 mg/ ml, em água. Leituras realizadas em reômetro BROOKFIELD LV-DV III, cone CP-52, CP-51 e CP-40, à 25°C.....	68
Figura 27 – Curvas de viscosidade da HXGRP (15 mg/ml) solubilizada em água (■) e em solução aquosa a 3 mg/ml de tetraborato de sódio (●). Leituras realizadas em reômetro BROOKFIELD LV-DV III, cone CP-52, à 25°C.....	68

Figura 28 - Gráficos utilizados para a determinação do comportamento viscoelástico linear da HXGRP (20 mg/ml) na frequência de 10Hz. (A) em água destilada, (B) em solução a 3 mg/ml de tetraborato de sódio. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.....	70
Figura 29 – Curvas de frequência da HXGRP 40 (▲) e 20 mg/ml (●) solubilizadas em água. G' símbolos abertos, G'' símbolos fechados. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.....	71
Figura 30 - Curvas de frequência da HXGRP 20mg/ml solubilizada em água destilada (■) e em solução a 3 mg/ml de tetraborato de sódio (●). G' símbolos abertos, G'' símbolos fechados. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.....	71
Figura 31 - Curvas de tempo da HXGRP (30 mg/ml) solubilizada em água destilada (A) e em solução a 3 mg/ml de tetraborato de sódio (B), (■) G', (●) G'', (▲) viscosidade dinâmica. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.....	73
Figura 32 – Variação de G' <i>versus</i> a concentração de tetraborato de sódio para HXGRP (20 mg/ml) em diferentes frequências. (▲) 10, (●) 1 e (■) 0,316 Hz. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.....	74
Figura 33 - Variação dos valores de tan (δ) <i>versus</i> a frequência para a HXGRP 20 mg/ml em água, pH 5.0 (*) e para o complexo HXGRP (20 mg/ml)-borato (3mg/ml + 0.33 mg/ml NaBH ₄), pH 9,3 (◆), 9,8 (▲), 10,3 (■), 10,6 (●). Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.....	74
Figura 34 – Variação do G' <i>versus</i> pH para a HXGRP (20 mg/ml) solubilizada em água (pH 5,0) e para o complexo HXGRP (20 mg/ml)-B (3 mg/ml + 0,33 mg/ml de NaBH ₄) em diferentes frequências. (▲) 10, (●) 1, (■) 0,316 Hz. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.....	75
Figura 35 – Aspecto macroscópico do complexo HXGRP (20 mg/ml)-B (7 mg/ml +, boroidreto de sódio 0,33 mg/ml), pH 9,8.....	76
Figura 36 - Variação de G' <i>versus</i> a concentração de tetraborato de sódio para HXGFC (20 mg/ml) em diferentes frequências. (▲) 10, (●) 1 e (■) 0,1 Hz. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.....	78
Figura 37 – Curvas de frequência da HXGRP (A) e HXGFC (B), ambas à 20 mg/ml em água (●) e em solução a 7 mg/ml de tetraborato de sódio, pH = 9,8 (■). G' símbolos abertos, G'' símbolos fechados. As leituras foram realizadas em reômetro TA Instruments AR 2000 com placa paralela de 20 mm ranhurada, à 25°C, exceto para HXGRP em água que foi lida em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à mesma temperatura	79

Figura 38 - Gráfico de Cox-Merz de HXGRP (A) e HXGFC (B), ambas a 20 mg/ml em solução a 7 mg/ml de tetraborato de sódio, pH = 9,8. (●) viscosidade absoluta (η), (■) viscosidade dinâmica (η'). Leituras realizadas em reômetro TA Instruments AR 2000 com placa paralela de 20 mm ranhurada, à 25°C.....80

Figura 39 – Curvas de temperatura da HXGRP 40 mg/ml em água (A) a 1 Hz e 5% de deformação e do complexo HXGRP (30 mg/ml)-B (3 mg/ml) (B) a 1 Hz e 3% de deformação. G' símbolos abertos e G'' símbolos fechados. As setas indicam o início do processo de aquecimento. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2° 81

Figura 40 – Curva de temperatura da HXGFC 30 mg/ml em água a 1 Hz e 5% de deformação (A) e do complexo HXGFC (30 mg/ml)-B (3 mg/ml) a 1 Hz e 3% de deformação (B). G' (■) e G'' (●), processo de aquecimento (símbolos fechados), processo de resfriamento (símbolos abertos). Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cones PP 35 Ti (A) e C60/2° (B).....83

Figura 41 - Espectro de RMN de ^{11}B do ácido bórico em D_2O , pH 10, 30°C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....86

Figura 42 - Espectro de RMN de ^{11}B para o metil β -D-galactopiranosídeo em D_2O , pH 9,3, 30°C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....87

Figura 43 - Espectro de RMN de ^{11}B do complexo HXGRP-borato em D_2O , pH 9,8, 30°C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....88

Figura 44 – Curva termogravimétrica da HXGRP (linha pontilhada) e do complexo HXGRP-B (linha contínua).....90

Figura 45 - Energia de ativação em função da porcentagem de degradação para a HXGRP (■) e complexo HXGRP-B (▲).....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Códigos utilizados para a nomenclatura dos oligossacarídeos de xiloglucana, segundo FRY <i>et al.</i> 1993.....	2
Tabela 2 - Análise de rendimento e relação molar de carboidratos* para a HXGRP após etapas de purificação por membrana.....	40
Tabela 3 - Quantificação de açúcar total, proteínas e umidade para a HXGRP.....	41
Tabela 4 - Proporção relativa entre os diferentes tipos de oligossacarídeos obtidos* a partir da galactoxiloglucana de sementes de <i>H. courbaril</i>	42
Tabela 5 - Derivados metilados reduzidos com boroidreto de sódio deuterado, obtidos para a HXGRP e seus principais fragmentos de massa (JANSSON <i>et al.</i> , 1976; CARPITA e SHEA, 1989).....	44
Tabela 6 - Assinalamentos de ^1H e ^{13}C dos sinais obtidos por RMN para a HXGRP. Os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.....	53
Tabela 7 - Intensidades das bandas III, I e relação III/I do espectro de emissão de fluorescência do pireno em água e soluções aquosas (10 mg/ml) de HXGRP e HXGRP-AQ.....	61
Tabela 8 - Dados de massa molar (M_w), raio de giro (R_g), razão característica (C_∞) e comprimento de persistência (L_p), viscosidade intrínseca $[\eta]$ e rotação óptica ($[\alpha]_{25}^D$) para HXGRP e HXGRP-AQ.....	63
Tabela 9 - Relação molar monossacarídica, açúcar total, proteína e umidade e massa molar da HXGFC.....	77
Tabela 10 - Dados de decomposição térmica (TGA e DTG) para HXGRP e complexo HXGRP-B.....	90

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

$[\eta]$ – viscosidade intrínseca

η – viscosidade absoluta

η^* – viscosidade dinâmica

Ara – arabinose

C_∞ – razão característica

C5 – carbono 5

C6 – carbono 6

CG – cromatografia gasosa

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa

CGP – cromatógrafo de gel permeação

COSY – “correlated spectroscopy”

cv – cultivar

d.i. – diâmetro interno

DTG – derivada da curva termogravimétrica

D₂O – óxido deuterado

DEPT – “distortionless enhancement by polarization transfer”

dn/dc – relação entre índice de refração e concentração de uma amostra

E_a – energia de ativação

f – furanosídico

FAB-MS – “fast atom bombardment mass-spectroscopy”

Fuc – fucose

G' – módulo elástico

G'' – módulo viscoso

Gal – galactose

Gal C2 – unidade de galactose ligada ao carbono 2 de uma unidade de xilose

Gal C4 – unidade de galactose ligada ao carbono 4 de uma unidade de xilose

Glc – glucose

h – horas

HMQC – “heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy”

HPAEC-PAD – cromatografia de troca iônica de alta performande acoplada a detetor de pulso amperométrico

HPG – hidroxipropilgumar

HPSEC-MALLS – cromatografia de exclusão estérica de alta performance acoplada a detector de espalhamento de luz multi-ângulo

HXGFC – galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* colhidas na reserva de Foz do Chopim-PR

HXGRP – galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* colhidas em Ribeirão Preto-SP

HXGRP-A – galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* colhidas em Ribeirão Preto-SP, aquecidas por duas horas a 85°C e resfriadas à 25°C.

HXGRP-B – galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* colhidas em Ribeirão Preto-SP, complexada com íons borato

IBA – ácido indol 3 butírico

k' – constante de Huggin's

L_p – comprimento de persistência

MALDI-TOF-MS – “matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”

Me₂OBF₃ – trifluoreto de boro – éter etílico

MS – espectroscopia de massa

M_n – massa molar média

M_w – massa molar ponderal média

nC – nanocoulombs

p – piranosídico

ppm – parte por milhão

R_g – raio de giro

RMN de ¹¹B – ressonância magnética nuclear de boro onze

RMN de ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono treze

RMN de ¹H – ressonância magnética nuclear de próton

rpm – rotações por minuto

tan (δ) – relação G''/G'

TGA – análise termogravimétrica

TOCSY – “total correlated spectroscopy” (espectroscopia de correlação total)

v/v – volume por volume

Xyl – xilose

Xyl ns – xilose não substituída

Xyl s – xilose substituída

RESUMO

Uma galactoxiloglucana (HXGRP) foi obtida de sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá). Ela apresentou uma relação molar monossacarídica de 4:3:1 para glucose, galactose e xilose, respectivamente. Através do tratamento da HXGRP com uma enzima *endocelulase* em tampão acetato, pH 5, 30°C, e separação dos oligossacarídeos por HPAEC-PAD verificou-se que eles são os: XXG (2,8%), XXXG (3%), XLG (47%), XLLG (2,4%), XXXXG (23%), XXXLG (14%), XLXXG (4,8%) e XXLXG (2,6%). Análises de espectroscopia de RMN mono e bidimensionais do polímero não permitiram a obtenção de dados que ajudassem no esclarecimento de sua estrutura fina, mas a análise de metilação e do produto obtido pelo tratamento da HXGRP com β -galactosidase sugere a presença de unidades de α -D-Xylp substituídas em O-4 por unidades de β -D-Galp, estrutura não reportada anteriormente. A oxidação seletiva da HXGRP com o reativo TEMPO foi efetiva como demonstrado pelas modificações observadas no seu espectro de RMN de ^{13}C , com o aparecimento de um sinal na região de δ 175, indicando a presença de carboxila de ácido urônico. Através de sua dosagem por método colorimétrico e análise do espectro de RMN de ^{13}C pode-se sugerir a presença de somente ácido β -D-galacturônico, sendo que praticamente todas as unidades de galactose foram oxidadas. A análise da região de C-5 de xilosil e C-6 de galactosil, do espectro de DEPT-135 desse derivado oxidado, demonstra a diminuição de um sinal que não tinha sido atribuído a nenhum carbono das unidades monossacarídicas do material nativo, e a diminuição desse mesmo sinal no espectro de DEPT-135 no material tratado com a enzima β -galactosidase (MARTIN, 1999) sugerem que ele pertença a unidades de galactose ligadas ao C-4 das unidades de xilose. Análises reológicas, de fluorescência e de HPSEC-MALLS, de soluções de HXGRP aquecidas a 85°C por duas horas e depois resfriadas e de não aquecidas sugerem a presença de agregação entre as moléculas. A adição de íons borato à soluções de HXGRP aumentam a sua viscosidade, bem como seu comportamento viscoelástico, o que pode ser interpretado pelo modelo de inibição do fenômeno da reptação. A viscoelasticidade varia com o pH, concentração de íon borato e a massa molar do polímero. Para uma concentração de galactoxiloglucana de 20 mg/ml, o pH que

· promoveu as melhores características elásticas foi o de 9,8. Entre as concentrações de tetraborato de sódio estudadas a que promoveu melhor interação foi a de 7 mg/ml. Na análise comparativa entre duas amostras de massa molar diferente, a de maior M_w apresenta os valores dos módulos elástico e viscoso bem maiores que a de menor, mas por análises de Cox-Merz nenhuma apresentou comportamento de gel. A análise reológica a uma frequência fixa com variação de temperatura, também, mostra diferenças de comportamento para as duas moléculas em solução aquosa ou de tetraborato de sódio. Por análises de RMN de ^{11}B observa-se a formação de complexos do tipo BD, o que justifica a formação de uma solução mais viscoelástica após a adição de borato, e não a de um gel. Análises termogravimétricas do material complexado e não complexado no estado sólido demonstram a persistência do complexo e diferenças em sua cinética de degradação.

ABSTRACT

A galactoxyloglucan (HXGRP) was obtained from the seeds of the tree *Hymenaea courbaril* (jatobá). It had a monosaccharide molar ratio of 4:3:1 of glucose, xylose and galactose, respectively. HXGRP was submitted to enzymatic degradation with an *endo*-glucanase in acetate buffer, pH 5,0, 30°C. The resulting oligosaccharides were separated by HPAEC-PAD and were: XXG (2,8%), XXXG (3%), XLG (47%), XLLG (2,4%), XXXXG (23%), XXXLG (14%), XLXXG (4,8%) e XXLXG (2,6%). 1D and 2D NMR spectroscopy did not clearly define the structure of HXGRP, but methylation analysis and the product formed by treatment with β -galactosidase indicated that α -D-Xylp residues can be substituted at O-4 by β -D-Galp residues, a structure which has not been previously reported. Selective oxidation with the TEMPO reagent was effective as demonstrated by modifications observed in the ^{13}C NMR spectrum of the product, with the appearance of a new signal at δ 175, indicating a uronic acid carboxyl group. Its quantification by a colorimetric method, and ^{13}C NMR analysis suggested the presence of only β -D-galacturonic acid, with almost all of the galactosyl residues being oxidized. Analysis of the C-5 region of the xylosyl and the C-6 region of the galactosyl residues of the oxidized polysaccharide using DEPT-135 spectroscopy showed a decrease in a signal not attributed to any C nucleus of the monosaccharide residues. The decrease of the same signal obtained from β -galactosidase treated polysaccharide in its DEPT-135 spectrum (MARTIN, 1999) suggested that it belonged to galactosyl linked to C-4 of xylosyl residues. Rheological, fluorescence and HPSEC-MALLS analyses of HXGRP dissolved in water heated to 85°C for 2 h and thereafter cooled to 25°C, and non-heated solutions suggested the presence of molar aggregation. When borate ions were added to the HXGRP solutions, an increase in their viscosity and their viscoelastic behavior occurred and this was interpreted as inhibition of a reptation model. The viscoelasticity was modified on changes of pH, borate ion concentration and the molecular weight of the polymer. For a galactoxyloglucan concentration of 20 mg/ml, the pH that promotes the best elastic character was 9.8 and the best tetraborate concentration was 7 mg/ml. In a comparative analysis between two samples with different molecular weights, that with the highest M_w had higher elastic and viscous

moduli, but by Cox-Merz analysis they did not show any gel behavior. Rheological analyses with temperature variation at a fixed frequency, also showed differences between the two molecules when they were solubilized in water or in aqueous sodium tetraborate. ^{11}B NMR spectroscopy showed the presence of BD complex, justifying the formation of a more viscoelastic solution and not a gel. Thermogravimetric analyses of complexed and non-complexed material in the solid state showed persistence of complexes and differences in their degradation kinetics.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Polissacarídeos

Os polissacarídeos constituem uma das mais abundantes e diversificadas famílias de biopolímeros. A sua estrutura primária varia em composição, seqüência, massa molar, configuração anomérica, posição de ligações e densidade de carga. Variabilidades adicionais resultam da sua susceptibilidade à mudanças ambientais como força iônica e grau de hidratação. Mudanças nestes parâmetros podem dar origem a inúmeras formas de estruturas químicas e de conformação, as quais refletem em uma grande variação de propriedades e aplicações, desde produtos químicos corriqueiros até especialidades químicas lucrativas para uso médico e de alta tecnologia. Numerosas outras aplicações estão surgindo como resultado do aumento da demanda por indústrias biotecnológicas, farmacêuticas e outras (YALPANI, 1988).

1.1.1. Xiloglucanas: fontes e caracterização estrutural

As xiloglucanas são os principais componentes hemicelulósicos da parede celular de dicotiledôneas, plantas floridas e gimnospermas (SIMS *et al.*, 1996). Podem atuar, também, como polissacarídeos de reserva sendo encontradas em algumas sementes (MacGREGOR e GREENWOOD, 1980).

Devido à complexidade de suas estruturas que podem ser constituídas por grupos de oligossacarídeos de diferentes tipos, FRY *et al.* (1993) desenvolveram uma nomenclatura concisa para designar de forma não ambígua as estruturas de xiloglucanas, onde a molécula é nomeada a partir da cadeia lateral, em segmentos constituídos de uma unidade de glicosil simples e suas cadeias laterais. Cada segmento é codificado por uma letra dependendo da estrutura da cadeia lateral, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Códigos utilizados para a nomenclatura dos grupos oligossacarídicos de xiloglucana, segundo FRY *et al.* (1993).

Letra código	Estrutura representada
G	β -D-Glcp
X	α -D-Xylp-(1→6)- β -D-Glcp
L	β -D-Galp-(1→2)- α -D-Xylp-(1→6)- β -D-Glcp
F	α -L-Fucp-(1→2)- β -D-Galp-(1→2)- α -D-Xylp-(1→6)- β -D-Glcp
A	α -L-Araf-(1→2) } β -D-Glcp
	α -D-Xylp-(1→6) }
B	β -D-Xylp-(1→2) } β -D-Glcp
	α -D-Xylp-(1→6) }
C	α -L-Araf-(1→3)- α -D-Xylp-(1→2) } β -D-Glcp
	α -D-Xylp-(1→6) }
S	α -L-Araf-(1→2)- α -D-Xylp-(1→6)- β -D-Glcp

Em estudos recentes que envolvem hidrólise de xiloglucanas com *endo*- β -glucanase, pode-se verificar que elas são constituídas inteiramente, ou em grande parte, por grupos repetitivos de oligossacarídeos (Figura 1). Nesses grupos oligossacarídicos as unidades de α -D-Xylp podem ainda ser substituídas em 'a' ou 'b' por β -D-Galp e, no caso de xiloglucana de parede celular primária, em 'b' por α -L-Fucp(1→2)- β -D-Galp (MacGREGOR e GREENWOOD, 1980; BUCKERIDGE *et al.*, 1992).

Seguindo a nomenclatura de Fry *et al.* (1993) apresentada na Tabela 1, se o oligossacarídeo da Figura 1, não tivesse nenhuma de suas unidades de xilose substituídas seria denominado XXXG, se fosse substituído em 'a' por uma unidade de galactose seria denominado XLXG, se substituído em 'a' e 'b' por unidades de galactose seria denominado XLLG e se a unidade de galactose da posição 'a' não fosse substituída e a galactose de 'b' substituída por uma unidade de fucose, seria denominado XLFG.

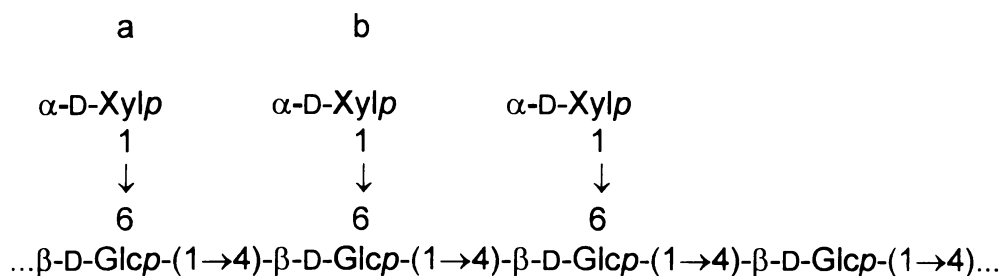


Figura 1 - Representação esquemática de um dos grupos oligossacarídicos de xiloglucana (adaptado de YORK *et al.*, 1993).

Em algumas estruturas, as unidades de β-D-galactopiranosose possuem substituintes O-acetil predominantemente ligados na posição 6 (YORK *et al.*, 1995). Mesmo entre as xiloglucanas de parede celular primária de dicotiledôneas e monocotiledôneas há diferenças estruturais. Nas últimas não há fucose terminal, possuem menos xilose e muitos menos galactose que as primeiras, com exceção da espécie *Allium cepa* (cebola) (HAYASHI, 1989).

Por possuírem além das unidades de xilose e glucose, também, unidades de galactose, fucose e pequenas quantidades de arabinose, alguns autores dizem que o termo xiloglucana é uma denominação incorreta (JAMES, 1985) e a denominam, então, de galactoxiloglucana (REIS *et al.*, 1987).

Estruturas de xiloglucanas de diferentes espécies foram determinadas utilizando como ferramenta a análise dos oligossacarídeos.

O'NEILL e SELVENDRAN (1983) submeteram a xiloglucana de *Phaseolus coccineus* à acetólise e obtiveram diversos oligossacarídeos, mas identificaram apenas quatro que foram: D-Galp-(1→2)-D-Xylp, D-Glcp-(1→4)-D-Glcp, L-Fucp-(1→2)-D-Galp-(1→2)-D-Xylp e D-Glcp-(1→4)-D-Glcp-(1→4)-D-Glcp.

O grupo de Darvill e Albersheim realizou diversos estudos com derivados oligossacarídicos de xiloglucanas de diferentes espécies. Assim, YORK *et al.* (1990) isolaram as xiloglucanas de cultura de células de sicômoro (*Acer pseudoplatanus*), sementes de tamarindo e casca de sementes de colza, fizeram a sua digestão com *endo*-(1→4)-β-D-glucanase e analisaram os oligossacarídeos isolados através de espectroscopia de ¹H RMN e espectrometria de FAB-MS. Da xiloglucana de cultura de células de sicômoro, KIEFER *et al.* (1990) caracterizaram estruturalmente um heptassacarídeo contendo arabinose, gerado por digestão do polissacarídeo com

uma *endoglucanase* de *Trichoderma viride*. HISAMATSU *et al.* (1991) estudaram um undecassacarídeo com duas unidades de α -L-fucose terminais, obtido a partir de xiloglucanas de células de sicômoro, da mesma forma que no trabalho de KIEFER *et al.* (1990). HISAMATSU *et al.* (1992) estudaram sete oligossacarídeos obtidos de uma xiloglucana secretada por cultura de células de *A. pseudoplatanus* comentando que os resultados obtidos aumentaram a lista de correlações entre ^1H -RMN e características estruturais específicas. YORK *et al.* (1993) digeriram a xiloglucana de tamarindo com uma *endoglucanase* de *Trichoderma reesei* e após 96 horas trataram o material com uma β -galactosidase de *Aspergillus niger*, concluindo que a digestão com a última enzima hidrolizou seletivamente dois octassacarídeos isômeros presentes na mistura. YORK *et al.* (1995) analisaram onze oligossacarídeos previamente não caracterizados da xiloglucana produzida por uma cultura de *A. pseudoplatanus*. Além da metodologia utilizada nos trabalhos anteriores, os autores ainda incluíram a análise de MALDI-TOF dos oligossacarídeos que permitiram correlações adicionais entre estrutura da xiloglucana e deslocamentos químicos específicos em ^1H RMN. HANTUS *et al.* (1997) estudaram os oligossacarídeos de sementes de jojoba, e os caracterizaram estruturalmente, através de espectrometria de massa e espectroscopia de RMN bidimensional, encontrando um oligossacarídeo não descrito na literatura com a seguinte constituição na cadeia lateral: $[\alpha\text{-L-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)-}]$, que é um homólogo estrutural da cadeia lateral de um oligossacarídeo que contém fucose $[\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow\text{6)-}]$ e apresenta atividade antiauxínica, isto é inibe o crescimento “in vitro” de secções de caule de ervilha estimuladas por ácido 2,4-diclorofenoxiacético, uma auxina sintética (YORK *et al.*, 1984).

RENARD *et al.* (1992) extraíram uma xiloglucana de parede celular de maçã, efetuando a sua hidrólise parcial com uma *endoglucanase* de *T. viride*, sendo que os principais oligossacarídeos isolados foram os seguintes: XXXG, XXFG e XLFG, respectivamente. As análises dos espectros de ^1H RMN mostraram que esses oligossacarídeos não são acetilados.

BUCKERIDGE *et al.* (1992) estudaram os oligossacarídeos da xiloglucana de *Copaifera langsdorffii* verificando que, eram os mesmos encontrados para a

xiloglucana de tamarindo, mas em diferentes proporções, para populações de savana e floresta.

BRACINI *et al.* (1995) trataram a xiloglucana extraída de sementes de ciclâmen com uma celulase de *T. viride* gerando oligômeros que foram estudados por MS e RMN, encontrando os seguintes oligossacarídeos: XXLG (mais abundante), XXXG e XLLG indicando que a distribuição de galactose nessa xiloglucana é irregular.

VINCKEN *et al.* (1997) fizeram uma classificação das xiloglucanas de acordo com o padrão de substituição da cadeia principal, sendo que nas angiospermas e gimnospermas é encontrado o padrão poli XXXG e nas solanáceas o poli XXGG e ainda existem os poli XXG, poli XXGGG e poli XXX, indicando a existência de diferentes padrões estruturais para esses polissacarídeos.

BUCKERIDGE *et al.* (1997) demonstraram a existência de uma nova família de oligossacarídeos em sementes de *Hymenaea courbaril*, colhidas nos jardins do Instituto de Botânica em São Paulo, SP. Após tratamentos alternados com α -xilosidase e β -glucosidase, verificaram que aproximadamente 50% deles seriam do tipo XXXXG, um novo padrão estrutural.

O grupo de Nakanishi realizou diversos estudos com oligossacarídeos de xiloglucana de sementes de tamarindo utilizando a técnica de MALDI-TOF-MS que não havia sido empregada anteriormente para análise de oligossacarídeos obtidos a partir da xiloglucana de tamarindo (YAMAGAKI *et al.*, 1997, 1998a, b).

SPRONK *et al.* (1998) estudaram os oligossacarídeos pequenos e menos ramificados da xiloglucana de maçã, utilizando uma combinação de FAB-MS e ^1H RMN e identificaram o GFG e o seu dímero, o dodecassacarídeo GFGGFG.

WATT *et al.* (1999) isolaram dois oligossacarídeos de xiloglucana de maçã que não haviam sido estudados anteriormente por ^{13}C RMN, o XXFG e o XLFG.

VIERHUIS *et al.* (2001b) estudaram oligossacarídeos obtidos de xiloglucana de oliva através de MALDI-TOF e RMN e verificaram que eram constituídos principalmente por XXSG e XLSG.

MARRY *et al.* (2003) isolaram e identificaram diversos pequenos oligossacarídeos da xiloglucana de tamarindo através de uma metodologia facilmente reproduzível que resulta em oligossacarídeos relativamente puros para padrões ou substratos.

Nos últimos anos têm aumentado consideravelmente o interesse por xiloglucanas. Há trabalhos de diferentes órgãos de diferentes espécies de plantas como frutos de caqui (CUTILLAS-ITURRALDE *et al.*, 1998), zona de diferenciação do xilema de cedro vermelho japonês (KAKEGAWA *et al.*, 1998), cultura de células de *Digitalis lanata* (HENSEL *et al.*, 1997 e 1998), folhas de *Digitalis purpurea* (HENSEL *et al.*, 1998), casca de uva (IGARTUBURU *et al.*, 1997), frutos de tomate (FAIK *et al.*, 1998), broto de bambu (EDASHIGE e ISHII, 1998), caule de couve-flor (FEMENIA *et al.*, 1999a, b), cultura de células de maçã (REID *et al.*, 1999), polpa de beterraba (OOSTERVELD *et al.*, 2000), soja (HUISMAN *et al.*, 2000), oliva (VIERHUIS *et al.*, 2000; VIERHUIS *et al.*, 2001a e b), no suco de maçã (MEHRLÄNDER *et al.*, 2002) e na casca de cacau (REDGWELL *et al.*, 2003).

Também foi encontrada em sementes de leguminosas tropicais (*Dentarium microcarpum* e *Mucuna flagellipes*) utilizadas na Nigéria e alguns outros países do oeste africano. A farinha dessas sementes é utilizada como espessante de sopas e guisados (ONWELUZO *et al.*, 2002).

O interesse, também, é demonstrado pelo número crescente de artigos enfocando diferentes utilizações e propriedades das xiloglucanas.

1.1.2. Xiloglucanas: utilizações e propriedades

A xiloglucana de sementes de tamarindo pode ser utilizada, principalmente, nas indústrias têxtil e alimentícia e ainda como adesivo e agente emulsificante. Em cosméticos, para preparar emulsões de óleos essenciais, cremes de barbear e dentifrícios. Em produtos farmacêuticos, como ligante em comprimidos e drágeas. Em inseticidas, para emulsificar princípios ativos e óleos minerais. E por possuir muitas propriedades similares às das pectinas, é usada em tratamento de colite, diarreia, disenteria e outras desordens intestinais (RAO e SRIVASTAVA, 1973).

Como componente de fibras dietéticas, as xiloglucanas possuem atributos nutricionais de valor e significância fisiológica (ONWELUZO *et al.*, 2002). Além disso, foi encontrado que uma dieta rica em farinha de *Dentarium senegalense*, uma planta leguminosa africana utilizada como alimento na Nigéria, reduz os níveis de glucose pós-prandial e a concentração de insulina em indivíduos humanos saudáveis, sendo que

esse papel é atribuído à uma xiloglucana de alta massa molar encontrada nessa farinha (ONYECHI *et al.*, 1998).

Géis de xiloglucana de tamarindo degradada com a enzima β -galactosidase e, com redução de 44% no seu conteúdo de galactose, apresentaram-se eficientes como veículos para a administração de drogas por via retal (MIYAZAKI, *et al.*, 1998), intraperitoneal (SUISHA, 1998), oral (KAWASAKI *et al.*, 1999; MIYAZAKI *et al.*, 2001a) e percutânea (TAKAHASHI *et al.*, 2002), além de formarem géis quando instilados em olho de coelho propiciando seu uso em fórmulas oftalmológicas (MIYAZAKI *et al.*, 2001b).

A xiloglucana de *Tropaeolum majus* L., entre outros efeitos, possui uma atividade antimutagênica quando a mutagênese é induzida pelo composto nitroaromático 1-nitropireno. As taxas de inibição foram dose dependentes e seu modo de ação devido à interação direta do polissacarídeo com as células, comprovando a hipótese de que um consumo diário de uma quantidade elevada de polissacarídeos promove um decréscimo no risco de câncer do aparelho gastrointestinal (HENSEL e MEIER, 1999).

Há patentes citando a utilização da xiloglucana como constituinte ativo em cosméticos (SHISEIDO, 2000) e, também, após remoção parcial das unidades de galactose, na preparação de alimentos (DAINIPPON, 1999 e 2001).

Os oligossacarídeos de xiloglucana também podem apresentar efeitos biológicos em plantas e animais.

Podem agir como elicitores de ligação de glico- e glicanohidrolases de parede celular que podem atuar na expansão da parede celular (JOSELEAU *et al.*, 1992). Dependendo da concentração ou composição da cadeia lateral podem promover ou inibir o crescimento de plantas (CREELMAN e MULLET, 1997; ROSE e BENNETT, 1999). Em frações enriquecidas de proteínas da membrana plasmática de protoplastos de amora silvestre (*Rubus fruticosus*) foram encontrados receptores para o oligossacarídeo XXFG (DUNAND *et al.*, 2000).

De acordo com SONE e colaboradores (1992), o oligossacarídeo XLLG pode ser utilizado como aditivo de alimentos, como fibra dietética solúvel de baixa massa molar (citado por SONE e SATO, 1994).

Oligossacarídeos de xiloglucana (XXXG, XXLG e XLLG) obtidos pela digestão com *endoglucanase* possuem efeitos hipolipidêmicos reduzindo os níveis de lipídeos

hepáticos, lipídeos totais, colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos em ratos alimentados com uma dieta rica em gorduras (YAMATOYA *et al.*, 1997).

Entre as propriedades apresentadas pelas xiloglucanas é interessante ressaltar a sua capacidade de interação com a celulose tanto “in vivo” quanto “in vitro”.

A celulose, como as xiloglucanas, é constituída por uma cadeia principal de unidades de β -D-glucose, interligadas (1 $\rightarrow$ 4), mas não possui nenhuma cadeia lateral. Suas cadeias tendem a se agrupar em microfibrilas através de pontes de hidrogênio, enquanto as cadeias de xiloglucana não se associam devido ao grande número de cadeias laterais ligadas à sua estrutura (HAYASHI, 1989; VINCKEN *et al.*, 1995).

Existe uma relação íntima entre as cadeias de xiloglucana e celulose “in vivo”. Nas paredes celulares primárias, as microfibrilas de celulose são revestidas por xiloglucanas (MAc CANN *et al.*, 1990; ROSE e BENNETT, 1999); existindo somente uma pequena quantidade de celulose não revestida (HAYASHI e MacLACHLAN, 1984; VINCKEN *et al.*, 1995).

Baseado nas quantidades de xiloglucana que podem ser extraídas de parede celular vegetal (HAYASHI, 1989; ROSE e BENNETT, 1999), verificou-se que a capacidade de interação entre celulose e xiloglucana nessas paredes é muito maior que aquela encontrada em experimentos de interação entre os dois polímeros realizados “in vitro” (HAYASHI *et al.*, 1987; BABA *et al.*, 1994; VINCKEN *et al.*, 1995; ROSE e BENNETT, 1999),

Já foi demonstrado que é necessário um tamanho mínimo de 5 unidades de glucose consecutivas para que ocorra a ligação de xiloglucanas à celulose, mas a extensão de ligação aumenta gradualmente do octassacarídeo (Glu:Xyl 5:3) ao oligossacarídeo com 21 unidades (Glu:Xyl 12:9) (HAYASHI *et al.*, 1994).

Através de estudos “in vitro” com diferentes tipos de polissacarídeos sugere-se que essa interação é baseada na complementariedade entre as superfícies das β -D-glucanas contendo ligação (1 $\rightarrow$ 4) e a celulose (MISHIMA *et al.*, 1998). Essa ligação é muito específica uma vez que não é afetada por um excesso de dez vezes de (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3) e (1 $\rightarrow$ 6) β -glucanas, (1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 4) β -glucana, arabinogalactana e pectina (HAYASHI *et al.*, 1987). Através de simulações por computador, foi

demonstrado que as cadeias laterais fucosiladas podem facilitar a conformação de cadeia principal plana e foi especulado que essas regiões organizadas causariam a ligação de xiloglucana à celulose (LEVY *et al.*, 1991). Porém, estudos com o mutante *mur 2* de *Arabidopsis thaliana*, que possui uma alteração no gene *At FUT 1*, que codifica a fucosiltransferase de xiloglucana nessa espécie, levando a planta a perder a xiloglucana fucosilada em todos seus principais órgãos, demonstraram nenhuma alteração em seu crescimento e fisiologia. Observaram, também, o enfraquecimento óbvio de suas paredes celulares primárias, como determinado por medidas de perda de resistência, sugerindo que as plantas mutantes podem desenvolver uma cadeia xiloglucana-celulose razoavelmente estável (ZABACKIS *et al.*, 1996; LEVY *et al.*, 1997; REITER *et al.*, 1997; REITER, 2002; VANZIN *et al.*, 2002) levantando dúvidas sobre a necessidade da fucose para que ocorra essa interação.

Em estudos de interação entre celulose e fragmentos de xiloglucana com diferentes graus de polimerização, foi relatado que a substituição com galactose provavelmente diminui a habilidade dos fragmentos em penetrar nos pequenos poros da celulose (VINCKEN *et al.*, 1995).

LIMA e BUCKERIDGE (2001) estudaram a adsorção de xiloglucanas de sementes de diferentes espécies (*Copaifera langsdorffii*, *H. courbaril*, *Tamarindus indica* e *Tropaeolum majus*) sobre a celulose e observaram que a xiloglucana que apresentou maior capacidade de interação foi a de *H. courbaril* seguida por *T. indica*, *T. majus* e *C. langsdorffii*. Os resultados que obtiveram com xiloglucanas com diferentes graus de galactosilação indicam que a presença de grandes quantidades de unidades de galactose estão associadas com uma baixa interatividade com a celulose. A análise de estrutura fina da xiloglucana que permaneceu ligada à celulose revela que podem haver domínios mais interativos que parecem ser regiões ricas em XXXG e XLXG. No entanto, ainda não está esclarecido se o fator que realmente pode afetar a interação é o grau de galactosilação ou a distribuição das unidades de galactose, uma vez que alguns resultados indicaram que uma distribuição irregular de galactose aparentemente favorece a ligação. Isso, provavelmente, ocorre devido à presença de grandes proporções de unidades de galactosil em um lado da cadeia que expõem as unidades do outro lado para a interação com a celulose por pontes de hidrogênio. Por outro lado, a tendência de

uma distribuição uniforme das unidades de galactose pode levar à uma estrutura mais torcida, resultando em uma baixa capacidade de ligação.

Baseado na interação de xiloglucanas com celulose foi demonstrado que xiloglucanas de sementes de diferentes espécies vegetais melhoram as propriedades mecânicas de folhas de papel sem afetar seu brilho e opacidade (LIMA *et al.*, 2003).

Também há evidências de formação de complexos entre xiloglucanas e pectinas (THOMPSON e FRY, 2000), bem como complexos pectina-xilana-xiloglucana (FEMENIA *et al.*, 1999).

Em vista de suas inúmeras propriedades aqui apresentadas a xiloglucana de sementes de *H. courbaril* vem sendo estudada pelo Grupo de Carboidratos da UFPR desde 1993 e em 1999 iniciaram-se, também, os estudos da xiloglucana de folhas de *H. courbaril*.

1.1.3. Estudos da xiloglucana de *H. courbaril* pelo Grupo de Carboidratos da UFPR

LIMA (1993) e LIMA *et al.* (1993) fizeram a análise estrutural e viscosimétrica da xiloglucana de sementes de *H. courbaril* var. *stilbocarpa* colhidas em Teodoro Sampaio – SP, utilizando diferentes métodos incluindo hidrólise ácida parcial e acetólise parcial e sugeriram o seu uso em substituição à goma de tamarindo. LIMA *et al.* (1995), após o tratamento do polímero com uma celulase comercial (BIOFERM), isolaram e caracterizaram alguns oligossacarídeos, entre eles um octassacarídeo predominante, constituído por uma estrutura do tipo XXLG.

