

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA DE OLIVEIRA SALVALAGGIO

**GALACTOMANANAS DE SEMENTES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS:
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
POR ESPALHAMENTO DE LUZ**

CURITIBA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARINA DE OLIVEIRA SALVALAGGIO

**GALACTOMANANAS DE SEMENTES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS:
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E
POR ESPALHAMENTO DE LUZ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Joana Léa Meira Silveira

Colaborador:

Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

MARINA DE OLIVEIRA SALVALAGGIO

**GALACTOMANANAS DE SEMENTES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS:
OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POR
ESPALHAMENTO DE LUZ**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof^a Dr^a Joana Léa Meira Silveira (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

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

Prof^a Dr^a Izabel Cristina Riegel
Departamento de Química – UFPR

Dr^a Neoli Lucyzyn
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 25 de fevereiro de 2010

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido meu crescimento a cada obstáculo superado e por me proporcionar a convivência com as pessoas a quem sou muito grata.

Ao meu pai, Laudir, por ser o principal herói das minhas histórias infantis e por carregar este papel ao longo dos meus anos de vida, direcionando meus passos.

À minha mãe, Eva, que é a maior companheira de todas, capaz de enxergar o lado bom da vida mesmo quando não se vê nenhuma luz. Ela é mágica!

Ao meu irmão Paolo, meu segundo herói, por ser o meu maior exemplo de que vale a pena buscar tudo aquilo que desejamos, por ser meu conselheiro profissional e pelas correções do resumo.

Ao meu irmão Matheus, meu terceiro herói, que sempre apoiou as minhas decisões, é exemplo de firmeza e retidão, e por ser meu conselheiro profissional.

Às minhas cunhadas, Deni e Paty, minhas irmãszinhas, sempre prontas a oferecer colo e ouvidos, e pelas conversas sempre muito produtivas

À Prof^a Dra^a Joana Léa Meira Silveira, em primeiro lugar, por ter acreditado na minha capacidade de adaptação e crescimento. Sou muito grata pela orientação deste trabalho, por ter me aceitado como aluna no meio do caminho e também por ter sido tão zelosa e compreensiva principalmente nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, por ter aceitado colaborar com a construção desse trabalho, por ter sido essencial na elaboração dos experimentos e nas discussões dos resultados.

Ao Prof. Dr. Silvio Francisco Brunatto, que gentilmente me acolheu em seu departamento e me orientou nas análises de granulometria.

Ao Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira-Netto pelo auxílio nas análises estatísticas finais.

À Prof^a Dra^a Maria Berenice Reynaud Steffens, que desencadeou em mim a paixão pela Bioquímica.

À Prof^a Dra^a Maria Eliane Merlin Rocha, por ter cordialmente me aceitado como aluna e me transmitido ensinamentos de docência.

Ao Prof. Dr. Marcello Iacomini, que me apresentou com alegria o fantástico universo dos polissacarídeos.

Às minhas Brows, Monica e Vânia, que foram fundamentais durante todo o percurso. O incentivo, especialmente durante as árduas disciplinas, e a amizade de vocês fizeram toda diferença nesses 2 anos. Eu as admiro muito e vou sentir muita falta de todos os momentos ao lado de vocês.

Às doutorandas Lúcia e Nana, por terem me ensinado o be-a-bá das práticas do laboratório com carinho e cuidado. Obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar, a ouvir, a sugerir. À Nana pela amizade que firmamos ao longo deste período – sem você o laboratório seria preto e branco. Um agradecimento especial à doutoranda Heide, que me ensinou a trabalhar no HPLC e no dinâmico, estive ao meu lado (literalmente!) durante boa parte do tempo e participou de tudo que eu fiz. Agradeço pelas boas conversas e pelos bons conselhos. Vocês 3 foram fantásticas!

Aos ICs, Henrique e Ale, que auxiliaram muito no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por terem realizado cada etapa com dedicação e paciência e por terem quebrado alguns galhos nos experimentos.

Aos colegas de laboratório, Nicks, Rogério, João, Larry, Rhayla, Marília e Karen, que não raras vezes me auxiliaram nos experimentos e nas análises de resultados, e também pelos divertidos momentos de descontração.

Às vizinhas da esquerda e da direita, Giovana e Ju Rizzi, pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos colegas da turma de Mestrado, especialmente Gustavo, Regina e Thiago, pelas agradáveis conversas e ensinamentos. Aos colegas dos laboratórios vizinhos pelo companheirismo e auxílio nos experimentos, além dos cafés e água geladina.

Às amigas de faculdade, Andressa e Dani Real, pela amizade de sempre e pela torcida. À Pri, que de mestra se tornou amiga e em breve será colega de trabalho, a minha gratidão pela amizade, pelo incentivo e pelo exemplo de profissional que eu procuro seguir.

À Dra Fátima Schultz, que me amparou e guiou desde o primeiro mês.

À técnica Rosane, pelas análises de GLC e por dividir as torradinhas. À Elizangela (Éliz), por repartir seu espaço no GPC comigo sem reclamar e pelas conversas sobre a tecnologia dos esmaltes cor-de-rosa.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação, Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá, e sua antecessora, Prof^a Dra^a Leda Satie Chubatsu, pela prontidão e atenção.

Ao Programa REUNI, pelo auxílio financeiro.

*"Só engrandeceremos nosso
direito à vida cumprindo
o nosso dever
de cidadãos do mundo."
(Ghandi)*

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os processos diretos e seqüenciais nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 24 e 48 horas das extrações de galactomananas de sementes de bracinga – GM (*Mimosa scabrella*), barbatimão – GS (*Stryphnodendron adstringens*) e guapuruvu – GG (*Schizolobium parahybae*). A eficiência das extrações foi avaliada através das análises por cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) acoplada aos detectores de espalhamento de luz laser com multiângulos (MALLS), índice de refração (RI) e viscosimétrico (VIS), (HPSEC-MALLS/IR/VIS). As extrações diretas de galactomananas de bracinga apresentaram relação manose:galactose que variou de 1,1:1 a 1,2:1, para os polissacarídeos de barbatimão a variação foi de 2,0:1 a 2,6:1, enquanto para as extrações de guapuruvu a variação foi de 2,2:1 a 2,6:1. Para as extrações seqüenciais, a variação de galactomananas de bracinga foi de 1,1:1 a 1,2:1, as galactomananas de barbatimão variaram de 2,0:1 a 2,3:1 e para os polissacarídeos de guapuruvu a variação ocorreu entre 2,5:1 e 4,2:1. As extrações diretas correspondentes aos tempos de 1 hora (GM1d), 6 horas (GS6d) e 2 horas (GG2d) para bracinga, barbatimão e guapuruvu, respectivamente, foram as frações que apresentaram a melhor eficiência nos processos de extração, considerando rendimento e resultados obtidos por HPSEC-MALLS/RI/VIS, tais como massa molecular ponderal média (M_w), índice de polidispersão (M_w/M_n), raio de giro (R_g), taxa de recuperação (%) e viscosidade intrínseca ($[\eta]_w$). Os rendimentos e valores de M_w das extrações escolhidas resultaram em 22,2% e $1,08 \times 10^6$ g/mol, 18,3% e $1,15 \times 10^6$ g/mol e 24,9% e $0,94 \times 10^6$ g/mol respectivamente para GM1d, GS6d e GG2d. Os valores de M_w encontrados corresponderam aos maiores valores de R_g e $[\eta]_w$ na maioria das extrações analisadas. As distribuições de massas moleculares apresentaram concordância com os resultados de M_w , pois evidenciaram elevadas massas moleculares nos tempos iniciais e degradação principalmente nos tempos de 24 e 48 horas de extração. Os resultados para as extrações diretas de 24 horas apresentaram as variações de $1,5 \times 10^5$ a 7×10^6 g/mol para bracinga, 9×10^4 a $5,5 \times 10^6$ g/mol para barbatimão e 2×10^4 a 3×10^6 g/mol para guapuruvu. Os resultados obtidos permitiram verificar que cada fonte vegetal de galactomanana apresenta um tempo de extração direta eficaz relativa ao rendimento, ao comportamento macromolecular em solução e às características físico-químicas. Os resultados também favoreceram a aplicação industrial desses polissacarídeos como potenciais fontes de galactomananas.

Palavras-chave: galactomanana, extração, *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron adstringens*, *Schizolobium parahybae*, cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the extraction of galactomannans from seeds of (*Mimosa scabrella*) - GM, (*Stryphnodendron adstringens*) - GS and (*Schizolobium parahybae*) - GG in direct and sequential processes at the time 1, 2, 3, 4, 6, 24 and 48 hours. The efficiency of extraction was assessed through the analysis of high performance size exclusion chromatography (HPSEC) coupled to the multiangle laser light scattering (MALLS), refractive index (RI) and viscometric (VIS) detectors, resulting HPSEC-MALLS/RI/VIS. The direct extraction of *M. scabrella* galactomannans presented for mannose:galactose ranged from 1.1:1 to 1.2:1, for the polysaccharides of *S. adstringens* range was 2.0:1 to 2.6:1, while for the extraction of *S. parahybae* range was 2.2:1 to 2.6:1. For sequential extractions, the variation of *M. scabrella* galactomannans was 1.1:1 to 1.2:1, the *S. adstringens* galactomannans ranged from 2.0:1 to 2.3:1 and the *S. parahybae* polysaccharides variation occurred between 2.5:1 and 4,2:1. Extractions corresponding to direct time of 1 hour (GM1d), 6 hours (GS6d) and 2 hours (GG2d) for *M. scabrella*, *S. adstringens* and *S. parahybae*, respectively, were the fractions that presented the best efficiency in the extraction process, considering yield and results obtained by HPSEC-MALLS/RI/VIS, such as molecular weight average (M_w), polydispersity (M_w/M_n), radius of gyration (R_g), recovery rate (%) and intrinsic viscosity ($[\eta]_w$). Yield and M_w values of the chosen extraction resulted in 22.2% and 1.08×10^6 g/mol, 18.3% and 1.15×10^6 g/mol and 24.9% and 0.94×10^6 g/mol respectively for GM1d, GS6d and GG2d. The values of M_w found to the highest values of R_g and $[\eta]_w$ in most samples. Distributions of molecular weight have agreed with M_w because showed the highest values for molecular weights at the initial extraction times and degradation especially at 24 and 48 hours of extraction times. The results for the 24 hours direct extractions showed variations of $1,5 \times 10^5$ and 7×10^6 g/mol for *M. scabrella*, 9×10^4 and $5,5 \times 10^6$ g/mol for *S. adstringens* and 2×10^4 and 3×10^6 g/mol for *S. parahybae*. The results obtained ensured that each plant source of galactomannan presents an effective time direct extraction on the performance, on its macromolecules in solution behavior and its physical-chemical properties. The results also had favored the industrial application of these polysaccharides as potential sources of galactomannans.

Keywords: galactomannan, extraction, *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron adstringens*, *Schizolobium parahybae*, size exclusion chromatography (SEC)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – COMPOSIÇÃO FÍSICA DAS SEMENTES DA FAMÍLIA LEGUMINOSAE.....	21
FIGURA 2 – SEMENTES DE BRACATINGA E DE BARBATIMÃO.....	22
FIGURA 3 – SEMENTES DE GUAPURUVU.....	23
FIGURA 4 – ESTRUTURA GERAL DA GALACTOMANANA.....	24
FIGURA 5 – COMPOSIÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E SEQÜÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLECULAR DAS GALACTOMANANAS.....	25
FIGURA 6 – MODELO DE GRÁFICO DE ZIMM OBTIDO POR HPSEC-MALLS.....	39
FIGURA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE RAIOS HIDRODINÂMICO E RAIOS DE GIRO DE UM POLÍMERO EM SOLUÇÃO.....	40
FIGURA 8 – MODELO DE PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO POR ESPALHAMENTO DE LUZ ACOPLADO AO DETECTOR RI EM FUNÇÃO DO VOLUME DE ELUIÇÃO DA AMOSTRA.....	41
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS.....	50
FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DIRETA DAS GALACTOMANANAS DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU.....	53
FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO SEQÜENCIAL DAS GALACTOMANANAS DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU.....	54
FIGURA 12 – PERFIS ESCOLHIDOS A PARTIR DAS TRIPLICATAS DE ANÁLISES POR MALLS 90° (PRETO)/ IR (CINZA)/ VIS DE GALACTOMANANAS DE BRACATINGA EXTRAÍDAS A 2 E 48 HORAS E PREPARADAS POR CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO A 1,2, 0,45 E 0,22 µm.....	70
FIGURA 13 – PERFIS ESCOLHIDOS A PARTIR DAS TRIPLICATAS DE ANÁLISES POR MALLS 90° (PRETO)/ IR (CINZA)/ VIS DE GALACTOMANANAS DE BARBATIMÃO EXTRAÍDAS A 2 E 48 HORAS E PREPARADAS POR CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO A 1,2, 0,45 E 0,22 µm.....	71
FIGURA 14 – PERFIS ESCOLHIDOS A PARTIR DAS TRIPLICATAS DE ANÁLISES POR MALLS 90° (PRETO)/ IR (CINZA)/ VIS DE GALACTOMANANAS DE GUAPURUVU EXTRAÍDAS A 2 E 48 HORAS E PREPARADAS POR CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO A 1,2, 0,45 E 0,22 µm.....	71

FIGURA 15 – PERFIL OBTIDO POR MALLS 90° DA EXTRAÇÃO GG2d NO TRECHO 1,2 (A) E NO TRECHO 0,22 (B) E FORMALIZAÇÃO DO GRÁFICO DE ZIMM NO OBTIDO NO TRECHO 1,2 (A') E NO TRECHO 0,22 (B').....	76
FIGURA 16 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DA GALACTOMANANA DE BARBATIMÃO (GS6d) UTILIZANDO ELUENTE NaNO ₂ E DETECTORES MALLS 90°, IR E VIS.....	78
FIGURA 17 – DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES (g/mol) DAS EXTRAÇÕES DIRETAS (A) E SEQUENCIAIS (B) DE GALACTOMANANAS DE BRACATINGA.....	82
FIGURA 18 – DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES (g/mol) DAS EXTRAÇÕES DIRETAS (A) E SEQUENCIAIS (B) DE GALACTOMANANAS DE BARBATIMÃO.....	87
FIGURA 19 – DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES (g/mol) DAS EXTRAÇÕES DIRETAS (A) E SEQUENCIAIS (B) DE GALACTOMANANAS DE GUAPURUVU.....	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE GALACTOMANANAS.....	30
TABELA 2 – IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DETIDAS NAS DIFERENTES EXTRAÇÕES.....	50
TABELA 3 – RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES DIRETAS DAS GALACTOMANANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU EM RELAÇÃO À SEMENTE INTEIRA.....	60
TABELA 4 – RENDIMENTO OBTIDO A PARTIR DO ENDOSPERMA DAS EXTRAÇÕES DIRETAS E SEQÜENCIAIS DE GALACTOMANANAS DE GUAPURUVU.....	61
TABELA 5 – RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQÜENCIAIS DAS GALACTOMANANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU EM RELAÇÃO À SEMENTE INTEIRA.....	63
TABELA 6 – RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DIRETAMENTE DAS SEMENTES DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU.....	66
TABELA 7 – RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS SEQÜENCIALMENTE DAS SEMENTES DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU.....	67
TABELA 8 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO E MÉDIAS COM DESVIOS PADRÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS EM TRIPLICATA DAS EXTRAÇÕES GM2d E GM48d NOS TRECHOS 1,2, 0,45 E 0,22 μm	72
TABELA 9 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO E MÉDIAS COM DESVIOS PADRÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS EM TRIPLICATA DAS EXTRAÇÕES GS2d E GS48d NOS TRECHOS 1,2, 0,45 E 0,22 μm	72
TABELA 10 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO E MÉDIAS COM DESVIOS PADRÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS EM TRIPLICATA DAS EXTRAÇÕES GG2d E GG48d NOS TRECHOS 1,2, 0,45 E 0,22 μm	73
TABELA 11 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS POR HPSEC-MALLS/IR/VIS DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DIRETA (GMd) E SEQÜENCIALMENTE (GMs) DAS SEMENTES DE BRACATINGA.....	79
TABELA 12 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS COMPARATIVOS ENTRE A EXTRAÇÃO GM1d E DADOS DE GALACTOMANANA DE BRACATINGA ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	81

TABELA 13 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS POR HPSEC-MALLS/IR/VIS DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DIRETA (GSd) E SEQUENCIALMENTE (GSs) DAS SEMENTES DE BARBATIMÃO.....	84
TABELA 14 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS COMPARATIVOS ENTRE A EXTRAÇÃO GS6d E DADOS DE GALACTOMANANAS DE BARBATIMÃO ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	86
TABELA 15 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS POR HPSEC-MALLS/IR/VIS DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DIRETA (GGd) E SEQUENCIALMENTE (GGs) DAS SEMENTES DE GUAPURUVU.....	89
TABELA 16 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS COMPARATIVOS ENTRE A EXTRAÇÃO GG2d E DADOS DE GALACTOMANANAS DE GUAPURUVU E ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	91
TABELA 17 – COMPARAÇÃO ENTRE $R_g(z)$ E $R_g(r)$ DAS EXTRAÇÕES DIRETAS E SEQUENCIAIS DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU.....	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

C^{13} RMN	– ressonância magnética nuclear de carbono 13
dn/dc	– diferença do índice de refração da amostra em função de determinada concentração
GEV	– granulometria por estufa a vácuo
GMXd ou GMXs	– galactomanana de bracinga extraída em determinado tempo (X) diretamente (d) ou seqüencialmente (s)
GGXd ou GGXs	– galactomanana de guapuruvu extraída em determinado tempo (X) diretamente (d) ou seqüencialmente (s)
GPC	– cromatografia por gel permeação
GSXd ou GSXs	– galactomanana de barbatimão extraída em determinado tempo (X) diretamente (d) ou seqüencialmente (s)
GSD	– granulometria por <i>spray dryer</i>
HPSEC	– <i>high performance size exclusion chromatography</i> ou cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance
HPSEC-MALLS	– <i>high performance size exclusion chromatography coupled at multiangle laser light scattering</i> ou cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance com multidetecção
IR	– detector de índice de refração
MALLS	– detector de espalhamento de luz laser multiângulos ou <i>multiangle laser light scattering</i>
Man:Gal	– relação manose:galactose
M_n	– massa molecular ponderal média em número
M_w	– massa molecular ponderal média em peso
M_z	– massa molecular ponderal média em função do fator z
ND	– não determinado
NNLS	– <i>non-negatively least squares</i>
$[\eta]$	– viscosidade intrínseca
$[\eta]_r$	– viscosidade intrínseca proveniente de cálculos matemáticos
$[\eta]_z$	– viscosidade intrínseca obtida pelo detector viscosimétrico
η	– viscosidade absoluta da solução
η_{rel}	– viscosidade relativa
η_s	– viscosidade do solvente

η_i	– incremento da viscosidade relativa
rend.	– rendimento (%)
R_g	– raio de giro
$R_g(\eta)$	– raio de giro como parâmetro reológico
$R_g(w)$	– raio de giro em peso
$R_g(z)$	– raio de giro em função do fator z
VIS	– detector viscosimétrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 OBJETIVO GERAL.....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 GALACTOMANANAS.....	21
2.2.1 Estrutura.....	24
2.2.2 Propriedades fisiológicas e aplicação industrial.....	26
2.2.3 Extração.....	29
2.3 ANÁLISE DE POLÍMEROS.....	35
2.3.1 Espalhamento de luz.....	35
2.3.1.1 HPSEC-MALLS.....	36
2.3.1.2 Viscosidade.....	42
2.3.1.2.1 Análise de agregados.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	49
3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	51
3.2.1 Extração de galactomananas de sementes de Bracatinga, Barbatimão e Guapuruvu.....	51
3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	55
3.4 ANÁLISES DE ESPALHAMENTO DE LUZ.....	56
3.4.1 Efeito da filtração sobre a eluição da amostra nas etapas de purificação e agregados de galactomananas.....	56
3.4.2 Análises cromatográficas de exclusão estérica de alta performance com multideteção (HPSEC-MALLS/IR/VIS).....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 EXTRAÇÃO DAS GALACTOMANANAS.....	59
4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS.....	65
4.3 ANÁLISES DE HPSEC.....	68
4.3.1 Efeito da filtração sobre a concentração e agregados de galactomananas.....	68

4.3.2 Análises cromatográficas de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALLS/RI/VIS).....	77
5. CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS.....	100

1. INTRODUÇÃO

As galactomananas são polissacarídeos extraídos geralmente do endosperma das sementes de diferentes espécies da família Leguminosae e que têm grande aplicação industrial, especialmente nos ramos petroquímico, farmacêutico, cosméticos, papel, tecidos, minério, explosivos (SRIVASTAVA, KAPOOR, 2005) e alimentos. Especificamente neste último, são comumente utilizados como espessantes, estabilizantes e substitutos de gorduras em sorvetes, molhos, dentre outros produtos alimentícios (POLLARD, FISHER, 2006), além de proporcionarem melhoramento nas características organolépticas dos produtos (SHIRANI, GANESHARANEE, 2009).

Atualmente, as tendências industriais exigem a introdução de fontes alternativas de polissacarídeos, portanto, é fundamental a busca de fontes renováveis, de fácil acesso pela abundância das espécies vegetais e baixo custo (CERQUEIRA, 2009; JOSHI, KAPOOR, 2003).

As galactomananas procedentes de fontes originadas na América Latina são pouco utilizadas industrialmente, apesar da biodiversidade da flora local e do clima favorável para sua produção ou para o desenvolvimento das espécies nativas (AZERO, ANDRADE, 2002). No Brasil a importação de polissacarídeos supera a exportação e apresenta um custo médio superior (CUNHA, PAULA, FEITOSA, 2009).

Entre os anos de 2003 e 2007, a importação das principais galactomananas utilizadas comercialmente, guar e alfarroba, atingiu mais de 10 mil toneladas, o equivalente a valores superiores a 20 milhões de dólares (CUNHA, PAULA, FEITOSA, 2009).

A bracatinga (*Mimosa scabrella*), o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e o guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) são leguminosas nativas brasileiras, que apresentam, no endosperma de suas sementes, galactomananas que variam quanto à frequência do substituinte galactose. A relação manose:galactose (Man:Gal) de bracatinga, guapuruvu e o barbatimão é de aproximadamente 1,1:1; 3:1 e 1,5:1, respectivamente (GANTER *et al.*, 1995). As galactomananas das referidas espécies têm estrutura química já estabelecida pelo grupo de Carboidratos Vegetais do

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (GANTER *et al.*, 1991; GANTER *et al.*, 1992; REICHER *et al.*, 1992; GANTER *et al.*, 1993).

A razão manose:galactose (Man:Gal) proporciona variações de tamanho molecular e estrutura entre as galactomananas oriundas da mesma espécie ou espécies diferentes, e este fator caracteriza as propriedades funcionais das galactomananas em dispersões aquosas. Esta relação depende tanto da fonte vegetal quanto do método de extração utilizado. O grau de substituição das galactomananas afeta a solubilidade do polissacarídeo em água e é determinante quanto à capacidade das moléculas interagirem entre si e com outros polissacarídeos (MCCLEARY, 1981; LARIZADOU, BILIADERIS, IZYDORCZYK, 2000; SECOUARD, GRISEL, MALHIAC, 2006).

Tendo em vista a influência do tamanho molecular destas macromoléculas nas propriedades funcionais e conseqüente aplicação industrial, esse trabalho avaliou as propriedades físico-químicas das galactomananas extraídas de sementes de bracatinga, guapuruvu e barbatimão a partir de diferentes métodos de extração visando a otimização da obtenção desses polissacarídeos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o processo de obtenção de galactomananas de bracatinga (*Mimosa scabrella*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) comparando os produtos obtidos em diferentes tempos de extração através de análises por cromatografia de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALLS/IR/VIS).

