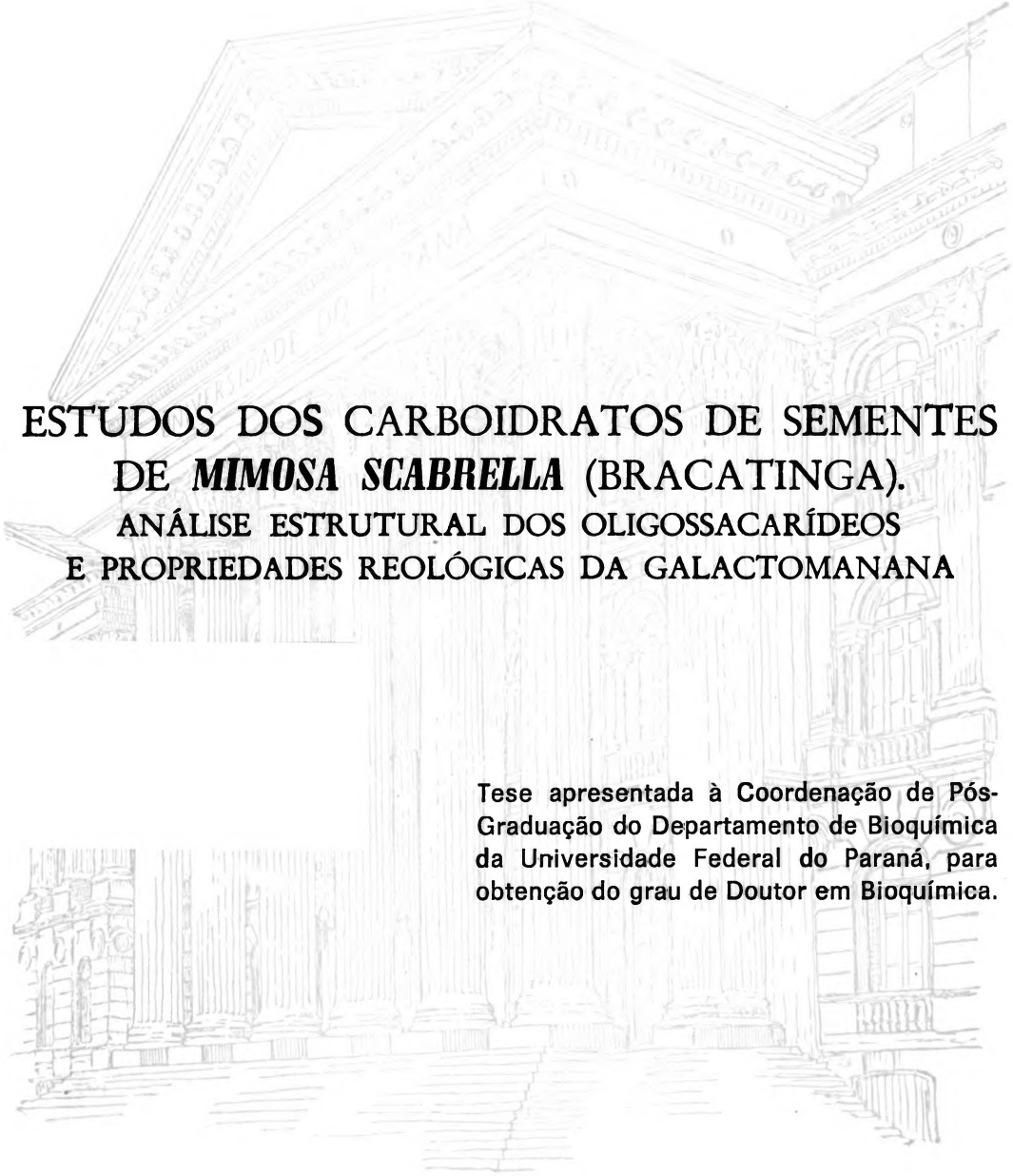


JOANA LÉA MEIRA SILVEIRA GANTER



ESTUDOS DOS CARBOIDRATOS DE SEMENTES
DE **MIMOSA SCABRELLA** (BRACATINGA).
ANÁLISE ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS
E PROPRIEDADES REOLÓGICAS DA GALACTOMANANA

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

Curitiba
1991

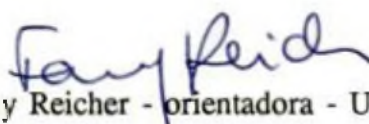
ESTUDOS DOS CARBOIDRATOS DE SEMENTES
DE *MIMOSA SCABRELLA* (BRACATINGA).

ANÁLISE ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS
E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA GALACTOMANANA

por

JOANA LÉA MEIRA SILVEIRA GANTER

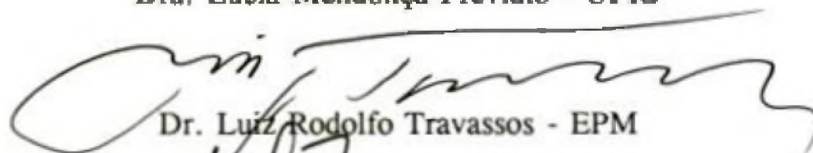
Tese aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:



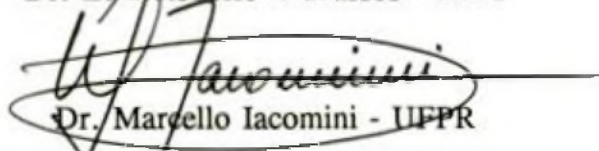
Dra. Fany Reicher - orientadora - UFPR



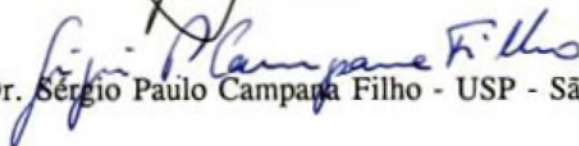
Dra. Lúcia Mendonça Previato - UFRJ



Dr. Luiz Rodolfo Travassos - EPM



Dr. Marcello Iacomini - UFPR



Dr. Sérgio Paulo Campana Filho - USP - São Carlos

JOANA LÉA MEIRA SILVEIRA GANTER

ESTUDOS DOS CARBOIDRATOS DE SEMENTES
DE *MIMOSA SCABRELLA* (BRACATINGA).
ANÁLISE ESTRUTURAL DOS OLIGOSSACARÍDEOS
E PROPRIEDADES REOLÓGICAS DA GALACTOMANANA

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

Curitiba
1991

Orientadores

Prof^a. Dra. Fany Reicher

Prof. Dr. João Batista Chaves Corrêa

Esta tese foi em parte realizada nos laboratórios do
Centre de Recherche sur les Macromolécules
Végétales da Université Scientifique et Médicale de
Grenoble - França, sob orientação dos Professores:
Dra. Marguerite Rinaudo
Dr. Alain Heyraud
Dr. Michel Milas

Ao Sidney e Thiago que amo muito e de quem roubei momentos preciosos de convívio.

À Josefa, José e Julio que sem
seu apoio incansável seria
impossível a realização desta tese

Produza a terra erva verde que de a sua semente; e produza árvores frutíferas que dêem frutos, segundo a sua espécie e que contenham a sua semente em si mesmas para a reproduzirem sobre a terra e assim se fez.

Gênesis 1, 11-12.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a DEUS pela maravilha da vida.

A professora Dra. Fany Reicher, orientadora incansável que junto e à distância sempre soube se fazer presente. Debatedora de muitas idéias que aqui trago à luz.

Ao professor Dr. João Batista Chaves Corrêa, orientador, demonstrando que da fundamentabilidade nasce a essencial expressão adjetiva.

A professora Madame Marguerite Rinaudo, mestra, amiga nas terras estranhas e nos momentos difíceis; que acreditou em mim, como eu acreditei em minha vontade de pesquisar.

Aos professores Michel Milas e Alain Heyraud cuja orientação foi fundamental para o desenvolvimento desta tese.

Aos integrantes do Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales - CERMAV - França, que me facilitaram o acesso às "situações de fato" minha sincera gratidão.

Aos professores Drs. Philip James Gorin, Marcello Iacomini e Moacir Kaminski pela dedicação e empenho na análise crítica deste trabalho.

Ao professor Dr. José Domingos Fontana pela colaboração na obtenção da bolsa "sandwich" - Projeto Rhae - para a realização do estágio no exterior (CERMAV - França).

Ao professor Dr. Fabio Pedrosa, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pela colaboração.

A professora Dra. Maria Rita Sierakowski, pela colaboração.

Aos colegas de laboratório Pascale, Luciana, Laurance, Noel, Erique, Viviane, Catherine, Philippe, Sirlei, Nery, Carem, Selma, Guido, pela cooperação emprestada.

Ao secretário Nilton da Silva Reis, pelo empenho e habilidade técnica na execução no trabalho de digitação.

A desenhista Angela Feijó pela dedicação na elaboração dos desenhos e gráficos.

Meu apreço a todos os amigos que estiveram ao meu lado, de diferentes modos apoiando este trabalho.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná na pessoa do professor Alsedo Leprevost pelo estímulo e colaboração.

Ao Instituto de Terras, Cartografia e Florestas pela doação das sementes de *Mimosa scabrella*.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

S U M Á R I O

Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Símbolos.....	xvii
Lista dos Nomes Comuns das Espécies vegetais.....	xx
Resumo.....	xxiii
Summary.....	xxiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Estrutura dos oligossacarídeos da rafinose.....	2
1.2 Ciclitois.....	8
1.3 Metabolismo dos oligossacarídeos da rafinose.....	15
1.4 Flatulência.....	21
1.5 Galactomananas.....	24
1.6 Caracterização reológica dos polímeros em solução.....	30
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1 Métodos gerais.....	54
3.1.1 Hidrólise ácida total.....	55
3.1.2 Hidrólise ácida parcial da galactomanana.....	55
3.1.3 Redução e acetilação dos produtos das hidrólises ácidas.....	55

3.1.4	Análises de metilação.....	56
3.1.5	Métodos cromatográficos.....	57
3.1.5.1	Cromatografia em papel.....	57
3.1.5.2	Cromatografia em camada delgada.....	57
3.1.5.3	Cromatografia líquido-gasosa.....	57
3.1.5.4	Cromatografia de gel permeação em coluna.....	58
3.1.5.5	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	58
3.1.6	Espectrometria de massa acoplada a bombardeamento por átomos acelerados.....	59
3.1.7	Ressonância magnética nuclear de carbono treze.....	59
3.2	Obtenção das sementes.....	60
3.3	Obtenção dos oligossacarídeos e polissacarídeo.....	60
3.3.1	Método A de extração.....	60
3.3.2	Método B de extração.....	61
3.3.3	Método C de extração.....	61
3.4	Preparo da solução de polissacarídeo.....	61
3.5	Viscosimetria.....	62
3.5.1	Viscosímetro capilar.....	62
3.5.2	Viscosímetros rotatórios.....	62
3.5.3	Viscosidade relativa.....	66
3.5.4	Viscosidade intrínseca.....	67
3.5.5	Avaliação do comportamento pseudoplástico.....	68
3.5.6	Viscosidade específica em função do parâmetro de abrangência.....	68
3.6	Determinação da massa molecular.....	69
3.6.1	Medidas de massa molecular em sistema estático.....	69
3.6.2	Medidas de massa molecular em sistema dinâmico.....	70

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1 Obtenção dos oligossacarídeos.....	73
4.2 Purificação dos oligossacarídeos.....	78
4.3 Análise estrutural dos compostos de baixo peso molecular.....	81
4.4 Caracterização da galactomanana.....	93
4.5 Análise do comportamento reológico da galactomanana em solução.....	95
5. CONCLUSÕES.....	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE TABELAS

I	Oligossacarídeos da família da rafinose.....	3
II	Aplicação de galactomananas de guar e alfarrobo por ordem de maior aplicação.....	27
III	Análise por HPLC dos carboidratos de baixo peso molecular de sementes de <i>Mimosa scabrella</i> obtidos por três métodos de extração.....	75
IV	Atribuição dos sinais dos espectros de ^{13}C -n.m.r. dos ciclitois de sementes de <i>Mimosa scabrella</i>	83
V	Atribuição dos sinais dos espectros de ^{13}C -n.m.r. dos oligossacarídeos da família da rafinose de sementes de <i>Mimosa scabrella</i>	87
VI	Composição em monossacarídeos a partir de galactomanana de <i>Mimosa scabrella</i>	94
VII	Análise por metilação pelos métodos de HAKOMORI e PURDIE da galactomanana de <i>Mimosa scabrella</i>	96
VIII	Viscosidade relativa da solução de galactomanana de <i>Mimosa scabrella</i>	97
IX	Parâmetros viscosimétricos para galactomananas e polissacarídeos.....	104

LISTA DE FIGURAS

1	Diastereoisômeros do inositol, de acordo com POSTERNAK.....	10
2	Eteres <u>O</u> -metílicos do inositol.....	11
3	Via metabólica de formação da galactomanana e dos oligossacarídeos da rafinose.....	18
4	Tipos de curvas de escoamento.....	31
5	Curva de viscosidade típica de um fluido pseudoplástico.....	33
6	Escoamento de fluido em regime laminar.....	37
7	Comportamento de um polímero em solução a diferentes concentrações.....	42
8	Determinação gráfica das concentrações críticas c^* e c^{**}	43
9	Viscosidade absoluta (η), viscosidade dinâmica (η^*), módulo de cisalhamento dinâmico (G'), módulo de perda (G'') em função da frequência angular (ω), e ou da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$).....	45
10	Viscosímetro capilar - coluna tipo Ubbelohde.....	63
11	Viscosímetro tipo COUETTE, mesmo sistema que compõe o viscosímetro Low Shear 30	64

12	Viscosímetro rotativo tipo Cone-Plano.....	65
13	Determinação gráfica da viscosidade intrínseca.....	68
14	Esquema do sistema de cromatografia equipado à multidetecção - Cromatógrafo de Gel Permeação, Difusão de luz e Viscosímetro.....	72
15	Esquema de obtenção dos componentes de baixo peso molecular das sementes de <i>Mimosa scabrella</i>	74
16	Cromatogramas em HPLC em coluna CHO-682 dos extratos de <i>Mimosa scabrella</i> por três métodos de extração.....	76
17	Fracionamento dos oligossacarídeos de sementes de <i>Mimosa scabrella</i> (obtidos pelo método B) por GPC em coluna Bio-Gel P2.....	79
18	Espectros de ^{13}C -n.m.r. (75 MHz) dos oligossacarídeos da família da rafinose de sementes de <i>Mimosa scabrella</i>	86
19	Espectros de massa (FAB positivo, matriz glicerol) A-pinitol, B-trigalactosil pinitol.....	89
20	Espectros de ^{13}C -n.m.r. (75 MHz) dos ciclitois de sementes de <i>Mimosa scabrella</i>	92
21	Viscosidade em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para solução aquosa de galactomanana de <i>Mimosa scabrella</i> a diferentes concentrações.....	99

22	Viscosidade específica em função de $c[\eta]$, (a), e $c[\eta] + K'(c[\eta])^2$, (b) para solução aquosa de galactomana de <i>Mimosa scabrella</i>	101
23	Módulo de cisalhamento dinâmico G' (\blacktriangle) e módulo de perda G'' (\blacktriangle), a 25°, em relação a frequência para solução aquosa de galactomanana de <i>Mimosa scabrella</i> . Comparação com solução aquosa de galactomanana de <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> de acordo com ROBINSON et alii (\bullet, \circ) e RICHARDSON e ROSS-MURPHY (\blacksquare, \square)	106
24	Expoente $-n$ no regime não-Newtoniano em função da concentração polimérica expresso como parâmetro de abrangência para solução aquosa de galactomanana de <i>Mimosa scabrella</i> (\bullet).....	108

LISTA DE SÍMBOLOS

a e K Constantes de MARK-HOUWINK

B_n Constante

c Concentração do polímero em g/ml (ou g/l)

c^* Concentração crítica

c^{**} Concentração crítica no regime concentrado

c_P Centipoise - unidade de viscosidade (CGS)

dn/dc Índice de refração

dv/dx Velocidade de cisalhamento

G' Módulo de cisalhamento dinâmico, módulo de reserva, módulo de elasticidade

G'' Módulo de perda

k' Constante de HUGGINS

M Massa molecular do polímero

\bar{M}_n Massa molecular média em número

\bar{M}_w Massa molecular ponderal média

man/gal, man: gal manose: galactose

n Inclinação obtida a partir da relação da viscosidade em função da velocidade de cisalhamento

R_θ Fator de RAYLEIGH

ΔR_θ Diferença do fator de RAYLEIGH entre a solução e o solvente

S Inclinação obtida a partir da relação entre viscosidade específica e o parâmetro de abrangência $c[\eta]$

T Torque = Força de torção em dinas.cm (CGS) ($1 \text{ dina.cm} = 10^{-7} \text{ N.m}$)

w Velocidade angular em rad/s

α Coeficiente de expansão de FLORY

$\dot{\gamma}$ Velocidade de cisalhamento (s^{-1})

$\dot{\gamma}_r$ Velocidade de cisalhamento crítica (s^{-1})

η Viscosidade absoluta em Pa.s ou mPa.s

η_{sp} viscosidade específica em Pa.s ou mPa.s

$[\eta]$ viscosidade intrínseca

η^* Viscosidade dinâmica complexa em mPa.s

τ Tensão de cisalhamento em mPa.s

λ comprimento de onda

LISTA DOS NOMES COMUNS DAS ESPÉCIES VEGETAIS*

- Arachis hypogaea* - amendoim verdadeiro (peanut)
- Artemisia dracunculus* - cravo de defunto
- ^a*Aspidosperma quebracho*
- Caesalpinia pulcherina* - barba de barata
- Caesalpinia spinosa* - tara
- Cajanus cajan* - guando (red gram)
- Calopogonium mucunoides* - calopogônio
- Canavalia brasiliensis* - feijão de porco
- Canavalia gladiata* - fava contra
- Cannabis sativa* - canhamo verdadeiro
- Ceratonia siliqua* - alfarrobo (locust bean)
- Cicer arietinum* - grão de bico (chick peans, bengal gram)
- Cyamopsis tetragonolobus* - guar
- ^a*Desmanthus illinoensis*
- Dolichos biflorus* - feijão cavalo (horse gram)
- Dolichos lablab* - cumandatiá
- Gleditsia amorphoides* - espinho de christo
- Glycine max* - soja (soybean, soya)
- Gossypium herbaceum* - algodão (cotton)
- Helianthus annuus* - girassol (sunflower)
- Lens esculenta* - lentilha (lentil)
- Lens culinaris* - lentilha (lentil)
- Leucaena glauca* - acacia bela rosa
- Leucaena leucocephala* - acacia

^a*Lotus pedunculatus*

Lupinus albus - tremço-branco, lupino branco (lupin)

Lupinus angustifolius - tremço-azul (lupin)

Lupinus luteus - tremço amarelo, tremço de cheiro

Medicago sativa - alfafa verdadeira (lucerne)

Mimosa scabrella - bracatinga

^a*Ononis alopecuroides*

^a*Ononis nadrix*

Phaseolus angularis - feijão adsuki

Phaseolus aureus - feijão mung (mung bean)

Phaseolus limensis - (Lima bean)

Phaseolus mungo - feijão da Índia (black gram)

Phaseolus radiatus - feijão da China (green gram)

Phaseolus vulgaris - feijão comum (green bean, red kidney bean)

Pinus cambertrana - pinho

Pisum sativum - ervilha (garden pea, pea, smooth pea)

^a*Sarcophalus diclerrichii*

Sequoia sempervieres - sequóia

Sophora japonica - árvore dos pagodes

^a*Stachys sieboldii*

Trifolium pratense - trevo vermelho (red clover)

Trifolium repens - trevo rasteiro

Trifolium subterraneum - (subterranean clover)

Triticum aestivum - trigo (wheat)

Vicia faba - feijão cavalo, feijão faba (bread bean, horse bean, faba bean)

Vicia sativa - alverjita comum

Vigna angularis - (adzuki bean)

Vigna catjang - feijão de vaca (cowpea)

Vigna sinensis - ervilha de vaca (cowpea)

Vigna unguiculata - ervilha de vaca (cowpea)

a. Não foi encontrado tradução do nome comum desta espécie

*. A tradução para a língua portuguesa dos nomes comuns das espécies citadas neste trabalho foram obtidas em Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, CORRÊA, M.P., 1984

RESUMO

A *Mimosa scabrella*, conhecida como bracatinga, pertence a família Leguminosae, sub-família Mimosoidea. É uma espécie de crescimento rápido e abundante no Sul do Brasil fornecendo 1 kg de sementes anualmente. As sementes contêm 30% de galactomanana (man:gal 1,1:1 ; $[\eta] \sim 900$ ml/g) e 11% de oligossacarídeos. Os oligossacarídeos foram fracionados por cromatografia preparativa de gel permeação em Bio-gel P2 e as frações obtidas purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Os componentes identificados por ^{13}C -n.m.r, FAB-ms, g.l.c.-ms foram ajugose (0,1%), verbascose (0,8%), estaquiose (0,9%), rafinose (0,7%), sacarose (5,8%), ciclitol (0,3%), derivado O-metílico do ciclitol (0,8%) e alditois (0,4%). Glucose (0,6%), galactose (0,3%) e frutose (0,3%) também foram encontrados. Entre os oligossacarídeos foi isolado e caracterizado um novo composto, o trigalactosil pinitol $\text{O}-\alpha\text{-D-galactopiranosil-}(1\rightarrow6)\text{-O}-\alpha\text{-D-galactopiranosil-}(1\rightarrow6)\text{-O}-\alpha\text{-D-galactopiranosil-}(1\rightarrow2)\text{-D-3-O-metil-chiro inositol}$.

Com relação as propriedades reológicas da galactomanana de *Mimosa scabrella* em solução, verificou-se que os resultados experimentais de fluxo e dinâmica foram concordantes no regime diluído e semi-diluído. O polissacarídeo forma emaranhados ao acaso (random coil) estabelecidos a partir da curva matriz, com valores próprios de polímeros flexíveis como o poliestireno e poliestireno sulfonato. O biopolímero apresenta soluções com comportamento que contrasta com outras galactomananas em dois aspectos: comportamento líquido mesmo em regiões semi-diluídas e viscosidade específica em regime viscoelástico menor. Estas diferenças de comportamento da galactomanana de *Mimosa scabrella* foram atribuídas a sua estrutura altamente ramificada.

SUMMARY

Mimosa scabrella, known as bracinga, belongs to the *Leguminosae* family, sub-family *Mimosoideae*, is a native tree abundant in Southern Brazil. Each tree provides 1 kg of seed annually. The seeds contain 30% of a viscous galactomannan (man:gal 1,1:1, $[\eta]$ 900 ml/g) and 11% of oligosaccharides. The oligosaccharides were fractionated on Bio-gel P2. The resulting fractions were purified by high performance liquid chromatography and their chemical composition and structure were determined by ^{13}C -n.m.r spectroscopy, FAB-ms, glc and glc-ms as ajugose (0.1%), verbascose (0.8%), stachyose (0.9%), raffinose (0.7%), sucrose (5.8%), alditols (0.4%), cyclitol (0.3%) and their O -methylated derivative (0.8%). Glucose (0.6%), galactose (0.3%) and fructose (0.3%) were also found. A new compound trigalactosyl pinitol, $\text{O}-\alpha\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-O}-\alpha\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{6)-O}-\alpha\text{-D-galactopyranosyl-(1}\rightarrow\text{2)-D-3-O-methyl-chiro-inositol}$ was identified in the oligosaccharide fraction.

The rheological properties of galactomannan solutions from *Mimosa scabrella* were investigated. The experimental results of both flow and dynamic systems are in agreement in dilute and semidilute regimes. The galactomannan solutions are characteristic of a random coil polymer established by master curve, similar to the value found for flexible polymers as polystyrene and polystyrene sulfonate. Galactomannan solutions have a typical behavior in contrast with other galactomannans, as a liquid-like solution even in a semidilute regime, and a lower viscoelastic behavior. These differences for behaviour of solutions of the galactomannan of *Mimosa scabrella* were attributed to its high degree of branching.

1. INTRODUÇÃO

O homem depende das plantas para sobreviver, e à medida que a população mundial aumenta, maior é a necessidade de preservar a flora e proteger o ecossistema.

O número de espécies nativas sub-exploradas e potencialmente utilizáveis das regiões tropicais e sub tropicais é extremamente elevado em relação às poucas que são cultivadas para fins econômicos(162). Isto se deve, em grande parte, à escassez de informações básicas sobre a morfologia, fitossociologia e sistemática dos vegetais nativos, bem como à pouca divulgação de dados sobre o seu cultivo, bioquímica e fisiologia.

Além de limitar o uso das plantas, a acomodação a esta situação pode contribuir para o desaparecimento gradual de espécies, já que os padrões impostos por uma economia predominantemente extrativa resultam em elevadas taxas de desmatamento.

Porém, o conhecimento de requisitos ótimos para cultivo, bem como a seleção para melhoramento genético, poderão favorecer o interesse econômico e contribuir para uma exploração racional e controlada da flora(53) .

Sementes acumulam compostos de reserva os quais constituem verdadeiros depósitos energéticos, que são utilizados pelas próprias plantas, para o desenvolvimento do embrião durante a germinação, ou das gemas durante a brotação e pelo homem como fonte de carbono, energia e matéria prima(159). Dentre as reservas armazenadas destacam-se pela abundância e multiplicidade de usos, os carboidratos que podem ser subdivididos de acordo com a solubilidade em água(97):

1. carboidratos não estruturais insolúveis em água: primeiramente o amido (α -glucanas) que é depositado nos amiloplastos e algumas hemiceluloses de várias composições que são frequentemente depositadas na parede celular;
2. carboidratos não estruturais solúveis em água: monossacarídeos, oligossacarídeos, alditois, ciclitois e polissacarídeos como galactomananas, arabinogalactanas, e frutanas.

Apesar da riqueza dos diferentes carboidratos não estruturais encontrados no reino vegetal, a sacarose e amido tem despertado maior interesse dos cientistas.

KELLER(97) descreve a importância dos estudos bioquímicos e da fisiologia de oligossacarídeos da sacarose e açúcares álcoois presentes em plantas superiores.

1.1. ESTRUTURA DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA RAFINOSE

Existem vários carboidratos que possuem molécula de sacarose em sua extremidade tais como a inulina [β -(2 \rightarrow 1)-frutana], a levana [β (2 \rightarrow 6)-frutana], os oligossacarídeos formados por transglicosilação como a questose (α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranose), a nistose (α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-frutofuranose); e os oligossacarídeos da rafinose.

Oligossacarídeos da sacarose, também conhecidos como α -galactosídeos ou oligossacarídeos da família da rafinose, ou ainda de oligossacarídeos da rafinose, são moléculas de sacarose unidas através de ligações glicosídicas a vários monossacarídeos (galactose, frutose ou glucose) que podem ligar-se à unidade de frutose ou da glucose que compõe a sacarose, ou a ambas.

Os oligossacarídeos da sacarose podem apresentar-se na forma de α -galactosil sacarose e compreendem a rafinose, planteose, estaquiose, verbascose e ajugose como representado na Tabela I(62,71).

Além da(s) unidade(s) de galactose, a glucose pode estar ligada à molécula de sacarose como acontece na gentianose (β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2) - β -D-frutofuranosídeo), encontrada em rizomas de muitas espécies de *Gentianaceae*, ou na melezitose (α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-frutofuranosil-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopiranosídeo) que ocorre em exudatos presentes nas folhas de árvores após ataque de insetos(71).

Além dos oligossacarídeos da sacarose são encontrados na natureza a melibiose (α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosídeo), a maninotriose(α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glucopiranosídeo), entre outros (62).

TABELA I - OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA DA RAFINOSE (67, 71).

OLIGOSSACARÍDEOS	ESTRUTURA
Sacarose	α -D-glup-(1→2)- β -D-fruf
Planteose	α -D-glup-(1→2)- β -D-fruf-(6→1)- α -D-galp
Rafinose	α -D-galp-(1→6)- α -D-glup-(1→2)- β -D-fruf
Estaquiose	α -D-galp-(1→6)- α -D-galp-(1→6)- α -D-glup(1→2)- β -D-fruf
Vesbascose	α -D-galp-(1→6)- α -D-galp-(1→6)- α -D-galp(1→6)- α -D-glup(1→2)- β -D-fruf
Ajugose	α -D-galp-(1→6)- α -D-galp-(1→6)- α -D-galp(1→6)- α -D-galp(1→6)- α -D-glup-(1→2)- β -D-fruf

glup = D-glucopiranosil; galp = D-galactopiranosil; fruf = D - frutofuranosil

Os níveis de oligossacarídeos da rafinose e suas proporções relativas são variáveis entre espécies, dependendo da idade, maturidade e condições ambientais(54), podendo variar também dentro da mesma espécie. Estes níveis podem perfazer mais que 10% do peso seco da semente. Em consequência, a extração e determinação do conteúdo em galactosídeos tem sido tema de muitos estudos(36,54,70,97,102,107,167,175,207).

Uma variedade de procedimentos tem sido empregada para a extração de α -galactosídeos de sementes de leguminosas como fervura das sementes em etanol aquoso(168), extração aquosa a frio(114) e a temperaturas moderadas(99), entre outros. Como resultado destas extrações, muitas variações são observadas a nível de oligossacarídeos totais, que podem ser atribuídas a ineficiência do poder de extração dos solventes utilizados, hidrólise dos componentes pela presença de α -galactosidase endógena ativa(99) ou discrepâncias ocorridas nos métodos de análise e quantificação.

SAINI(167), pretendendo comprovar que o uso de diferentes métodos de extração para oligossacarídeos não poderia ser a única fonte de tais variações, realizou estudos com sementes de *Lupinus angustifolius* cv. Chittick, *Cicer arietinum* cv. Tyson, *Glycine max* cv. Forrest, *Phaseolus angularis* cv. Bloodwood e *Vigna sinensis* cv. Banjo. O material moido foi deslipidificado por tratamento com hexano a temperatura ambiente e a seguir submetido a quatro diferentes tipos de extração. O material moido e deslipidificado previamente foi extraído com água a 30°, com etanol aquoso a 65° ou 80° apresentando resultados compatíveis em relação às proporções de sacarose, e na composição em oligossacarídeos como rafinose, estaquiose e verbascose. O tratamento da semente previamente deslipidificada em uma mistura metanol: água (4 : 1) resultou numa extração incompleta dos oligômeros da rafinose. Os resultados mostraram que não ocorreu hidrólise significativa de oligômeros durante as extrações, embora uma leve hidrólise tenha sido observada no processo de extração aquosa com maior evidência para sementes de *Lupinus angustifolius* cv. Chittick. Isto é coerente com a obtenção de pequena quantidade de oligossacarídeos totais e altos níveis de atividade α -galactosidase. O autor(167) sugere também que o processo de extração pode contribuir para o isolamento incompleto dos oligossacarídeos da família da rafinose, a co-extração de enzimas, como

a α -galactosidase, que podem determinar discrepâncias nas análises e quantificação dos oligômeros. Entretanto não fica descartada a hipótese que as condições de cultivo possam interferir na composição em oligossacarídeos.

KNUDSEN(102) em estudos realizados com sementes de *Glycine max* cv. Merr. verificou que o tratamento prévio das sementes inteiras em água fervente por 30 minutos antes da extração aquosa a 60° eliminava a presença de glucose e maltose, provavelmente pela inativação enzimática. Estes componentes foram detectados após extração aquosa a 60° onde o tratamento prévio não foi realizado. KNUDSEN sugere, neste caso, um provável aumento da hidrólise enzimática do amido durante o processo de extração.

O mesmo método de extração foi empregado para análise dos oligossacarídeos da rafinose para mais três espécies de leguminosas, *Cicer arietinum* L. , *Pisum sativum* L. e *Phaseolus vulgaris* L.. Foi observado que a sacarose estava presente em maiores proporções nas sementes de *Glycine max* cv. Merr. e *Cicer arietinum* L., mas que nas sementes de *Pisum sativum* L. e *Phaseolus vulgaris* L. existiam quantidades proporcionais de sacarose e estaquiose. A rafinose foi observada nas quatro amostras, porém em pequena quantidade.

A quantificação dos oligossacarídeos solúveis contidos nas sementes é necessária, no estudo do controle metabólico das plantas e nas investigações fisiológicas e bioquímicas.

KUO et alii(107) utilizaram o método quantitativo de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para investigar os oligossacarídeos de 29 espécies de sementes maduras, compreendidas entre 8 famílias. Os oligossacarídeos analisados foram obtidos por extração etanólica do material deslipidificado. Entre eles estão a sacarose e diferentes oligossacarídeos de rafinose. Quase todas as espécies da família *Leguminosae* apresentaram estaquiose em maior proporção que rafinose enquanto que todas as espécies da família *Gramineae* analisadas apresentaram maiores proporções de rafinose. A sacarose foi predominante em sementes de *Arachis hypogaea*, *Pisum sativum* e *Glycine max*, todas de família *Leguminosae* e também em *Helianthus annuus*, família *Compositae*. Os mesmos dados sobre a sacarose em sementes de *Glycine max* e *Pisum sativum*

foram reportados por KNUDSEN(102) e SAINI(167). Verbascose foi encontrada em maior proporção em sementes de *Vicia faba* e *Phaseolus aureus*, ambas pertencentes a família *Leguminosae*. Ao comparar estes resultados com os obtidos anteriormente por KNUDSEN(102) para sementes *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris*, KUO et alii(107) observaram que as proporções de oligossacarídeos são significativamente menores, provavelmente por se tratar de cultivares diferentes.

Tendo em vista a diversidade entre proporções dos oligossacarídeos de rafinose nas sementes de diferentes famílias e mesmo entre diferentes espécies da mesma família, ainda não foi esclarecido qual é o mecanismo de regulação bioquímica que induz o acúmulo preferencial de um tipo específico de oligossacarídeo.

A composição em oligossacarídeos de sementes de *Vicia Faba* foi determinada em cinco cultivares diferentes(54), sendo dois de *Vicia Faba* L. (Muchamiel, Paceco) e três de *Vicia faba* minor (Scuro Torre Lama, Linea Monti 26, Manfredini). Embora todas apresentassem o mesmo perfil qualitativo, ou seja, sacarose, rafinose estaquiase e verbascose, observou-se uma distribuição relativa muito diferente. Sacarose e verbascose foram os componentes com maiores proporções em todos os cultivares, predominando no cultivar *Vicia faba* L. Muchamiel. Pode-se sugerir que a escolha de cultivares é uma das formas de melhorar a qualidade de produção de sementes de leguminosas.

CERNING et alii(33) na busca de novas fontes de alimentos realizaram estudos sobre a composição de carboidratos em sementes de *Vicia faba* a partir de 16 amostras de várias origens geográficas (Europa, Norte da África, Ásia). Os açúcares presentes na fração solúvel em etanol, separadas por cromatografia de coluna e camada delgada, foram identificados como galactosídeos de sacarose (5,7%), ou seja: rafinose, estaquiase, verbascose e ajugose (Tabela I).

A variação da composição em açúcares de baixo peso molecular foi analisada por YASUI(207) entre 23 amostras de sementes de *Phaseolus vulgaris* na forma selvagem. Mio-inositol, sacarose, rafinose, estaquiase e verbascose foram identificados em todas as amostras. A estaquiase foi predominante entre os oligossacarídeos isolados (relação estaquiase-verbascose 27:1). No entanto, em quatro das 23 amostras analisadas

a relação entre verbascose e estaquiose foi em média 1,8:1 sendo denominadas de tipo A em relação às outras, denominadas de tipo B. As amostras do tipo A não apresentaram diferenças de cor da semente, peso ou morfologia floral e vegetativa em relação às outras do tipo B. Estes resultados podem conduzir à classificação quimiotaxonômica através da composição em carboidratos.

YASUI(205) realizou também estudos comparativos entre os oligossacarídeos obtidos a partir de 26 amostras de sementes de formas cultiváveis de *Glycine max* [*Glycine max*. (L.) MERRILL subs. max] e de formas selvagens [*Glycine max*. subsp. soja (SIEB. et ZUCC.) OHASHI]. (Admite-se que a forma selvagem é um ancestral do tipo cultivável). *Glycine max* L. é uma importante fonte de óleo vegetal e proteína, podendo as sementes secas serem utilizadas como alimento antes ou após o brotamento. Além disso muitos produtos processados tem sido criados e consumidos. Taxonomicamente a *Glycine max* pertence ao sub gênero SOJA e ao gênero *Glycine* WILLD. Todas as amostras continham oligossacarídeos da rafinose e ciclotóis, sendo a sacarose e estaquiose os componentes predominantes, como foi reportado por outros autores(102,107,167).

Os diferentes tipos de *Glycine max*, cultiváveis e selvagens, apresentam composição em carboidratos similar. De acordo com OHASHI(142) podem ser ditas coespecíficas. Porém, o tratamento por análises estatística de projeção, sugere que os tipos cultiváveis são distinguíveis, tomando-se por base as proporções em carboidratos(205).

Os tipos cultiváveis apresentaram maiores quantidades de sacarose, galactosil pinitol, galactinol [1-O-(α -D-galactopiranosil)-1-L-mio-inositol], digalactosil glicerol e menores proporções de estaquiose, em relação aos tipos selvagens.

Estas observações poderiam indicar uma influência do homem na evolução das leguminosas alimentícias, mas segundo YASUI(205) ainda existem poucos dados disponíveis da composição de carboidratos de baixo peso molecular de outras espécies selvagens para uma análise comparativa.

Muito pouca pesquisa tem sido realizada, a nível de Brasil, sobre a identificação de oligossacarídeos presente em plantas nativas, apesar da abundância e diversidade de espécies existentes no país.

O potencial agrônomo de espécies do gênero *Canavalia*, devido à capacidade de proteção e recuperação de solos pobres, força vegetativa e pela recente introdução no Brasil da espécie *Canavalia gladiata* var *gladiata*, com fins nutricionais, levou TEIXEIRA(190) a estudar a composição dos carboidratos de baixo peso molecular presente nas folhas e ramos de *Canavalia gladiata*, *Canavalia gladiata* var *gladiata* e *Canavalia brasiliensis*. Foram usados os processos de cromatografia de gel permeação (GPC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na separação e purificação dos oligossacarídeos e monossacarídeos. As frações mais significativas com grau de polimerização até dois, eram constituídas de glucose, sacarose, pequenas proporções de mio-inositol, sendo o pinitol o constituintes mais abundante. A ocorrência dos mesmos constituintes nas três espécies é explicada pela proximidade entre suas classificações botânica.