SOUZA-LIMA (1997), analisou parcialmente a estrutura da galactoxiloglucana de sementes de *H. courbaril* (jatobá) colhidas em Ribeirão Preto – SP e, por tratamento com β -galactosidase e posterior análise por ^{13}C RMN, sugeriram a possibilidade de algumas unidades de β -D-galactopiranosose estarem ligadas em O-4 de unidades de β -D-glucopiranosose. Também sintetizou um derivado sulfatado da xiloglucana analisado por reologia em comparação com o polímero nativo e que também foi analisado quanto a sua atividade anticoagulante que não foi significativa.

VARGAS-RECHIA (1998) tratou a xiloglucana obtida de sementes de jatobá, colhidas em Ribeirão Preto, com as enzimas celulase comercial (BIOFERM),

endoglucanase do tipo I (EGI) e *endoxiloglucanase* do tipo 2 (EG5) obtendo oligossacarídeos similares aos obtidos por LIMA *et al.* (1995). Com o oligossacarídeo XXLGol, assim denominado por ter a sua unidade terminal de glucose reduzida, VARGAS-RECHIA *et al.* (1998), realizaram estudos de atividade biológica para uso como elicitador de crescimento em plantas.

MARTIN (1999), continuando os estudos com a galactoxiloglucana de sementes de jatobá colhidas em Ribeirão Preto, confirmou os resultados obtidos por SOUZA-LIMA (1997) e verificou que a interação entre o polímero e íons borato, em solução, alteram as propriedades reológicas do sistema. Sintetizou um novo derivado sulfatado da xiloglucana que foi fracionado em coluna de AT-III, sendo que tanto a fração que apresentou afinidade pela coluna, bem como a que não apresentou, demonstraram atividade anticoagulante maior que o derivado não fracionado, porém ainda não significativa, descartando a utilização dessa molécula como anticoagulante.

BUSATO (1999) e BUSATO *et al.* (2001), isolaram uma xiloglucana fucosilada de folhas de *H. courbaril* (colhidas em Ribeirão Preto) e realizaram estudos estruturais obtendo uma relação Glc:Xyl:Gal:Fuc 8:5:2,5:1 e massa molar (M_w) de 49.500 g/mol.

FREITAS (2000) e FREITAS *et al.* (2003a) estudaram a interação da galactoxiloglucana de *H. courbaril* (sementes do Paraná) com amido de milho com alto teor de amilose (CSM) e “waxy” constituído principalmente por amilopectina (CSP). Em condições reológicas não oscilatórias os géis apresentaram um aumento em sua viscosidade de pasta quando comparados com os amidos ou a galactoxiloglucana isolados. Análises reológicas oscilatórias mostraram que ocorre uma interação na mistura de galactoxiloglucana e CSM resultando em um aumento da estabilidade térmica do gel quando comparado com aquela do CSM isolado.

LIMA-NISHIMURA (2002) testou meios de cultivo vegetal obtidos a partir de interações de xiloglucana de sementes coletadas em Porto dos Gaúchos (MT) com ágar e Gelrite® e os que apresentaram melhores resultados em termos de geleificação foram testados na micropropagação de cenoura, café e macieira. Um meio nutritivo geleificado com ágar/xiloglucana foi utilizado, entre outros experimentos, para regeneração de raízes de cenoura obtendo-se o dobro de plantas regeneradas em relação ao controle. No caso de embriogênese somática de

dois genótipos de café, testou-se um outro tipo de meio de cultivo geleificado com a mistura Gelrite[®]/xiloglucana ou somente Gelrite[®]. O primeiro meio seguiu um padrão de embriogênese direta e o segundo indireta. O número de embriões somáticos foram maiores para o meio modificado com uma diferença estatisticamente significativa.

LIMA-NISHIMURA (2002) e LIMA-NISHIMURA *et al.* (2003) testaram um meio nutritivo, comumente utilizado para cultivo vegetal, geleificado com a mistura ágar/xiloglucana para a proliferação de gemas axilares de macieiras cv Jonagored e porta-enxerto Marubakaido. A taxa de crescimento e a proliferação de brotos foram maiores no meio que consistiu da mistura do que no controle, para as duas macieiras. Para o cv Jonagored foi observada uma redução significativa na percentagem de brotos hiperhídricos. Na ausência de auxina o enraizamento de brotações foi muito maior para o meio substituído que para o não substituído. Quando IBA, um estimulador da elongação das células das raízes laterais de plantas (DEBI *et al.*, 2003), foi adicionado a ambos os meios, no modificado obteve-se resultados melhores em termos de porcentagem de enraizamento e qualidade das raízes.

Além das características e propriedades já descritas para as xiloglucanas, os carboidratos em geral, sendo compostos polihidroxilados (polióis), possuem a propriedade de formar complexos com íons borato, assunto de interesse fisiológico e tecnológico, que será tratado no próximo item.

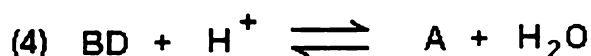
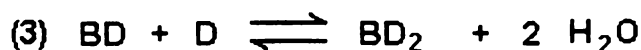
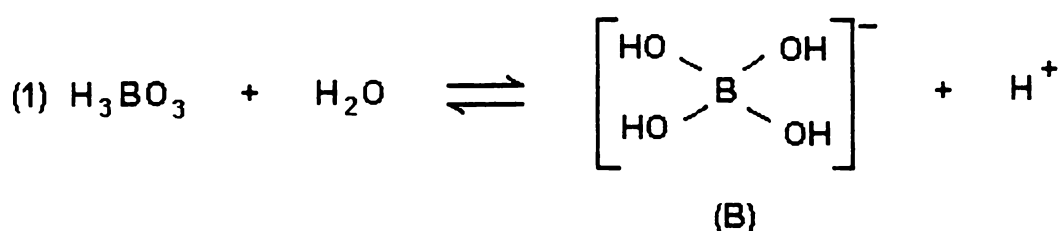
1.2. Interação de polissacarídeos com íons borato

Em 1842, BIOT (citado por ROY *et al.*, 1957) relatou que uma solução de ácido bórico tornava-se mais ácida, com a adição de vários açúcares. Nos anos seguintes, muitos pesquisadores testaram várias séries de polióis com o objetivo de estudar seus efeitos sobre a acidez do ácido bórico. Em 1912, BÖESEKEN e van ROSSEN realizaram estudos condutimétricos de reações de ácido bórico com glicerol, catecol, resorcinol, pirrogalol e manitol.

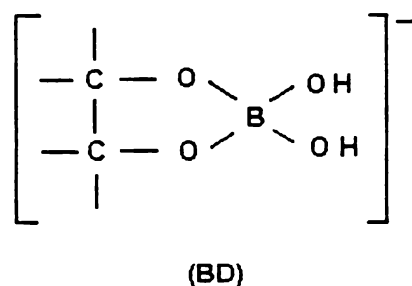
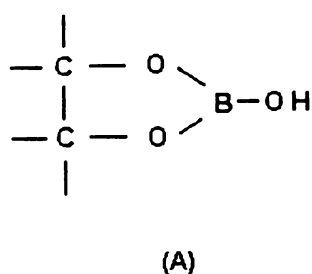
Desde então, já foram utilizados diversos métodos para examinar as reações de complexação dos íons borato, tais como, condutividade, medidas de pH, medidas crioscópicas, polarimetria, eletroforese de zona, espectroscopias de ressonância

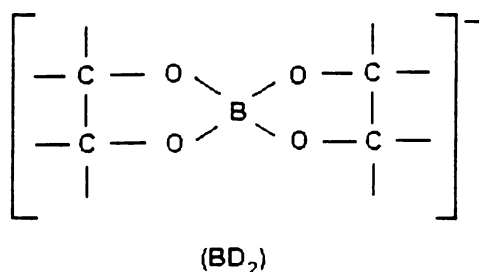
nuclear magnética (RMN) de ^1H , ^{13}C e ^{11}B . Também, a interconversão de compostos aquosos de borato dependentes do pH, bem como a interação de íons borato com dióis, têm sido monitoradas indiretamente por medidas de índice de refração e rotação óptica (GEY *et al.*, 1988).

ISBELL *et al.* (1948), estudando certos açúcares e álcoois na presença de tetraborato, propuseram que as reações envolvidas na formação dos complexos seriam as seguintes:



Onde os complexos A, BD e BD_2 seriam:





ANGYAL e McHUGH (1955 e 1957), propuseram que, na adição de *cis*-inositol à uma solução aquosa de tetraborato de sódio, um decréscimo no pH resultaria na formação de um complexo bi-tridentado de borato. A formação desse complexo, representado na Figura 2, foi comprovada por RMN de ¹³C por GORIN e MAZUREK (1973). A 2,4-di-O-metil-D-manose também é capaz de formar um complexo mono-tridentado com boro através de seus três grupamentos hidroxila disponíveis e o *cis*-inositol forma um complexo bi-tridentado, através da complexação de suas seis hidroxilas com dois íons borato (GORIN e MAZUREK, 1973).

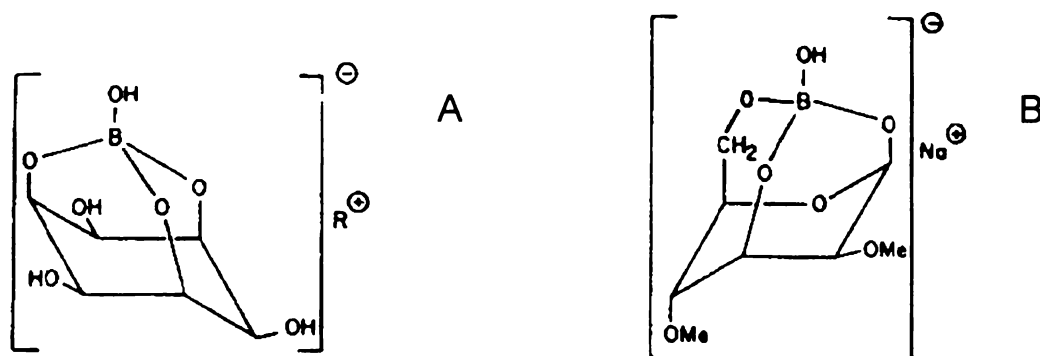


Figura 2 – Complexos de borato tridentados formados com *cis*-inositol (A) e 2,4-di-O-metil-D-manose (B) (GORIN e MAZUREK, 1973).

Sabe-se ainda que, a adição de uma pequena proporção de borato, favorece a formação do complexo espirano (BD₂), enquanto que na presença de borato adicional o equilíbrio pode ser deslocado para a formação de complexos do tipo BD, e em menor quantidade de um éster (A) (VERMAAS, 1932 e ISBELL *et al.*, 1948).

Esses complexos são obtidos muito mais facilmente com glicóis cíclicos possuindo hidroxilas adjacentes com configuração *cis* do que os seus isômeros *trans* (DEUEL *et al.*, 1948; NOBLE e TARAVEL, 1987).

A espectroscopia de RMN de ^{11}B confirmou a existência dos complexos entre bórax e uma grande variedade de compostos polihidroxilados simples em solução e sua dependência do pH, concentração e estrutura. O método espectroscópico não perturba o equilíbrio químico da amostra, e deslocamentos químicos característicos indicam a existência de complexos com anéis de cinco e seis membros (Figura 3), bem como complexos monocíclicos (BD) e espirocíclicos (BD₂) (KENNEDY e HOW, 1973).

Os complexos de carboidratos e íons borato, também, podem ser detectados por monitorização de mudanças no espectro de RMN de ^{13}C . Em uma delas, os deslocamentos químicos permanecem constantes mas ocorre o alargamento dos sinais dos átomos de ^{13}C que estão nas posições vicinais ao complexo. Em outra, os sinais permanecem definidos mas ocorrem mudanças nos deslocamentos químicos. Além da detecção dos complexos de borato, frequentemente, é possível averiguar as estruturas químicas presentes e determinar quantitativamente as proporções relativas entre os complexos e o material de partida (GORIN e MAZUREK, 1973).

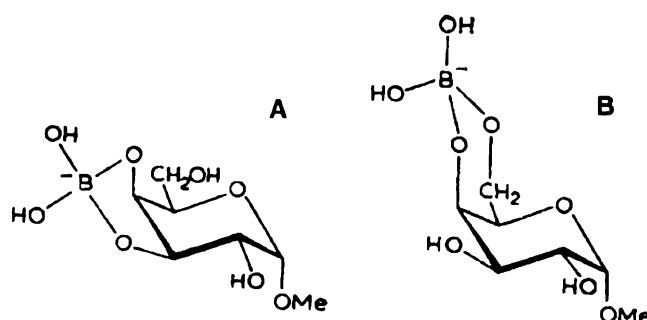


Figura 3 - Complexos entre borato e metil α -D-galactopiranosídeo formados por anéis de 5 (A) e 6 (B) membros (KENNEDY e HOW, 1973).

van DUIN *et al.* (1984) estudaram a estabilidade dependente de pH de ésteres de ácido bórico e borato com glicol, ácido glicólico, ácidos oxálico e glicérico e concluem que o RMN de ^{11}B proporciona uma ferramenta analítica adequada para a determinação quantitativa e elucidação da estrutura de vários ésteres em meio aquoso. Na continuidade desses estudos, van DUIN *et al.* (1985) apresentaram os dados de RMN de ^{11}B para uma série de ésteres de borato de polióis e polihidroxicarboxilatos em solução aquosa alcalina, sendo que para cada composto o mono- ou di-éster de borato prevalente foi identificado. Os deslocamentos químicos de RMN de ^{11}B e a largura das linhas juntamente com a constante de associação correspondente foram determinados. Foram propostas, também, regras empíricas para prever os deslocamentos químicos de ^{11}B , a estabilidade relativa e a estrutura dos ésteres de borato em meio aquoso.

NOBLE e TARAVEL (1987) realizaram estudos de RMN de ^1H dos complexos borato-metil α -D-galactopiranosídeo em $\text{di}(\text{}^2\text{H}_3)\text{metilsulfóxido}$ que serviu como base para entender a geleificação da galactomanana de guar e borato.

No caso de polissacarídeos, MOE *et al.* (1947) e DEUEL *et al.* (1948) foram os primeiros a demonstrar que a provável natureza da reação entre esses compostos e íons borato era similar àquela que ocorria nos compostos polihidroxilados simples.

DEUEL e NEUKOM (1949) demonstraram a esperada correlação entre a intensidade de formação do gel e a presença de carboidrato reativo. Seus testes foram realizados pela adição de soluções saturadas de bórax a soluções aquosas das gomas.

Desde que os polissacarídeos contêm uma multiplicidade de grupamentos hidroxila, a formação de compostos do tipo BD_2 levaria à formação de ligações cruzadas entre as moléculas do polissacarídeo com a formação de gel, ou aumento de viscosidade, e outras mudanças em outras propriedades correlacionadas com a massa molar.

A farmacopéia Helvética V menciona a incompatibilidade do bórax com goma arábica, sendo que essa incompatibilidade seria a formação de gel. A geleificação de soluções aquosas da mucilagem de *Ceratonia siliqua* (galactomanana de carob), por bórax, também foi observada (DEUEL *et al.*, 1948).

Dentre todos os estudos de interação de polissacarídeos com íons borato, o polímero que teve suas propriedades mais exploradas por diferentes métodos, inclusive por reologia e RMN, foi a galactomanana de guar ou o seu derivado hidroxipropilguar (HPG) (PEZRON *et al.*, 1988a, b; GEY *et al.*, 1988; NOBLE e TARAVEL, 1987; NOBLE e TARAVEL, 1988; NOBLE e TARAVEL, 1990; KESAVAN e PRUD'HOMME, 1992; POWER *et al.*, 1998; TAYAL *et al.*, 1999).

As galactomananas, entre outros polissacarídeos, formam géis, quando interagem com borato, em soluções 0,1% ou menos concentradas (DEUEL e NEUKON, 1949).

Nas indústrias de óleo e gás, géis de guar complexado com íons borato são utilizados nas perfurações de poços de petróleo com o objetivo de aumentar a produtividade (TAYAL *et al.*, 1999).

NOBLE e TARAVEL (1987) realizaram análises de RMN de ^{13}C de uma galactomanana parcialmente despolimerizada e observaram as mudanças que ocorriam no espectro obtido. Com o acréscimo de concentrações crescentes de borato, notaram uma mudança drástica nas intensidades de todos os átomos de carbono das unidades de α -D-galactopiranosose. Também foram feitos experimentos de tempo de relaxamento do polissacarídeo com e sem adição de tetraborato de sódio e observaram que, o maior efeito em termos de tempo de relaxamento "spin-spin", foi em relação aos átomos de carbono de unidades de galactose.

Por estudos de RMN e diálise foi demonstrado que, exceto por efeitos de polieletrólitos, o guar e o hidroxipropilguar comportam-se como modelos glicosídicos (especialmente α -D-galactopiranosídeo) em relação à complexação com íons borato. Complexos monodiol-borato (BD) com anéis de cinco ou seis membros (Figura 3) são formados e suas constantes de formação (K_1) são da mesma ordem de magnitude. Os complexos são mais prontamente formados nas unidades de galactose e a maioria das ligações cruzadas é, provavelmente, de complexos didiol-borato (BD_2) de cinco membros (PEZRON *et al.*, 1988a). Também observou-se, pela obtenção de diagramas de fase sol-gel, que o número de ligações cruzadas formadas entre galactomananas e bórax em solução aquosa pode ser controlado pelas concentrações de polímero e bórax, temperatura e força iônica (PEZRON *et al.*, 1988b).

GEY *et al.* (1988) chegaram a conclusões similares às de PEZRON *et al.*, (1988a). Por RMN de ^{11}B , utilizando metil-glicosídeos modelo e uma fração de galactomanana de guar hidrolisada por β -D-mananase, também verificaram a formação de mono ou di-complexos com anéis de 5 ou 6 membros. Comparando-se a constante de formação entre os glicosídeos modelo e a amostra de guar analisada, chegou-se à conclusão que a formação dos complexos guar-borato ocorre principalmente via complexos com anéis de 5 membros e que esses complexos são formados mais rapidamente com as unidades de D-galactose do que com as unidades de D-manose.

Por experimentos de RMN de ^{11}B em diferentes temperaturas foram determinadas as constantes de equilíbrio de formação de complexos entre borato e os compostos modelo metil α -D-glucopiranosídeo, metil β -D-manopiranosídeo e metil α -D-galactopiranosídeo. Comparando uma amostra de guar despolimerizada com esses compostos modelo foi possível fazer a distinção entre os complexos envolvendo unidades de galactopiranosose ou manopiranosose (NOBLE e TARAVEL, 1988).

Em estudos reológicos envolvendo guar e hidroxipropilguar (HPG) em concentrações e pH elevados, com ou sem ligações cruzadas devidas à íons borato, e levando em conta que as galactomananas possuem a característica de formar ligações cruzadas pelo simples aumento do pH, chegou-se à conclusão que o comportamento de relaxamento de um gel depende da natureza das ligações cruzadas na cadeia do gel. E, também, que há dois tipos de ligações cruzadas, uma devido ao pH alcalino e outra devido aos íons borato, e que os mecanismos de relaxamento associados com as ligações cruzadas devidas aos íons borato são muito mais rápidos que aqueles associados com as devidas ao meio alcalino (NOBLE e TARAVEL, 1990; NOBLE *et al.*, 1990).

Outros estudos reológicos envolvendo complexos como guar e hidroxipropilguar-borato demonstraram que o equilíbrio químico envolvendo ácido bórico, íons borato livres ou associados com sítios *cis*-diol de cadeias de polissacarídeos determinam o número de ligações cruzadas e que esse equilíbrio é função da temperatura e pH (KESAVAN e PRUD'HOMME, 1992).

Foi estudado, também, o comportamento reológico do complexo hidroxilpropilguar-borato determinando seu ponto de geleificação. Os autores

afirmaram que a avaliação dessas propriedades é importante porque o HPG é comumente utilizado na indústria de petróleo e durante a sua utilização, em uma parte do processo, o fluido faz ligações cruzadas com os íons borato para formar um gel. Salientaram, ainda, que, apesar das propriedades do guar e HPG serem estudadas extensivamente por grupos de reologia e indústrias de petróleo, um entendimento completo do comportamento desses fluidos e géis ainda não foi elucidado (POWER *et al.*, 1998).

O processo de degradação de hidrogéis de galactomanana de guar e borato, por endo- β -mananase e/ou α -galactosidase foi estudado através de medidas reológicas onde demonstrou-se que os módulos elástico (G') e viscoso (G'') são extremamente sensíveis à alterações a nível molecular de polímeros e géis (TAYAL, *et al.*, 1999).

Além das galactomananas são encontrados estudos com dois outros polissacarídeos como descrito a seguir.

Uma ramnoglucuronana sulfatada, obtida da alga verde marinha *Ulva* spp. forma um gel fraco quando solubilizado em água a uma concentração de 1,6%. O seu módulo elástico aumenta cerca de 50 vezes quando é adicionado o ácido bórico e cerca de 80 vezes quando são adicionados ácido bórico e cloreto de cálcio. Os autores também propuseram mecanismos para essa interação (LAHAYE e AXELOS, 1993).

A esquizofilana, um polissacarídeo neutro de fungos com uma estrutura química que consiste de uma cadeia linear de β -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucose com uma cadeia lateral de β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucose para cada três unidades de glucose da cadeia principal, também teve suas propriedades viscoelásticas estudadas, quando em presença de íons borato. Foi observada a formação de um gel físico e estudada a sua cinética de geleificação com variação nas concentrações de íons borato, presença de cloreto de sódio, bem como variação de pH dos sistemas (GRISEL e MULLER, 1996).

Os diferentes complexos de boro com polissacarídeos descritos até aqui são obtidos apenas em laboratório ou com a interferência do homem, mas a própria natureza utiliza-se dessas propriedades, como no caso dos dímeros de ramnogalacturonanas.

As ramnogalacturonanas são polissacarídeos pécticos estruturalmente complexos presentes na parede celular de plantas em crescimento. Existem

principalmente como dímeros que são ligados por ésteres de borato. Já foram isoladas de paredes celulares de monocotiledôneas. É o único polissacarídeo contendo boro que isolado de fontes biológicas (ISHII e MATSUNAGA, 1996).

Outro aspecto interessante dos complexos é a demanda por boro na produção de materiais industriais, por exemplo, vidros resistentes ao calor, cerâmicas finas e dopante para semicondutores. Por isso, já foram investigados vários tipos de adsorventes para boro. Resinas têm sido utilizadas para remover o boro de efluentes industriais e cinzas de carvão, bem como para a sua determinação em diversos tipos de material biológico ou geológico e, também, para a separação de isótopos de boro por cromatografia de troca iônica. Com a finalidade de desenvolver novos grupamentos funcionais ligantes de boro bem como para entender o mecanismo de interação com resinas já utilizadas para esse fim foram desenvolvidos alguns estudos descritos a seguir.

YOSHIMURA *et al.* (1996), estudaram as resinas Dextran T-40 e géis de Sephadex G com diferentes graus de ligações cruzadas em comparação com metil- α -D-glucopiranosídeo por RMN de ^{11}B e, concluíram que o borato é adsorvido pelos géis de Sephadex, por complexação do borato com unidades glucopiranosídicas da matriz do gel.

YOSHIMURA *et al.* (1998) estudaram a resina Amberlite IRA-743, que tem como grupamento funcional a *N*-metilglucamina e concluíram, através de técnicas de RMN de ^{11}B e medidas de distribuição, que o átomo de nitrogênio do grupamento funcional não é coordenado com o boro. Mas observaram que a capacidade tamponante dos grupamentos amina desempenha um importante papel na alta adsorção do boro em uma ampla faixa de pH das soluções aplicadas na resina.

SHAO *et al.* (2000) estudaram, por RMN de ^{11}B a determinação do coeficiente de distribuição, o comportamento de adsorção do boro aos polissacarídeos trocadores de ânions QAE-Sephadex e QA celulose. Os estudos de RMN de ^{11}B demonstraram que o borato se liga com as unidades glucopiranosídicas dos géis ao invés de se ligar com os grupamentos funcionais trocadores de ânions. A quantidade de adsorção também se mostrou dependente de pH, concentração de boro e presença de eletrólitos.

Com relação às xiloglucanas foi demonstrado que a mucilagem de sementes de tamarindo (uma xiloglucana) na presença de íons borato formava um gel fraco,

mas as soluções tornavam-se viscosas e elásticas (DEUEL e NEUKOM, 1949). Esse efeito já havia sido demonstrado anteriormente por GHOSE e KRISHNA (1946) que relataram que uma solução de xiloglucana tratada com pequenas quantidades de tetraborato de sódio e então agitada resultava em um gel semi-sólido (RAO e SRIVASTAVA, 1973). SAVUR e SREENIVASAN (1948) descreveram o complexo formado como um produto altamente viscoso e gelatinoso, que se assemelhava, nesse aspecto, à goma tragacanto. Mas não está descrito na literatura nenhum estudo que evidencie essa interação por reologia.

1.3.Reologia

A palavra reologia é resultado da soma dos radicais “rhêo” e “logos” e significaria a ciência do escoamento, uma vez que do grego “panta rhei” significa “tudo flui”. Porém, o escoamento somente ocorre quando há deformação, então a expressão acima poderia ser traduzida como “tudo se deforma”. Em 1978, LENK definiu reologia como o ramo da física que trata do mecanismo dos corpos deformáveis. Vários autores definiram a palavra de diversas maneiras diferentes, mas a mais completa e abrangente é a de VINOGRADOV e MALKIN (1980) dizendo que a reologia é a ciência que se preocupa com a descrição das propriedades mecânicas dos vários materiais, sob várias condições de deformação, quando estes exibem a capacidade de escoar e/ou acumular deformações reversíveis (NAVARRO, 1997).

Em alguns casos, a resposta do material à imposição de um esforço externo é a única propriedade confiável para classificá-lo como sendo fluido ou sólido. Mas nem sempre pode-se confiar nisso. LENK (1978) define um fluido como sendo um corpo que se deforma irreversivelmente, como resultado do escoamento. Porém os sólidos plásticos e os metais escoam e sofrem deformações irreversíveis e notadamente não são fluidos. O que distingue um sólido plástico de um fluido é que o último não resiste ao seu próprio peso e seu escoamento é majoritariamente viscoso na temperatura ambiente. Assim, a análise da relação tensão:deformação não basta para classificar reologicamente um material. Em primeiro lugar, deve-se verificar a presença de escoamento, se isso não ocorrer, o material com certeza é um sólido, em segundo lugar deve-se observar se o escoamento é viscoso ou

plástico. E deve-se ressaltar que a recuperação espontânea ou a deformação reversível, que antes só eram relacionadas com sólidos, não podem ser um determinante do caráter reológico dos materiais, uma vez que, também, pode ser apresentada por uma classe especial de fluidos chamados viscoelásticos (NAVARRO, 1997).

Os fluídos viscoelásticos não obedecem nem o modelo dos líquidos Newtonianos, onde o fluxo persiste por todo o tempo em que uma tensão é aplicada, nem o modelo de sólidos de Hooke, onde a tensão de cisalhamento aplicada a uma superfície resulta em uma deformação instantânea que uma vez alcançada, nenhum movimento adicional é observado, mas o estado deformado persiste por tanto tempo quanto a tensão é aplicada (BARNES *et al.*, 1989).

O termo viscoelasticidade é usado para descrever comportamentos que estão entre os extremos clássicos de resposta elástica de Hooke e o comportamento viscoso Newtoniano.

Tendo isso em vista, os conceitos de elasticidade e viscosidade precisam ser qualificados desde que os materiais reais exibem uma ou outra propriedade, ou uma combinação de ambas simultaneamente, como no caso dos sistemas viscoelásticos.

A propriedade dominante e os valores dos parâmetros dependem da tensão aplicada e da duração de aplicação dessa tensão. Se for aplicada uma grande variação de tensão durante um grande intervalo de tempo ou frequência usando um reômetro, é possível observar propriedades de líquidos em sólidos e propriedades de sólidos em líquidos. A escala de tempo em reologia é obtida por meio do “número de Deborah” (D_e) que pode ser obtido pela fórmula seguinte:

$$D_e = \tau / T, \text{ onde : } \tau \text{ é o tempo de relaxação do material}$$

T é o tempo do experimento

O tempo τ é infinito para um sólido elástico de Hooke e zero para um líquido viscoso Newtoniano. Assim números de Deborah altos correspondem a um comportamento sólido e números baixos correspondem a um comportamento líquido. Um material pode parecer sólido por possuir um tempo de relaxação característico muito longo, ou por causa do processo de deformação utilizado no estudo ser muito rápido (BARNES *et al.*, 1989).

Enquanto a reologia de polímeros fundidos é de enorme importância na indústria de plásticos, as soluções de polímeros têm uma aplicabilidade muito mais abrangente. Essas podem ser utilizadas em indústrias alimentícias, farmacêutica, eletrônica e de tintas, entre outras. Por isso a reologia dessas soluções é tão importante quanto a de polímeros fundidos (FERGUSON e KEMBLOWSKI, 1991).

Dentre os polímeros naturais, os polissacarídeos além da capacidade de modificar os meios aquosos por espessar, quelar, emulsificar, estabilizar, encapsular, flocular, expandir e suspender, ou formar géis, filmes e membranas, apresentam características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade e não apresentam toxicidade (LAPASIN e PRICL, 1995).

Os polissacarídeos podem apresentar aplicabilidade nas áreas de alimentos, médica e farmacêutica, indústrias de adesivos, detergentes, implementos agrícolas, cerâmica, cosméticos, ceras, explosivos, têxtil, de tintas e, também, na indústria de petróleo (LAPASIN e PRICL, 1995).

Alguns dos fatores que afetam as propriedades reológicas são comuns para todos os sistemas poliméricos, outros são peculiares aos polímeros de carboidratos.

Se for considerada primeiramente a escala molecular tem-se a cadeia principal do polímero e suas características correlatas como comprimento em solução, formato, rigidez e eventual presença de grupos ionizáveis que desempenham um papel principal na determinação das características reológicas dos sistemas. A maioria dos parâmetros moleculares estão correlacionados entre si, e outros com fatores externos como, por exemplo, as características do solvente. Esse último pode, por sua vez, exercer influência sobre a conformação adotada pela macromolécula no meio, bem como a capacidade de formar estruturas supermoleculares. Em outras palavras, mudanças na força iônica, natureza dos contra-íons, temperatura ou outros parâmetros podem induzir a transição conformacional e modificar a resistência hidrodinâmica da macromolécula ao fluido. Também, se a concentração do polímero for suficientemente alta, as variações descritas anteriormente podem promover mudanças estruturais a nível supermolecular, modificando o comportamento reológico.

Um outro parâmetro importante no controle estrutural e, portanto, nas propriedades reológicas dos sistemas polissacarídicos é a concentração do polímero. Em soluções suficientemente diluídas, as interações polímero-polímero

tornam-se progressivamente menos significantes. Em tais regimes as diferenças reológicas originam-se essencialmente do volume hidrodinâmico das macromoléculas, o qual, por sua vez, está intimamente associado à conformação adotada pelas moléculas em solução (LAPASIN e PRICL, 1995).

Quando uma macromolécula em solução é submetida a um fluxo laminar, a uma velocidade de cisalhamento definida, suas diferentes partes, se movem a diferentes velocidades, dependendo do fato de estarem em áreas de fluxo rápido, ou de fluxo comparativamente lento. Como resultado, a macromolécula está sob a ação de um par de forças, as quais a fazem rodar no fluxo. Os movimentos translacionais e rotacionais das macromoléculas causam fricção entre os seus segmentos e as moléculas do solvente. A manifestação macroscópica desse fenômeno, é um aumento da viscosidade da solução, quando comparada com a do solvente puro. Esse aumento na viscosidade devido à rotação de macromoléculas individuais pode ser estimado pela viscosidade intrínseca (TAGER, 1978), pois uma diluição infinita representa uma ótima condição de referência à qual se deve referir para avaliar a contribuição individual que cada macromolécula sozinha proporciona às propriedades reológicas da solução total (LAPASIN e PRICL, 1995).

Em regimes concentrados, todas as cadeias são circundadas por outras cadeias, se não entrarem em contato umas com as outras; isso implica que todas as possíveis configurações acessíveis a uma cadeia simples na sua flutuação Browniana é reduzida em virtude de restrições topológicas representadas pelas outras moléculas de polímeros. Existem diversos modelos para explicar os fenômenos relacionados com soluções concentradas de polímeros, que podem ser mecânicos ou moleculares, sendo que os modelos mecânicos simples ou complexos não representam completamente o comportamento viscoelástico dos polímeros reais. Mesmo assim serviram de base para o desenvolvimento de determinadas teorias moleculares que se apresentam mais complexas na descrição das respostas viscoelásticas desses materiais (NAVARRO, 1997), como a teoria da reptação proposta por de GENNES (1971) e a da inibição do fenômeno da reptação proposta por LEIBLER *et al.* (1991).

Desde o seu surgimento, a idéia do movimento de reptação, alcançou grande popularidade entre o estudiosos de polímeros (FUJITA, 1990). Esse conceito foi introduzido por de GENNES (1971) que discutiu os movimentos Brownianos de

uma cadeia livre movendo-se através de uma rede fixa (DOI e EDWARDS, 1986). A teoria de de GENNES propõem que as cadeias de polímeros se movimentam de forma isolada, “serpenteando” através de um tubo imaginário inserido em uma matriz formada pelas cadeias ou moléculas vizinhas. Esse modelo pode ser melhor entendido pela observação da Figura 4 e surgiu a partir da necessidade de se levar em consideração os vários constrangimentos impostos ao livre movimento de uma cadeia ou molécula. Imaginando que a matriz citada acima seja representada por pontos fixos que se tornam obstáculos impedindo o movimento de cada cadeia, como mostrado na Figura 4, o modelo da reptação sugere que a cadeia em movimento procura se livrar desses obstáculos produzindo um movimento “serpenteante”. Dessa forma para ir de um ponto até o outro a cadeia gastaria mais tempo do que se o seu deslocamento fosse em linha reta. Em termos gerais a cadeia tem a sua mobilidade diminuída na medida em que aumentam os obstáculos, o que explica o aumento da viscosidade com o aumento da massa molar, sobretudo a partir da massa molar crítica, M_c .

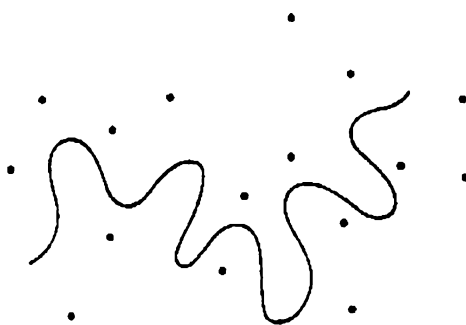


Figura 4 - Cadeia em movimento reptante através de obstáculos fixos (DOI e EDWARDS, 1986).

Devido a complexidade dos cálculos matemáticos associados ao modelo, de GENNES imaginou a cadeia forçada a se mover no interior de um tubo conforme mostrado na Figura 5. Nesse caso o tempo máximo de relaxação da cadeia estaria relacionado ao tempo necessário para que a mesma percorresse o tubo devido a ação de uma tensão externa. Esta tensão seria então totalmente relaxada quando a

cadeia deixasse o tubo. Sendo assim, todo problema associado a essa teoria estaria associado ao cálculo do tempo de difusão da molécula através do tubo.

Através de cálculos matemáticos foi demonstrado que a viscosidade do polímero está associada não ao comprimento da cadeia mas sim com o tubo imaginário, o qual cresce à medida que aumenta o número de obstáculos, ou seja, à medida que a massa molar do polímero aumenta. Isso tudo representa um tempo maior de residência da cadeia no interior do tubo e, conseqüentemente, um tempo maior de relaxação. Desta forma, a viscoelasticidade dos fluídos poliméricos estaria associada intimamente, segundo de GENNES, ao surgimento de obstáculos ao livre movimento das macromoléculas causadas por elas próprias e seus segmentos (NAVARRO, 1997).

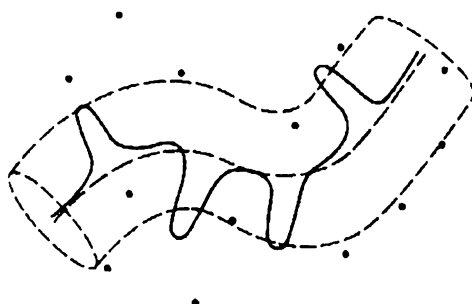


Figura 5 – Movimento de uma cadeia polimérica através de um tubo imaginário, representado pelas linhas pontilhadas (DOI e EDWARDS, 1986).

No modelo de obstrução do fenômeno da reptação introduzido por LEIBLER *et al.* (1991) supõem-se que cada cadeia de polímero contém muitos sítios de associação induzidos por pontes de hidrogênio, complexação com íons ou cristalização. As cadeias são também entrelaçadas umas com as outras e a difusão somente é possível ao longo da cadeia (LEIBLER *et al.*, 1991; WIENTJES *et al.*, 2000).

Esse modelo considera a dinâmica de redes temporárias, as quais têm pontos de junção com energias de ligação relativamente fracas, de tal forma que se

quebram e se refazem frequentemente na escala de tempo dos experimentos. A característica que mais se destaca nessas redes reversíveis é o aumento do seu comportamento viscoelástico, quando comparada com polímeros que não possuem esses sítios de associação. Esse aumento do comportamento viscoelástico é demonstrado em um tempo de relaxamento mais longo (difusão lenta) (LEIBLER *et al.*, 1991).

Em soluções concentradas de polímeros lineares não modificados, o movimento “serpenteante” da cadeia é devido à sua difusão através do tubo, onde ela está contida. Quando ligações cruzadas reversíveis estão presentes, esta difusão é mais lenta, mas ainda continua acontecendo.