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair as galactomananas de sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella*), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) pelos métodos direto e seqüencial em diferentes tempos;
- Determinar a relação manose:galactose das galactomananas;
- Determinar os parâmetros físico-químicos em solução das galactomananas obtidas pelos diferentes tipos e tempos de extração por cromatografia de exclusão estérica com multidetecção, tais como: massa molecular, índice de polidispersão, distribuição das massas moleculares, raio de giro e viscosidade intrínseca.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GALACTOMANANAS

Dentre outras fontes, tais como de fungos, bactérias, algas, as galactomananas estão contidas em sementes de plantas e são utilizadas como fonte de reserva para o vegetal. As sementes exalbuminosas são constituídas por casca, endosperma e embrião, conforme representado na figura 1:

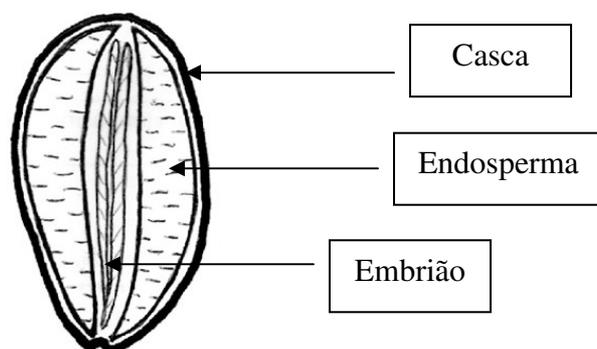


FIGURA 1 – CORTE LONGITUDINAL DE SEMENTE DA FAMÍLIA LEGUMINOSAE CONTENDO ENDOSPERMA
FONTE: adaptado de Dakia *et al.* (2008)

Na germinação de várias sementes pertencentes à família Leguminosae, a galactomanana, que é o polissacarídeo de reserva do endosperma, é degradada por 3 tipos de enzimas: α -galactosidase, β -mananase e β -manosídeo-hidrolase para liberação de energia (MCCLEARY, 1984). Entretanto, para a análise das galactomananas, a semente deve estar em um estado de maturação correspondente à integridade da molécula, ou seja, em um período anterior à quebra enzimática para utilização dos oligos ou monossacarídeos.

A maioria das galactomananas extraídas de plantas superiores tem origem na família Leguminosae ou Fabaceae (DEA, MORRISON, 1975). Conforme Cronquist (1988), a classificação abrange 3 famílias: Fabaceae, Caesalpiniaceae e Mimosaceae.

No entanto, tradicionalmente, a família Leguminosae é subdividida de 3 subfamílias: Papilionoideae ou Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, as quais serão adotadas neste trabalho (LOPES *et al.*, 2009).

A presença das espécies da subfamília Mimosoideae se dá nas regiões da América do Sul e Central, África e Austrália (ELIAS, 1981; LOPES *et al.*, 2009). Cerca de 80% das espécies dessa subfamília ocorrem no Brasil, nas quais se enquadram a bracatinga (*Mimosa scabrella*), presente nos estados do sudeste e sul, e o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), que é encontrado principalmente no estado do Paraná e é uma espécie de distribuição tropical (CARVALHO, 1994; LOPES *et al.*, 2009). A figura 2 retrata as sementes de bracatinga (A) e de barbatimão (B).



FIGURA 2 – SEMENTES DE BRACATINGA (A) E DE BARBATIMÃO (B)
 FONTES: Alex Santos (2009); <http://timblindim.wordpress.com/arvores/barbatimao>.
 Acesso em 22/09/2009

O guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) pertence à subfamília Caesalpinioideae (ERNANI, 1994) e é característico do sul do estado da Bahia

(CARVALHO, 1994). A espécie é encontrada também nas regiões de Mata Atlântica, como nos estados do sul e sudeste do Brasil (MENDES *et al.*, 2008). Na figura 3 encontram-se sementes de guapuruvu.



FIGURA 3 – SEMENTES DE GUAPURUVU

As espécies das subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae evoluíram quanto à adaptação em ambientes de clima tropical, enquanto espécies da subfamília Faboideae são encontradas principalmente em clima temperado e semi-árido. Exemplos de sementes pertencentes à subfamília Faboideae são *Cyamopsis tetragonoloba*, de onde se extrai a galactomanana comercial de guar, e *Trigonella foenum-graecum*, originária da galactomanana fenogrego. Outras fontes de galactomananas utilizadas comercialmente são *Ceratonia siliqua* e *Caesalpinia spinosa*, de alfarroba e tara, respectivamente, pertencentes à subfamília Caesalpinioideae (ERNANI, 1994; POLLARD *et al.*, 2010).

2.2.1 Estrutura

A estrutura básica das galactomananas pode ser representada de acordo com a figura 4. As unidades de D-manose se repetem ao longo da cadeia principal, enquanto as de D-galactose ocorrem na cadeia como substituintes no carbono 6 da D-manose em ligação $\alpha(1\rightarrow6)$ (POLLARD, FISHER, 2006). No esquema da figura 4 estão destacadas as relações manose:galactose (Man:Gal) das galactomananas de guapuruvu, barbatimão e bracatinga.

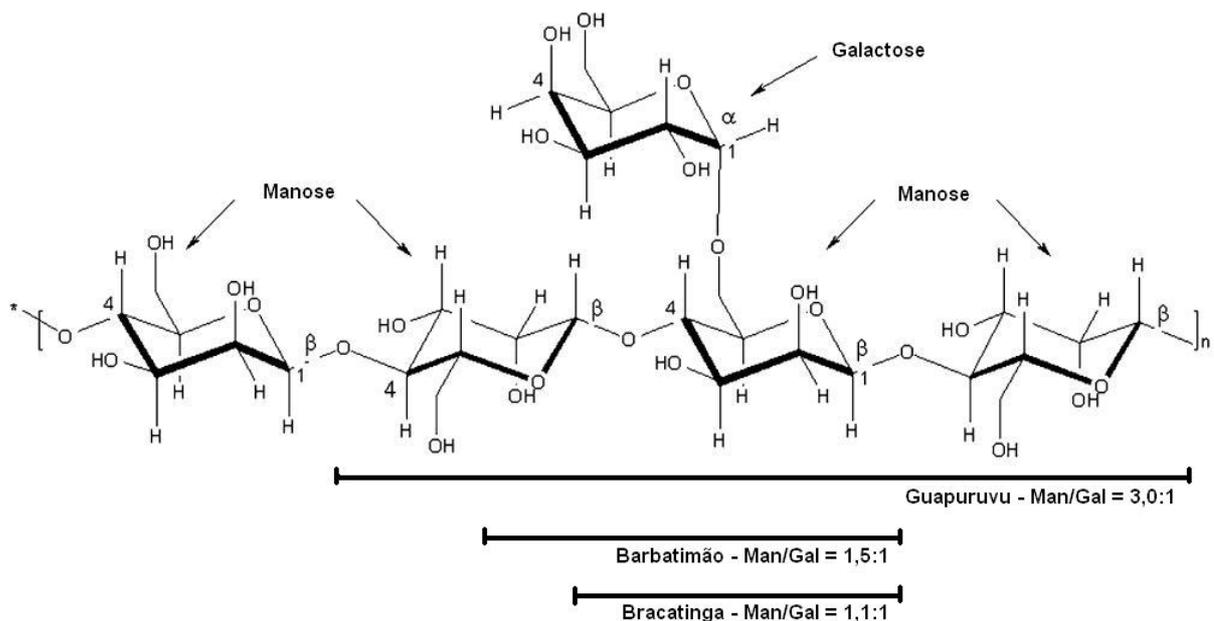


FIGURA 4 – ESTRUTURA GERAL DAS GALACTOMANANAS

FONTE: adaptado de Secouard, Grisel, Malhiac (2007)

Ganter *et al.* (1995) verificaram a distribuição de unidades de D-galactose ao longo da cadeia principal de manose através de ressonância magnética nuclear (C^{13} RMN) para galactomananas de bracatinga, guapuruvu e barbatimão. A bracatinga, que é altamente substituída por grupos D-galactosil, caracteriza-se pela presença de 2 substituições seguidas na cadeia de manose. Para guapuruvu e barbatimão, ocorre uma substituição a cada duas unidades de D-manose; no entanto, o sinal em 78.6 mais intenso para guapuruvu revelou a presença de regiões não-substituídas. Esses

resultados são consistentes com um arranjo aleatório das unidades de D-galactose nas 3 galactomananas.

Avaliando os polissacarídeos de uso industrial, a galactomanana da goma guar é mais substituída do que a de alfarroba, por isso mais solúvel. A maior solubilidade é atribuída à significativa hidratação das regiões ricas em galactose. No entanto, associações intermoleculares podem ocorrer na cadeia principal, de manana, em regiões com mais de 6 unidades de manose não substituídas (DEA, CLARK, MCCLEARY, 1986). A goma tara apresenta solubilidade intermediária, pois é menos substituída que o guar e possui mais unidades de D-galactose que alfarroba (DAKIA *et al.*, 2008).

A figura 5 mostra, de maneira esquemática, a seqüência de distribuição das unidades de D-galactose ao longo da cadeia D-manose, a influência que o tamanho da cadeia causa na massa molecular do polímero e a seqüência de distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia de manose.

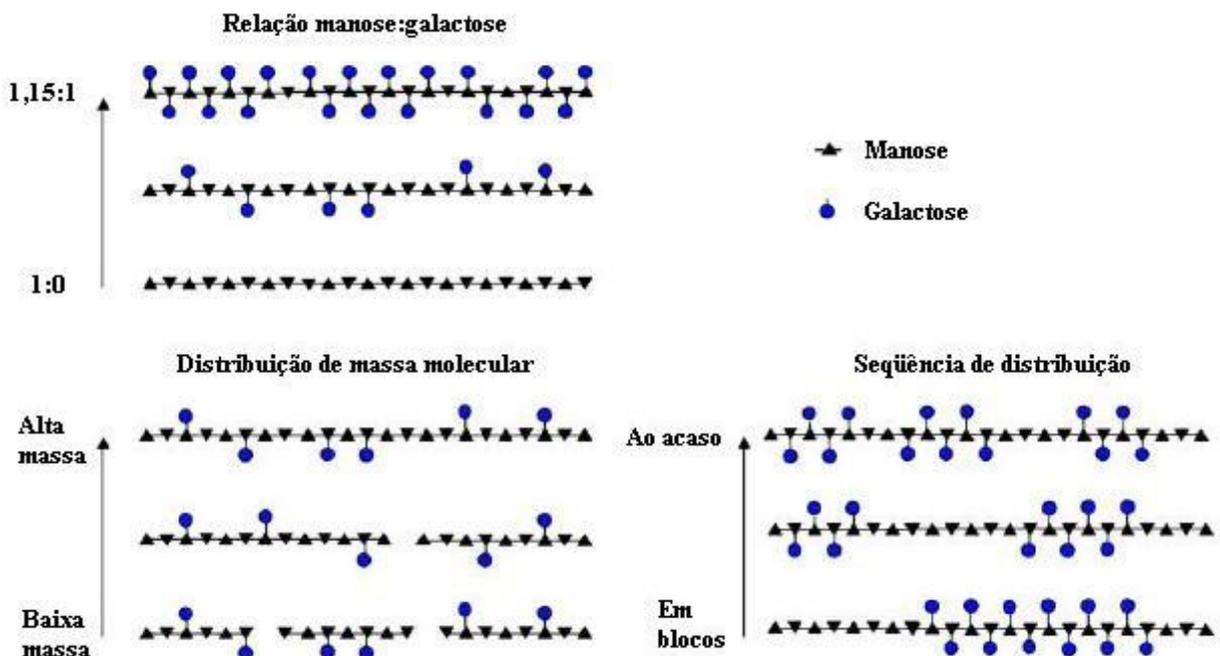


FIGURA 5 – COMPOSIÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E SEQÜÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES DE D-GALACTOSE NAS GALACTOMANANAS

FONTE: adaptado de Pollard, Fischer (2006)

No que se refere à seqüência de distribuição das unidades de D-galactose ao longo da cadeia da manana, pode-se classificar o polímero em distribuição ao acaso, alternada ou em blocos, fator que determina a interação com outros polissacarídeos (DEA, MORRISON, 1975).

É conhecido que galactomananas apresentam diferentes características moleculares em solução, como diferentes conformações, fato muitas vezes atribuído ao resultado direto da massa molecular ou de diferenças de comprimento da cadeia polimérica, bem como de seus substituintes. A viscosidade intrínseca também pode ser influenciada por uma expansão ou contração da cadeia, devido à influência da substituição da cadeia de manose por galactose (SEMENOVA, 2007; POLLARD *et al.*, 2010).

2.2.2 Propriedades fisiológicas e aplicação industrial

Polissacarídeos não amiláceos são os principais constituintes das fibras dietéticas, que é um termo genérico para substâncias encontradas nas porções comestíveis da planta, resistentes à digestão e à absorção pelo intestino delgado humano e com fermentação completa ou parcial pelo intestino grosso (SLAUGHTER *et al.*, 2002; ESPOSITO *et al.*, 2005).

As fibras dietéticas são classificadas de acordo com sua solubilidade em água, em solúveis e insolúveis. Como exemplos de fibras insolúveis, encontram-se celulose, hemicelulose e lignina e alguns exemplos de fibras solúveis são as pectinas, gomas e mucilagens, tais como galactomananas (ESPOSITO *et al.*, 2005).

Os efeitos das fibras solúveis no metabolismo são altamente benéficos, como a diminuição do LDL-colesterol (BEHR *et al.*, 1998) e lipídeos totais (SRICHAMROEN *et al.*, 2008) e podem resultar na formação de soluções viscosas no trato gastrointestinal e retardar a absorção de nutrientes, como, por exemplo, a de glucose no intestino delgado (SLAUGHTER *et al.*, 2002). Apresentam-se ainda como bom substrato para algumas cepas de bactérias lácticas e bifidobactérias, que constituem

ação prebiótica, promovendo equilíbrio da microflora intestinal, benéfica à saúde do intestino (GRIZARD, BARTHOMIEUF, 1999). De acordo com tais propriedades, esses produtos podem ser utilizados na prevenção e tratamento de desordens metabólicas (SLAUGHTER *et al.*, 2002).

Inicialmente, as propriedades anti-diabéticas das espécies vegetais foram atribuídas ao alto teor de galactomananas das sementes, portanto ao elevado teor de fibras. No entanto, hoje se sabe que outros componentes também estão envolvidos nesta ação, como a 4-hidroxiisoleucina e as saponinas esteroidais (BASU, SRICHAMROEN, 2010).

Ao aumentar a viscosidade do conteúdo intestinal, as fibras retardam a absorção de carboidratos, afetando a resposta de glucose plasmática pós prandial. Além disso, aumentam a presença dos ácidos graxos de cadeia curta no intestino. Quando administradas sob forma de suplementos, as fibras solúveis também apresentam-se eficazes na redução de lipídeos totais circulantes no sangue (BASU, SRICHAMROEN, 2010).

Além de constituírem benefícios ao organismo humano, as propriedades físico-químicas das galactomananas são vantajosas para o uso industrial. Devido a tais propriedades, as galactomananas são utilizadas comercialmente em alimentos como espessantes e agentes geleificantes, além de estabilizantes em dispersões. Os espessantes aumentam a resistência ao fluxo de um líquido e promovem “corpo” e textura ao alimento (SANFORD, BAIRD, 1983). Atuam sobre o controle da textura, manutenção da característica da mistura e controle da mobilidade de água em produtos alimentícios (ACHAYUTHAKAN, SUPHANTHARIKA, 2008).

As galactomananas de guar e de alfarroba ou locusto são as espécies mais utilizadas na indústria alimentícia (DOYLE *et al.*, 2006). A galactomanana de tara tem sido aceita como uma alternativa às já utilizadas no uso industrial (AZERO, ANDRADE, 2002).

Esses polissacarídeos são utilizados em alimentos com diferentes propriedades (AZERO, ANDRADE, 2002), como em produtos lácteos como espessantes de sobremesas ou sorvetes. Podem ser também utilizadas como geleificantes de produtos à base de frutas, em misturas com pectinas, produtos em pó (sobremesas e pudins) e

produtos de panificação, como misturas para bolos e tortas (REID, EDWARDS, 1995).

Incluindo as características de espessante e geleificante, as galactomananas são capazes de interagir com outros polímeros, como proteínas, amido e outros polissacarídeos. A interação promove modificações das propriedades físico-químicas de cada componente, causando efeito sinérgico como aumento na viscosidade da mistura ou mesmo a geleificação (CUI *et al.*, 2006).

Galactomananas pouco substituídas interagem com carragenanas, porém muito melhor com agarose, por esta ser constituída apenas por cadeia formada por unidades de D-glucose (glucana). A combinação entre as gomas xantana e alfarroba resulta em um gel forte; o local de interação da goma xantana com a goma alfarroba é composto pelos segmentos de cadeia substituída (DEA, MORRISON, 1975; DEA, CLARK, MCCLEARY, 1986).

Devido às suas características estruturais, as galactomananas exibem interações sinérgicas com outros polissacarídeos que possuem cadeia principal rígida, como xantana, κ -carragenana e agarose. Essas interações têm sido amplamente estudadas a fim de buscar alternativas para a indústria alimentícia e melhorar o processo e a qualidade dos produtos já existentes (CUI *et al.*, 2006). As texturas obtidas pela sinergia entre os polissacarídeos variam entre macias, elásticas à mastigação e géis rígidos (SANFORD, BAIRD, 1983).

O sistema xantana-galactomanana é empregado porque individualmente estes polissacarídeos sozinhos não são capazes de formar gel, porém sua mistura resulta em um espessante bastante eficaz. Bresolin *et al.* (1997) investigaram o mecanismo de interação entre xantana e galactomanana de bracinga e guapuruvu através de análises reológicas. Estes autores observaram que o mecanismo de interação da xantana com a galactomanana de bracinga, que é altamente substituída, ocorreu diferentemente dos modelos propostos anteriormente para galactomanana de guapuruvu, que interage com xantana através da região não substituída desta última.

Koop *et al.* (2009) investigaram as propriedades reológicas do sistema xantana-galactomanana, de bracinga ou guar, como matriz em formulações contendo ácido ascórbico e 1,2-propanodiol. Os autores observaram melhoria no comportamento

do hidrogel com galactomananas provenientes de ambas as espécies em dispersões em tampão fosfato e 1,2-propanodiol. Os testes de estabilidade sugeriram que os hidrogéis contendo galactomanana representam uma matriz potencial para formulações cosméticas com ácido ascórbico.

2.2.3 Extração

Há uma semelhança entre os polissacarídeos do endosperma das sementes de guapuruvu e alfarroba. Enquanto o primeiro apresenta relação Man:Gal 3:1 (GANTER *et al.*, 1995), a galactomanana de alfarroba apresenta a relação 3,5:1 (DAKIA *et al.*, 2008), podendo atingir a relação 4:1 (POLLARD *et al.*, 2007).

Na maioria dos estudos que envolvem extração de galactomananas do endosperma de leguminosas, os procedimentos de moagem e extração não são especificados em detalhes ou mesmo citados. O tratamento seqüencial das sementes deve incluir moagem das sementes inteiras e extração aquosa das galactomananas pelas etapas de agitação e posterior precipitação em meio alcoólico (DAKIA *et al.*, 2007; POLLARD *et al.*, 2008).

As extrações de galactomananas de sementes de alfarroba e goma guar em escala industrial usualmente envolvem a remoção da casca por moagem da semente (DEA, MORRISON, 1975). Os polissacarídeos podem ser obtidos puros mediante extração aquosa após o endosperma ser separado do embrião. Esse processo pode ser realizado pela fervura das sementes em água ou álcool até que a separação manual dos componentes da semente seja possível (BUCKERIDGE, DIETRICH, LIMA, 2000).

Em sementes como de fenogrego, o método de separação manual dos componentes da semente apresenta vantagem, pois nas células do endosperma há pouca quantidade de citoplasma após a maturação da semente e separá-lo do embrião é um importante passo de purificação (BUCKERIDGE, DIETRICH, LIMA, 2000).

Diferentes metodologias têm sido propostas para extração de galactomananas de sementes, como apresentado na tabela 1.

TABELA 1 – METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE ALGUMAS GALACTOMANANAS

continua

Espécie	Material extraído Rendimento	Solvente	Tempo; temperatura*	Inativação enzimática	M _w (x10 ⁶ g/mol)	R _{g(w)} (nm)	[η] _w (mL/g)	Relação Man: Gal	Referência
Faboideae									
<i>C. tetragonoloba</i> (guar)	Semente inteira	Água	Overnight, 34°C	-	1,39	-	1050	1,6:1	Rayment <i>et al.</i> (1995)
	-	-	-	-	1,303	76,64	1050	2:1	Brummer, Cui, Wang (2003)
<i>T. foenum-graecum</i> (fenogregó)	Semente inteira; 22%	Água	2 horas, 10°C	Etanol 70%, 180 min	1,418	75,08	961	1,2:1	Brummer, Cui, Wang (2003)
Caesalpinoideae									
<i>C. siliqua</i> (alfarroba)	Semente inteira; 56%	Água	1 hora, a 100°C	-	1,024	61,0	710	3,5:1	Dakia <i>et al.</i> (2008)
	Endosperma	Água	Pré tratamento: 90°C + 3 dias, 25°C	-	0,99	-	1460	-	Pollard <i>et al.</i> (2008)
<i>C. spinosa</i> (tara)	Endosperma	Água	1 hora, 95°C	-	1,4	-	1730	3:1	Pollard <i>et al.</i> (2010)

TABELA 1 – METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DE GALACTOMANANAS COMERCIAIS E DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU
conclusão

Espécie	Material extraído Rendimento	Solvente	Tempo; temperatura*	Inativação enzimática	M _w (x10 ⁶ g/mol)	R _{g(w)} (nm)	[η] _w (mL/g)	Relação Man: Gal	Referência
<i>S. parahybae</i> (guapuruvu)	Endosperma; 25%	Água	4 horas, 25°C	-	1,35	-	1280	3:1	Bresolin <i>et al.</i> (1997)
	Endosperma; 27,5%	Água	1 hora, 25°C	Água 98°C, 10 minutos	1,56	108,6	-	3,2:1	Vianna-Filho (2009)
Mimosoideae									
	Semente inteira; 17%	Água	4 horas, 25°C	-	1,4	-	740	1,1:1	Bresolin <i>et al.</i> (1997)
<i>M. scabrella</i> (bracatinga)	Semente inteira; 28%	Água	25°C	Água 98°C, 10 minutos	1,15	73	740	1,1:1	Ganter, Reicher (1999)
	Semente inteira (extração A**)	Água	1 hora, 25°C	Água 98°C, 10 minutos	0,57	-	-	-	Noleto <i>et al.</i> (2009)
<i>S. adstringens</i> (barbatimão)	Semente inteira	Água	16h, 4, 25, 60°C	Metanol- água, 30min	-	-	1400	1,5:1	Ganter <i>et al.</i> (1995)
	Semente inteira	Água	16h, 4, 25, 60°C	Metanol- água, 30min	-	-	1400	1,5:1	Reicher <i>et al.</i> (1992)

NOTAS: os espaços não preenchidos (-) correspondem à ausência dos respectivos parâmetros na referência correspondente; * os resultados de M_w, R_g e [η] das espécies que apresentaram mais de uma temperatura de extração correspondem à temperatura de 25°C; ** a referência indica duas extrações, de galactomananas A e B, conforme detalhado nos parágrafos abaixo

Na tabela 1, Rayment *et al.* (1995) avaliaram propriedades reológicas da galactomanana de guar, obtida por extração aquosa a 34°C, sob agitação durante a noite e obtiveram parâmetros físico-químicos como $1,39 \times 10^6$ g/mol para massa molecular ponderal média (M_w) e 1050 mL/g para $[\eta]$. A relação Man:Gal foi de 1,6:1, semelhante aos valores previamente dispostos na literatura.

Para a purificação da galactomanana de guar destinada à aplicação biológica, Cunha *et al.* (2007) desenvolveram quatro métodos: 1 – tratamento com enzima proteolítica, 2 – etapas sucessivas de dissolução, centrifugação e precipitação; 3 – precipitação com solução de Fehling; 4 – método 2 seguido de 3. Os parâmetros avaliados foram rendimento, proteínas, contaminação por mono, oligo e polissacarídeos, cobre, turbidez, e parâmetros reológicos como energia de ativação do fluxo e temperatura inicial. Os resultados obtidos para viscosidade intrínseca ($[\eta]_w$) e M_w apresentaram redução progressiva do método 1 ao método 4, e os maiores valores, obtidos pelo método 1, $[\eta]_w$: 1000,9 mL/g e M_w : $3,5 \times 10^6$ g/mol, foram inferiores aos da amostra não purificada, $[\eta]_w$: 1250 mL/g e M_w : $4,5 \times 10^6$ g/mol. Segundo os autores, considerando a utilização de grande quantidade de galactomanana de guar, o método 2 foi indicado para encapsulamento de drogas, enquanto o método 4 foi observado como ideal para tratamento de osteoartrite, considerando o percentual de proteínas como parâmetro crucial. Levando em conta a pureza, estabilidade térmica, propriedades reológicas da galactomanana e o custo e a simplicidade do procedimento, o método 2 pareceu ser o mais vantajoso para aplicação biológica.