O *Calopogonium mucunoides* é uma leguminosa originária da América do Sul que cresce espontaneamente em diversas áreas do Brasil(Mato Grosso e regiões costeiras). Tem sido utilizado como proteção de solo, adubação verde e mais recentemente como forrageira para pastagem. Esta planta, como outras leguminosas, tem a capacidade de fixar nitrogênio, desenvolvendo-se em solos fracos além de possuir um crescimento rápido. O interesse desta espécie como fonte promissora no plano de valorização agroalimentar, propiciou a TEIXEIRA et alii(191) estudarem também os oligossacarídeos presentes no extrato etanólico das sementes desta leguminosa. As frações obtidas, foram identificadas como frutose, glucose, pinitol, sacarose, galactosilpinitol, rafinose e estaquiase.

Observou-se que várias espécies citadas(190,191,205,207) possuem como componentes, além de oligossacarídeos da rafinose, ciclitois e seus derivados.

1.2. CICLITÓIS

Ciclitois têm sido identificados em muitos tipos de vegetais superiores, particularmente em Gimnospermas e em Angiospermas da família *Leguminosae*.

Apresentam-se geralmente em altas concentrações nas sementes em desenvolvimento e em nódulos da raiz(16).

A nomenclatura dos ciclitóis é divergente entre os autores(2,150,199). Todos os ciclohexanohexois (ciclitois), que compreendem nove estereoisômeros, são chamados de inositois e são diferenciados entre si pelos prefixos como: cis, epi, allo, mio, muco, neo, scilo, (+)-chiro e (-)-chiro inositol (Figura 1).

Os isômeros mio, (+)-chiro (também denominado de D-inositol) e (-)-chiro inositol (também chamado L-inositol) são facilmente obtidos de fontes naturais, os outros diastereoisômeros são sintetizados a partir destes três, através de uma série de reações de epimerização. O mio-inositol está presente em grande número de plantas e microorganismos, é utilizado como padrão comercial, além de apresentar importância fisiológica. O mio-inositol é excretado pela urina (inosituria) associada a excreção de D-glucose (glucosuria), característica da diabetes mellitus; em seres humanos e ratos, a reabsorção de mio-inositol pelo rim é inibida devido a elevada concentração de D-glucose; é fator de crescimento para microorganismos e utilizado como vitamina A, agente lipotrófico prevenindo a infiltração de gordura no fígado. Além disso, o mio-inositol pode ser utilizado como tratamento para alopecia (perda de cabelo) e substituinte do ácido-L-ascórbico em dietas.

Entre os ciclitois encontrados frequentemente no reino vegetal estão os éteres-O-metilícos de inositol como, por exemplo, o (+)-pinitol, (-)-quebraquitol, sequoitol, bornesitol e o ononitol(150) (Figura 2).

O D-(+)-pinitol, (D-3-O-metil-chiro-inositol), foi isolado pela primeira vez em 1856 por BERTHELOT(150) nos exudatos de *Pinus cambertrana*. Posteriormente numerosas plantas foram analisadas entre as quais 53 espécies de leguminosas, onde o pinitol foi encontrado em quantidade pouco significativa. Além do D-(+)-pinitol, foi observado em folhas de *Artemisia dracunlus* L. o antípoda ótico do pinitol, D-(-)-pinitol.

NORDIN(140) observou que a liberação do pinitol é muito mais rápida que de carboidratos durante a embebição de sementes de *Glycine max* cv. Sparks. Provavelmente

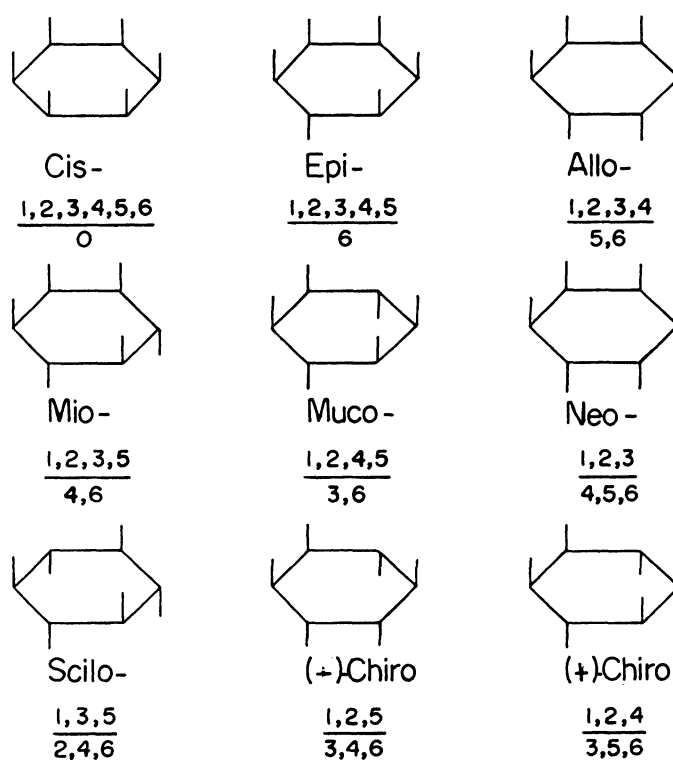


Figura 1 -Diastereoisômeros do inositol, de acordo com POSTERNAK(150). Os ciclos estão contidos num plano, onde os números representados no numerador indicam os carbonos aos quais as hidroxilas estão ligadas na região superior ao plano e os números do denominador indicam os carbonos aos quais as hidroxilas estão ligadas na região inferior ao plano.

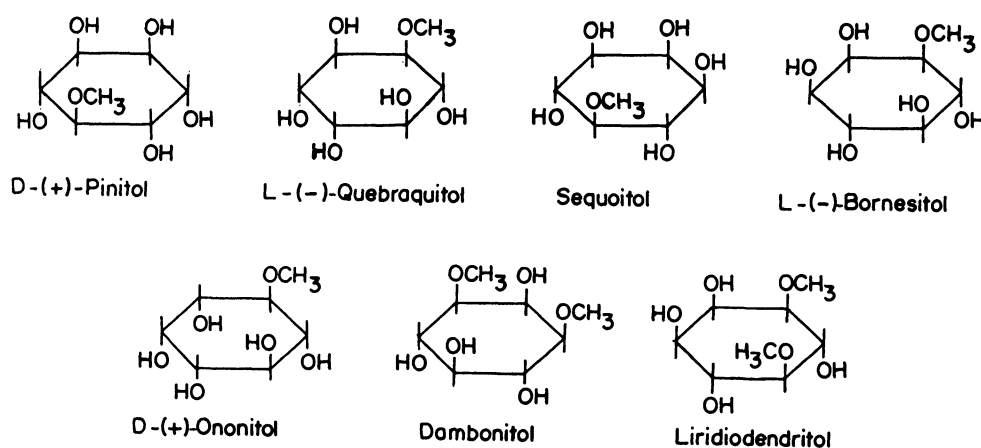


Figura 2 - Eteres O-metílicos do inositol

o efluxo específico de pinitol tem um significado na germinação. A semente contém 0,6 a 0,9% de pinitol dos quais 12% é perdido durante a embebição; esta mudança parece pequena para que seja atribuída a um controle do efeito osmótico. Possivelmente a perda de carboidratos e ciclitóis tenha alguma influência no desenvolvimento das espécies de *Rhizobium* no solo.

Sabe-se que a liberação de carboidratos (sacarose, rafinose, estaquiose, frutose, glicose) durante a embebição é variável. A deterioração da testa e o conteúdo inicial de umidade são alguns dos fatores que influenciam o efluxo dos componentes da semente. Após armazenagem das sementes por alguns meses os resultados mostraram uma menor liberação de carboidratos. A relação pinitol-carboidratos foi maior em comparação com sementes não armazenadas(140).

Ainda hoje existem dúvidas sobre a biossíntese de D-pinitol em plantas superiores(55). A sequência pode variar a partir das etapas de reação que envolvem sequitol, mio-inositol e D-ononitol.

O L-(-)-quebraquitol, (L-2-O-metil-chiro-inositol), tem seu nome originário da *Aspidosperma quebracho*, do gênero *Apocynaceae*, de onde foi isolado pela primeira vez em 1889 por TANRET(150). Foi encontrado também em *Cannabis sativa*(16).

Sequoitol, (5-O-metil-mio-inositol), foi isolado primeiramente em madeira de *Sequoia sempervieres*. Através de pesquisas sistemáticas observou-se que este ciclitol está presente em um grande número de Gimnospermas, particularmente em coníferas. Seu grupo metílico pode ser encontrado também na posição 2 do mio-inositol(+).

L-(+)-bornesitol, (L-1-O-metil-mio-inositol), foi extraído em 1871 por GIRARD(150) através de pressão sobre a borracheira bruta, e também isolado da madeira de *Sarcophalus diderrichii* e *Cannabis sativa*(16). Pode existir na forma de L-(-)-bornesitol, como o pinitol que é encontrado no reino vegetal nas suas duas formas enantiomorfos.

D-(+)-ononitol, (D-4-O-metil-mio-inositol), foi isolado de *Ononis nadrix* L., *Ononis alopecuroides* L., *Medicago sativa*, *Dolichos lablab* L. e *Vigna catjang walp*, todas pertencentes a família *Leguminosae*. Dambonitol (1,3-O-dimetil-mio-inositol) e liridiodendritol (3,5-di-O-metil-mio-inositol) são raramente encontrados entre as espécies vegetais.

PHILIPS, DOUGHERTY E SMITH(145) ao constatarem a abundância relativa dos ciclitóis em leguminosas partiram para a identificação destes compostos em sementes e nódulos das raízes de *Glycine max* L. Merr. Entre os ciclitóis isolados estão o pinitol, D-chiro-inositol, mio-inositol e sequoitol. Pinitol foi predominante nas sementes dos 24 cultivares examinados. No entanto apresentaram proporções diferenciadas entre os cultivares, provavelmente devido ao grau de maturação variável.

O segundo ciclitol mais abundante foi D-chiro-inositol, seguido de mio-inositol que foi encontrado em quantidades insignificantes.

Os extratos dos nódulos de raiz apresentaram concentrações de mio-inositol e D-chiro-inositol muitas vezes maior que em outras partes da planta, sendo que a concentração de pinitol e sequoitol foi semelhante.

BINDER E HADDON(16) em estudos realizados com as folhas de *Glycine max* L. Merr. identificaram ciclitóis presentes em baixas concentrações, entre os quais D-(+)-ononitol, sequoitol e o bornesitol. Os autores observaram que o conteúdo de D-(+)-ononitol em folhas é variável, de acordo com o estágio de crescimento vegetativo e

conforme o cultivar.

A *Glycine max* L. Merr. foi a primeira espécie em que a combinação entre os ciclitois: pinitol, ononitol, sequoitol, bornesitol, chiro-inositol e mio-inositol foi observada. Por outro lado foram identificados pinitol, ononitol e bornesitol em *Medicago sativa*(122,161); pinitol, sequoitol, bornesitol e D-chiro-inositol em três espécies de *Asclepiadaceae*. A identificação destes ciclitois pode apresentar algum interesse taxonômico.

Muitos autores(11,96,151,175,206) ao estudarem sementes da família *Leguminosae* observaram a presença de oligossacarídeos derivados do ciclitol denominados galactopiranosil ciclitois, galactosil ciclitois ou galactosídeos de ciclitol. O primeiro galactosídeo de ciclitol foi isolado de sementes de *Vicia sativa*, um mio-inositol galactosídeo conhecido como galactinol, identificado também em sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Lupinus albus*(151). Outro isômero, 2-O(α -D-galactopiranosil)-1-D-chiro-inositol foi isolado de sementes de *Glycine max*(96).

Os glicosídeos de pinitol encontram-se presentes entre os constituintes de baixo peso molecular das sementes de leguminosas(11,175). O galactosil-pinitol [2-O-(α -D-galactopiranosil)-4-O-metil-1-D-chiro-inositol] foi isolado pela primeira vez em sementes de *Trifolium subterraneum*(11), posteriormente em *Cicer arietinum* L., *Lens esculenta*, *Glycine max* L. cv. Yellow Tokyo, *Phaseolus vulgaris* L.(151,175). A hidrólise ácida ou enzimática (α -galactosidase) forneceu proporções idênticas de galactose e pinitol. Após metilação, hidrólise, redução e acetilação, os produtos mono-O-acetil-penta-O-metil ciclitol e 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-galactitol foram identificados por análise cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa.

Em estudos de sementes de 39 espécies de leguminosas, compreendidas em treze gêneros, verificou-se a presença de galactosil-pinitol em todas as amostras e que este componente estava sempre acompanhado de quantidades de pinitol, o mesmo ocorrendo para o galactinol em relação ao mio-inositol.

Admite-se que o galactinol presente nas plantas atua como um intermediário na biossíntese da rafinose, estaquiose e verbascose(52) e por analogia BEVERIDGE, FORD

e RICHARDS(11) sugerem para o galactosil-pinitol a mesma função. Esta proposição foi reforçada em estudos de SCHWEIZER et alii(175), que verificaram a ausência de galactinol em sementes de *Glycine max* e *Cicer arietinum* L., mas observaram quantidades significativas de oligossacarídeos da rafinose e galactosil pinitol.

Outros isômeros foram identificados como o 1-D-5-O-(α -D-galactopiranosil)-4-O-metil-chiro-inositol isolado de sementes de *Glycine max*(96) e o galactosil ononitol [1-D-5-O-(α -D-galactopiranosil)-4-O-metil-mio-inositol] isolado de sementes de *Vigna angularis*(206).

O galactosil ononitol está presente também em sementes de *Vigna sinensis* Savi, mas não em sementes de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* L. e *Glycine max* cv. Merr., o que poderia sugerir um significado quimiotaxonômico, o mesmo ocorrendo para o galactinol(151) e o galactosil pinitol(11,175).

Um digalactosídeo pinitol, O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-4-O-metil-chiro-1-D-inositol foi isolado e identificado pela primeira vez em sementes de *Cicer arietinum* L. cv Ain Temouchent (2,8% da semente descascada) e denominado ciceritol. Este composto está presente também em sementes de *Lens esculenta* (1,16%), *Lupinus albus* L. cv. Kalina (0,65%), *Glycine max* L., cv. Yellow Tokyo (0,08%) e *Phaseolus vulgaris* L.,cv. Michelet (traços)(151). Foi detectado também um digalactosil glicerol em sementes de *Phaseolus aureus* Roxb(6) e em *Phaseolus vulgaris* L.(207).

QUEMENER E BRILLOUET(151) sugerem a existência de um homólogo do ciceritol, um trigalactosil pinitol, em sementes de *Cicer arietinum* L. cv. Ain Temouchent, *Lens esculenta* e *Lupinus albus* L. cv. Kalina porém o composto não foi isolado e caracterizado.

Os açúcares álcoois denominados de poliois acíclicos ou alditois estão incluídos entre os compostos de baixo peso molecular presente nas sementes de leguminosas. LEWIS(109) listou 17 alditois de ocorrência natural em plantas. Porém, manitol, glucitol (sorbitol) e galactitol (dulcitol) são encontrados com maior frequência. O manitol foi identificado em aproximadamente 50 famílias, principalmente entre as *Oliaceae*, *Apiaceae* e *Rubiaceae*. Sorbitol é característico de muitas *Rosaceae*, *Plantaginaceae*

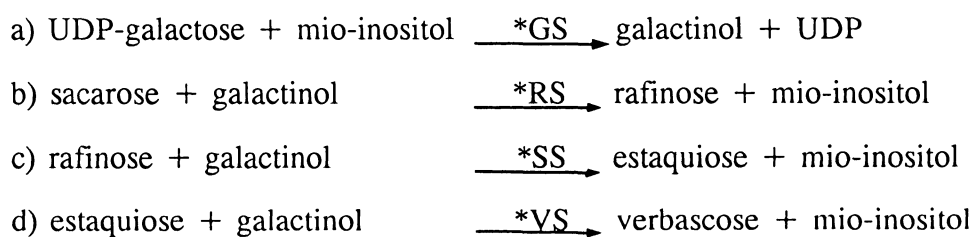
e *Malvaceae*(70) enquanto que o galactitol ocorre em *Celastraceae*. A distribuição dos alditóis é tão distinta que eles podem ser sugeridos como valiosos marcadores quimiotaxonômicos.

Alditóis encontram-se presentes em todas as partes das plantas superiores, mas seus sítios de reserva são principalmente as folhas e frutos. São definidos quimicamente como produtos de redução de aldoses ou cetoses. A redução de cada aldose produz um alditol, enquanto que dois alditóis epiméricos são obtidos de cada cetose.

As funções fisiológicas atribuídas aos alditóis são semelhantes às dos açúcares neutros. Elas incluem reserva de carbono (principalmente nos vacúolos), regulação osmótica, proteção de enzimas e membrana, e translocação de carbono.

1.3. METABOLISMO DOS OLIGOSSACARÍDEOS DA RAFINOSE

O metabolismo e acúmulo dos oligossacarídeos no desenvolvimento da semente é bastante complexo. Os oligossacarídeos da rafinose (Tabela I) são sintetizados no endosperma simultaneamente com a sedimentação da galactomanana(182). A biossíntese envolve sucessivas transferências de unidades α -D-galactopiranosil do galactinol à molécula de sacarose, isto é, para o grupo hidroxila do C-6 do terminal glucosil ou da unidade D-galactosil da sequência oligossacarídica precedente(71) de acordo com esquema abaixo, conforme proposto por DEY(52):



* GS = galactinol sintase (UDP-galactose : inositol galactosil transferase) ; * RS = rafinose sintase ; * SS = estaquiose sintase; * VS = verbascose sintase.

Entretanto, KELLER(97) em revisão recente no Journal of Plant Physiology, relata que apesar da existência de vários trabalhos sobre o assunto (30,36,43,81,96,98,112,166,172.192,193) a bioquímica dos oligossacarídeos incluindo biossíntese, regulação e compartimentalização encontra-se em fase inicial, existindo a necessidade de estudos mais aprofundados.

A sacarose, o principal composto de translocação de carbono e energia nas plantas, importante no desenvolvimento das sementes, é utilizada na síntese de galactomanana e oligossacarídeos da rafinose, na Figura 3(182):

Oligossacarídeos da sacarose são degradados pela ação de hidrolases. A α -galactosidase (E.C. 3.2.1.22) é a principal enzima da iniciação catabólica na quebra dos galactosil sacarose removendo unidades de D-galactose com liberação da sacarose(129).

Em estudos realizados em tubérculos de *Stachys sieboldii*(98), observou-se que a α -galactosidase esta localizada no vacúolo, no mesmo compartimento do substrato. Galactose livre também foi identificada, agindo como inibidor competitivo da atividade α -galactosidase durante a fase de dormência do tubérculo. Postula-se que a galactose é transportada para fora do vacúolo e subsequentemente fosforilada pela galactoquinase no citossol interrompendo a inibição , permitindo que a α -galactosidase mobilize a estaquiose para a germinação.

A atividade α -galactosidase segundo estudos de LOWELL E KUO(112) aumenta durante o crescimento de sementes de *Glycine max* de dois cultivares, cv. Williams 82 e Wolverine, o mesmo ocorrendo para cv. Forrest(85). Os autores investigaram também a relação entre o acúmulo de açúcares solúveis e a atividade enzimática durante o desenvolvimento de sementes de *Glycine max* L. Meer. dos dois cultivares.

SAINI(167) ao analisar métodos de extração para obtenção de oligossacarídeos da rafinose a partir das sementes de leguminosas, observou que a atividade da α -galactosidase estava associada à fracção da parede celular, exceto em sementes de *Lupinus angustifolius* cv. Chittick, que se encontrava na fracção citoplasmática. Observou, ainda, que a atividade α -galactosidase não foi afetada pela etapa de deslipidificação a temperatura ambiente.

Embora a função dos oligossacarídeos da rafinose não esteja completamente elucidada, há evidências que eles, assim como a sacarose, atuam como compostos de reserva e de pronta disponibilidade para a planta, como substrato para a respiração durante a germinação(182). Conseqüentemente, alguns trabalhos tem sido desenvolvidos nesta área.

KUO et alii(107) realizaram análise comparativa do metabolismo de oligossacarídeos da rafinose em sementes de *Phaseolus aureus*, *Glycine max*, e *Gossypium herbaceum* durante a germinação, pois estas espécies apresentavam oligossacarídeos predominantes; a verbascose em *Phaseolus aureus*, a estaquiose em *Glycine max* e rafinose em *Gossypium herbaceum*, o que deveria caracterizar diferentes cinéticas metabólicas. Observaram ainda, que níveis de sacarose decresciam progressivamente nas sementes de *Glycine max* e de *Gossypium herbaceum*, enquanto que um acréscimo deste açúcar ocorria nas sementes de *Phaseolus aureus*. Este acúmulo de sacarose provavelmente se deve à mobilização de uma grande quantidade de reserva de amido presente nos cotilédones das sementes de *Phaseolus aureus*. Frutose e pequena quantidade de glucose são acumuladas no caule embrionário de *Phaseolus aureus* e *Glycine max*; em sementes de *Gossypium herbaceum* este acúmulo é mínimo, e a presença de monossacarídeos nos cotilédones é também mínima ou inexistente.

Baseados nestes resultados os autores(107) sugerem que o caule embrionário seja o sítio majoritário para a hidrólise de sacarose e que o seu metabolismo, bem como, o de monossacarídeos é característico de cada espécie. Provavelmente a pequena quantidade de glucose presente no caule embrionário deva indicar que esta foi rapidamente metabolizada para novo crescimento, talvez para formação de UDP-Glucose(166). Verificaram ainda, pelo crescimento do caule embrionário e o decréscimo em peso seco dos cotilédones, que as sementes de *Phaseolus aureus* germinavam mais rápido que as de *Glycine max* e estas, por sua vez, mais rápido que sementes de *Gossypium herbaceum*. A velocidade de germinação correspondia ao acúmulo de frutose no caule embrionário e ao desaparecimento do oligossacarídeo de rafinose predominante nas sementes, ou seja,

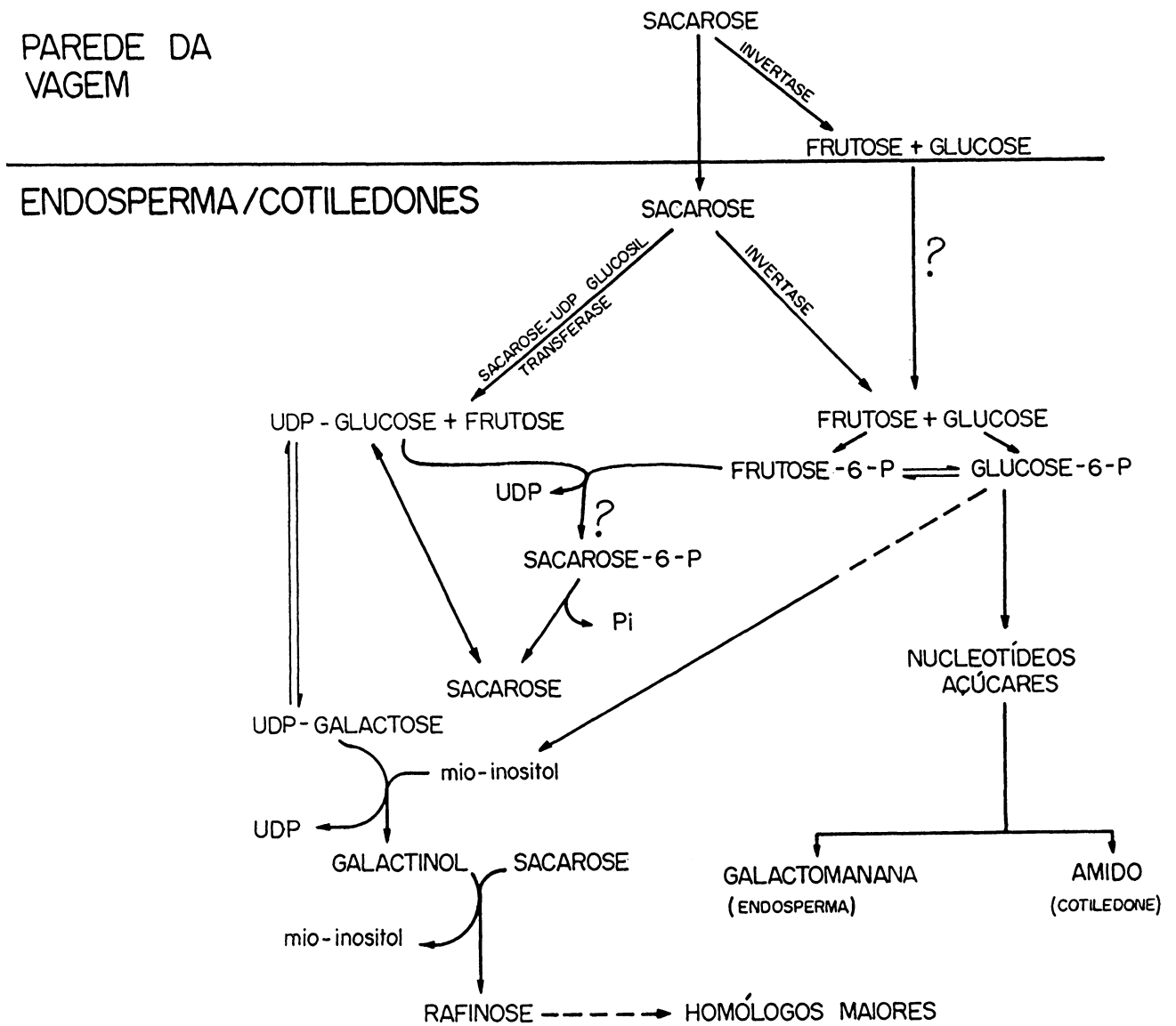


Figura 3 - Via metabólica de formação da galactomanana e dos oligossacarídeos da rafinose a partir da sacarose conforme proposto por SINGH et alii(182).

verbascose em *Phaseolus aureus*, estaquiose em *Glycine max* e rafinose em *Gossypium herbaceum*.

No entanto, conteúdo em oligossacarídeos da rafinose nas sementes de *Phaseolus aureus* e *Glycine max* foi maior quando comparada ao estado de dormência, sugerindo que este aumento provavelmente se deve a síntese dos oligossacarídeos nos primeiros estágios de germinação(52).

Em todos os casos citados acima, os oligossacarídeos da série da rafinose presentes, tanto nos cotilédones, como no caule embrionário desaparecem no decorrer da germinação, mas com velocidade maior no caule embrionário, sugerindo que os oligossacarídeos da rafinose, presente nos cotilédones, são primeiramente hidrolisados para produção de sacarose e daí transportados para o caule embrionário, para metabolização adicional.

Estas análises de açúcares solúveis das sementes em fase de germinação fornecem informações para o conhecimento do metabolismo dos oligossacarídeos nos cotilédones e caule embrionário, mas estes estudos requerem ainda uma melhor investigação associada ao metabolismo das enzimas envolvidas neste sistema, como a α -galactosidase, invertase (β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, EC 3.2.1.26) e sacarose sintase (UDP-glucose : frutose 2- α -D-glucosil transferase, EC 2.4.1.13).

Foram desenvolvidos estudos sobre os efeitos da germinação em oligossacarídeos da rafinose em duas variedades de sementes *Phaseolus vulgaris* (35), *Phaseolus aureus*(6) e *Cicer arietinum*(6). A rafinose e estaquiose foram reduzidas a aproximadamente 70-80% do valor inicial após seis dias de germinação em sementes de *Phaseolus vulgaris*. No caso das sementes de *Phaseolus aureus* verificou-se um declínio total em oligossacarídeos da rafinose após três dias e para as sementes de *Cicer arietinum* o decréscimo foi pouco significativo durante o mesmo período.

Os conteúdos de glucose, frutose e sacarose mostraram-se máximos após 48h e 24h de germinação para sementes de *Phaseolus aureus* e *Cicer arietinum*, respectivamente. Houve um leve decréscimo no conteúdo dos ciclitois e oligossacarídeos de ciclitois. As sementes na fase de brotação (mergulhadas em água e germinadas durante

poucos dias) apresentaram proporções menores de componentes de baixo peso molecular, principalmente devido ao uso dos galactosídeos da família da rafinose pelas plantas, como fonte energética de rápida disponibilidade.

Diferenças no decréscimo dos oligossacarídeos nas sementes durante a germinação têm sido atribuídas, parte a diferenças de origem e cultivares, e parte a diferenças na atividade da enzima α -galactosidase(12).

Com a finalidade de uma melhor compreensão das funções propostas para os oligossacarídeos da rafinose CASTILLO et alii(30) iniciaram estudos da rafinose sintase e galactinol sintase no desenvolvimento de sementes de *Glycine max*, v. Hudson 78 e *Phaseolus vulgaris*, v. California Dark Red. Estabeleceram que a atividade da galactinol sintase era maior nas últimas etapas de desenvolvimento das sementes, quando o peso das mesmas iniciavam um decréscimo, como no início do processo de dessecação. Isto é, a perda de água inicia concomitantemente com o acúmulo dos oligossacarídeos de rafinose. Os oligossacarídeos podem fornecer um microambiente de água e grupos hidroxilas que protegem as proteínas de membrana e outras moléculas biologicamente ativas da desnaturação, durante o processo de dessecação concernente à dormência. Um processo similar pode ser proposto para o processo de aclimatização durante o frio.

Durante o inverno as temperaturas são muito baixas para um crescimento significativo da planta, no verão, a umidade do solo é pequena e o crescimento é interrompido. Por este motivo algumas plantas desenvolvem características que favorecem o crescimento durante a primavera e outono, quando as temperaturas são mais amenas e a umidade é favorável(36).

Pastos de estações frias acumulam oligossacarídeos da rafinose em seus vacúolos, diferenciando dos vegetais que acumulam grande quantidade de amido em seus cloroplastos.

Em contraste com o amido, os oligossacarídeos são altamente solúveis em água e podem ser metabolizados a partir da sacarose com a alteração do comprimento das cadeias com o mínimo desperdício de energia(12). Além disso o metabolismo do amido é relativamente sensível à temperaturas frias.

Todas estas evidências levaram POLLOCK(147) a caracterizar os oligossacarídeos da rafinose como uma forma alternativa de reserva de carboidratos, especialmente em sítios fora de cloroplastos, fornecendo uma vantagem significativa para as plantas que continuam a crescer durante os meses de inverno.

Sugere-se, ainda, que a síntese dos oligômeros da rafinose possa facilitar a reciclagem de fosfato cloroplástico a baixas temperaturas, pois uma reciclagem é importante para o contínuo crescimento das plantas durante temperatura baixas(148). CASTILLO et alli(30) verificaram que baixas temperaturas induziam e ou aumentavam a atividade de galactinol sintase em sementes e folhas de *Glycine max* e *Phaseolus aureus*. Este fato foi acompanhado de um acréscimo de sacarose e oligômeros de rafinose e um decréscimo de amido durante o inverno.

A atividade da galactinol sintase aumentada ou induzida pelas baixas temperaturas indica que esta possa ter uma função chave na biossíntese dos oligossacarídeos da rafinose, em resposta a baixas temperaturas, devido a ativação gênica ou a processos postranslacionais, tornando-se esta enzima, um modelo interessante para o estudo da ativação gênica em plantas submetidas a baixa temperaturas.

O conhecimento do mecanismo molecular da ativação gênica pela baixa temperatura a que são submetidas as plantas, tem uma importância potencial para o desenvolvimento de estratégias de engenharia genética, para a resistência e aclimatização das plantas ao frio.

Como exemplo, experimentos *in vitro* demonstraram que os açúcares presentes nas plantas podem evitar deformações causadas pelo congelamento, onde a rafinose demonstrou-se mais eficaz pela sua estrutura oligomérica em relação a sacarose e glucose(171).

1.4. FLATULÊNCIA

O interesse na pesquisa de carboidratos de baixo peso molecular em produtos naturais é crescente, pois estes podem perfazer mais de 10% do peso seco da

semente(167). Do ponto de vista nutricional os oligossacarídeos da rafinose são conhecidos como fatores de indução à flatulência, pela formação de gases no intestino.

No sistema digestivo humano estes oligossacarídeos não são digeridos, conseqüentemente não sendo absorvidos pelo trato intestinal superior, mas são degradados e fermentados por microorganismos do colo intestinal produzindo H_2 e CO_2 devido a inexistência de enzimas do tipo α -galactosidase na classe mamalia. Assim, os oligossacarídeos passam relativamente intactos até o intestino grosso, onde sofrem fermentação(13).

Muitas investigações tem sido realizadas com relação aos problemas de flatulência causados pela ingestão de sementes de leguminosas.

Tratamentos baseados na ingestão simultânea de leguminosas com enzimas, ao invés de hidrolizar os oligossacarídeos, tiveram um efeito insignificante na produção de gases a nível intestinal(6).

Com a finalidade de analisar a qualidade nutricional das leguminosas de *Pisum sativum* L, *Vicia faba* L. e *Lens culinaris*, BHATTY e CHRISTISON (13) determinaram o conteúdo de oligossacarídeos totais, sendo 5,88%, 3,03% e 3,84%, respectivamente. As proteínas isoladas destas três leguminosas, utilizadas como produtos processados na incorporação de rações e produtos alimentícios, apresentaram uma concentração muito baixa de sacarose e oligossacarídeos, logo, estando relativamente livre dos efeitos causados pela flatulência.

OGUN, MARKAKIS e CHENOWETH(141) analisaram os efeitos ocorridos na composição em oligossacarídeos de rafinose causado pelo descasque, imersão a frio, imersão a quente e cocção em quatro cultivares de sementes de *Vigna unguiculata*. Observou-se, por análise nas sementes isentas do caldo, que houve um pequeno decréscimo de rafinose após o processamento, enquanto, que para estaquiose o decréscimo foi significativo em todas os métodos de processamento, exceto pela imersão a frio. Como a estaquiose é um dos componentes de maior influência na flatulência, esta redução foi considerada significativa.

Outros tratamentos como imersão em água e bicarbonato de sódio, autoclavação,

germinação e fritura das sementes germinadas foram aplicadas a sementes de *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum*, *Phaseolus mungo*, *Cajanus cajan* e *Vicia faba*(96).

Entre os métodos empregados, observaram que a germinação por 24 horas é um tratamento razoável para redução dos carboidratos causadores da flatulência, pois durante este período, os açúcares devem ser utilizados na produção de energia necessária para os vários processos ocorridos na semente. Neste mesmo período não se obteve perdas dos carboidratos úteis como agentes nutritivos.

Um estudo comparativo dos níveis de flatulência em relação ao conteúdo de oligossacarídeos presentes em algumas leguminosas foi desenvolvido por SAVITRI e DESIKACHAR(173). O conteúdo de oligossacarídeos obtidos após extração etanólica de sementes de sete diferentes leguminosas: *Glycine max*, *Cicer arietinum*, *Cajanus cajan*, *Phaseolus mungo*, *Vigna catjang*, *Dolichos biflorus* e *Phaseolus radiatus* foi analisado em amostras cruas, após cocção ou germinação. Os resultados obtidos mostraram que o conteúdo em oligossacarídeos (rafinose, estaquiose e verbascose) nas amostras submetidas a cocção foram maiores que as cruas. Após germinação durante 72 horas obteve-se uma redução em oligossacarídeos variando entre 40 - 50%. O aumento, após cocção foi atribuído à maior facilidade de extração dos oligossacarídeos. Este aumento variou de 15 a 25% entre as leguminosas analisadas.

A diminuição no conteúdo de oligossacarídeos com a germinação progressiva (24-72horas), ocorre provavelmente pela ação da enzima α -galactosidase. Após 72 horas de germinação, a redução em estaquiose foi de 41 - 86%, seguida pela verbascose 50-75%, sendo menor para a rafinose 5-30%

A marcante redução nos efeitos de flatulência por todos os legumes após germinação pode ser atribuída a acentuada redução dos oligossacarídeos(153).

Os resultados acima citados demonstraram que as práticas tradicionais como germinação e brotamento, seguidas por muitas civilizações orientais é um método fácil para redução da flatulência produzida pelas leguminosas.

Os estudos de SAVITRI e DESIKACHAR(173), demonstraram que os efeitos de flatulência de algumas leguminosas no estado *in natura* e após germinação não eram

proporcionais ao conteúdo de oligossacarídeos estimado. Este fato poderia indicar que, além dos α -galactosídeos da sacarose, outros componentes como os galactosídeos ciclitois, as hemiceluloses e mesmo o amido podem ser responsáveis pela indução à flatulência.

Apesar dos inúmeros resultados interessantes discutidos acima, observa-se que as pesquisas na área de carboidratos de baixo peso molecular está no seu início. Esta situação deixa em aberto muitas questões fundamentais sobre a bioquímica e fisiologia dos oligossacarídeos da rafinose, ciclitois e alditois. Isto inclui etapas de biossíntese e utilização, regulação, translocação e funções fisiológicas complementares (osmoregulação, crioproteção).

Os componentes de baixo peso molecular são compostos suplementares ou alternativos ao metabolismo básico, que envolve a sacarose e amido sendo encontrados universalmente no reino vegetal. Conseqüentemente as investigações sobre oligossacarídeos da rafinose, ciclitois, alditois devem ser conduzidas paralelamente ao estudo do metabolismo básico, oferecendo assim, uma oportunidade impar para ampliar os conhecimentos sobre a complexidade e variabilidade da vida das plantas e sua melhor utilização pelo homem.

1.5. GALACTOMANANAS

Os biopolímeros, carboidratos e proteínas, estão sendo largamente utilizados em processos industriais, representando cerca de 80% da produção mundial, onde o restante compreende os polímeros sintéticos(203).

Dentre os carboidratos incluem-se os polissacarídeos de origem vegetal como amido (73% do consumo de polissacarídeos anualmente nos U.S.A.), celulose e seus derivados (19%), galactomanana (3%), alginato (0,9%), pectina (0,6%), carragenana (0,3%), agarose (0,2%) e os de origem microbiana como a xantana (0,8%) e dextrana (0,1%). Além destes polissacarídeos pode-se citar a quitina, quitosana, escleroglucana, succinoglucana e os da família da ransana (rhansan), gelana (gellan), welana (wellan), S-88, S-198, S-657, estes últimos em fase inicial de aplicação industrial(130).

No reino vegetal os polissacarídeos são os constituintes mais abundantes, considerados importantes fontes de matéria prima renovável. Processos biotecnológicos estão sendo desenvolvidos para exploração e modificação destes polímeros(23).