A Figura 6 ilustra um passo elementar de difusão da cadeia de um gel reversível, que explica o impedimento do fenômeno da reptação.

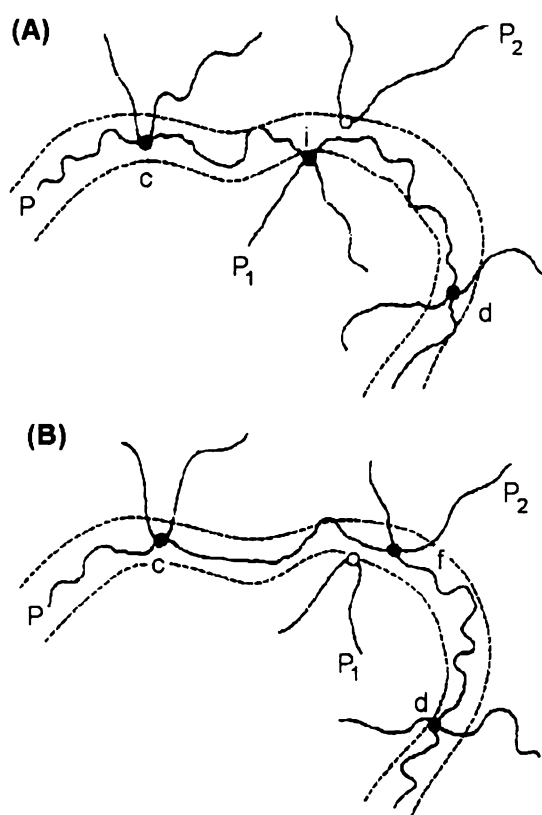


Figura 6 - Representação esquemática de um passo elementar da difusão da cadeia de um polímero. (A) Situação inicial: A cadeia P tem um ponto de ligação i com a cadeia P₁. (B) Situação final: o ponto de ligação i se desfaz e é criado um novo ponto de ligação f com a cadeia P₂. Durante essa troca, o centro de massa da secção cd da cadeia P é deslocado ao acaso (LEIBLER *et al.*, 1991).

O ponto de ligação i que forma uma ligação cruzada entre as cadeias P e P_1 pode mover-se apenas dentro do tubo no qual está confinado. Esse ponto de ligação i não permite a difusão das partes livres da cadeia P entre os pontos de ligação c e d . As secções da cadeia ci e id movem-se, fazendo seus centros de massa flutuarem em torno de posições médias. Quando a ligação cruzada do ponto de ligação i se desfaz, permite com que esse ponto de ligação livre se mova. O segmento cd pode então mover-se até que um de dois eventos ocorra. O ponto de ligação i pode ligar-se novamente com a cadeia P_1 , sendo que nesse caso não ocorre nenhuma movimentação da rede, ou pode se associar com a cadeia P_2 e formar a ligação cruzada f (Figura 6 B). Durante esse passo elementar da ligação cruzada i à ligação cruzada f , os centros de massa da cadeia P deslocam-se para uma nova posição média e isso, corresponde ao movimento do centro de massa da cadeia P , ao longo do tubo no qual está confinada. Uma sequência de tais passos elementares ao acaso resulta em uma difusão “serpenteante” da cadeia P , que seria menos lenta caso não existissem tais pontos de ligação.

Tendo como base os conhecimentos apresentados acima e reconhecendo a importância da caracterização estrutural de polímeros de carboidratos, bem como o entendimento de suas propriedades em solução é proposto o presente trabalho.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Extrair e purificar uma galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá);
- 2.2. Analisar a estrutura fina da galactoxiloglucana por análises de metilação e por técnicas de RMN de ^{13}C e ^1H , mono e bidimensionais;
- 2.3. Obter oligossacarídeos da galactoxiloglucana por digestão com *endocelulase* e separá-los por HPAEC-PAD para verificar a composição e a proporção dos principais oligossacarídeos presentes na macromolécula;
- 2.4. Obter e caracterizar um derivado da galactoxiloglucana, obtido por oxidação específica em C-6;
- 2.5. Analisar as características físico-químicas de soluções de galactoxiloglucana antes e após aquecimento através de medidas de reologia, HPSEC-MALLS e fluorescência;
- 2.6. Obter e analisar por reologia os complexos entre galactoxiloglucana e íons borato, variando as concentrações do íon, o pH do meio, a temperatura das análises e a M_w ;
- 2.7. Analisar o complexo galactoxiloglucana-borato por RMN de ^{11}B em comparação com um modelo de metil β -D-galactopiranosídeo-borato;
- 2.8. Analisar os complexos galactoxiloglucana-borato, no estado sólido, por termogravimetria em comparação com a amostra não complexada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Fonte de polissacarídeo

A galactoxiloglucana (a partir de agora denominada HXGRP) utilizada nesse trabalho, foi obtida a partir dos cotilédones de sementes de *Hymenaea courbaril*, conhecida popularmente no Brasil, como jatobá. As sementes foram coletadas no *campus* da Universidade de São Paulo, de Ribeirão Preto – SP, onde a espécie está catalogada em Herbário (SPFR), sob o número 05312.

3.2. Extração e purificação

As sementes foram quebradas e depois fervidas em água destilada por 15 minutos, em seguida foram descascadas, os seus cotilédones foram moídos e submetidos a extração aquosa exaustiva, à 25°C. Ao extrato aquoso obtido, foi adicionado cloreto de sódio em quantidade suficiente para originar uma solução 0,1 mol/l e dois volumes de etanol comercial. O precipitado, constituído pela HXGRP bruta, foi separado e seco à 25°C.

O polissacarídeo bruto foi solubilizado em água destilada a uma concentração de 20 g/l e a essa solução foi acrescentada solução de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965). O material foi mantido sob refrigeração num período de 5 a 16 horas e, em seguida, o precipitado formado foi recolhido e descomplexado com ácido clorídrico 0,1 mol/l. À solução resultante foram adicionados dois volumes de etanol, o precipitado obtido foi separado e lavado várias vezes com etanol aquoso, até a remoção de todo o ácido, separado e seco à 25°C.

Depois de seco, o material foi novamente solubilizado em água destilada à uma concentração de 5 g/l, centrifugado à 7000 rpm por 45 minutos e filtrado sucessivamente por membranas (MILLIPORE) de éster de celulose com 3,0, 0,8 e 0,22 μm de diâmetro de poro. A solução obtida foi evaporada até um volume reduzido (~ 150 ml), tratada com dois volumes de etanol e seca à 25°C.

3.3. Análises químicas, físico-químicas e espectroscópicas do polissacarídeo

3.3.1. Determinação das quantidades de açúcar total, ácido urônico e proteínas

A quantificação de açúcar total foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), a de ácido urônico pelo de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973), a de proteínas pelo método de HARTREE (1972) e a de umidade pelo método de ZOBEL e STEPHEN (1995). Como padrão, na dosagem de açúcar total, foi utilizada uma solução de glucose:xilose:galactose na proporção de 4:3:1, respectivamente. Nas dosagens de ácido urônico e proteínas foram utilizados padrões de ácido galacturônico e albumina bovina, respectivamente.

3.3.2. Determinação da composição monossacarídica

A obtenção dos alditóis acetato, para a análise por CG, foi realizada da seguinte forma:

O polímero foi submetido à hidrólise ácida total por um dos dois métodos apresentados a seguir:

a) À amostra em pó, foi adicionado ácido sulfúrico 72% (m/v), em banho de gelo, por 1 h. Decorrido esse tempo o ácido foi diluído para 8% (m/v) e o sistema mantido à 100°C por mais 4 h (hidrólise de SAEMAN, SAEMAN *et al.*, 1954). Após a hidrólise, o material foi neutralizado com carbonato de bário e filtrado.

b) Ao material solubilizado em água foi adicionado ácido trifluoracético (TFA) em uma quantidade tal que a solução final resultasse em 2 mol/l. Esse sistema foi mantido à 96°C, por 8 horas. Em seguida o TFA foi evaporado e a amostra lavada várias vezes com água destilada até a eliminação do ácido (ADAMS, 1965).

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram reduzidos com borohidreto de sódio à 25°C por 16 h. A reação foi neutralizada com resina de troca iônica (forma H⁺) e, em seguida, o material foi filtrado, evaporado até a secura, lavado várias vezes com metanol e evaporado novamente. O produto reduzido foi acetilado com uma mistura de piridina:anidrido acético 1:1 (v/v) à temperatura ambiente, por 16 h. A reação foi interrompida pela adição de gelo, os alditóis acetato

foram extraídos com clorofórmio e lavados várias vezes com sulfato de cobre a 5% (SAWADEKER *et al.*, 1965).

A cromatografia gasosa (CG) foi realizada em um cromatógrafo HEWLETT PACKARD, modelo 5890 A, série II, utilizando uma coluna DB-225 J & B Scientific (0,25 mm d.i. x 30 m) utilizando nitrogênio como gás de arraste e um detector de ionização em chama. As temperaturas do detector, injetor e coluna foram 300, 250 e 220°C, respectivamente.

3.3.3. Análise de metilação

A primeira fase da metilação foi realizada pelo método de CIUCANU e KERREK (1984), onde 50 mg da amostra seca, foram solubilizados em 2 ml de dimetilsulfóxido. Após a solubilização foram acrescentados 100 mg de hidróxido de sódio seco e o sistema foi mantido sob agitação constante por 30 minutos. Após foi adicionado 0,5 ml de iodeto de metila, e o meio reacional foi agitado por mais 30 minutos. A adição de base e reagente alquilante foi repetida por mais duas vezes. O material foi, então, dialisado e liofilizado, e esse processo foi repetido por mais duas vezes. Em uma segunda fase o material resultante da primeira derivatização foi submetido à mais dois ciclos de metilação, agora segundo KUHN *et al.* (1955). Nesse processo o polissacarídeo parcialmente metilado foi solubilizado em dimetilformamida e, então, foram acrescentados 1 g de óxido de prata e 2 ml de iodeto de metila. O material permaneceu envolto em papel alumínio e foram acrescentados 1 g de óxido de prata por três dias seguidos. O processo foi finalizado, fazendo-se a extração do produto metilado com dicloro metano.

Os derivados metilados foram hidrolisados empregando o método de SAEMAN, conforme descrito no item 3.3.2, reduzidos com boroidreto de sódio deuterado, acetilados e analisados por CG-EM.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) foi realizada em um cromatógrafo VARIAN modelo 3300 acoplado à um espectrômetro de massa FINNIGAN Ion-Trap (modelo 810 R-12) utilizando uma coluna capilar DB-225 (30 m x 0,25 mm d.i.) mantida a 50°C durante a injeção da amostra e então programada para aquecimento até 220°C a uma taxa constante de 40°C/min, tendo hélio como gás de arraste.

3.3.4. Análises de Ressonância Nuclear Magnética (RMN) de ^{13}C e ^1H , mono- e bidimensionais e de ^{11}B

Foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, em equipamento da marca BRUKER, modelo DRX 400, série AVANCE, com frequência do ^1H em 400 MHz, do ^{13}C em 100,62 MHz e do ^{11}B em 128, 37 MHz. As análises da HXGRP, por RMN de ^{13}C e ^1H , foram realizadas a uma temperatura de 70°C, utilizando D_2O como solvente e acetona como padrão interno tanto para as análises de RMN de ^{13}C (δ 30,2) como para ^1H (δ 2,224). As análises de RMN de ^{11}B foram realizadas em solução de ácido bórico (0,02 mol/l) em D_2O , a uma temperatura de 30°C, utilizando ácido bórico 0,1 mol/l como padrão externo (δ 0,0).

As análises da HXGRP oxidada foram realizadas no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI) da Universidade Federal do Ceará (UFC), em equipamento da marca Bruker, modelo DRX 500, série AVANCE, com frequência de ^1H em 500,13 MHz e de ^{13}C em 125,77 MHz, em D_2O , 30°C.

3.3.5. Análises de HPSEC-MALLS

O dn/dc das amostras foi realizado utilizando um refratômetro diferencial WATERS, modelo 2410, em um comprimento de onda de 546 nm, com pelo menos 5 concentrações entre 1 e 0,1 mg/ml (filtradas por membranas de MILLIPORE de 0,45 μm). A relação entre o índice de refração e a concentração fornece a constante dn/dc que é utilizada no cálculo da massa molar.

As amostras foram solubilizadas em uma solução aquosa de nitrito de sódio 0,1 mol/l contendo 0,2 g/l de azida de sódio, filtradas por membranas Millipore de 0,22 μm e injetadas em um CGP com colunas de ultrahidrogel (2000/500/250/120), alimentadas por uma bomba Waters 515. A detecção foi realizada com o mesmo refratômetro descrito acima e com um detector a laser multiângulos, modelo DAWN DSP, Wyatt Technology. A fonte laser permite a medida de massa molar utilizando 18 ângulos que variam de 26 a 163 graus.

Para obter a razão característica (C_∞) e o comprimento de persistência (L_p) foi utilizado um método usando raio de giro (R_g) e massa molar (M_w) na equação 1 de acordo com ROGER *et al.* (2000):

$$C_\infty = \lim_{(n \rightarrow \infty)} L/n_w l^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

- L é a raiz quadrada da distância ponta à ponta
- l é o comprimento dos bastões
- $n_w = M_w/m_0$ = grau de polimerização = massa molar do polímero (M_w) em razão da massa molar da unidade (m_0)

Para uma molécula com enovelamento molecular ao acaso o valor de L é proporcional à:

$$L = 6R_g^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

A razão característica pode ser obtida usando a seguinte equação:

$$C_\infty = 6R_g^2/n_w l^2 = 6R_g^2 m_0/M_w l^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

Os autores acima propõem uma metodologia para obter graficamente o valor da C_∞ usando a relação:

$$R_g^2/M_w = C_\infty l^2 / 6 m_0 (1+c'M_w^{1/2}) \quad (\text{Eq. 4})$$

A regressão linear da variação de R_g^2/M_w em função de $M_w^{1/2}$ resulta no coeficiente linear $C_\infty l^2/m_0$. Utilizando um comprimento monomérico de 0,52 nm e uma massa molar da unidade de 360 (GIDLEY *et al.*, 1991) foi possível determinar o valor de C_∞ . Outra forma de se obter o valor de C_∞ é utilizando o gráfico de Stockmayer-Fixman. Os dados obtidos dessa maneira apresentaram boa correlação com o gráfico de Roger (FREITAS *et al.*, 2003b).

Com o valor da razão característica é possível obter o valor do comprimento de persistência, pela seguinte relação matemática:

$$C_\infty = 2(L_p/l) - 1 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde:

- l = comprimento dos bastões
- L_p = comprimento de persistência

3.3.6. Determinação da rotação óptica específica

Foi determinada com uma solução da HXGRP purificada na concentração de 1 mg/ml em aparelho AUTOPOL III, marca Rudolf Research, à 25°C.

A rotação óptica específica foi calculada através da seguinte equação (SNYDER *et al.*, 1962):

$$[\alpha]_{25}^D = \alpha / L.c \quad (\text{Eq. 6}),$$

Onde:

- α é o ângulo da rotação polarizada, expresso em graus;
- L é o caminho óptico, em dm;
- c é a concentração da solução em g%.

3.3.7. Obtenção de oligossacarídeos da HXGRP por hidrólise enzimática e separação por HPAEC-PAD

Amostras de HXGRP foram hidrolisadas, no laboratório do Prof. Marcos S. Buckeridge (Instituto de Botânica – SP), com celulase de *Trichoderma viride*, proveniente da MEGAZYME (Austrália), por 32 horas, 30°C, em tampão acetato pH 5,0. Os produtos da hidrólise enzimática foram analisados por um sistema trocador de íons Dionex DX 500, usando uma coluna Carbopack e detector amperométrico de pulso. O eluente utilizado foi hidróxido de sódio 88 mmol/l com um gradiente de acetato de sódio 0,5 mol/l variando de 7 a 15%.

3.3.8. Análise de fluorescência

As amostras foram preparadas pela adição de 10 µl de uma solução de pireno na concentração de $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l a 5 ml de soluções aquosas de HXGRP, na concentração de 10 mg/ml, sendo uma não aquecida e a outra aquecida a 85°C por 2 h e resfriada à temperatura ambiente. As leituras do espectro de fluorescência do pireno foram feitas imediatamente após a sua adição às soluções de polissacarídeo em um espectrofotômetro de fluorescência HITACHI modelo f-4500, do Departamento de Química da UFPR. O comprimento de onda utilizado para a excitação do pireno foi 310 nm e as intensidades relativas das bandas de

fluorescência foram determinadas de um espectro de emissão (360-460 nm), com uma fenda de 5 nm.

3.4. Oxidação específica em O-6

Uma amostra de 1 g do biopolímero foi solubilizada em 2 l de água destilada e resfriado a 4°C. O pH da solução foi corrigido para 8,0 com 0,1 mol/l de hidróxido de sódio e, em seguida, foram adicionados 100 mg de brometo de sódio, 40 mg de TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi) e 6 ml de hipoclorito de sódio. O pH foi ajustado para aproximadamente 9,3 e, foi mantido nesse valor pela adição de hidróxido de sódio 0,05 mol/l. Após 5 horas e 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de uma pequena quantidade de borohidreto de sódio, onde a redução se processou em aproximadamente 10 horas. Após, a solução (2 l) foi neutralizada com algumas gotas de ácido acético 0,1 mol/l, e o produto da oxidação foi precipitado com dois volumes de etanol (4 l), centrifugado e seco à temperatura ambiente (de NOOY *et al.*, 1996; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000).

3.5. Preparo das amostras para reologia

3.5.1. Preparo da amostras para análise de viscosidade intrínseca

Para as análises de viscosidade intrínseca, as amostras de HXGRP foram solubilizadas em cloreto de potássio 0,1 mol/l ou água destilada, na concentração de 2 mg/ml (solução mãe), sob agitação magnética por duas horas e a seguir diluídas, com o mesmo solvente da solução mãe, para concentrações menores.

3.5.2. Preparo das amostras em solução aquosa e dos complexos HXGRP-B

Para as outras medidas reológicas as amostras foram solubilizadas em água ou solução de tetraborato de sódio, por 16 h, sob agitação magnética. A preparação dos complexos HXGRP-borato (HXGRP-B) se dá pela simples solubilização da HXGRP em soluções de tetraborato de sódio na concentração e pH desejados, em agitador magnético, sob velocidade constante. As concentrações de galactoxiloglucana foram de 20 mg/ml para as análises com variação da concentração de tetraborato de sódio ou pH, e 40 ou 30 mg/ml para as análises com

variação de temperatura e tempo. Essas últimas concentrações foram escolhidas, por causa de limitações do equipamento que só possui um sistema de geometria para amostras de alta viscosidade.

Nas análises envolvendo variação na concentração de tetraborato, foram utilizadas soluções nas concentrações de 3, 5, 7 e 10 mg/ml do sal sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ - MERCK). Para as análises com variação de pH, foi utilizada uma concentração fixa de sal de 3 mg/ml com 0,33 mg/ml de boroidreto de sódio. O pH foi medido com um pHmetro (QUIMIS), antes e após a solubilização e ajustado com gotas de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 0,5, 1 e 3 mol/l.

Para as análises com variação de tempo e temperatura, a concentração de tetraborato de sódio utilizada foi de 3 mg/ml de solução.

3.6. Análises reológicas

Algumas medidas reológicas no modo não oscilatório foram realizadas em um reômetro BROOKFIELD, modelo LVDV-III, acoplado a um banho circulante BROOKFIELD TC-500 a 25°C. As geometrias utilizadas foram do tipo cone placa (CP-40, CP-51 ou CP-52).

Análises reológicas, no modo oscilatório ou não, foram realizadas em um reômetro HAAKE, RS 75, com geometrias de cone placa C 60/2° ou cone coaxial DG 41, e a temperatura foi controlada por um banho circulante HAAKE DC-5 ou um sistema de aquecimento HAAKE Peltier TC-80. A velocidade de aquecimento para as soluções aquosas de HXGRP foram de 1°C/min e para as de HXGRP-B foi de 1°C/min durante o processo de aquecimento, e 0,5°C/min durante o processo de resfriamento no intervalo de temperatura de 85-50°C e 1°C/min no intervalo de 50 a 5°C. Nas análises com variação de temperatura e de tempo, foi utilizada uma frequência fixa de 1 Hz.

Para algumas análises oscilatórias com variação de temperatura (taxas de aquecimento de 5,0, 2,5, 1,0 e 0,5°C/min), bem como para os experimentos das análises de Cox-Merz [$\eta(\gamma) \sim |\eta^*|(\omega = \gamma)$], onde η = viscosidade absoluta, γ = taxa de cisalhamento, $|\eta^*|$ = módulo da viscosidade dinâmica, ω = frequência (rad/s)] (BARNES *et al.*, 1989) foi utilizado um reômetro TA Instruments AR 2000 (empréstimo da DP Union – SP), com a temperatura controlada por um sistema

PELTIER, utilizando dois tipos de geometrias (placa paralela ETC de 25 mm e placa paralela de 20 mm ranhurada).

3.7. Análises termogravimétricas

Para as análises termogravimétricas foram utilizadas amostras liofilizadas da HXGRP nativa ou complexada com tetraborato de sódio (3 mg/ml).

Os experimentos foram realizados em um equipamento de análise termogravimétrica SHIMADZU 50 H (TGA), do DQOI, UFC. A massa das amostras foi padronizada como sendo $9,9 \pm 0,1$ mg. Todos os experimentos foram realizados em atmosfera de nitrogênio a um fluxo constante de 50 ml/min. Os experimentos foram conduzidos em quatro taxas de aquecimento 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0° C/min partindo da temperatura ambiente até 800°C. O suporte das amostras utilizado na análise foi um cadinho de platina.

A amostra foi mantida a 105°C por 3 h antes dos experimentos, e a perda total de água foi normalizada para 100% de massa a 200°C, devido a umidade residual presente na amostra.

3.7.1. Análise cinética da degradação térmica

A dependência da constante de velocidade com a temperatura pode ser obtida pela equação de Arrhenius (OZAWA, 1965). Para determinar a energia de ativação (E_a), o log das taxas de aquecimento (k) foi plotado como função do recíproco da temperatura absoluta para diferentes perdas de massa ($\alpha\%$ = 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60). A inclinação da reta fornece $-E_a/R$, onde R é a constante universal dos gases. A interseção da linha com a ordenada fornece o fator pré-exponencial (A), na equação de Arrhenius.

$$\ln K = \ln A - E_a/RT \quad (\text{Eq. 7})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração, purificação e análise da composição química e monossacarídica da HXGRP

A galactoxiloglucana utilizada no presente trabalho foi obtida, dos cotilédones de sementes de *H. courbaril*, coletadas em Ribeirão Preto, SP, através de extração aquosa exaustiva, como descrito em trabalhos anteriores (LIMA, 1993; SOUZA-LIMA, 1996; FREITAS, 2000), apresentando rendimento de 45% que é considerado bom para polissacarídeos obtidos de sementes.

A purificação para remoção de proteínas livres e outros polissacarídeos foi realizada com a adição do reativo de Fehling (JONES e STOODLEY, 1965) e precipitação do polissacarídeo, seguido de descomplexação, centrifugação e filtração por membranas de éster de celulose com poros de 3,0, 0,8, e 0,22 μm . Após a filtração os polissacarídeos foram precipitados e secos a 25°C.

Pela análise do índice de refração da amostra em diferentes concentrações foi obtido um dn/dc de 0,15. A análise de HPSEC-MALLS mostra que o processo de purificação foi eficiente, como pode ser observado pelo perfil homogêneo apresentado na Figura 7.

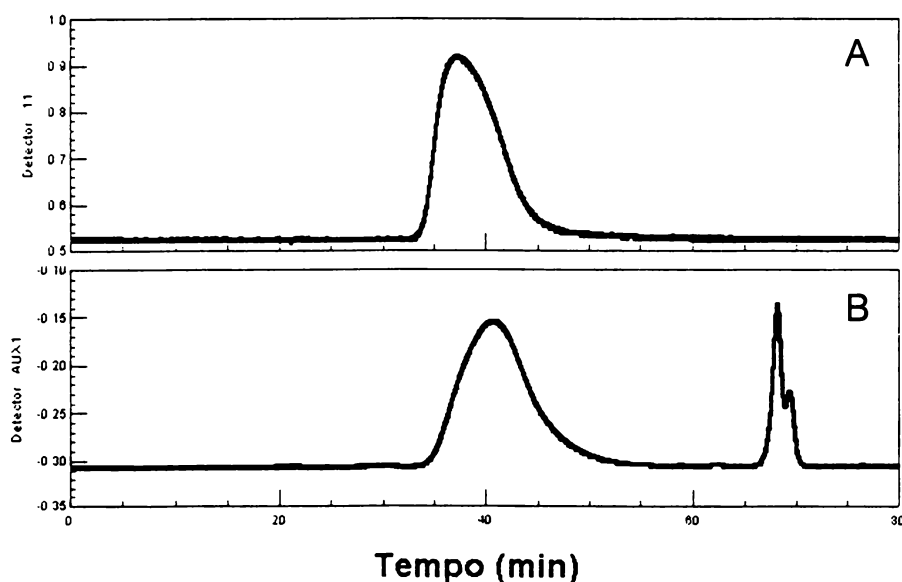


Figura 7 - Perfil de HPSEC-MALLS para a galactoxiloglucana de sementes de *H. courbaril* purificada, (A) detector de espalhamento de luz e (B) detector de índice de refração.

A massa molar obtida foi $5,4 \cdot 10^5$ g/mol com uma polidispersão de 1,5. Os dois picos que aparecem entre os tempos de 65 e 75 minutos, no perfil obtido através do detector de índice de refração, correspondem à saída do solvente e algum sal presente na amostra (provavelmente cloreto de sódio), respectivamente.

O rendimento e a composição monossacarídica após cada etapa de filtração, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise de rendimento e relação molar de carboidratos* para a HXGRP após filtração em membranas.

Tamanho do Poro	Rendimento (%)	Relação Glc:Xyl:Gal
3 μm	70,3	4,1:3,0:1,0
0,8 μm	49,4	4,4:3,3:1,0
0,22 μm	33,0	4,3:3,3:1,0

*Após hidrólise ácida, redução, acetilação e análise por CG-EM.

Os resultados de relação molar Glc:Xyl:Gal apresentados na Tabela 2 estão coerentes com a quantificação realizada por RMN de ^1H , onde essa relação, obtida pelo cálculo das áreas de H-1 de Glc, Xyl e Gal resultaram nos valores de 3,8:3,2:1,0 respectivamente.

Observando-se que não há uma diferença significativa na composição monossacarídica e que os valores dos rendimentos obtidos diminuem significativamente após cada etapa da filtração, estabeleceu-se que o biopolímero seria filtrado apenas pela membrana de 3,0 μm para as análises reológicas, e que a filtração prosseguiria até 0,22 μm apenas para as análises de viscosidade intrínseca, HPSEC-MALLS e RMN que requerem amostras mais puras e em pequenas quantidades.

As análises de açúcar total, proteínas e umidade estão apresentadas na Tabela 3, e sustentam a informação que o biopolímero pode ser classificado como uma proteoglicana.

Tabela 3 - Quantificação de açúcar total, proteínas e umidade para a HXGRP.

Tamanho do Poro	Açúcar total ^a	Proteínas ^b	Umidade ^c
	(%)		
3,0 µm	80,4	4,6	15,0
0,22 µm	81,6	3,6	12,0

a-Dubois et al., 1956; b-Hartree, 1972; c-Zobel e Stephen, 1995

4.2. Determinação da proporção entre os oligossacarídeos obtidos a partir da digestão da HXGRP com celulase

A HXGRP foi digerida com uma enzima do tipo celulase e o “pool” de oligossacarídeos obtidos foi analisado por HPAEC-PAD, fornecendo um perfil de eluição (Figura 8) que, quando comparado com perfis de eluição de oligossacarídeos padrões e tendo seus picos quantificados, fornece a proporção dos grupos de oligossacarídeos que constituem a galactoxiloglucana de sementes de *H. courbaril*.

Na Figura 8, pode-se observar que o pico maior corresponde ao oligossacarídeo XLG, seguido de uma mistura de XLLG e XXXXG e da presença de XXXLG, demonstrando que o polímero é constituído principalmente por esses grupos. Ainda são encontrados os oligos XXG, XXXG, XLXXG e XXLXG, embora em pequenas proporções.

A porcentagem de cada tipo de oligossacarídeo está apresentada na Tabela 4.

A porcentagem de XLLG que é eluída no mesmo tempo de retenção que XXXXG foi deduzida a partir da porcentagem de galactose obtida após hidrólise ácida total, redução e acetilação do polissacarídeo, sendo de 2% para o primeiro e 23% para o segundo oligossacarídeo. Assim, a série contendo o nonassacarídeo corresponde a 23% e a de decassacarídeo 22%, demonstrando que a nova série de oligossacarídeos está presente em 45% da molécula de HXGRP.

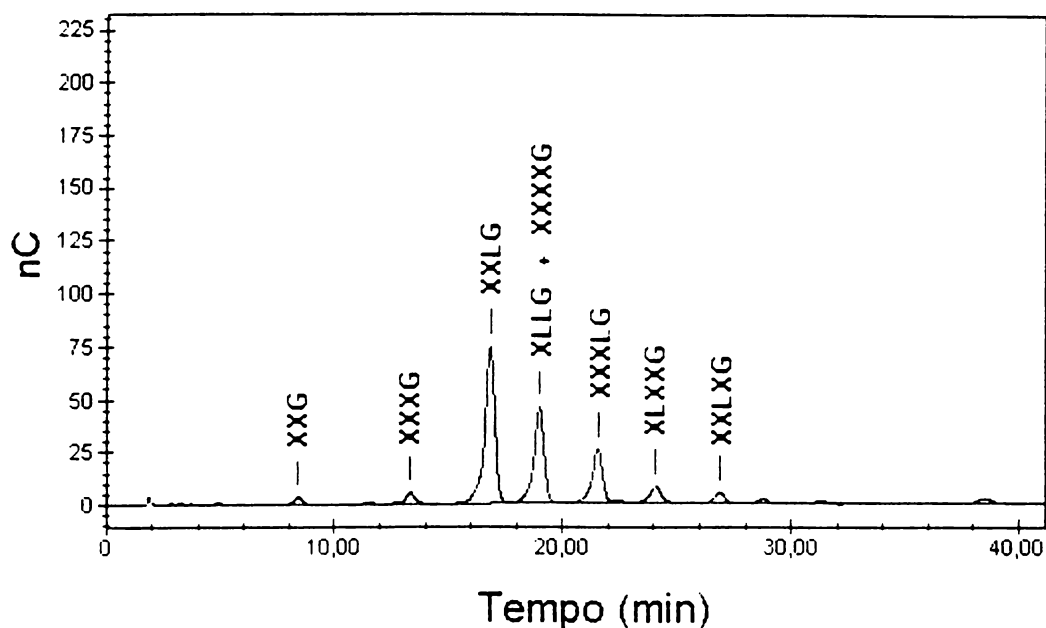


Figura 8 - Perfil de eluição por HPAEC-PAD, da galactoxiloglucana de *H. courbaril*, tratada com *endocelulase*.

Tabela 4 - Proporção relativa entre os diferentes tipos de oligossacarídeos obtidos* a partir da galactoxiloglucana de sementes de *H. courbaril*.

Oligossacarídeo	Porcentagem (mol%)
XXG	3
XXXG	3
XXLG	47
XLLG + XXXXG	25
XXXLG	14
XLXXG	5
XXLXG	3

* por HPAEC-PAD após tratamento com *endocelulase*, tampão acetato pH = 5,0, T = 30°C.

O oligossacarídeo XXXXG foi obtido por BUCKERIDGE *et al.* (1997), no polissacarídeo de sementes de *H. courbaril* colhidas no Jardim Botânico – SP. TINÉ (2002) identificou três diferentes oligossacarídeos da série XXXXG substituídos por unidades de galactose em diferentes posições e denominados de XXXLG, XLXXG e

XXLXG, segundo a nomenclatura de FRY *et al.*, 1993. Esses resultados confirmam que a *H. courbaril* sintetiza uma xiloglucana de armazenamento com características estruturais únicas, com uma cadeia principal composta de oligossacarídeos com três (3%), quatro (52%) e cinco (45%) unidades de glucose, enquanto 29% das ramificações não apresentam unidades de galactose.

Foi demonstrado por LIMA e BUCKERIDGE (2001) que o modo de distribuição das unidades de galactose na molécula de xiloglucana afeta a sua interação com a celulose. Como a proporção entre os diferentes oligossacarídeos obtidos a partir do polissacarídeo de sementes de *H. courbaril* varia conforme a região de coleta das sementes (FREITAS *et al.*, 2003b), o padrão de distribuição, bem como a quantidade de um determinado tipo de oligossacarídeo poderia influenciar as propriedades subsequentes do polímero.

4.3. Análise estrutural da HXGRP por metilação e espectroscopia de ressonância magnética nuclear

4.3.1. Análise de metilação

A obtenção do derivado metilado foi difícil uma vez que a amostra precisou ser metilada várias vezes utilizando metodologias diferentes, para que se obtivesse um derivado adequado para análise. A metanólise seguida de hidrólise com ácido sulfúrico 0,5 mol/l, por 18 horas, à 100°C, comumente utilizada na hidrólise para posterior obtenção dos alditóis acetato parcialmente metilados, também se mostrou inadequada, pois quando analisada, a amostra não apresentava alditóis acetato metilados ou não metilados, sugerindo que o tempo de hidrólise estava causando degradação da amostra. Para obtenção dos derivados apresentados a seguir, foi utilizada a hidrólise de SAEMAN (H₂SO₄ 72% (m/v), 0°C, 1 h, seguida de diluição do ácido sulfúrico para 8%, 96°C, 4 horas). Provavelmente devido à hidrólise incompleta, esta análise de metilação não se mostrou quantitativa, sugerindo a necessidade de avaliar o tempo ideal para que ocorra a hidrólise sem degradação da amostra. Os monossacarídeos resultantes da hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio deuterado, o que permite a diferenciação entre 2,3-Me₂-pentitol e 3,4-Me₂-pentitol através dos tipos de fragmentos formados após análise por CG-EM. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5, onde pode ser observada uma mistura dos derivados 3,4- e 2,3-Me₂-Xyl cuja fragmentação está apresentada

na Figura 9. Esses sinais, bem como a proporção entre eles estão de acordo com os dados obtidos para uma mistura dos dois pentitóis apresentada por CARPITA e SHEA (1989). O derivado 2,3,4,6-Me₄-Glc provavelmente não foi encontrado por estar presente em pequena quantidade na amostra.

Tabela 5 - Derivados metilados reduzidos com boroidreto de sódio deuterado, obtidos para a HXGRP e seus principais fragmentos de massa (JANSSON *et al.*, 1976; CARPITA e SHEA, 1989).

Derivado Metilado	Fragmentos Principais, m/z
2,3,4-Me ₃ -Xyl	88, 101, 102, 117, 118, 161, 162
Mistura de 3,4 e 2,3-Me ₂ -Xyl	87,88,101,102,117,118,129,130,189,190
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	87,102,113,118,129,145,161,205
2,3,4-Me ₃ -Glc	87, 102, 118,129,162,189
2,3,6-Me ₃ -Glc	87,102,113,118,129,162
2,3-Me ₂ -Glc	85,102,118,127,162,201

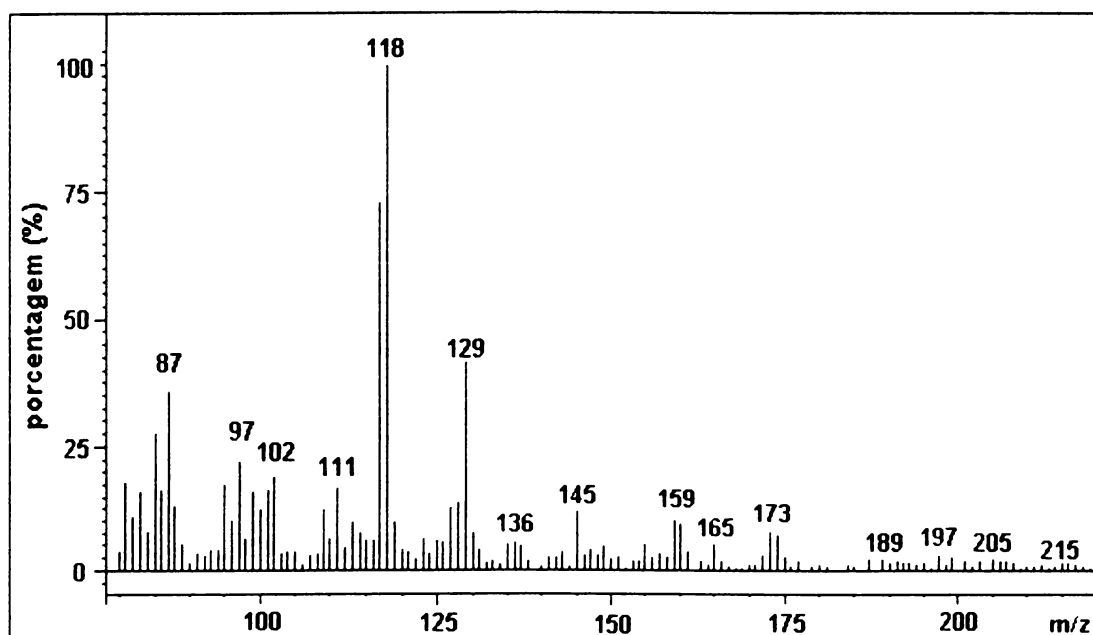


Figura 9 - Fragmentos de massa da mistura de acetato de 3,4 e 2,3-Me₂-xilitol.

Na Figura 10 está apresentado um esquema com os padrões de fragmentação dos derivados metilados 3,4- e 2,3-Me₂-pentitol. Em uma análise da figura pode-se observar que os fragmentos formados pelo primeiro derivado são 88, 101, 117, 130, 190 e, para o segundo, 87, 102, 118, 129 e 189.