Brummer, Cui, Wang (2003) realizaram análises físico-químicas da extração aquosa fervente, por aproximadamente 2h, de galactomanana de fenogrego (*Trigonella foenum-graecum*) e de galactomananas de guar e alfarroba. Para a galactomanana de fenogrego, os resultados de M_w , R_g , $[\eta]_w$ e relações Man:Gal foram de 1,418 g/mol, 75,08 nm, 961 mL/g e 1:1, respectivamente. Os autores utilizaram a enzima pronase e promoveram a purificação da galactomanana de fenogrego a partir do processo de extração seqüencial realizado a 10°C, por 3 horas, por esta apresentar quantidade de proteína inferior à da fração obtida por extração direta não enzimática. Foi observado ligeira diferença na relação Man:Gal entre os processos de extração, 1,02:1 na extração direta e 1,05:1 na extração seqüencial. O valor de M_w manteve-se em torno de $1,4 \times 10^6$

g/mol, valor superior aos das galactomananas comerciais, fato justificado por modelagem molecular presente na literatura, que indica que a introdução do grupo galactosil na manana induz a uma redução da dimensão da cadeia (PETKOWICZ *et al.*, 1999).

Smirnova *et al.* (2004) realizaram extrações de galactomanana de sementes de *Styphnolobium japonicum* (Sófora-do-Japão) a 25°C, purificada com complexo de Cu^{2+} , e a 70°C e verificaram que a relação Man:Gal da extração “a frio” foi de 4,8:1 e a quente, de 5,3:1. Houve diferenças quanto aos valores de massa molecular (M_w) das galactomananas entre os 2 processos de extração e em relação à literatura (7000 kDa em Kooiman, 1971), onde são encontrados valores inferiores aos obtidos: 1190 kDa (g/mol) para a extração a frio e 1400 kDa (g/mol) para a extração a quente.

Cerqueira *et al.* (2009) estipularam 3 metodologias para avaliar o rendimento de extração e purificação das galactomananas de *Adenanthera pavonina*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Gleditsia triacanthos* e *Sophora japonica*: 1 – massa do endosperma em relação à massa de sementes inteiras; 2 – massa do endosperma em relação à massa da extração etanólica do polissacarídeo após filtração e centrifugação do material; 3 – rendimento total da extração e purificação. O melhor rendimento foi obtido para *G. triacanthos* e *C. pulcherrima*, que apresentaram valores próximos a 25% e relações Man:Gal em torno de 3:1, condizentes com a literatura (ANDRADE *et al.*, 1999; SCIARINI *et al.*, 2008) e semelhantes a galactomananas comerciais como alfarroba, o que indica que a metodologia empregada pode ser extrapolada a outras galactomananas. Os resultados também mostraram que o processo de extração e purificação permite valores de pureza entre 80 e 98%, avaliados a partir do conteúdo total de monossacarídeos das amostras.

Pollard *et al.* (2008) desenvolveram uma metodologia para a extração de galactomanana de alfarroba que abrangeu pré tratamento das sementes inteiras a 90°C, imersão das sementes em água por 3 dias e extração do endosperma manualmente, imersão do endosperma em água por 30 minutos para aumentar a hidratação e moagem do endosperma hidratado. Os autores avaliaram se o procedimento influenciava a massa molecular da galactomanana, que industrialmente é derivada de extração de uma mistura de sementes de diferentes origens. Verificaram que o método utilizado

não alterou a estrutura das galactomananas e, portanto, não modificou a massa molecular.

Dakia *et al.* (2008) realizaram extração por 1 hora a 100°C de galactomananas de alfarroba e obtiveram rendimento de 56% a partir das sementes inteiras e a relação Man:Gal de 3,5:1. Analisaram os polissacarídeos por HPSEC, com a obtenção de M_w , R_g e $[\eta]_w$ de $1,024 \times 10^6$ g/mol, 61 nm e 710 mL/g, respectivamente.

De maneira semelhante, Pollard *et al.* (2010) realizaram extração de galactomananas de tara por 1 hora a 95°C, cuja relação Man:Gal encontrada na literatura é de 3:1 (DAAS *et al.*, 2002; BRUMMER, CUI, WANG, 2003). Na análise por HPSEC, obtiveram $1,4 \times 10^6$ g/mol relativo a M_w e 1730 mL/g referente a $[\eta]_w$.

Extrações de galactomananas de fontes nativas, como bracatinga, barbatimão e guapuruvu, foram relatadas na literatura. Bresolin *et al.* (1997) realizaram extrações aquosas de guapuruvu e bracatinga por 4 horas a 25°C. Os autores obtiveram relações Man:Gal de 3:1 e 1,1:1, M_w de 1,35 e $1,4 \times 10^6$ g/mol e $[\eta]_w$ de 1280 e 740 mL/g, respectivamente para guapuruvu e bracatinga. Tais parâmetros foram resultantes de análises por espalhamento de luz (SEC) com um ângulo e detector viscosimétrico acoplado.

Vianna-Filho (2009) e Ganter, Reicher (1999) realizaram extrações aquosas por 1 hora a 25°C, de galactomananas de guapuruvu e bracatinga, cujas relações Man:Gal foram respectivamente de 3,2:1 e 1,1:1 e os rendimentos foram de 25% com relação ao endosperma de guapuruvu e 28% com relação à semente inteira de bracatinga. Em ambos os processos foi realizada inativação enzimática com água fervente por 10 minutos e os resultados referentes a M_w foram de 1,56 e $1,15 \times 10^6$ g/mol e a $[\eta]_w$ foram de 1280 e 740 mL/g, respectivamente para guapuruvu e bracatinga. As análises de guapuruvu foram realizadas utilizando HPSEC-MALLS, enquanto de bracatinga, apenas SEC, com resultado adicional de R_g , 73 nm.

Recentemente, Noleto *et al.* (2009) realizaram extrações de galactomananas de sementes de bracatinga por dois procedimentos diferentes: A – extração aquosa por 1 hora com inativação enzimática através de água fervente por 10 minutos, B – extração aquosa por 5 horas sem inativação enzimática. Os autores verificaram que os diferentes processos resultaram em variações de massa molecular ponderal média

(M_w) e índice de polidispersão (M_w/M_n). O valor de M_w encontrado para o procedimento de extração A foi de $5,706 \times 10^5$ g/mol e para B, $3,508 \times 10^4$ g/mol e a redução foi atribuída à ação enzimática. O M_w/M_n foi de 1,1 e 1,7, para as extrações A e B, respectivamente.

Extrações de galactomananas de barbatimão foram realizadas pelo grupo de química de carboidratos vegetais da UFPR (Ganter *et al.* 1995; Reicher *et al.* 1992) onde demonstraram que extrações aquosas a 4, 25 e 60°C foram realizadas. Em ambos os estudos, as galactomananas apresentaram relações Man:Gal de 1,5:1 e $[\eta]_w$ de 1400 mL/g.

As metodologias de extração variando temperatura implicam em diferentes relações Man:Gal, valores de massa molecular e viscosidade intrínseca para os polissacarídeos analisados. Resultados diversificados de rendimento empregando um mesmo método de extração são consequência da análise de diferentes espécies, mesmo que apresentem relações Man:Gal semelhantes (DA SILVA, GONÇALVES, 1990; FERNANDES, 1994).

A maior parte dos estudos envolvendo extrações de galactomananas incluem, além dos rendimentos e relações Man:Gal, resultados de massa molecular (M_w) e viscosidade intrínseca ($[\eta]_w$). Tais parâmetros são obtidos por técnicas de análise de polímeros, e mais recentemente são analisados por espalhamento de luz.

2.3 ANÁLISE DE POLÍMEROS

2.3.1 Espalhamento de luz

O espalhamento de luz é um dos poucos métodos absolutos capazes de determinar a massa molecular e, certamente, é aplicável sobre a mais ampla gama de massas moleculares (WYATT, 1993). Oferece informações ao nível molecular,

permitindo a determinação da massa da partícula, forma e dimensão (NICOLAU *et al.*, 2009).

Qualquer sistema é capaz de espalhar luz, porém o interesse maior está no estudo de sistemas puros ou de moléculas dispersas ou em suspensão. Através do espalhamento de luz observa-se principalmente moléculas pequenas, polímeros e agregados moleculares em soluções, dispersões de colóides, suspensões e géis (CHU, 1991).

Quando a luz incide sobre uma partícula, ela pode ser desviada, absorvida ou transmitida. Para as partículas que são grandes em comparação com o comprimento de onda da luz emitida, ocorre a reflexão, refração ou difração. Para as partículas menores ou de mesmo tamanho do comprimento de onda incidente, ocorre o espalhamento de luz (JONES, 1999).

2.3.1.1 HPSEC-MALLS

Diversas técnicas tais quais refratometria, difração de raios-X e espalhamento de luz dinâmico já foram utilizadas na análise de polímeros. Alguns autores, porém, utilizam a multidetecção acoplada ao espalhamento de luz no estudo de macromoléculas, exploram fundamentos matemáticos e desenvolvem técnicas de obtenção de parâmetros como massa molecular ponderal média (M_w) a partir da correlação com outros parâmetros como raio de giro (R_g) e viscosidade intrínseca ($[\eta]$) (WYATT, 1993; REED, 1996). Para a análise dos polissacarídeos poliestireno sulfonato de sódio, hidrobrometo de poli(L-lisina), dextrana e pectina (PC1), Michel (1999) apresentou resultados de dissolução, agregação e degradação pelo emprego das técnicas de cromatografia de exclusão estérica de alta performance, acoplada a espalhamento de luz laser com multiângulos (HPSEC-MALLS).

A luz é espalhada pela interação dos elétrons nas moléculas com a radiação incidente. O campo elétrico oscilatório causa uma vibração nos elétrons gerando dipolos oscilatórios, que reemitem a radiação. Como a movimentação dos elétrons são

fontes de radiação em movimento, a frequência da radiação é deslocada para frequências maiores ou menores, dependendo de sua velocidade e de sua direção relativa ao detector, o que caracteriza o efeito Doppler. As moléculas em solução se movem em todas as direções com igual probabilidade e apresentam velocidade contínua de distribuição. Dessa forma, a extensão do espectro é observada (SANTOS, CASTANHO, 1996).

O detector de espalhamento de luz estático utiliza o princípio de que a intensidade de luz polarizada por uma molécula é diretamente proporcional à massa molecular, conceito que caracteriza o espalhamento de Rayleigh. Este sistema mede a média total de intensidade de espalhamento em um determinado período e proporciona análises rápidas, depende de apenas uma solução para emitir resultados e determina os parâmetros contidos na equação básica do espalhamento de luz, a equação de Rayleigh (1) (WYATT, 1993; KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004; AL-ASSAF, PHILLIPS, WILLIAMS, 2006; SEMENOVA, 2007; GABORIEAU *et al.*, 2008):

$$Kc/ R\theta = (1/M_w + 2A_2c)[1 + (16\pi^2/3\lambda^2)R_g^2\text{sen}^2(\theta/2)] \quad (1)$$

onde $R\theta$ é o razão de Rayleigh em um determinado ângulo, K é a constante óptica, c é a concentração, M_w é a massa molecular do polímero analisado, A_2 é o segundo coeficiente de expansão virial, λ é o comprimento de onda do laser, R_g é o raio de giro. A equação 2 corresponde a uma solução diluída ideal, em que não há dependência angular e concentração:

$$Kc/ R\theta = 1/ M_w \quad (2)$$

O fator K varia de acordo com cada equipamento e também pode ser determinado de acordo com a fonte de luz incidente verticalmente polarizada, conforme a equação 3:

$$K = 4\pi^2 n_o^2 (dn/dc)^2 / (N_A \lambda^4) \quad (3)$$

onde n_o^2 é o índice de refração do solvente, dn/dc corresponde ao incremento do índice de refração da amostra em função da variação da concentração, N_A é o número de Avogadro e λ , o comprimento de onda do laser (WYATT, 1993; STRELITZKI, REED, 1999).

A equação de Rayleigh/Debye/Gans (eq. 4) acrescenta parâmetros à equação de Rayleigh e pode ser descrita para uma solução não ideal com partículas grandes (4a) ou para uma solução ideal (4b):

$$Kc/ R\theta = 1/ M_w P(\theta) + 2A_2c + 3A_3c + \dots \quad (4a)$$

$$Kc/ R\theta = (1/M_w + 2A_2c)P(\theta) \quad (4b)$$

onde M_w é a média ponderal das massas moleculares em peso, A_2 é o segundo coeficiente de expansão virial e $P(\theta)$ é o fator de forma ou fator de espalhamento referente ao ângulo de análise do polímero. O segundo coeficiente virial (A_2) corresponde a uma função complexa de temperatura, pressão e outros parâmetros do sistema polímero-solvente e classifica a interação desse sistema (KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004). Em uma solução ideal, as interações entre polímero-solvente são consideradas nulas e o solvente é considerado ideal; nessas condições, o coeficiente virial é nulo. Em moléculas de alta massa molecular, devido às diferenças de espalhamento em partículas grandes, a assimetria na distribuição angular da intensidade da luz espalhada fornece informações sobre tamanho e conformação das partículas em dispersão, contidas na função $P(\theta)$ (KERKER, 1969, *apud* WYATT, 1993). A equação 5 define $P(\theta)$:

$$P(\theta) = [1 - (16\pi^2 R_g^2 n_o^2 / 3\lambda^2)] \text{sen}^2(\theta/2) \quad (5)$$

sendo θ o ângulo de espalhamento, R_g^2 o raio de giro quadrático médio das moléculas e λ o comprimento de onda (OSTER, 1972 *apud* SANTOS, CASTANHO, 1996).

A equação 4 é a base do gráfico de Zimm. Em baixas concentrações e considerando que o vetor de espalhamento (q) é escrito como: $q = (4\pi n/\lambda)\text{sen}(\theta/2)$ (eq.

6) e $q^2 \langle S^2 \rangle \leq 1$, a equação de Rayleigh modificada pode ser escrita como uma população de polímeros polidispersa, através da equação 7:

$$Kc/R\theta = \frac{1}{M_w} + (1 + \frac{q^2 \langle S^2 \rangle_z}{3}) + 2A_2 \quad (7)$$

e esta equação permite determinar o quadrado da soma das médias sobre as distâncias intramoleculares do centro de massa da partícula $\langle S^2 \rangle_z$ (STRELITZKI, REED, 1999).

A equação básica do espalhamento de luz confere a relação entre a intensidade de espalhamento e propriedades físicas da molécula. A dedução gráfica de Zimm ou Debye, entre $Kc/R\theta$ e $\text{sen}^2(\theta/2)$ extrapolada ao ângulo zero e à concentração zero, permite obter os parâmetros R_g , A_2 e M_w (NICOLAU *et al.*, 2009). A figura 6 exibe um exemplo de gráfico de Zimm, com $Kc/R\theta$ em função do $\text{sen}^2(\theta/2)$, em que os pontos que constituem as linhas horizontais correspondem à concentração e os pontos formadores das linhas verticais correspondem ao ângulo θ .

Raio de giro (R_g) refere-se à distância de rotação em torno de um eixo fixo no espaço. Dessa forma, qualquer objeto tem um número infinito de raios de giro, pois há um número infinito de eixos correspondentes. No exemplo de uma molécula esférica, o eixo passa pelo seu centro de gravidade e o raio de giro estipula o tamanho da cadeia polimérica (WYATT, 1993; RODEMBUSCH, 2001).

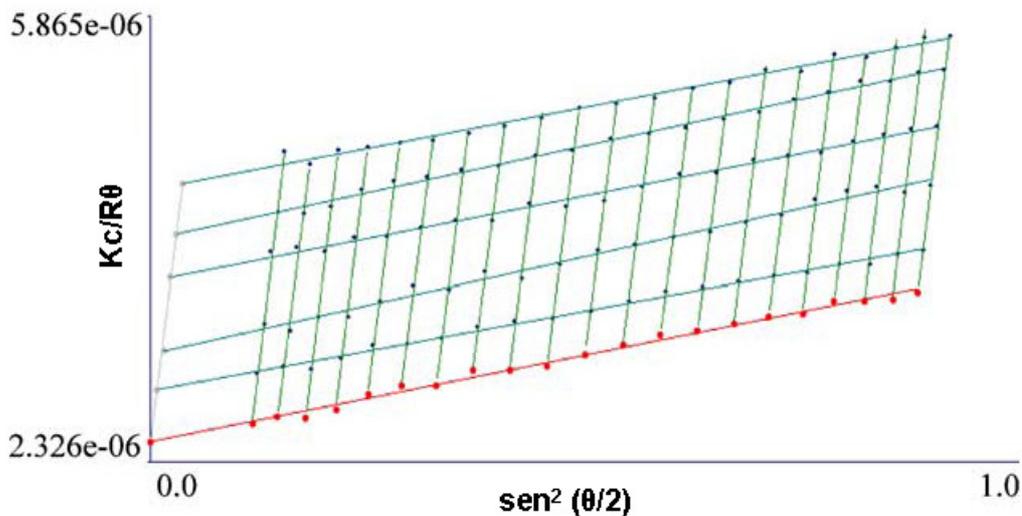


FIGURA 6 – MODELO DE GRÁFICO DE ZIMM OBTIDO POR HPSEC-MALLS
 FONTE: adaptado de Li *et al.* (2006)

A figura 7 correlaciona a distância calculada para o raio de giro (R_g) e o raio hidrodinâmico (R_h), que é obtido pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, a partir do centro de gravidade de um polímero em solução.

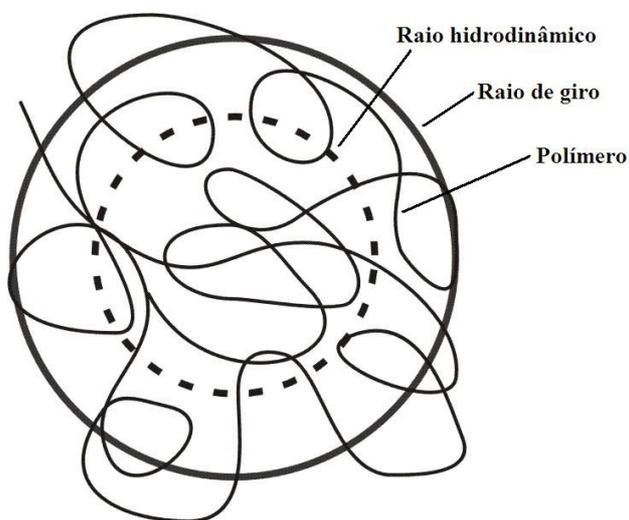


FIGURA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE RAIOS HIDRODINÂMICO E RAIOS DE GIRO DE UM POLÍMERO EM SOLUÇÃO
FONTE: Giacomelli (2008)

A cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC - *high performance size exclusion chromatography* ou GPC – cromatografia por gel permeação) acoplada a espalhamento de luz laser com multiângulos (MALLS) é utilizada no estudo do comportamento das partículas em solução. Algumas moléculas que são solúveis na fase móvel do equipamento podem ser analisadas em conjunto com outros detectores além do detector de espalhamento de luz laser em multiângulos. Dentre os possíveis detectores utilizados estão o de índice de refração (IR), que se relaciona com a concentração da solução, e o detector viscosimétrico (VIS), que determina a viscosidade absoluta do polímero em solução (KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004).

O polissacarídeo em solução a ser analisado é carregado pelo solvente até uma ou mais colunas dispostas em série, preenchidas com material poroso. A separação ideal por tamanho ocorre pela permeabilidade diferencial dos poros. As moléculas maiores, de maior massa, apresentam tempos de retenção reduzidos e aparecem

primeiro no perfil de eluição, enquanto as moléculas pequenas aparecem ao final da análise (KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004).

Como as colunas de gel permeação separam o polímero de acordo com o tamanho, cada fração é encaminhada à luz laser e os detectores multiângulos medem instantaneamente das intensidades espalhadas. O detector de índice de refração, conectado em série ao equipamento, fornece a concentração da solução polimérica (figura 8) além da taxa de recuperação, que corresponde à subtração da massa estimada (solubilizada e purificada previamente à injeção) pela concentração real (material detectado pelo detector IR) (WANG *et al.*, 2009; FUNAMI *et al.*, 2007).

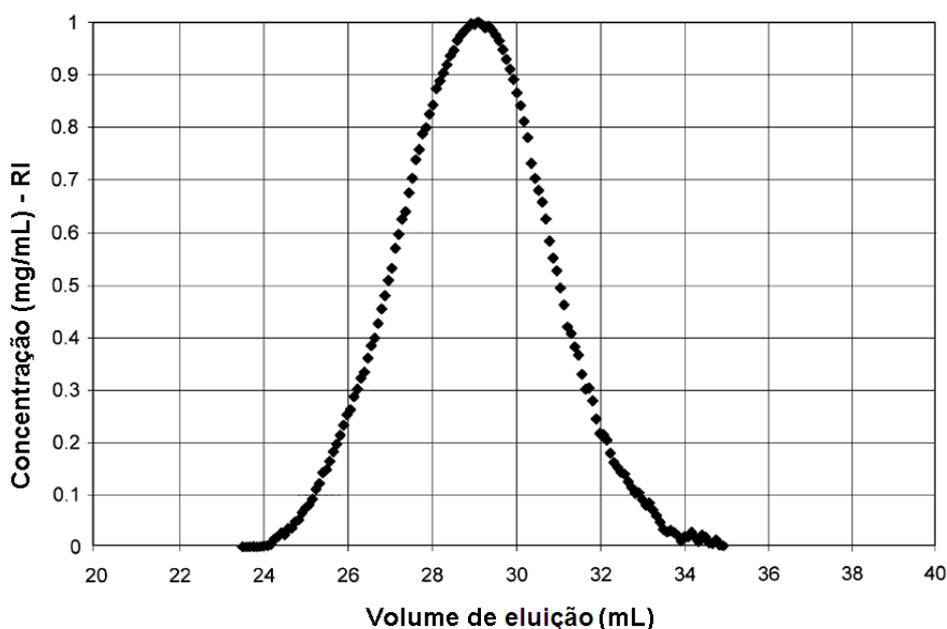


FIGURA 8 – MODELO DE PERFIL DE ELUIÇÃO OBTIDO EM GPC ACOPLADO AO DETECTOR RI EM FUNÇÃO DO VOLUME DE ELUIÇÃO DA AMOSTRA
FONTE: adaptado de Kostanski, Keller, Hamielec (2004)

Para polímeros simples, há uma única relação entre o raio de giro e a massa molecular, assim, tais polímeros são separados de acordo com a massa molecular. Polímeros complexos, de cadeia longa ramificada, por exemplo, são separados de acordo com o tamanho. Se os perfis se mostram pouco polidispersos, ou seja, apresentam tamanhos semelhantes, os detectores verificam o mesmo raio de giro para as várias massas moleculares (KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004).

O uso do detector de espalhamento de luz fornece determinações absolutas a respeito da distribuição de massas moleculares do polímero. Uma vez obtidos os valores de massa molecular ponderal em cada ponto da curva de eluição, calcula-se os valores médios de M_n (eq. 8), M_w (eq. 9) e M_z (eq. 10), que correspondem à massa molecular numérica média, massa molecular ponderal média e massa molecular z-média, respectivamente:

$$M_n = \Sigma c_i / \Sigma (c_i / M_i) \quad (8)$$

$$M_w = \Sigma (c_i M_i) / \Sigma c_i \quad (9)$$

$$M_z = \Sigma (c_i M_i^2) / \Sigma (c_i M_i) \quad (10)$$

onde c_i é a concentração em massa na espécie i e M_i é a massa do polímero em função do comprimento da cadeia i . Em um polímero composto por x frações, pode-se calcular as médias das massas utilizando as equações com o pressuposto de que as frações são tomadas em intervalos de igual volume de eluição e que a concentração de fator de resposta do detector é independente do peso molecular. Essa metodologia elimina a necessidade de utilizar uma curva de calibração a partir de padrões (REED, 1995; KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004; FUNAMI *et al.*, 2008).