Os polissacarídeos são frequentemente empregados para aumentar a viscosidade das soluções na formação de geis não covalentes, na estabilização de emulsões ou floculação de materiais dispersos, como quelantes, ligantes e impermeabilizantes. Tem como característica a biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade hidrofílica e não toxicidade(170,204). Para que sejam adequadamente explorados pela indústria, é necessário o desenvolvimento prévio de critérios que definam a estrutura, função e conformação molecular adotada.

Dentre estes polissacarídeos destacam-se pelas suas propriedades viscosantes e emulsificantes, as galactomananas. São constituintes de reserva em endosperma de sementes de plantas da família *Leguminosae*. Ocorrem também como componentes da parede celular em caules de Gimnospermas(194), em líquens(72,73), microorganismos como fungos(10,74,75,101,110,135). Apesar das análises químicas das galactomananas de sementes terem iniciado no fim do século XIX, em sementes de *Ceratonía siliqua*(186), e atualmente com inúmeras espécies estudadas(48,185) somente duas são utilizadas para produção de galactomanana a nível industrial, *Ceratonía siliqua* e *Cyamopsis tetragonolobus*(177).

A *Ceratonía siliqua* (23% galactose, 77% manose) conhecida comercialmente por goma de alfarrobo, (locust bean ou carob), é nativa do Sul da Europa e foi utilizada inicialmente como ração animal(48). Esta espécie pertence a sub-família *Caesalpinioideae*, tribo *Cassieae*, produzindo árvores com oito metros de altura com frutos de 10 a 20 cm, a partir dos 5 anos, em média. Suas sementes são em forma oval, amarronzadas, com 8 a 9 mm de comprimento(24).

A *Cyamopsis tetragonolobus* (38% galactose, 62% manose) e uma planta nativa do Paquistão, da sub-família *Faboideae*, tribo *Indigofereae* cujo polissacarídeo é conhecido comercialmente como goma de guar (guaran) o interesse nesta espécie surgiu

em 1940 (48) devido a escassez de outras fontes de galactomanana durante a 2ª Guerra Mundial. Atualmente é cultivada em larga escala nos U.S.A.. É uma espécie de cultivo anual, possuindo 0,6 m de altura com sementes de diâmetro médio entre 4-5 mm. Sua produção anual mundial entre os anos 1983-1985 foi de 67.000 toneladas métricas, sendo 1/3 consumido na indústria de alimentos e o restante na indústria em geral. Seu valor de mercado no ano de 1986 foi de 45 milhões de dolares com previsões de aumento de produção em 18,3% para os próximos anos(204). Esta galactomanana e seus derivados está entre os primeiros biopolímeros de consumo mundial (abaixo da celulose e dos derivados de amido) em níveis de produção e valor de mercado.

Segundo BULPIN et alii(23) as propriedades da galactomananas utilizadas para fins comerciais provém de dois fatores concernentes a sua estrutura molecular:

1. a cadeia principal de β -(1 \rightarrow 4)-manana que é rígida e conduz à viscosidade elevada em soluções diluídas.
2. Conteúdo em galactose que determina a combinação com outros polissacarídeos e a estabilidade em sistemas de congelamento.

Este critério pode ser considerado satisfatório pois envolve os parâmetros que determinam a estrutura primária que é responsável pelo peso molecular, pela conformação adotada e pelos níveis estruturais terciários (interação polímero-polímero) e quaternário (interação entre polímeros diferentes).(154)

No caso de aplicações envolvendo aumento de viscosidade em soluções aquosas tanto a goma de guar como a goma de alfarrobo podem ser utilizadas, no entanto a goma de guar é mais empregada por razões econômicas. Entretanto em aplicações envolvendo co-gelatinização com outros polissacarídeos e estabilização em produtos congelados a goma de alfarrobo é a mais indicada, por apresentar menor conteúdo de galactose(139).

A aplicação das galactomananas na indústria pode ser resumida conforme indica a Tabela II.

TABELA II - APLICAÇÕES DE GALACTOMANANAS DE GUAR E ALFARROBO POR ORDEM DE MAIOR APLICAÇÃO (139,177)

Indústria	Aplicação
Alimentícia.	espessante estabilizante gelificantes (em associação com outros polissacarídeos)
Papeleira.	aditivo
Textil.	espessante para tinturas
Minério.	floculante agente de flotação
Petroquímica.	agente de fracturação colmatante temporario
Explosivos.	estabilizante

Outras indústrias como, tintas, adesivos, farmacêutica, cosméticos, fotografias, agricultura, utilizam este produto em seus processos, porém em quantidade menos significativa. Trabalhos realizados nos anos 1940-1950 sobre as galactomananas de guar e alfarrobo permitiu a obtenção de um esquema geral concernente a estrutura deste composto. Galactomananas são macromoléculas constituídas de uma cadeia principal de unidades β -D-manopiranosídicas ligadas glicosidicamente em (1 \rightarrow 4), possuindo ramificações laterais de unidades α -D-galactopiranosose ligados glicosidicamente em (1 \rightarrow 6).

As galactomananas podem apresentar diferenças entre as espécies de leguminosas pela proporção de unidades α -D-galactopiranosose presentes no polímero(179), que varia

entre proporções de 50% para galactomanana de *Medicago sativa*(40) e *Trifolium repens*(91) ambas da tribo *Trifolieae* até 16% para galactomanana de *Sophora japonica*(103) da tribo *Sophoreae*, uma característica importante que pode auxiliar na classificação quimiotaxonômica entre as espécies da família *Leguminosae*. As ramificações de unidades de galactose favorecem a solubilidade em água das galactomananas. Os níveis de no mínimo 10% em galactose são necessários para solubilidade em água(46).

A distribuição das unidades de α -D-galactopiranosose ao longo da cadeia principal de β -D-manopiranosose, é outro aspecto importante, e pode estabelecer uma relação entre a estrutura do polímero e suas propriedades em solução, podendo ocorrer de forma regular (alternada), em blocos ou randômica(18,48,115).

Uma revisão abrangente sobre análise estrutural, conformação e peso molecular de galactomananas foi abordada em tese de mestrado da autora(66). A tese descreve o isolamento e análise da estrutura química de galactomanana obtida de sementes de *Mimosa scabrella*.

A galactomanana de *Mimosa scabrella* é composta de uma cadeia principal de manopiranosose ligadas $\beta(1\rightarrow4)$ com 88% das unidades substituídas em O-6 por unidade de α -D-galactopiranosose. Os resultados indicaram também a possibilidade da ocorrência de 2% de galactobiose ao longo da cadeia principal de manose através de ligações (1 \rightarrow 6), porém este dado deverá ser confirmado.

Esta galactomanana apresenta viscosidade intrínseca $[\eta] \sim 890\text{ml/g}$ e pode ser utilizada como alternativa para galactomanana de guar na indústria nacional.

A *Mimosa scabrella*, Angiospermae arborescente pertencente a família *Leguminosae*, é conhecida popularmente por bracatinga, bracaatinga, bracatinho, abaracaatinga, bracatinga preta, maracatinga (Biguaçu -SC), anizeiro (MG), mandengo (RJ), bracatinga branca, bracatinga vermelha e bracatinga argentina. As três últimas tem sido consideradas como três variedades diferentes(92,160). Esta espécie pode ser encontrada em território Paranaense, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Possui crescimento rápido e extraordinária capacidade de regeneração natural, com florescimento

a partir de 8 meses de idade, em média com árvore de três metros de altura, podendo atingir 15 metros em 4 a 6 anos. A produção de sementes de bracatinga é anual e abundante, fornecendo em média 1kg de sementes por árvore a partir dos três anos de idade(14,15).

A agrossilvicultura da *Mimosa scabrella* vem sendo desenvolvida a mais de 80 anos por pequenos e médios produtores, pois se presta ao reflorestamento, regeneração do solo e auxílio no combate a erosão. No Paraná perfaz 25% das matas. Projeta-se no mercado da madeira como fonte energética, na secagem de grãos, sementes agrícolas, erva mate e fumo, em olarias, panificadoras, cerâmicas, caldeiras de diferentes indústrias, na fabricação de aglomerados e celulose, como matéria prima para a produção de coque e carvão vegetal, na indústria moveleira e na construção civil.

Devido a este mercado consumidor seguro, seu manejo simples, pouco oneroso e com ciclo curto e produtivo, organismos estaduais vem desenvolvendo programas de incentivo a preservação, conservação e produção de bracatinga.

Dentre estes programas, em maio de 1987, foi firmado um convênio pela FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - com os Governos do Brasil e da França, para a execução do Projeto FAO - GCP/BRA/025/FRA(117), tendo como objetivo básico identificar as condições de aumento da produtividade do sistema agrossilvicultural da bracatinga, bem como, os métodos operacionais e um aperfeiçoamento da organização dos pequenos produtores rurais frente as situações socio-econômicas, de forma a estimular o desenvolvimento integrado. Este projeto propõe-se, entre outros a ampliação da área plantada de bracatinga em 46.000 hectares, num prazo de 10 anos. A ampliação da área de bracingais baseia-se na semeadura direta. As sementes são coletadas e/ou compradas pelo ITCF ,Instituto de Terras, Cartografia e Florestas, organismo responsável pelo controle de qualidade e seleção de acordo com o grau de germinação. Este órgão é responsável pela distribuição das sementes aos pequenos e médios produtores, além da comercialização junto aos grandes consumidores.

Este convênio propõe-se também através da instalação de áreas de produção de sementes de bracatinga a obtenção de 5000 kg de sementes melhorada anualmente a partir

do ano de 1995(27).

Este convênio engloba o "Projeto Energia" que tem como meta a colheita de 60.000 Kg de sementes de bracatinga de reflorestamento de uma área de 100.000 hectares entre 1990-1999, considerando que o Paraná possui uma área de 2.447.039 hectares efetivamente disponíveis para este fim(143).

Em paralelo, o Estado do Paraná vem incrementando o Programa de desenvolvimento Florestal Integrado, PDFI, através da Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, onde a bracatinga vem recebendo atenção especial, visto que o Paraná consome 17 milhões de metros estéreos de lenha e carvão por ano para atender ao consumo industrial, agropecuário, comercial e residencial(28).

O interesse nesta espécie é um estímulo ao estudo da galactomanana de sementes, visto que a matéria prima é disponível. Sementes descartadas para germinação também podem ser utilizadas.

1.6.CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DOS POLÍMEROS

O fato das galactomananas formarem produtos de alta viscosidade, levou à investigação mais detalhada das suas propriedades reológicas visando melhorar produtos de interesse comercial. Para melhor compreensão da reologia serão apresentados a seguir alguns conceitos teóricos indispensáveis à análise do comportamento reológico das soluções.

Um fluido distingue-se de um sólido por sua deformabilidade. O sólido perfeito é aquele cuja deformação é elástica e obedece a Lei de HOOKE, que diz: a deformação do corpo é proporcional a tensão aplicada. A relação tensão/deformação fornece uma medida chamada de rigidez do material(189)

Os fluidos ideais são aqueles que possuem deformação inelástica, e podem ser definidos segundo a Lei de NEWTON que diz: a deformação cresce contínua e linearmente qualquer que seja a tensão aplicada. Quando à resistência ao escoamento, ou seja, a viscosidade, é independente da taxa ou velocidade de cisalhamento, estes fluidos são

chamados de Newtonianos, como a água e o ar. Normalmente os polímeros em solução diluída possuem comportamento de um líquido Newtoniano(146).

O aparecimento de uma grande quantidade de polímeros sintéticos com comportamento variados quanto a deformabilidade contribuiu ao lado dos polímeros naturais para o desenvolvimento acelerado da Reologia, ciência do fluxo e de formação dos materiais que estuda os polímeros e fluidos não - Newtonianos.

Os fluidos não-Newtonianos, que subdividem-se em materiais denominados de Bingham, dilatantes ou pseudoplásticos (Figura 4) são aqueles cuja viscosidade depende do valor instantâneo da tensão de cisalhamento ($\tau = \text{força}/\text{área cisalhada}$), "independentes do tempo".

Os materiais com "comportamento de Bingham" necessitam de uma tensão de cisalhamento mínima para começar a fluir e após esta tensão inicial, o líquido escoar, mantendo a relação constante entre tensão de cisalhamento e velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$, também chamada de velocidade de deformação ou deformação). Como exemplo de fluidos de Bingham podem ser citados os dentifrícios e a maioria das tintas(22)

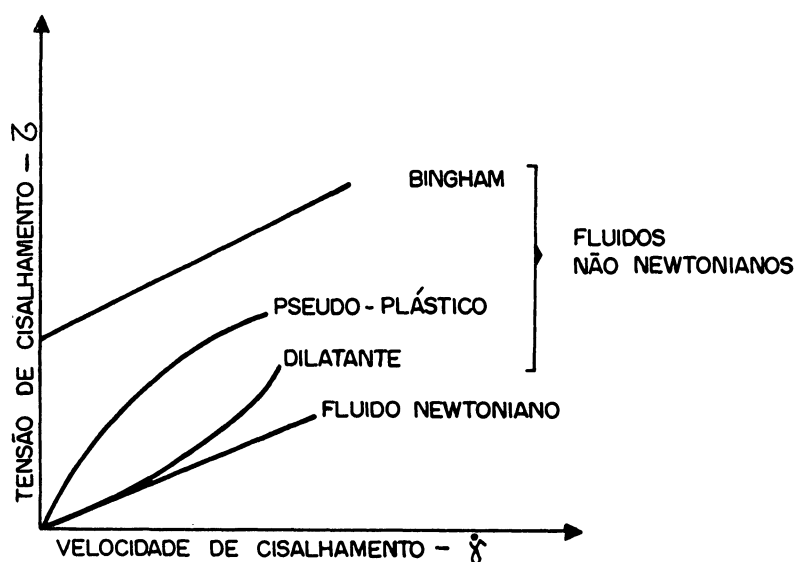


Figura 4 - Tipos de curvas de escoamento(125)

Os materiais com comportamento dilatante ou pseudoplástico não necessitam de uma tensão inicial mínima para escoarem, porém a viscosidade destes fluidos (dilatantes ou pseudoplásticos) varia de forma não linear com a velocidade de cisalhamento.

No caso de materiais com "comportamento dilatante" a viscosidade aumenta com o aumento da velocidade de cisalhamento. O comportamento dilatante pode ser evidenciado em suspensões altamente concentradas, onde as partículas constituintes são irregulares e não se orientam facilmente, ou em polímeros fundidos onde há formação de cristais durante o processo de escoamento. Como exemplos, pode-se citar suspensões de partículas muito pequenas, como amido de milho em etilenoglicol/água e soluções diluídas de poliisobuteno em polibuteno.

Nos fluidos com "comportamento pseudoplástico" há diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento, o que pode ser explicado através do desaparecimento dos emaranhados e da orientação das moléculas na direção do fluxo, tornando a resistência ao escoamento cada vez menor. A maioria dos polímeros sintéticos no seu estado fundido e os polímeros naturais em solução aquosa são exemplos de materiais pseudoplásticos.

Em soluções poliméricas, além da orientação das macromoléculas na direção do fluxo, a modificação na forma de moléculas flexíveis com a velocidade de cisalhamento e o efeito do fluxo no rompimento de interações intermoleculares são responsáveis pelo comportamento pseudoplástico.

A curva típica de um fluido pseudoplástico pode ser observada na Figura 5 que relaciona a viscosidade absoluta (η) e velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). O comportamento Newtoniano(181) ocorre em velocidade de cisalhamento muito baixas (A) e muito altas (B), na faixa intermediária (C) observa-se o comportamento pseudoplástico, isto é, a partir de um gradiente crítico (shear thinning - $\dot{\gamma}_c$) o logaritmo da viscosidade decresce linearmente com o aumento do logaritmo do cisalhamento(78). A faixa de comportamento pseudoplástico é variável e dependente do tipo de polímero e das condições de análise(104).

O aumento e a amplitude da diminuição da viscosidade em soluções que

são compostas de polímeros de alto peso molecular podem ser explicadas pela orientação e ou deformação das moléculas durante o fluxo(79).

Considerando-se agora o comportamento da viscosidade a diferentes concentrações poliméricas com a variação da velocidade de cisalhamento observa-se que para soluções diluídas a redução da viscosidade do seu máximo (patamar Newtoniano) com o aumento da velocidade de cisalhamento é pouco significativo, sendo o decréscimo mais acentuado conforme o alinhamento dos emaranhados poliméricos na direção do fluxo.

Em soluções concentradas, a interpenetração dos novelos poliméricos leva a formação de uma rede estrutural emaranhada. A baixas velocidades de cisalhamento estes emaranhados que são rompidos pela deformação imposta, são rearranjados através de novas interações com diferentes segmentos, sem causar alteração na viscosidade. Esta situação corresponde o patamar Newtoniano (A - Figura 5).

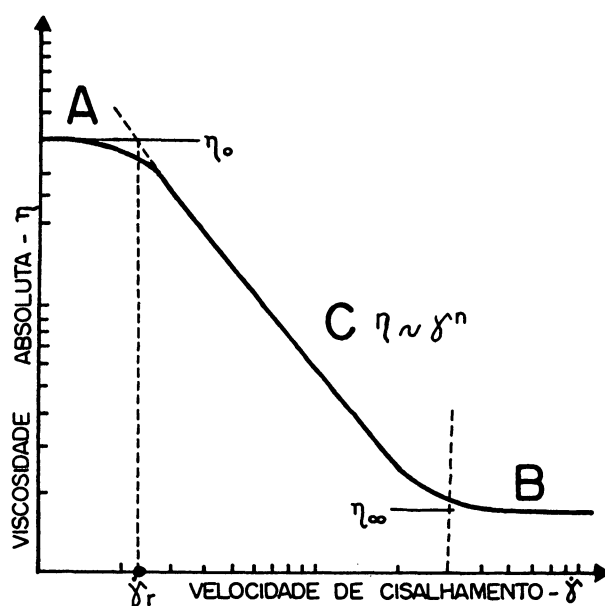


Figura 5 - Curva de viscosidade típica de um fluido pseudoplástico

A diminuição da viscosidade a partir de um gradiente crítico ($\dot{\gamma}_r$ - Figura 5), ocorre quando a velocidade de cisalhamento externa imposta torna-se maior que a velocidade de formação de novos emaranhados, a densidade de ligações cruzadas da rede polimérica é desfeita e a viscosidade é reduzida.

Dentro da classificação de fluidos não-Newtonianos podem ser incluídos os materiais denominados viscoelásticos. Estes materiais apresentam propriedades que podem ser caracterizadas como intermediárias, entre as de um sólido perfeito (elástico) e as de um líquido perfeito (Newtoniano).

Um fluido viscoelástico em equilíbrio, quando submetido a uma tensão de cisalhamento, exibe inicialmente uma resposta elástica que corresponde ao deslocamento das moléculas de sua posição inicial, para uma nova posição de equilíbrio. Isto ocorre em um intervalo de tempo relativamente pequeno, chamado do tempo de relaxamento. Durante este tempo, o trabalho exercido sobre o material é armazenado, sob a forma de energia, se a tensão for removida, o corpo tende a recuperar sua forma original. Porém, esta recuperação é incompleta devido a manifestação da parte viscosa do material. O escoamento viscoso é, portanto a segunda resposta à tensão e inicia-se tão logo seja aplicada. Se a tensão de cisalhamento é mantida sobre o corpo, uma velocidade de deformação ($\dot{\gamma}$) constante é alcançada e o trabalho realizado para manutenção desse escoamento é dissipado em forma de calor.

O escoamento viscoso é por conseguinte, irreversível espontaneamente, e pode continuar mesmo após o alívio da tensão, logo as propriedades reológicas de substâncias viscoelásticas devem ser caracterizadas pela relação entre tensão e velocidade de cisalhamento, em um determinado período de tempo. Portanto o escoamento viscoelástico é dependente do tempo, que o diferencia dos outros três tipos de escoamentos não-Newtonianos (Bingham, dilatantes e pseudoplásticos).

A resposta de um material viscoelástico a uma dada tensão vai depender da velocidade de reorganização estrutural, a nível molecular(77).

Quando o material polimérico é submetido a uma pequena velocidade de cisalhamento (velocidade de deformação) ou quando a deformação é aplicada lentamente,

o arranjo das cadeias macromoleculares não se afasta muito de sua posição de equilíbrio. O material pode ser caracterizado com viscoelasticidade linear, ou seja os valores de tensões e deformação estão relacionados linearmente.

Por outro lado, se o material polimérico é submetido a uma alta deformação ou alta velocidade de cisalhamento, as cadeias macromoleculares tendem a se deslocar significativamente da situação ou conformação de equilíbrio. Neste caso o material fornece uma resposta mecânica não linear.

É de certo modo evidente que um composto macromolecular necessite de um tempo maior para alcançar um estado de equilíbrio, se comparado ao tempo necessário para um composto de baixo peso molecular. Nos polímeros, o relaxamento se propaga ao longo de toda cadeia e o tempo despendido será proporcional à arquitetura macromolecular. Este processo relativamente vagaroso, governa as propriedades de escoamento de um material. Pode-se observar que o peso molecular, o comprimento da cadeia e a presença de ramificação no esqueleto macromolecular são fatores essenciais a serem considerados no comportamento reológico dos polímeros(77).

Para o entendimento das propriedades de um polímero é necessário o conhecimento da estrutura química e da forma tridimensional, que não é estática nem única, podendo alterar-se continuamente conforme as condições impostas.

No caso das cadeias longas a estrutura global pode alterar por oscilações independentes entre cada par de unidades viscinais e, além disso cada anel pode passar a formas de maior energia. A forma de cadeia que altera continuamente entre conformações locais e globais diferentes é conhecida como entrelaçamento não específico (random coil)(154). Este tipo de conformação é estabilizada pela entropia conformacional, quanto maior o número de conformações locais, entre as quais a cadeia possa flutuar, mais difícil para esta cadeia sobrepor-se ao movimento térmico e permanecer em uma forma particular. Assim, a entropia compensa a energia potencial. Também é necessário levar em conta que as energias de interação entre as unidades monossacarídicas não são suficientemente fortes e numerosas para fixar em uma forma determinada a cadeia estabilizada por interações cooperativas.

O estudo das difusões brownianas de translação e rotação, da velocidade de sedimentação e da viscosidade permite caracterizar o comportamento hidrodinâmico de um polímero, pois estes processos estão ligados diretamente ao movimento relativo das moléculas em relação ao solvente. Avaliando estes parâmetros, optou-se pelo estudo detalhado do fenômeno de viscosidade.

A importância da viscosidade na química macromolecular iniciou-se com estudos de STAUDINGER(34), em 1926, na caracterização de soluções poliméricas. Observou-se experimentalmente que a viscosidade depende de uma série de fatores, entre eles: o peso molecular; a estrutura linear ou ramificada concentração do polímero; flexibilidade da cadeia; temperatura e velocidade de cisalhamento empregada para a obtenção da medida e a interação entre as moléculas que compõem a solução.

A viscosidade, palavra de origem latina, "viscum", pode ser definida como a resistência contra os deslizamentos que compõe o escoamento. É uma propriedade física dos fluidos que origina o aparecimento de tensões tangenciais na superfície de contato, entre elementos de fluidos adjacentes dotados de velocidade distintas.

Deve-se a NEWTON a idéia de que a dificuldade no escoamento das partículas poderia ser caracterizada como viscosidade dos fluidos por analogia ao atrito entre as superfícies sólidas, mas que no caso de fluidos o atrito interno entre os elementos vizinhos é função da variação de velocidade existente entre uma camada de fluido e a adjacente, gerando-se entre elas uma tensão tangencial proporcional ao gradiente de velocidade(34,146). O escoamento é considerado como um regime laminar ou seja os efeitos viscosos são preponderantes impedindo a agitação no interior do fluido, como pode ser observado na Figura 6, neste caso a força F aplicada na área A fornece uma tensão tangencial ($\tau = F/A$). A relação dv/dx corresponde a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), sendo dx a distância entre os planos.

Supondo-se um fluido contínuo, ou seja fluido Newtoniano onde a viscosidade independe da velocidade de cisalhamento pode-se aplicar as teorias hidrodinâmicas, através da equação de NEWTON (Equação 1, Figura 6). Onde η é a viscosidade absoluta.

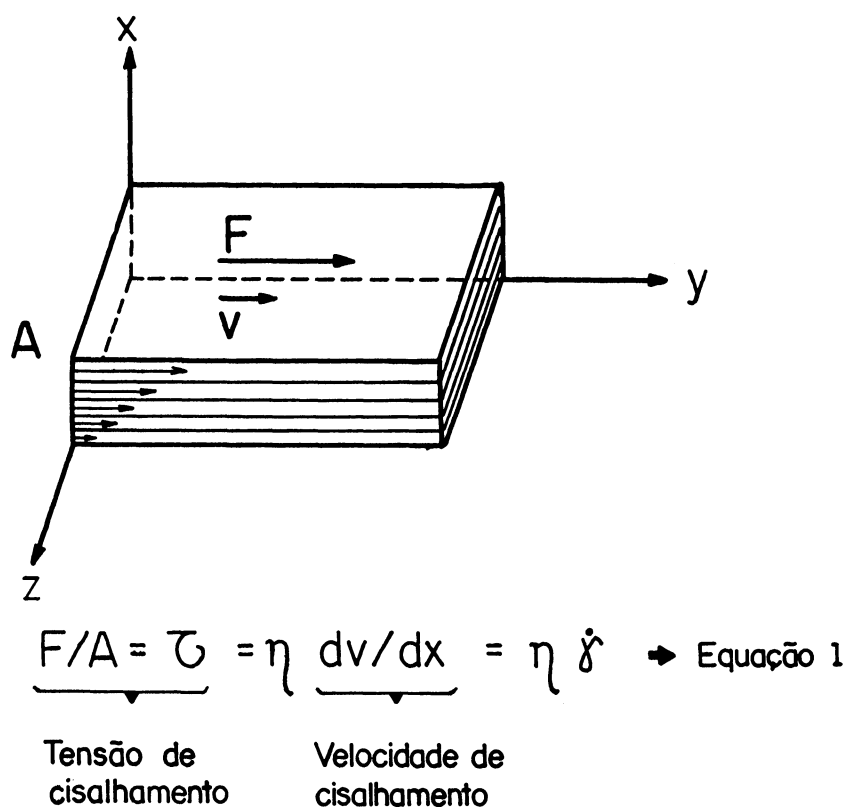


Figura 6 - Escoamento de fluido em regime laminar.

Avaliou-se até agora a viscosidade de um fluido puro. Ao se considerar um sistema constituído de partículas rígidas dispersas em um líquido puro, ou seja uma solução, a natureza da viscosidade está baseada nas propriedades hidrodinâmicas, das partículas. Os movimentos translacionais das moléculas em relação ao solvente podem ser randômicos (movimento Browniano), diretos (difusão) ou movimentos em um campo centrífugo (sedimentação).

A presença de tais partículas (suficientemente pequenas que o escoamento do solvente seja mantido como laminar) perturbam o escoamento do solvente puro, pois constituem barreiras sólidas ao deslocamento do solvente causando um aumento da força de atrito e energia dissipada no meio. Este acréscimo de trabalho depende evidentemente da natureza do solvente e correspondente a viscosidade da solução, que é superior aquela do solvente puro.

Afim de avaliar a perturbação relativa as partículas, determina-se a viscosidade relativa e a viscosidade específica (ver página 67)

Para soluções muito diluídas, as partículas estão afastada umas das outras, onde considera-se a perturbação total como a de uma única partícula em solução. Para soluções concentradas, as perturbações de todas as partículas devem ser consideradas, sendo necessária a análise da viscosidade a diversas concentrações e a extrapolação dos resultados a concentração nula, determinando-se a viscosidade intrínseca (ver página 67).

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ está relacionada diretamente com a dimensão da cadeia. A dimensão da cadeia polimérica por sua vez depende da natureza do solvente através dos efeitos do volume excluído e dos efeitos de maus solventes, da rigidez intrínseca e forma da molécula(65). Consequentemente é a única viscosidade que caracteriza as moléculas dissolvidas, sendo equivalente ao volume específico hidratado (volume hidrodinâmico).

O volume excluído (ou volume de exclusão) definido por FLORY-KRIGBAUM(152), é o volume centrado em torno de uma cadeia polimérica, no interior da qual é impossível encontrar o centro de massa de uma segunda cadeia.

Para bons solventes, os segmentos poliméricos se incham de moléculas de solvente causando o aumento do volume da cadeia, contribuindo para o efeito do volume excluído positivo.

Nos maus solventes, os segmentos do polímero tendem a se reunir, tornando energeticamente desfavoráveis aos contatos polímero-solvente, causando um aglomerado dos segmentos de polímero, este efeito é oposto ao efeito do volume excluído.

Existe uma condição particular onde os dois efeitos, isto é o efeito de volume excluído e o efeito do mau solvente se equilibram, neste caso o polímero se encontram em dimensões gaussianas ideais. O solvente no qual este fenômeno ocorre é chamado de solvente θ .

A variação da viscosidade com a concentração foi objeto de vários estudos, consequentemente diferentes fórmulas empíricas e teóricas foram propostas.

A dependência da viscosidade específica com a concentração do polímero pode ser escrita na forma de uma expansão para todas as faixas de concentração do polímero:

$$\eta_{sp} = [\eta].c + K'([\eta].c)^2 + \dots + B.([\eta].c)^n \quad \rightarrow \text{Equação 2}$$

No caso de regime diluído a viscosidade de uma solução polimérica pode ser completamente descrita em função da concentração, se não ocorreram interações intermoleculares. Esta relação é dada por uma reta que obedece a equação de HUGGINS(69,78,188):

$$\eta_{sp} = [\eta].c + K'([\eta].c)^2 \quad \rightarrow \text{Equação 3}$$

O coeficiente k' , constante de HUGGINS, varia de 0,3 a 0,7, dependendo da rigidez da molécula e do sistema termodinâmico (interação solvente-solvente, polímero-polímero, polímero-solvente), é independente da massa molecular para cadeias longas. k' diminui quando os efeitos de volume excluído aumentam (os efeitos de volume excluídos aumentam num bom solvente). Na existência de interações intermoleculares (entanglements) o valor de k' para soluções poliméricas pode assumir valores superiores a 0,7. Os valores de k' 0,3 - 0,4 para bons solventes, e 0,5 - 0,8 em solventes θ . A constante de HUGGINS assume valores inferiores a 0,3 quando o polímero é submetido a altas velocidades de cisalhamento, geralmente maiores que 2.000 s^{-1} .

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica depende da sua massa molecular. Uma das primeiras relações entre viscosidade e massa molecular (M) foi proposta em 1930 por STAUDINGER(34), para soluções poliméricas diluídas. MARK-HOUWINK(187), propuseram uma relação empírica mais geral:

$$[\eta] = KM^a \quad \rightarrow \text{Equação 4}$$

onde $[\eta]$ = viscosidade intrínseca do polímero, e M e a massa molecular de um polímero dissolvido.

K e a são constantes que variam em função da natureza do solvente, da temperatura e da estrutura química do polímero e podem ser obtidos através de várias

etapas conforme descrito por TAGER(187).

A relação empírica de MARK-HOUWINK é válida somente para solventes ideais, onde o efeito do volume excluído não altera a estabilidade do novelo polimérico (coil), pois este efeito causaria a expansão da cadeia. Conseqüentemente a equação é aplicável a polímero monodisperso neutro(80,125,188).

Para a maioria dos polímeros os valores de \underline{a} estão compreendidos entre 0,5 e 1,0. Os valores entre 0,5 e 0,8 correspondem geralmente a polímeros lineares flexíveis, e quanto mais próximo de 0,5 maior a união entre as cadeias, assumindo a forma esferoide ou seja condições θ . Os valores de \underline{a} compreendidos entre 0,8 e 1,0 são indicativos de polímeros lineares mais rígidos e dificilmente encontrados na forma enovelada, neste caso os efeitos de volume de exclusão se manifestam.

Além da equação de MARK-HOUWINK, outras teorias tem sido propostas para obtenção da massa molecular polimérica. As teorias consideram que a afinidade termodinâmica de um solvente em relação as macromoléculas podem ser permeáveis, impermeáveis ou parcialmente permeáveis.

O comportamento da solução polimérica (forma e dimensão da cadeia) depende da concentração conforme a teoria FLORY-FOX(65), podendo-se definir três regimes: regime diluído, semi-diluído e concentrado.

O regime diluído caracteriza-se por apresentar cadeias isoladas uma das outras, tendo suas dimensões aumentadas na presença de um bom solvente pelo efeito de volume de exclusão, que é traduzido pelo coeficiente de expansão de FLORY(65) (α). Nesta região a dimensão das cadeias permanece aproximadamente constante, com ausência de interação intracadeia podendo ser caracterizadas pela viscosidade intrínseca.

A partir de uma concentração crítica (c^*), as cadeias começam a se interagir. Neste caso ocorre uma alteração dos efeitos de volume excluído devido aos segmentos de diferentes cadeias, com a diminuição da influência destes efeitos e conseqüente diminuição de α caracterizando regime semi-diluído.

As dimensões das cadeias diminuem até atingirem uma concentração c^{**} , onde as cadeias não são perturbadas pelo efeito de volume excluído, correspondendo as

condições θ . Este domínio caracteriza o regime concentrado. Nestas condições (solvente θ , temperatura θ), as dimensões das cadeias são independentes da concentração em polímero.

A viscosidade em sistema polímero - solvente aumenta rapidamente com a concentração em polímero, em virtude das interações intermoleculares e da forma de entrelaçamento(77,78). É possível estimar-se a concentração na qual o volume hidrodinâmico das moléculas de polímeros em solução começam a sobrepor-se. Esta estimativa é obtida através da relação entre a viscosidade específica contra a concentração do polímero em solução. Observou-se para algumas gomas hidrossolúveis (8,124,128,132,201) que a variação da viscosidade específica, a baixas velocidades de cisalhamento, com a concentração apresentava um desvio nítido de linearidade. Este desvio caracteriza a transição no comportamento da solução e a concentração na qual este fenômeno ocorre é denominada de concentração crítica (c^*). A c^* reflete o volume ocupado pelo novelo polimérico isolado(133). Acima deste valor crítico os entrelaçamentos intermoleculares são significativos.

A Figura 7 representa o comportamento do polímero em solução num regime diluído (A), regime semi-diluído (B) e regime concentrado C(124,125).

No gráfico da viscosidade específica à velocidade de cisalhamento tendendo a zero, contra a concentração obtém-se dois segmentos de reta. O ponto de mudança entre os dois segmentos caracteriza o início do entrelaçamento polimérico (a transição da concentração crítica c^*). O valor de c^* aumenta com o decréscimo do peso molecular do polímero. Estes resultados podem ser reduzidos a uma única curva (curva matriz) considerando-se o volume ocupado pelas cadeias individuais para cada massa molecular.

O volume hidrodinâmico efetivo (cadeia isolada) do novelo polimérico pode ser convenientemente caracterizado pela viscosidade intrínseca $[\eta]$, enquanto que o número de novelos poliméricos presentes é proporcional a concentração. Logo o volume total ocupado pode ser caracterizado por um parâmetro adimensional denominado parâmetro de abrangência (coil overlap parameter $c[\eta]$) que fornece uma medida da extensão do espaço ocupado pelo polímero(78,132,133,201).

Experimentalmente a variação da viscosidade específica obtida em função de $c[\eta]$ evidencia a mudança do comportamento viscosimétrico dos polímeros, separando os diferentes regimes (diluído, semi-diluído, concentrado).

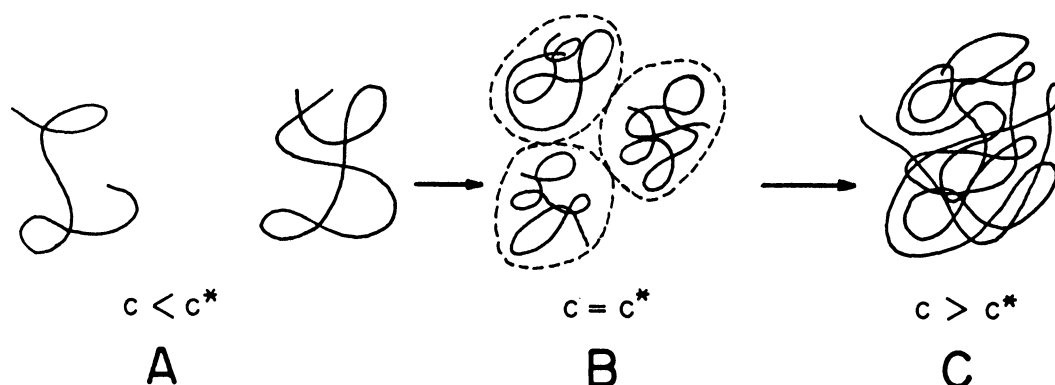


Figura 7 - Comportamento de um polímero em solução a diferentes concentrações.

Obtem-se dois segmentos lineares, o primeiro em concentrações abaixo de c^* , onde a relação de HUGGINS(69,188) é verificada, isto é, o sistema encontra-se em regime diluído, que tem por limite de concentração a concentração crítica.

O segundo segmento linear é aquele obtido após c^{**} , com uma inclinação que depende do conjunto polímero-solvente geralmente com valores entre 3 e 5,0.

A variação da viscosidade específica pode ser representada através de um desenvolvimento limite em função de $c[\eta]$, segundo a Equação 2.

Os dois primeiros termos da direita, correspondem a equação de HUGGINS(69,188), válida em regime diluído e $+ \dots + B (c[\eta])^n$ representa os efeitos causados pelas interações intercadeia.

O afastamento da reta de inclinação \perp , define o fim do regime diluído. A segunda parte linear após c^{**} é explicada pela obtenção da separação dos segmentos homogêneos

da solução, correspondendo ao regime concentrado onde as dimensões das cadeias tornam-se independente da concentração.