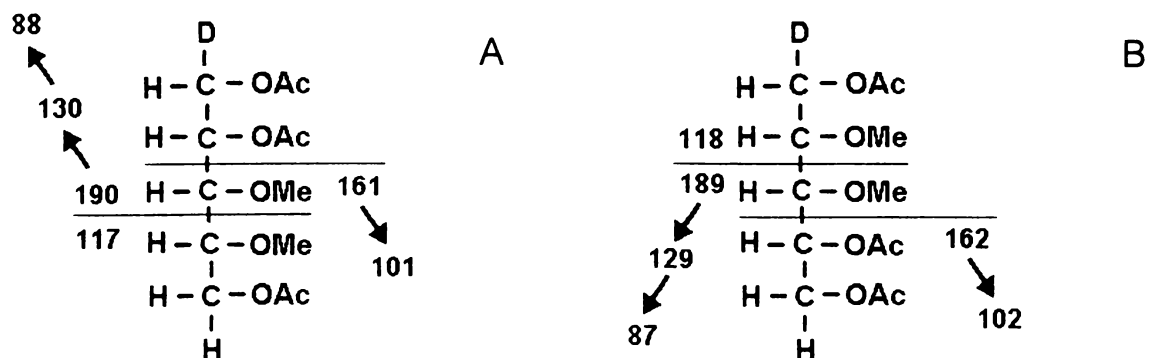


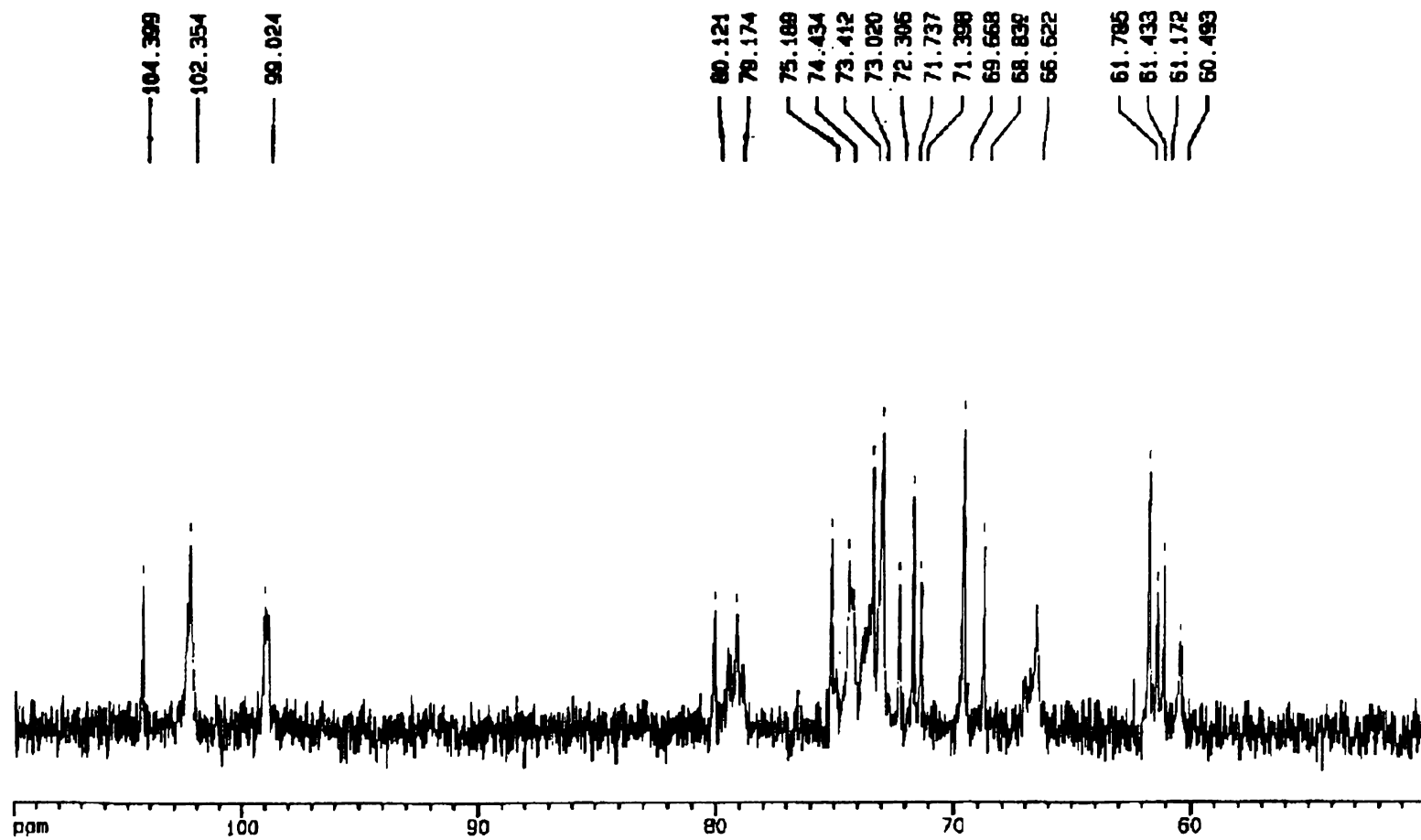
Figura 10 - Padrão de fragmentação dos derivados metilados 3,4- (A) e 2,3-Me₂-pentitol (B) (Adaptado de CARPITA e SHEA, 1989).

Esses resultados sugerem que além das unidades de xilose substituídas na posição 2 por unidades de galactose, existem algumas substituídas na posição 4 por unidades de galactose, fato não apresentado na literatura. A obtenção de oligossacarídeos, onde fosse possível fazer todos os assinalamentos de ¹H e ¹³C inclusive interunidades monossacarídicas, por análises de ressonância magnética nuclear bidimensionais, seria a melhor ferramenta para confirmar esse dado em estudos futuros.

4.3.2. Análise de ressonância magnética nuclear mono e bidimensional:

Na Figura 11, pode-se observar o espectro de RMN de ¹³C da HXGRP. Na região dos carbonos anoméricos é possível observar os sinais em δ 104,4, 102,3, 102,6, 99,02 e 98,84, sendo que o primeiro corresponde ao C-1 das unidades de β -D-galactose, os dois seguintes ao C-1 das unidades de β -D-glucose e os dois últimos ao C-1 de unidades de α -D-xilose.

Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C , em D_2O , 70°C , da HXGRP, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.



Na Figura 12 está representado o espectro de DEPT-135 da HXGRP. Esse experimento proporciona uma inversão dos sinais de CH₂ em relação à linha de base do espectro permitindo a identificação do C-6 das unidades de β -D-Galp e β -D-Glcp, bem como do C-5 das unidades de α -D-Xylp. Foram identificados os sinais de δ 66,92 e 66,41 pertencentes ao C-6 de unidades de β -D-Glcp, δ 61,66 e 61,63 pertencentes ao C-5 das unidades de α -D-Xylp, δ 60,36 que pertence às unidades de β -D-Galp e também o sinal de δ 61,14 que não foi identificado.

Todos esses assinalamentos foram feitos com base nos dados obtidos por YORK *et al.* (1993) para o oligossacarídeo XXLG, uma vez que é esse o oligossacarídeo presente em maior quantidade na HXGRP em estudo.

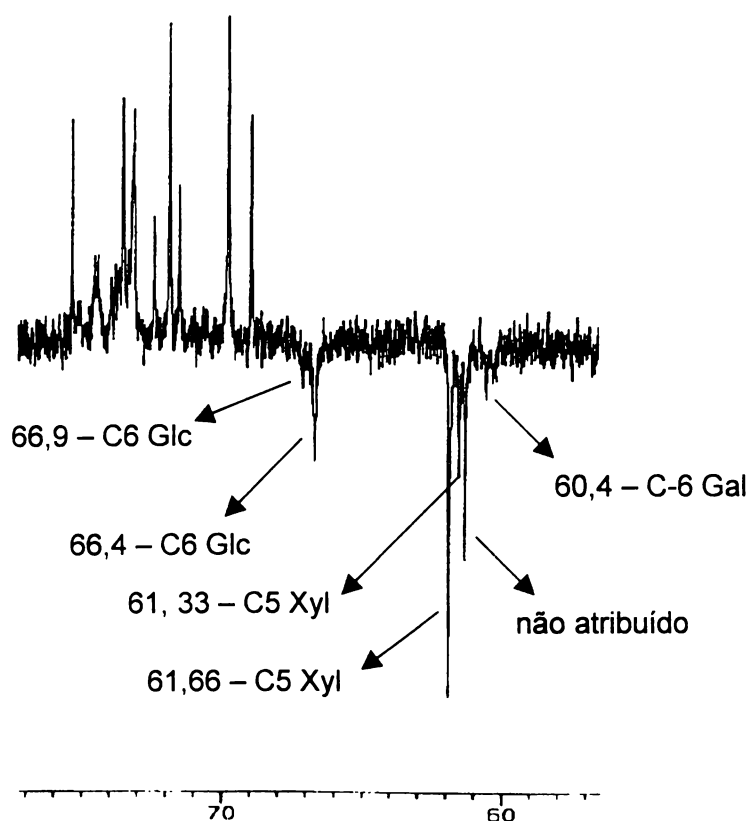


Figura 12 - Espectro de DEPT-135 da HXGRP em D₂O, 70° C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

Para assinalar todos os sinais de ^1H e ^{13}C presentes nas unidades monossacarídicas constituintes do polímero, são necessários experimentos de correlação ^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C , geralmente realizados com oligossacarídeos obtidos por degradação química ou enzimática do polissacarídeo em estudo, devido à complexidade dessas moléculas.

RAMESH *et al.* (2001) obtiveram todos os assinalamentos dos sinais de ^1H e ^{13}C para a galactomanana de *Trigonella foenum-graecum* em sua forma intacta, ou seja, sem fragmentação química ou enzimática, diminuindo custos e aumentando a rapidez do processo de análise estrutural, uma vez que para a obtenção de oligossacarídeos, muitas vezes, são necessárias enzimas puras e para sua separação, equipamentos de alto custo.

Com o objetivo de verificar se seria possível obter os assinalamentos de ^1H e ^{13}C das unidades monossacarídicas de HXGRP foram realizados os experimentos de HMQC, COSY e TOCSY.

Correlacionando-se os C-1 já assinalados no espectro de RMN de ^{13}C com os seus respectivos prótons na região anomérica do espectro de HMQC (Figura 13) foi possível obter os assinalamentos H-1/C-1 das unidades de β -D-Galp, β -D-Glcp e α -D-Xylp, pois esse espectro permite observar o acoplamento entre um próton e seu carbono diretamente ligado (JONES, 1994).

Os valores encontrados foram δ 104,43/4,579, 102,28/4,567, 98,96/4,950 e 98,79/5,139 sendo os dois primeiros correspondentes às unidades de β -D-Galp e β -D-Glcp, respectivamente e os dois últimos para as unidades de α -D-Xylp.

Comparando-se os dados obtidos para a α -D-Xylp com os dados obtidos por YORK *et al.* (1993) pode-se atribuir os assinalamentos δ 98,79/5,139 para as unidades de α -D-Xylp substituídas por unidades de β -D-Galp e os assinalamentos δ 98,96/4,950 para as unidades de α -D-Xylp não substituídas.

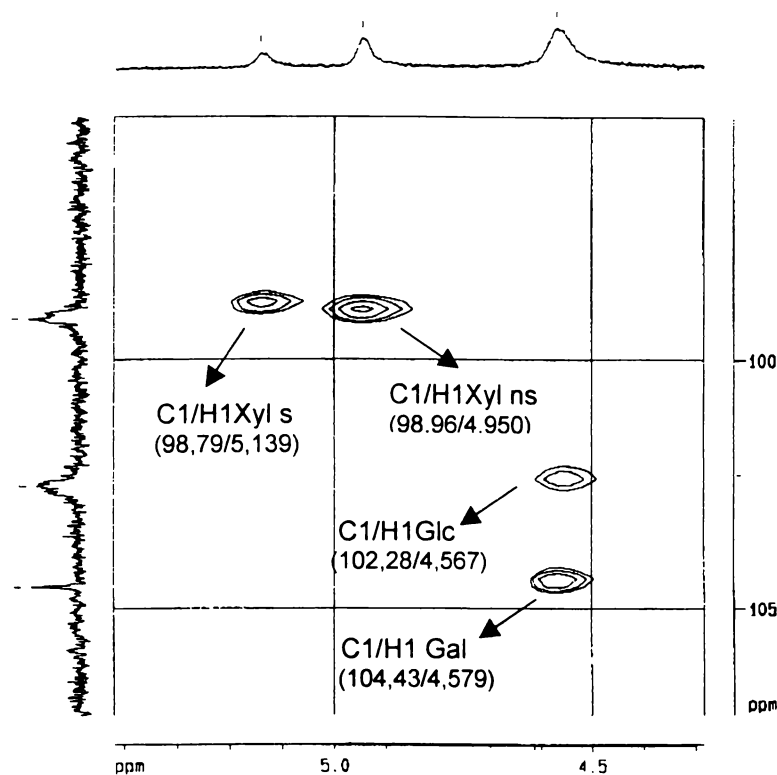


Figura 13 - Espectro de HMQC da região anomérica da HXGRP em D₂O, 70° C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

É interessante salientar que, para os oligossacarídeos da xiloglucana estudada por YORK *et al.* (1993), foi possível determinar quatro assinalamentos diferentes para as unidades de glucose, sendo uma reduzida e três para unidades de xilose, enquanto que para a HXGRP foram observados apenas um sinal para glucose, e para a xilose foi possível somente diferenciar a substituída da não substituída.

Seguindo o mesmo raciocínio utilizado para os assinalamentos de prótons anoméricos pode-se fazer os assinalamentos de H-6 das unidades de β-D-galp e β-D-Glcp e C-5 de α-D-Xylp, conforme a Figura 14.

β-D-Glcp substituída por xilose, δ 66,92/3,958

β-D-Glcp substituída por xilose e galactose, δ 66,41/3,959

α-D-Xylp, δ 61,63/3,570

α -D-Xylp, δ 61,66/3,739

β -D-Galp, δ 60,40/3,792

O sinal em δ 61,14 que se correlaciona com o próton no deslocamento de δ 3,791, muito próximo ao H-6 das unidades de galactose, não encontrou correspondência com nenhum sinal de C-6 ou C-5 na tabela de YORK *et al.* (1993).

Nesse caso foi possível diferenciar as unidades de glucose ligadas somente à xilose das unidades de glucose ligadas à uma xilose que por sua vez está ligada a uma unidade de galactose.

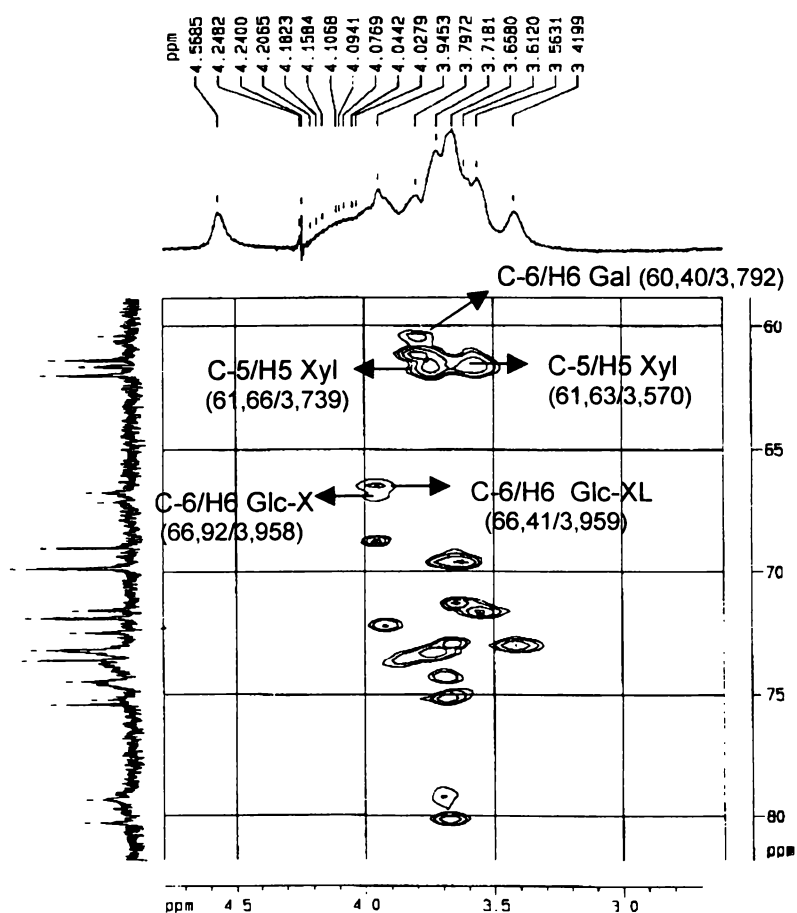


Figura 14 - Espectro de HMQC da HXGRP, em D₂O, 70°C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

Analisando-se o espectro de COSY (Figura 15) que mostra o acoplamento entre prótons vicinais (JONES, 1994), foram obtidos os assinalamentos para H-2 e H-3 das unidades de glucose e xilose e para a galactose somente H-2, e correlacionando-se esses prótons com os seus respectivos carbonos no espectro de HMQC foram obtidos os C-2 e C-3 das unidades de glucose e xilose e os C-2 das unidades de galactose.

β -D-Glcp - C-2/H-2, δ 72,95/3,407, C-3/H-3, δ 79,24/3,693

α -D-Xylp s - C-2/H-2, δ 80,2/3,667, C-3/H-3, δ 72,13/3,914

α -D-Xylp ns - C-2/H-2, δ 71,59/3,542, C-3/H-3, δ 74,5/3,715

β -D-Galp - C-2/H-2, δ 71,24/3,643

Não foi possível estabelecer os assinalamentos para as outras posições (C-4/H-4 e C-5/H-5) pela ausência de correlações no espectro de COSY e TOCSY. Isso pode ser atribuído à complexidade estrutural da xiloglucana, uma vez que RAMESH *et al.* (2001) salientam que foi possível obter os assinalamentos para a galactomanana sem fragmentação estudada por eles, pelo fato desta não apresentar uma estrutura complexa.

Comparando-se o espectro de DEPT-135 da HXGRP tratada com β -galactosidase, obtido no trabalho de MARTIN (1999), com o espectro de DEPT-135 da HXGRP nativa (Figura 16 A e B), verifica-se que após a modificação ocorreu um deslocamento de todos os sinais para campo mais baixo e uma diminuição do sinal não atribuído a nenhuma unidade monossacarídica quando o espectro da HXGRP nativa foi analisado em comparação com os dados de YORK *et al.* (1993). Embora esses espectros não forneçam dados quantitativos, sugere-se que esse sinal corresponderia ao C-6 de unidades de galactose que estariam ligadas ao C-4 de xilose. Isso é interpretado pelo fato de que como as unidades de xilose da HXGRP encontram-se na forma piranosídica, essas apresentam um anel semelhante ao da glucose, epímeros de C-1 a C-5. A β -galactosidase que foi utilizada no trabalho de MARTIN (1999) é proveniente de fígado bovino e específica para moléculas de lactose que possuem glucose e galactose ligadas (1 $\rightarrow$ 4), então a enzima poderia agir somente sobre as unidades de galactose ligadas em C-4 da xilose, e não nas

unidades de galactose ligadas em C-2 de xilose. A ação específica da enzima nessa posição diminuiu, como consequência o sinal em δ 62,48 do polissacarídeo tratado com β -galactosidase (Figura 16-B) que corresponde ao sinal de 61,14 no polímero nativo (Figura 16-A) confirmando os dados obtidos pela análise de metilação.

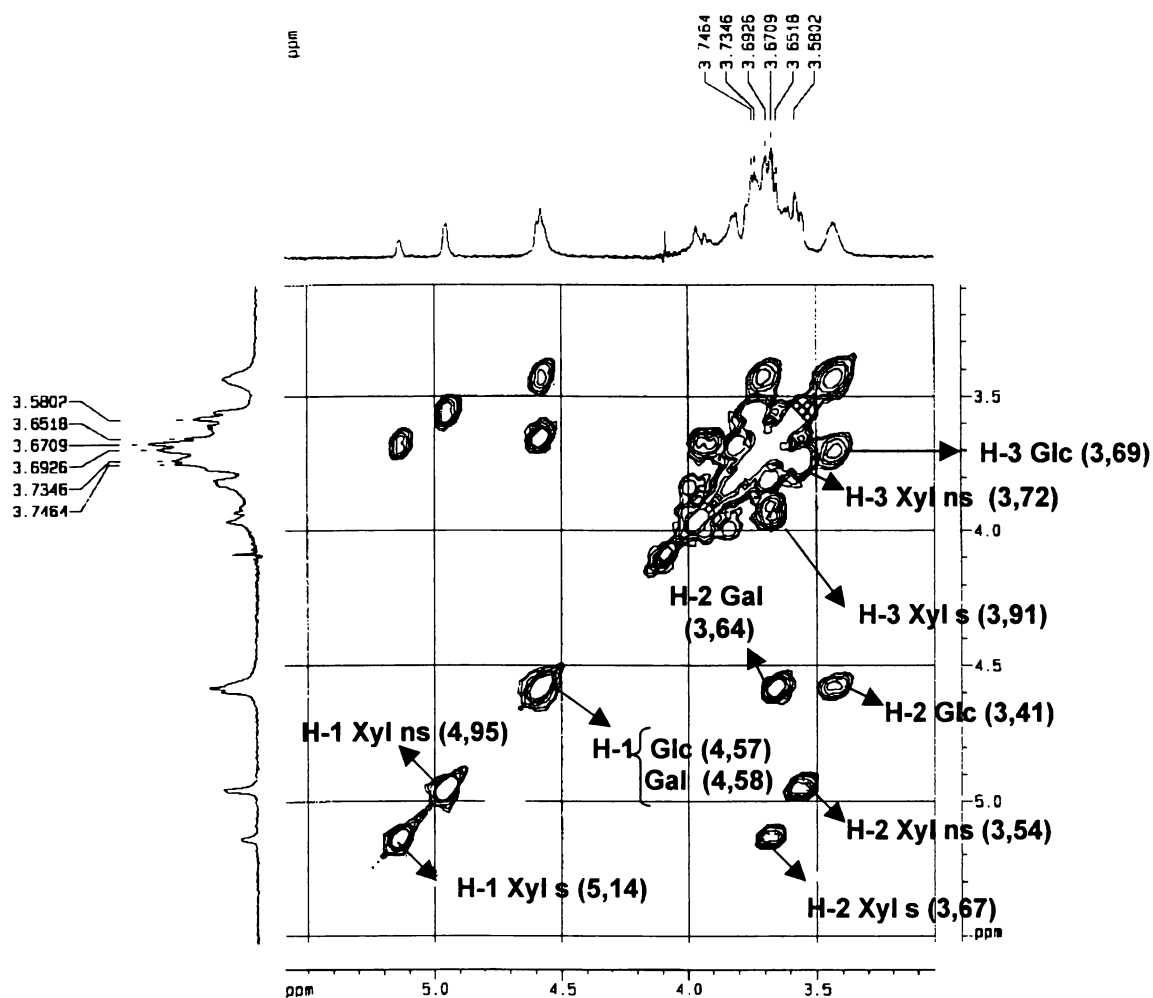


Figura 15 - Espectro de COSY da HXGRP, em D₂O, à 70°C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

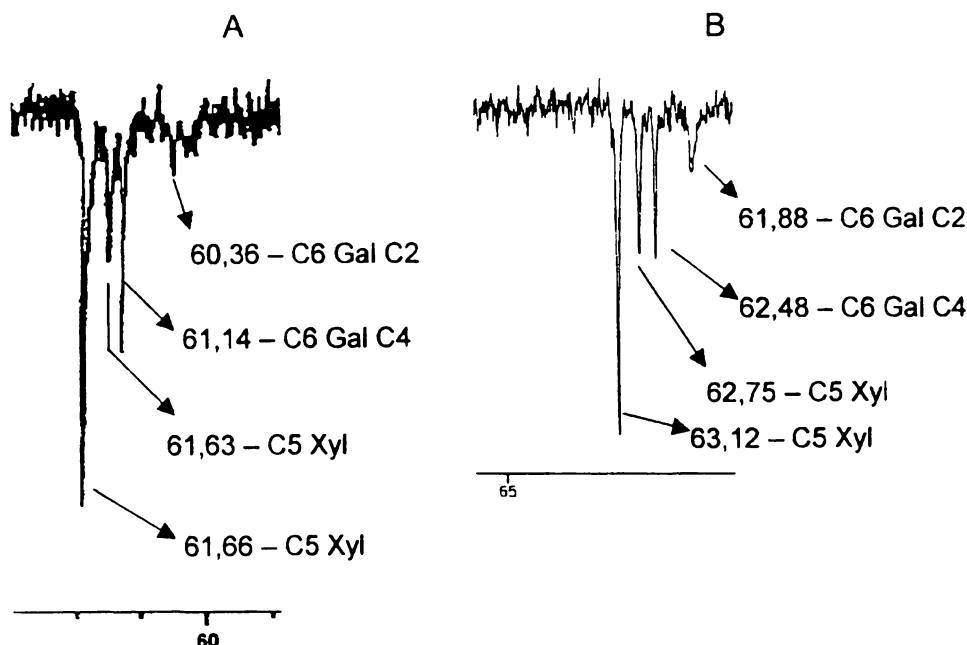


Figura 16 - Região de C-5 de α -D-Xylp e C-6 de β -D-Galp da HXGRP nativa (A) e tratada com a enzima β -galactosidase (B). Os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

Um resumo dos dados obtidos está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Assinalamentos de ^1H e ^{13}C dos sinais obtidos por RMN para a HXGRP. Os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

Unidade	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
β -D-Glcp X	102,3/4,57	72,95/3,41	79,24/3,69	n.a.	n.a.	66,92/3,958
β -D-Glcp XL	102,3/4,57	72,95/3,41	79,24/3,69	n.a.	n.a.	66,41/3,959
α -D-Xylp s	98,79/5,14	80,20/3,67	72,13/3,91	n.a.	61,63/3,57	—
α -D-Xylp ns	98,96/4,95	71,59/3,54	74,50/3,72	n.a.	61,66/3,74	—
β -D-Galp C2	104,4/4,58	71,24/3,64	n.a.	n.a.	n.a.	60,36/3,792
β -D-Galp C4	104,4/4,58	71,24/3,64	n.a.	n.a.	n.a.	61,14/3,791

β -D-Glcp X – unidade de glucose substituída por unidade de xilose

β -D-Glcp XL – unidade de glucose substituída por unidade de xilose substituída por galactose

α -D-Xylp s – unidade de xilose substituída por galactose

α -D-Xylp ns – unidade de xilose não substituída

β -D-Galp C2 – unidade de galactose ligada ao C-2 de xilose

β -D-Galp C4 – unidade de galactose ligada ao C-4 de xilose

n.a. – não assinalado

4.4. Análises da HXGRP modificada por oxidação específica em O-6

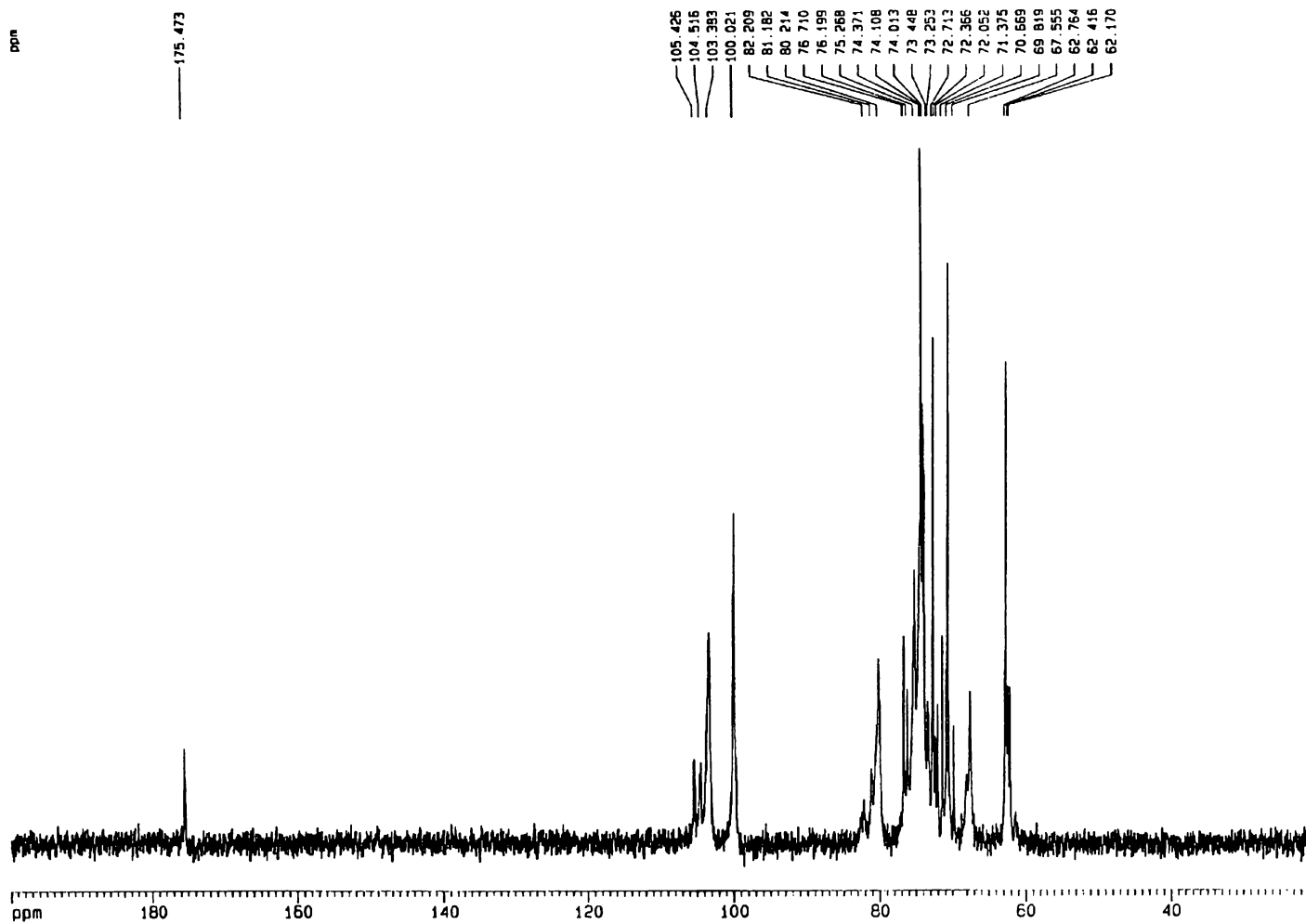
O produto da reação de oxidação específica da galactoxiloglucana com o reagente TEMPO teve um rendimento de 109%. A dosagem de ácidos urônicos foi realizada pelo método colorimétrico de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973), cujo resultado foi de 10%, e, também, pelo número de mmols de NaOH gastos durante a reação de oxidação, com teor de 12%. Esses resultados indicam que, praticamente, todas as unidades de galactose presentes na amostra foram oxidadas. Além de galactose, poderiam ser oxidadas as unidades de glucose não substituídas, mas é importante ressaltar que a formação de ácido galacturônico seria mais fácil, uma vez que as unidades de galactose posicionam-se mais externamente na cadeia do polissacarídeo sendo, dessa forma, mais acessíveis em relação às unidades de glucose que estão situadas na cadeia principal.

Observando-se comparativamente os espectros de ^{13}C RMN do material nativo e do oxidado, pode-se verificar diversas modificações ocorridas após a derivatização e, também, o deslocamento de todos os sinais de ^{13}C em aproximadamente 1 ppm, para campo mais baixo (Figuras 10 e 17).

Entre as mudanças observadas nos espectros está o aparecimento de um sinal na região de δ 175,47 (Figura 17), com um pequeno ombro em δ 175,38, como pode ser observado em sua forma ampliada na Figura 16, esses sinais são característicos da função carboxila, demonstrando, portanto, que a oxidação efetivamente ocorreu.

Na análise da região de C-6 da galactose que ocorre em campo alto ($\delta \sim 61,0$), observa-se apenas um pequeno sinal indicando que, praticamente, todas essas unidades foram oxidadas, transformando, como consequência, o grupamento alcoólico primário em carboxila. Esse resultado está de acordo com as porcentagem de ácido urônico obtidas pelas duas metodologias empregadas.

Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C , em D_2O , 60°C , da HXGRP oxidada com o reagente TEMPO, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.



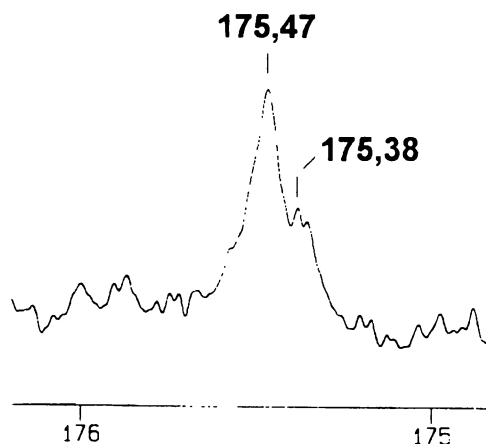


Figura 18 - Região de C-6 de ácido urônico do espectro de RMN ^{13}C da amostra de HXGRP oxidada, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

Na região de C-1 do polímero nativo (Figura 19-A) temos os sinais em δ 104,4 e 99,0 que correspondem às unidades de β -D-galactopiranosose e α -D-xilopiranosose, respectivamente. Os sinais em δ 102,6; 102,4 e 102,3, correspondem às unidades de β -D-glucopiranosose, segundo YORK *et al.* (1993). Como na região dos carbonos anoméricos do material oxidado (Figura 19-B) aparecem sinais em δ 105,42, 104,52, 103,40 e 100,2, os dois últimos podem ser atribuídos às unidades de glucose e xilose, respectivamente. Como todos os sinais do espectro do material oxidado estão deslocados 1 ppm para campo mais baixo, provavelmente, o sinal a δ 105,43 corresponda ao C-1 das unidades de galactose não oxidadas, enquanto o δ 104, 52 ao C-1 das unidades de ácido galacturônico (SHASHKOV *et al.*, 1996; BARTODZIEJKA *et al.*, 1998; PERRY e MacLEAN, 1999).

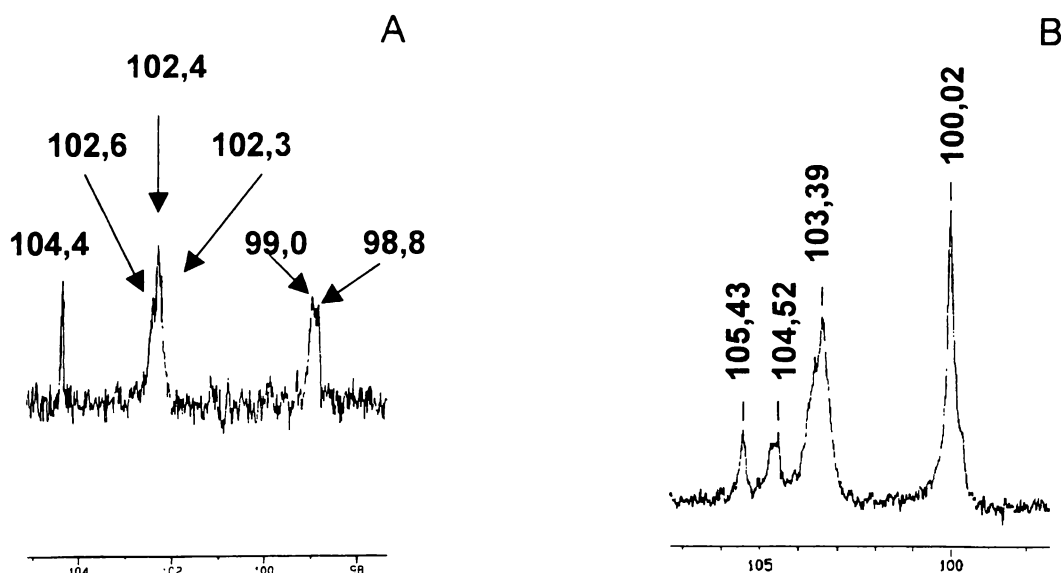


Figura 19 - Região de C-1 do espectro de RMN de ^{13}C da HXGRP nativa (A) e oxidada (B), os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

Analisando-se a região de C-5 da xilose e C-6 da galactose do espectro de DEPT-135 da HXGRP oxidada (Figura 20), observa-se o desaparecimento do sinal correspondente à galactose ligada ao C-2 da xilose (acima de δ 62,16) e uma redução acentuada do sinal da galactose ligada ao C-4 da xilose (δ 62,16), confirmando mais uma vez a oxidação das unidades de galactose presentes na HXGRP. As implicações que a oxidação das unidades de galactose, modificadas para ácido β -D-galacturônico possam ocasionar nas propriedades desse derivado oxidado serão objetivo de estudos futuros.

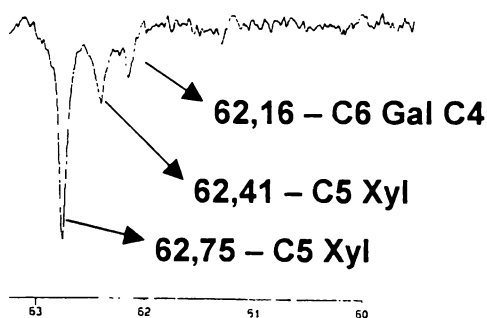


Figura 20 - Região de C-5 de α -D-Xylp e C-6 de β -D-Galp da HXGRP oxidada. Os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

A análise do material nativo por HPSEC-MALLS apresentou um perfil homogêneo, tanto para o índice de refração como para o de espalhamento de luz (Figura 7, pág. 39).