A polidispersão ou distribuição bruta de massa do polímero, obtida pela relação M_w/M_n , ocorre devido a variações estruturais, tais quais: grau de substituição, padronização da substituição e grau de polimerização. Essas variações e as distribuições intra e intermoleculares associadas estão diretamente relacionadas à biossíntese da fonte de reserva da planta e apresentam importante impacto sobre a funcionalidade comercial das galactomananas (POLLARD *et al.*, 2008).

2.3.1.2 Viscosidade

A conformação de polissacarídeos em soluções aquosas pode ser investigada de acordo com a teoria de soluções poliméricas diluídas. Um polímero emaranhado ao

acaso, por exemplo, apresenta uma estrutura compacta e é altamente denso em solução, o que proporciona valores baixos de viscosidade intrínseca (DAKIA *et al.*, 2008).

A viscosidade intrínseca é uma propriedade do polissacarídeo em solução, definida como o volume hidrodinâmico ocupado pelas moléculas de um polímero isolado. Para a obtenção da viscosidade intrínseca $[\eta]$, Huggins desenvolveu um modelo matemático em função do incremento da viscosidade relativa η_i , da concentração da solução c e da constante de Huggins K , de acordo com a equação 11, extrapolando à diluição infinita:

$$\eta_i/c = [\eta] + K[\eta]^2c \quad (11)$$

O valor de K geralmente encontra-se entre 0,3 e 0,8, variando de 0,3 a 0,4 para soluções com bons solventes, de 0,5 a 0,8 para polímeros em solventes θ e acima de 0,8, pode ocorrer a formação de agregados (KHOURYIEH *et al.*, 2007; YANG, ZHANG, 2009).

A viscosidade relativa η_{rel} pode ser calculada a partir da viscosidade da solução η e da viscosidade do solvente η_s pela equação 12:

$$\eta_{rel} = \eta/\eta_s \quad (12)$$

Conforme a equação 13, o incremento da viscosidade relativa também pode ser obtida em função da viscosidade relativa η_{rel} , da viscosidade da solução η e da viscosidade do solvente η_s :

$$\eta_i = (\eta - \eta_s)/\eta_s \quad (13a)$$

$$\eta_i = \eta_{rel} - 1 \quad (13b)$$

A partir do gráfico de Huggins, que relaciona η_i/c e c , a viscosidade intrínseca é obtida pelo coeficiente linear e a constante de Huggins K é obtida pela inclinação da

reta, extrapolando à concentração zero (TANGLERTPAIBUL, RAO, 1987 apud KHOURYIEH *et al.*, 2007).

A viscosidade intrínseca é uma medida volumétrica, normalmente é expressa em dL/g, pois está relacionada com o inverso da densidade do polímero em solução. Esta pode ser determinada em sistemas de multidetecção como HPSEC-MALLS e calculada a partir da massa molecular. Somente o espalhamento de luz acoplado à multidetecção pode gerar tais parâmetros simultaneamente e de forma independente, pois a massa molecular é determinada através do espalhamento de luz, enquanto a viscosidade intrínseca é obtida através de cálculos matemáticos derivados da viscosidade absoluta, proveniente do detector viscosimétrico (DAKIA *et al.*, 2008; POLLARD *et al.*, 2010).

Para soluções aquosas não iônicas como as galactomananas, a determinação da viscosidade intrínseca assume particular importância em aplicações industriais, já que esta característica físico-química está relacionada com a estrutura química da cadeia polimérica. Galactomananas altamente substituídas resultam em valores de viscosidade intrínseca e raio de giro reduzidos, quando comparados a polissacarídeos pouco substituídos. De acordo com o exemplo demonstrado experimentalmente e por modelagem molecular, a introdução de grupos galactosil na cadeia principal de manose das galactomananas induz uma redução da dimensão da molécula e há uma correlação entre o grau de substituição, rigidez e extensão das cadeias poliméricas (PETKOWICZ, REICHER, MAZEAU, 1998; PETKOWICZ *et al.*, 1999; BRUMMER, CUI, WANG, 2003; POLLARD *et al.*, 2010).

É possível relacionar massa molecular, raio de giro e viscosidade intrínseca. A equação de Flory-Fox indica que a viscosidade intrínseca é inversamente proporcional à M_w , como indica a equação 14:

$$[\eta] = \phi_0 \bar{v}^{3/2} R_g^3 / M_w \quad (14)$$

onde ϕ_0 é o parâmetro de viscosidade, R_g é o raio de giro e M_w é a massa molecular ponderal média em peso (FLORY, 1953 apud FREITAS *et al.*, 2005).

Segundo Gidley *et al.* (1991), o raio de giro sofre influência do volume de exclusão, que é o resultado da repulsão entre as moléculas do polímero. O parâmetro de viscosidade é obtido através de dois cálculos matemáticos, cuja variável é o fator de expansão da cadeia. O fator de expansão (ϵ), inserido na equação 15, é definido como a razão das dimensões da cadeia em um determinado solvente, a uma temperatura específica. O parâmetro de viscosidade em função do fator de expansão da cadeia ($\varphi\epsilon$) está descrito na equação 16 (LUCAS, SOARES, MONTEIRO, 2001; FREITAS *et al.*, 2005).

$$[\eta] = \varphi\epsilon 6^{3/2} R_g^3 / M_w \quad (15)$$

$$\varphi\epsilon = \varphi_0(1 - 2,63\epsilon - 2,86\epsilon^2) \quad (16)$$

$$\epsilon = 2\alpha - 1 \quad (17)$$

O ângulo α define o fator de expansão da cadeia (eq. 17) corresponde à relação gráfica entre o raio de giro e a massa molecular (YAMAKAWA, 1971; GIDLEY *et al.*, 1991; FREITAS *et al.*, 2005). Para a obtenção de α através de cálculo matemático, utiliza-se a equação de Mark-Houwink-Sakurada, conforme descrito na equação 18:

$$[\eta] = KM_w^\alpha \quad (18)$$

Tanto K quanto α refletem uma combinação de contribuições; K está relacionada à flexibilidade da cadeia, inclusive à orientação das ligações glicosídicas, enquanto α reflete a geometria da cadeia ramificada, esfera, haste, bastão, emaranhado ao acaso e a qualidade do solvente: ruim, θ ou bom (YOUNG, LOVELL, 1991 *apud* PICOUT, ROSS-MURPHY, 2007). Em um gráfico que relaciona M_w e R_g , o ponto onde a reta cruza o eixo y é K e α corresponde ao ângulo da reta (FREITAS *et al.*, 2005).

Os parâmetros K e α são constantes para um polímero em solução em solvente e temperatura fixos. Para moléculas emaranhadas ao acaso flexíveis em solução com

bom solvente, o valor de α permanece entre 0,5 e 0,8, para polímeros emaranhados compactos em solvente θ (que não influencia a conformação do polímero), α gira em torno de 0,8 e no caso de cadeias rígidas, o valor de α é superior a 1,0 (HUANG, ZHANG, 2005; YANG, ZHANG, 2009).

2.3.1.2.1 Análise de agregados

É possível definir agregados como sendo estruturas de várias cadeias poliméricas entrelaçadas em solução. Esta associação pode ser induzida pelo solvente, por mecanismos eletrostáticos, pela associação de moléculas pequenas, no caso de açúcares neutros e proteínas ou resíduos de extração não removidos por purificação (MICHEL, 1999). Quando solubilizados em água, polissacarídeos formam agregados macromoleculares devido a numerosas pontes de hidrogênio intermoleculares (LI *et al.*, 2006).

A agregação em soluções poliméricas dificulta a caracterização das moléculas e das propriedades físico-químicas da solução, como propriedades termodinâmicas e espaciais, além do coeficiente de difusão, por espalhamento de luz (KANAOKA, 2003).

Alguns métodos físicos como filtração, aquecimento e centrifugação podem minimizar ou eliminar os agregados das soluções (VÅRUM *et al.*, 1992; GOMEZ *et al.*, 1997).

Através da técnica de solubilização utilizando pressão e temperatura controlados, Picout *et al.* (2003) observaram a redução da agregação molecular em xiloglucanas através de análises por espalhamento de luz. A presença de agregados nas amostras não tratadas foi qualificada pela baixa reprodutibilidade dos valores determinados para massa molecular. Com o tratamento, os resultados obtidos por HPSEC-MALLS/VIS apresentaram elevada reprodutibilidade devido à diminuição ou ausência de agregados, comprovando a estreita relação entre solubilização e formação de agregados moleculares.

Outra maneira de evitar a formação de agregados ou de redes entre as cadeias poliméricas é a derivatização. Grimm, Krüger, Burchard (1995) transformaram uma β -glucana obtida de cerveja em β -glucana tricarbamilato utilizando tetrahidrofurano como método de derivatização.

A formação de agregados aumenta expressivamente a rigidez da cadeia e essa formação pode não ser detectada por técnicas como por pressão osmótica, caso o número de moléculas envolvidas na agregação seja pequeno, entretanto pode representar uma fração significativa da massa molecular (VÅRUM *et al.*, 1992; LI *et al.*, 2006).

Embora muitos estudos de espalhamento de luz tenham sido realizados no intuito de eliminar os agregados de soluções-teste, em algumas soluções, especialmente as muito concentradas ou pouco solúveis, o processo de agregação é inevitável, o que dificulta ou impossibilita a caracterização do polímero pelas técnicas de espalhamento de luz (KANAOKA, 2003).

Sabendo-se que a intensidade de luz espalhada é proporcional à massa molecular média, mesmo uma pequena quantidade de agregados pode levar a um resultado discrepante na determinação da massa molecular do polímero (LI *et al.*, 2006). O segundo coeficiente virial (A_2) traduz a interação entre polímero e solvente, portanto, o valor negativo de A_2 confirma a presença dos agregados (KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004; YANG, ZHANG, 2009).

A agregação pode influenciar o valor da viscosidade intrínseca. Há diferenças entre os valores de viscosidade intrínseca obtida através do viscosímetro acoplado ao HPSEC-MALLS e a obtida através de análises reológicas a partir da equação 17 (página 45), de Mark-Houwink-Sakurada, que correspondem a $[\eta]_w$ e $[\eta]_r$, respectivamente. Tais diferenças podem ser devido à polidispersão e ao volume de exclusão, que influenciam o raio de giro e o parâmetro ϕ de viscosidade (FREITAS *et al.*, 2005; GIDLEY *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 2001).

A agregação pode ocorrer em uma solução de concentração finita, onde o agregado interage com nanoagregado; essa interação compõe um obstáculo na obtenção do raio de giro do polímero. Embora a interação entre os agregados possa ser eliminada extrapolando os dados para uma concentração zero, esse procedimento não é

possível se o grau de agregação for dependente da concentração. Além disso, normalmente os agregados são polidispersos e a polidispersão deve ser corrigida para a obtenção de R_g e R_h (KANAOKA, 2003).

A detecção por MALLS/RI mostra-se sensível para a detecção de agregados em soluções de polímeros, como galactomananas. O detector MALLS pode evidenciar agregados através da presença de “ombros” no pico de espalhamento de luz, que indicam massas muito polidispersas devido às populações diferentes (LANG, BURCHARD, 1993; CHENG, BROWN, PRUD’ HOMME, 2002).

A fim de observar as características físico-químicas das amostras de bracinga com processo de secagem, Vendruscolo *et al.* (2009) utilizaram HPSEC-MALLS. O aumento abrupto de massa molecular observado através da relação entre a fração de massa cumulativa e a massa molecular na secagem por spray-drier foi relacionado com agregação, evidenciando processo menos vantajoso do que o que utilizou secagem a vácuo. Agregados são inevitáveis em soluções aquosas de galactomananas, pois ocorrem pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila, e sua quantidade e tamanho foi dependente principalmente da metodologia de secagem (GANTER, SABBI, REED, 2001; WANG *et al.*, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A partir das sementes inteiras de bracatinga e barbatimão e do endosperma das sementes de guapuruvu, as galactomananas foram extraídas nos tempos 1, 2, 3, 4, 6, 24 e 48 horas direta e seqüencialmente, conforme será descrito no item 3.2 desta seção (página 51).

As galactomananas extraídas foram identificadas de acordo com a espécie, o tempo e o tipo de extração, de acordo com a apresentação da tabela 2:

TABELA 2 – IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DETIDAS NAS DIFERENTES EXTRAÇÕES

Tempo (horas)	Bracatinga		Barbatimão		Guapuruvu	
	Direta	Seqüencial	Direta	Seqüencial	Direta	Seqüencial
1	GM1d	GM1s	GS1d	GS1s	GG1d	GG1s
2	GM2d	GM2s	GS2d	GS2s	GG2d	GG2s
3	GM3d	GM3s	GS3d	GS3s	GG3d	GG3s
4	GM4d	GM4s	GS4d	GS4s	GG4d	GG4s
6	GM6d	GM6s	GS6d	GS6s	GG6d	GG6s
24	GM24d	GM24s	GS24d	GS24s	GG24d	GG24s
48	GM48d	GM48s	GS48d	GS48s	GG48d	GG48s

A galactomanana obtida de cada uma das diferentes extrações foi avaliada conforme demonstra o fluxograma da figura 9. Foi verificada a composição monossacarídica de todos os polissacarídeos das três espécies. Todas as amostras foram submetidas às avaliações de homogeneidade, diferenças de concentração por solubilização, centrifugação e dupla filtração, viscosidade intrínseca e determinação do dn/dc por índice de refração.

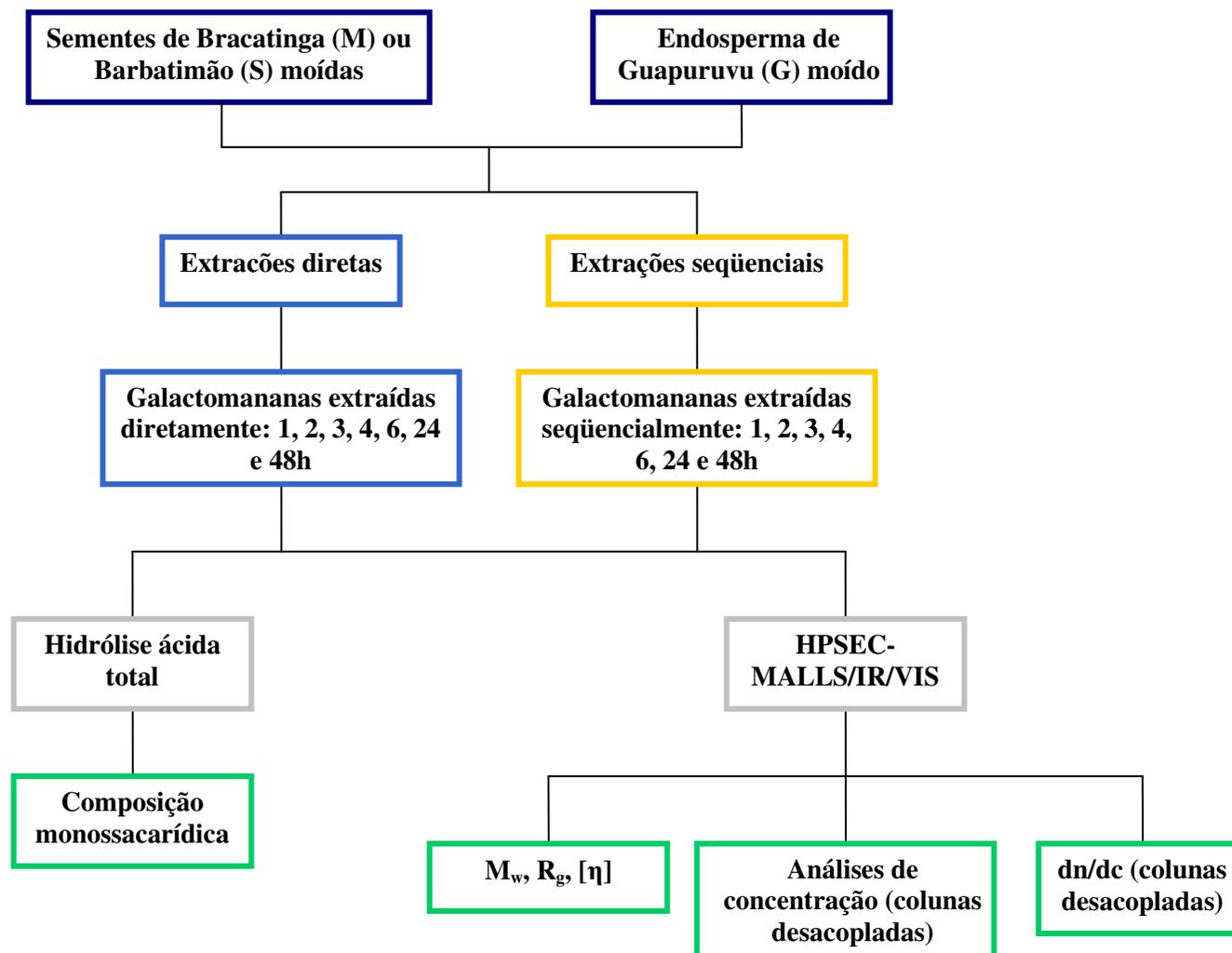


FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS

3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.2.1 Extração de galactomananas de sementes de Bracatinga, Barbatimão e Guapuruvu

As sementes de bracatinga (*Mimosa scabrella*) e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) foram adquiridas do Instituto Ambiental do Paraná, com procedência de povoamentos naturais da região de Bocaiúva do Sul e de Campo Mourão, respectivamente. As sementes de guapuruvu (*Schizolobium parahybae*) foram adquiridas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), com procedência do Viveiro Florestal da Mata Atlântica.

Inicialmente, 200 g de sementes inteiras de bracatinga e barbatimão foram processadas em moinho Standard Model NO.3 – Willey Mill – Arthur H. Thomas Co usando peneiras com abertura 2 e 1 mm.

Para a inativação enzimática das referidas sementes da extração seqüencial, 100 g de sementes moídas foram fervidas a 98°C em 800 mL de água destilada por 10 minutos e em seguida, resfriadas pela adição de gelo. O volume foi completado até 2 litros com água destilada à temperatura ambiente (25°C) para início da extração, sob agitação de 750rpm. O mesmo procedimento foi realizado para extração direta, no entanto foram utilizados 50 g de sementes moídas.

A inativação enzimática das sementes de guapuruvu ocorreu a partir de 300 g de sementes inteiras, que foram fervidas em 750 mL de água destilada por 30 minutos. Em seguida, parte do tegumento foi retirada manualmente e o material, resfriado por 18 h. Em todas as extrações seqüenciais, o volume de água foi gradativamente diminuído, conforme a redução da massa de material residual obtido a cada extração.

Cada semente de guapuruvu foi cortada longitudinalmente, seguida da retirada manual do embrião e separação do endosperma e tegumento. O endosperma foi submetido à secagem à temperatura ambiente por 3 dias. Após a secagem, o endosperma foi moído em moinho Tecnal tipo Willey TE-650 e as extrações direta e

seqüencial foram realizadas conforme descrito nas figuras 12 e 13, para as galactomananas de bracinga e barbatimão. Nas extrações diretas foram utilizados 11,5 g de endosperma moído para 1 litro de água e o material de partida das extrações seqüenciais foi 60 g de endosperma moído, que foi extraído com volume inicial de 2 litros e volumes reduzidos à medida que o material centrifugado, proveniente da extração anterior, diminuía.

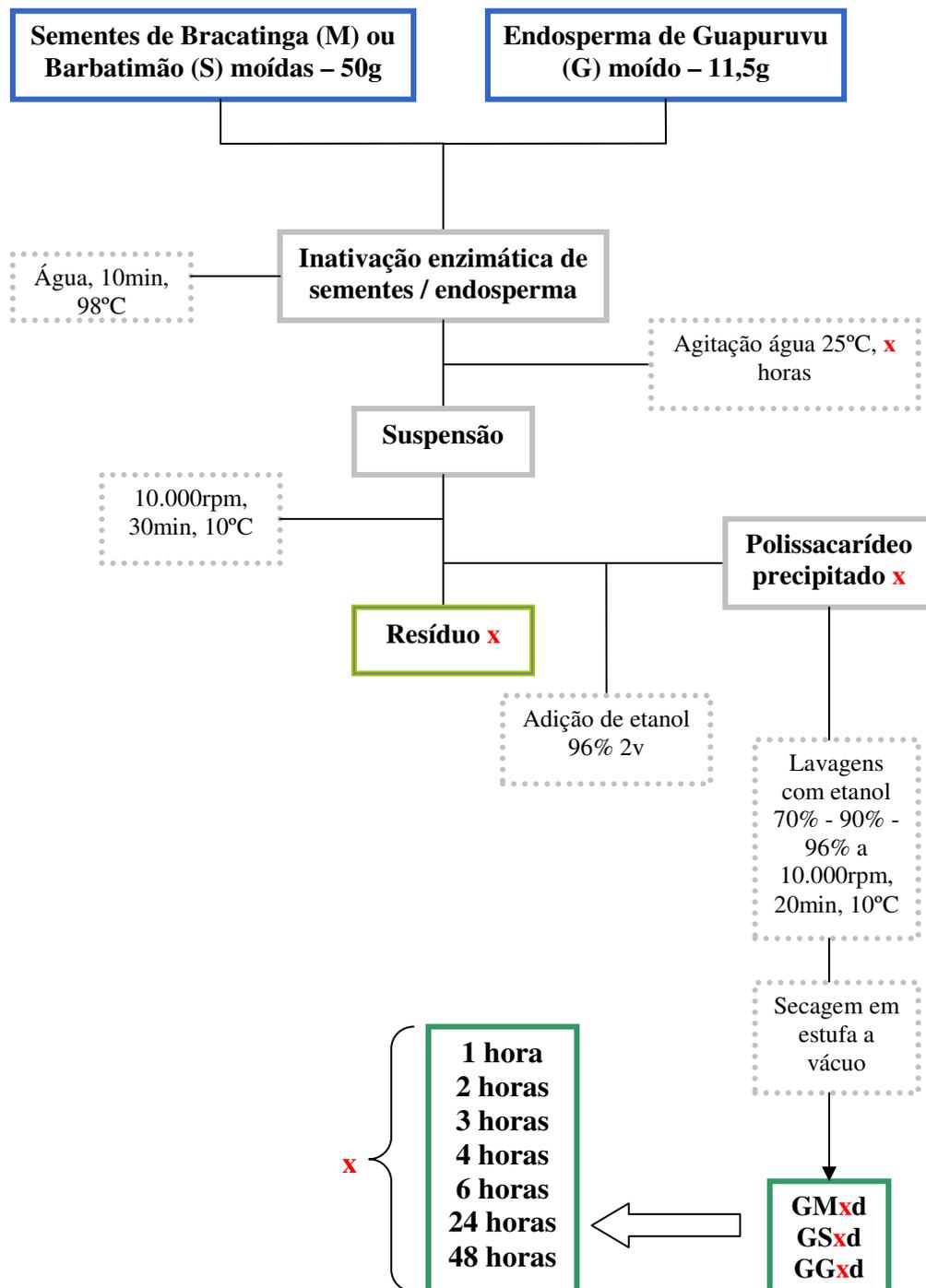
As extrações de bracinga, barbatimão e guapuruvu foram realizadas nos tempos 1, 2, 3, 4, 6, 24 e 48 horas. Foram adicionadas gotas de tolueno a fim de evitar a degradação dos polissacarídeos.

No método seqüencial, cada extração, ao término do tempo, foi centrifugada em centrífuga Hitachi Himac CR21E por 30 minutos a 10.000 rpm (1680 g) a 10°C e o resíduo obtido re-suspenso em água, com volumes decrescentes devido à redução de massa do material, para o próximo tempo de extração. A partir deste resíduo de 1 h de extração iniciou-se a próxima extração de mais 1 h (totalizando duas horas de extração) e assim sucessivamente até a extração de 48 horas, sempre partindo do resíduo resultante do processo de extração imediatamente anterior. Já no método direto, ao final de cada tempo de extração o material foi centrifugado sob as mesmas condições do método seqüencial e o resíduo foi descartado.

O sobrenadante da centrifugação de ambos os métodos foi filtrado em tecido de nylon, precipitado com etanol 96% (2 v), precedido da adição de 10 g de NaCl por litro de solução. O polissacarídeo precipitado com etanol foi mantido sob refrigeração a 4°C por 24 h. A utilização do NaCl ocorreu para a prevenção da co-precipitação de proteínas com a galactomanana.