A região intermediária, acima da c^* e abaixo de c^{**} caracteriza a região semi-diluída(78). (Figura 8)

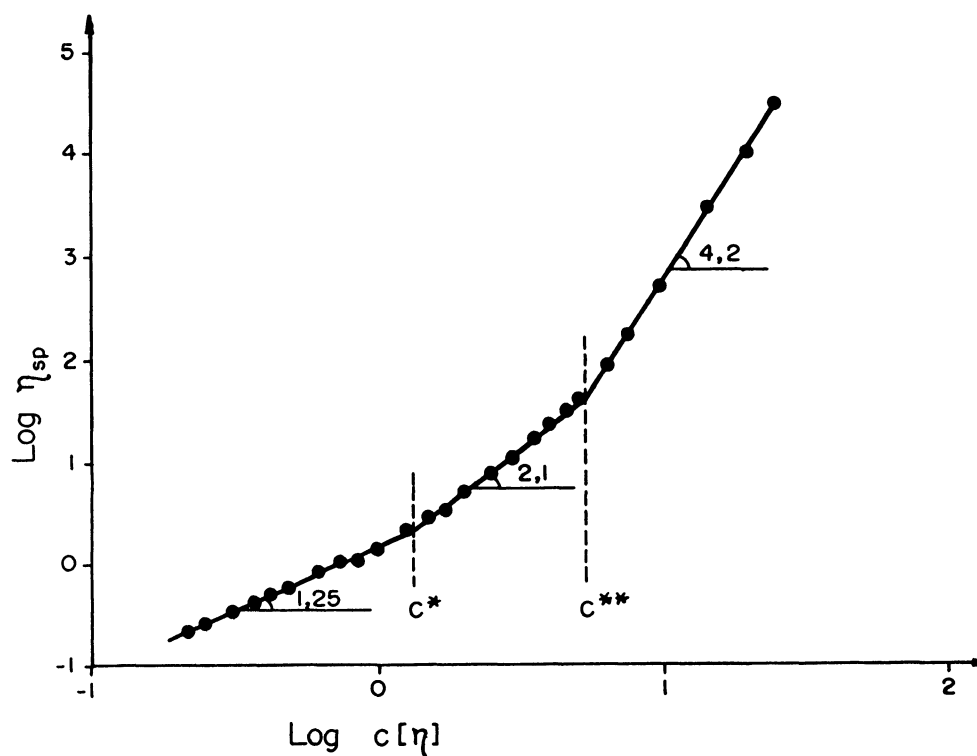


Figura 8 - Determinação da concentração c^* e c^{**} (42).

A causa básica para o comportamento não-Newtoniano dos polímeros é a orientação dos segmentos moleculares através do fluxo, que causa um aumento na elasticidade do polímero.

Para análise deste comportamento, pode-se submeter a solução à deformação fixa, isto é propriedades estáticas onde se relaciona a dependência da viscosidade a diferentes velocidades de cisalhamento ou a deformações sinusoidais, ao decorrer do tempo em uma dada frequência (w), que corresponde à medidas dinâmicas ou oscilatórias.

As medidas dinâmicas permitem estudar mais profundamente o domínio pseudoplástico ou viscoelástico, possibilitando a separação entre caráter elástico e o caráter viscoso, ocorrendo geralmente em soluções poliméricas concentradas.

A aplicação desta técnica para soluções poliméricas é essencialmente qualitativa e utilizada para análise da estrutura das soluções, isto é, presença ou ausência de interações intermoleculares que podem conduzir à formação de redes muito fracas, que seriam destruídas por medidas em cisalhamento simples(138).

Na ausência de interações intermoleculares deve-se obter a superposição entre a frequência e o gradiente de velocidade (velocidade de cisalhamento) e também entre a viscosidade complexa η^* (obtida por medidas em dinâmica) e viscosidade absoluta η , teoria desenvolvida por COX & MERZ(41), que apresenta a seguinte relação:

$$\eta = f(\dot{\gamma}) = \eta^* = f(\omega) \quad \rightarrow \text{Equação 5}$$

$$\eta^* = \frac{(G'^2 + G''^2)^{1/2}}{\omega} \quad \rightarrow \text{Equação 6}$$

G' é o módulo de cisalhamento dinâmico, está relacionado com as medidas de elasticidade ou a energia armazenada relativo ao caráter sólido do polímero em análise; G'' é o módulo de perda, está relacionado como caráter líquido do polímero, é uma medida de energia dissipada ou perdida como calor por ciclo de deformação sinusoidal.

A Figura 9 compreende o comportamento típico da viscosidade dinâmica (η^*) e a relação do fluxo estático entre a viscosidade absoluta (η) e a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$)(64,138). Em muitos casos G' torna-se maior que G'' a frequências elevadas, e G'' atingindo um pico máximo. A baixas frequências, a viscosidade dinâmica complexa é independente da frequência, caracterizando regime Newtoniano, sendo a elasticidade medida por G' muito pequena. O módulo de elasticidade, G' , também pode atingir baixos níveis a frequências muito altas, obtendo-se nestas condições valores de módulo com comportamento característico ao da borracha.

O comportamento não-Newtoniano ocorre a altas frequências sendo caracterizado pela a intersecção entre os módulos G' e G'' , indicativo da transição do regime diluído para o regime semi-diluído, e que segundo FERRY(64) corresponde ao aparecimento do patamar elástico.

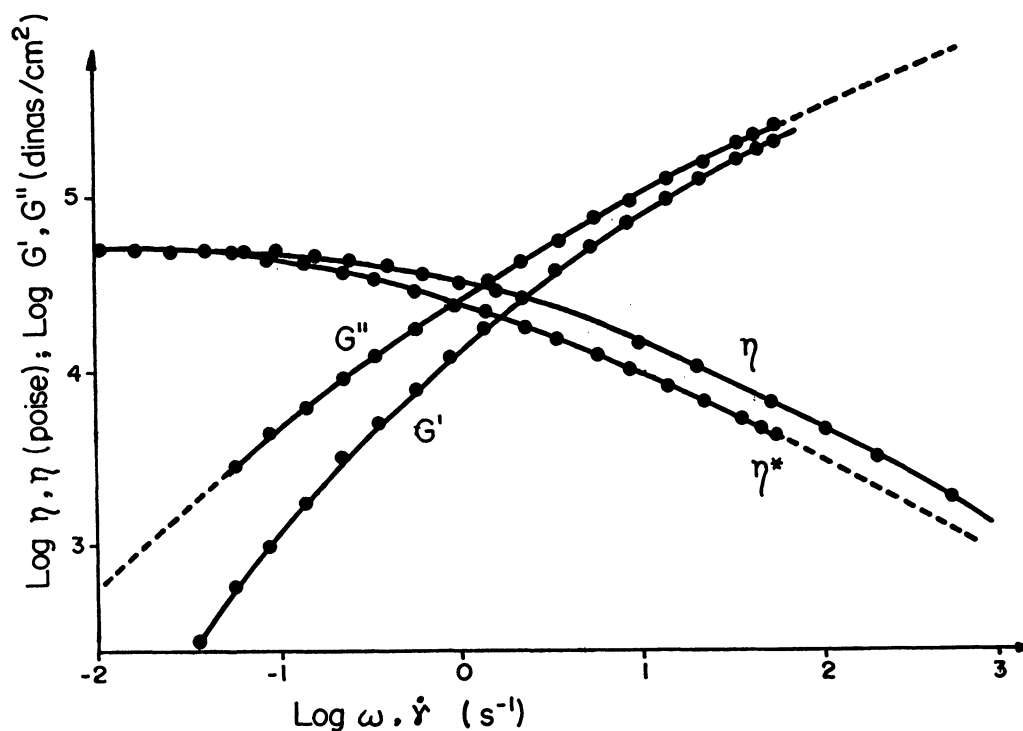


Figura 9 - A viscosidade absoluta, η ; viscosidade dinâmica, η^* ; módulo de perda, G'' ; módulo de cisalhamento dinâmico, G' , em função da frequência angular (ω), e ou da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$)(138).

Até o momento descreveu-se sobre a reologia aplicável a polímeros em geral isto é, polímeros neutros solúveis em água, polieletrólitos em excesso de sal ou polímeros sintéticos em solventes orgânicos pois as técnicas de caracterização são as mesmas.

Serão abordados a seguir, aplicações destes conceitos à galactomananas. Os estudos sobre a reologia destas soluções iniciaram-se com a galactomanana de guar em 1962, por CARLSON et alii(26), que observou a dependência de cisalhamento (shear thinning) característica de comportamento pseudoplástico.

SHARMAN et alii(179) realizaram um estudo comparativo das propriedades hidrodinâmicas de galactomanana extraída de diferentes espécies entre elas *Ceratonia*

siliqua (man/gal 3,85), *Cyamopsis tetragonolobus* (man/gal 1,75), *Lotus pedunculatus* I (man/gal 1,10), *Lotus pedunculatus* II (man/gal 1,02), *Medicago sativa* var. wairau (man/gal 1,13), *Trifolium pratense* var. montgomery (man/gal 1,15), *Sophora japonica* (man/gal 5,12) e *Glycine max* (man/gal 1,40).

As viscosidades de todas as soluções acima também apresentaram um comportamento fortemente dependente da velocidade de cisalhamento, apesar das variações man/gal e pesos moleculares. Os autores(179) propuseram-se então a estudar o comportamento hidrodinâmico das mesmas soluções.

Foi observado através de análises de coeficientes de difusão e sedimentação e massa molecular ponderal média(\bar{M}_w) que as galactomananas comportavam-se como séries homólogas diferindo somente na massa molecular.

Através da relação empírica de MARK-HOUWINK (Equação 4) para polímeros lineares, os parâmetros K e a foram obtidos e verificou-se que todas as galactomananas apresentavam coeficiente a entre 0,5 e 0,8 que segundo a teoria de FLORY-FOX corresponde geralmente a polímeros lineares flexíveis(65).

Os autores concluíram que as diferenças entre a proporção man/gal não afetam o comportamento hidrodinâmico das galactomananas e que elas podem ser consideradas uma série linear diferindo na massa molecular. Com exceção da galactomanana de *Medicago sativa* (man/gal 1,13) que apresentou valor diferenciado para o coeficiente de difusão e a galactomanana de *Lotus pedunculatus II* (man/gal 1,02) que extrapolou a linearidade ao se relacionar viscosidade intrínseca e massa molecular.

No entanto a dispersão dos dados obtidos neste trabalho é relativamente alta, para que seja usado como conclusivos em cadeias de galactomananas e considerá-los como teoria hidrodinâmica padrão para polímeros em solução.

ROBINSON et alii(165) consideraram o comportamento de fluxo de galactomanana de guar em ampla faixa de concentração, desde o regime diluído até regime concentrado, para cinco amostras de diferentes massas moleculares.

Obtiveram segundo a equação de MARK-HOUWINK (Equação 4) valores de $a = 0,723$ semelhantes aos obtidos por SHARMAN et alii(179), enquanto que os

valores de $\underline{K} = 3,8 \cdot 10^{-4}$ dl/g foram bastante distintos. Segundo ROBINSON et alii esta diferença deve-se ao fato que métodos inadequados para determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ com medidas de viscosidade em soluções concentradas ao invés de soluções diluídas.

A partir destes dados, os autores sugerem que a galactomanana de guar em solução comporta-se como um polímero levemente rígido e distribuído na forma de novelo ao acaso (random coil).

Seguindo as teorias da concentração dependente da viscosidade, DOUBLIER e LAUNAY(58,59) realizaram estudos em 12 amostras comerciais de galactomananas que compreendiam sete amostras de goma de guar ($230 \leq [\eta] \leq 1170$ ml / g) e cinco de goma de alfarrobo ($770 \leq [\eta] \leq 1000$ ml/g) todas de massa molecular diferente.

Os gráficos do logaritmo de viscosidade específica em relação ao parâmetro de abrangência ($c[\eta]$) para as amostras de diferentes massas moleculares mostraram uma única curva matriz no caso das galactomananas de guar. O mesmo ocorreu com as amostras de alfarrobo. Este tipo de relação é frequentemente empregada para polímeros sintéticos(9,60,106). A curva matriz obtida foi decomposta em duas zonas lineares. A transição ocorreu a $c^* [\eta] = 1,3$ para as galactomananas das duas fontes, o que segundo PORTER e JOHNSON(149) sugere a formação de entrelaçamento entre as macromoléculas, onde a concentração e o grau de polimerização influenciam a densidade destes entrelaçamentos.

A curva matriz apresentou uma leve diferença para as soluções de goma guar e alfarrobo, sendo mais significativa para a amostra de galactomanana de guar com $[\eta] = 1170$ ml/g. Os autores(59) sugerem que estas diferenças são causadas por elevados níveis de impurezas ou pelo menor grau de substituição, permitindo maior força intercadeia.

A superposição em uma única curva para soluções de galactomanana de guar a diferentes massas moleculares ($450 \leq [\eta] \leq 1250$), também foi observado por ROBINSON et alii(165). A transição da curva matriz ocorreu neste caso, a $c^* [\eta] = 4$ valor compatível com os observados para polímeros flexíveis (no caso de polímeros rígidos o valor encontrado é $c^*[\eta] \sim 1$ e 2).

Abaixo de c^* , para viscosidade específica menor que 10 a reta possuía uma inclinação 1,3 ($\eta_{sp} \sim c^{1,3}$) valor compatível com os observados para outros polissacarídeos, o mesmo não ocorre para a inclinação da reta a concentrações acima c^* ($\eta_{sp} \sim c^{5,1}$). A inclinação de 5,1 foi maior que os valores obtidos para polímeros que apresentam interações a partir de entrelaçamentos físicos (inclinação 3-4)(133). Este fenômeno segundo MORRIS et alii(133), é reflexo da existência de entrelaçamentos físicos não específicos, onde o rearranjo da estrutura entrelaçada devido a deformação aplicada é similar para todos os polissacarídeos. No entanto GRAESSLEY(78) sugere que o comportamento similar é decorrente da polidispersão apresentada por polissacarídeos comerciais, observado em soluções poliméricas sintéticas.

Discordando da concentração $c^* = 4/ [\eta]$ MORRIS et alii(133) em análises de amostras comerciais de galactomanana de guar e alfarrobo obtiveram a concentração crítica c^* de $2,6/[\eta]$ e inclinação de 1,4 e 4, respectivamente. Este comportamento pode ser explicado pela formação de uniões específicas entre os segmentos do polímero, que devem aumentar com o aumento da concentração, causando aumento da massa molecular do polímero e conseqüentemente sua viscosidade.

Efeitos similares tem sido observados em polímeros sintéticos(137), onde a união dos entrelaçamentos é intensificado por forças atrativas específicas denominadas "hiperentanglement".

As propriedades viscoelásticas de soluções aquosas de galactomanana de guar tem sido estudadas através de métodos de dinâmica oscilatória(165), cisalhamento estático e transiente. Nas concentrações estudadas por RICHARDSON e ROSS-MURPHY(163),(1%,2%,3%), os experimentos de dinâmica oscilatória, demonstraram um comportamento de caráter líquido a baixas frequências com módulo de perda G'' maior que o módulo de elasticidade G' . A situação inverte para frequência elevadas onde obtém-se um comportamento de caráter sólido ($G' \sim 2 \times G''$), numa solução de galactomanana à 3%). Este comportamento é típico de um sistema de polímeros enovelados ao acaso (random coil), o mesmo foi obtido por ROBINSON et alii(165). Além disso a curva que representa a viscosidade estática (η) também chamada de viscosidade absoluta contra

velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) é essencialmente coincidente com a curva da viscosidade dinâmica complexa (η^*) versus frequência (ω) obedecendo assim regra de COX-MERZ(41). Esta observação está indicando que o mesmo rearranjo está ocorrendo nos dois tipos de fluxo (estático e dinâmico), acima de uma faixa de frequência empregada.

A goma xantana, polissacarídeo extracelular produzido por fermentação a partir da bactéria *Xanthomonas campestris* foi analisada por CUVELIER e LAUNAY(42). Possui propriedade viscoelástica, podendo ser utilizada como modelo de polímero natural comparável ao comportamento viscoelástico das galactomananas.

A variação do módulo de perda (G'') e o módulo de elasticidade (G') com a frequência (ω) mostraram que o comportamento viscoelástico é alterado de um comportamento fracamente elástico para um caráter sólido com o aumento da concentração, quando G' torna-se maior que G'' . Para xantana, a concentrações além de $c^{**}(c^{**}[\eta])=5,5$) as soluções apresentam um forte comportamento elástico, com a formação de um patamar pseudoelástico a frequências elevadas.

CUVELIER e LAUNAY(42) e RICHARDSON e ROSS-MURPHY(163) deduziram através das propriedades de fluxo e propriedades viscoelásticas que as soluções de xantana a diferentes regimes de concentração, apresentam diferentes curvas, resultantes da variação da densidade das zonas de junção existente na rede elástica formada através das associações poliméricas, o que resulta na não obediência da regra de COX-MERZ(41) para soluções semi-diluídas.

MILAS et alii(127) investigaram o comportamento viscoelástico de uma xantana não pasteurizada. Como observado em outros polissacarídeos, através de medidas dinâmicas, foi demonstrado que a baixas frequências, durante o patamar Newtoniano, as curvas são superpostas seguindo a lei de COX-MERZ(41), mas para velocidade de cisalhamento elevada, esta relação não é mais válida obtendo-se comportamento característico de polímeros rígidos.

O módulo de reserva (G') e módulo de perda (G'') também foram considerados. O ponto de intersecção das duas curvas a uma dada frequência (ω_p), decresce com a concentração do polímero até um mínimo acima da concentração crítica (c^*). ω_p parece

seguir o mesmo comportamento que a velocidade de cisalhamento crítico ($\dot{\gamma}_r$) quando considerado em função de c [η]. Os autores(127) puderam concluir que os resultados experimentais de fluxo estático e dinâmico estão em concordância com o comportamento da solução de xantana caracterizando-a como um polímero de mecanismo clássico de emaranhados mas com nenhuma interação hidrodinâmica predominante a concentrações elevadas, discordante com os dados de literatura demonstrados até agora. Esta diferença se deve provavelmente a natureza da amostra de xantana utilizada e a xantana comercial frequentemente estudada.

Considerou-se até o momento as propriedades das galactomananas, particularmente a goma guar, relatando as propriedades moleculares como a massa molecular e viscosidade intrínseca em soluções diluídas, e alternadamente o comportamento de fluxo à concentração elevada. Estas investigações estão baseadas em tratamento molecular aplicados à polímeros sintéticos em solução e polímeros fundidos nos últimos quinze anos. Este fato vem despertando o interesse empresarial para aplicação da reologia no controle de processos industriais que utilizam biopolímeros como matéria prima(23).

Por seu caráter hidrofílico, isto é, rapidamente hidratável em água fria, formação de dispersão coloidal e por ser um biopolímero não digerível pelo trato intestinal, pequenas quantidades de goma guar, são utilizadas industrialmente em alimentos processados. Por exemplo quantidades entre 0,1 e 0,15% do peso total dos ingredientes secos são utilizados em mistura de bolos facilitando e reduzindo o tempo de mistura. Com a adição de galactomanana de guar o produto final apresenta tempo de prateleira (shelf life) e retenção de umidade aumentado, além de uma diminuição na tendência de fracionamento.

Tentativas tem sido realizadas, para a produção de alimentos com altos níveis de goma guar com finalidades terapêuticas, pois este polímero causa a queda do colesterol(94), reduz as concentrações de insulina posprandial e glucose(95), sendo eficiente no tratamento de diabetes e síndromes de "dumping" (conjunto de transtornos que sofrem os gastroctomizados nos primeiros meses da intervenção cirúrgica)(7). Estes produtos compreendem pães, biscoitos, base para pizzas, bolos entre outros(63,89).

DOGRA et alii(56) sugerem através de experimentos com três tipos de bolos, que altos níveis de guar podem ser incorporados industrialmente em produtos processados, para fins terapêuticos. A adição de 10% de goma guar pode ser efetivada sem perda na aceitabilidade pelo consumidor. Níveis acima conduzem a perda na aceitabilidade além de prejudicar a cor, textura e aeração do produto.

É bem conhecido na indústria alimentícia que a quantidade de aroma necessário, para produzir a mesma intensidade de sabor em um produto viscoso é muito maior comparado com um produto líquido. Comercialmente a eficiência do sabor liberado (flavour release) possui importância considerável pois os aromas compreendem frequentemente um componente de custo elevado.

Além da influência dos aromas, outros componentes de paladar que estabelecem o caráter doce, amargo, azedo, salgado podem interferir na eficiência dos produtos utilizados como espessante.

Considerando o exposto acima, BAINES e MORRIS(8) verificaram através de análises do comportamento reológico das soluções poliméricas que a variação de concentração de galactomanana de guar causava mudanças qualitativas na supressão da intensidade subjetiva de gosto/aroma.

Pela variação da viscosidade específica (η_{sp}) em função da concentração reduzida ($c/[\eta]$) foi possível obter a $c^* = 2,85/[\eta]$ para as soluções de galactomanana de guar com concentrações fixas de sacarose (10% p/p) e aromatizante sabor morango (0,2% p/p), em concordância com resultados obtidos previamente para soluções polissacarídicas(133), foi observando ainda a dependência da concentração crítica do polissacarídeo em relação à intensidade de açúcar e aroma. Abaixo da concentração crítica o poder adoçante e aromatizante eram independentes da quantidade de goma presente, mas altas concentrações, onde as cadeias são forçadas a se interpenetrar formando uma rede emaranhada, a intensidade perceptível de ambos os efeitos diminuem.

A percepção do aroma e doçura tiveram essencialmente a mesma dependência no grau de espaço ocupado pelo polímero, apesar de envolverem receptores e mecanismos fisiológicos praticamente diferentes. Este comportamento generalizado poderia indicar que

o polissacarídeo não interfere entre as interações do receptor com o substrato.

Sugere-se então que o polímero na forma de rede emaranhada ($c > c^*$) inibe o transporte de pequenas moléculas (sacarose e aromatizante) do interior da solução para superfície. Os estudos abordados acima foram realizados com um sistema polimérico único, devendo ser abordado como um início para o estudo da relação entre a reologia dos polímeros e o entendimento dos efeitos da estrutura dos alimentos nos fatores organolépticos.

Sugere-se portanto, a necessidade de um aprofundado estudo relativo às propriedades reológicas das galactomananas especialmente nas etapas de processamento industrial. Acredita-se que este estudo poderia contribuir para a melhoria de qualidade do produto final.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo o estudo dos componentes de baixo peso molecular e galactomanana extraída de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga), de acordo com os seguintes itens:

1. Extração dos oligossacarídeos e galactomanana presente na semente.
2. Isolamento e purificação dos oligossacarídeos e galactomanana.
3. Análise estrutural dos oligossacarídeos.
4. Confirmação da estrutura fina da galactomanana.
5. Estudo das propriedades reológicas da galactomanana em solução por diferentes parâmetros:
 - . Relação entre viscosidade e velocidade de cisalhamento.
 - . Relação entre viscosidade específica e parâmetro de abrangência.
 - . Dimensão molecular.
 - . Determinação da concentração crítica (c^*).
 - . Análise do comportamento viscoelástico.
6. Relação entre estrutura química e propriedades reológicas.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 MÉTODOS GERAIS

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

As soluções contendo oligossacarídeos ou polissacarídeos foram liofilizadas em aparelho Virtis, modelo 10-145 Mr-BA a pressões menores que 150 mmHg e temperatura do condensador de aproximadamente -40°.

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

Os espectros de ultra-violeta e visível foram obtidos em espectrofotômetro UVIKON 810 UV/VIS.

A variação do índice de refração (dn/dc) foi determinado em refratômetro diferencial Brice-Phoenix modelo BP-2000-V equipado de uma fonte luminosa de comprimento de onda $\lambda = 546$ nm.

A umidade foi determinada em balança termogravimétrica "Thermobalance SETARAM 670", equipada com programador de tempo PRT 540 e registrador Sefram, modelo Servotrac PED. Na técnica empregada, a variação do peso do material foi registrada no intervalo entre 20° e aproximadamente 200°, sendo que um valor constante em peso foi sempre obtido antes de alcançar a temperatura limite (200°).

Os tratamentos de ultrason realizaram-se em sonicador BRANSON modelo B12, de potência de 150 W equipado de uma micro sonda standard de 3 mm de diâmetro.

As dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método de fenol-ácido sulfúrico(61) a 490 nm, utilizando-se como padrão glucose a 40 mg/ml; açúcares redutores foram determinados pelo método de SOMOGYI(184) e NELSON(136).

A determinação quantitativa de proteína foi realizada com o reagente de FOLIN-CIOCALTEAU, segundo método de LOWRY et alii(113), a 660 nm, utilizando como padrão albumina bovina a 10mg/ml.

3.1.1. HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL

As hidrólises ácidas foram realizadas em tubo kimax utilizando-se ácido trifluoracético (TFA) 1,0 M , durante 5 horas em banho de água fervente. O agente catalizador (TFA) foi removido por sucessivas evaporações à vácuo.

3.1.2. HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA GALACTOMANANA

A galactomanana, (12 g) foi tratada com H_2SO_4 0,05 M (400 ml), durante 14 horas, sob refluxo. Após este período de hidrólise, a solução foi neutralizada com carbonato de bário ($BaCO_3$) e filtrada. O filtrado foi concentrado, submetido a precipitação com três volumes de etanol 95% e centrifugado. O sobrenadante alcoólico foi concentrado e liofilizado. Os produtos resultantes foram fracionados por GPC, purificados por HPLC e analisados por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r..

3.1.3. REDUÇÃO E ACETILAÇÃO DOS PRODUTOS DAS HIDRÓLISES ÁCIDAS

Os monossacarídeos foram reduzidos com boroidreto de sódio(178), a temperatura ambiente por 16 horas. O excesso de $NaBH_4$ foi destruído por ácido acético, os ions Na^+ removidos por resina Lewatit S-100, forma H^+ , e o ácido bórico foi eliminado por codestilação com metanol, na forma de ester volátil borato de trimetila. Os alditois foram então submetidos à acetilação com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v) a temperatura ambiente por 16 horas, ou a 100-105° por 1 hora, quando o processo foi interrompido por adição de gelo moido.

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

3.1.4. ANÁLISE DE METILAÇÃO

O polissacarídeo foi inicialmente metilado pelo método de HAKOMORI (82). A amostra de polissacarídeo (50 mg) foi dissolvida em 3 ml de dimetil sulfoxido, durante um período de 6 horas a temperatura ambiente e duas horas à 60°. Em seguida adicionou-se metil-sulfinil metídeo de sódio e o sistema reagente foi mantido sob agitação a temperatura ambiente por um período de 14 horas. Após este período foi adicionado iodeto de metila (3,2 ml), gota a gota, durante um intervalo de duas horas, mantendo-se o sistema sob agitação e na ausência de luz por mais uma hora. O processo foi interrompido pela adição de água (4 ml). O derivado parcialmente metilado foi dialisado em água destilada e em seguida liofilizado. O processo foi repetido por mais uma vez.

O polissacarídeo parcialmente metilado (25 mg) foi dissolvido em 2 ml de iodeto de metila e levado a refluxo por 10 minutos. Em seguida, na ausência de luz, foi adicionado óxido de prata (0,1 g) gradativamente durante um intervalo de 30 minutos, segundo o método de PURDIE(90). O sistema foi mantido sob refluxo por mais seis horas. Ao final das seis horas o material foi centrifugado a 4°. O resíduo foi lavado com clorofórmio, reunido ao sobrenadante e levado a secura.

Uma aliquota (5 mg) do polissacarídeos Q-permetilado foi hidrolisada, inicialmente com ácido fórmico 90% (0,6 ml), por uma hora, a 100°, sob refluxo, ao término levado a secura. Em seguida ao produto seco adicionou-se TFA 2 M (0,7 ml), sendo a mistura submetida a refluxo por 4 horas a 100°. Após remoção do ácido com sucessivas lavagens com água até pH 6,0, o hidrolisado é reduzido, acetilado e analisado por g.l.c. - m.s..

3.1.5. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.1.5.1. CROMATOGRAFIA EM PAPEL

As análises cromatográficas em papel (p.c.) foram realizadas pela técnica ascendente, utilizando-se papel Whatman nº 1, com o seguinte sistema de solvente:

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

Os cromatogramas foram visualizados com nitrato de prata alcalino(197) e cloridrato de para-anisidina(43).

3.1.5.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As análises cromatográficas em camada delgada (t.l.c.) foram realizadas em placas de sílica gel Merck (20 x 20 cm), empregando-se sistema de solvente: n-butanol:ácido acético:água (7:7:5 v/v)

Os açúcares foram visualizados com orcinol e os ácidos aminados com ninidrina a 0,1% em acetona (p/v).

3.1.5.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDO - GASOSA (G.L.C.)

As análises por g.l.c. foram realizadas em:

A) Cromatógrafo Varian, modelo 2449 com detetor de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste (40,0 ml/min) em coluna 3% de OV - 225 sobre gás Chrom Q de 100 - 200 mesh em tubo de aço inoxidável 200 x 0,15 cm (d.i.) com detetor a 240°. As temperaturas de operação da coluna foram 190° para os acetatos de alditois e 165° para os acetatos de alditois parcialmente metilados. Os tempos de retenção são relativos ao 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glucitol. As determinações quantitativas dos produtos analisados por g.l.c. foram realizados por triangulação(174).

B) Cromatógrafo Helwett-Packard, modelo 5890, com detetor de ionização de chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste (4 ml/min), coluna Widebore SP 2380 30 m x 0,53 mm (d.i). As temperaturas de operação da coluna foram entre 210-225° para acetatos de alditois e 170° para acetatos de alditois parcialmente metilados.

3.1.5.4. CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO EM COLUNA (GPC)

As análises por cromatografia em gel permeação dos oligossacarídeos foram efetuadas em coluna de vidro termostaticada (210 x 1,5 cm d.i, 65°) contendo gel de poliacrilamida (Bio-Gel P2, 200-400 mesh; Bio Rad - U.S.A.). Uma minibomba Milton Roy foi utilizada (eluente H₂O, fluxo 30 ml/h). A detecção dos produtos obtidos foi acompanhada por um refratômetro diferencial JOBIN-YVON IOTA, equipado de fonte luminosa com $\lambda = 940$ nm.

Os espectros foram registrados em aparelho Servotrace. As amostras(1 ml; 200 mg/ml) foram injetadas via injetor de septo, e as frações (5 ml) coletadas em coletor automático, modelo 2212-Redirac. As amostras foram previamente deionizadas em resina mista Amberlite MB-3 (mistura Amberlite IR-120 foram H⁺ e Amberlite IRA-41 - forma OH⁻) e filtradas em membrana de nitrocelulose Sartorius 3,0 μ m.

3.1.5.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Os oligossacarídeos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em aparelho Waters, equipado com bomba modelo M 6000A, um injetor universal U6K e um detetor de índice de refração R 401 (Waters Associates Inc, Milford, MA - U.S.A.). As áreas dos picos foram calculadas por integrador Chromatopac modelo C-R1B, Shimadzu Kyoto, Japão. As colunas utilizadas para a purificação das amostras usando água como fase móvel foram:

- . Phenomenex - Rezex - RCD - BR para oligossacarídeos, à 50°.
- . Nucleosil 5 m - C-18 - (S.F.C.C). para oligossacarídeos, à 25°.
- . CHO- 682 - (Interchim) para monossacarídeos, à 85°

As amostras foram dessalificadas pelo uso de resina mista Amberlite MB3 e filtradas em aparelho Sartorius com membranas 0,45 μm .

A separação dos oligossacarídeos por cromatografia C-18 é dita fase reversa (compreende um grupo alifático ligado à sílica revestindo totalmente a sua superfície com uma espécie de cabeleira não polar) por se tratar de fase estacionária não polar e fase movel (água) polar.

Pode-se admitir com um erro mínimo de 2% que todos os açúcares neutros apresentam a mesma variação de índice de refração com a concentração ($dn/dc = \text{constante}$). Logo através do detetor de índice de refração o pico do cromatograma é diretamente proporcional a concentração em peso do carboidrato(86).

3.1.6. ESPECTROMETRIA DE MASSA ACOPLADA A BOMBARDEAMENTO POR ÁTOMOS ACELERADOS (FAB-MS)

As análises cromatográficas obtidas a partir da técnica de FAB-MS foram realizados em um espectrômetro de massa Nermag quadripolar modelo R-1010 a 8 KV, acoplado a sistema computacional PDP 11/73. As amostras foram dissolvidas em matriz de glicerol em um alvo de cobre(21).

3.1.7. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO TREZE - (^{13}C -N.M.R)

As análises de ressonância nuclear magnética de carbono treze foram realizadas em espectrômetro Bruker AC-300 incorporado a transformador de Fourier. As amostras foram dissolvidas em D_2O em tubos de 0,5 cm de diâmetro.

Os deslocamentos químicos foram expressos em campo baixo (δ em p.p.m), relativos a ressonância do DSS (1.sulfonato de sodio-4,4-silopentano-4-dimetil) como padrão externo ($\delta = 0$). Os espectros foram obtidos em 75 MHz, a 30°.

3.2. OBTENÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de *Mimosa scabrella* foram adquiridas por intermédio do Instituto de Terras, Cartografia e Floresta (ITCF), advindas de povoamentos naturais localizados na região metropolitana de Curitiba, onde foram coletados durante o período de novembro-janeiro de 1988.

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

3.3. OBTENÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS E POLISSACARÍDEOS

As sementes trituradas foram submetidas a três métodos de extração.

3.3.1. MÉTODO A DE EXTRAÇÃO

As sementes moidas (30 g), foram extraídas em Soxhlet, com mistura de benzeno-etanol (2:1 v/v, 400 ml), durante 6 horas. O resíduo seco foi submetido à extração aquosa (500 ml), a 4°, sob agitação durante 24 horas e filtrado. O procedimento foi repetido mais duas vezes. Os extratos aquosos foram reunidos, concentrados (250 ml) sob pressão reduzida abaixo de 40° e o polissacarídeo precipitado com três volumes de etanol 95% e centrifugado. O sobrenadante alcoólico foi concentrado e liofilizado fornecendo 2,1 g de oligossacarídeos (7% peso seco).

3.3.2. MÉTODO B DE EXTRAÇÃO

A deslipidificação prévia do material foi realizada em extrator do tipo Soxhlet por tratamento das sementes trituradas (300 g) com o solvente benzeno-etanol (9:1, v/v), durante 16 horas, sob refluxo. O resíduo após evaporado à secura foi extraído sob refluxo com metanol-água (4:1 v/v, 500 ml), durante 4 horas, e filtrado ainda quente. O procedimento foi repetido mais duas vezes. Os extratos foram reunidos, concentrados (250 ml) sob vácuo a 40° e liofilizados, fornecendo 12 g de oligossacarídeos (4% peso seco).

3.3.3. MÉTODO C DE EXTRAÇÃO

As sementes trituradas (20 g) foram submetidas à extração aquosa (400 ml), a 4°, sob agitação durante 18 horas e o extrato filtrado. O procedimento foi repetido por mais duas vezes. Os extratos foram reunidos e processados como no método B. A extração aquosa forneceu 2,2 g de oligossacarídeos com rendimento de 11%.

3.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE POLISSACARÍDEO

O polissacarídeo, obtido através do método A, foi lavado sequencialmente com etanol e acetona, fornecendo 9 g de produto, com um rendimento de 30%. Este material foi estocado a temperatura ambiente. No momento de colocá-lo em solução, seu grau de hidratação foi determinado por termogravimetria como descrito anteriormente. O produto pesado foi dissolvido em água destilada e mantido sob agitação durante um período de 12 à 24 horas antes de qualquer análise viscosimétrica.

3.5 VISCOSIMETRIA

3.5.1. VISCOSÍMETRO CAPILAR

As análises por viscosimetria capilar estão baseadas no princípio de escoamento de POISEUILLE(34) onde o valor da viscosidade é obtido por medidas de tempo correspondente ao escoamento de um volume conhecido de líquido através de um capilar. A viscosidade relativa é dada por $\eta_{rel} = t / t_o$ onde t e t_o são os tempos de escoamento da solução e do solvente, respectivamente.

Existem viscosímetros capilares muito sensíveis, mas de aplicação limitada à soluções de baixa viscosidade e comportamento Newtoniano. Para estes viscosímetros, onde o fluxo é decorrente somente da gravidade, a tensão de cisalhamento (τ) e a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) dependem do tempo de escoamento, e o valor de $\dot{\gamma}$ será sempre elevado (1000 s^{-1}).

As viscosidades das soluções diluídas foram inicialmente determinadas em viscosímetro automático do tipo FICA VISCOMATIC MS, equipado de um coluna tipo Ubbelohde (Figura 10), com diâmetro interno do capilar de 0,5 mm, onde a temperatura foi mantida a $25^\circ \pm 0,05^\circ$ por um termostato HAAKE.

3.5.2. VISCOSÍMETROS ROTATÓRIOS (TIPO COUETTE)

O sistema de análise em viscosímetro rotatório consiste na medida de emparelhamento exercido entre as forças de atrito sobre superfície móvel.

Neste tipo de aparelho o líquido a ser analisado é colocado entre duas superfícies suscetíveis ao giro, tendo um eixo de simetria comum, isto é coaxiais. Quando uma destas superfícies gira a uma velocidade constante, indicada, imprime um movimento ao líquido que pela existência da "Força de Atrito", proporcional a viscosidade, tende a girar a outra superfície. A rotação aplicada a segunda superfície permite determinar a viscosidade do líquido. Existem dois tipos de viscosímetros rotatórios: 1º viscosímetro de cilindros coaxiais, 2º viscosímetro cone-plano.

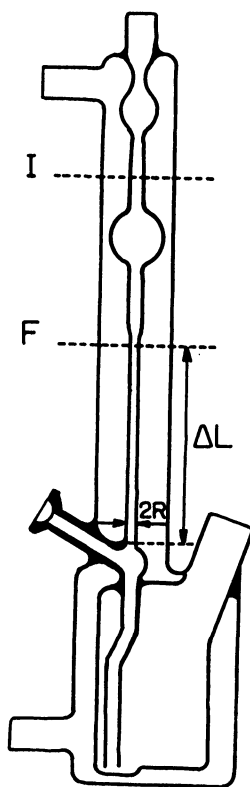


Figura 10 - Viscosímetro capilar - Coluna tipo UBBELOHDE. I= início do escoamento, F= final do escoamento, L= comprimento da coluna capilar, 2R= diâmetro da coluna capilar.

O primeiro viscosímetro deste tipo foi atribuído COUETTE, (Figura 11). É constituído de um cilindro de raio R_e fechado na parte inferior para servir de recipiente, com capacidade de rotação a velocidade angular uniforme (ω). O cilindro interior de raio R_i e altura h , é suspenso por um fio susceptível a torção (T) que permite a medida do conjunto de viscosidade.

Se $R_e/R_i < 1,05$, pode-se considerar a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) como sendo constante entre os dois cilindros, e para um fluido Newtoniano obtem-se a seguinte relação:

$$\eta = \frac{T}{\omega} \cdot \left(\frac{R_e^2 - R_i^2}{4\pi R_e^2 R_i^2 h} \right) \quad \rightarrow \text{Equação 7}$$

A velocidade de cisalhamento é dada como a média aritmética dos gradientes sobre cada uma das paredes:

$$\dot{\gamma} = \frac{R_e^2 + R_i^2}{R_e^2 - R_i^2} \cdot \omega \quad \rightarrow \text{Equação 8}$$

Estes viscosímetros são menos sensíveis que os capilares, mas a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) está bem definida e pode variar de 10^{-2} s^{-1} à 10^3 s^{-1} .