No material oxidado (Figura 21), quando analisado pelo detector de espalhamento de luz, foram observados dois picos em aproximadamente 37 e 42 minutos e, no detector de índice de refração, um ombro muito pequeno em 35 minutos, um pico em 45 minutos e três picos presentes entre 63 e 80 minutos.

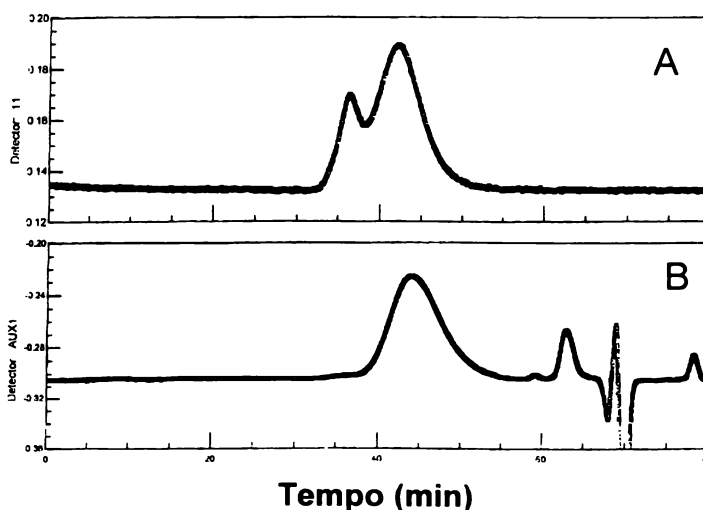


Figura 21 - Perfil de HPSEC-MALLS para a galactoxiloglucana de sementes de *H. courbaril* oxidada com o reagente TEMPO, (A) detector de espalhamento de luz e (B) detector de índice de refração.

O primeiro pico observado com o detector de espalhamento de luz e que não apareceu com o de IR poderia ser de um composto de elevada massa molar, mas presente em quantidade tão pequena que não foi perceptível na análise de IR. Os picos menores, provavelmente, correspondem a compostos de M_w menor e, que podem ter sido formados pela desagregação de HXGRP durante o processo de oxidação. Assim, o processo de oxidação também pode contribuir, futuramente, para interpretar o estado de agregação do polissacarídeo. Essa característica da HXGRP formar agregados moleculares de altos M_w já foi relatada na literatura (GIDLEY *et al.*, 1991; LANG, 1993; WANG *et al.*, 2001; PICOUT *et al.*, 2003) e será o assunto do próximo item.

4.5. Avaliação das propriedades de soluções de HXGRP antes e após aquecimento, por reologia, fluorimetria e HPSEC-MALLS

Na preparação das amostras de HXGRP complexadas com íons borato (HXGRP-B) foi observado que para os complexos preparados sob aquecimento, ocorria uma diminuição da viscosidade das soluções. Como esse comportamento foi observado repetidas vezes, foi realizada uma análise comparativa da viscosidade absoluta *versus* taxa de cisalhamento para a HXGRP solubilizada à temperatura ambiente, e dessa mesma amostra após aquecimento a 85°C, em banho de água, por 2h, em tubo selado e, então, resfriada a 25°C (HXGRP-AQ). Os resultados obtidos podem ser observados nas curvas de viscosidade da Figura 22, onde a HXGRP-AQ apresenta uma viscosidade absoluta que corresponde aproximadamente à metade do valor observado para a HXGRP. Esse resultado sugere mudança no estado de organização da macromolécula após o aquecimento como demonstrado pela diminuição significativa da viscosidade, assim como do seu caráter pseudoplástico.

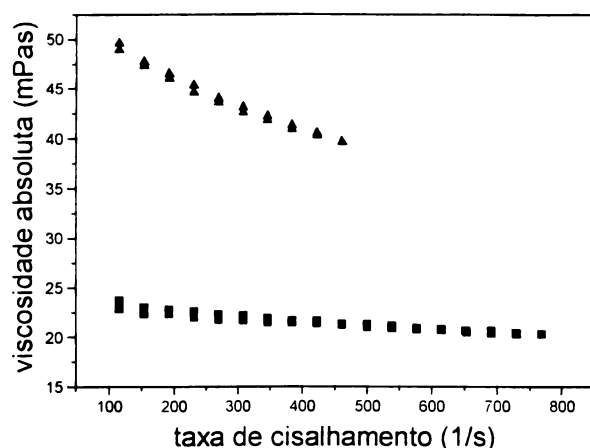


Figura 22 - Curvas de viscosidade de soluções aquosas de HXGRP (10 mg/ml) (▲) sem aquecer e (■) aquecida a 85°C, por 2 h e resfriada. Leituras em reômetro BROOKFIELD LV-DVIII, cone CP-51, à 25°C.

Como o espectro de emissão de fluorescência do pireno é sensível à polaridade do meio no qual está disperso, e sabendo-se que a banda I tem a sua intensidade aumentada na presença de solventes polares, a relação das intensidades de fluorescência de duas bandas vibracionais denominadas III e I (Figura 23) podem servir como um sensor de hidrofobicidade. A relação entre essas duas bandas é alterada quando ocorrem mudanças na polaridade do sistema onde a sonda está inserida, podendo, no caso de polímeros, indicar alterações conformacionais ocorridas na molécula. Por isso, essa metodologia tem sido empregada por estudiosos interessados em seu comportamento em solução (KALYANASUNDARAM e THOMAS, 1977; VIEIRA *et al.*, 2003).

Na Tabela 7 pode ser observada a relação das bandas III/I característica para a água (CHEE *et al.*, 2001), para a HXGRP-AQ e para a HXGRP. Observa-se que os valores da relação das bandas III/I para as duas amostras são diferentes indicando que, depois do aquecimento, há um ambiente ligeiramente mais apolar que para a amostra não aquecida.

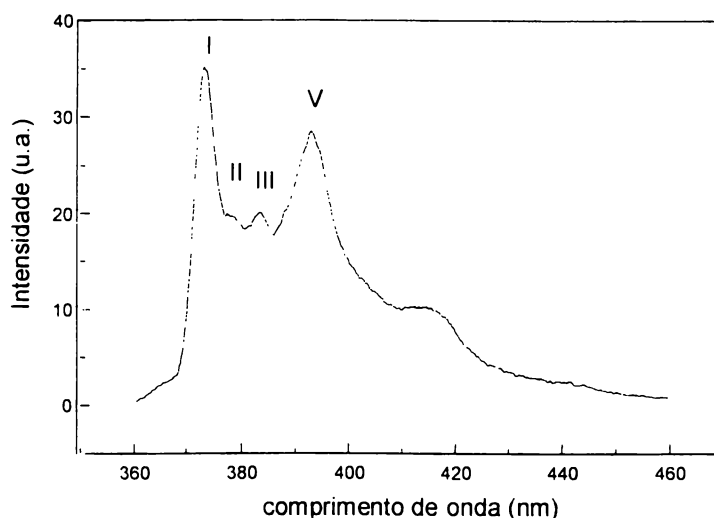


Figura 23-Espectro de fluorescência do pireno em água.

Tabela 7 – Intensidades das bandas III, I e relação III/I do espectro de emissão de fluorescência do pireno em água e soluções aquosas (10 mg/ml) de HXGRP e HXGRP-AQ.

	III	I	III/I
H ₂ O	19,95	35,22	0,57
HXGRP	8,04	11,86	0,68
HXGRP-AQ	6,57	8,82	0,74

Esses resultados podem indicar uma alteração na estrutura tridimensional do polímero ocorrida após o processo de aquecimento, confirmando os dados obtidos por medidas reológicas.

Para confirmar a hipótese de alteração na estrutura da amostra de HXGRP-AQ foram realizadas análises de HPSEC-MALLS das amostras antes e após o processo de aquecimento e resfriamento. O uso de HPSEC-MALLS apresenta diversas vantagens, tais como rapidez de análise e o uso de uma solução única.

Outra vantagem é o fato que pode ser observada uma distribuição de massa molar completa (ROGER *et al.*, 2000, FREITAS *et al.*, 2003b).

Na Figura 24 podem ser observados os perfis de eluição para HXGRP e HXGRP-AQ, utilizando-se o detector de espalhamento de luz.

Em ambas as análises os perfis se apresentaram homogêneos sendo que para a amostra aquecida, ocorreu um ligeiro deslocamento para volumes de eluição mais altos em relação à amostra não aquecida, o que indica diminuição da massa molar ponderal média (M_w).

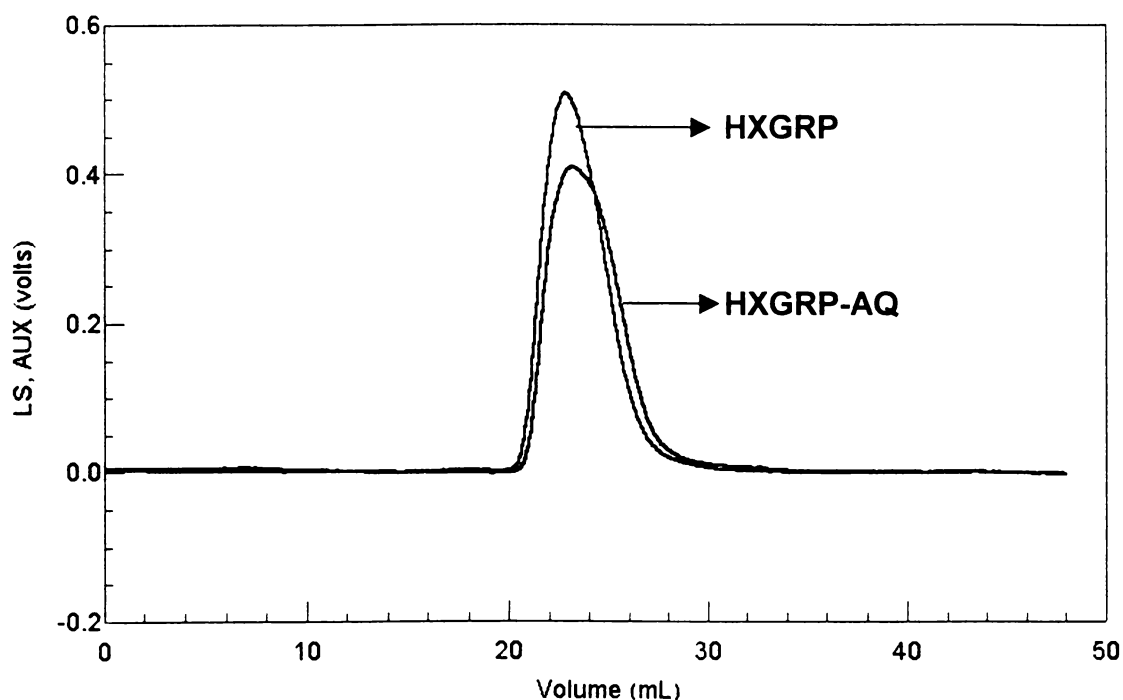


Figura 24-Perfil de eluição do HPSEC-MALLS, de soluções de HXGRP e HXGRP-AQ 1 mg/ml em solução aquosa de NaNO_2 0,1 mol/l contendo 0,2 g/l de NaN_3 , utilizando o detector de difusão de luz.

Em uma amostra polissacarídica polidispersa existem diversas famílias de moléculas com a mesma estrutura, mas com diferentes massas molares. É a média ponderal dessas diferentes massas que nos fornece o M_w . Analisando-se os dados obtidos a partir da análise de HPSEC-MALLS pelo gráfico de Debye [$R_\theta/(K^*c)$] vs.

$\text{sen}^2 \theta/2$, onde R_θ = razão entre a luz incidente e a luz espalhada, K^* = constante física para a luz incidente verticalmente polarizada, θ = ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada, c = concentração] (WYATT, 1993), podem ser obtidos os valores de M_w e R_g para os diferentes volumes de eluição do experimento, e as massas molares das diversas moléculas do polímero. No perfil da HXGRP-AQ (Fig. 24) foi observado que houve uma redução nos valores das massas molares mais altas, quando comparada com a HXGRP, todavia para aquelas famílias que apresentavam menor massa molar não houve modificação.

Os dados de massa molar (M_w), raio de giro (R_g), razão característica (C_∞), comprimento de persistência (L_p), viscosidade intrínseca $[\eta]$ e rotação óptica ($[\alpha]_{25}^D$) para as duas amostras podem ser observados na Tabela 8, salientando-se que ocorre uma variação na concentração de polissacarídeo utilizada para cada experimento, devido às condições de análise de cada equipamento utilizado e que essa variação de concentração pode influir nas propriedades dessas soluções.

Tabela 8- Dados de massa molar (M_w), raio de giro (R_g), razão característica (C_∞) e comprimento de persistência (L_p), viscosidade intrínseca $[\eta]$ e rotação óptica ($[\alpha]_{25}^D$) para HXGRP e HXGRP-AQ.

	M_w (g/mol)	R_g (nm)	C_∞	L_p (nm)	$[\eta]$ (ml/g)*	$[\alpha]_{25}^D$ (°)
HXGRP	$5,4 \cdot 10^5$	57,4	49,6	12,6	377,4	+ 82,5
HXGRP-AQ	$4,1 \cdot 10^5$	50,9	24,8	6,2	256,9	+ 83,8

* em solução aquosa de nitrito de sódio 0,1 mol/l

A razão característica e o comprimento de persistência das amostras foram obtidos utilizando uma fração de M_w e R_g obtidos da interpolação linear de Zimm (K^*c/R_θ vs. $\text{sen}^2 \theta/2$, onde R_θ = razão entre a luz incidente e a luz espalhada, K^* = constante física para a luz incidente verticalmente polarizada, θ = ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada, c = concentração) (WYATT, 1993)) à diferentes volumes de eluição (BEER *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2001).

Pelos resultados da Tabela 8, pode-se observar uma diminuição de todos os valores apresentados, com exceção da rotação óptica, após a amostra ser submetida ao processo de aquecimento.

De acordo com dados da literatura, a xiloglucana quando solubilizada sem aquecimento fica na forma de agregados moleculares (GIDLEY *et al.*, 1991; LANG, 1993; WANG *et al.*, 2001; PICOUT *et al.*, 2003) que, por possuírem uma massa molar mais alta, aumentam o valor de viscosidade de suas soluções, conforme observado nos resultados dos experimentos realizados.

Após o aquecimento e resfriamento ocorre uma diminuição em todos os parâmetros da Tabela 8, com exceção da rotação óptica que sofre uma pequena variação. Assim, uma diminuição de C_{∞} e L_p indica a dissociação dos agregados moleculares (WANG *et al.*, 2001; PICOUT *et al.*, 2003) e, como consequência, uma diminuição dos valores de viscosidade absoluta e intrínseca $[\eta]$.

O aumento na relação das bandas III/I do espectro de emissão de fluorescência do pireno pode ser explicado pelo fato de que a macromolécula estando menos compactada permite a entrada do pireno em regiões hidrofóbicas presentes na estrutura, que antes do aquecimento eram inacessíveis.

A presença dos agregados parece ser uma característica comum às xiloglucanas, uma vez que foi observada para esses polímeros quando extraídos de sementes de *Dentarium senegalense* (WANG *et al.*, 2001; PICOUT *et al.*, 2003), *Tamarindus indica* (GIDLEY *et al.*, 1991; LANG, 1993; PICOUT *et al.*, 2003) e agora de *H. courbaril* (FREITAS *et al.*, 2003b). Nesse último artigo, relacionado com a galactoxiloglucana extraída de sementes colhidas em diferentes regiões do Brasil e, também, com a de sementes de *T. indica*, foi realizado um estudo completo com tais parâmetros, correlacionando-os com as estruturas dos polissacarídeos.

4.6. Análises reológicas

4.6.1. Determinação da viscosidade intrínseca e da constante de Huggins

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi obtida pela extrapolação à concentração nula do polissacarídeo no gráfico viscosidade reduzida *versus* concentração, cujos valores variaram de 2 a 0,4 mg/ml do biopolímero. O valor obtido para $[\eta]$, usando água como solvente foi 330,5 ml/g e utilizando KCl 0,1 mol/l como solvente, foi de 359,8 ml/g (Figura 25). Esse valor é correlacionado com o volume hidrodinâmico de uma molécula isolada (MORRIS, *et al.*, 1981; GIDLEY, *et al.*, 1991). A constante de Huggins (k') foi obtida utilizando a equação de Huggins:

$$\eta_{sp}/C = [\eta] + k' \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad (\text{Eq. 8})$$

onde: η_{sp} é a viscosidade específica

C, a concentração

$[\eta]$, a viscosidade intrínseca da amostra

Os valores obtidos foram 0,73 e 0,52 quando o polissacarídeo foi solubilizado em água e em solução de KCl, respectivamente, e pode variar entre 0,3 e 0,6 sendo dependente da rigidez da molécula e do sistema termodinâmico. A constante de Huggins diminui em bons solventes e aumenta quando as interações intermoleculares aumentam (MILAS, 1991). Valores altos da constante de Huggin's indicam que o solvente utilizado não é adequado para a amostra (mau solvente). Nesse caso o solvente interage pouco com a macromolécula e o contato polímero-polímero é mais provável, fazendo com que o novelo macromolecular se encolha. A cadeia encolhida oferece menos resistência hidrodinâmica (resistência ao fluxo) e, portanto, essa solução apresenta menor viscosidade do que uma solução contendo uma cadeia estendida de mesmo peso molecular (LUCAS *et al.*, 2001). Então, nesse caso a solução de KCl 0,1 mol/l mostra ser um solvente mais adequado que a água para a HXGRP em estudo.

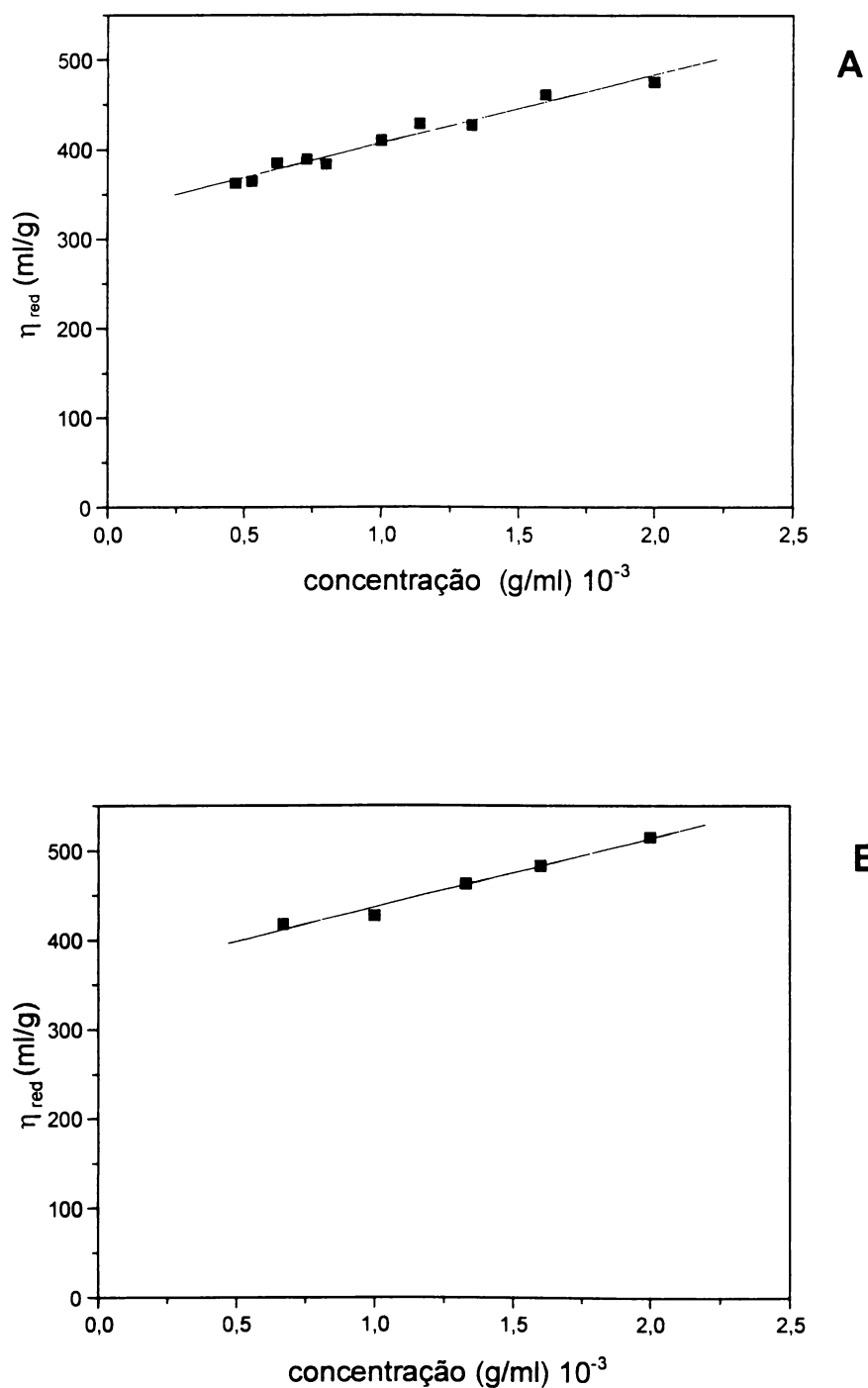


Figura 25 – Gráficos utilizados para a determinação da viscosidade intrínseca da HXGRP solubilizada em água (A) e em KCl 0,1 mol/l (B). Leituras realizadas em reômetro BROOKFIELD LV-DV III, cone CP-40, à 25°C.

4.6.2. Comportamento reológico de soluções de HXGRP em água e dos complexos HXGRP-B

Nas curvas de viscosidade, para diferentes concentrações da galactoxiloglucana (Figura 26), foi observado um comportamento similar ao encontrado para outras soluções de polissacarídeos, como citados na literatura.

Em pequenas concentrações o comportamento apresenta-se como sendo Newtoniano, enquanto em altas concentrações (> 10 mg/ml) ele se torna pseudoplástico, com essa característica acentuando-se com o aumento da concentração. Sabe-se da literatura que, em se tratando de soluções poliméricas, quanto maior a concentração, maior a possibilidade de aparecimento da pseudoplasticidade. Segundo KEJUN e GUOWEI (1992), isto se deve sobretudo ao aumento nas perturbações ao escoamento devido ao aumento populacional. O fato de existirem mais cadeias por unidade de volume de solução significa que o movimento livre se torna cooperativo, isto é, os segmentos cinéticos das cadeias enroladas ao acaso têm os seus movimentos dependentes dos da vizinhança. Além disto, havendo um maior número de cadeias no sistema, maior será o grau de enovelamento e maior o número de cadeias a serem alinhadas na direção do escoamento. Sendo assim, embora a viscosidade da solução aumente com a concentração do soluto, este valor cairá de forma acentuada quando o cisalhamento for imposto ao sistema (NAVARRO, 1997).

No trabalho de MARTIN (1999), foi observado que quando a galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* é solubilizada em uma solução a 3 mg/ml de tetraborato de sódio, ocorre um aumento em sua viscosidade e em suas características viscoelásticas. Em consequência dessas observações, um dos objetivos desse trabalho foi dar continuidade a essas investigações. Nas curvas de viscosidade da Figura 27, onde a HXGRP foi solubilizada em água e em solução aquosa a 3 mg/ml de tetraborato de sódio, pode-se observar um aumento da viscosidade no complexo HXGRP-B.

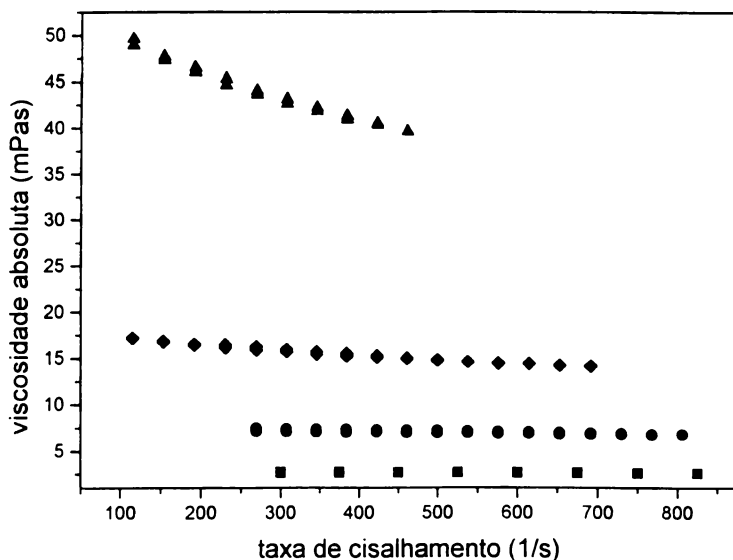


Figura 26 – Curvas de viscosidade da HXGRP a concentrações de (▲) 10, (◆) 7,5, (●) 5 e (■) 2,5 mg/ ml, em água. Leituras realizadas em reômetro BROOKFIELD LV-DV III, cone CP-52, CP-51 e CP-40, à 25°C.

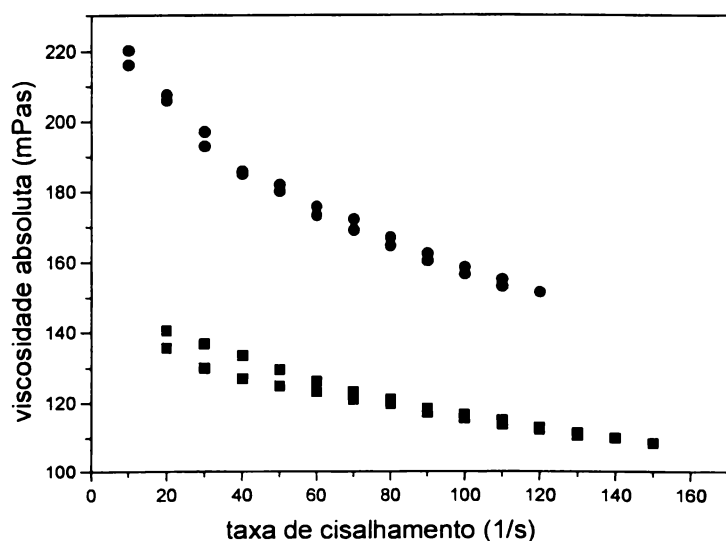


Figura 27 – Curvas de viscosidade da HXGRP (15 mg/ml) solubilizada em água (■) e em solução aquosa a 3 mg/ml de tetraborato de sódio (●). Leituras realizadas em reômetro BROOKFIELD LV-DV III, cone CP-52, à 25°C.

Para melhor caracterizar essa interação, as soluções de HXGRP e do complexo HXGRP-B foram submetidas à análises reológicas em sistema oscilatório, onde, em primeiro lugar, foram realizados experimentos de curvas de tensão (Figura 28) com o objetivo de determinar a região de comportamento viscoelástico linear que é a região onde G' e G'' são independentes da tensão ou deformação aplicada ao sistema. Todos os experimentos subsequentes foram realizados nessa região com a deformação variando entre 3 e 5%.

Na Figura 29, pode-se observar o espectro mecânico da HXGRP solubilizada em água nas concentrações de 40 e 20 mg/ml. O comportamento nos dois casos é típico de uma solução, pois o G'' (módulo viscoso) foi maior que o G' (módulo elástico) em toda a faixa de frequência. Pode, ainda, ser observado que, em frequências altas, os módulos tendem a um cruzamento. Essa característica do G' tornar-se maior que G'' em alta frequência é um comportamento típico observado em soluções concentradas, onde o entrelaçamento físico entre as cadeias aumenta e consequentemente, os valores do módulo elástico.

Na Figura 30, pode-se observar o comportamento em sistema oscilatório da HXGRP (20 mg/ml) quando solubilizada em água ou solução aquosa a 3 mg/ml de tetraborato de sódio. Para as amostras solubilizadas em tetraborato de sódio os valores de G' são maiores que aqueles observados em água, a diferença entre os dois módulos torna-se menor e o seu cruzamento ocorre em frequências mais baixas. Isso caracteriza um aumento no comportamento de sólido que é consistente com o aumento da viscosidade da amostra em seu aspecto macroscópico.

Observando o comportamento da amostra solubilizada em água ou em solução de tetraborato de sódio, torna-se interessante examiná-los em termos de obstrução do fenômeno da reptação, apresentado na introdução. Quando esse conceito é aplicado ao sistema em estudo, os íons borato dão origem a essas redes temporárias aumentando a viscoelasticidade da amostra, como apresentado na Figura 30. O cruzamento entre G' e G'' , para a amostra complexada, se dá em frequências mais baixas que as da HXGRP pura. Isso pode ser devido ao fato de que, em tempos menores que o tempo de vida de uma ligação, tais redes se comportem como géis. Em escalas de tempo mais longas, a quebra sucessiva de poucas ligações permite que a cadeia se difunda ao longo do tubo na qual está confinada (LEIBLER *et al.*, 1991).

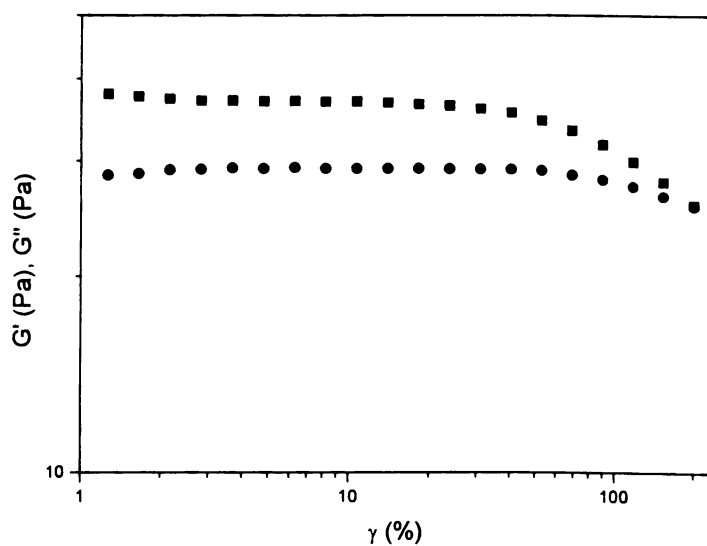
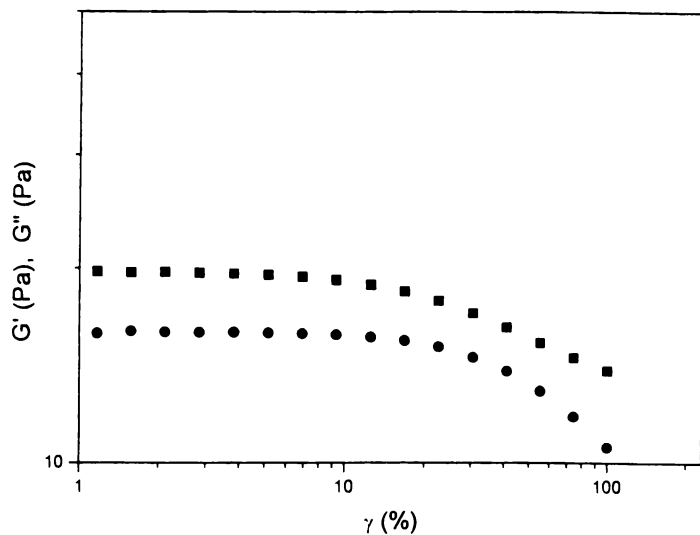


Figura 28 – Gráficos utilizados para a determinação do comportamento viscoelástico linear da HXGRP (20 mg/ml) na frequência de 10 Hz. (A) em água destilada, (B) em solução a 3 mg/ml de tetraborato de sódio. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.

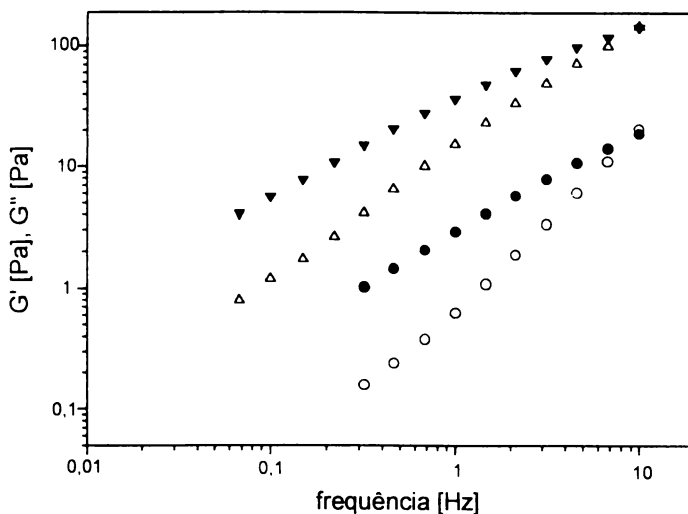


Figura 29 – Curvas de frequência da HXGRP 40 (▲) e 20 mg/ml (●) solubilizadas em água. G' símbolos abertos, G'' símbolos fechados. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.

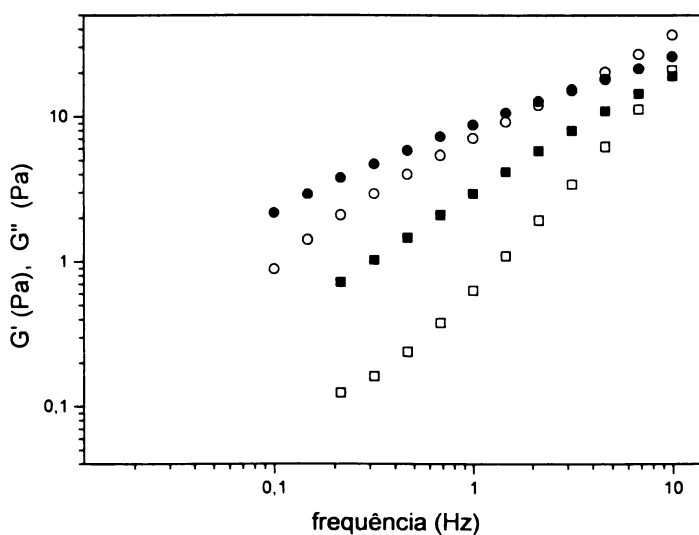


Figura 30 – Curvas de frequência da HXGRP 20 mg/ml solubilizada em água destilada (■) e em solução a 3 mg/ml de tetraborato de sódio (●). G' símbolos abertos, G'' símbolos fechados. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.

Para verificar a estabilidade das amostras solubilizadas em água ou em solução de tetraborato de sódio, quando submetidas a condições de estresse, foram realizadas curvas de tempo sob frequência e deformação fixas. Os valores de G' , G'' e viscosidade dinâmica foram constantes quando analisados por um período de seis horas. No caso da HXGRP solubilizada em solução aquosa de tetraborato de sódio, isso mostra que o tempo de solubilização foi suficiente para estabelecer todas as zonas de junção entre as cadeias de polímero e os íons (Figura 31).

Para mostrar a influência da concentração dos íons borato nos aspectos reológicos do complexo HXGRP-B, o polissacarídeo (20 mg/ml) foi solubilizado em água em soluções aquosas a 3, 5, 7, 10 mg/ml de tetraborato de sódio e suas propriedades reológicas foram analisadas.

Na Figura 32, pode-se observar o gráfico dos valores de G' *versus* a concentração de tetraborato de sódio efetuados em três diferentes frequências. Os valores de G' aumentam até a concentração de 7 mg/ml de tetraborato de sódio, indicando que essa é a concentração onde ocorre a viscoelasticidade máxima.

Em estudos com uma esquizofilana (GRISEL e MULLER, 1996) foi demonstrado que suas propriedades reológicas são afetadas de uma maneira muito intensa pela adição de pequenas quantidades de íons borato e que, quanto maior as concentrações de íons borato, maior a força do gel formado.

Com a intenção de aumentar a viscoelasticidade do sistema, o pH foi ajustado para 9,8; 10,3 e 10,6. Quando o pH de uma solução de tetraborato aumenta, há uma disponibilidade maior de íons borato aumentando o número de ligações cruzadas e, conseqüentemente, a viscoelasticidade da mistura (POWER *et al.*, 1998).

Os valores de $\tan(\delta)$ que expressam a relação G''/G' (NAÉ, 1993) são utilizados para caracterizar o melhor comportamento sólido, sendo que quanto menor for o valor, maior será o caráter sólido do sistema. Na Figura 33, pode ser observado que apesar da elevação do pH, o decréscimo dos valores de $\tan(\delta)$ não são muito pronunciados em pHs maiores que 9,3. Entre os pHs 9,8; 10,3 e 10,6, essa diferença praticamente não ocorre, mostrando uma estabilidade reológica nessa faixa de pH.