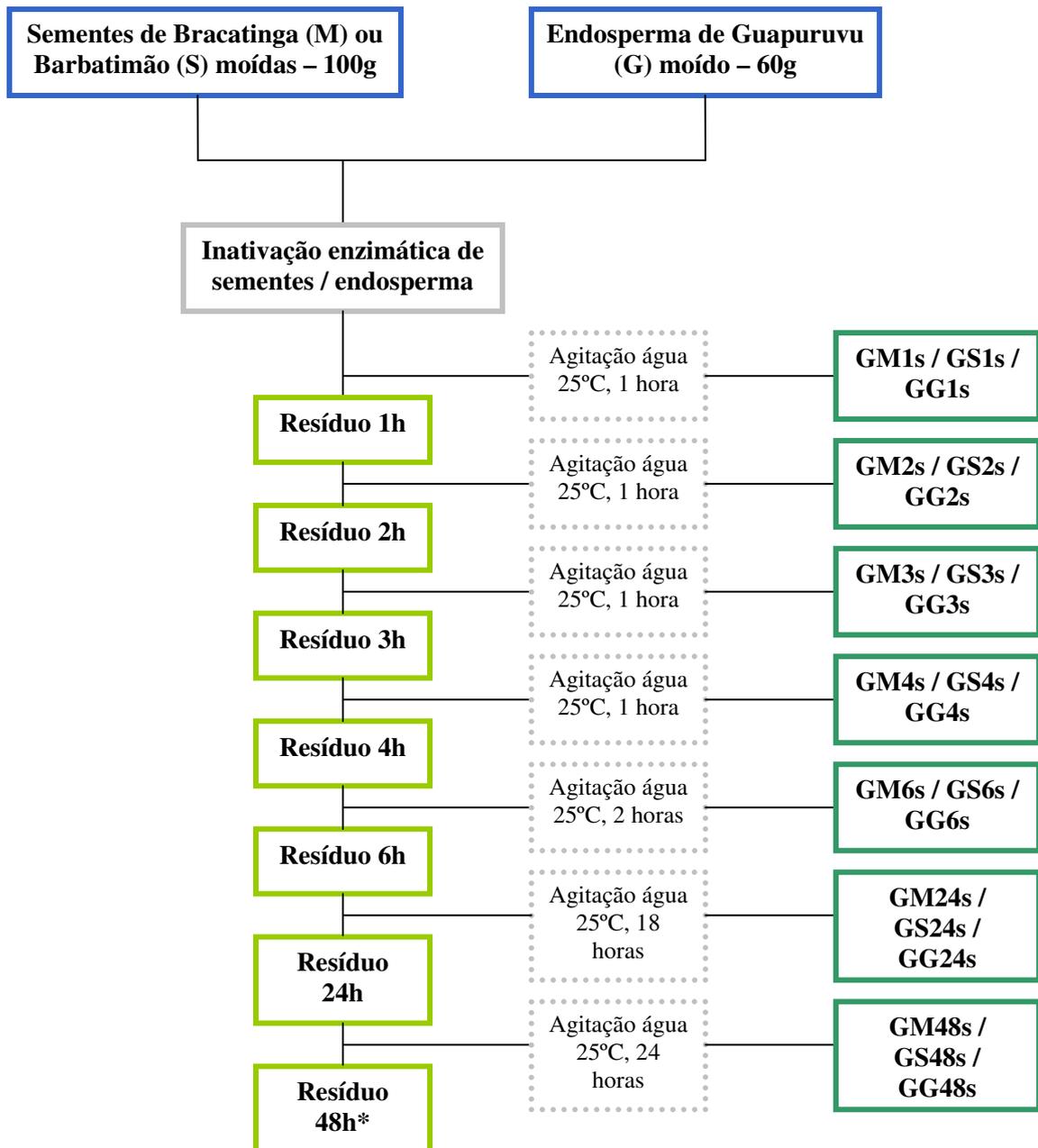
O polissacarídeo foi centrifugado por 30 minutos a 10.000rpm a 10°C. O sobrenadante etanólico foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com etanol 70% e centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm (1680g) a 10°C. O processo foi repetido com etanol 90% e 96%, então o precipitado foi disposto em placas de petri para secagem. Em seguida, foi realizada a secagem em estufa à vácuo modelo FDG Edgon 5P conectado a uma bomba JB DV-200N-250.

A obtenção das galactomananas foi realizada de acordo com os fluxogramas das figuras 10 e 11.



x – Número de horas no qual o processo de extração transcorreu

FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DIRETA DAS GALACTOMANANAS DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU



* o resíduo de 48h foi descartado

FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO SEQUÊNIAL DAS GALACTOMANANAS DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

A composição monossacarídica das amostras foi realizada através de hidrólise ácida total, redução e acetilação.

Cada amostra (2 mg) foi solubilizada em água destilada durante 16 horas. Às amostras foi adicionado 1 mL de ácido trifluoracético 4 mol/L e os tubos permaneceram a 100°C por 8 horas. O conteúdo foi evaporado e ao resíduo foi adicionado água destilada. Para redução, foi adicionado borohidreto de sódio (NaBH_4) e mantido por, pelo menos, 2 horas. Na seqüência foi adicionado resina catiônica Lewatit S-100 para remoção dos íons sódio, o material foi filtrado em algodão com adição de água e o filtrado, evaporado até a secura em rotaevaporador. Foi adicionado metanol por 3 vezes e o material, evaporado até secura em rotaevaporador (WOLFROM; THOMPSON, 1963). Os alditóis foram acetilados pela adição de 0,5 mL de piridina e 0,5 mL de anidrido acético e permaneceram por 16 horas em tubos de hidrólise lacrados. Para interrupção da reação foi adicionado gelo e na seqüência, 1 mL de clorofórmio.

A fase clorofórmica foi lavada alternadamente com sulfato de cobre (CuSO_4) e água destilada e evaporada a fim de ser analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC). O cromatógrafo gasoso marca Hewlett Packard 5890A Série II, possui um detector de ionização de chama (FID) e injetor à temperatura 250°C, coluna capilar DB-210 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), com espessura de filme de 0,25 μm a 220°C, e nitrogênio como gás de arraste em fluxo de 2 mL/min (SLONEKER, 1972). Os alditóis acetatos foram identificados por seus tempos de retenção, comparados com padrões.

3.4 ANÁLISES DE ESPALHAMENTO DE LUZ

3.4.1 Efeito da filtração sobre a eluição da amostra nas etapas de purificação e agregados de galactomananas

As análises, realizadas em triplicata, da eluição de massa de galactomananas nas etapas de purificação indicaram se ocorria alguma alteração de concentração nas diferentes etapas do preparo prévio às análises de espalhamento de luz. Os experimentos foram realizados em tempo real utilizando o sistema de cromatografia WATERS com diferentes detectores: multiângulo de espalhamento de luz laser (MALLS) DSP-F Wyatt Technology, detector diferencial de índice de refração (IR) WATERS 2410 e viscosimétrico Validyne P55 acoplado ao voltímetro Elenco Precision XP-581.

Durante o experimento foi utilizado fluxo de 1 mL/min controlado por bomba peristáltica WATERS 515 PUMP. A eluição foi monitorada por detector de índice de refração e as soluções foram analisadas usando como fase móvel solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 (200 ppm). Foi utilizado o software ASTRA versão 450 para a obtenção e interpretação dos resultados.

O tempo total de análise foi de 80 minutos, com volume total de 50 mL, com início imediato após cada preparação. As amostras analisadas foram previamente submetidas a 3 etapas de purificação, partindo de concentração inicial de 1mg/mL:

1 – filtração com membrana de acetato de celulose de porosidade 1,2 μm (amostra solubilizada por 16 horas, centrifugada a 10.000 rpm, a 12°C, por 30 minutos e filtrada em membrana de porosidade 1,2 μm);

2 – filtração com membrana de acetato de celulose de porosidade 0,45 μm (amostra solubilizada por 16 horas, centrifugada a 10.000 rpm, a 12°C, por 30 minutos e filtrada seqüencialmente em membranas de porosidade 1,2 μm e 0,45 μm);

3 – filtração com membrana de acetato de celulose de porosidade 0,22 μm (amostra solubilizada por 16 horas, centrifugada a 10.000 rpm, a 12°C, por 30 minutos e filtrada seqüencialmente em membranas de porosidade 1,2 μm , 0,45 μm e 0,22 μm).

3.4.2 Análises cromatográficas de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALLS/IR/VIS)

As amostras foram solubilizados durante 16 horas na concentração de 1 mg/mL em solução de nitrito de sódio (NaNO_2) a 0,1 mol/L e azida de sódio (NaN_3) a 200 ppm, centrifugadas por 30 minutos a 10.000 rpm a 12°C em microcentrífuga Sigma 2K15 e filtradas sob ar comprimido com membranas de acetato de celulose de porosidades 1,2 μm e 0,45 μm . Em seguida foram injetadas no cromatógrafo, cuja fase móvel utilizada foi uma solução de NaNO_2 0,1 mol/L contendo NaN_3 200 ppm, com fluxo de 0,6 mL/min, controladas por bomba WATERS 515 (WYATT, 1993).

Foram realizadas análises em triplicata de homogeneidade, determinação de massas moleculares (M_w , M_n , M_z), distribuição das massas e determinação do raio de giro (R_g) em cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance (HPSEC) WATERS com conjunto de colunas de gel permeação Ultrahydrogel 2000, 500, 250 e 120, conectadas em série com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ g/mol respectivamente. O equipamento é acoplado em série a três detectores: detector multiângulo de espalhamento de luz cujo comprimento de onda é 632 nm (MALLS) DSP-F Wyatt Technology, detector diferencial de índice de refração (IR) WATERS 2410 e detector viscosimétrico Validyne P55 acoplado ao voltímetro Elenco Precision XP-581 (WYATT, 1993). Foi utilizado o software ASTRA versão 450 para a obtenção e interpretação dos resultados.

Para a realização dos cálculos de viscosidade intrínseca foram utilizados os valores de viscosidade absoluta em cada ângulo analisado exportados a partir do gráfico de Debye com formalização de Zimm do software ASTRA para o programa de análises matemáticas e estatísticas ORIGIN, versão 5.0. Apenas os valores de

viscosidade correspondentes aos pontos que compuseram o pico definido pelo programa ASTRA foram utilizados.

No programa ORIGIN, a coluna de dados condizente à viscosidade obtida pelo detector viscosimétrico foi adicionada ao valor 10 para que nenhum ponto apresentasse valor negativo. Todos os valores desta coluna foram divididos pelo valor de viscosidade encontrado no primeiro ponto do pico, correspondente à viscosidade do solvente. A viscosidade relativa foi calculada dividindo-se a viscosidade absoluta η pela viscosidade do solvente η_s , conforme a equação 12 (página 43).

A coluna de dados contendo os valores de viscosidade relativa foi utilizada para a obtenção do incremento da viscosidade relativa η_i , de acordo com a equação 13b, contida na página 43, onde a viscosidade relativa η_{rel} é subtraída de 1.

Para calcular a viscosidade intrínseca, foi realizada a média da coluna com os valores do incremento da viscosidade relativa de cada ponto e a média dos valores importados referentes à concentração, obtidos através do detector RI. Apesar de a equação 19 ser utilizada para o cálculo da viscosidade reduzida, em sistemas muito diluídos como em análises de HPSEC-MALLS, as viscosidades encontram-se muito próximas à concentração zero (MICHEL, 1999; NISHIDA *et al.*, 2002). Sendo c a concentração e η_i o incremento da viscosidade relativa, a equação 23 foi utilizada para o cálculo da viscosidade intrínseca.

$$[\eta] = \eta_i/c \quad (19)$$

Foram também realizadas as análises para determinação de dn/dc . Os experimentos foram realizados nas concentrações 1, 0,8, 0,6, 0,4 e 0,2 mg/mL, centrifugadas e filtradas seqüencialmente em membranas de acetato de celulose de porosidade 1,2 μm e 0,45 μm . Para tanto, as colunas, o detector multiângulo DSP-F e o viscosímetro foram desacoplados, de forma que as amostras passaram apenas pelo detector diferencial de índice de refração. Os cálculos foram realizados pelo software ASTRA.

Eventuais diferenças entre médias para os diversos tratamentos foram testadas através do uso do “Student’s t-test” ($p=0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DAS GALACTOMANANAS

Há mais de 50 anos o estudo de polissacarídeos de origem vegetal é direcionado à aplicação comercial, especialmente as galactomananas de guar e alfarroba para o uso na indústria alimentícia (MCCLEARY, MATHESON, 1976; LUCYSZYN, 1994). São encontradas referências de estudos recentes dessas galactomananas, pois apesar de já apresentarem estrutura e propriedades físico-químicas conhecidas, ainda são alvo de novas estratégias de extração e purificação para otimização de processos industriais, além de estudos em aplicações biológicas (DAKIA *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*, 2007; POLLARD *et al.*, 2010).

Neste trabalho foi realizada extração direta e seqüencial de galactomanana de sementes de bracinga, barbatimão e guapuruvu, utilizando-se como variável o tempo de extração e analisando-se o comportamento macromolecular dos polissacarídeos obtidos em solução. Estas espécies foram escolhidas por já possuírem estruturas químicas estabelecidas, por apresentarem diferenças nas relações Man:Gal e por serem espécies nativas, de baixo custo por não implicarem em importação e de fácil acesso.

Durante o processo de extração, foi adicionado NaCl a fim de evitar a precipitação de proteínas e prevenir alterações nos rendimentos. Brummer, Cui, Wang (2003) utilizaram enzima pronase como alternativa para reduzir a precipitação de proteínas. De acordo com Rinaudo, Milas, Le Dung (1993), a eliminação completa de água da matriz polimérica pode conduzir à formação de agregados irreversíveis, como ocorre em processos de liofilização. Dessa forma, foi realizada a secagem em estufa à vácuo.

A tabela 3 indica os rendimentos das extrações de galactomananas com relação ao conteúdo inicial de sementes moídas de bracinga, barbatimão e guapuruvu:

TABELA 3 – RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES DIRETAS DAS GALACTOMANANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU EM RELAÇÃO À SEMENTE INTEIRA

Bracatinga	Rend (%)	Barbatimão	Rend (%)	Guapuruvu	Rend (%)
GM1d	22,2	GS1d	12,3	GG1d	6,3
GM2d	23,1	GS2d	10,8	GG2d	5,2
GM3d	24,5	GS3d	10,4	GG3d	5,6
GM4d	26	GS4d	12,0	GG4d	5,9
GM6d	23,5	GS6d	18,3	GG6d	6,1
GM24d	26	GS24d	18,2	GG24d	6,6
GM48d	20,1	GS48d	18,6	GG48d	7,1

Rend – rendimento

O rendimento de polissacarídeos extraídos diretamente de bracatinga apresentou média de 23,8%. O processo de extração utilizado para as sementes de bracatinga mostrou-se eficiente quanto ao rendimento em comparação com dados da literatura. Sementes de 14 espécies da subfamília Mimosoideae foram investigadas, em que 4 destas renderam entre 10 e 20% de galactomanana (BUCKERIDGE *et al.*, 1995).

Para o barbatimão, observou-se um rendimento crescente, com aumento de 48,8% de rendimento comparando-se a primeira e a sexta extrações. O aumento do rendimento até 6 horas garante a viabilidade do processo de extração direta em um tempo relativamente curto.

Os rendimentos de extração para bracatinga, cuja média foi de 23,8%, estão de acordo com os resultados obtidos por Buckeridge *et al.* (1995) para espécies da subfamília Mimosoideae, na qual são esperados rendimentos em faixas de 25 a 30%. No entanto, o rendimento médio das extrações de barbatimão, de 14,4%, foi inferior ao reportado para esta subfamília.

É possível observar, pelos resultados apresentados na tabela 5, que os rendimentos das extrações de bracatinga são superiores comparativamente aos mesmos tempos de barbatimão, fato justificado possivelmente pelo grau de substituição. A galactomanana de bracatinga é mais substituída que a de barbatimão, portanto mais solúvel, e é favorecida durante a extração por interagir mais facilmente no meio

aquoso. A metodologia de extração de guapuruvu implica na moagem do endosperma isolado, o que impede a comparação de rendimentos com as demais espécies.

Após 1 hora de extração de galactomanana de guapuruvu, o rendimento foi semelhante ao obtido por Vianna-Filho (2009), que encontrou 7,5% de galactomanana para a extração aquosa de 1 hora, à temperatura ambiente, em relação à semente total.

As galactomananas extraídas do endosperma de guapuruvu, cujo rendimento foi calculado em função da semente inteira, apresentaram rendimento que aumentou pouco em função do tempo de extração. Entretanto, a extração de 48 horas em comparação com a primeira hora apresentou aumento de apenas 12,7% no rendimento, o que não justifica um processo de extração tão prolongado.

Devido à pureza da galactomanana, os rendimentos calculados a partir do endosperma isolado de guapuruvu conferiram à espécie rendimentos em torno de 30%, como pode-se observar na tabela 6. Outros fatores influenciam o rendimento, como a solubilidade dos polissacarídeos e o tamanho das partículas extraídas. Quanto à solubilidade, as galactomananas de guapuruvu são pouco solúveis por serem pouco substituídas, conforme será discutido na seção 4.2.

Na tabela 4 estão apresentados os rendimentos de extração direta e seqüencial de guapuruvu a partir do endosperma puro.

TABELA 4 – RENDIMENTO OBTIDO A PARTIR DO ENDOSPERMA DAS EXTRAÇÕES DIRETAS E SEQÜENCIAIS DE GALACTOMANANAS DE GUAPURUVU

Extração direta	Rendimento (%)	Extração seqüencial	Rendimento (%)
GG1d	26,7	GG1s	26,7
GG2d	24,9	GG2s	20
GG3d	26,7	GG3s	3,5
GG4d	28	GG4s	0,8
GG6d	29,2	GG6s	0,6
GG24d	31,7	GG24s	0,6
GG48d	33,7	GG48s	1,1

A proporção obtida de endosperma em relação às sementes inteiras de guapuruvu foi de aproximadamente 32% em 24 horas de extração. Ganter *et al.* (1993)

observaram rendimento de 50% de galactomanana comparativamente ao endosperma em extração de 16 horas. Da mesma forma que a relação Man:Gal, o conteúdo de galactomanana no endosperma varia de acordo com a o grau de maturação da semente de guapuruvu, época de colheita, tipo de solo, dentre outros fatores inerentes à origem da semente (DEA, MORRISON, 1975).

A soma das extrações seqüenciais de galactomananas de guapuruvu em relação ao endosperma foi de 53,3%. Comparando este resultado com os valores obtidos nos diferentes tempos das extrações diretas e considerando que o material de partida das extrações seqüenciais é um só ao contrário das extrações diretas, observou-se vantagem das extrações seqüenciais sobre as diretas.

Foi observado que nas extrações diretas há aumento de rendimento a partir de 2 horas, enquanto nas extrações seqüenciais, há diminuição. O procedimento utilizado para extrair seqüencialmente as galactomananas promove uma diminuição da quantidade de polissacarídeo extraído, pois se trata de um processo extrativo exaustivo de contato das sementes com a água. Durante o processo de extração, a quantidade de água utilizada variou de acordo com a massa de material nas extrações seqüenciais. Tal procedimento pode ter limitado o rendimento devido à saturação dos polissacarídeos no meio aquoso.

Dakia *et al.* (2008) realizaram extração ácida e aquosa a 100°C, por 1 hora, de galactomananas do endosperma de alfarroba para análise de técnicas de extração e purificação de polissacarídeos. A galactomanana de alfarroba apresentou rendimento de 56% na extração a 25°C por 1 hora, que foi justificado pela hidrólise ácida parcial utilizada na remoção da casca. De maneira semelhante, a extração de galactomanana de guapuruvu também implica na remoção manual da casca da semente.

Na tabela 5 encontram-se os rendimentos das extrações seqüenciais de galactomananas, e os valores em porcentagem se referem à semente inteira de bracatinga, barbatimão e guapuruvu.

TABELA 5 – RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DAS GALACTOMANANAS OBTIDAS DAS SEMENTES DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU EM RELAÇÃO À SEMENTE INTEIRA

Bracatinga	Rend (%)	Barbatimão	Rend (%)	Guapuruvu	Rend (%)
GM1s	22,2	GS1s	12,3	GG1s	5,3
GM2s	3,2	GS2s	4,1	GG2s	4,0
GM3s	1,5	GS3s	0,9	GG3s	0,7
GM4s	0,6	GS4s	0,6	GG4s	0,2
GM6s	0,9	GS6s	0,8	GG6s	0,1
GM24s	0,6	GS24s	1,0	GG24s	0,1
GM48s	0,7	GS48s	0,4	GG48s	0,2

Rend – rendimento

A soma dos rendimentos das extrações sequenciais de bracatinga resultou em 29,7%, proporção superior ao rendimento de 4 horas (26%), que foi o maior valor das extrações diretas. Considera-se, portanto, que ainda que a soma dos rendimentos das extrações sequenciais tenha sido superior ao rendimento de 4 horas, o processo até 48 horas é inviável em longa escala pelo baixo rendimento e longo período de extração.

Para as galactomananas de barbatimão a soma das extrações sequenciais foi de 20,1%. Semelhantemente às extrações sequenciais de galactomananas de bracatinga, este valor foi superior ao rendimento máximo das extrações diretas, 18,6%, de 48 horas. Embora a soma dos rendimentos das extrações sequenciais tenham superado o rendimento de 18,6%, o processo sequencial até 48 horas é inviável em larga escala e pode ser substituído até mesmo por 6 horas de extração direta, que apresentou rendimento semelhante ao de 48 horas de extração, 18,3%.

Nas extrações sequenciais de bracatinga e barbatimão ocorreu uma redução de 86 e 67%, respectivamente, após a segunda hora de extração. Bento (2008) realizou extrações sequenciais de espécies da subfamília Mimosoideae, *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala*, de 16 horas cada, e obteve reduções respectivamente de 56% e 74% entre a primeira e a segunda etapas, com variação de temperatura. Observa-se que ocorrem reduções superiores a 50% nas extrações sequenciais de espécies da subfamília Mimosoideae, evento que limita os rendimentos deste tipo de extração e desfavorece o processo.

Para a galactomanana de guapuruvu, a redução de rendimento do primeiro para o segundo tempo de extração foi de aproximadamente 25%. Este resultado em comparação com as extrações seqüenciais das demais espécies corrobora com o perfil das sementes da subfamília Caesalpinoideae, na qual são observados altos rendimentos (BAILEY, 1971 *apud* REID, EDWARDS, 1995).

Ramesh, Yamaki, Tsushida (2001) realizaram extrações seqüenciais de galactomanana de fenogrego. Na extração aquosa à temperatura de 27°C, após dupla extração de 1 hora com n-hexano, obtiveram 10,8% de rendimento, seguida da extração com água fervente, que rendeu 18,8%. A galactomanana de fenogrego apresenta relação Man:Gal 1,2:1, próxima à de bracinga.

A fim de diferenciar quimicamente as galactomananas das espécies *Schizolobium amazonicum* (pinho cuiabano) e *Schizolobium parahybae* (guapuruvu), Petkowicz (1998) realizou extrações seqüenciais aquosas, de 2 horas cada, do endosperma de guapuruvu, com temperaturas variadas. O maior rendimento obtido para as extrações de galactomanana de guapuruvu foi de 34,8%, a 4°C, seguido de redução do rendimento para 3,1% na segunda etapa de extração, a 25°C. Comparativamente, o rendimento de 20% obtido a 25°C para GG2s apresentou-se superior à extração obtida na literatura na mesma temperatura. Esse resultado traduz vantagem da manutenção da temperatura ambiente para o processo de extração seqüencial, pois garante altos rendimentos em pouco tempo de extração.

Após 3 horas de extração verificou-se uma redução de 93, 92 e 87% em relação ao tempo de 1 hora para as galactomananas de bracinga, barbatimão e guapuruvu, respectivamente. Tais resultados indicam redução da viabilidade do processo a partir desse tempo de extração para bracinga e barbatimão. Para a galactomanana de guapuruvu, o primeiro tempo de extração apresentou rendimento muito inferior às demais espécies. Nas extrações de 2 e 3 horas os rendimentos foram equivalentes aos das demais espécies, com queda a partir de 4 horas.

As comparações efetuadas entre as extrações diretas e a soma dos rendimentos das seqüenciais das 3 espécies indicaram favorecimento das diretas. Não obstante a quantidade de material utilizada para a obtenção das extrações seqüenciais seja única para todo o processo, as extrações diretas apresentaram rendimentos superiores a cada

tempo de extração e favoreceram o mínimo tempo do processo. A soma dos rendimentos das extrações seqüenciais ultrapassou os valores máximos das extrações diretas das 3 espécies, entretanto, o tempo despendido para efetuar todas as extrações seqüenciais é de 48 horas, excessivo para a extrapolação em escala industrial.