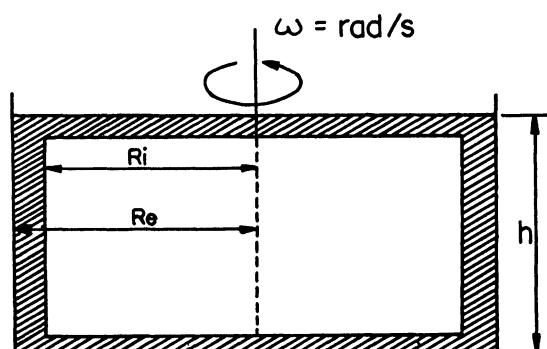


Figura 11 - Viscosímetro tipo COUETTE o mesmo sistema que compõe o viscosímetro Low Shear 30.

Outro tipo de viscosímetro rotativo é do tipo cone-plano (Figura 12) onde o líquido é colocado entre um cone de ângulo α conhecido e uma superfície plana perpendicular ao eixo do cone. Ao cone é aplicado uma velocidade angular de cisalhamento, exercendo uma torção (T) à superfície plana, sobre a qual foi colocada a solução estudada. São utilizados para soluções de altas viscosidades e fluidos não-Newtonianos.

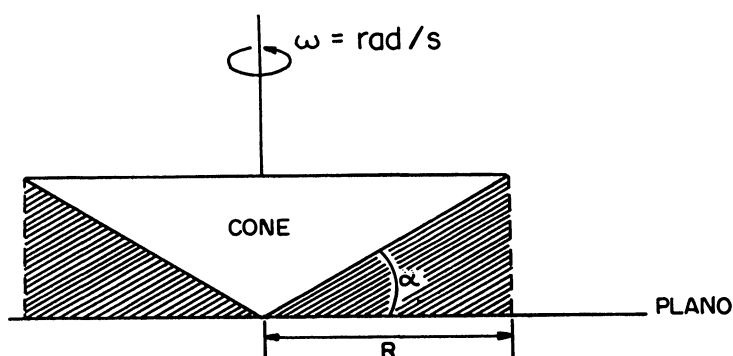


Figura 12 - Viscosímetro tipo Cone - Plano.

Se $\alpha < 4^\circ$, $\dot{\gamma}$ é constante no espaço contido entre o cone e o plano e pode ser representado por:

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega}{\text{tg } \alpha} \quad \zeta = \frac{3T}{2\pi R^3} \quad \eta = \frac{\zeta}{\dot{\gamma}} \quad \rightarrow \text{Equação 9}$$

$\dot{\gamma}$ = velocidade de cisalhamento (s^{-1}); ω = velocidade angular (rad/s); T = torque = força de torção (N.m); ζ = Tensão de cisalhamento ($\text{N/m}^2 = \text{Pa}$).

Neste viscosímetro a velocidade de cisalhamento pode variar de 10 s^{-1} à $2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, podendo-se acompanhar a viscosidade de fluidos numa grande faixa de $\dot{\gamma}$.

Os viscosímetros rotativos utilizados neste trabalho foram Low Shear 30 do tipo cilindro coaxial e o Carri-Med CS-50 tipo cone plano.

O Low Shear 30 utilizado para velocidade de cisalhamento variável de 10^{-2} à 128 s^{-1} esta equipado de um programador Rheoscan-30. Para velocidade de cisalhamento superiores, até 1770 s^{-1} , utilizou-se o reômetro Carri-Med CS 50 equipado de um sistema Rheo 1000c e um "software" 4-3 que permite a determinação direta viscosidade x velocidade de cisalhamento por contrôle de velocidade angular. As diferentes geometrias usadas foram cilindros duplos ($R_1 = 20\text{mm}$, $R_2 = 20,38\text{mm}$, $R_3 = 21,96\text{mm}$, $R_4 = 22,38\text{mm}$ e altura de $20,55\text{mm}$), e cones de 4 e 6 cm de diâmetro com 4° de ângulo cone. Para as determinações de viscosidade dinâmica foi utilizado cone de 4cm de diâmetro. Os dois viscosímetros são regulados a temperatura de $25^\circ \pm 0,05167$ por termostato HAAKE.

A unidade de viscosidade absoluta no sistema internacional é Poiseuille (P), que corresponde a viscosidade de um fluido que necessita de uma força (F), de 1 Newton por m^2 de superfície (ζ) para manter um gradiente de velocidade ($\dot{\gamma}$) de um m/s entre dois planos distantes de um metro. No entanto, utiliza-se mais frequentemente o Poise (P_0) e o centipoise (cP_0), unidades de viscosidade dinâmica no sistema CGS, igual a décima parte do Poiseuille. As unidades utilizadas no sistema internacional (SI) são Pascal segundo ($\text{Pa}\cdot\text{s} = P_1$) e mili Pascal segundo ($\text{mPa}\cdot\text{s}$) onde 1 $\text{mPa}\cdot\text{s}$ equivale a 1 cP_0 .

3.5.3 VISCOSIDADE RELATIVA

Os dados fornecidos pelo viscosímetro Low shear 30 foram transformados em viscosidade relativa (η_{rel}) com o auxílio de programa computacional.

Foram determinadas as variações das viscosidades relativas para solução de galactomanana de *Mimosa scabrella*, com concentrações de $0,09 \cdot 10^{-3}$ à $13,5 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml}$ à velocidades de cisalhamento variável de 10^{-2} a 128 s^{-1} .

Para soluções de galactomanana com concentrações de $3,6 \cdot 10^{-3}$ à $49,6 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml}$ a determinação da viscosidade relativa foi obtida também através de reômetro Carri-Med CS-50, com velocidade de cisalhamento variável de 100 à 1770 s^{-1} .

A partir da determinação da viscosidade relativa (η_{rel}) foi possível calcular a viscosidade específica (η_{sp}) e a viscosidade reduzidas (η_{red}) das amostras de galactomanana de *Mimosa scabrella*.

$$\eta_{rel} = \eta_{solução} / \eta_{solvente} \quad \rightarrow \text{Equação 10}$$

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{solução} - \eta_{solvente}}{\eta_{solvente}} = \eta_{rel}^{-1} \quad \rightarrow \text{Equação 11}$$

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / c \quad \rightarrow \text{Equação 12}$$

onde c é a concentração da amostra em g/ml.

3.5.4 VISCOSIDADE INTRÍNSECA

A viscosidade intrínseca da amostra de galactomanana de *Mimosa scabrella* foi determinada a partir de dados da viscosidade relativa, obtidas em viscosímetro Low Shear 30, pois foi impossível a determinação em viscosímetro capilar, devido a falta de repetibilidade das leituras, provavelmente causadas por características conformacionais do polissacarídeo em solução. Para esta análise foi preparada soluções de galactomanana com concentração de $0,09 \cdot 10^{-3}$ à $1,8 \cdot 10^{-3}$ g/ml em água destilada.

A viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi determinada graficamente através da relação entre a variação da viscosidade reduzida (η_{red}) em função da concentração (c). O valor de $[\eta]$ foi obtido pela extrapolação da reta obtida a concentração nula(A), como representado na Figura 13.

A partir do ângulo de inclinação (α) determina-se a constante k' (constante de HUGGINS).

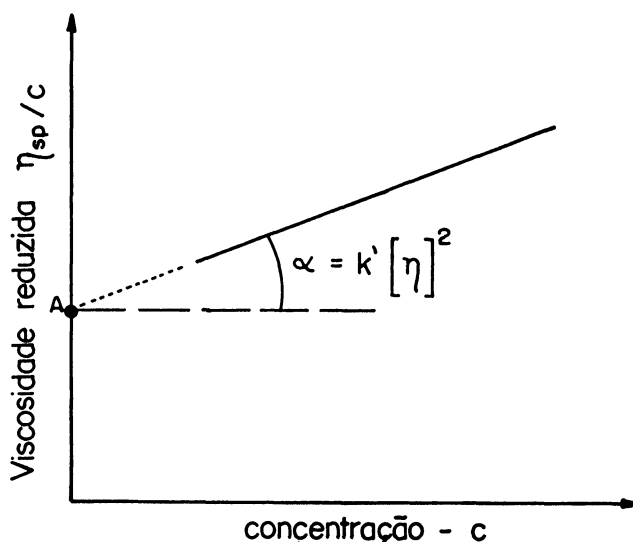


Figura 13 - Determinação gráfica da viscosidade intrínseca

3.5.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO PSEUDOPLÁSTICO

O comportamento pseudoplástico das amostras de galactomanana de *Mimosa scabrella* foi verificado pela diminuição da viscosidade absoluta em função do aumento de velocidade de cisalhamento na faixa de 10^{-2} a 10^3 .

Para esta análise foram utilizadas soluções de galactomanana em água destilada com concentrações variáveis de $0,09 \cdot 10^{-3}$ à $49,6 \cdot 10^{-3}$ g/ml. As medidas de viscosidade foram realizadas a temperatura de 25° .

3.5.6 VISCOSIDADE ESPECÍFICA EM FUNÇÃO DO PARÂMETRO DE ABRANGÊNCIA

A viscosidade específica em função do parâmetro de abrangência, $c[\eta]$, é uma análise gráfica obtida a partir da viscosidade das soluções de galactomanana no patamar Newtoniano a diferentes concentrações em função da viscosidade intrínseca $[\eta]$ multiplicado pela concentração da referida amostra.

Esta análise permitiu obter a concentração crítica, onde ocorre a transição entre os regime diluído e semidiluído da solução de galactomanana de *Mimosa scabrella*.

3.6. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

A massa molecular foi determinada através do método de difusão ou espalhamento de luz (light scattering). Este método possibilita a determinação de valores absolutos da massa molecular ponderal média (\bar{M}_w).

A avaliação de \bar{M}_w pode ser realizada a partir de dados obtidos através de técnica estática ou técnica dinâmica de medição.

3.6.1. MEDIDAS DE MASSA MOLECULAR EM SISTEMA ESTÁTICO

Pela técnica de medição estática a massa molecular é obtida unicamente pela utilização do fotômetro, onde são injetadas soluções de concentração definida.

O aparelho utilizado foi um CHROMATIX KMX-6, equipado com fonte laser de comprimento de onda $\lambda = 633$ nm e ângulo $\theta = 6-7^\circ$. Os dados fornecidos por este aparelho permitem obter diretamente a massa molecular (\bar{M}_w), a partir do fator de RAYLEIGH (R_θ)

Para cada massa molecular estabelecida determina-se uma função concentração e uma função angular. As soluções devem ser filtradas sobre membranas de porosidade $0,22\mu\text{m}$ no momento da introdução nas células de difusão.

O fator de RAYLEIGH no fotômetro CHROMATIX KMX-6 é calculado pela seguinte equação:

$$R_\theta = \frac{G_\theta \cdot D}{G_0 \cdot \sigma' \cdot \lambda'} \quad \rightarrow \text{Equação 13}$$

Onde G é a intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado, G_0 a intensidade relativa correspondente ao feixe incidente, D , σ' e λ' são constantes do aparelho. A unidade do fator de RAYLEIGH (R_θ), cm^{-1} , se origina de λ' . A relação entre

o fator de RAYLEIGH e a massa molecular (\bar{M}_w) pode ser obtida de forma simplificada, segundo a equação:

$$\frac{I}{\bar{M}_w} = \frac{K \cdot c}{\Delta R_\theta} \quad c \rightarrow 0 \quad \text{onde } K = 7,22 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad \rightarrow \text{Equação 14}$$

Onde, c é a concentração da solução, em g/ml, ΔR_θ , a diferença entre o R_θ da solução e o R_θ do solvente em cm^{-1} , dn/dc , taxa de variação do índice de refração, com a concentração, em ml/g, determinado em refratômetro diferencial.

3.6.2. MEDIDAS DE MASSA MOLECULAR EM SISTEMA DINÂMICO - GPC

Na técnica de medição dinâmica, o fotômetro de espalhamento de luz se encontra acoplado a um cromatógrafo de permeação em gel (GPC)

As medidas foram efetuadas através de um aparelho de difusão de luz CMX 100 CROMATIX e um refratômetro diferencial IOTA de JOBIN YVON (Figura 14). Estes dois detetores que se encontram na saída de duas colunas de cromatografia de gel permeação montadas em série OH pak B-804 e OH pak B-805 (SHODEX) permitem a extrapolação gráfica da concentração (c) e da massa molecular (\bar{M}_w), respectivamente. As colunas são alimentadas por uma bomba WATERS 6000, à um fluxo de 1 ml/min. O solvente é uma solução de nitrato de sódio 0,1 N, onde adicionou-se NaN_3 a 0,2g/l como agente bactericida.

O aparelho de difusão de luz está equipado com fonte de laser que emite um raio luminoso de comprimento de onda $\lambda = 633\text{nm}$ e permite medir massa molecular a um ângulo compreendido entre 5 e 6°. O volume da célula de medida, delimitada por duas faces de dois blocos de quartzo e de 10,5 μl .

Um terceiro detector foi desenvolvido entre saída das colunas e os detectores de difusão de luz e da concentração. Este detector é um viscosímetro contínuo (196).

A obtenção deste terceiro gráfico, (η) associado aos dois precedentes, permitem

efetuar a cada traçado de concentração, uma massa molecular e a viscosidade intrínseca, possibilitando o traçado direto da Lei de MARK-HOUWINK.

A determinação precisa dos valores das extremidades dos picos é realizada pela utilização de análise informática eletrônica, substituindo o registro clássico sobre o papel. A extrapolação destes cromatogramas conduz a determinação de massa molecular ponderal média (\bar{M}_w) e massa molecular em número (\bar{M}_n). O programa computacional que fornece estes valores utiliza as seguintes equações:

$$\bar{M}_w = (\sum N_i \cdot M_i^2 / \sum N_i M_i) \quad \rightarrow \text{Equação 15}$$

$$\bar{M}_n = (\sum N_i \cdot M_i / \sum N_i) \quad \rightarrow \text{Equação 16}$$

Onde M_i e N_i são respectivamente a massa molecular e o número de moléculas correspondente ao produto analisado.

O pico do cromatograma representa a amostra a caracterizar, onde é dividida em intervalos iguais(i) correspondendo a seus volumes. A altura h_i ao centro de cada intervalo é determinada e a massa molecular correspondente M_i é então deduzida a partir de um valor K , lido sobre a curva de eluição $\log M = f(k)$. Tem-se N_i , M_i , c_i e h_i para variação de volume Δv e dn/dc constante, podendo-se aplicar as seguintes equações:

$$\bar{M}_w = \sum h_i M_i / \sum h_i \quad \rightarrow \text{Equação 17}$$

$$\bar{M}_n = \sum h_i / (\sum h_i / M_i) \quad \rightarrow \text{Equação 18}$$

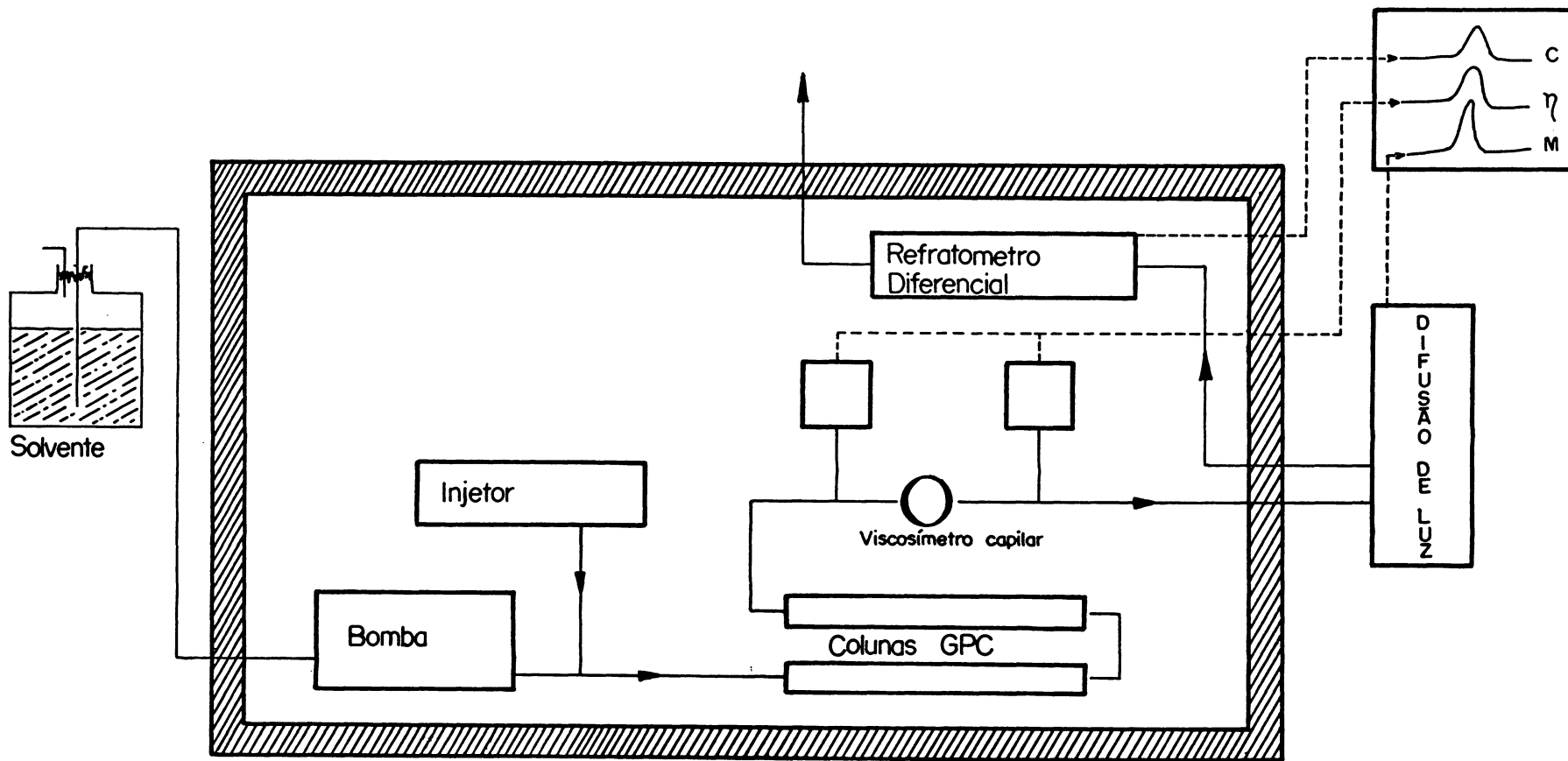


Figura 14 - Esquema do Sistema de cromatografia equipado à multideteccção - Cromatógrafo Gel Permeação; Difusão de luz; Viscosímetro.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

A *Mimosa scabrella* v. *scabrella*, vem sendo utilizado como fonte de matéria prima no estudo de hemiceluloses pelo grupo de CORRÊA e REICHER (37,38,39,57,155,156,) há muitos anos, além de ser uma espécie bastante investigada a nível botânico e florestal.

Devido a disponibilidade regional desta espécie suas sementes foram escolhidas para o desenvolvimento deste trabalho e forneceram oligossacarídeos e galactomanana.

4.1. OBTENÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Uma variedade de técnicas tem sido utilizadas para a extração de oligossacarídeos presente em sementes(99,114,167,169). Optou-se por três métodos de extração comparando-se qualitativa e quantitativamente os produtos obtidos.(Figura 15)

As sementes moídas foram deslipidificadas com uma mistura benzeno: etanol em proporções 2:1 (método A) e 9:1 (método B), em Soxhlet, a fim de eliminar lipídeos ceras e pigmentos.

O resíduo obtido pelo método A foi submetido a extração aquosa a 4^o e o extrato em seguida precipitado com etanol, obtendo-se no sobrenadante a fração de oligossacarídeos com um rendimento de 7%.

O resíduo obtido pelo método B foi submetido a extração em uma mistura metanol: água sob refluxo. O extrato forneceu a fração em oligossacarídeos com rendimento de 4%.

Os dois métodos de extração (A e B) apresentaram a mesma distribuição relativa em carboidratos. A extração aquosa direta a 4^o seguida de precipitação com etanol (método C) originou no sobrenadante açúcares de baixo peso molecular com rendimento de 11%. A composição em carboidratos de baixo peso molecular das sementes de *Mimosa scabrella* dos três métodos de extração pode ser observado na Tabela III.

SEMENTE MOIDA DE
Mimosa scabrella

74

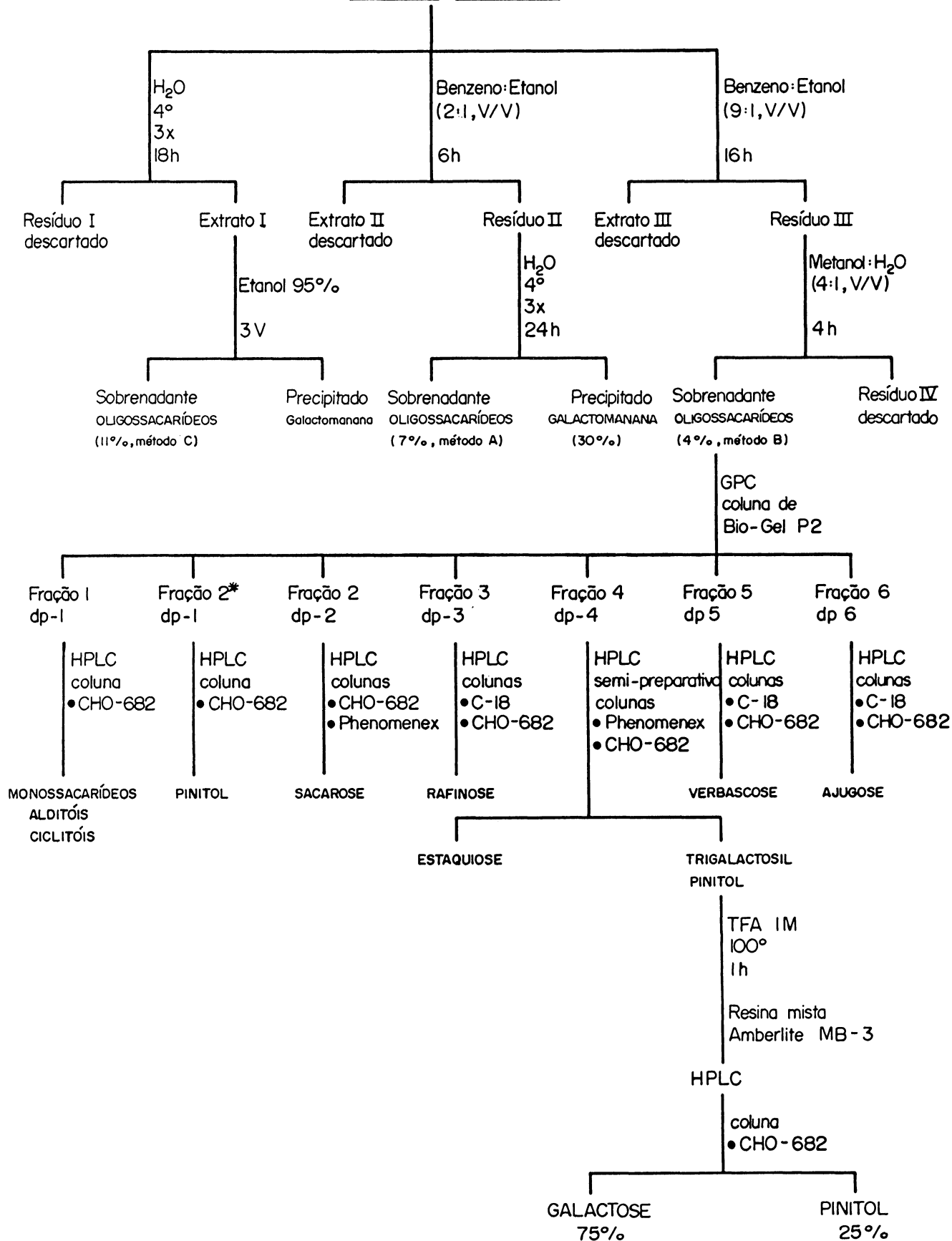


Figura 15 - Esquema de obtenção dos componentes de baixo peso molecular de sementes de *Mimosa scabrella*

TABELA III - ANÁLISE POR HPLC DOS CARBOIDRATOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DE SEMENTES DE *MIMOSA SCABRELLA* OBTIDOS POR TRÊS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

CARBOIDRATO	Método A	Método B	Método C
a. Sorbitol	-	1,5	1,0
b. Galactitol	-	-	-
c. Arabinitol/Manitol	-	1,0	-
d. Mio Inositol	4,8	3,0	3,0
e. Eritritol	1,2	1,0	-
f. Glicerol	0,5	0,4	-
g. Frutose	10,8	3,0	18,0
h. Galactose	4,9	3,0	17,0
i. Pinitol	7,3	7,0	3,0
j. Glucose	4,6	5,0	17,0
k. Sacarose	50,0	53,0	7,0
l. Rafinose	3,9	6,0	6,0
m. Estaquiiose/ Trigalactosil pinitol	4,6	8,0	13,0
n. Verbascose	6,7	7,0	9,0
o. Ajugose	0,6	1,0	3,0

a. Composição em % relativos a área dos picos obtidos por HPLC em coluna CHO-682, assumindo que os valores de dn/dc são constantes.

. (-) traços

O método C apresentou uma distribuição relativa diferenciada com relação aos dois métodos anteriores de que pode ser observado na Tabela III e através dos cromatogramas de HPLC obtidos dos extratos de *Mimosa scabrella*(Figura 16) .

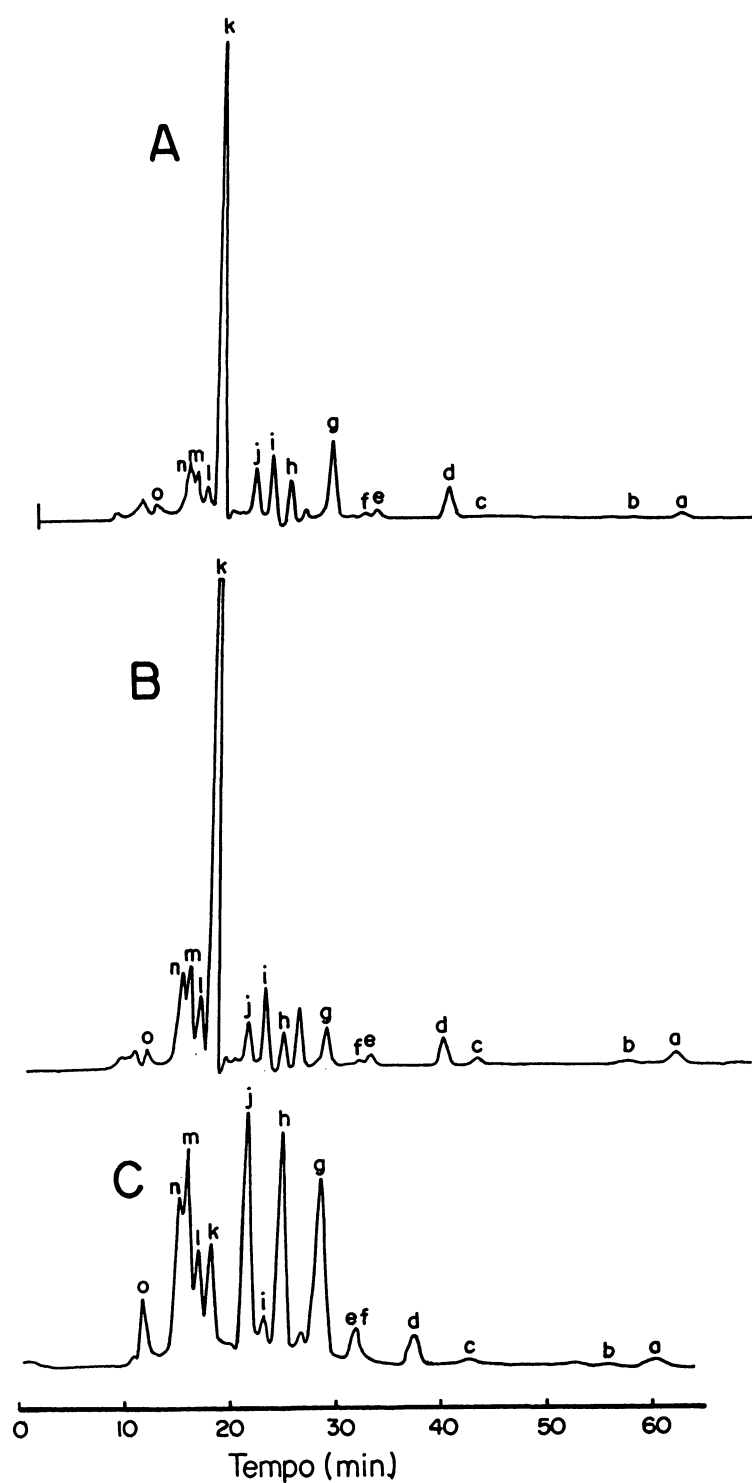


Figura 16 - Cromatogramas por HPLC dos extratos de *Mimosa scabrella* por três métodos de extração, em coluna CHO-682, à temperatura de 85° e eluido com água, fluxo de 0,4 ml/min. A, método A; B, método B; C, método C. A composição (a - o) é a mesma demonstrada na tabela III.

Verificou-se que através do método de extração aquosa direta (método C) ocorria um aumento significativo nas proporções de monossacarídeos como frutose (80%), glucose (70%) e galactose (70%), além de um leve acréscimo nas proporções de estaquiose verbascose e ajugose. Em contraste a este acréscimo foi observado um declínio acentuado de sacarose de 86%, como demonstrado no pico k (Figura 16).

As diferenças na distribuição relativa em carboidratos, embora apresentassem o mesmo perfil qualitativo, pelo método C (extração aquosa direta) em relação aos outros dois métodos ocorreu provavelmente pela ação das enzimas que atuaram durante o processo de extração em água fria.

Este fenômeno de hidrólise durante a extração aquosa direta a 30° foi observado em análise de sementes de leguminosa como *Lupinus angustifolius* cv. Chittick(167) e extração aquosa a 60° de sementes de *Glycine max* cv. Merr.(102)

Pode-se sugerir que a etapa prévia de deslipidificação a quente realizada neste trabalho para sementes de *Mimosa scabrella*, nos métodos de extração A e B, tenha sido responsável pela inativação enzimática. No entanto, SAINI(167) ao analisar métodos de extração para obtenção de oligossacarídeos a partir de sementes de leguminosas como *Lupinus angustifolius*, *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Phaseolus angularis* e *Vigna sinensis*, observou que a atividade α -galactosidase não era afetada pela etapa prévia de deslipidificação a temperatura ambiente. Outra forma de inativação enzimática foi realizada pelo tratamento prévio das sementes inteiras de *Glycine max* cv Merr(102) em água fervente por 30 minutos.

Os resultados mostram portanto que o processo de extração é fator importantíssimo na análise de oligossacarídeos, além de contribuir para o isolamento incompleto dos compostos, influenciando no rendimento dos produtos, e que aliado ao rendimento deve-se eliminar a co-extração de enzimas endógenas ativas no meio.

Além destes fatores, alguns autores observaram em estudos de oligossacarídeos de sementes de leguminosas como *Vicia faba*(33), *Phaseolus vulgaris*(207) e *Glycine max*(205), que as condições de cultivo podem interferir na distribuição relativa em oligossacarídeos de uma mesma espécie.

4.2. PURIFICAÇÃO DOS OLIGOSSACARÍDEOS

Para análise quantitativa e qualitativa dos componentes de baixo peso molecular das sementes de *Mimosa scabrella* foi escolhido o produto obtido pelo método de extração B, pois verificou-se que apesar do menor rendimento em relação ao método A, a amostra obtida no método B é representativa e foi demonstrado por REICHER et alli(158) que o tratamento metanol-água 4:1 sob refluxo inativa em 100% as enzimas e que o tratamento com benzeno etanol 2:1 não é eficiente para inativar totalmente as enzimas. SAINI(167) abordou em seu trabalho com sementes de leguminosas que a extração com metanol: água resultava numa extração incompleta dos oligômeros de rafinose.

Inicialmente efetuou-se o fracionamento dos oligossacarídeos por cromatografia de gel permeação (GPC) em Bio-Gel P2 (Figura 17).

O gel de poliacrilamida (Bio-Gel P2), suporte utilizado no fracionamento dos oligossacarídeos de *Mimosa scabrella*, tem sido adotado por muitos autores (32,33,88,167,190,191) pelo seu alto poder de resolução em mistura destes oligômeros. A separação foi obtida em eluição com água, solvente adequado ao sistema que contém açúcares neutros. A temperatura de 65° é recomendada(86), pois diminui as interações gel-soluto, que interferem na eluição dos componentes.

O fracionamento da mistura de oligossacarídeos de *Mimosa scabrella* indicou que o componente com grau de polimerização (dp) igual a dois (Fração 2* - Figura 17) é predominante.

Todas as frações obtidas por GPC em Bio-Gel P2 foram submetidas a purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Essa técnica de separação rápida tem sido utilizada para identificação de oligossacarídeos de sementes de diferentes espécies (54,70,102,202).

A separação específica dos monossacarídeos e dissacarídeos (Frações 1,2,2*) presentes no extrato metanol: água (Figura 17) a partir de sementes de *Mimosa scabrella*, foi realizada em colunas de HPLC que continham como suporte resinas

trocadoras de cations na forma Pb^{++} (coluna CHO-682), utilizando água como fase móvel. Todos os outros suportes necessitam de misturas água/solvente orgânico, que não são apropriados ao estudo de oligossacarídeos

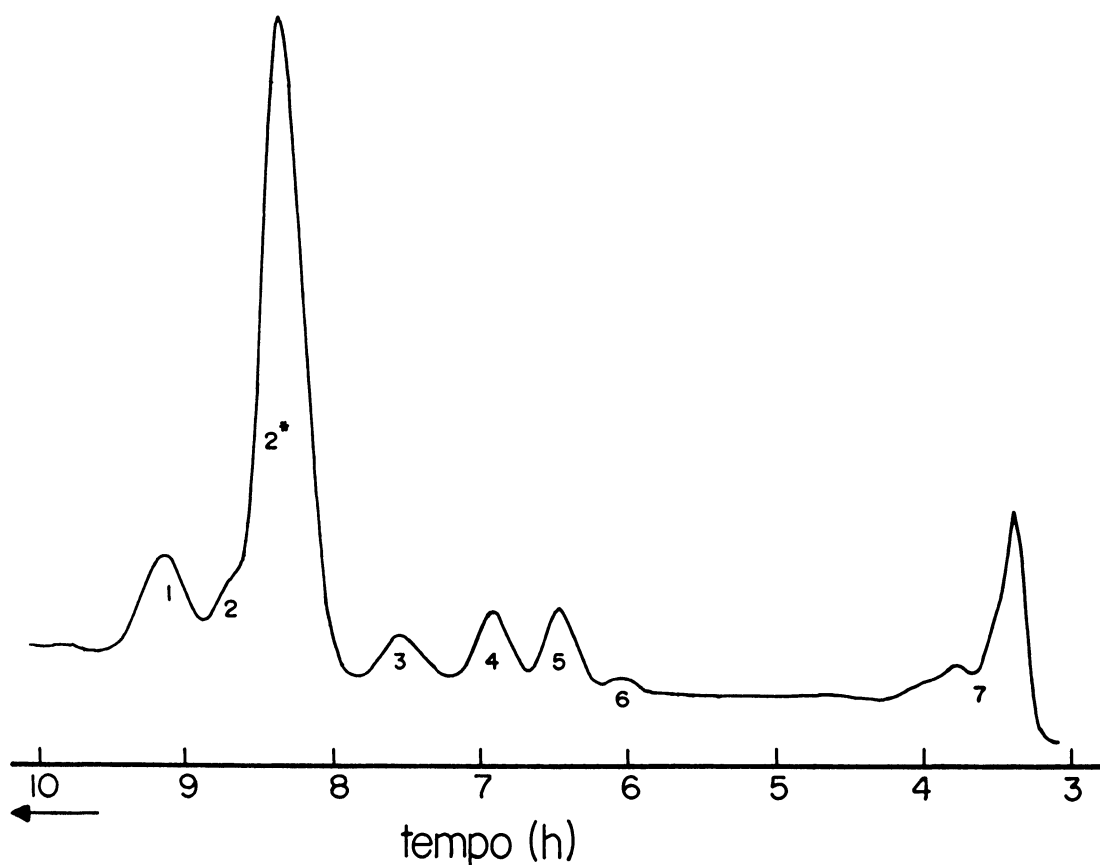


Figura 17 - Fracionamento dos oligossacarídeos de sementes de *Mimosa scabrella* (obtidos pelo método de extração B) por GPC em coluna Bio-Gel P2 (200-400 mesh ; 210 x 1,5 cm, d.i.) a temperatura de 65°, eluente-água, detetor índice de refração.

neutros pois causam problemas de limite de solubilidade resultando em separação deficiente dos componentes. Geralmente estas colunas utilizam temperaturas de 60° - 85° com a finalidade de aumentar o poder de resolução(93).

A purificação dos oligossacarídeos de sementes de *Mimosa scabrella* foi realizada em coluna de HPLC tipo C-18 (fase reversa), não apresentando problemas de solubilidade, utilizando-se água como fase móvel e temperatura ambiente(183). Pela multiplicidade de produtos presentes na mistura de oligossacarídeos de *Mimosa scabrella* eluidos com tempos de retenção semelhantes foi necessário a utilização de outros tipos de colunas para uma separação mais eficiente. Neste caso a coluna "Phenomenex"(144) mostrou-se satisfatória.

BLACK e GLOVER(17) demonstraram que as análises realizadas para separação de oligossacarídeos de *Glycine max* por HPLC era afetada pela fase móvel acetonitrila: água conforme aumentava-se a proporção do solvente orgânico, causando diminuição na resposta do detetor de índice de refração, provavelmente devidos ao fenômeno de solubilidade.

A série de oligossacarídeos em sementes de *Glycine max e Lupinus angustifolius* foram identificados por WIGHT E DATEL(202) pelo método de HPLC em coluna de RP 18(fase reversa). Verificaram que as principais vantagens deste método é o uso de fase móvel não tóxica, além da rapidez na preparação das amostras, embora exista a desvantagem da co-eluição da rafinose e verbascose. Outros autores(190,191) indicam o método de HPLC em fase reversa pela sua alta seletividade.

Entretanto KUO et alii(107) optaram pela cromatografia líquida através de resina de troca iônica na forma Ca^{++} que além de uma perfeita separação dos oligossacarídeos da família da rafinose, possibilitou a identificação e quantificação dos monossacarídeos presentes em sementes de 29 espécies diferentes. Outras colunas tem sido utilizadas com o mesmo fim como " μ Bondapak" forma OH(54,70).