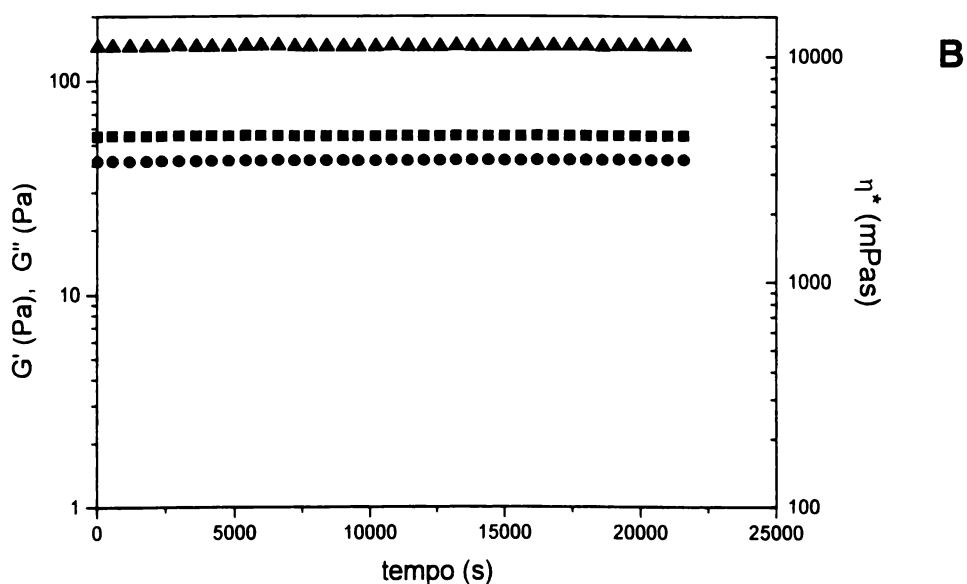
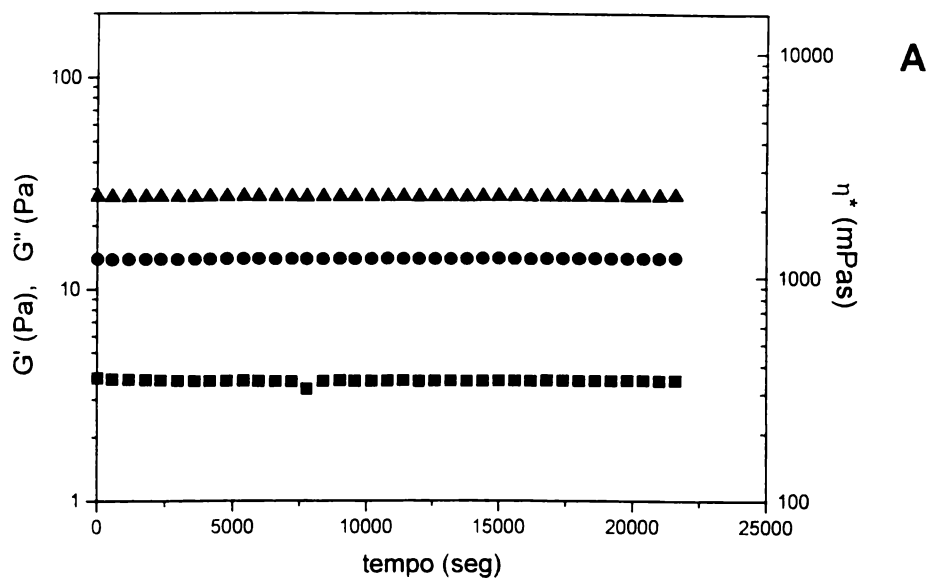


Figura 31 – Curvas de tempo da HXGRP (30 mg/ml) solubilizada em água destilada (A) e em solução a 3 mg/ml de tetraborato de sódio (B), (■) G' , (●) G'' , (▲) viscosidade dinâmica. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C, frequência de 1 Hz.

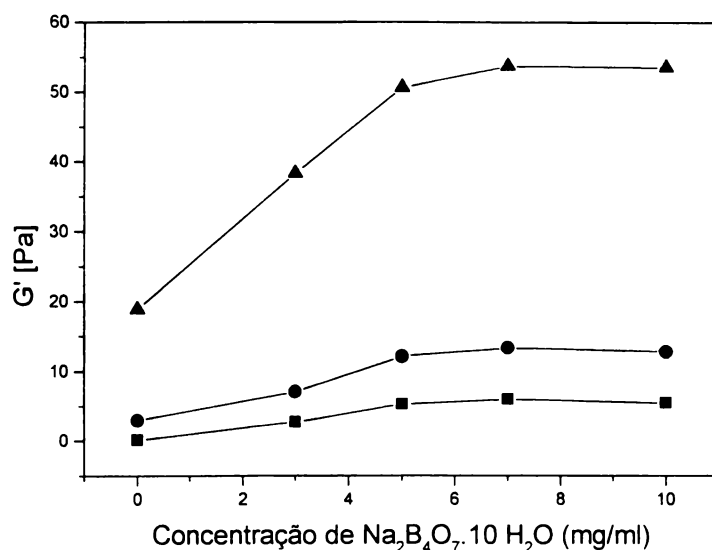


Figura 32 – Variação de G' versus a concentração de tetraborato de sódio para HXGRP (20 mg/ml) em diferentes frequências. ($\blacktriangle$) 10, ($\bullet$) 1 e ($\blacksquare$) 0,316 Hz. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.

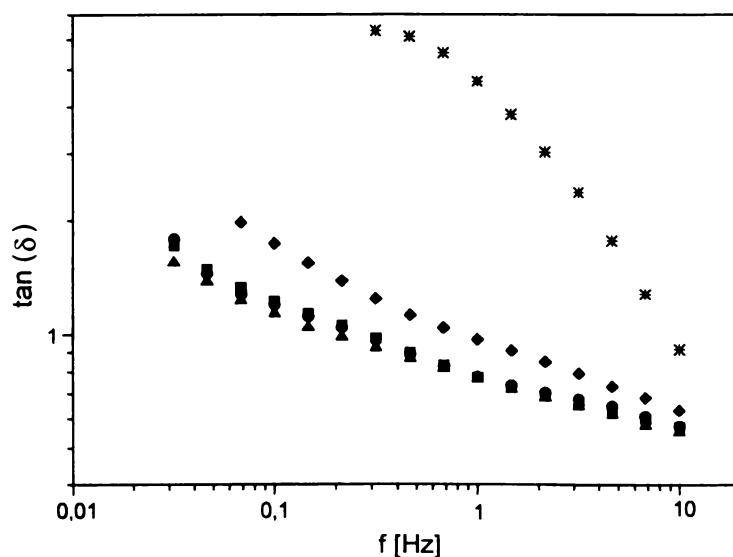


Figura 33 – Variação dos valores de $\tan(\delta)$ versus a frequência para a HXGRP 20 mg/ml em água, pH 5,0 (*) e para o complexo HXGRP (20 mg/ml)-borato (3 mg/ml + 0,33 mg/ml NaBH_4), pH 9,3 ($\blacklozenge$), 9,8 ($\blacktriangle$), 10,3 ($\blacksquare$) e 10,6 ($\bullet$). Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.

Na Figura 34, pode-se observar que entre os valores de pH estudados, o que promoveu melhor características de sólido da mistura, para uma coccentração de 20 mg/ml de HXGRP, foi 9,8. Nesse valor e nos valores mais altos o aspecto macroscópico da mistura é de um gel que não flui facilmente e pode ser manipulado. A Figura 35 ilustra o aspecto do complexo obtido para a HXGRP 20 mg/ml em solução de tetraborato de sódio 7 mg/ml contendo 0,33 mg/ml de boroidreto de sódio, em pH 9,8. Em pH 12,0 (dados não mostrados) a mistura, torna-se um líquido com uma viscosidade muito baixa.

Nos complexos borato-hidroxipropilgumar, o valor de G' aumenta com o aumento do pH até pH 12,0 (Power *et al.*, 1998). O efeito diferente causado pelo pH nos dois polímeros pode ser devido a ionização dos grupamentos hidroxila em pH elevado que gera uma repulsão eletrostática inter e intra cadeias em HXGRP, ou ainda por uma mudança na conformação molecular (NOBLE *et al.*, 1990) da HXGRP.

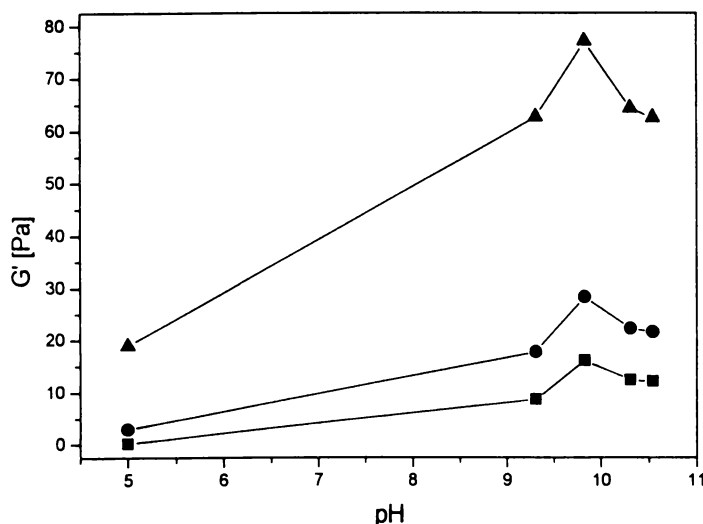


Figura 34 – Variação do G' versus pH para a HXGRP (20 mg/ml) solubilizada em água (pH 5,0) e para o complexo HXGRP (20 mg/ml)-B (3 mg/ml + 0,33 mg/ml de NaBH_4) em diferentes frequências. (▲) 10, (●) 1, (■) 0,316 Hz. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.

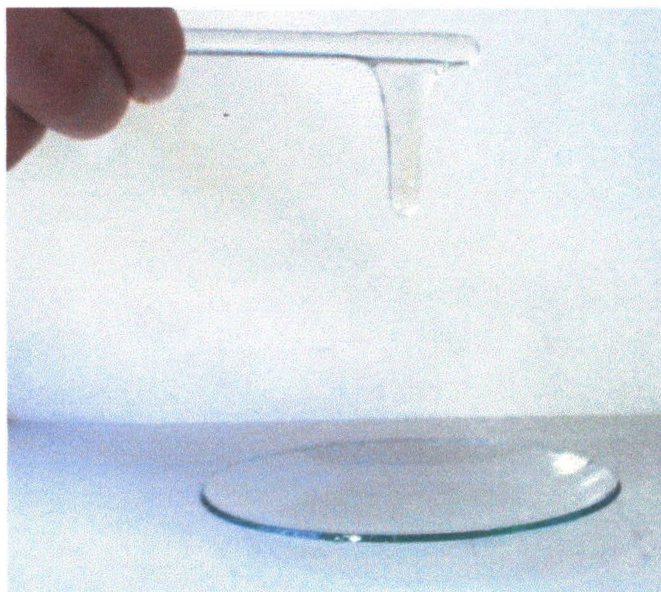


Figura 35 – Aspecto macroscópico do complexo HXGRP (20 mg/ml)–B (7 mg/ml + boroidreto de sódio 0,33 mg/ml), pH 9,8.

Para o hidroxipropilgumar, POWER *et al.* (1998), reportaram que a pHs baixos, a inclinação da curva $\tan(\delta)$ *versus* frequência é negativa e que a pHs altos ela se torna positiva, de tal forma que foi possível determinar o ponto de gel do sistema, que é o pH no qual o gradiente $\tan(\delta)$ *versus* frequência é zero. Isso não foi possível para a HXGRP em estudo, pois a inclinação do gráfico $\tan(\delta)$ *versus* frequência foi negativo mesmo nos pHs onde os maiores valores de G' foram observados, provavelmente porque o complexo HXGRP-B não forma um gel verdadeiro e sim uma solução viscoelástica.

Para complementar os estudos envolvendo variação de pH, será necessário verificar a sua influência em soluções aquosas de HXGRP, uma vez que para galactomananas, já foi descrito na literatura que o aumento do pH altera as propriedades de suas soluções aquosas, causando um aumento na sua viscosidade (NOBLE *et al.*, 1990).

Com o objetivo de complementar o trabalho, foi examinada, também, uma galactoxiloglucana obtida de sementes coletadas em outra região do Brasil (Foz do Chopin-PR) (FREITAS *et al.*, 2003a). Essa amostra denominada HXGFC possui uma

massa molar maior que a galactoxiloglucana coletada em Ribeirão Preto (HXGRP) (sua relação molar monossacarídica, quantidades de açúcar total, proteína, umidade e massa molar estão apresentadas na Tabela 9).

Tabela 9 - Relação molar monossacarídica, açúcar total, proteína e umidade e massa molar da HXGFC.

Glc:Xyl:Gal (mol%)	4:3:1
Açúcar total (%)	80,7
Proteína (%)	2
Umidade (%)	14,8
Massa molar (g/mol)	1.528.000

Essa amostra, também, foi testada com relação a variação na concentração de tetraborato de sódio como apresentado na Figura 36 onde pode ser observado que a concentração de tetraborato de sódio que apresentou os maiores valores para o módulo elástico nas diferentes frequências utilizadas foi de 7 mg/ml, como obtido para a HXGRP. Valores de concentração de sal entre 3 e 7 mg/ml, bem como entre 7 e 10 mg/ml serão explorados em estudos futuros

Foram então preparados os complexos HXGRP-B e HXGFC-B em solução a 7 mg/ml de tetraborato de sódio contendo 0,33 mg de boroidreto de sódio em pH 9,8, com o objetivo de comparar as duas curvas de frequência.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 37. Nessa, pode ser observado que a galactoxiloglucana com massa molar maior origina uma solução mais viscoelástica, demonstrando que essa característica está correlacionada, também, com a massa molar do polissacarídeo.

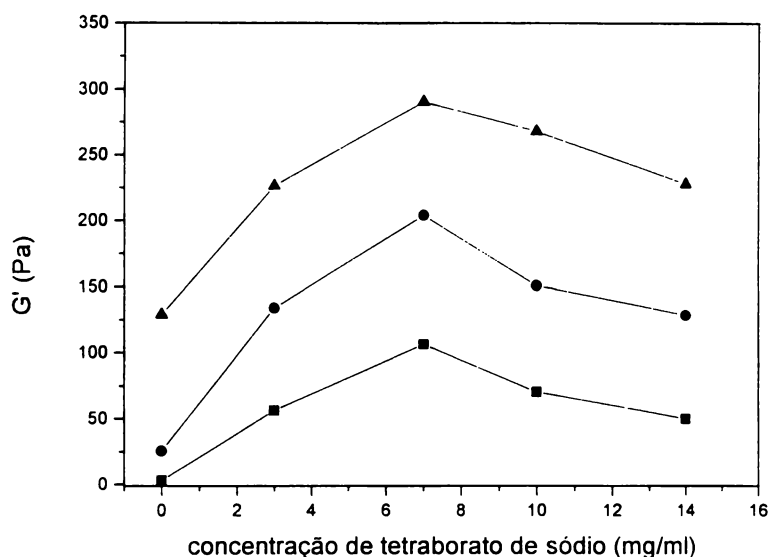


Figura 36 – Variação de G' versus a concentração de tetraborato de sódio para HXGFC (20 mg/ml) em diferentes frequências: (▲) 10, (●) 1 e (■) 0,1 Hz. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à 25°C.

Realizando-se análises através do modelo de Cox-Merz (Figura 38), com essas duas amostras pode-se observar que o sistema realmente não forma um gel fraco, tendo somente o aspecto de uma solução viscoelástica, uma vez que a viscosidade absoluta é maior que a viscosidade dinâmica (COX e MERZ, 1958; BOT *et al.*, 2001; HAN *et al.*, 2002; ROBERTS e CAMERON, 2002).

Para verificar os efeitos da variação de temperatura sobre a galactoxiloglucana isolada e os complexos galactoxiloglucana-tetraborato foram realizadas curvas de temperatura em diferentes taxas de aquecimento. Os resultados obtidos, com uma taxa de aquecimento de 1°C/min estão apresentadas na Figura 39 (A e B).

Na Figura 39-A, pode ser observado que os valores de G' e G'' decrescem com o aquecimento. No resfriamento, G'' aumenta com valores menores que os encontrados no processo de aquecimento, enquanto o G' é mais alto que no processo de aquecimento até uma temperatura de 55°C, quando torna-se menor, como o G'' . Esse aumento no módulo de armazenamento indica uma maior rigidez na molécula a essa temperatura.

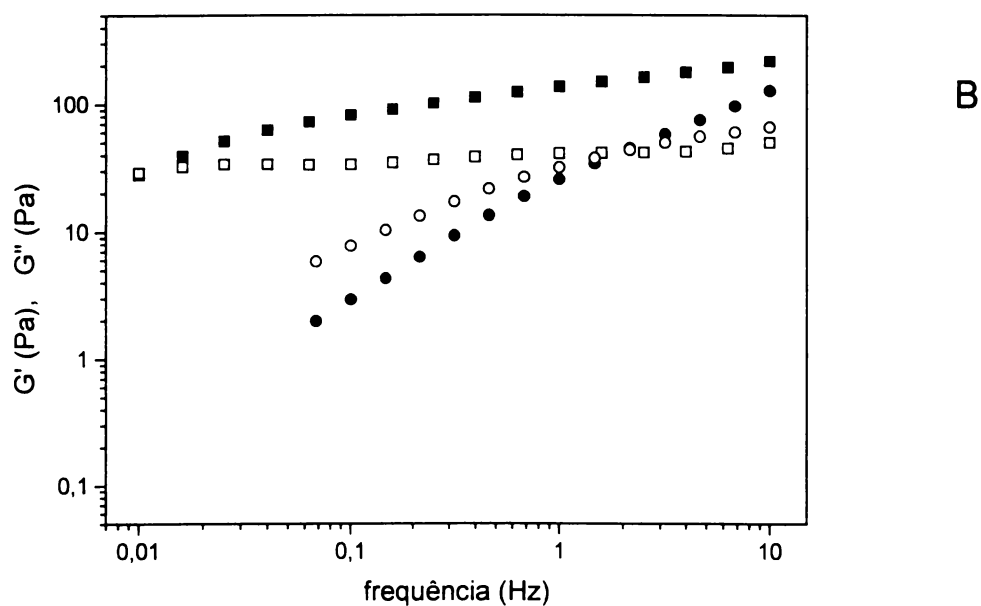
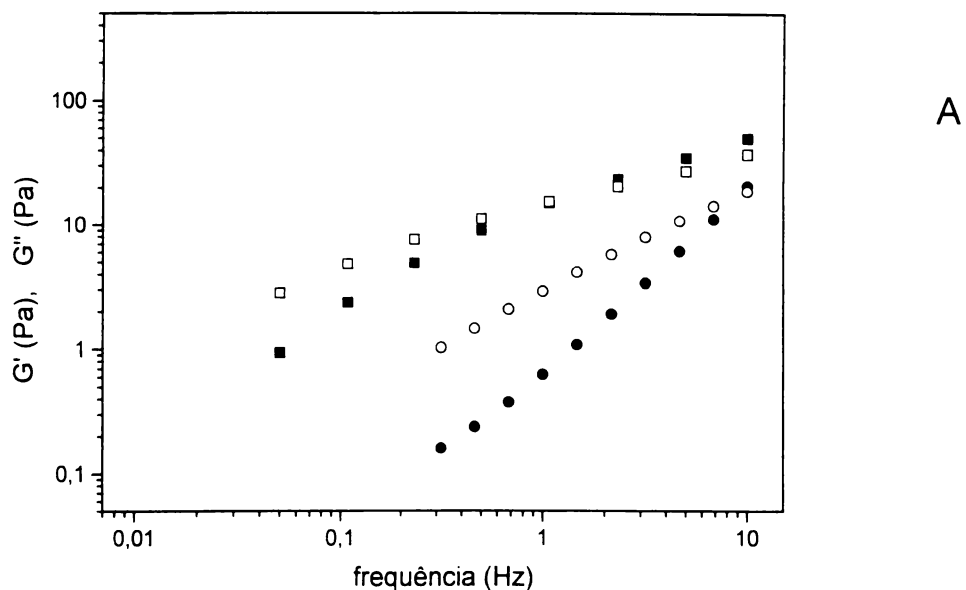


Figura 37 – Curvas de frequência da HXGRP (A) e HXGFC (B), ambas à 20 mg/ml em água (●) e em solução a 7 mg/ml de tetraborato de sódio, pH = 9,8 (■). G' símbolos abertos, G'' símbolos fechados. As leituras foram realizadas em reômetro TA Instruments AR 2000 com placa paralela de 20 mm ranhurada, à 25°C, exceto para HXGRP em água que foi lida em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2°, à mesma temperatura .

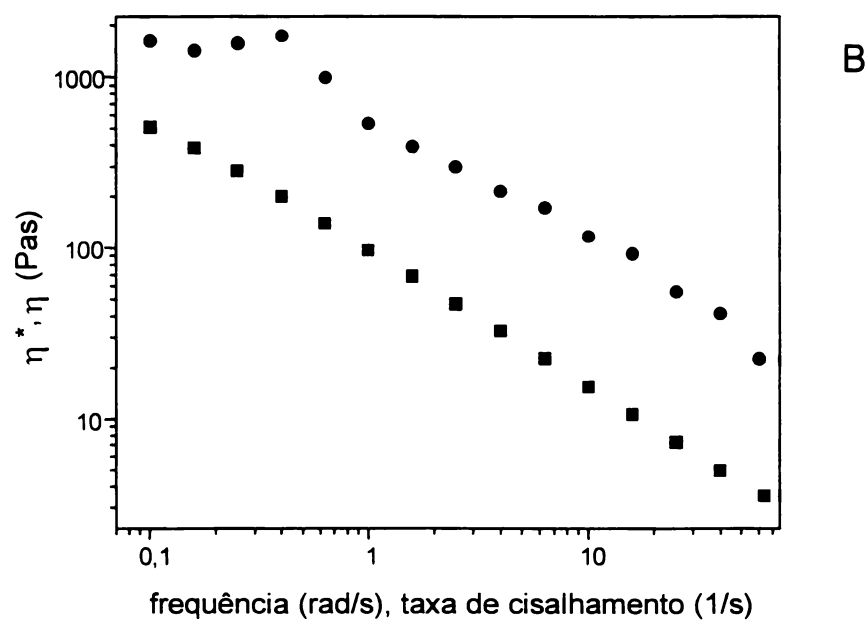
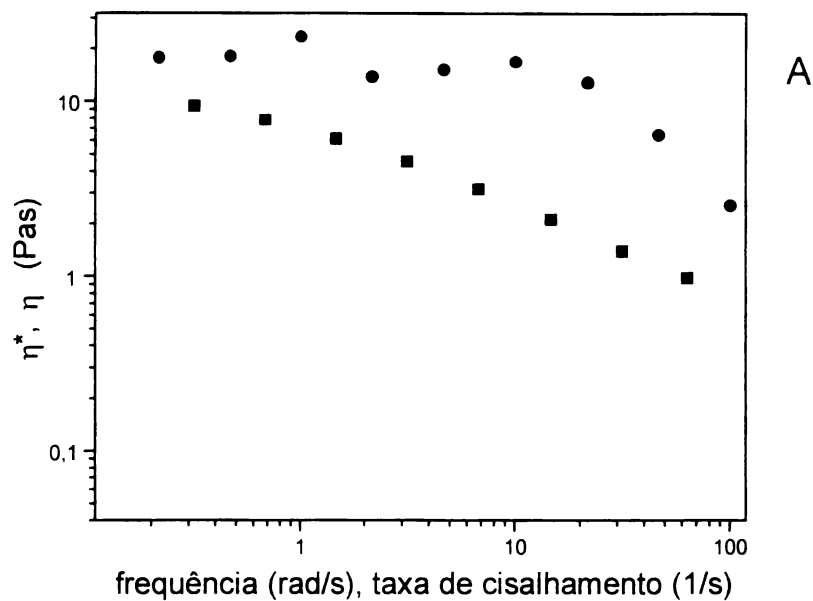


Figura 38 – Gráfico de Cox-Merz de HXGRP (A) e HXGFC (B), ambas a 20 mg/ml em solução a 7 mg/ml de tetraborato de sódio, pH = 9,8. (●) viscosidade absoluta (η), (■) viscosidade dinâmica (η^*). Leituras realizadas em reômetro TA Instruments AR 2000 com placa paralela de 20 mm ranhurada, à 25°C.

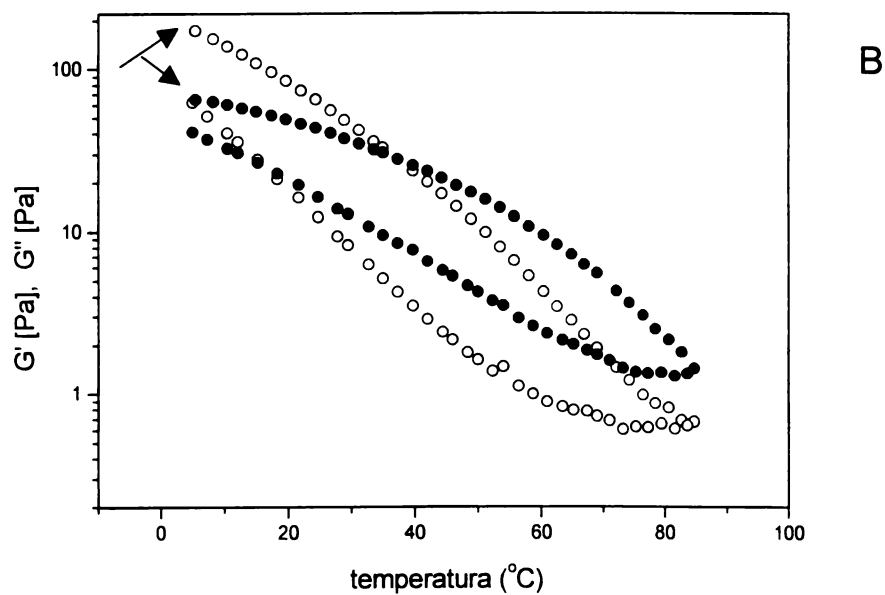
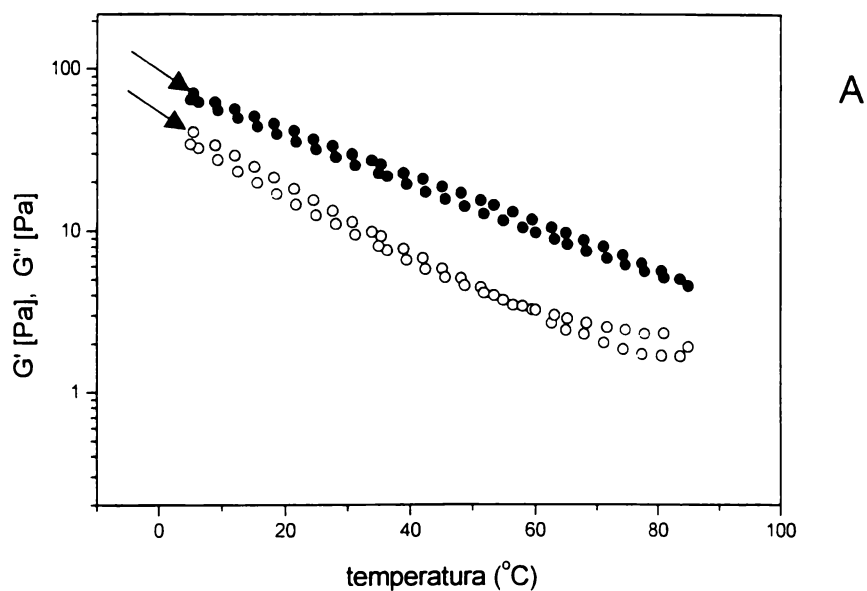


Figura 39 – Curvas de temperatura da HXGRP 40 mg/ml em água (A) a 1 Hz e 5% de deformação e do complexo HXGRP (30 mg/ml)-B (3 mg/ml) (B) a 1 Hz e 3% de deformação. G' símbolos abertos e G'' símbolos fechados. As setas indicam o início do processo de aquecimento. Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cone C60/2 $^{\circ}$.

Na Figura 39-B, sob a aplicação de uma tensão, pode-se observar que os valores de G' iniciam-se maiores que os de G'' durante o processo de aquecimento, até uma temperatura de aproximadamente 35°C , onde tornam-se menores do que os valores de G'' . Isso pode ser explicado desde que as reações de equilíbrio para os íons borato em água têm uma energia de ativação positiva, de forma que o número de ligações cruzadas diminui conforme a temperatura aumenta (KESAVAN e PRUD'HOMME, 1992). Isso também pode ser atribuído a quebra das ligações entre o polissacarídeo e os íons borato devido ao aumento da temperatura. Também, pode ser observado que as ligações cruzadas se regeneram durante o processo de resfriamento, mas o G' torna-se maior que o G'' somente a uma temperatura de aproximadamente 16°C , mas com valores menores que os observados no processo inicial. Quando essa amostra é mantida a 5°C por 2 horas e submetida à mesma análise, os valores de G' não retornam aos valores iniciais, mostrando que o aquecimento provoca alguma alteração na interação polissacarídeo-íons borato.

Na curva de temperatura da HXGFC (Figura 40-A) pode-se observar um comportamento diferente do obtido para HXGRP. Até a temperatura de 27°C os valores do módulo elástico são superiores aos do módulo viscoso, sendo que após essa temperatura ocorre uma inversão entre eles. Esse comportamento pode ser explicado pela maior massa molar da HXGFC, uma vez que em valores de M_w baixos, com cadeias poliméricas curtas, o tempo durante o qual as cadeias em solução permanecem entrelaçadas é curto, com um baixo tempo de relaxamento para a amostra. Com o aumento do M_w ocorre também um aumento no tempo no qual as cadeias em solução permanecem entrelaçadas, aumentando o tempo de relaxamento e a viscoelasticidade da amostra (FERGURSON e KEMBLOWSKI, 1991), como pode ser observado comparando-se as Figuras 39-A e 40-A.

Já na curva de temperatura do complexo HXGFC-B (Figura 40-B), foi observado que os módulos decrescem com o aumento da temperatura, como descrito para o complexo HXGRP-B, mas a inversão dos módulos G' e G'' ocorre em temperatura maior, em torno de 75°C , e no processo de resfriamento os valores de G' e G'' retornam aos mesmos valores apresentados durante o processo de aquecimento. A presença desse ponto de fusão alto sugere um comportamento de gel, embora nas análises pelo modelo de Cox-Merz esse complexo apresente um comportamento de solução.

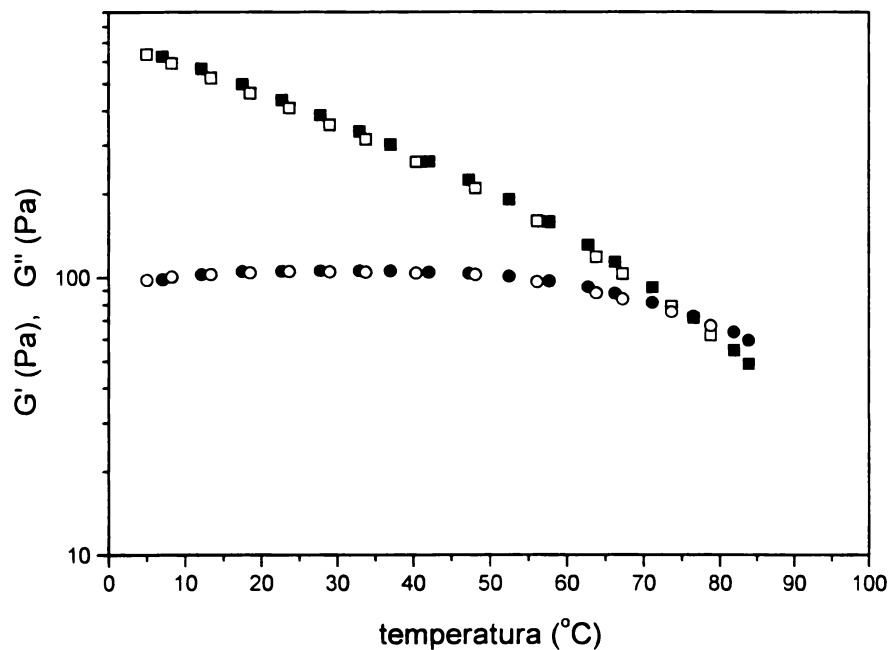
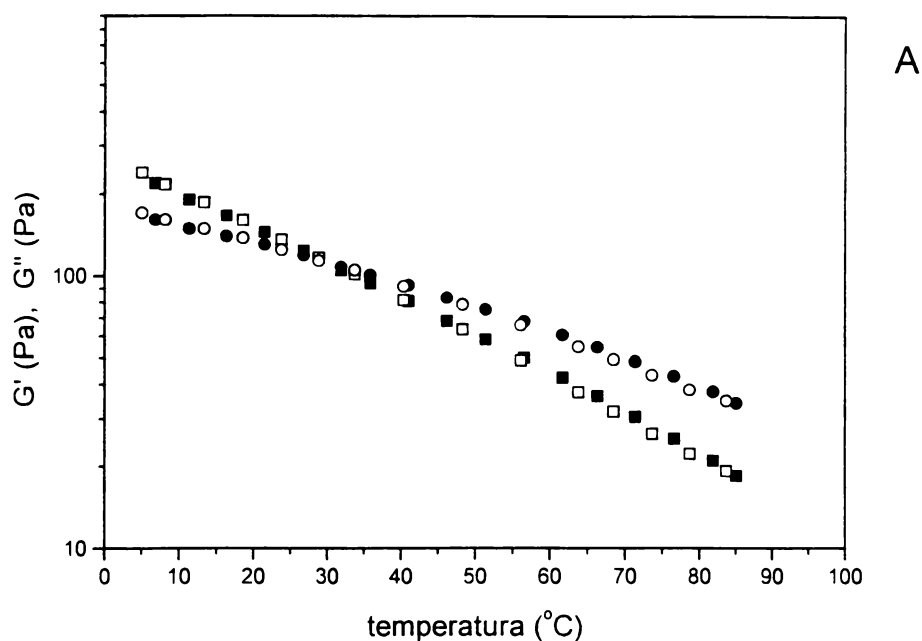


Figura 40 – Curva de temperatura da HXGFC 30 mg/ml em água a 1 Hz e 5% de deformação (A) e do complexo HXGFC (30 mg/ml)-B (3 mg/ml) a 1 Hz e 3% de deformação (B). G' (■) e G'' (●), processo de aquecimento (símbolos fechados), processo de resfriamento (símbolos abertos). Leituras realizadas em reômetro HAAKE RS 75, cones PP 35 Ti (A) e C60/2° (B).

Os resultados apresentados para as amostras complexadas ou não (Figuras 39 e 40) indicam que há diferenças entre os complexos formados pelos dois polímeros e no caso da HXGRP o processo de aquecimento realmente promove alguma alteração na estrutura da molécula, que não é observada para a HXGFC.

As curvas de temperatura da HXGRP com e sem tetraborato de sódio foram realizadas a diferentes taxas de aquecimento e resfriamento (5, 2,5, 1,0 e 0,5°C/min) e a histerese térmica observada foi maior, quanto menor foi a taxa de aquecimento, sugerindo que isso pode influenciar na organização do biopolímero com as moléculas de água e na desagregação das cadeias polissacarídicas.

4.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{11}B para metil β -D-galactopiranosídeo e complexo HXGRP-B

A espectroscopia de RMN de ^{11}B é útil para caracterizar os ésteres formados pela interação entre borato e dióis (van DUIN *et al.*, 1984; KANEKO *et al.*, 1997). Em diversos trabalhos essa técnica foi utilizada para caracterizar a ligação entre íons borato e unidades monossacarídicas em moléculas de polissacarídeos (O'NEILL *et al.*, 1996; YOSHIMURA *et al.*, 1996; KANEKO *et al.*, 1997; SHIM *et al.*, 1998; YOSHIMURA *et al.*, 1998).

Como em uma concentração maior que 0,025 mol/l são formados complexos de poliborato (BAES e MESMER, 1976, citados por YOSHIMURA *et al.*, 1996), os experimentos desse trabalho foram realizados em uma concentração de borato de 0,02 mol/l a fim de evitar a formação de tais complexos.

Em primeiro lugar foram realizados experimentos de RMN de ^{11}B do ácido bórico ou borato a diferentes pHs para que ficasse assegurado que os deslocamentos obtidos nos experimentos subsequentes não fossem devidos à uma variação de deslocamento do ácido bórico ou borato nesses diferentes pHs, mas sim devido à formação de complexos entre monossacarídeos e os íons borato.

Em pH $\sim 10,0$ onde foi observado a formação do melhor complexo entre borato e HXGRP por reologia e, portanto, o pH utilizado para os experimentos desse trabalho, o borato apresentou um deslocamento químico de $\delta -15,6$, como mostrado na Figura 41.

Como composto modelo foi utilizado o metil β -D-galactopiranosídeo que possui hidroxilas livres em posições propícias para a complexação com os íons borato. Estudos indicam que a glucose também pode formar complexos entre íons borato e as hidroxilas das posições 4 e 6 (KENNEDY e HOW, 1973). Como a posição 4 do anel de glucose faz parte das ligações da cadeia principal da HXGRP, esse complexo somente ocorreria nas unidades terminais não redutoras, ou seja, em pequenas quantidades. Com relação à complexos entre borato e xilose não foram encontrados dados na literatura. Entretanto, estudos subsequentes utilizando padrões de metil α -D-xilopiranosídeo e metil β -D-glucopiranosídeo também deverão ser realizados.

Para o padrão metil β -D-galactopiranosídeo, em pH 9,3 foram observados sinais em δ -9,6, -13,5, -18,1, -21,7 e -22,9 (Figura 42). Em pH 11,0 foram observados deslocamentos similares (dados não mostrados).

De acordo com os dados obtidos por van DUIN *et al.*, 1985 para diversos polióis e polihidroxicarboxilatos em solução aquosa alcalina, o sinal em δ -9,6 corresponde à formação de um complexo bidentado do tipo BD₂ entre as unidades do metil-monossacarídeo modelo, o sinal em δ -13,5 pode ser atribuído a um complexo α,β -bidentado do tipo BD e o sinal em δ -18,1 ao complexo α,γ -bidentado do tipo BD, sendo que esses dois tipos de complexo já foram apresentados para unidades de metil α -D-galactopiranosídeo por KENNEDY e HOW (1973), mas utilizando Me₂O.BF₃ como referência externa. Os sinais em δ -21,7 e -22,9 não foram encontrados em dados da literatura, portanto serão necessários estudos complementares para fazer as devidas atribuições.