Ganter *et al.* (1993) realizaram extrações a 4, 25 e 60°C, com melhores rendimentos a 4°C. No presente trabalho as extrações foram realizadas apenas com controle a 25°C a fim de considerar os resultados de rendimento e análises macromoleculares apenas em função dos tempos de extração.

Comparando-se os tempos de 2 e 4 horas e 3 e 6 horas de extração, verificou-se que a redução de rendimento foi superior a 50% para a extração de galactomanana de guapuruvu em ambos os casos. Observou-se que de 3 para 6 horas houve redução de 83% para as extrações de guapuruvu, diferentemente do que ocorreu para as galactomananas de bracinga, 40%, e barbatimão, 11%. A análise entre os tempos de extração de 24 e 48 horas apresentou alterações de rendimento que não representam um rendimento dobrado, como poderia ser esperado.

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

Através da hidrólise ácida total, redução e acetilação e posterior análise por cromatografia líquido-gasosa (GLC) foi determinada a relação Man:Gal dos extratos aquosos obtidos das extrações diretas de sementes de bracinga, barbatimão e guapuruvu conforme indicado na tabela 6.

TABELA 6 – RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DIRETAMENTE DAS SEMENTES DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU

Bracatinga	Man:Gal	Barbatimão	Man:Gal	Guapuruvu	Man:Gal
GM1d	1,1:1	GS1d	2,2:1	GG1d	2,5:1
GM2d	1,2:1	GS2d	2,0:1	GG2d	2,2:1
GM3d	1,2:1	GS3d	2,3:1	GG3d	2,4:1
GM4d	1,1:1	GS4d	2,4:1	GG4d	2,6:1
GM6d	1,2:1	GS6d	2,4:1	GG6d	2,6:1
GM24d	1,2:1	GS24d	2,4:1	GG24d	2,5:1
GM48d	1,1:1	GS48d	2,6:1	GG48d	2,6:1

Nas extrações diretas de bracatinga, as relações Man:Gal se mantiveram aproximadamente em 1,2:1, conforme esperado para a espécie. Segundo Buckeridge *et al.* (1995), a relação Man:Gal da maioria das espécies da subfamília Mimosoideae varia de 1,01:1: a 1,5:1. A manutenção do elevado grau de substituição implica na conservação da alta solubilidade em água em todas as extrações das galactomananas de bracatinga (GANTER, REICHER, 1999; UGHINI *et al.*, 2004).

Com relação às extrações de barbatimão, as relações Man:Gal oscilaram de 2:1 a 2,6:1, com aumento de manose a partir de 2 horas. Esta variação possivelmente ocorreu devido a diferenças de solubilidade, pois nas primeiras horas de extração são obtidas as frações mais hidrossolúveis (mais galactosiladas), com posterior extração de frações menos solúveis (menos galactosiladas).

As relações Man:Gal das extrações diretas de guapuruvu se mantiveram entre 2,2:1 e 2,6:1. A relação Man:Gal de 3:1, encontrada em outros estudos desta espécie (GANTER *et al.*, 1993; GANTER *et al.*, 1995) é característica das galactomananas da subfamília Caesalpinoideae, que abrange relações Man:Gal de 3:1 a 3,5:1. No entanto, encontra-se na literatura resultados diferentes da faixa esperada para as galactomananas da subfamília Caesalpinoideae, como o obtido por Kapoor (1972), que analisou a composição monossacarídica de *Delonix regia* e obteve a relação Man:Gal 2:1 ou conforme observado por Souza (2009) para *Caesalpinia ferrea*, que apresentou relação Man:Gal de 2,3:1.

Segundo Ganter *et al.* (1993), as relações Man:Gal são de 1,1:1 para bracatinga, 1,5:1 para barbatimão e 3,0:1 para guapuruvu.

A relação Man:Gal das galactomananas obtidas pelas extrações sequenciais de bracatinga, barbatimão e guapuruvu proporcionou a análise das relações Man:Gal das três espécies, conforme indicado na tabela 7:

TABELA 7 – RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS SEQUENCIALMENTE DAS SEMENTES DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU

Bracatinga	Man:Gal	Barbatimão	Man:Gal	Guapuruvu	Man:Gal
GM1s	1,1:1	GS1s	2,2:1	GG1s	2,5:1
GM2s	1,2:1	GS2s	2,0:1	GG2s	2,5:1
GM3s	1,2:1	GS3s	2,0:1	GG3s	2,7:1
GM4s	1,1:1	GS4s	2,1:1	GG4s	2,8:1
GM6s	1,1:1	GS6s	2,3:1	GG6s	3,1:1
GM24s	1,1:1	GS24s	2,1:1	GG24s	3,8:1
GM48s	NR	GS48s	2,2:1	GG48s	4,2:1

NR: não realizado

Assim como ocorreu nas extrações diretas, as extrações sequenciais das galactomananas de bracatinga não sofreram alteração na relação Man:Gal. O alto grau de substituição da cadeia de manose previne agregações, estas que causam diminuição da solubilidade (REID, EDWARDS, 1995).

As relações Man:Gal de barbatimão apresentaram variação de 2:1 a 2,3:1 ao longo do tempo, ligeiramente inferior à oscilação obtida nas extrações diretas.

Bento (2008) efetuou extrações sequenciais, aquosa e alcalina, por 16 horas, alterando a temperatura de galactomananas de sementes pertencentes à subfamília Mimosoideae. Para *Adenantha pavonina*, cuja relação Man:Gal é de 1,4:1 (BUCKERIDGE, DIETRICH, LIMA, 2000), semelhante à do barbatimão, verificou-se que as relações Man:Gal mantiveram-se em torno de 1,6:1.

As extrações de guapuruvu resultaram em relações Man:Gal crescentes. Ao longo do tempo, as amostras mostraram-se cada vez menos substituídas, passando de 2,1:1 na primeira hora até 4,2:1 no tempo de 48 horas. Assim como ocorreu com as galactomananas de barbatimão, as extrações de galactomananas de guapuruvu podem

ter proporcionado frações mais hidrossolúveis e mais substituídas nas primeiras horas de extração com posterior extração das menos substituídas.

Os resultados obtidos neste trabalho para a galactomanana de guapuruvu estão de acordo com Petkowicz (1998), que verificou relações Man:Gal com proporções de manose ascendentes (2,8:1 a 5,4:1) nas extrações seqüenciais aquosas de galactomananas de guapuruvu, conforme o aumento da temperatura. O mesmo ocorreu nas extrações de *Gleditsia triacanthos* em água fervente, com NaOH 2N e à temperatura ambiente. As relações Man:Gal variaram de 2,5 a 3,1:1, conforme ocorre nas demais espécies da subfamília Caesalpinoideae (SCIARINI *et al.*, 2009).

Mesmo com variação de tempo e dos tipos de extração, a manutenção das relações Man:Gal das galactomananas de bracinga e barbatimão e o aumento dessas relações nas extrações de galactomananas de guapuruvu sugerem que os resultados quanto à proporção de unidades de D-manose e D-galactose nas galactomananas das sementes são característicos das subfamílias às quais pertencem as espécies.

4.3 ANÁLISES DE HPSEC

4.3.1 Efeito da filtração sobre a concentração e agregados de galactomananas

Existem vários métodos para a purificação de polissacarídeos. As metodologias incluem deslipidificação, formação de complexos iônicos, precipitação alcoólica, tratamentos enzimáticos e mecânicos, como centrifugação e filtração (KAPOOR, 1972; NOBLE, TURQUOIS, TARAVEL, 1990; BRUMMER, CUI, WANG, 2003; BOUZOUITA *et al.*, 2007). O protocolo de análises por espalhamento de luz estático foi modificado pela inclusão de centrifugação prévia à filtração, filtração com membrana de porosidade 1,2 μm , seguida de membrana 0,45 μm .

Por ter sido realizada centrifugação e dupla filtração das amostras, houve a suspeita de que a concentração inicial de 1 mg/mL das soluções tivesse sido alterada

durante este procedimento, além da dúvida sobre a influência da filtração sobre a remoção de agregados moleculares. Desta forma foram realizadas análises de determinação da concentração e de redução de agregados pós-filtração, conforme descrito no item 3.4.1 da página 56.

Foram utilizadas apenas 2 amostras de cada espécie, com tempos de extração extremos de 2 e 48 horas, para verificar a alteração das concentrações: GM2d e GM48d de bracinga, GS2d e GS48d de barbatimão e GG2d e GG48d de guapuruvu. Os detectores de espalhamento de luz e viscosimétrico também foram utilizados para a avaliação de massa molecular e da viscosidade das amostras.

Em todos os experimentos, o volume total do ensaio foi dividido em 3 partes para que houvesse a troca das amostras preparadas. Por volta dos primeiros 16 mL de eluição, a amostra centrifugada e filtrada com membrana de porosidade 1,2 μm (denominada amostra 1,2 μm) foi substituída pela amostra centrifugada, filtrada com membrana de porosidade 1,2 μm e filtrada com membrana de abertura 0,45 μm (denominada amostra 0,45 μm). Esta foi analisada até aproximadamente 33 mL de eluição, quando houve troca pela amostra centrifugada, filtrada com membrana de porosidade 1,2 μm , filtrada com membrana de abertura 0,45 μm e filtrada pela membrana de porosidade 0,22 μm (denominada amostra 0,22 μm). O decaimento seguido de recuperação observado mais significativamente no detector viscosimétrico da figura 14 ocorreu no momento das trocas das amostras. A amostra inicial (1,2 μm) foi bombeada a partir de um frasco e este conteúdo foi substituído pelas amostras com sucessivas filtrações.

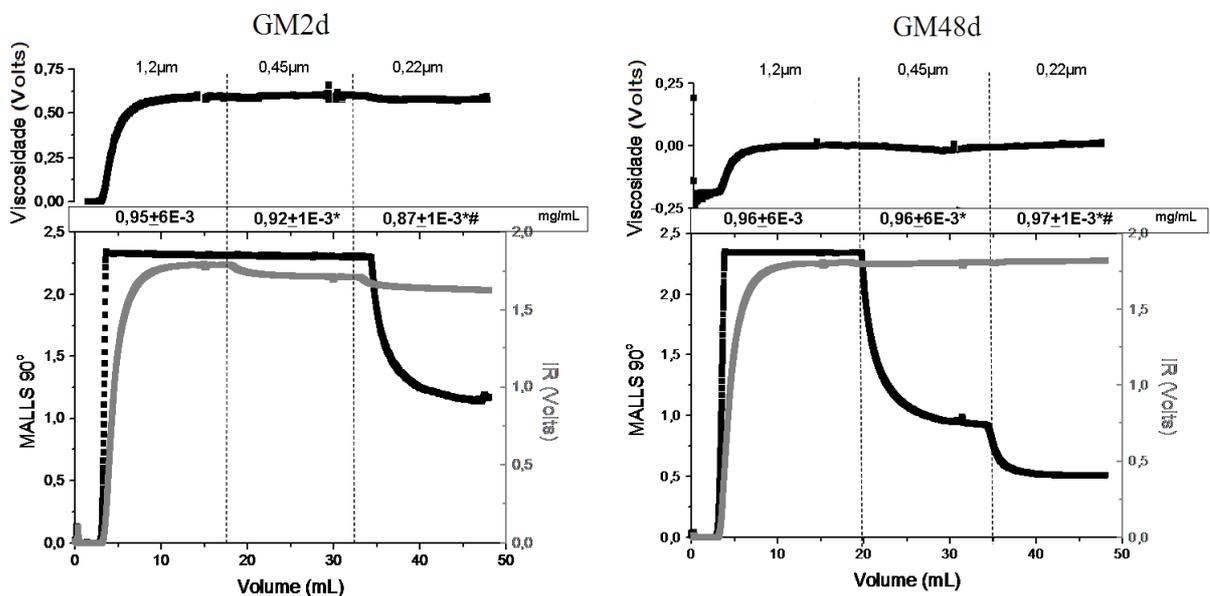
Embora o protocolo dos experimentos de espalhamento de luz fosse restrito à filtração pelas membranas 1,2 μm e 0,45 μm de abertura, a porosidade 0,22 μm foi incluída nesse processo a fim de avaliar a perda de amostra em função da filtração, pois esta membrana é utilizada na maioria dos protocolos que envolvem análises por espalhamento de luz.

Cada resultado foi manipulado no software ASTRA para a interpretação dos dados. O software permite a montagem do gráfico de Debye, do qual foi selecionada uma área constante de voltagem de índice de refração, viscosidade e espalhamento de luz em cada um dos trechos 1,2 μm , 0,45 μm e 0,22 μm do experimento. A partir

desses valores foi obtida a média de concentração, utilizando os experimentos em triplicata de cada extração.

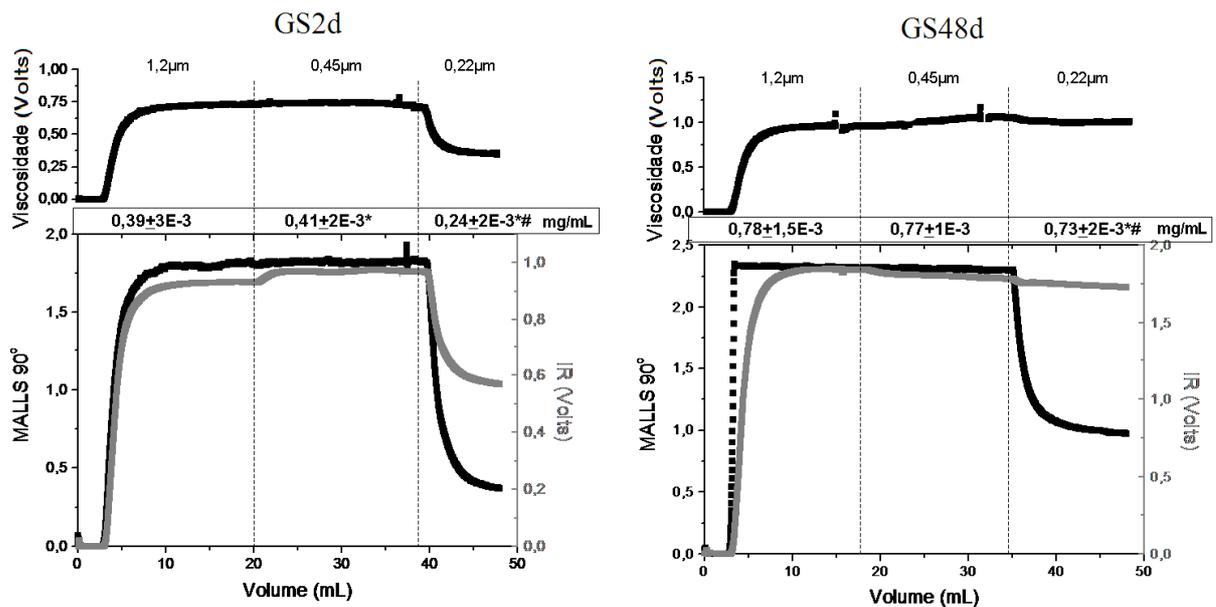
As médias de concentração das amostras 1,2 μm , 0,45 μm e 0,22 μm de cada extração foram estatisticamente analisadas pelo teste ANOVA com fator único e postest Tukey, $p < 0,05$. As figuras 12, 13 e 14 exemplificam o comportamento característico das análises das extrações GM2d e GM48d de bracinga, GS2d e GS48d de barbatimão e GG2d e GG48d de guapuvuru. Nas figuras estão mostrados os perfis de espalhamento de luz laser com multiângulos (MALLS 90°) em preto, por índice de refração (IR - Volts) em cinza e por viscosimetria (VIS - Volts), todos em função do volume de eluição (mL), bem como o valor médio das concentrações para cada amostra em mg/mL.

Em todas as extrações avaliadas não houve diferença estatisticamente significativa de concentração entre as amostras purificadas em membrana de 1,2 μm e 0,45 μm , 0,45 μm e 0,22 μm e 1,2 μm e 0,22 μm .



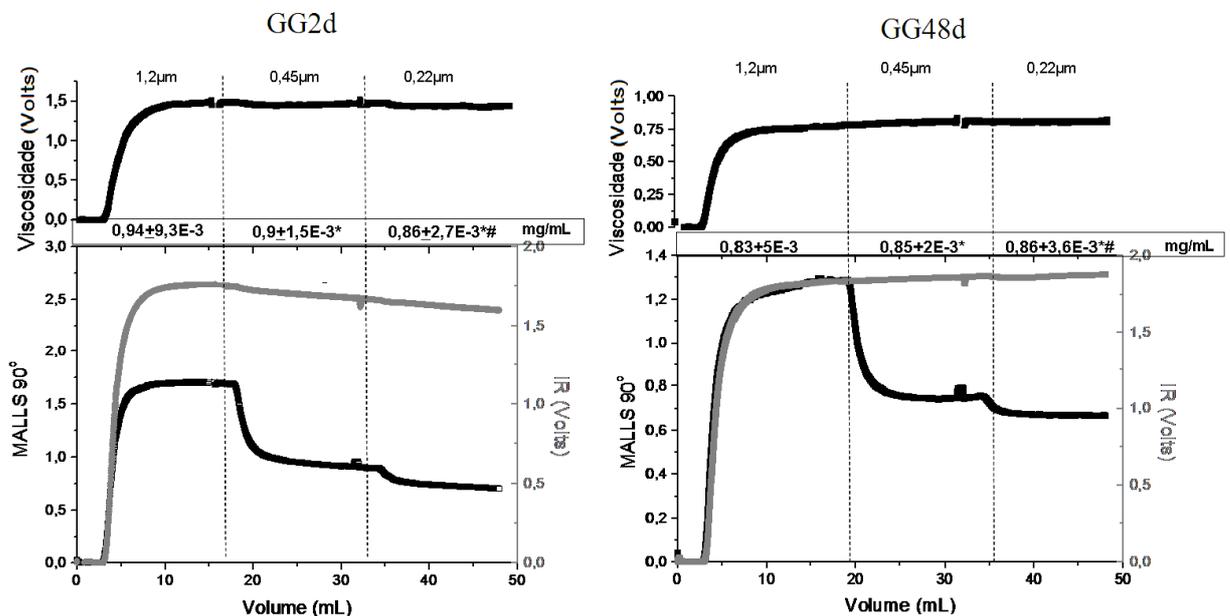
Nota: o símbolo * corresponde à análise estatística ANOVA com postest Tukey ($p < 0,05$) relativo à filtração 1,2 μm e o símbolo # corresponde à análise estatística ANOVA com postest Tukey ($p < 0,05$) relativo à filtração 0,45 μm

FIGURA 12 – PERFIS ESCOLHIDOS A PARTIR DAS TRIPLICATAS DE ANÁLISES POR MALLS 90° (PRETO)/ IR (CINZA)/ VIS DE GALACTOMANANAS DE BRACATINGA EXTRAÍDAS A 2 E 48 HORAS E PREPARADAS POR CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO A 1,2, 0,45 E 0,22 μm



Nota: o símbolo * corresponde à análise estatística ANOVA com postest Tukey ($p < 0,05$) relativo à filtração 1,2 μm e o símbolo # corresponde à análise estatística ANOVA com postest Tukey ($p < 0,05$) relativo à filtração 0,45 μm

FIGURA 13 – PERFIS ESCOLHIDOS A PARTIR DAS TRIPLICATAS DE ANÁLISES POR MALLS 90° (PRETO)/ IR (CINZA)/ VIS DE GALACTOMANANAS DE BARBATIMÃO EXTRAÍDAS A 2 E 48 HORAS E PREPARADAS POR CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO A 1,2, 0,45 E 0,22 μm



Nota: o símbolo * corresponde à análise estatística ANOVA com postest Tukey ($p < 0,05$) relativo à filtração 1,2 μm e o símbolo # corresponde à análise estatística ANOVA com postest Tukey ($p < 0,05$) relativo à filtração 0,45 μm

FIGURA 14 – PERFIS ESCOLHIDOS A PARTIR DAS TRIPLICATAS DE ANÁLISES POR MALLS 90° (PRETO)/ IR (CINZA)/ VIS DE GALACTOMANANAS DE GUAPURUVU EXTRAÍDAS A 2 E 48 HORAS E PREPARADAS POR CENTRIFUGAÇÃO E FILTRAÇÃO A 1,2, 0,45 E 0,22 μm

Para melhor visualização, as tabelas 8, 9 e 10 determinam como foram realizados os cálculos das triplicatas dos valores de concentração expostos na figura 15, respectivamente para galactomananas de bracinga, barbatimão e guapuruvu. Três valores de concentração foram selecionados nas etapas denominadas 1,2, 0,45 e 0,22 μm de cada perfil de eluição. Os pontos deveriam ser distantes entre si, preferencialmente em trechos estáveis, sem ascensão ou declive. Tais valores foram submetidos aos cálculos de média e desvio padrão e foram comparados entre si a fim de verificar diferenças estatisticamente significativas entre as etapas de purificação das amostras.

TABELA 8 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO E MÉDIAS COM DESVIOS PADRÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS EM TRIPLICATA DAS EXTRAÇÕES GM2d E GM48d NOS TRECHOS 1,2, 0,45 E 0,22 μm

	GM2d			GM48d		
	1,2	0,45	0,22	1,2	0,45	0,22
Valor 1 ($\times 10^4 \text{g/mol}$)	0,942	0,918	0,872	0,96	0,962	0,968
Valor 2 ($\times 10^4 \text{g/mol}$)	0,95	0,917	0,871	0,961	0,963	0,969
Valor 3 ($\times 10^4 \text{g/mol}$)	0,954	0,916	0,87	0,961	0,963	0,97
Média ($\times 10^4 \text{g/mol}$)	0,95\pm6	0,92\pm1	0,87\pm1	0,96\pm6	0,96\pm6	0,97\pm1

TABELA 9 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO E MÉDIAS COM DESVIOS PADRÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS EM TRIPLICATA DAS EXTRAÇÕES GS2d E GS48d NOS TRECHOS 1,2, 0,45 E 0,22 μm

	GS2d			GS48d		
	1,2	0,45	0,22	1,2	0,45	0,22
Valor 1 ($\times 10^3 \text{g/mol}$)	0,388	0,406	0,245	0,777	0,777	0,735
Valor 2 ($\times 10^3 \text{g/mol}$)	0,392	0,409	0,242	0,779	0,762	0,733
Valor 3 ($\times 10^3 \text{g/mol}$)	0,394	0,411	0,241	0,78	0,758	0,731
Média ($\times 10^3 \text{g/mol}$)	0,39\pm3	0,41\pm2	0,24\pm2	0,78\pm1,5	0,77\pm1	0,73\pm2

TABELA 10 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO E MÉDIAS COM DESVIOS PADRÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS EM TRIPLICATA DAS EXTRAÇÕES GG2d E GG48d NOS TRECHOS 1,2, 0,45 E 0,22 μm

	GG2d			GG48d		
	1,2	0,45	0,22	1,2	0,45	0,22
Valor 1 ($\times 10^3$ g/mol)	0,935	0,899	0,8629	0,821	0,845	0,855
Valor 2 ($\times 10^3$ g/mol)	0,9367	0,8973	0,8601	0,826	0,847	0,86
Valor 3 ($\times 10^3$ g/mol)	0,9365	0,896	0,8576	0,831	0,849	0,862
Média ($\times 10^3$g/mol)	0,94\pm9,3	0,9\pm1,5	0,86\pm2,7	0,83\pm5	0,85\pm2	0,86\pm3,6

Foi observado que a extração de 2 horas de bracinga (GM2d) apresentou declínio no perfil de IR que representa concentração em função da filtração, acompanhada pela redução proporcional da viscosidade. Tal fato confirma a perda de massa pela solução durante o processo de filtração. Entretanto, ocorreu redução no espalhamento de luz (EL) principalmente após 0,22 μm , sugerindo uma diminuição de agregados moleculares retidos nas membranas de progressiva porosidade. Galactomananas altamente substituídas tendem a apresentar poucos agregados, porém tal correlação depende do método de extração e preparo da solução, como variação de temperatura, tipo de solvente, entre outros (REID, EDWARDS, 1995; PICOUT *et al.*, 2002).