Observou-se que a cromatografia líquida de alta eficiência é um método eficaz na identificação de oligossacarídeos(87), mas que deve estar associada a outros métodos de análise química e espectrométrica para a identificação conclusiva dos compostos.

4.3. ANÁLISE ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS DE BAIXO PESO MOLECULAR

A análise estrutural foi determinada pelos métodos de cromatografia gasosa (g.l.c.), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (g.l.c. -m.s.), espectroscopia de ressonância nuclear magnética de carbono treze (^{13}C -n.m.r.) e pela técnica de bombardeamento de átomos acelerados acoplado espectrometria de massa (FAB - m.s.).

Análises preliminares por cromatografia em papel (p.c.) e cromatografia em camada delgada (t.l.c.) do extrato metanol-água das sementes de *Mimosa scabrella* demonstraram que além dos oligossacarídeos haviam monossacarídeos e alditois livres.

Após o fracionamento por GPC, purificação por HPLC seguida de análise estrutural pelos métodos acima citados foi possível a identificação dos glicosídeos de baixo peso molecular presentes nas sementes de *Mimosa scabrella* (Tabela III).

Os monossacarídeos (Fração 1 - Figura 17) identificados foram glucose, galactose e frutose. Os mesmos açúcares foram encontrados em sementes de *Glycine max*(107,175), *Lens esculenta*(175), *Phaseolus vulgaris*(175), *Triticum aestivum*(107) e *Trifolium subterraneum*(11).

MATHESON e SAINI(116) observaram em sementes de *Lupinus luteus* que os níveis de glucose, frutose e galactose mantinham-se praticamente constantes durante estudos de germinação mas o mesmo não ocorria para *Phaseolus aureus*(6) e *Cicer arietinum*(6) com níveis máximos após 48h e 24h de germinação, respectivamente.

Em análise cromatográfica por g.l.c. dos produtos isolados e purificados por HPLC contidos na Fração 1 (Figura 17), verificou-se que além da presença de monossacarídeos haviam açúcares alcoois livres como sorbitol, galactitol, arabinitol, manitol, eritritol e glicerol, cuja presença foi confirmada por g.l.c. - m.s.

Os espectros de ^{13}C -n.m.r. destes compostos apresentaram os mesmos deslocamentos químicos que os reportados por ANGYAL e LE FUR.(3).

LEWIS(109) relatou a presença de 17 alditois de ocorrência natural em plantas

mas entre os mais comuns estão o manitol, glucitol (sorbitol) e o galactitol (dulcitol) também encontrados em sementes de *Mimosa scabrella*.

Ciclitois e seus derivados tem sido encontrado frequentemente em espécies da família *Leguminosae*(6,11,16,175,205), como reguladores nas vias metabólicas dos carboidratos presentes na sementes(140,145). Estes compostos também foram identificados em sementes de *Mimosa scabrella*. Os ciclitois como o mio-inositol e o pinitol foram isolados da Fração 1 e 2, respectivamente (Figura 17) caracterizados por espectroscopia de ^{13}C -n.m.r., onde os deslocamentos químicos assinalados para cada carbono podem ser observados na Tabela IV. Estes resultados são compatíveis com os trabalhos realizados por ANGYAL e ODIER(4,5), BINDER e HADDON(16) e SCHWEIZER e HORMAN(176) que investigaram ciclitois e O-metil-ciclitois presentes em leguminosas.

O pinitol foi também caracterizado por espectrometria de FAB - m.s. O espectro de massa realizado através de FAB positivo em matriz de glicerol é mostrado na Figura 19-A. A massa deste composto (M) é 194. O espectro apresenta um ion pseudomolecular $(M + H)^+$ à $m/z = 195$ e ion cationizado $(M + Na)^+$ à $m/z = 217$.

Observou-se por análise em HPLC (Tabela III) que a proporção de pinitol (7%) é maior que mio-inositol (3%).

BEVERIDGE et alii(11) demonstraram entre 28 espécies de leguminosas compreendidas entre os gêneros *Desmodium*, *Dolichos*, *Centrosema*, *Glycine*, *Leucaena*, *Macroptilium*, *Pueraria*, *Trifolium* e *Stylosanthes* a predominância do pinitol em relação ao mio-inositol. O mesmo foi verificado por QUEMENER e BRILLOUET(151) em sementes de *Lupinus albus*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Lens esculenta* e *Cicer arietinum*, todas pertencentes a família *Leguminosae*.

NORDIN(140) sugere que o pinitol tenha um significado fisiológico na germinação, o que poderia explicar sua existência em quantidade relativamente elevada, mas ainda hoje existem dúvidas sobre as funções e biossíntese do pinitol(55).

No entanto, DAVIS e NORDIN(44) demonstraram a presença destes ciclitois em nódulos de raízes de *Medicago sativa*, *Glycine max*, *Phaseolus limensis* e *Trifolium repens* sugerindo que possuam função de fixação de nitrogênio auxiliando no

TABELA IV - ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DOS ESPECTROS DE ^{13}C -n.m.r. DOS CICLITOIS DE SEMENTES DE *MIMOSA SCABRELLA*

Composto	Deslocamento Químico (ppm)						
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	Me
Mio-inositol	72,02	73,05	72,02	73,30	75,32	73,30	
D-3-O-metil-chiro inositol (pinitol)	72,20	70,60	83,50	72,90	71,30	72,42	60,44
O- α -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 2)- D-4-O-metil-chiro-inositol ^a	96,49	69,05	70,09	69,94	71,50	61,63	
O- α -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 6)- D-4-O-metil-chiro-inositol ^a	68,85	76,49	71,89	83,46	71,51	71,60	60,45
O- α -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 6)- D-4-O-metil-chiro-inositol ^a	96,84	67,54 ^b	68,65 ^b	67,54 ^b	69,89	60,41	
O- α -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 6)- D-4-O-metil-chiro-inositol ^a	97,15	67,54 ^b	68,65 ^b	67,54 ^b	68,74	66,28	
O- α -D-galactopiranosil (1 \rightarrow 2)- D-4-O-metil-chiro-inositol ^a	93,89	68,69	70,20	70,11	68,48	66,30	
D-3-O-metil-chiro-inositol	63,34	73,87	82,08	70,20	68,84	70,11	58,99

a) Dados descritos por SCHWEIZER e HORMAN¹⁷⁶

b) Deslocamento químicos de C₂, C₃ e C₄ podem ser invertidos

desenvolvimento de espécies de *Rhizobium* presentes no solo, o que vem de encontro a utilização da *Mimosa scabrella* em solos de baixa fertilidade, pois verificou-se que esta espécie ativa a vida microbiana pela adição de grande quantidade de nitrogênio ao solo(100,123).

A Fração predominante 2* (Figura 17) identificada como sacarose representa cerca de 50% dos componentes de oligosacarídeos presentes nas sementes de *Mimosa scabrella*.

A predominância de sacarose foi observada em sementes de *Glycine max*(33,102,167), *Pisum sativum*(33) e *Arachis hypogaea*(134), todas espécies pertencentes a família *Leguminosae* e *Helianthus annuus*(107) da família *Compositae*.

Após a caracterização da sacarose, foram analisadas as frações com grau de polimerização entre 3 e 6 (Figura 17). Estas frações foram identificadas como compostos da série da rafinose (ver Tabela I na introdução deste trabalho). A Figura 17 mostra a rafinose (Fração 3), a estaquiase (Fração 4), a verbascose (Fração 5) e a jugose (Fração 6).

As estruturas dos oligossacarídeos foram confirmadas por análises espectroscópicas de ^{13}C -n.m.r. (Figura 18). Os espectros apresentaram sinais bem definidos para região de δ 96,9 - 98,3; de δ 91,2 - 92,9 e de δ 61 - 62 característicos para os carbonos anoméricos das unidades α -D-galactopiranosil, α -D-glucopiranosil e β -D-frutofuranosil, respectivamente (19,20).

As ressonâncias dos átomos de carbonos das unidades de α -D-glucopiranosil e β -D-frutofuranosil não são afetadas pelo acréscimo das unidades de galactose da jugose (dp 6), verbascose (dp 5) e estaquiase (dp 4). No entanto observa-se na região de C-1 um deslocamento para campo mais baixo de 0,71 p.p.m. em relação a unidade de α -D-glucopiranosil e um deslocamento para campo mais alto de 0,26 p.p.m. em relação a unidade de β -D-frutofuranose que compõe a rafinose (dp 3) devido a presença de galactose diretamente ligada a unidade de sacarose.

Observa-se claramente que o sinal a δ 104,4 em campo baixo corresponde a C-2 das unidades de β -D-frutofuranosídicas de sacarose e os sinais em campo alto δ 91,2 -

92,9 às unidades de α -D-glucopiranosídicas. Os outros sinais a δ 96,9 - 98,3 são referentes as unidades galactopiranosil acrescidas a unidade de sacarose (Figura 18). Esta região é característica de C-1 e de configuração α .

Na série de oligossacarídeos da rafinose as ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 6) entre as unidades de galactose são caracterizadas pela ausência de sinais típicos dos grupos CH₂OH na região de δ 62.

As ressonâncias de C-1 das unidades de galactose terminais da série de oligossacarídeos da rafinose mostram-se praticamente inalteradas com sinais a δ 97,19 (estaquiose), δ 96,93 (verbascose) e δ 96,94 (ajugose), provavelmente pela alta densidade eletrônica.

Observa-se também, na região de C-1 que os sinais correspondentes as unidades de galactose substituídas que compõe a ajugose, verbascose e estaquiose são deslocados para campo mais baixo em relação a galactose terminal, este fato é decorrente do ambiente eletrônico, influência dos ângulos entre as unidades vizinhas, estrutura química e conformação dos oligossacarídeos em solução.

Os deslocamentos químicos assinalados para cada carbono dos oligossarídeos da família da rafinose presentes nas sementes de *Mimosa scabrella* podem ser observados na Tabela V.

Os oligossacarídeos da rafinose estão largamente distribuídos entre as plantas superiores, principalmente nas sementes durante a maturação e nas folhas durante a fotossíntese. Entre os mais frequentes estão a rafinose e estaquiose. A verbascose encontrado geralmente em proporções insignificantes, com excessão das sementes de *Phaseolus aureus*(107), *Pisum sativum*(13,107) e *Vicia faba*(13,54,107,151).

A ajugose, hexassacarídeo, encontrado entre os compostos de baixo peso molecular nas sementes de *Mimosa scabrella* (dp 6 - Figura 17), não tem sido caracterizados em espécies de leguminosas, provavelmente pela dificuldade em isolar este composto presente geralmente em quantidades pouco significativas. Entre as poucas

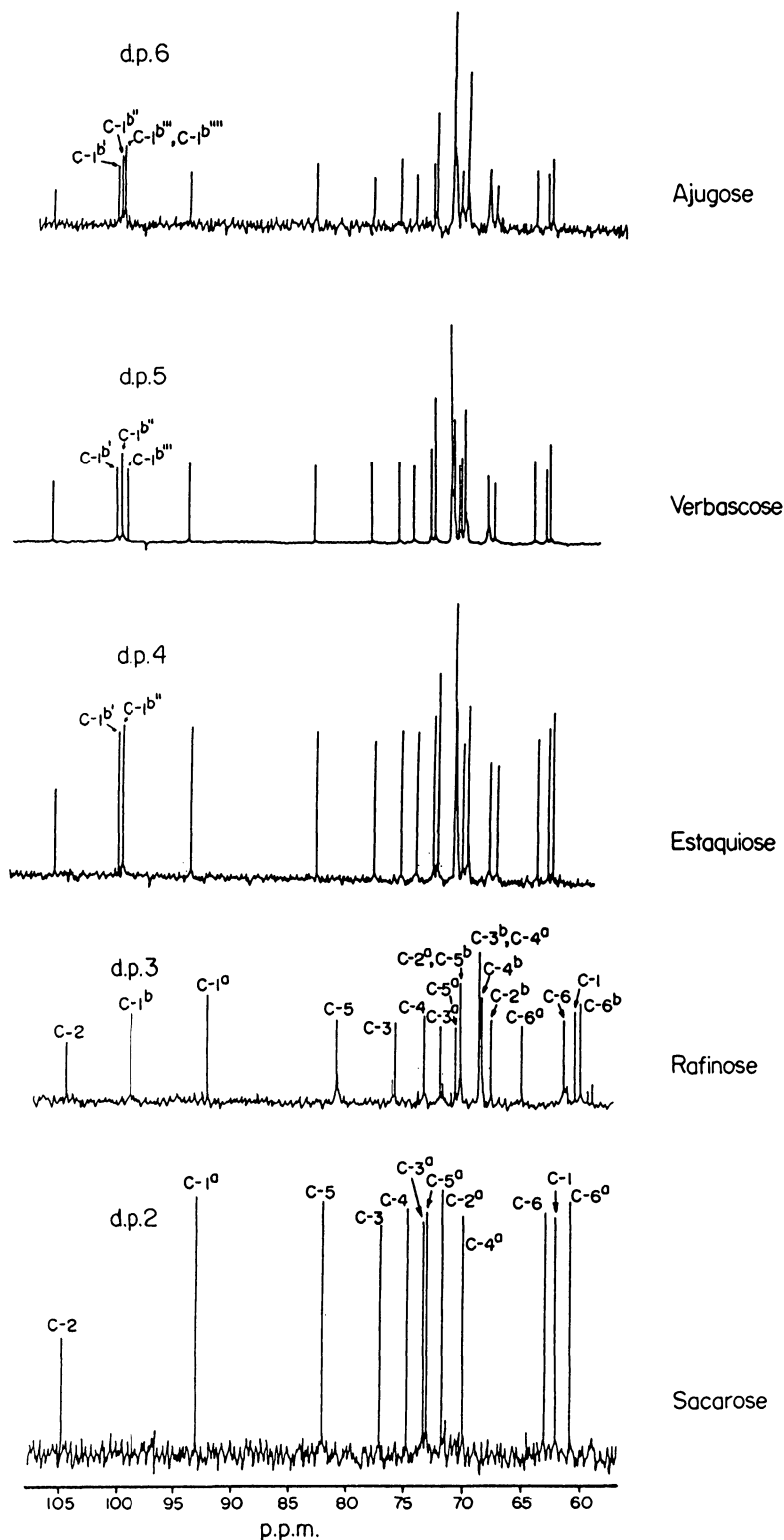


Figura 18 - Espectros de ^{13}C -n.m.r. (75 MHz) dos oligossacarídeos da família da rafinose de sementes de *Mimosa scabrella*, em óxido de deutério (D_2O) a 45° . Os símbolos \underline{a} e \underline{b} correspondem as unidades D-glucopiranosil e D-galactopiranosil, respectivamente. Os símbolos b' , b'' , b''' , b'''' corresponde as unidades de α -D-galactopiranosil ligadas a sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose, respectivamente.

TABELA V - ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DOS ESPECTROS DE ^{13}C -n.m.r. DOS OLIGOSSACARÍDOS DA FAMÍLIA DA RAFINOSE DE SEMENTES DE *MIMOSA SCABRELLA*.

Composto	Estrutura	Deslocamento Químico					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
dp 2-Sacarose	α -D-Glucopiranosil (1→2)	92,98	71,95	73,49	70,12	73,23	61,03
	β -D-frutofuranose	62,27	104,48	77,36	74,91	82,19	63,22
dp 3-Rafinose	α -D-galactopiranosil (1→6)	98,35	98,35	69,32	69,09	70,87	60,97
	α -D-glucopiranosil (1→2)	91,96	70,87	72,55	69,32	71,26	65,83
	β -D-frutofuranose	61,35	103,66	76,30	73,91	81,20	62,31
dp 4-Estaquiose	α -D-galactopiranosil (1→6)	97,19	68,66	67,44	68,66	70,12	60,28
	α -D-galactopiranosil (1→6)	97,53	68,53	67,95	67,59	68,39	65,65
	α -D-glucopiranosil (1→2)	91,25	70,12	71,88	68,49	70,43	65,05
	β -D-frutofuranose	61,60	102,94	75,56	73,18	80,49	60,63
dp 5-Verbascose	α -D-galactopiranosil (1→6)	96,93	68,65	67,42	68,65	70,09	60,28
	α -D-galactopiranosil (1→6)	97,10	68,54	67,42	67,82	68,65	65,47
	α -D-galactopiranosil (1→6)	97,49	68,54	67,99	67,58	68,38	65,62
	α -D-glucopiranosil (1→2)	91,24	70,09	71,89	68,51	70,41	65,02
	β -D-frutofuranose	61,61	102,94	75,55	73,17	80,48	60,62
dp 6-Ajugose	α -D-galactopiranosil (1→6)	96,94	68,65	67,42	68,65	70,12	60,30
	α -D-galactopiranosil (1→6)	96,94	68,56	67,42	67,92	68,65	65,46
	α -D-galactopiranosil (1→6)	97,17	68,56	67,42	67,76	68,65	65,60
	α -D-galactopiranosil (1→6)	97,50	68,56	68,04	67,58	68,39	65,62
	α -D-glucopiranosil (1→2)	91,25	70,12	71,91	68,47	70,42	65,01
	β -D-frutofuranose	61,62	102,95	75,56	73,17	80,49	60,63

citações encontradas na literatura estão os trabalhos realizados por CERNING et alii(33), CERNING e FILIATRE(32) e VOSE et alii(200). Nos dois primeiros a ajugose foi isolada e identificada após fracionamento por GPC em coluna de Bio-Gel a partir do extrato etanólico de sementes de *Vicia faba*, e no último por análise em glc e H⁺-n.m.r. a partir do extrato metanólico de sementes de *Pisum sativum* e *Vicia faba*.

Apesar da existência de muitos trabalhos referentes a caracterização de oligossacarídeos de rafinose em espécies da família *Leguminosae*, como descrito na introdução, a literatura não reporta nenhum estudo que caracterize os produtos isolados através de análise por HPLC, ¹³C-n.m.r. e FAB - m.s. como o realizado neste trabalho. Verificou-se que os componentes de baixo peso molecular das sementes de *Glycine max* estão em nível de conhecimento análogo ao da *Mimosa scabrella*. Convém ressaltar que os oligossacarídeos de nenhuma espécie do gênero *Mimosa*, como a *Mimosa scabrella*, foi descrito até o momento.

Os estudos de POLLOCK(147) e CASTILLO et alii(30) mostraram que o acúmulo de oligossacarídeos de rafinose é uma forma de resistência e aclimatização das plantas ao frio, o que poderia justificar a presença de proporções relativamente elevadas de sacarose e oligossacarídeos de rafinose em sementes de *Mimosa scabrella*, espécie de crescimento rápido e abundante em regiões frias do sul brasileiro, sujeitas a frequentes geadas.

Foram abordados até o momento os monossacarídeos ciclitois, alditois e oligossacarídeos da família da rafinose, todos constituintes de baixo peso molecular presentes nas sementes de *Mimosa scabrella*.

No entanto observou-se que a Fração 4 obtida por gel permeação em coluna de Bio-Gel P2 (Figura 17) e analisado por HPLC, apresentava outro composto além da estaquiose. O composto foi isolado e purificado em escala semi-preparativa por HPLC em coluna Phenomenex e CHO-682. Após purificação o composto foi submetido a análise por ¹³C-n.m.r. e FAB - m.s.

A identificação das unidades monossacarídicas foi confirmada por análise em HPLC dos carboidratos presentes após hidrólise ácida do trigalactosil pinitol com aparecimento de dois picos que foram caracterizados como D-galactose e pinitol. As áreas

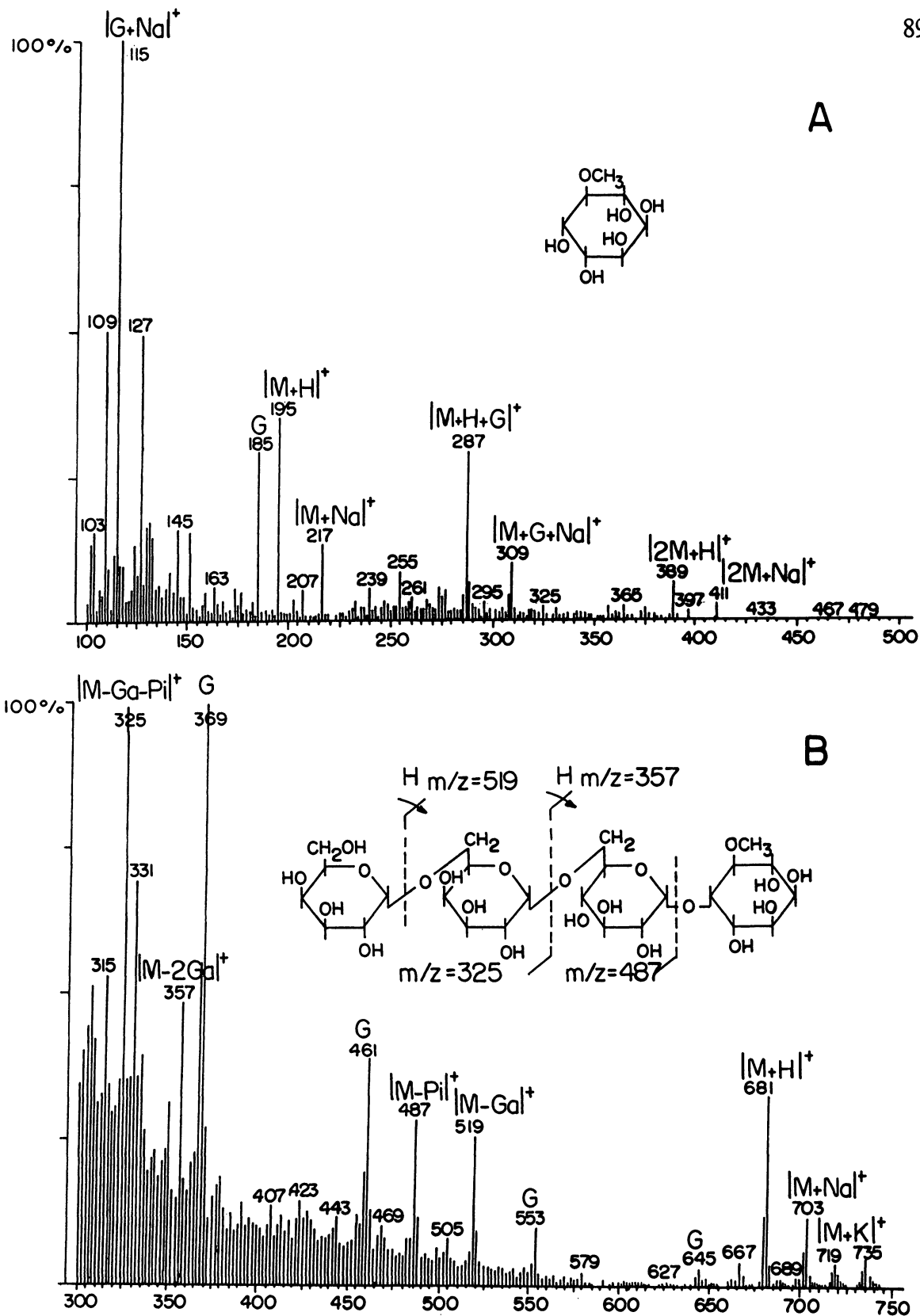


Figura 19 - Espectros de massa (FAB positivo, matriz glicerol) os símbolos G, Ga, Pi, H, Na e K correspondem ao glicerol, galactose, pinitol, hidrogênio, sódio e potássio, respectivamente. **A**, pinitol, (D-3-O-metil-chiro - inositol); **B**, trigalactosil pinitol, (O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- α -D-galactopiranosil - (1 \rightarrow 6)-O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-3-O-metil-chiro-inositol)

dos picos sugerem proporções molares de 3:1, respectivamente.

O pinitol livre caracterizado entre os componentes de baixo peso molecular das sementes de *Mimosa scabrella* foi utilizada como padrão para a análise por FAB-m.s. do tetrassacarídeo (Figura 19 A).

O espectro de massa realizado através FAB positivo em matriz de glicerol é mostrado na Figura 19 B. A massa deste composto (M) de $dp = 4$ é 680. O espectro apresenta um ion pseudomolecular $(M + H)^+$ à $m/z = 681$, e ions cationizados $(M + Na)^+$ à $m/z=703$ e $(M + K)^+$ à $m/z=719$.

A fragmentação observada por FAB positivo levou ao aparecimento de duas séries de ions(51).

A primeira série corresponde a fragmentação entre o nível das ligações glicosídicas com formação dos ions através da retenção da carga sobre o oxigênio (ligação glicosídica). Os ions obtidos foram $m/z = 325$ referente a $(M - Ga - Pi)$ e $m/z = 487$ referente a $(M - Pi)$, onde os simbolos Ga e Pi correspondem as unidades de galactose e pinitol, respectivamente.

A segunda série de ions corresponde a fragmentação entre as ligações glicosídicas com a transferência de hidrogênio. Neste caso a carga não fica sobre o oxigênio, e os ions obtidos foram $m/z = 357$ referente á $(M - 2 Ga)$ e $m/z = 519$ referente a $(M - Ga)$. Os ions característicos do produto coexistem com aqueles da matriz de glicerol (G) à $m/z = 369,461,553$ e 645.

A escolha de matriz de glicerol é justificada para o estudo de açúcares neutros, devido a sua viscosidade que permite uma obsevação prolongada dos espectros. A presença de cátions, necessários a formação dos íons cationizados tem uma função importante para a determinação da massa do composto em análise, pois permitem registrar espectros de moléculas presentes na matriz em pequenas concentrações. Uma mistura equimolecular de cloretos alcalinos, colocados em presença do açúcar leva a formação de ions cationizados $(M + Na)^+$, $(M + K)^+$ de intensidade praticamente iguais. Os íons alcalinos constituem os melhores agentes de cationização no interior da matriz para o estudo de açúcar neutros, por não apresentarem características complexantes o que

interferiria na identificação do composto.

O conhecimento deste fatores permitiu a identificação de um glicosídeo de três unidades de galactose uma de pinitol, que foi chamado de trigalactosil pinitol, por analogia a nomenclatura sugerida por SCHWEIZER et alii(175), que identificou um isômero de dp 3, digalactosil pinitol, denominado ciceritol.

O trigalactosil pinitol foi analisado por ^{13}C -n.m.r (Figura 20). A região de δ 93,8 - 97,1 é característica para os carbonos anoméricos, α -, C-1, de galactopiranosose sendo facilmente identificada por estar em campo baixo em relação a ressonância dos outros carbonos (102), de δ 67,5 - 70,2 corresponde aos átomos de C-2 a C-5, enquanto que os sinais de δ 60 - 62 e δ 66-72 são atribuídos a C-6, todos relativos as unidades de galactose e galactose-6-O substituída.

Os sinais de campo baixo a δ 93,8-97,1 são três indicando três ligações glicosídicas e seus campos relativamente altos para a região de C-1 mostram uma configuração α .

A ausência de sinais correspondentes a O-substituição em C-2, C-3 e C-4 para as unidades de galactopiranosose na região de δ 72-85 e a presença de dois sinais relativos a substituição em C-3 e C-2 do pinitol indicam que as unidades de galactopiranosose estão unidas por ligações glicosídicas do tipo ($\text{H}\rightarrow\text{6}$), sendo confirmado pela presença de um único sinal de C-6 não substituído em δ 60,4.

O pinitol, metil eter do inositol, ligado as unidades de galactose apresenta a região de δ 65,3 correspondente ao átomos de C-1, de δ 68,8 - 82,1 referente aos átomos de C-2 a C-5 e δ 58,99 atribuído ao grupo metoxil. Os deslocamentos químicos assinalados para cada carbono do trigalactosil pinitol podem ser observados na Tabela IV.

O sinal do átomo de carbono que contém o grupo metoxil é deslocado para campo mais baixo em aproximadamente 10 ppm(4). O efeito é notado no espectro do trigalactosil pinitol pela diferença de 8,28 ppm por analogia ao sinal de C-3 da unidade de chiro-inositol não substituída por grupo metoxil (δ 73,8) daquela substituída (δ 82,08), conforme descrito por ANGYAL e ODIER(5).

O deslocamento químico do grupo O-metil tem sido explicado em termos das suas

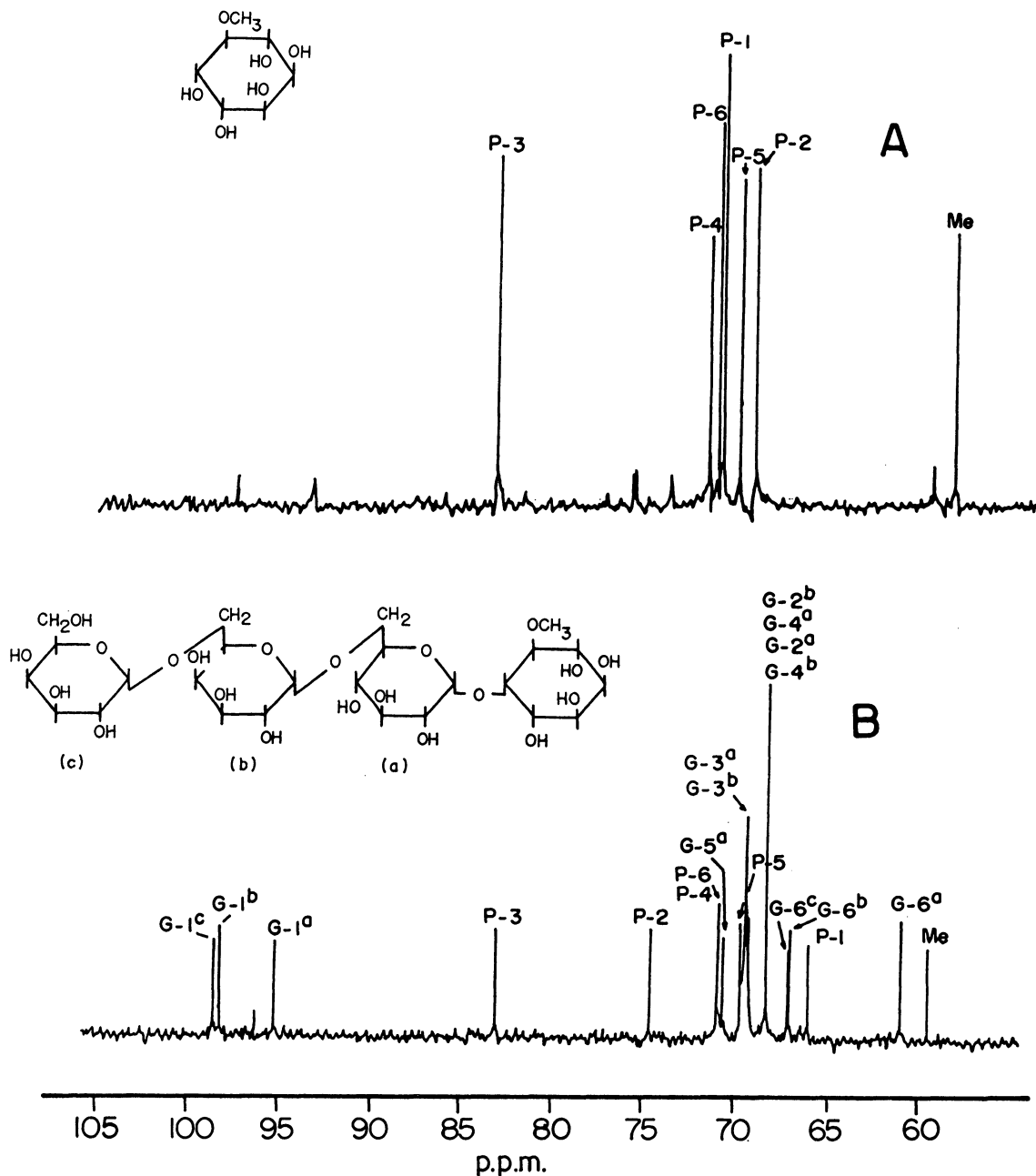


Figura 20 - Espectros de ^{13}C -nm.r. (75 MHz) dos ciclitóis de sementes de *Mimosa scabrella*, em óxido de deutério (D_2O), 45° . A, pinitol; B, trigalactosil pinitol. . P e G correspondem ao pinitol e a galactose, respectivamente.

interações (remoção de elétrons) com um substituinte no carbono adjacente (efeito α) (4). Os valores dos deslocamentos químicos são diagnosticados pela orientação do grupo metoxil e seus substituintes vizinhos. A interação ocorre para os compostos D-3-O-metil-chiro inositol onde o sinal é encontrado a campo baixo δ 60,44 e 2-O- α -D-galactopiranosil-D-4-O-metil-chiro inositol δ 60,45, ambos citados na tabela IV.

Observa-se que o sinal do grupo O-metil para o trigalactosil pinitol foi deslocado para campo mais alto (δ 58,99), provavelmente pela proximidade da ligação glicosídica do tipo (1 \rightarrow 2), entre a unidade de galactose e pinitol, e o grupamento metoxil. Um sinal semelhante do grupo O-metil δ 58,81 foi obtido para 5-O- α -D-galactopiranosil-D-4-O-metil-mio-inositol isolado de sementes de *Vigna angularis*(206), que possui C-5 unido por ligação glicosídica e C-4 substituído com grupamento metil.

Conclui-se portanto que novo galactosil pinitol é um O- α -D- galactopiranosil (1 \rightarrow 6)- O- α -D-galactopiranol-(1 \rightarrow 6)-O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-3-O-metil-chiro-inositol uma forma homóloga da família dos α -D-galactosil ciclitol(11,151,175). O isolamento e caracterização deste composto é um resultado inédito, apesar de sua existência ter sido sugerida em estudos de QUEMENER e BRILLOUET(151).

4.4. CARATERIZAÇÃO DA GALACTOMANANA

A galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* utilizada neste trabalho foi obtida a partir do método A de extração, após precipitação do extrato aquoso em etanol que forneceu uma fração polissacarídica com rendimento aproximado de 30%.

A estrutura da galactomanana de *Mimosa scabrella* foi determinada previamente(66) pelos métodos químicos de oxidação com periodato, metilação pela sequência de métodos de HAWORTH(83), KUHN et alii(105) e HAKOMORI(82) e por ^{13}C -n.m.r.. Este biopolímero possui estrutura similar á maioria das galactomananas de sementes de leguminosas, porém é altamente substituída. Os resultados foram confirmados por análise em HPLC e metilação pela sequência de métodos de HAKOMORI(82) e PURDIE(90). A Tabela VI mostra a relação manose - galactose obtida por diferentes métodos.

TABELA VI - COMPOSIÇÃO EM MONOSSACARÍDEOS A PARTIR DE GALACTOMANANA DE *MIMOSA SCABRELLA*.

Composição	Método			
	GLC ^a	¹³ C-N.M.R. ^a	HPLC	METILAÇÃO
Monossacarídica				
Manose	1,1	1,1	1,0	1,1
Galactose	1,0	1,0	1,0	1,0

a. Estabelecidos previamente por GANTER et alii(67)

A relação man: gal obtida para a galactomanana de *Mimosa scabrella* (1 : 1) é característica das espécies da Tribo Trifolieae como *Trifolium pratense*(179) var montgomery (man : gal 1,15), *Trifolium repens* L.(91)(man:gal 1,0), *Medicago sativa* (40) v. wairau (man:gal 1,13) e da Tribo Loteae como *Lotus pedunculatus*(179) (man:gal 1,1) ambas da sub-família *Faboideae*, mas presente sempre com rendimento inferiores a 20%(1,48,91,179).

Poucas espécies da Tribo *Mimoseae* foram estudadas, entre elas a *Desmanthus illinoensis*(48), *Leucaena glauca*(84) e a *Leucaena leucocephala*(47), cujas relações man:gal são 2,7:1, 1,3:1 e 1,5:1, respectivamente.

Este fato pode representar uma tendência da variação na relação de man:gal da sub-família(48), podendo ser utilizada como índice quimiotaxonômico.

McCLEARY et alii(121) verificaram que as galactomananas de sementes de leguminosas extraídas com água fria apresentavam um conteúdo em galactose sempre superior a 20%. Além disso verificaram que as galactomananas com relação de man:gal semelhantes requerem diferentes condições de extração, indicando que a eficiência das extrações não só depende do grau de substituição de galactose, mas também da sua distribuição ao longo da cadeia principal, tempo e etapas envolvidas na extração(47,48,120,157,158).

O rendimento de galactomanana na semente total de *Mimosa scabrella* (30%), está entre as espécies de elevado teor como a *Gleditsia amorphoides* (20 - 30%),

Ceratonia siliqua (10 - 40%) ambas pertencentes a sub-família *Caesalpinioideae*(31,119) e *Cyamopsis tetragonolobus* (23 a 35%), da sub-família *Faboideae*(48). As duas últimas são as únicas espécies utilizadas para produção de galactomanana em larga escala. Convém ressaltar que nas espécies citadas acima, o rendimento refere-se ao endosperma isolado e no caso da galactomanana de *Mimosa scabrella* corresponde a semente total, o que a coloca como matéria prima em potencial à produção de galactomanana como alternativa nacional.

A metilação da galactomanana de *Mimosa scabrella*, pelos métodos de HAKOMORI(82) e PURDIE(90) originou após hidrólise, redução e acetilação somente três derivados que foram identificados por g.l.c.- m.s. (Tabela VII). A Tabela indica os derivados 2,3-di-O-metil-manose(46,3%) e 2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose(46,2%) que correspondem as unidades de manose unidas por ligações glicosídicas (1→4), com ramificações laterais de unidades de galactose unidas por ligações glicosídicas (1→6), respectivamente. Algumas unidades de manose não estão substituídas, o que pode ser comprovado pela presença do derivado 2,3,6-tri-O-metil-manose(6,5%). Como o derivado 2,3,4-tri-O-metil-galactose não foi detectado, a hipótese da presença de pequena quantidade de substituição da cadeia principal de manana por galactobiose levantada anteriormente (66), fica inconsistente.

4.5. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DA GALACTOMANANA EM SOLUÇÃO

O comportamento reológico da galactomanana de *Mimosa scabrella* em solução como dos biopolímeros em geral é determinado por sua estrutura molecular(79). Esta afirmação, direcionou o estudo da relação entre a estrutura macromolecular e as propriedades físico-químicas em solução deste polissacarídeo.

No estudo do comportamento reológico do polímero de galactomanana de *Mimosa scabrella*, verificou-se inicialmente que este formava soluções viscosas em concentrações relativamente baixas. As medidas de viscosidade relativa das soluções de

TABELA VII - ANÁLISE POR METILAÇÃO PELOS MÉTODOS DE HAKOMORI⁸² E PURDIE⁹⁰ DA GALACTOMANANA DE MIMOSA SCABRELLA NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITOIS PARCIALMENTE METILADOS.