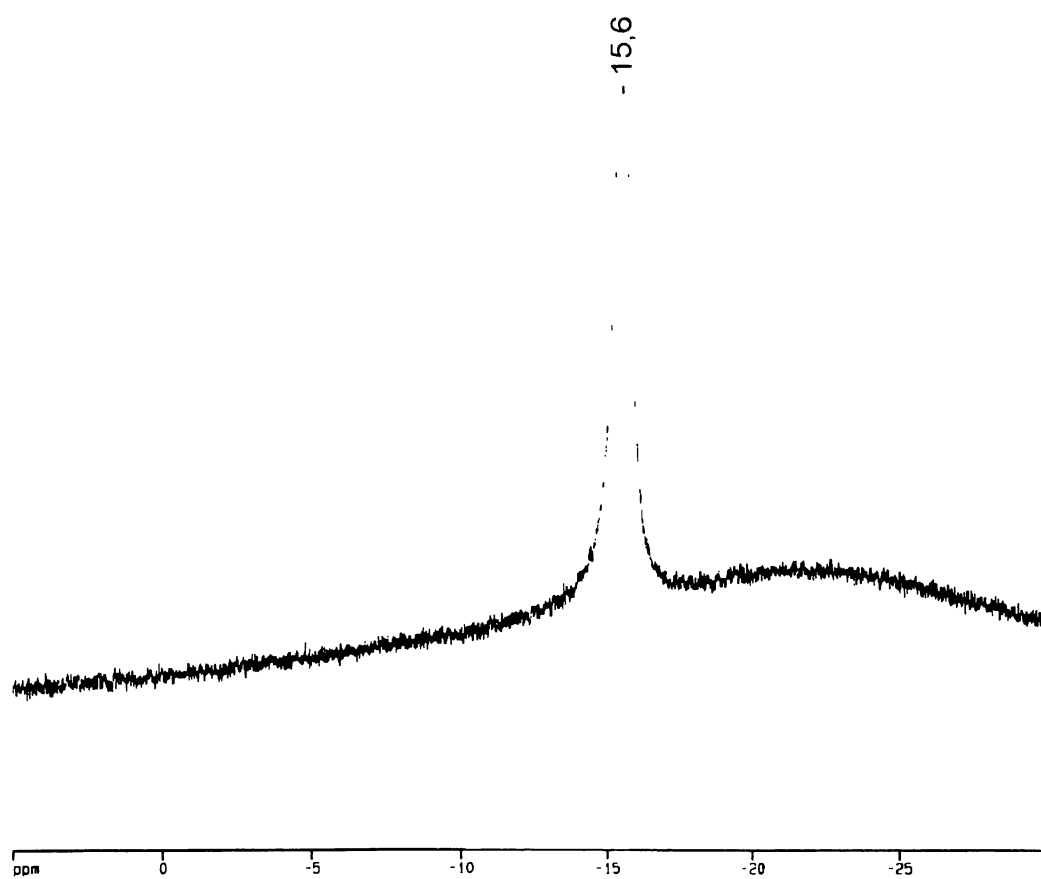


Figura 41 - Espectro de RMN de ^{11}B do borato em D_2O , pH 10,0 30°C, os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

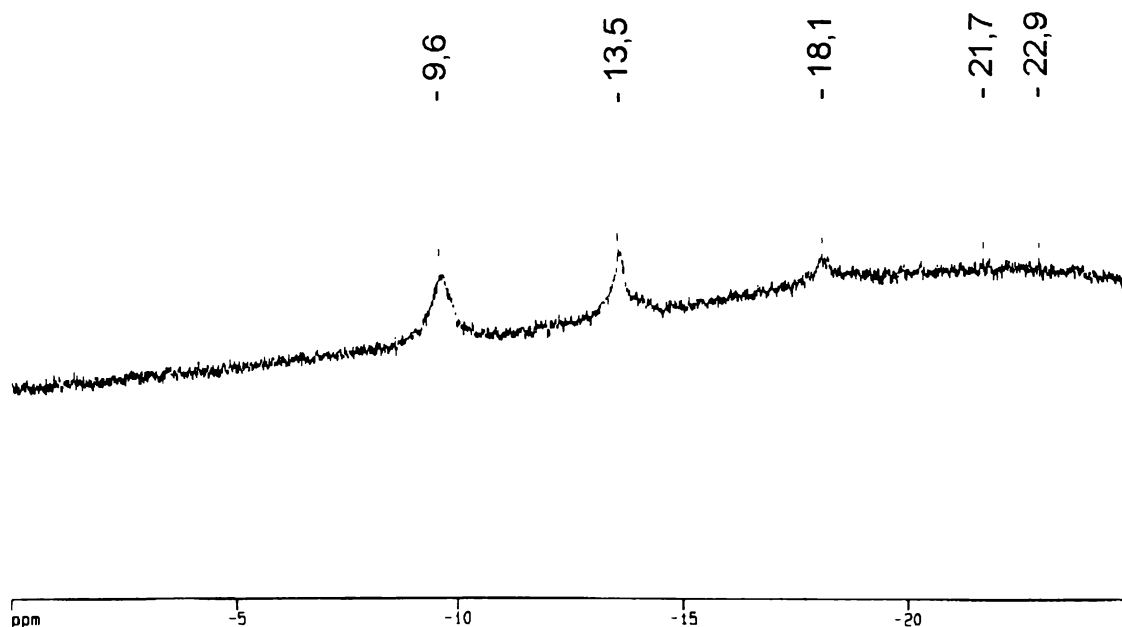


Figura 42 - Espectro de RMN de ^{11}B para o borato e metil β -D-galactopiranosídeo em D_2O , pH 9,3, 30°C , os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

Na amostra de HXGRP, pH 9,8 (Figura 43) foram observados os sinais de δ -12,5, -13,5 e -21,5. Sinais entre δ -12,5 e -14,9 podem ser atribuídos à formação de um complexo do tipo α,β -bidentado do tipo BD. O sinal em δ -13,5 provavelmente é devido à complexação do borato com a unidade de β -D-galactose, uma vez que não houve variação de deslocamento entre o composto modelo utilizado e o polissacarídeo. O sinal em δ -21,5 não foi identificado por dados da literatura. Entre esses há um pequeno sinal que poderia ser atribuído à um complexo do tipo BD_2 .

A formação de um complexo do tipo BD justifica o comportamento reológico do polímero complexado que não forma um gel verdadeiro e sim uma solução

viscoelástica. Os íons borato ligados à cadeia lateral do polissacarídeo, mas não fazendo ligações cruzadas entre elas, podem atrapalhar o movimento das cadeias aumentando o seu tempo de difusão e, como consequência, a viscoelasticidade do complexo quando comparado com a amostra não complexada. Para a formação de um gel seria necessário que se estabelecessem ligações cruzadas entre as cadeias, o que não ocorreu pois não foram observados sinais na região entre δ -7,7 e -11,9 ou entre δ -18,4 e -19,0 que seriam referentes a complexos do tipo BD_2 α,β e α,γ , respectivamente.

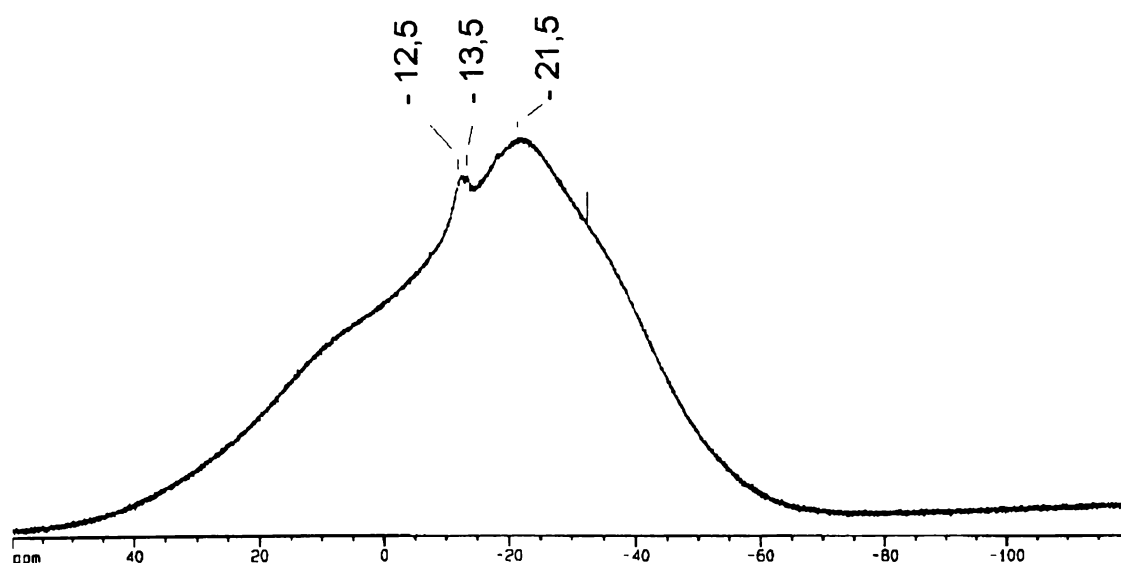


Figura 43 - Espectro de RMN de ^{11}B do complexo HXGRP-B em D_2O , pH 9,8, 30°C , os deslocamentos são expressos em (δ) ppm.

4.8. Análise termogravimétrica (TGA) da HXGRP e dos complexos HXGRP-B:

Através das análises reológicas e de RMN de ^{11}B comprovou-se a interação entre a HXGRP e os íons borato em solução. Visando um melhor entendimento dessa interação, foram realizados ensaios termogravimétricos de amostras liofilizadas da HXGRP isolada e do complexo formado em solução de tetraborato de sódio (HXGRP-B).

As curvas de TGA para materiais complexos como polímeros não podem ser interpretadas, à primeira vista, em termos das reações exatas que estão ocorrendo, entretanto, podem refletir a “impressão digital” do material (BROWN, 1988).

Na Figura 44 estão apresentadas as curvas termogravimétricas dos polímeros analisados e na Tabela 10 os dados relativos à decomposição dos mesmos, extraídos a partir da Figura 44.

Pode ser observado que a HXGRP é degradada mais rapidamente do que a complexada, e que a diferença entre a temperatura de início do processo de degradação é pouco significativa, isto é, 305,8°C para HXGRP e 319,4°C para o complexo HXGRP-B.

A degradação da HXGRP e do complexo HXGRP-B ocorre em uma etapa única, como pode ser confirmado aplicando-se a derivada aos dados da Figura 44 (dados não mostrados). Na região entre 20 e 150°C, o sistema HXGRP-B perde mais água que HXGRP (14,1 e 6,7%, respectivamente) indicando, assim, que o complexo retém mais água em sua estrutura que o polissacarídeo isolado após a liofilização.

Pode-se observar ainda na Figura 44 que a HXGRP foi degradada quase completamente à temperatura de 800°C, e o mesmo não foi observado para HXGRP-B. Essa diferença na porcentagem de degradação corresponde exatamente à massa de tetraborato de sódio presente na amostra que, como material inorgânico, deve degradar somente a uma temperatura superior a 800°C.

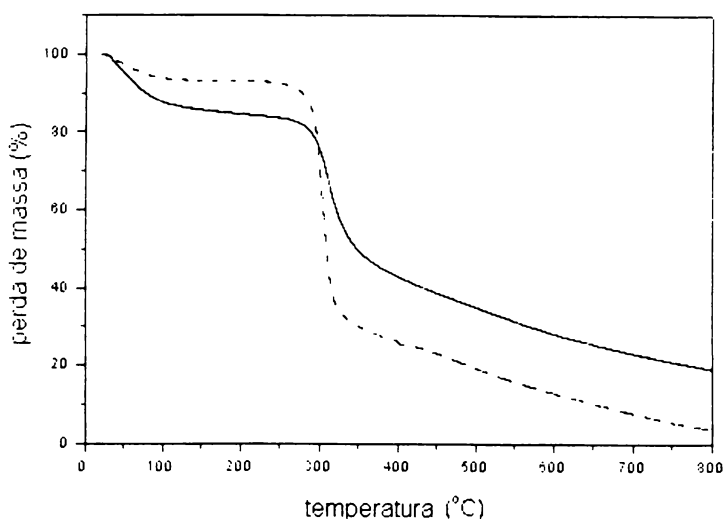


Figura 44 – Curva termogravimétrica da HXGRP (linha pontilhada) e do complexo HXGRP-B (linha contínua).

Tabela 10 - Dados de decomposição térmica (TGA e DTG) para HXGRP e complexo HXGRP-B.

Amostra	Estágio	Intervalo de temperatura (°C)	Ponto médio (°C)	Perda de massa (%)
HXGRP	1	20-150	56,3	6,7
	2	200-450	305,9	70,1
HXGRP-B	1	20-150	61,3	14,1
	2	200-450	319,4	46,0

Na análise cinética dos dados termogravimétricos o gráfico de $\ln K \times 1/T$ foi utilizado para obter a E_a (energia de ativação) (OZAWA, 1965) em função de diferentes valores de α , onde α é a porcentagem de degradação do material, extrapolados a partir da Figura 44. Os resultados ilustrados na Figura 45 mostram que a E_a para o complexo HXGRP-B é maior que para a HXGRP até aproximadamente 43% de degradação, sendo que depois disso ocorre um decréscimo atingindo um valor mínimo a 60%. Também observa-se que a E_a do polissacarídeo isolado se mantém praticamente constante até aproximadamente 50% de degradação, após o que aumenta muito pouco.

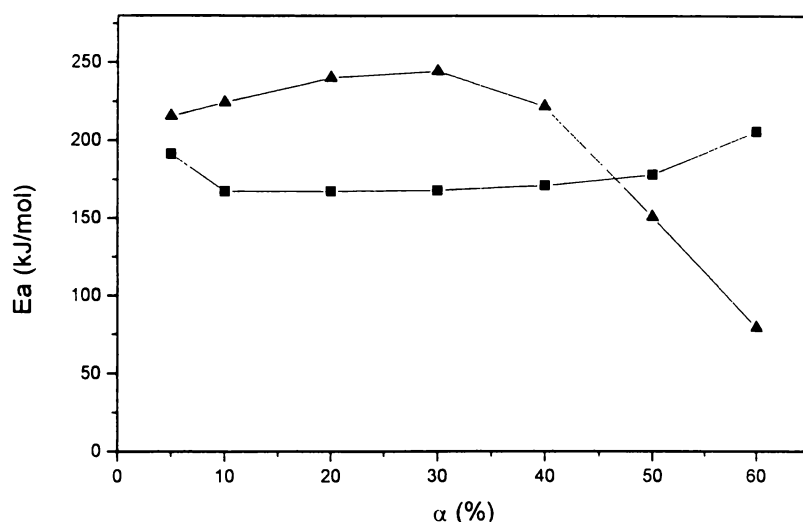


Figura 45 - Energia de ativação em função da porcentagem de degradação para a HXGRP (■) e complexo HXGRP-B (▲).

Esses resultados confirmam que o complexo HXGRP-B é degradado mais lentamente que a HXGRP. Esse comportamento pode ser relacionado com o fato de que os íons borato por estarem ligados aos grupamentos hidroxila em C-6 e/ou em posição axial das unidades de monossacarídeos, podem alterar o mecanismo de degradação do carboidrato, tornando-o mais lento (TANG e NEILL, 1964).

A partir dos resultados apresentados nessa etapa, pode-se concluir que o complexo HXGRP-B se mantém mesmo no estado sólido, e que há diferenças interessantes entre a cinética de degradação dos polímeros complexado e não complexado, abrindo perspectivas para estudos complementares futuros.

5. CONCLUSÕES

Tendo por base os dados apresentados nesse trabalho pôde-se chegar às seguintes conclusões:

5.1. A galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá) estudada no presente trabalho apresenta os seguintes grupos oligossacarídicos: XXG, XXXG, XLG, LLLG, XXXXG, XXXLG, XLXXG e XXLXG, sendo que os encontrados em maior proporção são o octassacarídeo XLG (47 mol%), o nonassacarídeo XXXXG (23 mol%) e o decassacarídeo XXXLG (14 mol%).

5.2. As análises de RMN mono- e bidimensionais permitiram o assinalamento de alguns ^1H e ^{13}C das unidades monossacarídicas da galactoxiloglucana utilizada no presente trabalho, mas não permitiu obter as posições das ligações ou outros dados que contribuíssem para a elucidação da estrutura fina do polímero.

5.3. A análise de metilação indica a presença de unidades de xilose substituídas na posição 4, fato não reportado previamente na literatura, para xiloglucanas.

5.4. A galactoxiloglucana oxidada apresentou várias modificações no seu espectro de ^{13}C RMN, incluindo o aparecimento de um sinal na região de $\delta 175$ referente à carboxila, indicando a formação de ácido urônico. Através da quantidade de ácido urônico obtida por dosagem colorimétrica e análise do espectro de RMN de ^{13}C , pode-se sugerir a formação de ácido galacturônico.

5.5. A diminuição de um sinal do espectro de DEPT-135 do material oxidado, não atribuído a nenhum carbono do material nativo quando esse foi analisado comparativamente com os assinalamentos obtidos por YORK *et al.* (1993), e sua diminuição também no espectro de DEPT-135 do material tratado com a β -galactosidase, sugere que ele pertença ao C-6 de unidades de galactose ligadas na posição 4 de unidades de xilose.

5.6. A viscosidade absoluta da galactoxiloglucana diminui após o aquecimento, uma alteração na hidrofobicidade da amostra após o aquecimento é demonstrada por análises de fluorescência de uma sonda de pireno, e análises por HPSEC-MALLS sugerem a presença de agregados moleculares no material nativo como explicação para tal comportamento.

5.7. A adição de íons borato às soluções de galactoxiloglucana aumentam a sua viscosidade, bem como o seu carácter viscoelástico, comportamento que pode ser explicado pela inibição do fenómeno da reptação.

5.8. A viscoelasticidade da amostra varia conforme a concentração de íons borato e o pH. Para a galactoxiloglucana na concentração de 20 mg/ml, a melhor resposta foi observada com uma concentração de tetraborato de sódio de 7 mg/ml e pH 9,8, independente da M_w do polímero.

5.9. Na análise comparativa entre as duas amostras observa-se que a de maior massa molar apresenta os valores dos módulos elásticos e viscoso bem maiores que a de menor massa molar, mas por análises de Cox-Merz nenhuma apresentou comportamento de gel.

5.10. O tratamento térmico afeta os valores de G' e G'' de ambas as amostras, e as curvas de aquecimento-resfriamento apresentam características distintas para cada uma com relação à temperatura de fusão-solidificação, comportamento que deverá ser explorado em estudos futuros.

5.11. Por análises de RMN de ^{11}B do complexo galactoxiloglucana-borato em comparação com o complexo metil β -D-galactopiranosídeo-borato observa-se a formação de complexos do tipo BD, justificando a formação de uma solução viscoelástica e não a de um gel.

5.12. As análises termogravimétricas da galactoxiloglucana, bem como do seu complexo com borato, no estado sólido, demonstram que o complexo persiste e apresenta diferenças em sua cinética de degradação, quando comparado com o polímero não complexado.

5.13. Pelas propriedades apresentadas, os complexos poderiam ser testados como catalisadores de reações aldólicas assimétricas (CORRÊA e PILLI, 2003), ou, principalmente o obtido com a galactoxiloglucana com maior M_w , poderia ser testado para utilização, de forma similar ao guar ou HPG, na indústria de petróleo (TAYAL *et al.*, 1999) .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.A. Acid hydrolysis of weak linkages. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 285-287, 1965.

ANGYAL, S.J.; McHUGH, D.J. Paper ionophoresis, complex formation with borate, and the rate of periodic acid oxidations. **J. Chem. Soc.**, London, p.1423-1431, 1957.

ANGYAL, S.J.; McHUGH, D.J. *cis*-Inositol, a 1,3,5-triaxially substituted cyclohexane derivative. **Chem. Ind.**, London, p. 947-948, 1955.

BABA, K.; SONE, Y.; MISAKI, A.; HAYASHI, T. Localizations of xyloglucan in the macromolecular complex composed of xyloglucan and cellulose in pea stems. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v. 35, n. 3, p. 439-444, 1994.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology.** Amsterdam: Elsevier, 1989, p. 4-6.

BARTODZIEJSKA, B.; SHASHKOV, A.S.; BABICKA, D.; GRACHEV, A.A.; TORZEWSKA, A.; PARAMONOV, N.A.; CHERNYAK, A.Y.; ROZALSKI, A.; KNIREL, Y.A. Structural and serological studies on a new acidic O-specific polysaccharide of *Proteus vulgaris* O32. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 256, p. 488-493, 1998.

BEER, M.U.; WOOD, P.J.; WEISZ, J. A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear tandom coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 39, p. 377-380, 1999.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acid. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 54, p. 484-489, 1973.

BÖESEKEN, J.; van ROSSEN, A. Configuration of ring systems. **Rec. Trav. Chim.**, The Hague, v.30, p. 392-406, 1912.

BOT, A.; SMORENBURG, H.E.; VREEKER, R.; PÂQUES, M.; CLARK, A.H. Melting behaviour of schizophyllan extracelular polysaccharide gels in the temperature range between 5 and 20°C. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 45, p. 363-372, 2001.

BRACINI, I.; DU PENHOAT, C.H.; MICHON, V.; GOLDBERG, R.; CLOCHARD, M.; JARVIS, M.C.; HUANG, Z.-H.; GAGE, D.A. Structural analysis of cyclamen seed xyloglucan oligosaccharides using cellulase digestion and spectroscopic methods. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 276, p. 167-181, 1995.

BROWN, M. E. **Introduction to thermal analysis.** London: Chapman and Hall, 1988, p. 17-18.

BUCKERIDGE, M.S.; ROCHA, D.C.; GRANT REID, J.S.; DIETRICH, M.C. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savana and forest populations. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v.86, p. 145-151, 1992.

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

BUSATO, A.P. **Polissacarídeos de folhas de *Hymenaea courbaril* (Jatobá)**. Curitiba, 1999. 129 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BUSATO, A.P.; VARGAS-RECHIA, C.G.; REICHER, F. Xyloglucan from the leaves of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, Oxon, v. 58, p. 525-531, 2001.

CARPITA, N.C.; SHEA, E.M. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C.J.; MCGINNIS, G.D. **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Boca Raton: CRC Press, 1989, p. 157-216.

CHEE, C.K.; RIMMER, S.; SOUTAR, I. SWANSON, L. Fluorescence investigations of the thermally induced conformational transition of poly(*N*-isopropylacrylamide). **Polymer**, Oxford, v. 42, p. 5079-5087, 2001.

CIUCANU, J.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v.13, p. 209-217, 1984.

CORRÊA, I.R.; PILLI, R.A. Reações aldólicas assimétricas catalíticas, **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 531-541, 2003.

COX, W.P.; MERZ, E.H. Correlation of dynamic and steady flow viscosities. **J. Polym. Sci.**, New York, v. 28, n. 118, p. 619-622, 1958.

CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Oligosaccharins, brassinolides and jasmonates: nontraditional regulators of plant growth, development and gene expression. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 1211-1223, 1997.

CUTILLAS-ITURRALDE, A.; PEÑA, M.J.; ZARRA, I.; LORENCES, E.P. A xyloglucan from persimmon fruit cell walls. **Phytochemistry**, Oxon, v. 48, n. 4, p. 607-610, 1998.

DAINIPPON PHARM CO LTD (DAIN). **Preparation of wheat flour processed food such as noodles, Japanese noodle and Chinese dumpling – involves adding wheat flour with galactoxyloglucan having reversilble thermal response property in which galactose side chains are removed partially**. A23L-001/16; C08B-037/00. JP 11332491-A. 07 December 1999. DERWENT Innovations Index. Disponível em: <http://dii8.isiknowledge.com/CIW.cgi> Acesso em: 27/02/2003.

DAINIPPON PHARM CO LTD (DAIN). **Preparation of rice cake or dumpling, involves adding thermally reversible galactoxyloglucan with partially removed galactose side chain, to starch raw material.** A23G-003/00; A23L-001/10. JP2001252032-A. 18 September 2001. DERWENT Innovations Index. Disponível em: <http://dii8.isiknowledge.com/CIW.cgi> Acesso em: 27/02/2003.

de GENNES, P.G. Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacles. **J. Chem. Phys.**, New York, v. 55, p. 572-579, 1971.

DEBI, B.R.; MUSHIDA, J.; TAKETA, S.; MIYAO, A.; HIROCHIKA, H.; ICHII, M. Isolation and characterization of a short lateral root mutant in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Sci.**, Oxon, v. 165, n. 4, p. 895-903, 2003.

de NOOY, A.E.J.; BESEMER, A.C.; VAN BEKKUM, H.; VAN DIJK, J.A.P.P.; SMIT, J.A.M. TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on the dimensions of the obtained polyelectrolyte chains. **Macromolecules**, Washington, v. 29, p. 6541-6547, 1996.

DEUEL, H.; NEUKOM, H. The reaction of boric acid and borax with polysaccharides and other high-molecular polyhydroxy compounds. **Makromol. Chem.**, Switzerland, v.3, p. 13-30, 1949.

DEUEL, H.; NEUKOM, H.; WEBER, F. Reaction of boric acid with polysaccharides. **Nature**, London, v. 161, n. 4081, p. 96-97, 1948.

DOI, M.; EDWARDS, S.F. **The theory of polymer dynamics**. Oxford: Clarendon, 1986 (reprinted 1994). p.189-190.

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

DUNAND, C.; GAUTIER, C.; CHAMBAT, G. LIÉNART, Y. Characterization of the binding of α -L-Fuc(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Gal(1 $\rightarrow$), a xyloglucan signal, in blackberry protoplasts. **Plant Sci.**, Oxon, v. 151, p. 183-192, 2000.

EDASHIGE, Y.; ISHII, T. Hemicellulosic polysaccharides from bamboo shoot cell-walls. **Phytochemistry**, Oxon, v. 49, n. 6, p. 1675-1682, 1998.

FAIK, A.; DESVEAUX, D.; MacCLACHLAN, G. Enzymic activities responsible for xyloglucan depolymerization in extracts of developing tomato fruit. **Phytochemistry**, Oxon, v. 49, n. 2, p. 365-376, 1998.

FEMENIA, A.; RIGBY, N.M.; SELVENDRAN, R.R.; WALDRON, K.W. Investigation of the occurrence of pectic-xylan-xyloglucan complexes in the cell walls of cauliflower stem tissues. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v.39, p. 151-164, 1999a.

FEMENIA, A.; WALDRON, K.W.; ROBERTSON, J.A.; SELVENDRAN, R.R. Compositional and structural modification of the cell wall of cauliflower (*Brassica*

oleracea L. var *botrytis*) during tissue development and plant maturation. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 39, p. 101-108, 1999b.

FERGUSON, J.; KEMBLOWSKI, Z. **Applied fluid rheology**. London: Elsevier Science Publishers, 1991, p. 149-150, 183.

FREITAS, R.A. **Estrutura e interação de galactoxiloglucana-amido**. Curitiba, 2000. 88 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FREITAS, R.A.; GORIN, P.A.J.; NEVES, J.; SIERAKOWSKI, M.-R. A rheological description of mixtures of a galactoxyloglucan with high amylose and waxy corn starches. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 51, p. 25-32, 2003a.

FREITAS, R.A.; MARTIN, S.; SANTOS, G.L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M.S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources as support to the hypothesis of molecular aggregates. Submetido à revista **Polymer**, 2003b.

FRY, S.C.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J.; KATO, Y.; LORENCES, E.P.; MacLACHLAN, G.A.; McNEIL, M.; MORT, A.J.; REID, J.S.G.; SITA, H.U.; SELVENDRAN, R.R.; VORAGEN, A.G. WHITE, A. An unambiguous nomenclature for xyloglucan derived oligosaccharides. **Physiol. Plant.**, Copenhagen, v. 89, p. 1-3, 1993.

FUJITA, H. **Polymer Solutions**. Amsterdam: Elsevier, 1990 (reprinted 1997), p. 236.

GEY, C.; NOBLE, O.; PEREZ, S.; TARAVEL, F.R. Complexes of borate ions with guar D-galacto-D-mannan polymer and related model compounds. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 173, p. 175-184, 1988.

GHOSE, T.P.; KRISHNA, S. "Gum taminda", a new substitute for gum tragacanth or carob-bean gum. **Indian Textile J.**, Bombay, v. 56, p. 506-508, 1946.

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

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. C-13 magnetic resonance spectroscopic evidence for formation of borate complexes of polyhydroxy compounds. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 27, p.325-339, 1973.

GRISEL, M.; MULLER, G. Rheological properties of schizophyllan in presence of borate ions. **Progress in Colloid Polymer Science**, Darmstadt, v. 102, p. 32-37, 1996.

HAN, X.-Z.; CAMPANELLA, O.H.; GUAN, H.; KEELING, P.L.; HAMAKER, B.R. Influence of maize starch granule-associated protein on rheological properties of

starch pastes. Part II. Dynamic measurements of viscoelastic properties of starch pastes. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 49, p. 323-330, 2002.

HANTUS, S.; PAULY, M.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P.; YORK, W.S. Structural characterization of novel L-galactose-containing oligosaccharide subunits of jojoba seeds xyloglucans. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 304, p. 11-20, 1997.

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

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

HAYASHI, T.; MacLACHLAN, G. Pea xyloglucan and cellulose. I. Macromolecular organization. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 75, p. 596-604, 1984.

HAYASHI, T.; MARSDEN, M.P.F.; DELMER, D.P. Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interaction *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 83, p. 384-389, 1987.

HAYASHI, T.; TAKUMI, T.; OGAWA, K.; MITSUISHI, Y. Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v. 35, n. 6, p. 893-899, 1994.

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

HENSEL, A.; SCHMIDGALL, J.; KREIS, W. Extracellular polysaccharides produced by suspension-cultured cells from *Digitalis lanata*. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 63, p. 441-445, 1997.

HENSEL, A.; SCHMIDGALL, J.; KREIS, W. The plant cell wall – a potential source for pharmacologically active polysaccharides. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 73, p. 37-43, 1998.

HISAMATSU, M.; IMPALLOMENI, G.; YORK, W.S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. A new undecasaccharide subunit of xyloglucans with two α -L-fucosyl residues. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 211, p. 117-129, 1991.

HISAMATSU, M.; YORK, W.S.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Characterization of seven xyloglucan oligosaccharides containing from seventeen to twenty glycosyl residues. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 227, p. 45-71, 1992.

HUISMAN, M.M.H.; WEEL, K.G.C.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Xyloglucan from soybean (*Glycine max*) meal is composed of XXXG-type building units. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 42, p. 185-191, 2000.

IGARTUBURU, J.M.; PANDO, E.; LUIS, R.; GIL-SERRANO, A. An acidic xyloglucan from grape skins. **Phytochemistry**, Oxon, v. 46, n. 8, p. 1307-1312, 1997.

ISELL, H.S.; BREWSTER, J.F.; HOLT, N.B.; FRUSH, H.L. Behavior of certain sugars and sugar alcohols in the presence of tetraborates-correlation of optical rotation and compound formation. **J. Res. Natl. Bur. Stand.**, Washington, v.40, p. 129-149, 1948.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan-II complex from walls of sugar beet pulp. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 284, p. 1-9, 1996.

JAMES, W.D. Biosynthesis of polysaccharides. In ASPINALL, G.O. **The polysaccharides: theory and applications**. London: Academic Press, 1985. v. 3, p. 146-147.

JANSSON, P.E.; KENNE, L.; LIEGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**, Stockholm, n. 8, p.1-70, 1976.

JONES, C. Nmr studies of phosphoinositol oligosaccharides from protozoa. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 262-272, 1994.

JONES, J.K.N.; STOODLEY, R.J. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 5, p. 36-38, 1965.

JOSELEAU, J.P.; CARTIER, N.; CHAMBAT, G.; FAIK, A.; RUEL, K. Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. **Biochimie**, Paris, v. 74, p. 81-88, 1992.

KAKEGAWA, K.; EDASHIGE, Y.; ISHII, T. Xyloglucan from xylem-differentiating zones of *Cryptomeria japonica*. **Phytochemistry**, Oxon, v. 47, n. 5, p. 767-771, 1998.

KALYANASUNDARAM, K.; THOMAS, J.K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 99, n. 7, p. 2039-2044, 1977.

KANEKO, S.; ISHII, T.; MATSUNAGA, T. A boron-rhamnogalacturonan-II complex from bamboo shoot cell walls. **Phytochemistry**, Oxon, v. 44, n. 2, p. 243-248, 1997.

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

KEJUN, Y.; GUOWEI, E. Synthesis and rheological properties in aqueous solution of poly(acrylamide-co-sodium allylsulfonate). **J. Appl. Polym. Sci.**, Chichester, v. 44, p. 1-7, 1992.

KENNEDY, G.R.; HOW, M.J. The interaction of sugars with borate: an N.M.R. spectroscopic study. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 28, p. 13-19, 1973.

KESAVAN, S.; PRUD'HOMME, R.K. Rheology of guar and HPG cross-linked by borate. **Macromolecules**, Washington, v. 25, p. 2026-2032, 1992.

KIEFER, L.L.; YORK, W.S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Structural characterization of an arabinose-containing heptadecasacchride enzymically isolated from sycamore extracellular xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 197, p. 139-158, 1990.

KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LÖW, I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glikosiden. **Angew. Chem.**, Deerfield Beach, v. 67, n.1, p. 32, 1955.

LAHAYE, M.; AXELOS, M.A.V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva* spp.) **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 22, p. 262-265, 1993.

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

LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. London: Black Academic and Professional, 1995.

LEIBLER, L.; RUBINSTEIN, M.; COLBY, R.H. Dynamics of reversible networks. **Macromolecules**, Washington, v. 24, p. 4701-4707, 1991.

LENK, R.S. **Polymer Rheology**. London: Applied Science Publishers, 1978.

LEVY, S.; YORK, W.S.; STRUIKE-PRILL, R.; MEYER, B.; STAEHELIN, L.A. Simulations of the static and dynamic molecular conformations of xyloglucan. The role of the fucosylated side chain in surface-specific side chain folding. **Plant J.**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 195-215, 1991.

LEVY, S.; MacLACHLAN, G.; STAEHELIN, L.A. Xyloglucan side chains modulate binding to cellulose during *in vitro* binding assays as predicted by conformational dynamic simulations. **Plant J.**, Oxford, v. 11, p. 373-386, 1997.

LIMA, D.U.; BUCKERIDGE, M.S. Interaction between cellulose and storage xyloglucans: the influence of the degree of galactosylation. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 46, p. 157-163, 2001.

LIMA, D.U.; OLIVEIRA, R.C.; BUCKERIDGE, M.S. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 52, p. 367-373, 2003.

LIMA, N.N. **Estudo do polissacarídeo de semente de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Jatobá)**. Curitiba, 1993. 107 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

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

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

LIMA-NISHIMURA, N. **Utilização da xiloglucana extraída de sementes de *Hymenaea courbaril* L. em géis para micropropagação de cenoura, café e macieira.** Curitiba, 2002. 82 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica.** Rio de Janeiro: e-papers, 2001, p. 137-138.

MacGREGOR, E.A.; GREENWOOD, C.T. Polysaccharides. In: _____. **Polymers in nature.** Chichester: John Wiley & Sons, 1980. p. 297.

MARRY, M.; CAVALIER, D.M.; SCHNURR, J.K.; NETLAND, J.; YANG, Z.; PEZESHK, V.; YORK, W.S.; PAULY, M.; WHITE, A.R. Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 51, p. 347-356, 2003.

MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: estrutura, modificações e propriedades.** Curitiba, 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MAZUREK, M.; PERLIN, A.S. Borate complexing by five-membered-ring *vic*-diols. **Can. J. Chem.**, Ottawa, v. 41, n. 10, p. 2403-2411, 1963.

MAcCANN, M.C.; WELLS, B.; ROBERTS, K. Direct visualization of cross-links in the primary cell wall. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v. 96, p. 323-334, 1990.

MEHRLÄNDER, K.; DIETRICH, H.; SEMBRIES, S.; DONGOWSKI, G.; WILL, F. Structural characterization of oligosaccharides and polysaccharides from apple juices produced by enzymatic pomace liquefaction. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 50, p. 1230-1236, 2002.

MILAS, M. Polieletrólitos. In: DE GROOTE, R.A.M.C.; CURVELO, A.A.S. **Polieletrólitos**. São Carlos: DFQ-IFQSC-USP, 1991, p. 68.

MISHIMA, T.; HISAMATSUM M.; YORK, W.S.; TERANISHI, K.; YAMADA, T. Adhesion of β -D-glucans to cellulose. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 308, p. 389-395, 1998.

MIYAZAKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; ENDO, K.; ATTWOOD, D. Comparison of *in situ* gelling formulations for the oral delivery of cimetidine. **Int. J. Pharm.**, Oxon, v. 220, p. 161-168, 2001a.

MIYAZAKI, S.; SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; ATTWOOD, D. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery. **J. Control. Release**, Oxon, v. 56, p. 75-83, 1998.

MIYAZAKI, S.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; ENDO, K.; TAKAHASHI, A.; ATTWOOD, D. *In situ* gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride. **Int. J. Pharm.**, Oxon, v. 229, p. 29-36, 2001b.

MOE, O.A.; MILLER, S.E.; IWEN, M.H. Investigation of the reserve carbohydrates of leguminous seeds. I. Periodate oxidation. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 69, p. 2621-2625, 1947.

MORRIS, E.R.; CUTLER, A.N.; ROSS-MURPHY, S.B.; REES, D.A. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 1, p. 5-21, 1981.

NAÉ, H.N. Introduction to rheology. In: LABA D. **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. New York: Marcel Dekker, 1993, p. 9-33.

NAVARRO, R.F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 1997, p. 9-11, 141-144.

NOBLE, O.; TARAVEL, F.R. Complex formation between guar D-galacto-D-mannan and borate ion. Thermodynamic data. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 184, p. 236-243, 1988.

NOBLE, O.; TARAVEL, F.R. Nuclear magnetic resonance evidence of the guar-borate interaction. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 166, p. 1-11, 1987.

NOBLE, O.; TARAVEL, F.R. Rheological properties of galactomannan-based gels. Part 2-Ion crosslinked galactomannan gels. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 12, p. 279-293, 1990.

NOBLE, O.; TURQUOIS, T.; TARAVEL, F.R. Rheological properties of galactomannan-based gels. Part 1-Guar and hydroxypropylguar gels in alkaline media. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 12, p. 203-217, 1990.

O'NEILL, M.A.; SELVENDRAN, R.R. Isolation and partial characterization of a xyloglucan from the cell walls of *Phaseolus coccineus*. **Carbohydr. Res.** Oxon, v. 111, p. 239-255, 1983.