Na extração GM48d houve diminuição nos valores de EL e manutenção de concentração e VIS até parte de 0,45 μm . A partir da segunda metade de 0,45 μm , o perfil ascendente de VIS se assemelhou ao de IR. Este perfil sugere que os agregados moleculares foram desfeitos com o uso do filtro de porosidade inferior e por esse motivo causaram um ligeiro aumento da concentração, porém não significativo estatisticamente. Poucos são os relatos em literatura de remoção de agregados apenas por processos de filtração (FREITAS *et al.*, 2010). Usualmente são utilizados processos como autoclavagem, sonicação e outros. A utilização do solvente cadoxen em soluções aquosas contendo polissacarídeos pode ser bastante eficaz na remoção de agregados quando ajustadas as concentrações de polissacarídeos e do solvente (WANG *et al.*, 2001).

Analisando a extração de 2 horas de barbatimão (GS2d), um discreto aumento de VIS acompanhou o acréscimo nos valores de EL até o final do trecho 0,45 μm . Em contrapartida, a inclinação ascendente do perfil correspondente à concentração mostrou-se mais intensa do que para os demais detectores. Com a filtração de 0,22 μm , houve redução de todos os parâmetros, especialmente de EL, chegando próximo de zero. Novamente, a redução da concentração devido à filtração foi responsável pelo decaimento de EL e viscosidade no trecho 0,22 μm , sugerindo que parte da amostra ficou retida na membrana. O ligeiro aumento da viscosidade até 0,45 μm pode estar relacionado ao processo de solubilização incompleto da amostra.

Ainda que não seja a espécie menos substituída, com relação Man:Gal próxima a 1,5:1, a galactomanana de barbatimão apresenta alta viscosidade e baixa solubilidade em água, que justificam os resultados observados para GS2d (GANTER *et al.*, 1995).

A extração GS48d apresentou redução no perfil de concentração apenas do trecho 0,45 μm para 0,22 μm , com a obtenção do valor $0,73 \times 10^{-3}$ mg/mL. Ocorreu uma diminuição de EL entre 1,2 μm e 0,45 μm , com pouca influência sobre a viscosidade e concentração a partir de 0,22 μm o que sugere redução de agregados da amostra.

A extração direta de 2 horas de guapuruvu (GG2d) apresentou redução do espalhamento de luz, com perfil de VIS pouco influenciado. No perfil de concentração houve redução, sem significância estatística, de 4,3 e 4,4% respectivamente entre o trecho 1,2 e 0,45 μm e 0,45 e 0,22 μm . Estes resultados novamente sugerem que agregados podem ter sido desfeitos ou terem sido retidos nas membranas de filtração.

Para a extração GG48d houve redução de EL e ligeiro aumento no perfil de concentração entre 1,2 a 0,22 μm , porém sem alteração da viscosidade. Assim como observado para GG2d, houve expressiva redução do espalhamento de luz, que indicou remoção de agregados moleculares.

A elevação da concentração e de VIS acompanhada do decréscimo da intensidade de EL foi observada nas extrações de 48 horas bracatinga e guapuruvu. Tais resultados sugerem que o protocolo de centrifugação e filtração foi útil na remoção de agregados, pois, comparativamente às extrações de 2 horas, as amostras de

48 horas apresentam mais propensão à formação de moléculas agregadas e degradadas pelo processo de extração (MICHEL, 1999; POLLARD *et al.*, 2008).

Proporções inferiores a 30% de manose em relação à galactose nas galactomananas podem conduzir a associações intermoleculares em soluções aquosas diluídas, com a força de interação crescente pela diminuição das unidades de galactose. Foi observado para extrações diretas e seqüenciais de galactomananas de barbatimão e guapuruvu, proporções que variaram de 50 a 61,5% e 54,5 a 76,2%, respectivamente, comparando as relações Man:Gal mais distintas dentro de cada processo de extração de cada espécie. Os segmentos não substituídos da cadeia principal são responsáveis pelas associações intermoleculares do polissacarídeo, como agregações (GIDLEY, 1991; LARIZADOU, BILIADERIS, IZYDORCZYK, 2000).

Os agregados moleculares apresentam um significativo espalhamento de luz em baixos vetores de onda [$q = (4\pi n/\lambda)/\text{sen}(\theta/2)$] (eq.6, página 38). No gráfico de Zimm seriam observados como uma relação de $Kc/R\theta$ que aumenta de forma não linear em função de q . Para um perfil isento de agregados, deve-se encontrar uma reta paralela ao eixo x ; no entanto, a disposição de pontos com aspecto ascendente no gráfico de Debye com formalização de Zimm sugere a presença de moléculas esféricas agregadas, que proporcionam alto grau de espalhamento de luz (LANDAU, LIFSCHITZ, 1963 *apud* FREITAS *et al.*, 2010).

A figura 16, adaptada do software ASTRA, confirma a presença de agregados no sistema em GG2d através do perfil ascendente do gráfico de Debye com formalização de Zimm no trecho 1,2 μm , além da reta no trecho 0,22 μm , que evidencia a eficácia do processo de filtração na redução de agregados moleculares.

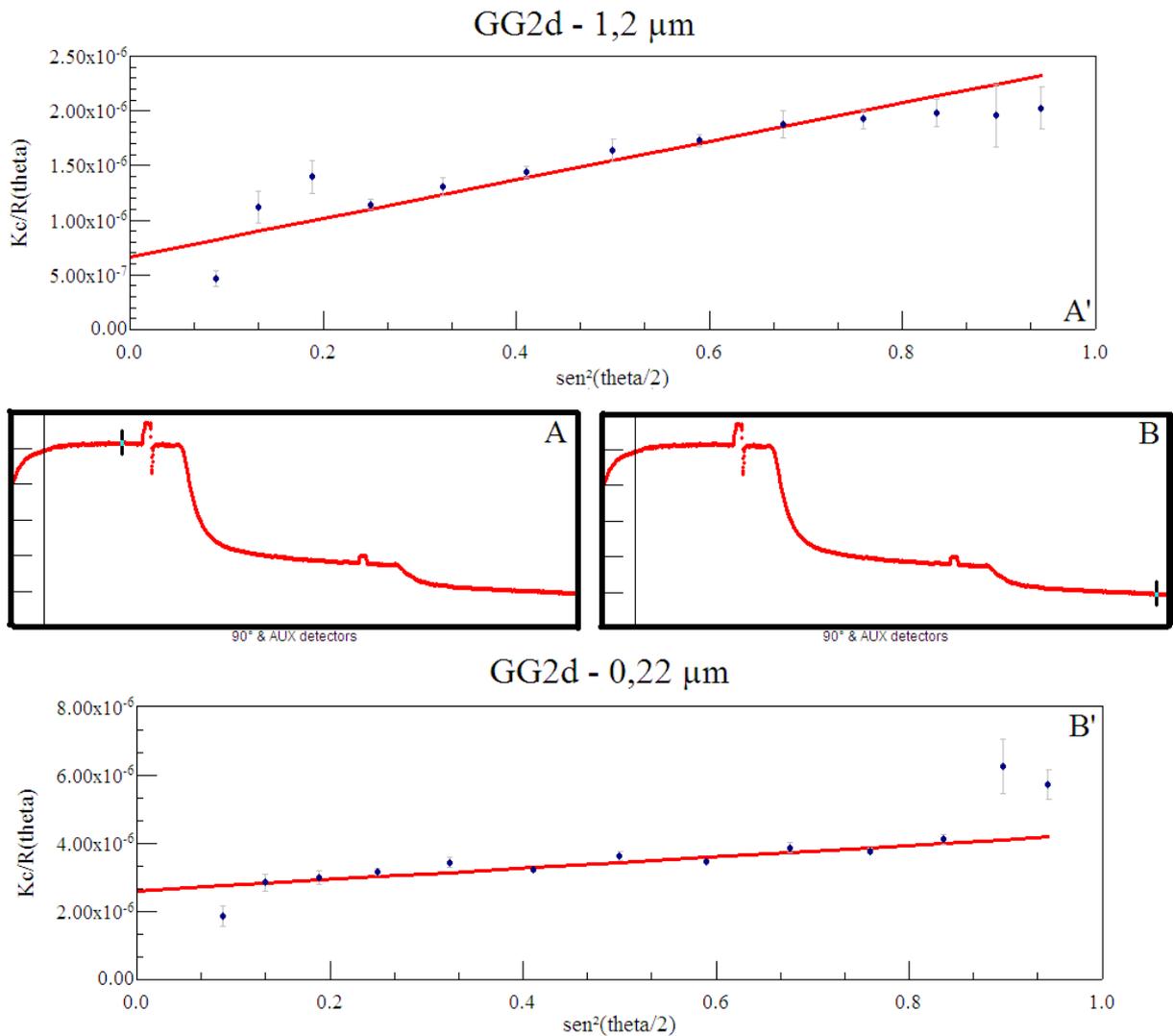


FIGURA 15 – PERFIL OBTIDO POR MALLS 90° DA EXTRAÇÃO GG2d NO TRECHO 1,2 (A) E NO TRECHO 0,22 (B) E FORMALIZAÇÃO DO GRÁFICO DE ZIMM NO OBTIDO NO TRECHO 1,2 (A') E NO TRECHO 0,22 (B')

Com o objetivo de solucionar dificuldades relacionadas à estabilidade de polímeros em soluções e aos efeitos de agregação em protocolos experimentais, Freitas *et al.* (2010) avaliaram a remoção de agregados por filtrações de N-carboximetilquitosana (NCCM) com membranas de porosidade 0,8, 0,45 e 0,22 μm . Foi verificado perda de concentração de 5% apenas após a filtração a 0,22 μm . A redução da intensidade de EL foi justificada pela presença de macromoléculas isoladas e agregados moleculares, enquanto a viscosidade manteve-se constante durante praticamente todo o período do experimento. Tais resultados são semelhantes aos

obtidos para GM2d e GG2d, comprovando a eficiência do processo de filtração na remoção de agregados.

Para a remoção completa de agregados de uma solução, esses não devem estar em equilíbrio com os polímeros menores e a quantidade de moléculas agregadas não deve ser sensível à concentração total da solução (MICHEL, 1999), o que pode ter ocorrido parcial ou totalmente durante o processo de filtração.

A partir dos resultados obtidos através das análises de concentração das amostras de galactomananas, observou-se que não houve perda significativa de concentração na filtração utilizando membrana com abertura de 0,22 μm em nenhuma das análises, entretanto foram observadas alterações de concentração acompanhadas ou não de alterações de valores de viscosidade e espalhamento de luz, que sugeriram remoção de agregados. O protocolo que consiste em centrifugação seguida de filtração com membrana de porosidade 1,2 μm e de 0,45 μm foi adotado para os experimentos seguintes.

4.3.2 Análises cromatográficas de exclusão estérica de alta performance com multidetecção (HPSEC-MALLS/RI/VIS)

Diferentes metodologias de extração e purificação de polissacarídeos têm sido propostas na literatura com intuito de aumentar o rendimento dos produtos obtidos, comparando a eficiência do processo a partir da determinação de parâmetros moleculares tais como a massa molecular ponderal média (M_w), raio de giro (R_g), entre outros. Estes parâmetros são geralmente obtidos a partir da técnica de espalhamento de luz estático e detectores correlacionados (CERQUEIRA *et al.*, 2009).

As galactomananas obtidas nos diferentes tempos de extrações diretas e sequenciais de bracatinga, barbatimão e guapuruvu foram submetidas a análises por cromatografia de exclusão por tamanho (HPSEC - *high performance size exclusion chromatography*) acoplada aos detectores: espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS), de índice de refração (IR) e viscosimétrico (VIS), ou seja, HPSEC-MALLS/IR/VIS. Foram obtidos os parâmetros de massa molecular ponderal média em

peso e em número (M_w e M_n), distribuição das massas, raio de giro (R_g) e viscosidade intrínseca ($[\eta]_w$). Apenas com uma análise de aproximadamente 80 minutos é possível determinar todos os parâmetros em conjunto. Para as análises foram utilizadas amostras purificadas, a partir da metodologia anteriormente estabelecida, que implica em centrifugação e dupla filtração com membranas de abertura 1,2 μm e 0,45 μm (KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004).

Previamente às análises, foi realizado o cálculo de dn/dc para extrações de 1 hora de cada espécie. Este experimento foi realizado utilizando apenas o detector IR, com as colunas, o detector MALLS e o detector VIS desacoplados. Os valores de dn/dc para bracinga, barbatimão e guapuruvu, respectivamente 0,1350, 0,1704 e 0,1595 mL/g , foram posteriormente utilizados no tratamento dos resultados das análises cromatográficas por HPSEC-MALLS/IR/VIS.

A figura 16 mostra o perfil de eluição obtido para a extração GS6d. O gráfico obtido exemplifica uma amostra unimodal, eluindo em torno de 22mL. O detector laser (MALLS 90°) está destacado em vermelho, o detector de índice de refração (IR - Volts) em azul e o detector viscosimétrico (VIS - Volts) em verde estão em função do volume de eluição (mL).

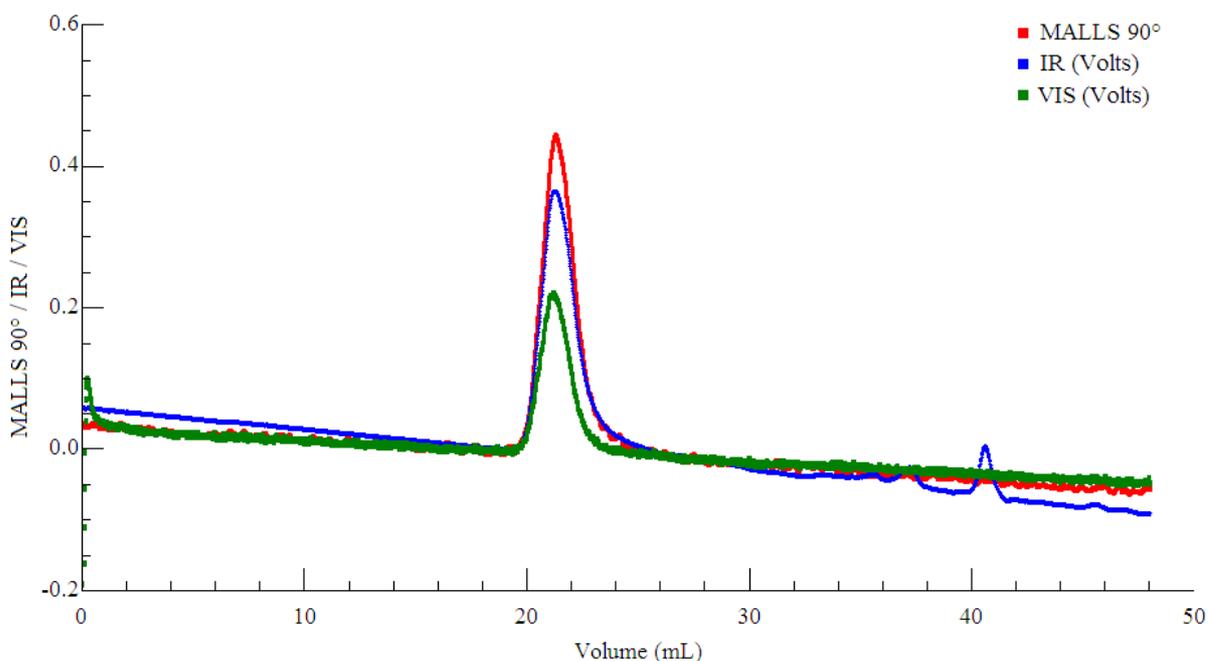


FIGURA 16 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS DA GALACTOMANANA DE BARBATIMÃO (GS6d) UTILIZANDO ELUENTE NaNO_2 E DETECTORES MALLS 90° , IR E VIS

A tabela 11 compara, respectivamente, os resultados de massas moleculares M_n , M_w , índice de polidispersão (M_w/M_n), raio de giro em função da massa molecular: $R_g(w)$, taxa de recuperação e viscosidade intrínseca: $[\eta]_w$ das extrações diretas e sequenciais das galactomananas de bracatinga. Conforme exposto no item 3.4.2 (página 57), a viscosidade intrínseca foi obtida a partir de cálculos matemáticos considerando a viscosidade absoluta e concentração determinada por IR. Os valores médios foram obtidos por triplicata e analisados estatisticamente juntamente com os desvios padrão.

TABELA 11 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS POR HPSEC-MALLS/IR/VIS DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DIRETA (GMd) E SEQUENCIALMENTE (GMs) DAS SEMENTES DE BRACATINGA

Amostra	M_n ($\times 10^6$ g/mol)	M_w ($\times 10^6$ g/mol)	M_w/M_n	$R_g(w)$ (nm)	%Recup	$[\eta]_w$ (mL/g)
GM1d	$0,55 \pm 0,06^{ab}$	$1,08 \pm 0,36^a$	$1,97 \pm 0,42^a$	$83,30 \pm 21,50^a$	$98,12 \pm 5,87^a$	$434,05 \pm 28,07^a$
GM2d	$0,54 \pm 0,07^{ab}$	$0,80 \pm 0,02^a$	$1,48 \pm 0,16^a$	$43,67 \pm 25,61^a$	$76,81 \pm 11,43^a$	$355,65 \pm 28,92^a$
GM3d	$0,55 \pm 0,13^{ab}$	$1,04 \pm 0,37^a$	$1,87 \pm 0,32^a$	$76,47 \pm 22,24^a$	$83,70 \pm 13,17^a$	$416,80 \pm 4,95^a$
GM4d	$0,54 \pm 0,14^{ab}$	$1,03 \pm 0,39^a$	$1,91 \pm 0,28^a$	$72,97 \pm 24,11^a$	$97,75 \pm 12,91^a$	$435,00 \pm 13,01^a$
GM6d	$0,47 \pm 0,09^b$	$0,89 \pm 0,25^a$	$1,88 \pm 0,23^a$	$63,30 \pm 19,87^a$	$100,00 \pm 16,19^a$	$431,70 \pm 50,77^a$
GM24d	$0,55 \pm 0,17^b$	$1,12 \pm 0,44^a$	$2,01 \pm 0,26^a$	$83,58 \pm 32,96^a$	$86,19 \pm 7,12^a$	$466,10 \pm 185,95^a$
GM48d	$1,14 \pm 0,46^a$	$1,36 \pm 0,36^a$	$1,32 \pm 0,40^a$	$41,33 \pm 30,02^a$	$54,42 \pm 61,17^a$	$143,25 \pm 53,81^a$
GM1s	$0,55 \pm 0,06^b$	$1,08 \pm 0,36^a$	$1,97 \pm 0,42^a$	$83,30 \pm 21,50^a$	$98,12 \pm 5,87^a$	$434,05 \pm 28,07^a$
GM2s	$0,67 \pm 0,13^b$	$0,94 \pm 0,10^a$	$1,42 \pm 0,12^a$	$62,85 \pm 5,96^a$	$81,46 \pm 12,93^{ab}$	$413,30 \pm 10,61^a$
GM3s	$1,30 \pm 0,27^{ab}$	$1,67 \pm 0,56^a$	$1,27 \pm 0,15^a$	$88,70 \pm 22,33^a$	$82,97 \pm 24,64^{ab}$	$529,70 \pm 145,95^a$
GM4s	$0,94 \pm 0,25^{ab}$	$1,53 \pm 0,48^a$	$1,67 \pm 0,45^a$	$74,27 \pm 35,98^a$	$64,28 \pm 11,21^{acb}$	$325,30 \pm 35,07^a$
GM6s	$1,45 \pm 0,19^a$	$1,71 \pm 0,45^a$	$1,17 \pm 0,15^a$	$81,03 \pm 22,94^a$	$72,76 \pm 10,96^{abc}$	$527,45 \pm 258,45^a$
GM24s	$1,29 \pm 0,18^{ab}$	$1,57 \pm 0,31^a$	$1,21 \pm 0,10^a$	$75,57 \pm 23,74^a$	$55,77 \pm 11,04^{bc}$	$473,90 \pm 154,86^a$
GM48s	$0,96 \pm 0,65^{ab}$	$1,22 \pm 0,55^a$	$1,71 \pm 0,98^a$	$53,07 \pm 17,92^a$	$41,39 \pm 16,37^c$	$274,25 \pm 36,27^a$

NOTA: % Recup: taxa de recuperação (%); Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

A extração de 1 hora direta apresentou M_w e viscosidade intrínseca elevadas. De acordo com a equação de Mark-Houwink-Sakurada, esses parâmetros são

diretamente proporcionais, portanto devem permanecer elevados ou reduzirem de maneira similar (PICOUT, ROSS-MURPHY, 2007).

Exceto no tempo de 2 horas em ambas as extrações, os raios de giro resultaram em valores próximos de 70 e 80nm, com destaque para uma redução em 48 horas, onde também ocorreram taxas de recuperação e viscosidade menores. Embora o resultado de M_w tenha sido o mais elevado no tempo de 48 horas, a degradação do polímero é indicada pela diminuição da viscosidade intrínseca em soluções de galactomananas (POLLARD *et al.*, 2008).

As relações M_w/M_n mais próximas de 1 foram as das amostras GM48d do grupo de extrações diretas e GM6s das extrações seqüenciais. Os resultados de polidispersão não apresentaram relação com os tempos de extração para as amostras de bracatinga.

Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias quando comparados os valores obtidos nos diferentes tempos das variáveis M_w , M_w/M_n , R_g e $[n]_w$ para ambos os processos de extração, além de taxa de recuperação nas extrações diretas. Tal observação demonstra que o tempo não apresentou influência sobre os resultados destes parâmetros.

As diferenças entre médias observadas para taxa de recuperação nas extrações seqüenciais e para M_n em ambos os processos demonstraram que houve alteração estatisticamente significativa entre os tempos de extração, entretanto não foi observada uma tendência de aumento ou decréscimo nos valores das médias apenas em função dos tempos de extração. Mais uma vez, através da visualização de médias, observou-se que o tempo de extração não influenciou os resultados das variáveis obtidas por HPSEC-MALLS/IR/VIS.

Dentre as extrações realizadas, a amostra que apresentou os melhores resultados considerando rendimento, massa molecular, índice de polidispersão, raio de giro, taxa de recuperação e viscosidade intrínseca foi GM1d, além de ser o menor tempo despendido para realizar a extração. Estudos prévios de galactomanana de bracatinga demonstraram a determinação de alguns parâmetros físico-químicos, conforme indicado na tabela 12 (GANTER *et al.*, 1993; GANTER *et al.*, 1995; BRESOLIN *et al.*, 1997; GANTER, REICHER, 1999, NOLETO *et al.*, 2009). Os

valores obtidos na literatura correspondem a extrações aquosas a 25°C, em tempos variados, cujas sementes sofreram tratamento para inativação enzimática, exceto para Ganter *et al.* (1993).

TABELA 12 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS COMPARATIVOS ENTRE A EXTRAÇÃO GM1d E DADOS DE GALACTOMANANA DE BRACATINGA ENCONTRADOS NA LITERATURA

		M_w				
	Rend (%)	($\times 10^6$ g/mol)	M_w/M_n	$R_g(w)$ (nm)	%Recup	$[\eta]_w$ (mL/g)
GM1d	24,5	$1,08 \pm 0,36$	$1,97 \pm 0,42$	$83,30 \pm 21,5$	$98,12 \pm 5,87$	$434,05 \pm 28,07$
Bracatinga*	30,0	1,4	1,1	73,0	ND	740,0

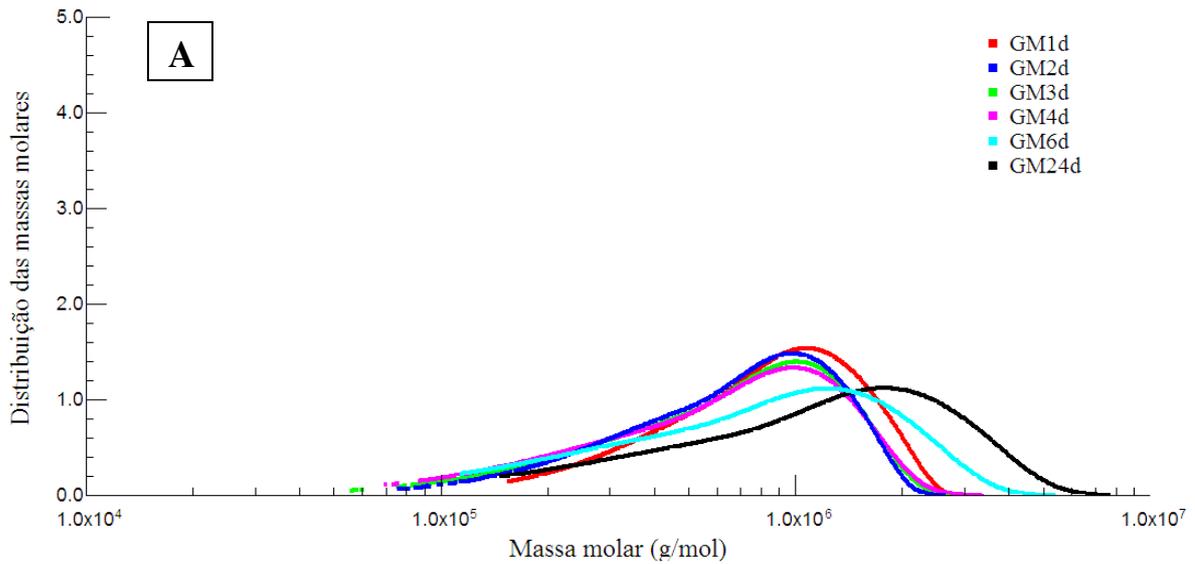
NOTAS: * fontes: GANTER *et al.*, 1993; GANTER *et al.*, 1995; BRESOLIN *et al.*, 1997; GANTER, REICHER, 1999, NOLETO *et al.*, 2009; Rend (%): rendimento (%); % Recup: taxa de recuperação (%); ND: dado não disponível

O valor absoluto do resultado obtido pela amostra GM1d para R_g foi superior ao observado na literatura e o valor de M_w apresentou-se equivalente, enquanto os demais parâmetros não coincidiram com os da literatura. Apesar de o rendimento ter sido comparativamente menor ao obtido por Ganter *et al.* (1995), que utilizaram extração com benzeno/etanol anteriormente à extração aquosa de 16 horas, o valor de 24,5% é vantajoso sobre o rendimento de 30% e a extração de 1 hora oferece a conveniência do curto tempo de extração.