Componente	R _t rel. ^a	M.s(m/z) ^b	Mo1%
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	7,82	59,71,75,87,101,117,129,145,161,173,205	48,2
2,3,6 - Me ₃ - Man	11,88	59,71,87,99,101,113,117,129,142,161,173,209,233	6,5
2,3 - Me ₂ - Man	16,17	58,71,85,101,111,117,127,142,161,187,201,231,261	46,3

a) g.l.c. em coluna Widebore SP 2380

b) g.l.c. ms. em coluna capilar de SP 2380

galactomanana de *Mimosa scabrella* após filtração em membranas (0,2 à 1,2 μm) estão representadas na Tabela VIII. A diminuição de viscosidade verificada após a filtração da solução sugere que o produto apresenta espécies agregadas em sua composição. Este fenômeno é observado na maioria dos polissacarídeos microbianos entre eles a xantana(111,127,128).

TABELA VIII - VISCOSIDADE RELATIVA DA SOLUÇÃO DE GALACTOMANANA DE *MIMOSA SCABRELLA*

Velocidade de Cisalhamento (s^{-1})	Viscosidade Relativa ^a				
	sem filtrar	Filtradas por membranas de			
		1,20 μm	0,80 μm	0,45 μm	0,20 μm
0,28	1,44	1,39	1,39	1,38	1,32
0,51	1,43	1,39	1,39	1,38	1,32
0,94	1,43	1,39	1,39	1,38	1,32
1,75	1,43	1,39	1,39	1,37	1,32
3,23	1,44	1,39	1,39	1,37	1,32

a. Solução aquosa de galactomanana de *Mimosa scabrella* a $0,45 \cdot 10^{-3}$ g/ml.

A viscosidade intrínseca, $[\eta]$, da galactomanana de *Mimosa scabrella* a 25° foi de 900 ml/g e o valor da constante de HUGGINS, k' , foi de 0,47. Esta determinação foi efetuada a partir de soluções diluídas ($0,09 \cdot 10^{-3}$ a $1,8 \cdot 10^{-3}$ g/ml) onde as cadeias macromoleculares que compõe a galactomanana podem ser consideradas independentes umas das outras e encontram-se em regime Newtoniano, evitando assim a formação de agregados que poderiam interferir na dimensão da cadeia molecular e consequentemente nos valores da viscosidade intrínseca.

Geralmente a determinação de $[\eta]$ e k' é realizada através de viscosímetros capilares, mas no caso da galactomanana de *Mimosa scabrella* não foi possível devido a orientação aleatória das macromoléculas em solução (entanglements) que conduziu a resultados poucos precisos, provavelmente devido a existência dos efeitos da velocidade

de cisalhamento na faixa de massa molecular.

O valor de viscosidade intrínseca obtida é comparável com os de algumas galactomananas de outras espécies como *Cyamopsis tetragonolobus* (880 ml/g ; man:gal 1,5:1,0) , *Caesalpinia spinosa* (1120 ml/g ; man :gal 2,6:1,0) , *Ceratonia siliqua* (990 ml/g; man:gal 3,0:1,0) e *Caesalpinia pulcherina* (1110 ml/g ; man:gal 3,2:1,0).

Segundo DEA et alii(47) e McCLEARY(118) o conteúdo de galactose presente no polímero não infere nos valores da viscosidade intrínseca, pois não está relacionada com as dimensões da cadeia polimérica.

Após determinada a $[\eta]$ pela aplicação do método de caracterização do biopolímero relacionando a propriedade hidrodinâmica da macromolécula em solução, partiu-se para a análise do comportamento de fluxo.

Soluções aquosas de materiais de baixo peso molecular, óleos e xaropes seguem a Lei de NEWTON (apresentada na página 30), onde as viscosidades não variam com a velocidade de cisalhamento. Em contraste as viscosidades das soluções polissacarídicas geralmente variam com a velocidade de cisalhamento(104,195).

Para verificar o comportamento de fluxo da solução de galactomanana de *Mimosa scabrella*, foram determinadas as curvas de fluxo e sua dependência com a velocidade de cisalhamento em uma larga faixa de concentração (0,09 g/l à 50 g/l), como demonstrado na Figura 21.

Os valores mostrados na curva foram obtidos através da utilização dos dois viscosímetros rotacionais com abrangência da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) de 10^{-2} à 2000 s^{-1} . Para concentrações do polissacarídeo inferiores a 3,6 g/l não foi observada dependência da viscosidade em relação a velocidade de cisalhamento em toda a faixa de $\dot{\gamma}$, sugerindo um comportamento Newtoniano para soluções diluídas de galactomanana de *Mimosa scabrella*. Em concentrações elevadas (acima de 3,6 g/l) o comportamento das soluções de galactomanana tornam-se dependentes da velocidade de cisalhamento (shear thinning), caracterizado pela diminuição da viscosidade a partir do gradiente crítico ($\dot{\gamma}_c$), definido previamente (página 34).

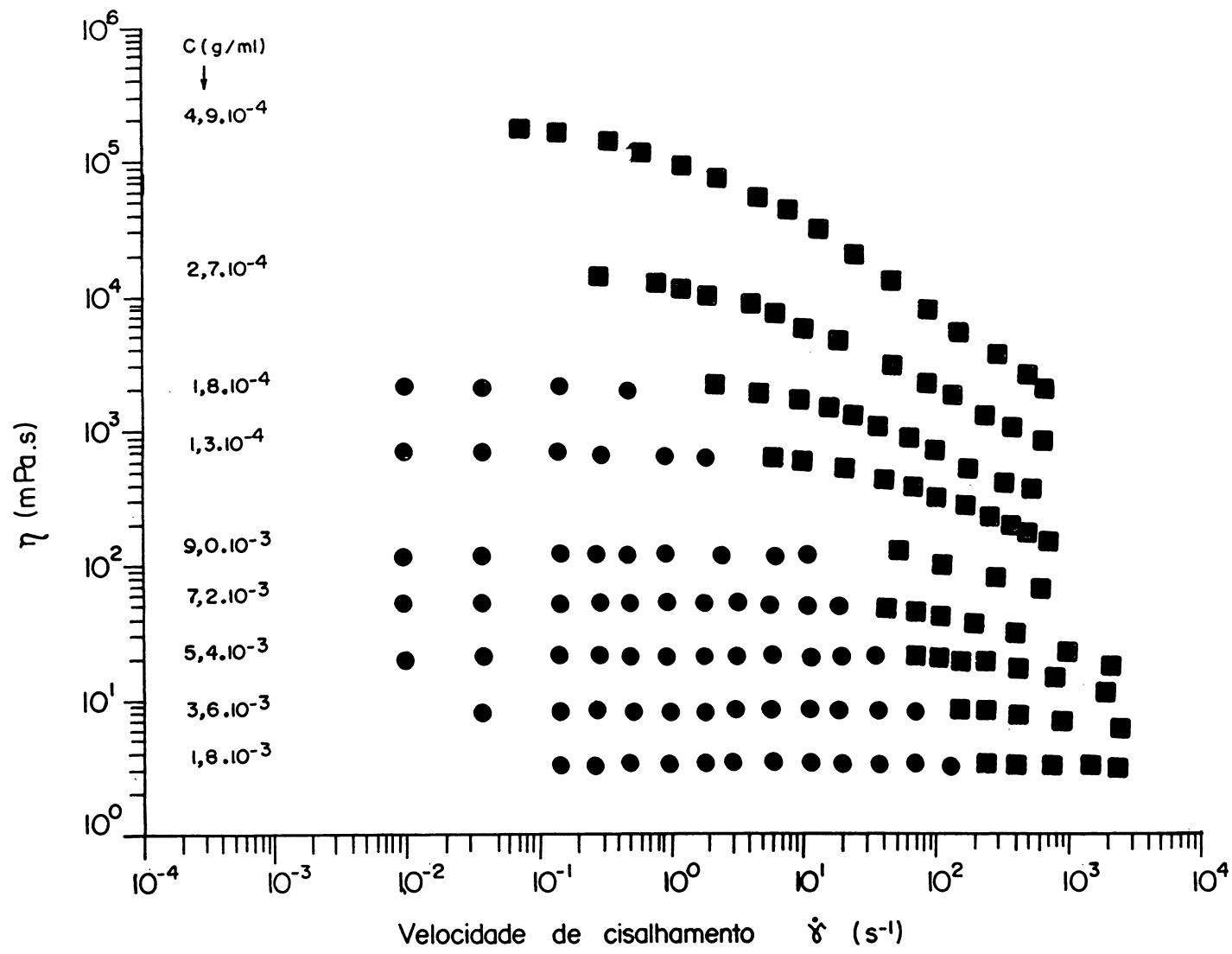


Figura 21: - Viscosidade (η) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para solução aquosa de galactomanana de *Mimosa scabrella* a diferentes concentrações (g/ml).
 ● Low Shear 30 ■ Carri med

A medida que a concentração aumenta observa-se um decréscimo no valor do gradiente crítico. Este decréscimo está de acordo com estudos desenvolvidos por KULLICKE e KNIEWSKE(106) , MILAS et alii(128) e MILAS e RINAUDO(126) onde sugerem que este fenômeno ocorre provavelmente pelo processo de alinhamento das cadeias poliméricas na direção do fluxo, diminuindo a resistência ao escoamento para as soluções de poliestireno e xantana, respectivamente.

Além disso a modificação na forma das moléculas, bem como o rompimento das interações intermoleculares causadas durante a aplicação da velocidade de cisalhamento podem ser outros fatores responsáveis pela formação do comportamento pseudoplástico.

A viscosidade específica, η_{sp} varia com a concentração do polímero como observado nas curvas de fluxo (Figura 21), expressas através da Equação 2 (página 39). Diferentes tipos de representação foram propostas para descrever a Equação 2, a mais usual é a relação da viscosidade específica, em função do parâmetro de abrangência c $[\eta]$, na forma logarítmica, como mostra a Figura 22 a. A Figura 22 b relaciona viscosidade específica em função da equação de HUGGINS modificada, $[\eta]c + k'(c[\eta])^2$,.

Esta última possui uma faixa linear de inclinação 1 que fornece por extrapolação à curva a, a concentração crítica $c^* [\eta]$ de aproximadamente 2,6. Este ponto é atribuído a transição entre o regime diluído e o regime semi-diluído de acordo com o diagrama de concentração proposto por GRAESSLEY(76,78), onde as moléculas que compõem a solução de galactomanana iniciam o entrelaçamento polimérico como mostrado na Figura 7.

A mesma representação para todo o domínio de concentração, foi determinada para xantana(127), welana(25), gelana(180), succinoglicana(164), escleroglucana(164), conduzindo a uma concentração crítica de $c^* [\eta] \sim 1$.

A concentração crítica de algumas soluções de galactomananas citadas na literatura(29,59,124,133) foram determinadas a partir da intersecção entre as duas partes lineares da curva $\log \eta_{sp}$ em função de $\log c[\eta]$. Através desta representação obtém-se uma única curva para a maioria dos hidrocoloides na forma randômica e os valores da concentração crítica, compreendem uma faixa entre 2,5 à 4(108,133), sendo que a

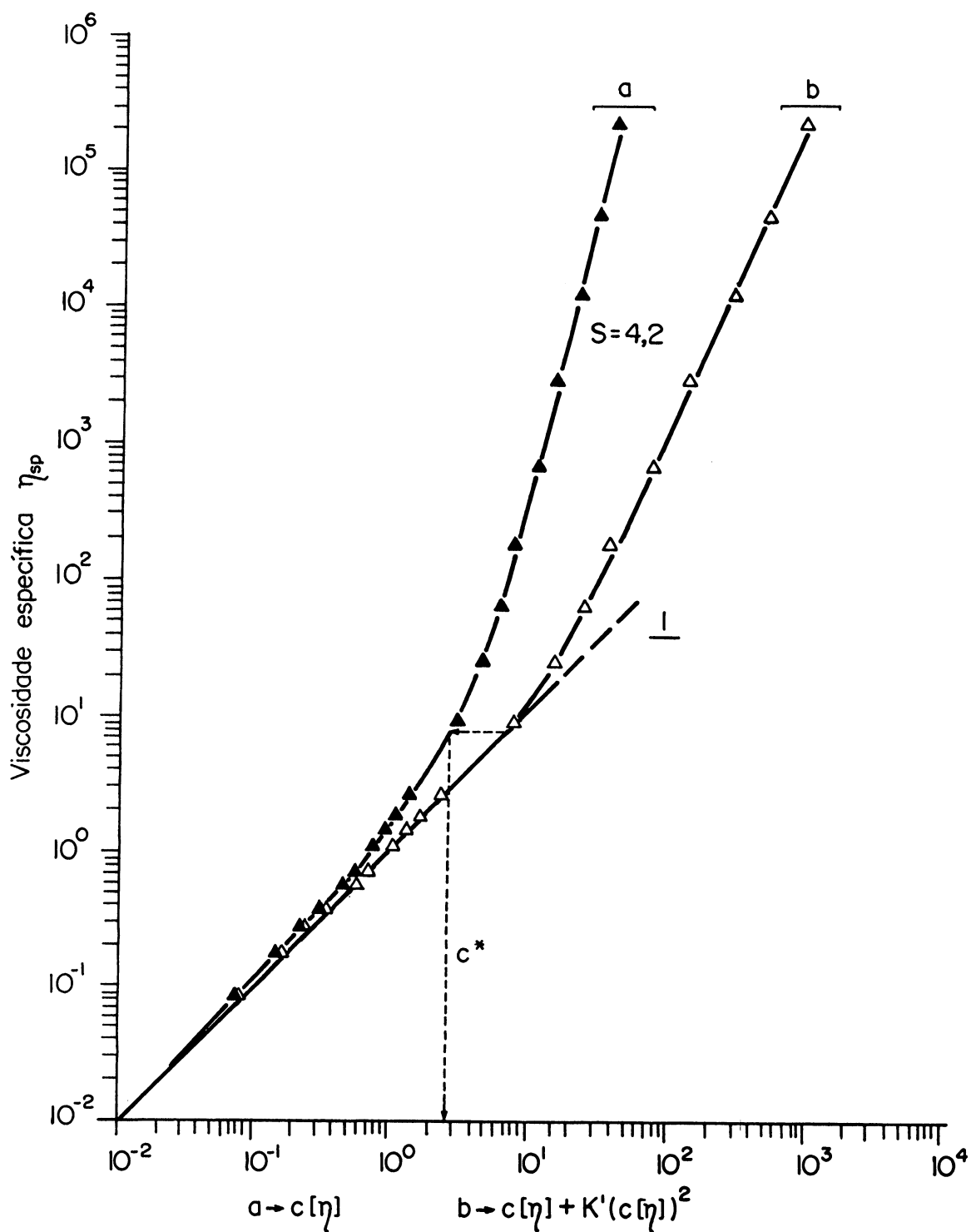


Figura 22 - Viscosidade específica em função do parâmetro de abrangência, (a), $c[\eta]$, (b), $c[\eta] + K'(c[\eta])^2$, para soluções aquosas de galactomanana de *Mimosa scabrella*

determinação de $c^*[\eta]$ proposta para a galactomanana de *Mimosa scabrella* está de acordo com estes resultados.

Os valores de $c^*[\eta]$ dos polímeros de dextranas, carragenanas e galactomananas(133) são significativamente superiores aos polissacarídeos microbianos com a xantana, welana, gelana e succinoglicana. Este fenômeno pode ser atribuído a maior rigidez apresentada pelos polissacarídeos microbianos que possuem comprimento de persistência(198) (q = comprimento de contorno da cadeia polimérica que persiste em uma dada direção) superior a 30 nm, enquanto que as galactomananas apresentam valores inferiores a 10nm conforme descrito por ROBINSON et alii(165).

O mesmo valor foi recentemente encontrado para polímeros flexíveis como poliestireno e poliestireno sulfonado(68), o que indica a possibilidade de uma cadeia polimérica flexível para galactomanana de *Mimosa scabrella*.

No entanto MORRIS et alii(133) em estudos da propriedade de fluxo de galactomanana atribuiu estes resultados a formação de interações específicas.

Observou-se que para valores de c $[\eta]$ maiores que 7 (Figura 21a) a dependência logarítmica da viscosidade específica em função de c $[\eta]$ tornava-se linear com uma inclinação, S , de 4,2.

Este resultado é compatível com os observados para soluções de xantana(42,195), mas foi superior ao observado para algumas soluções polissacarídicas(58,133) que apresentaram valores de 3,3. A diferença pode ser atribuída a formação de emaranhados físicos.

A formação do segmento linear, S , (Figura 22 a) é característico do regime concentrado, onde a dimensão das cadeias entram em processo de diminuição até atingir uma conformação não perturbada pelo efeito do volume excluído. Na condição θ a dimensão da cadeia tornam-se independentes da concentração em polímero.

Baseado nos resultados experimentais (Figura 22 a) e de acordo, com o desenvolvimento limite estabelecido para soluções poliméricas (Equação 2, página 39) que compreende: as interações com as moléculas de solvente, as interações intramoleculares, as associações intermoleculares e os emaranhados poliméricos, foi possível obter a

seguinte relação:

$$\eta_{sp} \xrightarrow{\dot{\gamma} \rightarrow 0} \sim (c \cdot [\eta])^{4,2} \quad \rightarrow \text{Equação 19}$$

A relação estabelecida acima é proporcional a lei das forças presentes. Partindo-se do parâmetro de MARK-HOUWINK, $a = 0,723$ determinado por ROBINSON et alii(165) para galactomanana, foi possível desenvolver a relação abaixo:

$$\eta_{sp} \xrightarrow{\dot{\gamma} \rightarrow 0} \sim c^4 M^{3,05} \quad \rightarrow \text{Equação 20}$$

Estes resultados estão de acordo com os valores assumidos para soluções poliméricas concentradas(106).

$$\eta \xrightarrow{\dot{\gamma} \rightarrow 0} \sim c^4 M^{3,5} \quad \rightarrow \text{Equação 21}$$

A mesma concordância em relação à soluções concentradas de galactomanana de *Mimosa scabrella* obtida com resultados experimentais foi verificada para os modelos teóricos desenvolvidos por de GENNES(49,50) para polímeros lineares, relacionando a viscosidade ao comportamento viscoelástico:

$$\eta \sim M^3 c^4 \quad \rightarrow \text{Equação 22}$$

A literatura(49,208) sugere que estes valores são decorrentes da formação de emaranhados puros (entanglements) na ausência de interação hidrodinâmicas (polímero-solvente) e em condições θ (página 38).

Ao comparar os valores de viscosidade específica obtidos para outras galactomananas em concentrações poliméricas de $c [\eta]$ acima de 7, verificou-se que a galactomanana de *Mimosa scabrella* possui η_{sp} mais baixa conforme demonstrado na Tabela IX. Esta característica é original para a galactomanana em estudo e pode ser atribuído ao alto grau de substituição por galactose, que impede a formação de interações intermoleculares, justificando uma menor viscosidade.

TABELA IX - PARÂMETROS VISCOSIMÉTRICOS PARA GALACTOMANANAS E POLISSACARÍDEOS

Parâmetros	<i>Ceratonia</i> ⁵⁸ <i>siliqua</i>	<i>Cyamopsis</i> ⁵⁸ <i>tetragonolobus</i>	<i>Ceratonia</i> ¹³³ <i>siliqua</i>	Polissacarídeos ¹³³	<i>Cyamopsis</i> ¹⁶⁵ <i>tetragonolobus</i>	<i>Mimosa</i> <i>scabrella</i>
η_{sp}	6300	2200	2000	250	600	300
S	6,65	4,50	4,30	3,30	5,10	4,20
n	-0,73	-0,70	-0,72	-0,72	-0,79	-0,65
Man/gal	4,00	2,00	3,85	-	1,56	1,10

η_{sp} : viscosidade específica para o parâmetro de abrangência, $c [\eta] = 10$;

S : inclinação da variação logarítmica da η_{sp} ; em relação a $c [\eta]=7$;

n : inclinação limite da variação logarítmica da viscosidade em relação a velocidade de cisalhamento no domínio viscoelástico;

man/gal: relação manose galactose.

Foram realizadas medidas de dinâmica em soluções concentradas (1,8 a 50 g/l) de galactomanana de *Mimosa scabrella* com a finalidade de avaliar mais profundamente o domínio pseudoplástico ou viscoelástico e sobretudo obter as condições que determinam o comportamento elástico (sólido) ou líquido que caracterizam a presença ou ausência de interações intermoleculares. Observou-se que o comportamento viscoelástico não é significativamente alterado com o aumento de concentração.

Em estudos do comportamento viscoelástico de soluções de galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus* (man/gal 1,56), ROBINSON et alii(165) posteriormente RICHARDSON et alii(163) verificaram que este polímero apresentava caráter líquido a baixas frequências ($G'' > G'$) e predominantemente sólido a altas frequências. Este comportamento indica um polímero de emaranhados ao acaso (random coil) e formação de uma rede emaranhada (entanglement) para soluções em concentrações acima do regime semi-diluído.

Uma comparação entre o módulo de cisalhamento dinâmico (G') e o módulo de perda (G'') da galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus*, obtidos nos trabalhos acima citados, e a galactomanana de *Mimosa scabrella* estão demonstrados na Figura 23.

Como a galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus* a altas frequências possui caráter sólido e sua viscosidade intrínseca é semelhante a da galactomanana de *Mimosa scabrella* (880 ml/g e 900 ml/g, respectivamente), os resultados obtidos na Figura 23 confirmam o caráter líquido da última mesmo em regime semi-diluído.

Acima do ponto de velocidade de cisalhamento crítico, $\dot{\gamma}_r$, e concentração polimérica crítica, c^* , (Figura 21 e 22), a galactomanana de *Mimosa scabrella* apresenta um comportamento viscoelástico. Nestas condições a viscosidade é dependente da Lei da Força que é dada por:

$$\eta \sim [\dot{\gamma}]^n \quad \rightarrow \text{Equação 23}$$

sendo a inclinação n função da concentração polimérica, como observado nas curvas de fluxo.

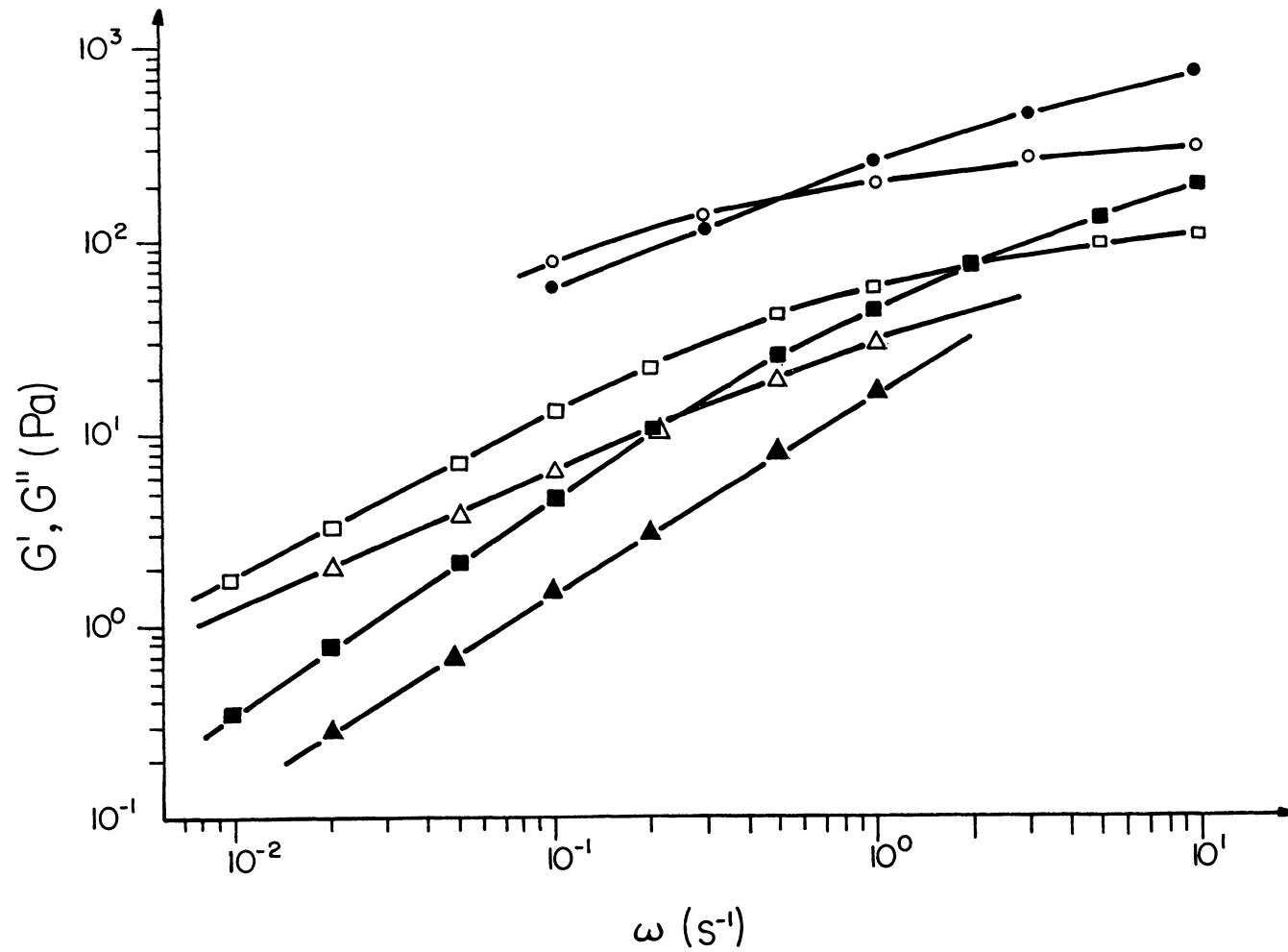


Figura 23 - Módulo de cisalhamento dinâmico G' (\blacktriangle) e módulo de perda G'' (\triangle), a 25 $^{\circ}$, em relação a frequência (ω) para solução aquosa de galactomanana de *Mimosa scabrella*. Comparação com solução aquosa de galactomanana de *Cyamopsis tetragonoloba*, de acordo com ROBINSON et alii (\bullet, \circ) e RICHARDSON e ROSS-MURPHY (\blacksquare, \square)

Experimentalmente a variação da inclinação \underline{n} (Figura 24) obtida para diferentes concentrações de galactomanana foi relacionada em função de $c[\eta]$ ficando caracterizado mais uma vez o fenômeno de pseudoplasticidade. Na Figura 24 foram incluídos os valores obtidos por SHARMAN et alii(179) para galactomananas de *Lotus pedunculatus* (man/gal 1,1); *Glycine max* (man/gal 1,4); *Medicago sativa* (man/gal 1,13); *Trifolium pratense*(man/gal 1,15), *Sophora japonica* (man/gal 5,12), *Cyamopsis tetragonolobus* (man/gal 1,75) e *Ceratonía siliqua*(man/gal 3,85). O aumento de n observado na Figura 24 a baixos valores de $c[\eta]$ é geralmente atribuído a diminuição das interações hidrodinâmicas quando a concentração polimérica aumenta. Este fenômeno torna-se mais sensível dentro do regime semi-diluído.

Para altas concentrações de galactomanana de *Mimosa scabrella* \underline{n} tende a um valor limite de aproximadamente 0,65, estando de acordo com os valores reportados por SHARMAN et alii(179) e GANTER et alii(68) para galactomananas e poliestireno sulfonato de sódio, respectivamente, à valores de $c[\eta]$ abaixo de 30.

No entanto este resultado é inferior ao obtido por outros autores para galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus* e *Ceratonía siliqua* conforme descrito na Tabela IX e para xantana(127).

GRAESSLEY(78) descreve que a polidispersão e flexibilidade da cadeia afetam os valores de \underline{n} , tendendo a diminuir seu limite. As interações específicas tem efeito contrário, isto é elevam os valores limite de \underline{n} . Logo estes resultados podem caracterizar as soluções de galactomanana de *Mimosa scabrella*, como uma amostra polidispersa com ausência de interações específicas (hiperentanglements). O resultado difere das proposições de MORRIS et alii(133) em estudos de propriedades de fluxo de galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus* e *Ceratônica siliqua*, que são polímeros menos substituídos que a galactomanana de *Mimosa scabrella*.

Segundo RICHARDSON et alii(163) estas diferenças encontradas por MORRIS et alii(133) são dependentes da purificação e preparação das soluções.

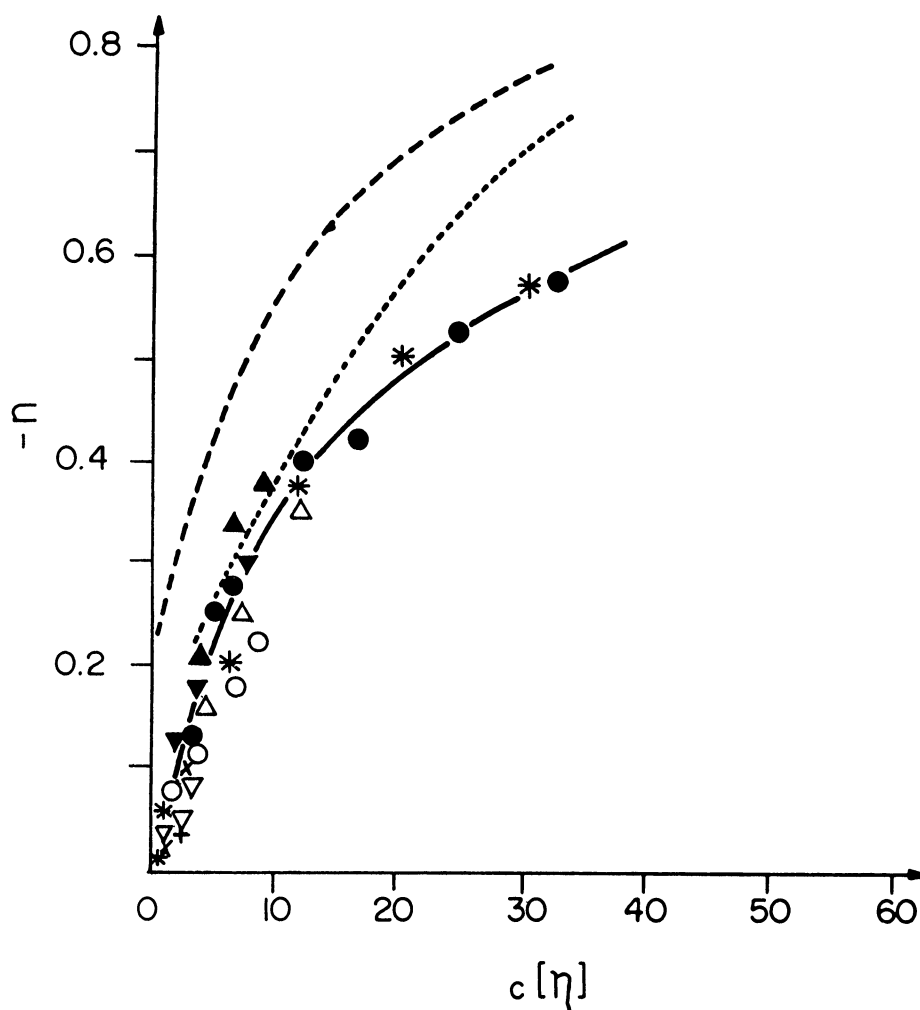


Figura 24 - Expoente $-n$ no regime não-Newtoniano em função da concentração polimérica expresso como parâmetro de abrangência para solução aquosa de galactomana de *Mimosa scabrella* (●). Comparação com galactomananas de *Lotus pedunculatus* I (x), *Glycine max* (+), *Medicago sativa* (o), *Trifolium pratense* (▼), *Lotus pedunculatus* II (▽), *Sophora japonica* (▲), *Cyamopsis tetragonolobus* (*), *Ceratonia siliqua* (Δ), poliestireno (...) e xantana (---).

5. CONCLUSÕES

1. Os oligossacarídeos de sementes de *Mimosa scabrella* foram obtidos por três métodos de extração, A, B e C com rendimentos de 7%, 4% e 11%, respectivamente.
2. A extração aquosa direta (método C) apresentou uma distribuição relativa diferenciada com relação aos outros dois métodos (A e B), provavelmente pela ação de enzimas que atuaram durante o processo de extração em água a 4°.
3. Para análise quantitativa e qualitativa dos componentes de baixo peso molecular de sementes de *Mimosa scabrella* foi escolhido o método B, com metanol-água, por se tratar de uma amostra representativa.
4. Os componentes de baixo peso molecular foram fracionados em coluna de Bio-Gel P2, purificados por HPLC em colunas CHO-682, C-18 e Phenomenex e caracterizados por FAB-m.s., ¹³C-n.m.r. e g.l.c.- m.s. como ajugose (0,1%), verbascose (0,8%), estaquiose (0,9%), rafinose (0,7%), sacarose (5,8%), mio-inositol (0,3%), pinitol (0,8%), alditois (0,4%), glucose (0,6%), galactose (0,3%) e frutose (0,3%).
5. A fração dp 4, que contém estaquiose, foi repurificada em colunas Phenomenex e CHO-682, indicando possuir mais um componente, que foi pela primeira vez caracterizado na literatura como trigalactosil pinitol, O- α -D-galactopiranosil-(\rightarrow 6)-O- α -D-galactopiranosil-(\rightarrow 6)-O- α -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-3-O-metil-chiro-inositol.
6. O resíduo de extração dos oligossacarídeos pelo método A, com H₂O à 4° forneceu uma galactomanana com rendimento de ~ 30% em relação ao peso total das sementes.

7. A estrutura fina da galactomanana foi confirmada pelos métodos de metilação e ^{13}C -n.m.r. como uma cadeia principal de D-manopiranosose $\beta(1\rightarrow4)$ altamente substituída em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosose em proporções de 1,1:1, respectivamente.
8. A viscosidade intrínseca da galactomanana de *Mimosa scabrella* a 25° é $[\eta] \sim 900$ ml/g e o valor da constante de HUGGINS, $k' = 0,47$.
9. Os resultados obtidos a partir da curva matriz demonstraram que a galactomanana de *Mimosa scabrella* em solução está na forma de emaranhados ao acaso (random coil).
10. A transição entre o regime diluído e semi-diluído para soluções de galactomanana de *Mimosa scabrella* é em $c*[\eta] \sim 2,6$, similar aos polímeros flexíveis como poliestireno e poliestireno sulfonato.
11. O biopolímero de sementes de *Mimosa scabrella* apresenta soluções com comportamento que contrasta com outras galactomananas em dois aspectos: comportamento líquido mesmo em regiões semi-diluídas e viscosidade específica em regime viscoelástico menor. Estas diferenças de comportamento da galactomanana de *Mimosa scabrella* são atribuídas a sua estrutura altamente ramificada.
12. O conhecimento das propriedades reológicas da galactomanana ($c*[\eta]$, k' , S , G' , G'' , n) que dependem da sua estrutura, possibilitam sua aplicação racional na melhoria da qualidade de produtos industrializados (alimentos, cosméticos, explosivos, farmacêutica). Assim a abundância dos bracatingais regionais e o interesse de reflorestamento planejado desta espécie, coloca-a como fonte de matéria prima para produção de espessante em grande escala.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANDREWS, P.; HOUGH, L.; JONES, J.K.N. Mannose-containing polysaccharides II. The galactomannan of fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*). J. Am. Chem. Soc., 74 : 2744-2776 , 1952.
- 2 ANGYAL, S.J. & ANDERSON, L. The cyclitols Adv. Carbohydr. Chem., 14 : 135-212, 1959.
- 3 ANGYAL, S.J. & LE FUR, R. The ^{13}C -N.M.R. spectra of alditols. Carbohydr. Res., 84 : 201-209, 1980.
- 4 ANGYAL, S.J. & ODIER, L. The effect of O-methylation on chemical shifts in the ^1H and ^{13}C -N.M.R. spectra of cyclic polyols. Carbohydr. Res., 123 : 23 - 29, 1983
- 5 _____. The ^{13}C -N.M.R. spectra of inositols and cyclohexanepentols: The validity of rules correlating chemical shifts with configuration. Carbohydr. Res., 100 : 43-54, 1982.
- 6 AMAN, P. Carbohydrates in raw and germinated seeds from mung bean and chickpea. J. Sci. Food Agric., 30: 869-875, 1979.
- 7 ARO, A.; UUSITUPA, M.; VOUTILAINEN, E.; HERSIO, K.; KORHONEN, T. ; SIITONEN, O. Improved diabetic control and hypocholesterolaemic effect induced by long-term dietary supplementation with guar gum in type 2 (insulin-independent) diabetes Diabetologia., 21 : 29-33, 1981.
- 8 BAINES, Z.V. & MORRIS, E.R. Flavour/taste perception in thickened systems : the effect of guar gum above and below c^* . Food Hydrocolloids., 1 (3): 197-205, 1987.
- 9 BAIRD, D. G. & BALLMAN, R.L. Comparison of the rheological properties of concentrated solutions of a rod like and a flexible chain polyamide J. Rheol., 23 (4) : 504-524, 1979.
- 10 BARRETO-BERGER, E. & GORIN, P.A.J. The chemistry of polysaccharides of fungi and lichens. In: The Polysaccharides. vol 2, ASPINALL, G.O (Ed). Academic Press, New York, 1983. p. 365-400.

- 11 BEVERIDGE, R.J.; FORD, C. W.; RICHARDS, G.N. Polysaccharides of tropical pasture herbage. VII - Identification of a new pinitol galactoside from seeds *Trifolium subterraneum* (subterranean clover) and analysis of several pasture legume seeds for cyclohexitols and their galactosides. Austr.J. Chem., 30 : 1583 - 1590, 1977.
- 12 BHASKAR, B.; RAMACHANDRA, G.; VIRUPAKSHA, T.K. Alpha-galactosidase of germinating seeds of *Cassia sericea* sw. J. Food Biochem., 14 : 45 - 59, 1990.
- 13 BHATTY, R.S. & CHRISTISON, G.I. Composition and nutritional quality of pea (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L. spp. minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik) meals, protein concentrates and isolates. Qual. Plant Plant Foods Hum. Nutr., 34 : 41-51;1984.
- 14 BIANCHETTI, A. comparação de tratamentos para superar a dormência de sementes de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Boletim de Pesquisa Florestal., 2 : 57 - 66 , 1981.
- 15 _____. Produção e tecnologia de sementes essenciais florestais. Curitiba, EMBRAPA/URPFCS. DOCUMENTOS., 02 , 1981 . 22 p.
- 16 BINDER, R.G. & HADDON, W.F. Cyclitols of soybean leaves. J. Agric. Food. Chem., 32:685-687, 1984.
- 17 BLACK, L.T. & GLOVER, J.D. A simple and rapid HPLC analysis of sugar in soybeans and factors affecting their standardization. J. Amer. Oil Chem. Soc., 57 : 143 - 144, 1980.
- 18 BOCIEK, S.M.; IZZARD, M.J.; MORRISON, A; WELTI, D. The ¹³C-n.m.r. spectra of (1→6) - α -D - galactosyl-(1→4) -β-D-mannans. Carbohydr. Res., 93 : 279-283, 1981.
- 19 BOCK, K. ; PEDERSEN, C.; PEDERSEN, H. Carbon-13 Nuclear resonance data of oligosaccharides. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 42 : 193 - 255, 1984.