O'NEILL, M.A.; WARRENFELTZ, D.; KATES, K.; PELLERIN, P.; DOCO, T.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, n. 37, p. 22923-22930, 1996.

ONWELUZO, J.C.; RAMESH, H.P.; THARANATHAN, R.N. Characterisation of free sugars and xyloglucan-type polysaccharides of two tropical legumes. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 47, p. 253-257, 2002.

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

OOSTERVELD, A.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 328, p. 185-197, 2000.

OZAWA, T. A new method of analyzing thermogravimetric data. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, Tokyo, November, p.1881-1886, 1965.

PERRY, M.B.; MacLEAN, L.L. Structural characterization of the antigenic O-chain of the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* serotype O65. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 322, p. 57-66, 1999.

PEZRON, E.; RICARD, A.; LAFUMA, F.; AUDEBERT, R. Reversible gel formation induced by ion complexation. 1. Borax-galactomannan interactions. **Macromolecules**, Washington, v. 21, p. 1121-1125, 1988a.

PEZRON, E.; LEIBLER, L.; RICARD, A.; AUDEBERT, R. Reversible gel formation induced by ion complexation. 2. Phase diagrams. **Macromolecules**, Washington, v. 21, p. 1126-1131, 1988b.

PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.B.; ERRINGTON, N.; HARDING, S.E. Pressure cell assisted solubilization of xyloglucans: tamarind seed polysaccharide and detarium gum. **Biomacromolecules**, Washington, v. 4, p. 799-807, 2003.

POWER, D.J.; RODD, A.B.; PATERSON, L.; BOGER, D.V. Gel transition studies on nonideal polymer networks using small amplitude oscillatory rheometer. **J. Rheol.**, New York, v. 42, n. 5, p. 1021-1037, 1998.

RAMESH, H.P.; YAMAKI, K.; ONO, H.; TSUSHIDA, T. Two-dimensional NMR spectroscopic studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan without chemical fragmentation. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 45, p. 69-77, 2001.

RAO, P.S.; SRIVASTAVA, H.C. Tamarind. In: WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**. San Diego: Academic Press, 1973. p. 369-411.

REDGWELL, R.; TROVATO, V.; MERINAT, S.; CURTI, D.; HEDIGER, S.; MANEZ, A. Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. **Food Chem.**, Exter, v. 80, p. , 2003.

REID, S.; SIMS, I.M.; MELTON, L.D.; GANE, A.M. Characterisation of extracellular polysaccharides from suspension cultures of apple (*Malus domestica*). **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 39, p. 369-376, 1999.

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

REITER, W.-D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Curr. Opin. Plant Biol.**, Oxon, v. 5, p. 536-542, 2002.

REITER, W.-D.; CHAPPLE, C.; SOMERVILLE, C.R. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition. **Plant J.**, Oxford, v. 12, p. 335-345, 1997.

RENARD, C.M.G.C.; LOMAX, J.A.; BOON, J.J. Apple-fruit xyloglucans: a comparative study of enzyme digests of whole cell walls of alkali-extracted xyloglucans. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 232, p. 303-320, 1992.

ROBERTS, S.A.; CAMERON, R.E. The effects of concentration and sodium hydroxide on the rheological properties of potato starch gelatinisation. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v.50, p. 133-143, 2002.

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

ROSE, J.K.C.; BENNETT, A.B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends Plant Sci.**, Oxon, v. 4, n. 5, p. 176-183, 1999.

ROY, G.L.; LAFERRIERE, A.L.; EDWARDS, J.O. A comparative study of polyol complexes of arsenite, borate and tellurate ions. **J. Inorg. Nucl. Chem.**, Oxford, v. 4, p. 106-114, 1957.

SAEMAN, J.F.; MOORE, W.E.; MITCHELL, R.L.; MILLETT, M.A. Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **TAPPI.**, Atlanta, v. 37, n. 8, p. 336-343, 1954.

SAVUR, G. R.; SREENIVASAN, A. Isolation and characterization of tamarind seed (*Tamarindus indica*) polysaccharide. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 172, p. 501-509, 1948.

SAWADEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 37, p. 1602-1604, 1965.

SHAO, C.; MIYAZAKI, Y.; MATSUOKA, S.; YOSHIMURA, K.; SAKASHITA, H. Complexation of borate with cross-linked polysaccharide anion exchanger: ^{11}B NMR and adsorption properties studies. **Macromolecules**, Washington, v. 33, p. 19-25, 2000.

SHASHKOV, A.S.; TOUKACH, F.V.; PARAMONOV, A.; ZIOLKOWSKI, A.; SENCHENKOVA, S.N.; KACA, W.; KNIREL, Y. A. Structures of new acidic O-specific polysaccharides of the bacterium *Proteus mirabilis* serogroups O26 and O30. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 386, p. 247-251, 1996.

SHIN, K.-S.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H. Rhamnogalacturonan II dimers cross-linked by borate diesters from the leaves of *Panax ginseng* C.A. Meyer are responsible for expression of their IL-6 production enhancing activities. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v.307, p. 97-106, 1998.

SHISEIDO CO LTD (SHIS). **Skin external preparation useful as cosmetics, contains xyloglucan and/or amino acid derivative as the active ingredients.** A61K-007/00; A61K-007/48. JP 2000281522-A. 10 October 2000. DERWENT Innovations Index. Disponível em: <http://dii8.isiknowledge.com/CIW.cgi> Acesso em: 27/02/2003.

SIERAKOWSKI, M.-R.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannan. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 42, p. 51-57, 2000.

SIMS, I.M.; MUNRO, S.L.A.; CURRIE, G.; CRAIK, D.; BACIC, A. Structural characterization of xyloglucan secreted by suspension cultured cells *Nicotiana plumbaginifolia*. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 293, p. 147-172, 1996.

SNYDER, C.F.; FRUSH, H.; ISBELL, H.S.; THOMPSON, A.; WOLFROM, M.L. Optical rotation. In: WHISTLER, R.L.; WOLFROM, M.L. **Methods in Carbohydr. Chem.**, New York: Academic Press, 1962, v.1, p. 524-534.

SONE, Y.; SATO, K. Measurement of oligosaccharides derived from tamarind xyloglucan by competitive ELISA assay. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Tokyo, v. 58, n. 12, p. 2295-2296, 1994.

SOUZA LIMA, M.M. **Polissacarídeos nativos e modificados de sementes de *H. courbaril*.** Curitiba, 1997. 128 f. Tese (Mestrado em Buiquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SPRONK, B.A.; RADEMAKER, G.J.; HAVERKAMP, J.; THOMAS-OATES, E.; VINCKEN, J.-P.; VORAGEN, A.G.J.; KAMERLING, J.P.; Vliegenthart, J.F.G. Dimers of a GFG hexasaccharide occur in apple fruit xyloglucan. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 305, p. 233-242, 1998.

SUISHA, F.; KAWASAKI, N.; MIYAZAKI, S.; SHIRAKAWA, M.; YAMATOYA, K.; SASAKI, M.; ATTWOOD, D. Xyloglucan gels as sustained vehicles for the intraperitoneal administration of mitomycin C. **Int. J. Pharm.**, Oxon, v. 172, p. 27-32, 1998.

TAGER, A. **Physical Chemistry of Polymers**. 2 ed. Moscow: Mir Publishers, 1978, p. 459.

TAKAHASHI, A.; SUZUKI, S.; KAWASAKI, N.; KUBO, W.; MIYAZAKI, S.; LOEBENBERG, R.; BACHYNSKY, J.; ATTWOOD, D. Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from *in situ* gelling xyloglucan formulations in rats. **Int. J. Pharm.**, Oxon, v. 246, p. 179-186, 2002.

TANG, W.K.; NEILL, W.K. Effect of flame retardants on pyrolysis + combustion of alpha cellulose. **J. Polym. Sci.**, New York, p. 65, 1964.

TAYAL, A.; PAI, V.B.; KHAN, S.A. Rheology and microstructural changes during enzymatic degradation of a guar-borax hydrogel. **Macromolecules**, Washington, v. 32, p. 5567-5574, 1999.

THOMPSON, J.E.; FRY, S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. **Planta**, Berlin, v. 211, p. 275-286, 2000.

TINÉ, M.A.S. **O conteúdo informacional da molécula de xiloglucano de cotilédones de *Hymenaea courbaril* reflete suas funções em nível celular**. Campinas, 2002. 112 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

van DUIN, M.; PETERS, J.A.; KIEBOOM, A.P.G.; van BEKKUM, H. Studies on borate esters I. **Tetrahedron**, Oxon, v. 40, n. 15, p. 2901-2911, 1984.

van DUIN, M.; PETERS, J.A.; KIEBOOM, A.P.G.; van BEKKUM, H. Studies on borate esters II. **Tetrahedron**, Oxon, v. 41, n. 16, p. 3411-3421, 1985.

VANZIN, G.F.; MADSON, M.; CARPITA, N.C.; RAIKHEL, N.V. KEEGSTRA, K.; REITER, W.-D. The *mur2* mutant of *Arabidopsis thaliana* lacks fucosylated xyloglucan because of a lesion in fucosyltransferase AtFUT1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 99, p. 3340-3345, 2002.

VARGAS-RECHIA, C.G. **Oligossacarídeos de xiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: estrutura e propriedades biológicas**. Curitiba, 1998. 130 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

VERMAAS, I.N. Equilibria of the boric acid-diol-water system. **Rec. Trav. Chim.**, The Hague, v.51, p. 67-92, 1932.

VIEIRA, N.A.B.; MOSCARDINI, M.S.; TIERA, V.A.O.; TIERA, M.J. Aggregation behavior of hydrophobically modified dextran in aqueous solution: a fluorescence probe study. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 53, p. 137-143, 2003.

VIERHUIS, E.; SCHOLS, H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Isolation and characterisation of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki) at different ripening stages. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 43, p. 11-21, 2000.

VIERHUIS, E.; SCHOLS, H.A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki). **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 44, p. 51-62, 2001a.

VIERHUIS, E.; YORK, W.S.; KOLLI, V.S.K.; VINCKEN, J.-P.; SCHOLS, H.A.; VAN ALEBEEK, G.-J.W.M.; VORAGEN, A.G.J. Structural analyses of two arabinose containing oligosaccharides derived from olive fruit xyloglucan: XXSG and XLSG. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 332, p. 285-297, 2001b.

VINCKEN, J.P.; KEIZER, A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 108, p. 1579-1585, 1995.

VINCKEN, J.P.; YORK, W.S.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A.G.J. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 114, p. 9-13, 1997.

VINOGRADOV, G.V.; MALKIN, A. Y. **Rheology of Polymers**. Moscow: Mir Publishers, 1980.

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

WATT, D.K.; BRASCH, D.J.; LARSEN, D.S.; MELTON, L.D. Isolation, characterisation, and NMR study of xyloglucan from enzymatically depectinised and non-depectinised apple pomace. **Carbohydr. Polym.**, Shannon, v. 39, p. 165-180, 1999.

WIENTJES, R.H.W.; DITS, M.H.G.; JONGSCHAAAP, R.J.J.; MELLEMA, J. Linear rheology of guar gum solutions. **Macromolecules**, Washington, v. 33, p. 9594-9605, 2000.

WHITNEY, S.E.C.; BRIGHAM, J.E.; DARKE, A.H.; REID, J.S.G.; GIDLEY, M.J. Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 307, p. 299-309, 1998.

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

YALPANI, M. **Polysaccharides: synthesis, modifications and structure/properties relations**. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 1-7.

YAMAGAKI, T.; MITSUISHI, Y.; NAKANISHI, H. Structural analyses of xyloglucan heptasaccharide by the post-source decay fragment method using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Tokyo, v. 61, n. 8, p. 1411-1414, 1997.

YAMAGAKI, T.; MITSUISHI, Y.; NAKANISHI, H. Determination of structural isomers of xyloglucan octasaccharides using post-source decay fragment analysis in MALDI-TOF mass spectrometry. **Tetrahedr. Lett.**, Oxon, v. 39, n. 23, p. 4051-4054, 1998a.

YAMAGAKI, T.; MITSUISHI, Y.; NAKANISHI, H. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by the post-source decay fragmentation method of MALDI-TOF mass spectrometry: influence of the degree of substitution by branched galactose, xylose and fucose on the fragment ion intensities. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokyo, v. 62, n. 12, p. 2470-2475, 1998b.

YAMATOYA, K.; SHIRAKAWA, M.; KUWANO, K.; SUZUKI, J.; BABA, O. Hypolipidemic effects of hydrolyzed xyloglucan. **Macromol. Symp.**, Heidelberg, v. 120, p. 231-236, 1997.

YORK, W.S.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide. **Plant Physiol.**, Rockville, v. 75, p. 295-297, 1984.

YORK, W.S.; HARVEY, L.K.; GUILLEN, R.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Structural analysis of tamarind seed xyloglucan oligosaccharides using β -galactosidase digestion and spectroscopic methods. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 248, p. 285-301, 1993.

YORK, W.S.; IMPALLOMENI, G.; HISAMATSU, M.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Eleven newly characterized xyloglucan oligoglycosyl alditols: the specific effects of sidechain structure and locations on ^1H NMR chemical shifts. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v.267, p.79-104, 1995.

YORK, W.S.; van HALBEEK, H.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by ^1H -n.m.r. spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry. **Carbohydr. Res.**, Oxon, v. 200, p. 9-31, 1990.

YOSHIMURA, K.; MIYAZAKI, Y.; OTA, F.; MATSUOKA, S.; SAKASHITA, H. Complexation of boric acid with the *N*-methyl-D-glucamine group in solution and in

crosslinked polymer. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, Cambridge, v. 94, n. 5, p. 683-689, 1998.

YOSHIMURA, K.; MIYAZAKI, Y.; SAWADA, S.; WAKI, H. ^{11}B NMR studies on complexation of borate with linear and crosslinked polysaccharides. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 651-656, 1996.

ZABLACKIS, E.; YORK, W.S.; PAULY, M.; HANTUS, S.; REITER, W.-D.; CHAPPLE, C.C.S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. Substitution of L-fucose by L-galactose in cell walls of *Arabidopsis mur1*. **Science**, Washington, v. 272, p. 1808-1810, 1996.

ZITTLE, C.A. Reaction of borate with substances of biological interest. **Adv. Enzymol.**, New York, v. 12, p. 493-527, 1951.

ZOBEL, H.F.; STEPHEN, A.M. Starch: structure, analysis and application. In STEPHEN, A.M. **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker, 1995, p.19-65.

7. Anexo:

Physico–chemical aspects of galactoxyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* and its tetraborate complex

S. Martin^{a,b}, R.A. Freitas^{a,b,c}, E. Obayashi^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 e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, P.O. Box 19046, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

^cCurso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Rua Uruguai, 458, P.O. Box 360, 88302-202, Itajaí, SC, Brazil

Received 5 August 2002; revised 17 January 2003; accepted 7 February 2003

Abstract

A galactoxyloglucan hydrocolloid (HXGRP) (Glu:Xyl:Gal molar ratio, ~4:3:1) was obtained from cotyledons of seeds of *Hymenaea courbaril* by aqueous extraction and then purified (33% yield). Rheological measurements showed that HXGRP, in aqueous systems, interacts with tetraborate ions increasing both, viscosity and G' values, also increasing the viscoelasticity of the system, but not forming a gel, as shown by Cox–Merz experiments. This interaction dependent of the amount of sodium tetraborate and the pH, and was analyzed in terms of hindered reptation. A temperature sweep of the HXGRP–tetraborate complex showed a characteristic cleavage of cross-links between polysaccharide and borate ions at high temperatures. An aqueous solution of HXGRP after heating at 85 °C for 2 h showed a decrease in its absolute viscosity.

© 2003 Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Galactoxyloglucan; *Hymenaea courbaril*; Sodium tetraborate; Rheology; Fluorescence analysis

1. Introduction

It is known that many water-soluble polymers form water-soluble gels when various cross-linking reagents are employed (Kesavan & Prud'homme, 1992).

Several studies involving borate and guar, hydroxypropylguar and other galactomannans have been carried out (Gey, Noble, Perez, & Taravel, 1988; Kesavan & Prud'homme, 1992; Noble & Taravel, 1990; Pezron, Ricard, Lafuma, & Audebert, 1988; Power, Rood, Peterson, & Boger, 1997; Rubinstein & Gliko-Kabir, 1995; Tayal, Pai, & Khan, 1999).

Since polysaccharides contain a multiplicity of hydroxyl groups, complex formation between borates or borate derivatives can occur with gel formation or an increase in the viscosity, with changes in other properties related to molecular size (Zittle, 1951). Gelation results from the cross-linking of different polymer chains, via the borate ion or sometimes parts of the same chain, in such a way that

a three-dimensional network of connected chains is formed (Gey et al., 1988).

Cross-linked guar gels are used, for example, in the oil and gas industries to transport sand into artificially created fractures in oil-bearing rock in order to enhance petroleum productivity (Tayal et al., 1999).

Savur and Sreenivasan (1948) indicated that the xyloglucan from seeds of *Tamarindus indica* forms a highly viscous, gelatinous product when treated with small amounts of borax, thus resembling gum tragacanth. Zittle (1951), in a review, cited that the mucilage from tamarind seeds and borate ions forms a weak gel, with solutions becoming viscous and ropy. Ghose and Krishna (1946-cited by Rao & Srivastava, 1973) showed that a xyloglucan solution treated with small quantities of sodium tetraborate and then stirred, yields a semisolid gel, but no extensive studies involving rheology or other methods exist that characterize this interaction.

Xyloglucans were first found as amyloids in the cell walls of plant seeds (Hayashi, 1989; Kooiman, 1957). In cotyledons, they have a (1 → 4)-linked β-D-glucan backbone with α-D-xylosyl residues attached to O-6, and then terminal β-D-galactose attached to O-2 (Hayashi, 1989;

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

utilized. The pH, measured with a QUIMIS pHmeter, before and after solubilization, was adjusted with 0.5, 1 and 3 mol/l NaOH or HCl.

When temperature was varied, the tetraborate concentration was 3 mg/ml.

2.6. Intrinsic viscosity determination

The absolute viscosity of the HXGRP solutions at different concentrations (0.4–2 mg/ml) was measured in a BROOKFIELD rheometer as described above and the value of reduced viscosity (η_{red}) was calculated. The plot of η_{red} versus concentration (C) was extrapolated to infinite dilution to determine the intrinsic viscosity $[\eta]$. The Huggin's constant (k') was obtained from the equation $\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2 C$, where η_{sp} is the specific viscosity (Lapasin & Prici, 1995).

2.7. Fluorescence assays

The pyrene fluorescence spectra of HXGRP solution (10 mg/ml), heated to 85 °C for 2 h and unheated were obtained using a fluorescence spectrophotometer HITACHI, model f-4500. The wavelength for pyrene excitation was 310 nm. The relative intensities of vibrational fluorescence bands were determined from an emission spectrum (360–460 nm, 5 nm slits).

3. Results and discussion

3.1. Isolation, purification, chemical and physico-chemical characterization of HXGRP

Exhaustive aqueous extraction from milled cotyledons of *H. courbaril* seeds yielded 40% of crude HXGRP. After deproteination by precipitation of HXGRP by Fehling solution and filtration using 3 and 0.22 μ m membranes, the yield related to crude HXGRP was 75 and 33%, respectively.

The monosaccharide molar ratios, total sugar, protein and moisture content are shown in Table 1, where from the data obtained, it can be concluded that the purified

Table 1
Monosaccharide molar ratios, total sugar, protein and moisture content of HXGRP, following Millipore filtration

	Pore size	
	3 μ m	0.22 μ m
Glu:Xyl:Gal (mol%)	4.3:3:1	3.8:3:1
Total sugar (%)	80.4	81.6
Protein (%)	4.6	3.6
Moisture content (%)	15	12

component of the endosperm of *H. courbaril* seeds is a proteogalactoxyloglucan.

The average molar mass (M_w) obtained by HPSEC-MALLS was 461,500 g/mol.

The intrinsic viscosity $[\eta]$ was calculated using concentration values between 0.4 and 2 mg/ml from a plot of η_{red} versus C . Its values were 330.5 ml/g with k' (Huggin's constant) of 0.73 in an aqueous solvent and 359.8 ml/g with k' of 0.52 when the solvent was 0.1 mol/l aq. KCl solution. The Huggin's constant varied between 0.3 and 0.6 and depends on the molecular rigidity and thermodynamical system. It decreased in a good solvent and increased when intermolecular interactions increased (Milas, 1991). Thus, in HXGRP, 0.1 mol/l aq. KCl was a better solvent than water.

For polyelectrolyte polysaccharides, such as an oxidized scleroglucan, this different behaviour, on solubilisation in water or in salt, indicated a conformational change (Coviello, Dentini, Crescenzi, & Vincenti, 1995; Coviello et al., 1998), in the case of HXGRP, this needs to be further investigated.

3.2. Rheological analysis

In the flow curves for different concentrations of HXGRP, we can observe a similar behaviour to that of other polysaccharide systems. At low concentrations the behaviour is Newtonian, while at higher ones (10 mg/ml) it is slightly pseudoplastic, this characteristic being more pronounced with increasing concentration (data not shown).

Since one of the present objectives is verify if an interaction occurs between polysaccharide and tetraborate ions, the second step of the rheological investigation was to determine whether there was an increase in the viscosity of the system when HXGRP was solubilised in an aqueous sodium tetraborate. In the flow curves of Fig. 1, where HXGRP was solubilised in water and in aqueous 3 mg/ml

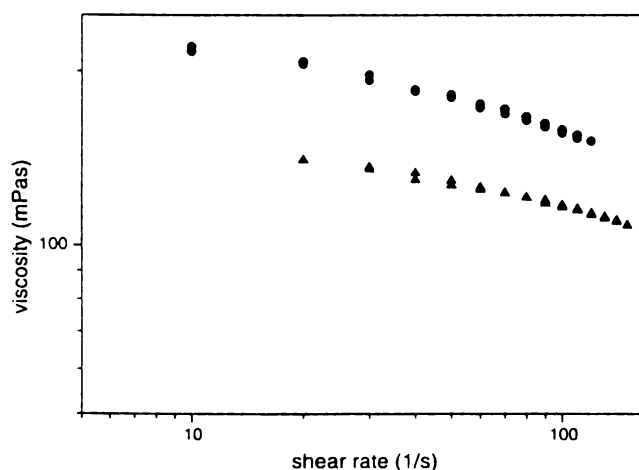


Fig. 1. Flow curves, at 25 °C, of HXGRP (15 mg/ml) in water (▲) and in aqueous sodium tetraborate 3 mg/ml (●)

To show the influence of borate ion concentration on the rheological aspects of HXGRP-tetraborate complexes, the poly (accharide) (20 mg/ml) was solubilised in water and 3, 5, 7 and 10 mg/ml sodium tetraborate solutions, and the dynamic rheological properties analysed.

In Fig. 4, one can observe the plot of G' values versus sodium tetraborate concentration measured at three different frequencies. The G' values increased up to a concentration of 7 mg/ml of sodium tetraborate, indicating that this is the concentration at which occurs maximum viscoelasticity. Also, that this behaviour is more pronounced at a frequency of 10 Hz and it is in agreement with the lifetime of the cross-links (see above).

In studies on schizophyllan (Grisel & Muller, 1996), it was demonstrated that its rheological properties was largely affected by the addition of small quantities of borate ions and the higher the borax concentration, the stronger the gel became, although a plateau was not reached.

With the intention of increasing the viscoelasticity, the pH was adjusted to 9.83, 10.31 and 10.55. When the pH of a tetraborate solution increases, there is a higher availability of borate ions, increasing the number of cross-links (Power et al., 1997) and consequently the viscoelasticity of the mixture. The $\tan(\delta)$ values that express the ratio G''/G' (Naé, 1993) were utilised in an attempt to characterise the optimum behaviour. In Fig. 5, it can be observed that besides the pH elevation, the $\tan(\delta)$ decrease was not so pronounced from pH 9.31 up. When the pHs were 9.83, 10.31 and 10.55, this difference did not practically occur, showing rheological stability over this range of pHs. Fig. 6 shows that the best pH for promoting the viscoelastic character of the mixture was 9.83. At this value and at higher ones the macroscopic aspect of the mixture was that of a gel that did not flow easily and could be manipulated. At pH 12.00, the mixture turns to a liquid with very low viscosity. In the complex hydroxypropylguar-tetraborate, G'

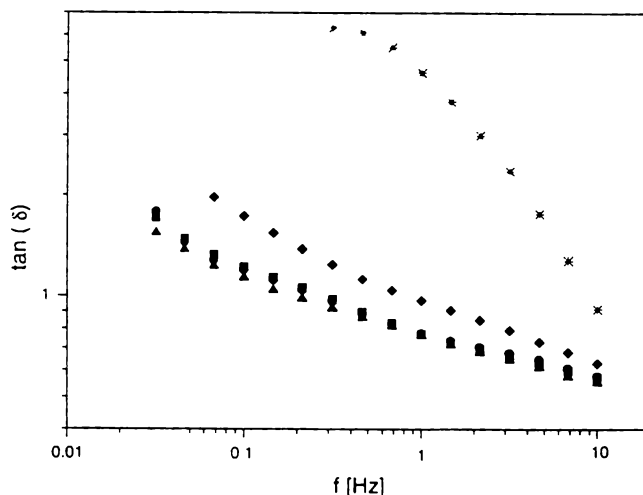


Fig. 5. Variation of $\tan(\delta)$ values versus frequency with HXGRP 20 mg/ml in water, at pH 5.0 (*) and HXGRP (20 mg/ml)-tetraborate (3 + 0.33 mg/ml NaBH_4) complexes, at pHs 9.31 (♦), 9.83 (▲), 10.31 (■), 10.55 (●).

increased with increase of the pH up to pH 12.0 (Power et al., 1997). The different effect of pH between the two polymers can be due to ionisation of hydroxyl groups at high pH and/or a change in the molecular conformation (Noble, Turquois, & Taravel, 1990) of HXGRP.

For hydroxypropylguar, Power et al. (1997), reported that at low pHs, the slope of the $\tan(\delta)$ versus frequency curve is negative and that at high pHs it became positive, so that they could determine the gelling point of the system, namely the pH at which the $\tan(\delta)$ -frequency gradient is zero. This was not possible for HXGRP, since the slope of $\tan(\delta)$ versus frequency was negative even at pHs where the higher values for G' were observed, since HXGRP-tetraborate did not form a gel and only a more viscoelastic solution.

To complement this observation, we examined an HXG obtained from seeds collected in another region of Brazil

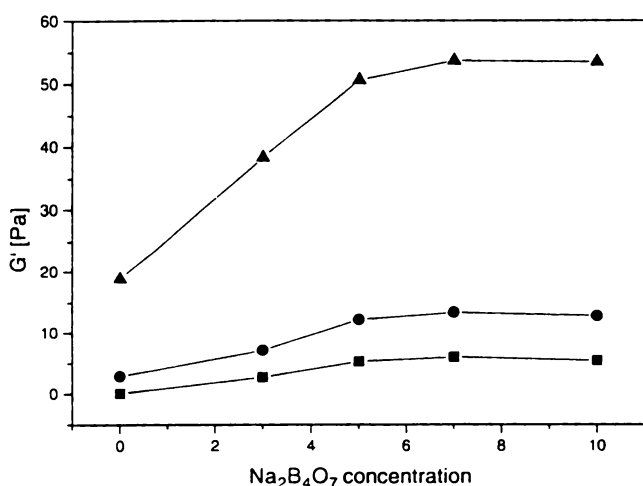


Fig. 4. Variation of G' versus tetraborate concentration with HXGRP (20 mg/ml) at different frequencies, (▲) 10 Hz, (●) 1 Hz and (■) 0.316 Hz.

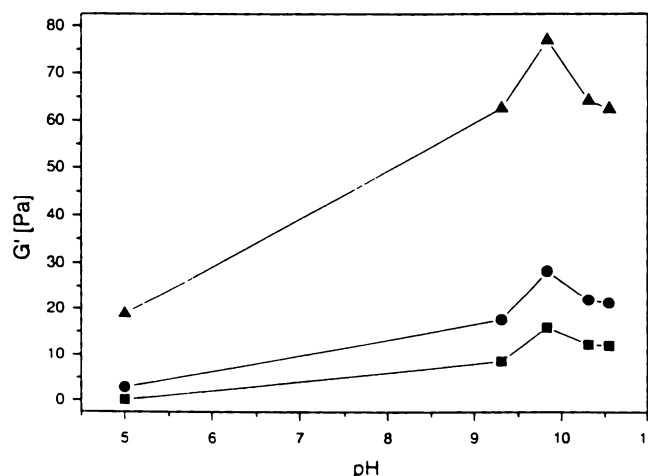


Fig. 6. Variation of G' versus pH for HXGRP in water (pH 5.0) and HXGRP-tetraborate complexes in water at different frequencies, (▲) 10 Hz, (●) 1 Hz, (■) 0.316 Hz.

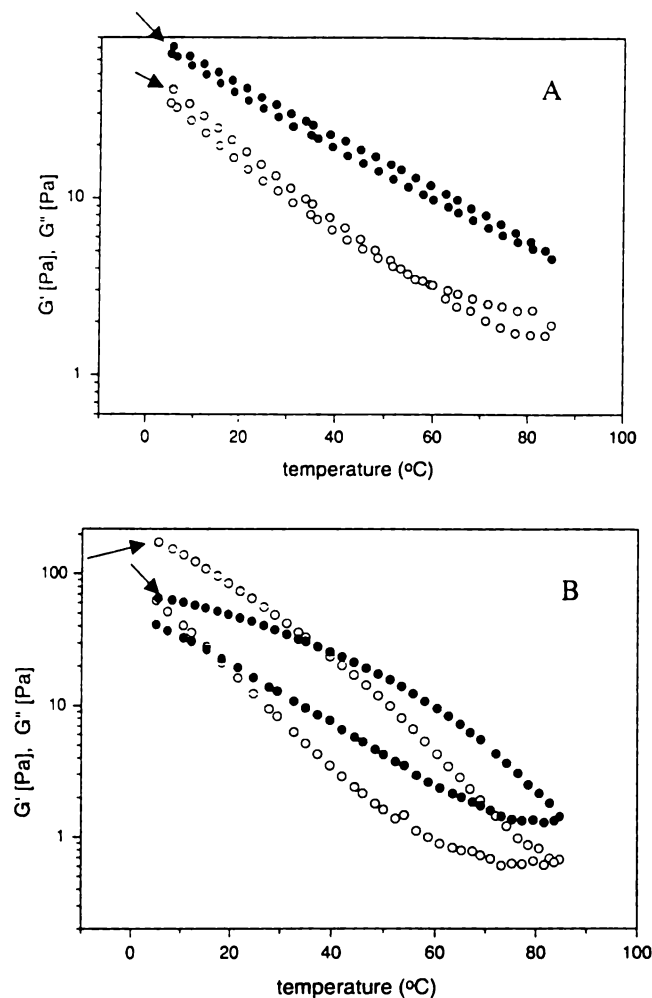


Fig. 9. Temperature sweep of HXGRP 40 mg/ml in water (A) at 1 Hz and 5% of deformation and aqueous HXGRP (30 mg/ml)-tetraborate (3 mg/ml) complex (B) at 1 Hz and 3% of deformation. G' open symbols and G'' full symbols. Arrows indicate the beginning of the heating process.

values lower than found in the heating process, while G' is greater, in the heating process up to a temperature of approximately 55 °C, when it became smaller as did G'' . This increase in the storage modulus can indicate development of a higher rigidity of the molecule at this temperature.

In Fig. 9(B) one can see that the G' values begin greater than those of G'' during the heating process up to ~35 °C, when it became lower. This can be explained since the equilibrium reactions for borate ions in water have positive activation energies, so that the number of cross-links

Table 3

III, I and III/I intensity ratios of emission fluorescence of pyrene in water, HXGRP solution (10 mg/ml) heated to 85 °C, 2 h and cooled to room temperature and HXGRP not heated

	III	I	III/I
H ₂ O	19.95	35.22	0.57
HXGRP not heated	8.04	11.86	0.68
HXGRP heated	6.57	8.82	0.74

decreases with temperature increase (Kesavan & Prud'homme, 1992). This can be attributed to the thermal breakage of the cross-links. It can also be observed, that on cooling the cross-linking increase, but G' becomes greater than G'' at ~16 °C, but with a lower value than that observed in the initial process. When this sample was maintained at 5 °C for 2 h and then submitted to the same analysis, the G' value does not return to the same value (data not shown).

The temperature curves of HXGRP with and without sodium tetraborate were obtained using different heating-cooling rates (5, 2.5, 1.0 and 0.5 °C/min) and the thermal hysteresis observed was greater the slower the process (data not shown).

The results presented above, are in accord with the mode of sample preparation. As it was difficult to solubilise HXGRP in tetraborate solution at room temperature, solubilization was attempted, by stirring at 60 °C, but the resulting complex had only a very low viscosity (data not shown). Another interesting observation, correlated with heating of the sample, is that when a sample of HXGRP was solubilised in water at 25 °C, heated to 85 °C for 2 h, and then cooled at 25 °C, its absolute viscosity decreased more than 20 fold when compared with that of an unheated sample.

3.3. Pyrene probe experiments

The fluorescence emission spectrum of pyrene is sensitive to the polarity of the environment in which it is dispersed. In particular, the ratio of fluorescence intensities of two vibronic bands, termed III and I can serve as a sensor of hydrophobicity. Consequently, this property has been used by polymer chemists interested in the conformational behaviour of water-soluble polymers. In Table 3, one can observe the characteristic III/I ratio for water (Chee, Rimmer, Soutar, & Swanson, 2001), and for HXGRP heated to 85 °C for 2 h and then cooled to 25 °C and for unheated HXGRP. The III/I ratio values for the two samples are different indicating, that after heating, there is a more apolar environment than for in the unheated sample. This behaviour can be associated with the same modification, in the HXGRP solution that caused the decrease in its absolute viscosity, after heating, as described above.

To verify if there is an alteration in the conformation of the HXGRP molecule that can be correlated with this behaviour after heating it would be necessary to perform experiments, to evaluate T_m , using more sensitive techniques such as optical rotation, light scattering (LS), circular dichroism (CD) and differential scanning calorimetry (DSC).

4. Conclusions

Rheological measurements showed an increase in the viscosity of HXGRP solubilised in sodium tetraborate,

- stilbocarpa. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17, 413–415.
- Martin S., 1999. Galactoxiloglucana de Sementes de *Hymenaea courbaril*: Estrutura e Propriedades. Master's Thesis in Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
- Martin, S., Obayashi, E., & Sierakowski, M.-R. (2001). Some rheological aspects of xyloglucan-tetraborate Complexes. *Proceedings of the sixth congresso brasileiro de Polímeros. IX international macromolecular colloquium, Gramado, RS, Brazil*, 1196–1199.
- 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 polymers and composites. São Pedro, SP, Brazil*, 166–170.
- Milas M., 1991. Polieletrólitos. De Groot, R.A.M.C., Curvelo, A.A.S (ed.). São Carlos: DFQ-IFQSC-USP, 68.
- Naé, H. N. (1993). Introduction to rheology. In D. Laba (Ed.), *Rheological properties of cosmetics and toiletries* (pp. 9–33). New York: Marcel Dekker.
- Noble, O., & Taravel, F. R. (1990). Rheological properties of galactomannan-based gels. Part 2-ion cross-linked galactomannan gels. *Carbohydrate Polymers*, 12, 279–293.
- Noble, O., Turquois, T., & Taravel, F. R. (1990). Rheological properties of galactomannan-based gels. Part 1-Guar and hydroxypropylguar gels in alkaline media. *Carbohydrate Polymers*, 12, 203–217.
- Pezron, E., Ricard, A., Lafuma, F., & Audebert, R. (1988). Reversible gel formation induced by ion complexation. I. Borax-galactomannan interaction. *Macromolecules*, 21, 1121–1125.
- Power, D. J., Rood, A. B., Peterson, L., & Boger, D. V. (1997). Gel transition studies on non ideal polymer networks using small amplitude oscillatory rheometry. *Journal of Rheology*, 42, 1021–1037.
- Rao, P. S., & Srivastava, H. C. (1973). Tamarind. In R. L. Whistler, & J. N. BeMiller (Eds.), *Industrial gums: Polysaccharides and their derivatives* (pp. 369–411). San Diego: Academic Press.
- Roberts, S. A., & Cameron, R. E. (2002). The effects of concentration and sodium hydroxide on the rheological properties of potato starch gelatinisation. *Carbohydrate Polymers*, 50, 133–143.
- Rubinstein, A., & Gliko-Kabir, S. T. P. (1995). Synthesis and swelling-dependent enzymatic degradation of borax-modified guar gum for colonic delivery purposes. *Sciences Techniques et Pratiques Pharmaceutiques Sciences*, 5, 41–46.
- Savur, G. R., & Sreenivasan, A. (1948). Isolation and characterization of tamarind seed (*Tamarindus indica*) polysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 172, 501–509.
- Souza-Lima M.M., 1997. Polissacarídeos Nativos e Modificados das Sementes de *Hymenaea courbaril*. Master's Thesis in Biochemistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
- Tayal, A., Pai, V. B., & Khan, S. A. (1999). Rheology and microstructural changes during enzymatic degradation of a guar-borax hydrogel. *Macromolecules*, 32, 5567–5574.
- Tiné, M. A. S., Cortelazzo, A. L., & Buckeridge, M. S. (2000). Xyloglucan mobilization in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Plant Science*, 154, 117–126.
- Vargas-Rechia, C. G., Reicher, F., Sierakowski, M.-R., Heyraud, A., Driguez, H., & Liénart, Y. (1998). Galactoxyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of *Hymenaea courbaril* acts as a signaling molecule. *Plant Physiology*, 116, 1013–1021.
- Wientjes, R. H. W., Duits, M. H. G., Jongschaap, J. J., & Mellema, J. (2000). Linear rheology of guar gum solutions. *Macromolecules*, 33, 9594–9605.
- Zittle, C. A. (1951). Reaction of borate with substances of biological interest. *Advances in Enzymology*, 12, 493–527.
- 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.