- 20 BOCK, K. & THOGERSEN, H. Nuclear magnetic resonance spectroscopy in the study of mono and oligosaccharides. Annu Rep. NMR Spectrosc., 13 : 1-57, 1982.
- 21 BOSSO, C; DEFAYE, J.; HEYRAUD, A.; ULRICH, J. Fast atom bombardment mass spectrometry for the characterization of cello and malto - oligosaccharides. Carbohydr. Res., 125 : 309-317, 1984.
- 22 BRETAS, R.S. A reologia dos polímeros para leigos e iniciados. Plástico moderno., 176: 28-35, 1987.
- 23 BULPIN, P.V.; GIDLEY, M.J.; JEFFCOAT, R.; UNDERWOOD, D.R. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant α -galactosidase. Carbohydr. Polym., 12 : 155 - 168, 1990.
- 24 BURKART, A. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2 . ed. Buenos Aires - Argentina, Acme Agency, 1952.
- 25 CAMPANA, S.; ANDRADE, C.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte and rheological studies on the polysaccharide welan. Int. J. Biol Macromol., 12 : 379-383, 1990.
- 26 CARLSON, W.A.; ZIWGENFUSS E.M.;OVERTON,J.D. Compatibility and manipulation of guar gum. Food Technol., 16 (10): 50-54, 1962.
- 27 CARPANEZZI, A. Manual técnico da bracinga (*Mimosa scabrella* Benth). Curitiba. EMBRAPA CNPF. Documentos., 20. 1988. 70 p.
- 28 CARVALHO, E.R. Bracinga: Lenha cria mercado a semente. Gazeta do Povo, Curitiba, 26 maio. 1991. 1º cad., p. 10.
- 29 CASTELAIN, C.; DOUBLIER, J.L.; LE FEBVRE, J. A Study of the viscosity of cellulose derivatives in aqueous solutions. Carbohydr. Polymer., 7, 1 - 16, 1987.
- 30 CASTILLO, E.M.; LUMEN, B.O.; REYES, P.S.; LUMEN, H.Z. Raffinose synthase and galactinol synhase in developing seeds and leaves of legumes J. Agric. Food Chem., 38 : 351-355, 1990.
- 31 CERESO, A.S. The constitution of a galactomannan from the seed of *Gleditsia amorphoides* J. Org. chem., 30 : 924-927, 1965.

- 32 CERNING - BEROARD, J. & FILIATRE, A. A comparison of the carbohydrate composition of legume seeds : horsebeans, peas and lupines. Cereal Chem., 53 : 968-978, 1976.
- 33 CERNING, J. ; SAPOSNICK, A.; GUILBOT, A. Carbohydrate composition of horse beans (*Vicia faba*) of different origins. Cereal Chem., 52 : 125-138, 1975.
- 34 CHAMPETIER, G & MONNERIE, L. Introduction a la chimie macromoléculaire. Paris, Masson et cie Editeurs, 1969, p. 313-350.
- 35 CHANG, K.C.; CHANG, D.C.; PHATAK,L. Effect of germination on oligosaccharides and nonstarch polysaccharides in navy and pinto beans. J.Food Sci., 54 (6):1615-1619, 1989.
- 36 CHATTERTON,N. J.; HARRISON,P.A.; THORNLEY,W.R.; BENNETT, J.H. Sucrosyloligosaccharides and cool temperature growth in 14 forb species. Plant Physiol. Biochem., 28: 167-172, 1990.
- 37 CORRÊA, J.B. C; GOMES, S.L.; GEBARA, M. Structural feactures of the stem of *Mimosa bracinga*. Carbohydr. Res., 60 : 337-343, 1978.
- 38 CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F; ODEBRECHT, S.; OLIVEIRA, M.L. The distribution of O-acetyl-groups in partially acetylated xylan. An. Acad.brasil. Ciênc., 51 (13): 429 - 433, 1979.
- 39 CORRÊA, J.B.C.; ROMANOWSKI, S.M.M.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D; GORIN, P.A.J.; REICHER, F. Ester-type lignin-xylan linkages in the cell wall of stem of *Mimosa scabrella*. An. Acad. brasil. Ciênc., 59 (3) : 179-184, 1987.
- 40 COURTOIS, J.E; ANAGNOSTOPOULOS, C. ; PETEK, F. Recherches sur les galactomannanes. I - Isolement d une galactomannane de la Luzerne et hidrolyse partielle par le galactosidase du café. Bull. Soc. Chim. Biol., 40 (9-10) : 1277 - 1285, 1958.
- 41 COX, W.P. & MERZ, E.H. Correlation of dynamic and steady flow viscosities J. Polym. Sci, 28 : 619 , 1958.

- 42 CUVELIER, G. & LAUNAY, B. Concentration regimes in xanthan gum solutions deduced from flow and viscoelastic properties. Carbohyr. Polymers., 6 : 321 - 333, 1986.
- 43 DALE, E.M. & HOUSLEY, T.L. Sucrose synthase activity in developing wheat endosperms differing in maximum weight. Plant Physiol., 82 : 7 - 10 , 1986.
- 44 DAVIS, L.C. & NORDIN, P. Sugar and organic acid constituents in white clover. Plant Physiol., 72 : 1051-1053, 1983.
- 45 DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOT, W.H.; JONES, K.M. Data for Biochemical Research, 2^oed. Oxford, Clarendon Press. 1969. p. 541-542
- 46 DEA, I.C.M. The role of structural modification in controlling polysaccharide functionality. In: Industrial Polysaccharides : Genetic Engineering, Structure/Properties, Relations and Applications. _____. (Ed). Elsevier, Amsterdam, 1987. p. 207-216.
- 47 DEA, I.C.M.; CLARK, A.H., McCLEARY, B.V. Effect of the molecular fine structure of galactomannans on their interaction properties - the role of unsubstituted sides. Food Hydrocolloids, 1 (2) : 129-140, 1986.
- 48 DEA, I.C.M. & MORRISON, A. Chemistry and interaction of seed galactomannans. Adv. Carbohydr. Chem Biochem., 31 : 241-312, 1975.
- 49 DeGENNES, P.G. Dynamics of entangled polymer solutions I. The Rouse model. Macromolecules., 9(4) : 587 - 593, 1976.
- 50 _____. Dynamics of entangled polymer solutions. II. Inclusion of hydrodynamic interactions Macromolecules, 9 (4) : 594 - 598.
- 51 DELL, A. F.A.B. - Mass spectrometry of carbohydrates. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 45 : 19 - 72, 1987
- 52 DEY, P.M. D-Galactose containing oligosaccharides. In: Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants. DEY, P.M & DIXON, R. A. (Ed), Academic, New york. 1985 p. 53-130.

- 53 DIETRICH, S.M.C.; RIBEIRO, R.C.L.F.; CHU, E.P.; BUCKERIDGE, M.S. O açúcar das plantas. Ciência Hoje, 7 (39): 42 - 48, 1988.
- 54 DINI, A.; SIMONE F.; RAMUNDO E.; SENATORE, F. Oligosaccharides in five different *Vicia Faba* L. cultivars. Biochem. Systematics Ecol., 17:559-561,1989.
- 55 DITTRICH, P. & BRANDL, A. Revision of the pathway of D-pinitol formation in Leguminosae. Phytochemistry, 26:1925-1926, 1987
- 56 DOGRA,R.; HILL, M.A.; STRANGE, R. The acceptability of three cake types incorporating varying levels of guar gum. Food Hydrocolloids, 3 (1) : 1 - 6, 1989.
- 57 DOROSO, N.; ODEBRECHT, S.; CORRÊA, J.B.C. Some aspects of the chemical structure of the hemicellulose from the stem of *Mimosa bracinga*. Arq. Biol. Tecnol., 23 : 257-263, 1980.
- 58 DOUBLIER, J. L. & LAUNAY, B. Propriétés rhéologiques des solutions aqueuses de galactomannanes: rôle de la masse moléculaire moyenne et de la concentration. Cahier du Groupe Français de Rhéologie., 4 : 191 - 198, 1977.
- 59 _____. Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. Journal of Texture Studies., 12 : 151 - 172, 1981.
- 60 DREVAL, V.E; MALKIN, Y. Y ; BOTVINNIK, G.O. Approach to generalization of concentration dependence of zero-shear viscosity in polymer solutions. J.Polymer Sci. , 11 : 1055-1076, 1973.
- 61 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH,F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28 : 350 - 356, 1956.
- 62 FRENCH, D. The raffinose family of oligosaccharides Adv. Carbohydr. Chem., 9 : 149 - 184, 1954.
- 63 FRENCH, S. & HILL,M.A. High fibre foods: A comparison of some baked products containing guar and pectin. J. Plant Foods., 6 : 101-109, 1985.
- 64 FERRY, J.D. Illustration of viscoelastic behavior of polymeric systems. In: Viscoelastic properties of polymers. John Wiley & Sons, Inc. New York, 3^o Ed. 1980. p. 33-55.

- 65 FLORY, P.J. Principles of polymer chemistry. New York, Cornell University Press, 1953.
- 66 GANTER, J.L.M.S. Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga). Curitiba. 1988. 135p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
- 67 GANTER, J.L.M.S.; CORRÊA, J.B.C.; SIERAKOWSKI, M.R.; REICHER, F. Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella* (bracatinga). Structure and properties. Proceedings Brazil-France - VI - Polymer Seminar, vol. A, IMA, UFRJ (Ed), Rio de Janeiro, 169-179, 1988
- 68 GANTER, J.L.M.S.; MILAS, M.; RINAUDO, M. On the viscosity of Na-polystyrene sulfonate, a flexible polyelectrolyte. Polymers. In press.
- 69 GELMAN, R.A & BARTH, H.G. Viscosity studies of hydrophobically modified (hydroxyethyl) cellulose. In: Water soluble Polymers. ACS - Advances in Chemistry Series, 213. Glass, J.E. (Ed). American Chemical Society, Washington, DC, 1986. p. 101 - 110.
- 70 GONDA, R.; TOMODA, M., KANARI, M.; YONEDA, N., SHIMIZU, T.; SHIGESHIRO, K.; YAZAWA, T. Constituents of the seed of *Malva verticillata*. III - Characterization of the major pectic pectidoglycan and oligosaccharides. Chem. Pharm. Bull, 36 (8):2790-2795, 1988.
- 71 GOODWIN, T.W. & MERCER, E.I. Carbohydrate Biosynthesis In: Introduction to Plant Biochemistry. Pergamon Press, Oxford, 2^a ed. 1983. p. 249-253.
- 72 GORIN, P.A.J. & IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. Carbohydr. Res., 128(1):119-132, 1984.
- 73 _____. Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having Ascomycetous mycosymbionts. Carbohydr. Res., 142:253-267, 1985.
- 74 GORIN, P.A.J. & MAZUREK, M. Assignment of carbon-13 signals in nuclear magnetic resonance spectra of D-galactopyrano-D-mannopyranans from yeasts. Carbohydr. Res., 105:283-287, 1982.
- 75 GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Structural chemistry of fungal polysaccharides. Adv. Carbohydr. Chem., 23: 367-417, 1968.

- 76 GRAESSLEY, W.W. Polymer chain dimension and the dependence of viscoelastic properties on concentration, molecular weight and solvent power. Polymer., 21 : 258 - 262, 1980.
- 77 _____. Viscoelasticity and flow in polymer melts and concentrated solutions. In: Physical properties of polymers. American Chemical Society, Washington, 1984. Cap 3, p. 97 - 153.
- 78 _____. The entanglement concept in polymer rheology. Adv. Polym.Sci., 16: 38 - 53, 1974.
- 79 GRAVANIS, G. Relation entre la structure molecular et les proprietes en solution d'un polysaccharide hydrosoluble. Grenoble, 1985, 173 p. Tese, Doutorado, Universite Scientifique et Medicale de Grenoble.
- 80 GRAVANIS, G; MILAS, M; RINAUDO, M; TINLAND, B. Comparative behaviour of the bacterial polysaccharides xanthan and succinoglycan. Carbohydr. Res., 160 : 259-265, 1987.
- 81 HANDLEY, L.W.; PHARR, D.M.; McFeeters, R.F. Relationship between galactinol synthase activity and sugar composition of leaves and seeds of several crop species. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 108 : 600-605, 1983.
- 82 HAKOMORI, S. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbonion in dimethyl sulphoxide. J. Biochem., 55 : 205-207, 1964.
- 83 HAWORTH, W.N. A new method of preparing alkylated sugars. J.Chem.Soc., 107 : 8 - 16, 1915.
- 84 HEGARTY, M.P.; SHINCKEL, P.G.; COURT, R.D. Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* Benth and to its toxic principle mimosine. Aust. J. Agric. Res., 15 : 153 - 167, 1964.
- 85 HERMAN, E.M. & SHANNON, L.M. Accumulation and sub-cellular localization of α -galactosidase - hemoglutinin in developing soybean cotyledons. Plant Physiol., 77 : 886 - 890, 1985.

- 86 HEYRAUD, A. Chromatographies liquides appliquées à l'hydrolyse des oligosaccharides par les polyacides. Grenoble - France, 1981. 185p. These. Doutorat, Université Scientifique et Medicale de Grenoble.
- 87 HEYRAUD, A. & RINAUDO, M. Carbohydrate analysis by high pressure liquid chromatography using water as the eluent. J. Liq. Chromatog., 3(5): 721-739, 1980.
- 88 HEYRAUD, A. & RINAUDO, M. Gel permeation chromatography of glucose oligomers on polyacrylamide gels. J. Chromatogr., 166 : 149 - 158, 1978.
- 89 HEYRAUD, A.; RINAUDO, M.; TARAVEL, F. Isolation and characterization of oligosaccharides containing D-fructose from juices of the Jerusalem artichoke, Kinetic constants for acid hydrolysis. Carbohydr. Re., 128 : 311-320, 1984.
- 90 HIRST, E.L. & PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. Methods Carbohydr. Chem., 5 : 287-296, 1965.
- 91 HORVEY, K.F. & WICKSTROM, A. The structure of galactomannan from white clover seeds (*Trifolium repens* L.). Acta Chem. Scand., 18 (3) : 833-834, 1964.
- 92 INOUE, M.T.; RODERJAN, C.V.; KUNIYOSHI, Y.S. Projeto Madeira do Paraná. Curitiba, Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1984. p. 38 -44.
- 93 INTERACTION. CHO - 682 Carbohydrate Column California-USA, 1986. 10 p. Instruction manual.
- 94 JENKINS, D.J.A.; LEEDS, A.R.; SLAVIN, B. MANN,J.; JEPSON, E.M. Dietary fiber and blood lipids: reduction of serum cholesterol in type II hyperlipidemia by guar gum Am. J. Clin. Nutr., 32 : 16 - 18, 1979.
- 95 JENKINS, D.J.A.; LEEDS, A.R.; GASSALL, M.A.; COCHET, B.; ALBERTI, K.G.M.M. Decrease in postprandial insulin and glucose concentrations by guar and pectin. Ann. Intern. Med., 86 : 20 -23, 1977.
- 96 JOOD,S.; MEHTA, U.; SINGH, R. Effect of processing on available carbohydrates in legumes. J. Agric. Food Chem., 34: 417-420, 1986.
- 97 KELLER,F. Biochemistry and physiology of non-fructan sucrosyl oligosaccharides and sugar alcohols in higher plants. J. Plant Physiol., 134: 141-147, 1989.

- 98 KELLER, F. & MATILE, P.H. The role of the vacuole in storage and mobilization of stachyose in tuber of *Stachys sieboldii*. J. Plant. Physiol., 119: 369-380, 1985.
- 99 KENNEDY, I.R.; MWANDEMELE, O.D.; MCWHIRTER, K.S. Estimation of sucrose, raffinose and stachyose in soybean seeds. Food Chemistry., 17 : 85 - 93, 1985.
- 100 KLEIN, R.M. Aspectos fitossociológicos da bracatinga (*Mimosa scabrella*) in: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais, 4, "Bracatinga uma alternativa para reflorestamento", Curitiba, 1981. Anais. Curitiba, EMBRAPA/URPFCS, p. 145-148.
- 101 KIHIO, T.; TABATA, H.; UKAI, S.; HARA, C. A minor, protein containing galactomannan from a sodium carbonate extract of *Cordyceps sinensis*. Carbohydr. Res., 156:189-197, 1986.
- 102 KNUDSEN, I.M. High - performance liquid chromatographic determination of oligosaccharides in leguminous seeds. J.Sc. Food Agric, 37: 560-566, 1986.
- 103 KOOIMAN, P. Structures of galactomannans from seeds of *Amnona muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convobulis tricolor* and *Shofora japonica*. Carbohydr. Res., 20 : 329-377, 1971.
- 104 KRUMEL, K.L. & SARKAR, N. Flow properties of gums useful to the food industry. Food Technology., 29 : 36-44, 1975.
- 105 KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LOW, I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glykosiden. Angew. Chem., 67 (1) : 32, 1955.
- 106 KULLICKE, W.M. & KNIEWSKE, R. The shear viscosity dependence on the concentration, molecular weight, and shear rate of polystyrene solutions. Rheol. Acta., 23 : 75-83, 1984.
- 107 KUO, T.M.; VAN MIDDLESWORTH, J.F.; KUO, T.M.; VAN MIDDLESWORTH, J.F.; WOLF, W.J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plants. J. Agric. Food. Chem., 36:32-36, 1988.

- 108 LAUNAY, B.; DOUBLIER, J.L.; CUVELIER, G. Functional properties of food macromolecules. MITCHELL, J.R. & LEDWARD, D.A. (Ed). Elsevier Applied Science Publishers, London, 1986. p. 1 - 78.
- 109 LEWIS, D.H. Occurrence and distribution of storage carbohydrates in vascular plants. In: Storage of carbohydrates in vascular plants. Society for Experimental Biology Seminar Series., 19. _____. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge. 1984. p. 1 - 52.
- 110 LLOYD, K.O. Isolation, characterization, and partial structure of peptidogalactomannans from the yeast form of *Cladosporium werneckii*. Biochemistry., 9 : 3446-3453, 1970.
- 111 LOPES, L.M.A. Caracterização viscosimétrica de mistura das gomas xantana e guar. Rio de Janeiro. 1989. 282 p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 112 LOWELL, C.A. & KUO, T.M. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. Crop. Sci., 29: 459-465, 1989.
- 113 LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265-275, 1951.
- 114 MACRAE, R. & ZAND-MOGHADDAM, A. The determination of the component oligosaccharides of lupin seeds by high pressure liquid chromatography. J. Sci. Fd. Agric., 29 : 1083-1086, 1978.
- 115 MANZI, A.E.; CERESO, A.S.; SHOOLERY, J.N. High resolution ^{13}C -n.m.r. spectroscopy of legume seed galactomannans. Carbohydr. Res., 148: 189-197, 1986.
- 116 MATHESON, N.K. & SAINI, H.S. Polysaccharide and oligosaccharide changes in germinating lupin cotyledons. Phytochemistry., 16 : 59 - 66, 1977.
- 117 MAZUCHOWSKI, J.Z. & LAURENT, J.E. Plano de desenvolvimento Agroflorestal e Energético para Região Metropolitana de Curitiba. Projeto FAO-GCP/BRA/025/FRA Convenio Brasil/Paraná - França - FAO. EMATER DOCUMENTOS., 11. 1990. 64p.

- 118 McCLEARY, B.V. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannan Carbohydr. Res., 92 : 269-285, 1981.
- 119 _____. The fine structures of carob and guar galactomannans. Carbohydr. Res., 139 : 237 - 260, 1985.
- 120 _____. Enzymic hydrolysis, fine structure and gelling interactions of legume seed D-galacto-D-mannans. Carbohydr. Res., 71 : 205 - 230, 1979.
- 121 McCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K.; SMALL, D.M. Galactomannans and galactoglucomannan in legume seed endosperms: structural requirements for -mannanase hydrolysis. Phytochemistry., 15 : 1111-1117, 1976.
- 122 McCOMB, E. A. & RENDING, V.V. Ononitol (4-O-methyl-myo-inositol) as a constituent of *Medicago sativa*. Arch. Biochem. Biophys., 99 : 192 , 1962.
- 123 MENDES FILHO, J.M.A.; POGIANI, F.; LAPA, R.P. Comportamento de três espécies florestais em solo alterado pela exploração do xisto na região de São mateus do Sul . In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais, 4, "Bracatinga uma alternativa para reflorestamento", Curitiba, 1981. Anais. Curitiba, EMBRAPA/URPFCS, p. 149-159.
- 124 MENJIVAR, J.A. Use of gelation theory to characterize metal cross-linked polymer gels. In: Water soluble Polymers. ACS - Advances in Chemistry Series, 213. Glass, J.E. (Ed). American Chemical Society, Washington, DC, 1986. p. 209-226.
- 125 MILAS, M. Polieletrólitos. GROOTE, R.A.M.C. & CURVELO,A.A.S. (Ed) Instituto de Física e Química de São Paulo - USP, São Carlos, 1991. 83 p.
- 126 MILAS, J. & RINAUDO, M. - Investigation on conformational properties of xanthan in aqueous solution In: Solution properties of polysaccharides. A.C.S Symp. Series., 150 : 25 - 30 , 1981.
- 127 MILAS, M.; RINAUDO M.; KNIPPER, M.; SCHUPPISER, J.L. Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions. Macromolecules., 23 (9): 2506 -2511, 1990.

- 128 MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. Polym.Bull., 14 : 157 - 164, 1985.
- 129 MITSUTOMI, M. & OHTAKARA, A. Isolation and identification of oligosaccharides produced from raffinose by transgalactosylation reaction of thermostable α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*, Agric. Biol. Chem., 52((9): 2305-2311, 1988.
- 130 MOORHOUSE, R. structure/Properties relationships of a family of microbial polysaccharides In: Industrial polysaccharides: Genetic Engineering, structure/Properties relations and applications. YALPANI, M. (ed). Elsevier, Amsterdam, 1987 p. 187 - 206.
- 131 MORRIS, E.R. Organoleptic properties of food polysaccharides in thickened systems. In: Industrial Polysaccharides : Genetic Engineering, Structure/ Properties Relations and Applications. YALPANI, M. (Ed) Elsevier, Amsterdam, 1987. p. 225-238.
- 132 _____. Rheology of hydrocolloids. In: Gums and stabilisers for the food industry 2. PHILLIPS, G.O.; WEDLOCK, D.J.; WILLIAMS, P.A. (ed). Pergamon Press, Oxford, 1984. p. 57 - 78.
- 133 MORRIS, E.R.; CUTLER, A. N.; ROSS-MURPHY, S.B.; REES, D.A.; PRICE, J. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. Carbohydr. Polymers., 1 : 5-21, 1981.
- 134 MUSSINGO, M. N.; BASHA, S. M.; SANDERS, T.H. COLE, R. J. ; BLANKENSHIP, P.D. Effect of drought and temperature stress on peanut (*Arachis hypogaea L.*) seed composition. J. Plant Physiol., 134: 710-715, 1989.
- 135 NAKAJIMA, T. Extracellular galactomannan from *Neurospora crassa*. Agric. Biol. Chem., 46(4) : 869-875, 1982.

- 136 NELSON, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153: 375 - 380, 1944.
- 137 NEWLIN, T.E.; LOVELL, S.E.; SAUNDERS, P.R.; FERRY, J.D. Mechanical properties of substances of high molecular weight. XXXVI. Long-range intermolecular coupling in dependence on temperature and concentration. J. Colloid Sci, 17: 409, 1962.
- 138 NIELSEN, L.E. Effects of rate of shear on polymer rheology. In: Polymer Rheology Marcel Dekker Inc., New York, 1977. p. 47 - 53.
- 139 NOBLE, O. Les galactomannanes en solution aqueuse : Conformation, interactions et gelification. Grenoble-France, 1988. 188 p. These, Doctorat, Université de Grenoble I.
- 140 NORDIN, P. Preferential leaching of pinitol from soybeans during inhibition. Plant Physiol., 76 : 313 - 315, 1984.
- 141 OGUN, P.O.; MARKAKIS, P.; CHENOWETH, W. Effect of processing on certain antinutrients in cowpeas (*Vigna unguiculata*) J. Food Sci., 4: 1084-1085, 1989
- 142 OHASHI, H. Wild flowers of Japan II, Herbaceous plants, Chloripetalae, SATAKE, Y; OHWI, J.; KITAMURA, S.; WATARI, S.; TAMINARI, T. (Ed) Watari and T. Tominari, Heibonsha, Tokyo, 1982, p. 186-212.
- 143 PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento; In: Bracatinga: melhoramento de produção energética e alimentícia. Projeto FAO-GCP/BRA/025/FRA Convênio Brasil/Paraná - França - FAO, Curitiba, 1987. 38 p.
- 144 PHENOMENEX. REZEX-RCO-BR-OLIGOSACCHARIDE California-USA, s.d. Catalogo de exposição.
- 145 PHILLIPS, D. V. ; DOUGHERTY, D.E.; SMITH, A. E. Cyclitols in soybean. J. Agric. Food. Chem., 30: 456-458, 1982.
- 146 PINTO, N.L.S.; NEIDERT, S.H.; FILL, H.D.O.A. LAMBROS, D.; REIS, F.C.A. Noções básicas de mecânica dos fluidos e hidraulica. Vol.1, Curitiba, 1974, p. 9 - 23.

- 147 POLLOCK, C.J. Environmental effects on sucrose and fructan metabolism. Curr. Topics Plant. Biochem. Physiol., 5 : 32-46, 1986.
- 148 POLLOCK, C.J. & LLOYD, E.J. The effect of low temperature upon starch, sucrose and fructan synthesis in leaves. Ann., Bot., 60: 231-235, 1987.
- 149 PORTER, R.S. & JOHNSON, J.F. The entanglement concept in polymer systems. Chem.Rev., 6 : 1-27, 1965.
- 150 POSTERNAK, T. Les cyclitols. In: Actualites scientifique et Industrielles 1294. Hermann (Ed). Paris, 1962. p. 10-21.
- 151 QUEMENER, B. & BRILLOUET, J.M. - Ciceritol, a pinitol digalactoside from seeds of chick pea, lentil and white lupin. Phytochemistry., 22 : 1745-1751, 1983.
- 152 QUIVORON, C. Thermodynamique de solutions de polymeres In: Initiation à la chimie et à la physico-chimie macromoleculaires. Groupe français d' études et d' applications des polymers (Ed), Grenoble, 1986 p.71-121.
- 153 RAO, P.U. & BELAVADY, B. Oligosaccharides in pulses. Varietal differences and effects of cooking and germination J. Agric. Food Chem., 26 : 316, 1978.
- 154 REES, D.A. Polysaccharide shapes. Chapman Hall Ltd, Londres, 1977, 80p.
- 155 REICHER, F. "Estudos sobre a localização de grupos O acetílicos e de complexos lignina-xilana em hemicelulose nativa de *Mimosa scabrella*" (bracatinga). Curitiba, 1984. 136 p. Tese, Doutorado, Universidade Federal do Paraná
- 156 REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GORIN, P.A.J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of *Mimosa scabrella* (bracatinga). A study of O-acetyl group migration. Carbohydr. Res., 135 : 127-143, 1984.
- 157 REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D.; CORRÊA, J.B.C. Seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (Barbatimão). Appl. Biochem. Biotechnol. 28/29 : 353-361, 1991.
- 158 REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D.; CORRÊA, J.B.C. Properties of the seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (Barbatimão). Appl. Biochem. Biotechnol. In press.

- 159 REID, J.S.G. Cell wall storage carbohydrates in seeds. Biochemistry of the seed "gums" and "hemicelluloses". Adv. Bot. Res., 11 : 125 - 155, 1985.
- 160 REITZ, R.; KLEIN, R.M. ; REIS, A. Projeto Madeira do Rio Grande do Sul . Sellowia, Itajai, 34/35, 1983 p. 525.
- 161 RENDING, V.V. & McCOMB, E.A. Pinitol (5-O-methyl-D-inositol) as a constituent of *Medicago sativa* Arch. Biochem. Biophys., 96 : 455 - 456 , 1962.
- 162 RIBEIRO, R.C.L.F; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; CARVALHO , M.A.M.; VIEIRA, C.C.J.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. Revta. brasil. Bot., 9 : 159 - 166, 1986.
- 163 RICHARDSON, R.K. & ROSS-MURPHY, S.B. Non-linear viscoelasticity of polysaccharide solutions I: Guar galactomannan solutions. Int. J. Biol. Macromol., 9 : 250-256, 1987.
- 164 RINAUDO, M. & MILAS, M. On the properties of polysaccharides, relation between chemical structure and physical properties. In: Industrial polysaccharides : Genetic Engineering, Structure/Properties Relations and Applications. YALPANI, M. (Ed). Elsevier, Amsterdam, 1987, p. 217-223.
- 165 ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S.B.; MORRIS, E.R. Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. Carbohydr. Res., 107 : 17-32, 1982.
- 166 RODAWAY, S. ; HUANG, B.F.; MARCUS, A. Nucleotide metabolism and the germination of seed embryonic axes. In: The plant seed - Development, preservation and germination. RUBENSTEIN, I.; PHILLIPS, R.L.; GREEN, C.E.; GENGENBACH, B.G. (Ed). Academic, New York, 1979.
- 167 SAINI, H.S. Extractability and evaluation of α -galactosides of sucrose in leguminous seeds. Food Chem., 28:149-157, 1988.
- 168 _____. Mono-di-and oligosaccharide profiles of developing, dormant and germinating lupin seeds. Proceedings, Fourth International Lupin Conference Geraldton, Western Australia, 1986, p. 292.

- 169 SAINI, H.S. & GLADSTONES, J.S. Variability in the total and component galactosyl sucrose oligosaccharides of *Lupinus* species. Austr. J. Agric. Res., 37: 157 - 166, 1986.
- 170 SANDERSON, G.R. Polysaccharides in foods. Food Technology., 35 (7) : 50-57, 1981.
- 171 SANTARIUS, K.A. & MILDE, H. Sugar compartmentation in frost-hardy and partially dehardened cabbage leaf cells. Planta., 136 : 163 , 1977.
- 172 SARAIVITZ, D.M.; PHARR, D.M.; CARTER, T.E. Galactinol synthase activity and soluble sugar in developing seeds of four soybean genotypes. Plant Physiol., 83 : 185 - 189, 1987.
- 173 SAVITRI,A. & DESIKACHAR,H.S.R. A comparative study of flatus production in relation to the oligosaccharide content of some legumes. Nutrition Rep. Int., 31:337-344, 1985.
- 174 SAWARDEKER,J.S.; SLONEKER, J.J.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. Anal. Chem., 37 : 1602-1604, 1965.
- 175 SCHWEIZER, T. F.; HORMAN, I.; WURSCH, P.; Low molecular weight carbohydrates from leguminous seeds, a new disaccharide galactopinitol. J. Sci Fd.Agri., 29: 148 - 154, 1978
- 176 SCHWEIZER, T.F. & HORMAN, I. Purification and structure determination of three galactopyranosyl cyclitols from soya bean. Carbohydr. Res., 95 : 61 - 71, 1981.
- 177 SEAMAN, J.K. Guar gum & locust bean gum In: Handbook of Water Soluble Gums and Resins. DAVIDSON, R.L.(Ed), Mc Graw-Hill, 1980.
- 178 SELVENDRAN, R.R.; MARCH, J.F.; RING, S. G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96 : 282-292, 1979.
- 179 SHARMAN, W.R., RICHARDS, E.L., MALCOLM, G.N. Hydrodynamic properties of aqueous solutions of galactomannans. Biopolymers , 17 : 2817 - 2833, 1978.

- 180 SHI, X. Relation entre la conformation et les propriétés d un polysaccharide bacterien, le gellane. Grenoble, 1990. 163 p. Tese, Doutorado, Université Joseph Fourier, Grenoble I.
- 181 SIMHA, R. & CHAN, F.S. Corresponding state relations for the Newtonian viscosity of concentrated polymer solutions. J. Phys. Chem., 75 : 256-267, 1971.
- 182 SINGH, R.; AGGARWAL, A.; BHULLAR, S.S.; GOYAL, J. Import of sucrose and its partitioning in the synthesis of galactomannan and raffinose oligosaccharides in the developing guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) seed. J. Exp. Bot., 41:101-110. 1990.
- 183 SOCIÉTÉ FRANÇAISE CHROMATO COLONNE Nucléosil 5 - C18 - Colonne Analytiques, France, s.d. Catalogo de exposição.
- 184 SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160: 61 - 68, 1945
- 185 SONI, S.K. & BOSE, S. Seed galactomannans & their structures. J.Sci.Ind. Res., 44 : 544-547, 1985.
- 186 STEPHEN, A.M. Other plant polysaccharides In: The Polysaccharides. ASPINALL, G.O. (Ed). Academic Press, New York, vol. 2, 1983. p.115-122
- 187 TAGER, A. Determination of molecular mass of polymers, size and shape of macromolecules. Estimation of thermodynamic flexibility of a chain. In: Physical chemistry of polymers. Moscow, Mir Publishers, 1978, p. 489-523.
- 188 _____. Mechanical properties of polymer solutions and gels In: Physical chemistry of polymers. Moscow, Mir Publishers, 1978. Cap. 15, p. 453-488.
- 189 _____. RUBBER - Like state polymers. In: Physical chemistry of polymers. Mir Publishers, Moscow, 2º d, 1978. Cap. 7, p. 175-206.
- 190 TEIXEIRA M. A.; PEREIRA, M.O.S.; HEYRAUD A.; RINAUDO, M. Estudo químico de espécies do gênero *Canavalia*. Ciência e Cultura., 39:509, 1987.
- 191 TEIXEIRA M.A.; PEREIRA, M.O.S.; HEYRAUD, A; RINAUDO, M. Low molecular weight carbohydrates in the seeds of *Calopogonium mucunoides* Ciência e Cultura, 38:621-622, 1986.

- 192 THORNE, J.H. Temperature and oxygen effects on C-photosynthate unloading and accumulation in developing soybean seeds. Plant Physiol., 69 : 48 -53, 1982.
- 193 THORNE, J.H & RAINBIRD, R.M. An in vivo technique for the study of phloem unloading in seed coats of developing soybean seeds. Plant Physiol., 72 : 268-271, 1983.
- 194 TIMELL, T.E. Galactoglucomannans from the wood of gymnosperms. Meth. Carbohydr. Chem., 5:134-137, 1965.
- 195 TINLAND, B. Etude d un polysaccharide microbien: Le xanthane modele de molecule semi-rigido.Grenoble-France, 1988. 176p. These. Doutorat, Universite Scientifique Technologique et Medicale de Grenoble.
- 196 TINLAND, B; MAZET, J; RINAUDO, M. Characterization of water - soluble polymers by multidetection size-exclusion chromatography. Makromol.Chem., 9 : 69-73, 1988.
- 197 TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.F.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. Nature., 166 : 444, 1950.
- 198 TRICOT, M. Comparison of experimental and theoretical persistence length of some polyelectrolytes at various ionic strengths. Macromolecules., 17 (9): 1698 - 1704, 1984.
- 199 VERKADE, P.E. & SCHEFFERTRAAAT, A. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC and International Union of Biochemistry (IUB). Tentative rules for cyclitol nomenclature. J. Biol. Chem., 243 (22) : 5809 - 5819, 1968.
- 200 VOSE, J.R.; BASTERRECHEA, M.J.; GORIN, P.A.J.; FINLAYSON, A.J.; YOUNGS, C.G. Air classification of field peas and horsebean flours: chemical studies of starch and protein fractions. Cereal Chem., 53 (6):928-936, 1976.
- 201 WALKER, B. Gums and stabilisers in food formulations. In: Gums and stabilisers for the food industry 2.PHILLIPS, G.O., WEDLOCK, D.J.; WILLIAMS, P.A. (Ed). Pergamon Press, Oxford, 1984. p. 137 - 161.

- 202 WIGHT, A. W. & DATEL, J.M. Evaluation of a reversed phase high performance liquid chromatographic column for estimation of legume seed oligosaccharides. Food Chem., 21 : 167 - 181, 1986.
- 203 YALPANI, M. Synthesis and characterization of polysaccharides In: Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Properties, Relations and Applications. (Ed). Elsevier, Amsterdam, 1987. p. 1 - 6.
- 204 YALPANI, M. & SANDFORD, P.A. Commercial Polysaccharides: recent trends and developments In: Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Properties, Relations and Applications. (Ed). Elsevier, Amsterdam, 1987. p.311 - 335..
- 205 YASUI, T. Dissimilarity in low molecular weight carbohydrate composition of the seeds of cultivated soybean [(*Glycine max* (L) Merrill subsp *max*]and wild soybean [*G. max* subsp. *Soja* (SIEB et ZUCC.) OHASHI] Agric. Biol., Chem., 49 (4): 933-937, 1985.
- 206 _____. Identification of a new galactosyl cyclitol from seeds of *Vigna angularis* Ohwi et Ohashi (adzuki bean). Agric. Biol. Chem., 44 (9): 2253-2255, 1980.
- 207 _____. Variation in low molecular weight carbohydrate composition of *Phaseolus vulgaris* seeds. Phytochemistry, 24 (6) : 1241 - 1244, 1985.
- 208 ZHELIGOVSKAYA, Y. A. & SEMENOV, A.N. The formation of a random network of entanglements in a polymer solution. Polymer Sci U.S.S.R., 30 (11) : 2483-2487, 1988.

Esta tese deu lugar às seguintes publicações.

1. GANTER, J.; CORRÊA, J.; REICHER, F.; HEYRAUD, A.; RINAUDO, M. Low molecular weight carbohydrates from *Mimosa scabrella* seeds. Plant Physiol. Biochem., 29 (2):139-146, 1991.
2. GANTER, J.L.M.S.; MILAS, M.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. Carbohydr. Polymers., 17: 1992, In Press.