As massas apresentadas nas tabelas 10 e 11 expressam a média de massa molecular ponderal em peso (M_w) e número (M_n). Porém, a distribuição dessas massas pode ser observada pela técnica de espalhamento de luz pode, pois explana melhor a abrangência logarítmica dessas massas.

A figura 17 compara a distribuição de massas moleculares em função dos valores máximos obtidos pelo detector MALLS 90° das massas moleculares (g/mol) das extrações diretas e sequenciais de bracatinga.

EXTRAÇÕES DIRETAS



EXTRAÇÕES SEQÜENCIAIS

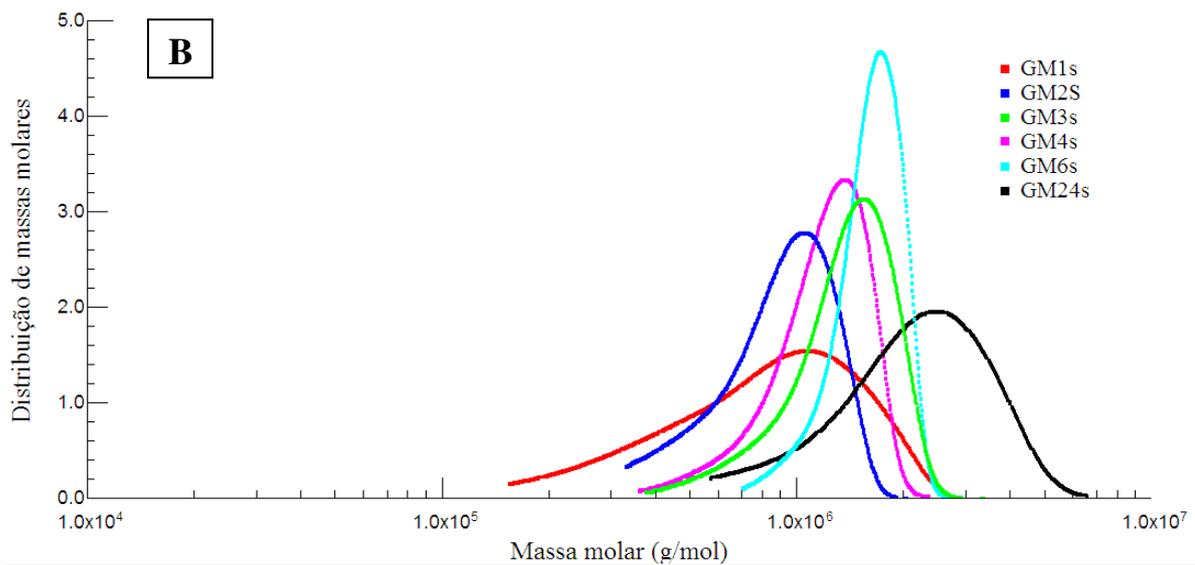


FIGURA 17 – DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES (g/mol) DAS EXTRAÇÕES DIRETAS (A) E SEQÜENCIAIS (B) DE GALACTOMANANAS DE BRACATINGA

Nas extrações diretas, até o tempo de 6 horas as massas moleculares apresentaram distribuições semelhantes, que variam de 1×10^5 g/mol até $2,5 \times 10^6$ g/mol, com destaque para o tempo de 1 hora, cujo índice de polidispersão foi 1,96, e viscosidade foi de 434,05 mL/g.

A degradação começou a ser observada a partir da extração de 6 horas, pela formação de um “ombro” à esquerda. A extração GM24d apresentou uma larga distribuição de massa variando de $1,5 \times 10^5$ g/mol até 8×10^6 g/mol, com pico de altura menor e um “ombro”, demonstrando cadeia polimérica degradada pelo tempo de extração prolongado (POLLARD *et al.*, 2008).

Os perfis mais estreitos e mais altos indicam menor polidispersão (NETOPILÍK, PODZIMEK, KRATOCHVÍL, 2004). Esse parâmetro foi visualizado na extração seqüencial de GM6s, que apresentou a relação M_w/M_n 1,17. Esta extração apresentou também viscosidade intrínseca elevada de 527,45 mL/g e a maior massa molecular (M_w) entre os diferentes tempos de extrações seqüenciais, $1,71 \times 10^6$ g/mol. Embora tenha apresentado tais resultados satisfatórios, o rendimento da extração GM6s é menor do que o da extração escolhida como a melhor dentre as galactomananas de bracinga.

Ocorreu deslocamento à direita e alargamento da base no pico de 24 horas das extrações seqüenciais, com massas que variaram de 6×10^5 g/mol a $6,5 \times 10^6$ g/mol. Extrações em tempos muito longos favorecem o processo de degradação, entretanto nas extrações seqüenciais de bracinga as galactomananas foram preservadas mesmo nos últimos tempos de extração (POLLARD *et al.*, 2010).

Na tabela 13 encontram-se comparações entre os resultados obtidos por HPSEC-MALLS/IR/VIS das extrações diretas e seqüenciais, respectivamente, das galactomananas de barbatimão.

TABELA 13 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS POR HPSEC-MALLS/IR/VIS DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DIRETA (GSd) E SEQUENCIALMENTE (GSs) DAS SEMENTES DE BARBATIMÃO

Amostra	M_n ($\times 10^6$ g/mol)	M_w ($\times 10^6$ g/mol)	M_w/M_n	$R_g(w)$ (nm)	%Recup	$[\eta]_w$ (mL/g)
GS1d	$1,29 \pm 0,33^a$	$1,69 \pm 0,80^a$	$1,27 \pm 0,27^{abc}$	$108 \pm 54,26^a$	$56,13 \pm 4,85^a$	$1206,95 \pm 6,15^a$
GS2d	$1,21 \pm 0,21^a$	$1,31 \pm 0,18^{ab}$	$1,09 \pm 0,06^a$	$83,90 \pm 16,94^a$	$59,84 \pm 17,11^a$	$1346,75 \pm 15,77^a$
GS3d	$0,93 \pm 0,05^a$	$1,03 \pm 0,06^{ab}$	$1,11 \pm 0,06^a$	$73,05 \pm 20,95^a$	$60,82 \pm 6,49^a$	$1291,75 \pm 32,74^a$
GS4d	$0,90 \pm 0,06^{ab}$	$1,08 \pm 0,10^{ab}$	$1,20 \pm 0,08^{ab}$	$80,64 \pm 18,44^a$	$63,88 \pm 12,48^a$	$1156,10 \pm 22,20^a$
GS6d	$1,09 \pm 0,19^a$	$1,15 \pm 0,20^{ab}$	$1,05 \pm 0,03^a$	$75,45 \pm 24,40^a$	$66,13 \pm 14,33^a$	$1317,80 \pm 1,27^a$
GS24d	$0,50 \pm 0,05^a$	$0,87 \pm 0,31^b$	$1,73 \pm 0,48^{bc}$	$69,00 \pm 36,04^a$	$72,42 \pm 4,02^a$	$829,55 \pm 36,84^a$
GS48d	$0,44 \pm 0,19^a$	$0,73 \pm 0,13^b$	$1,75 \pm 0,38^c$	$63,95 \pm 13,75^a$	$71,49 \pm 18,30^a$	$846,45 \pm 25,81^a$
GS1s	$1,29 \pm 0,33^a$	$1,69 \pm 0,80^a$	$1,27 \pm 0,27^a$	$108 \pm 54,26^a$	$56,13 \pm 4,85^{ab}$	$1206,95 \pm 6,15^a$
GS2s	$1,32 \pm 0,65^a$	$2,16 \pm 1,88^a$	$1,46 \pm 0,56^a$	$124,90 \pm 92,0^a$	$46,42 \pm 8,40^{ab}$	$1140,90 \pm 58,97^a$
GS3s	$0,99 \pm 0,20^{ab}$	$1,07 \pm 0,19^a$	$1,08 \pm 0,03^a$	$77,60 \pm 20,66^a$	$57,95 \pm 5,32^{ab}$	$1157,55 \pm 41,37^a$
GS4s	$1,13 \pm 0,17^{ab}$	$1,17 \pm 0,16^a$	$1,04 \pm 0,01^a$	$77,98 \pm 18,01^a$	$62,99 \pm 8,11^a$	$1269,85 \pm 9,69^a$
GS6s	$1,46 \pm 0,56^a$	$1,75 \pm 1,05^a$	$1,15 \pm 0,21^a$	$95,40 \pm 58,46^a$	$37,80 \pm 10,08^b$	$747,90 \pm 60,53^a$
GS24s	$1,11 \pm 0,34^{ab}$	$1,35 \pm 0,51^a$	$1,20 \pm 0,10^a$	$66,00 \pm 31,70^a$	$42,87 \pm 0,88^{ab}$	$618,60 \pm 66,47^a$
GS48s	$0,23 \pm 0,07^b$	$0,58 \pm 0,11^a$	$2,53 \pm 0,26^b$	$34,60 \pm 4,26^a$	$44,63 \pm 20,23^{ab}$	$220,60 \pm 175,79^a$

NOTA: % Recup: taxa de recuperação (%); Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

Nas extrações de barbatimão, os maiores valores de massa molecular (M_w) nos GS1s de 1 e 2 horas apresentaram também elevados valores de viscosidade intrínseca, assim como ocorreu para os menores valores de M_w no tempo de 48 horas de extração.

Foi observada uma redução dos valores de M_w e raio de giro conforme aumentaram os tempos de extração. Nas extrações diretas, o resultado de M_w em 1 hora foi de $1,69 \times 10^6$ g/mol e de 48 horas foi $0,73 \times 10^5$ g/mol. Quanto ao R_g , nas extrações diretas, houve redução de 108 nm para 63,95 entre 1 e 48 horas, enquanto nas extrações sequenciais a redução foi intensificada, alcançando 34,60 nm em GS48s. Embora tenha sido observada uma relação entre os valores de M_w e R_g e os tempos de extração, não houve diferença entre médias para R_g em ambos os tipos de extração e para M_w nas extrações sequenciais. Nas extrações diretas, a tendência de diminuição

dos resultados de M_w conforme aumentaram os tempos de extração foi comprovada estatisticamente pelas diferenças entre as médias.

As taxas de recuperação das extrações diretas apresentaram valores crescentes até o tempo de 24, com pequena redução de 1% no tempo de 48 horas. Entretanto, a análise estatística comprovou que as médias não apresentam diferenças entre si, ou seja, o tempo crescente de extração não influenciou tais resultados.

As variações visualizadas pela análise estatística nas extrações sequenciais para os resultados de taxa de recuperação são decorrentes de 3 fatores: o teor de polímero presente na amostra e sua pureza; solubilização insuficiente; perda de amostra por adsorção na coluna percentual de concentração perdido pelas colunas e é, portanto, a concentração real da análise (POLLARD *et al.*, 2010). A redução desse parâmetro em função do tempo sugere que a quantidade de polissacarídeo presente nas amostras reduziu paralelamente ao tempo.

Com relação ao índice de polidispersão, foi observado diferenças estatísticas nos diferentes tempos de extração direta, porém não houve tendência de amostras mais ou menos polidispersas em função do tempo. A amostra GS6d apresentou índice de polidispersão mais próximo a 1, além de rendimento de 18,3%, conforme descrito na tabela 3 (página 60). Devido a estes e outros resultados mencionados na tabela 12, sugere-se que o tempo de 6 horas de extração direta apresentou os melhores resultados para obtenção de galactomanana de barbatimão. As amostras GS4s e GS2d apresentaram resultados elevados de M_w , R_g e $[\eta]_w$, além de pouca polidispersão, no entanto apresentam baixos rendimentos de extração, respectivamente 0,6% e 10,8%.

A tabela 14 descreve a comparação entre resultados obtidos para a extração GS6d e a literatura (REICHER *et al.*, 1991; REICHER *et al.*, 1992; GANTER *et al.*, 1995). Os valores obtidos na literatura correspondem a extrações aquosas a 25°C, em tempos variados.

TABELA 14 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS COMPARATIVOS ENTRE A EXTRAÇÃO GS6d E DADOS DE GALACTOMANANAS DE BARBATIMÃO ENCONTRADOS NA LITERATURA

	Rend (%)	M_w (x10 ⁶ g/mol)	M_w/M_n	R_g(w) (nm)	%Recup	[η]_w (mL/g)
GS6d	18,3	1,15 ± 0,20	1,05 ± 0,03	75,45 ± 24,4	66,13 ± 14,33	1317,80 ± 1,27
Barbatimão*	25,0	1,8	ND	ND	ND	1400,0

NOTAS: * fontes: (REICHER *et al.*, 1991; REICHER *et al.*, 1992; GANTER *et al.*, 1995); Rend (%): rendimento (%); % Recup: taxa de recuperação (%); ND: dado não disponível

A partir das análises comparativas da tabela acima, é possível observar que os resultados obtidos para a amostra GS6d, exceto rendimento, foram semelhantes às informações de barbatimão, fato que comprova a eficácia do processo direto de extração até o tempo de 6 horas.

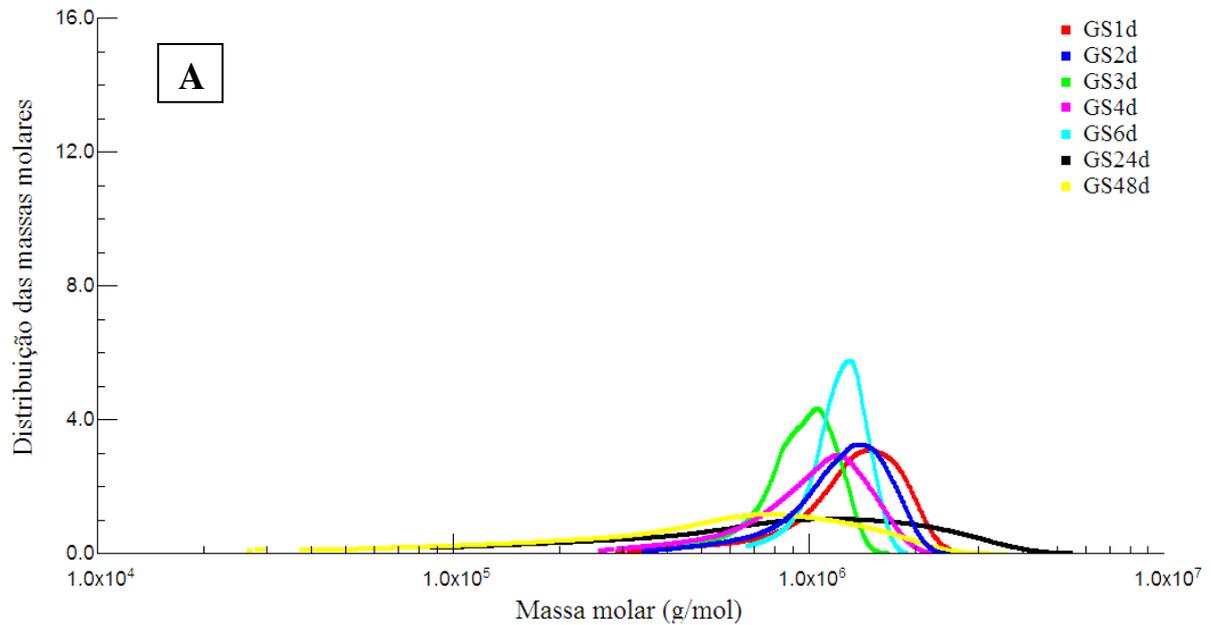
Ganter *et al.* (1995) obtiveram 25% de rendimento para a galactomanana de barbatimão, extraída a 25°C após pré tratamento com benzeno:etanol 2:1 (v/v) por 16 horas e metanol:água 4:1 (v/v). O rendimento de 18,3% obtido para GS6d apresentou vantagem sobre a metodologia citada, pois foi extraída em um tempo menor, numa mesma temperatura e sem pré tratamento com solventes orgânicos.

A extração direta de galactomanana de barbatimão por 24 horas a 25°C foi realizada por Reicher *et al.* (1991). O valor de M_w obtido foi de 1,8x10⁶ g/mol foi semelhante ao obtido para GS6d, de 1,15x10⁶ g/mol.

Reicher *et al.* (1992) realizaram extração aquosa de galactomanana de barbatimão por 3 horas a 25°C utilizando metanol:água a 3:1 e 2:1 (v/v) e etanol:água 4:1 (v/v) como pré tratamento. Os autores obtiveram 1400 mL/g de viscosidade intrínseca, enquanto a extração GS6d resultou em 1317,8 mL/g mesmo com tempo mais estendido e sem a realização de pré tratamento.

Na figura 18 encontram-se as distribuições de massa molecular correspondentes às extrações diretas e sequenciais de galactomananas de barbatimão.

EXTRAÇÕES DIRETAS



EXTRAÇÕES SEQUÊNCIAIS

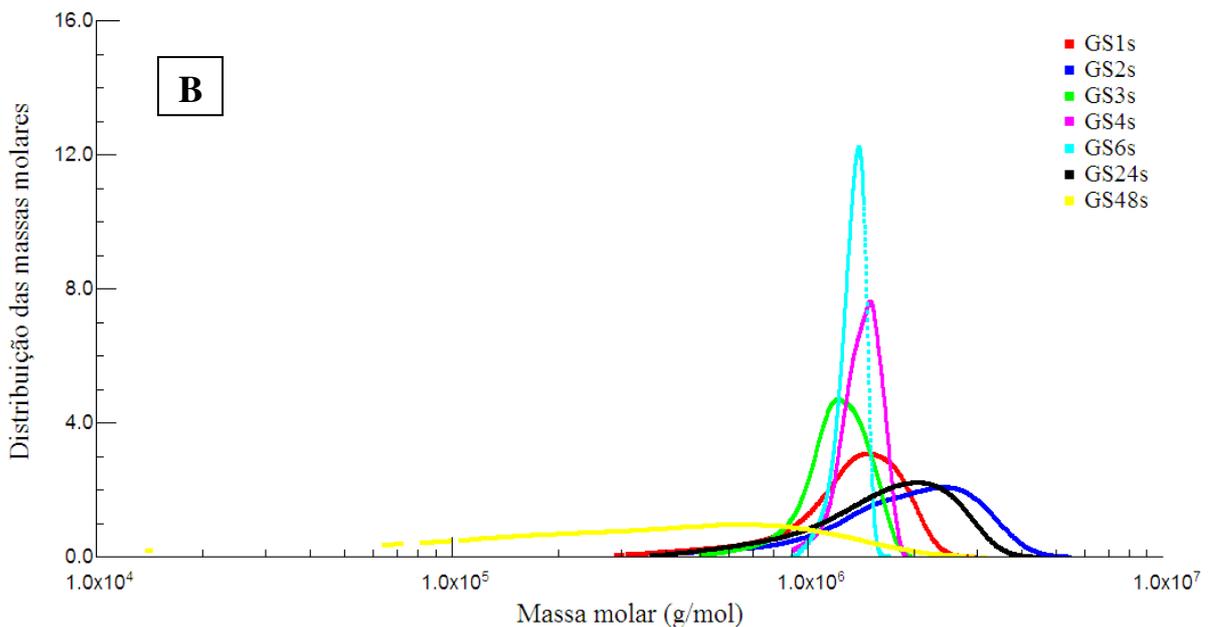


FIGURA 18 – DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES (g/mol) DAS EXTRAÇÕES DIRETAS (A) E SEQUENCIAIS (B) DE GALACTOMANANAS DE BARBATIMÃO

Em concordância com os resultados apresentados na tabela 13 (página 84), que comparam as extrações da galactomanana de barbatimão, a extração direta no tempo de 6 horas apresentou-se como menos polidisperso devido ao valor próximo a 1 e ao

pico estreito e elevado, com amplitude de massa de 7×10^5 a $1,8 \times 10^6$ g/mol. Esta amostra apresentou elevada $[\eta]_w$, 1317,80 mL/g, e $R_g(w)$, 75,45 nm, análogo ao descrito na literatura para a galactomanana comercial de guar, de razão Man:Gal semelhante, cujos resultados foram 1050,0 mL/g e 76,64 nm, respectivamente (BRUMMER, CUI, WANG, 2003).

Apesar de apresentar discreto “ombro” à esquerda, que sinaliza degradação, o pico correspondente à extração GS3d apresentou-se pouco polidisperso. O valor obtido para M_w dessa extração, $1,03 \times 10^6$ g/mol, reduzido de 21,4% em comparação com o tempo de 2 horas, corrobora com o processo de degradação visualizado na distribuição das massas (POLLARD *et al.*, 2008). Observou-se no pico da extração GS4d um aumento da dispersão das massas, comprovado pelo índice de polidispersão, que aumentou de 1,11 para 1,20 de 3 para 4 horas de extração.

Os picos dos tempos de 24 e 48 horas das extrações diretas sofreram ampliação das bases e redução da altura. Houve variação de massas entre 3×10^4 e $3,5 \times 10^6$ g/mol no tempo de 48 horas. Já a amostra GS24d variou de 9×10^4 a $5,5 \times 10^6$ g/mol os valores das massas e apresentou um deslocamento da base do pico para a direita, de forma similar ao demonstrado na literatura para extração direta de 48 horas de xiloglucana de *Hymenaea courbaril*, possivelmente por consequência do aumento do tamanho das partículas em solução (KAI, PETKOWICZ, 2010). Essas 2 extrações mostraram-se degradadas, como evidenciam os “ombro” presentes em cada perfil.

As extrações seqüenciais de barbatimão apresentaram perfis diferentes entre si. Assim como ocorreu nas extrações diretas, o tempo de 6 horas apresentou pico alto e estreito, caracterizando a menor polidispersão das massas. A variação de massas foi de 9×10^5 g/mol a $1,8 \times 10^6$ g/mol, expressivamente menor que nos demais tempos de extração, fato visualizado pelo menor M_n das extrações seqüenciais, 1,15.

De maneira semelhante à GS6s, a extração GS4s mostrou-se igualmente pouco polidispersa, pois a largura do pico estendeu-se de 9×10^5 a 2×10^6 g/mol. Apesar do pico menor, a extração de 4 horas apresentou viscosidade 41% superior à de 6 horas, possivelmente devido ao tempo de extração.

O tempo de 48 horas de extração revelou pico de grande extensão lateral, com massas de $1,5 \times 10^4$ a 3×10^6 g/mol, e mais baixo que as demais extrações, possivelmente

pela degradação devido ao tempo de extração (PICOUT *et al.*, 2002; POLLARD *et al.*, 2008).

Pollard *et al.* (2010) realizaram 3 métodos de extração, modificando tempo e temperatura, de sementes das subfamílias Faboideae e Caesalpinoideae. A extração de galactomanana de guar apresentou M_w variando de 1,99 a $2,56 \times 10^6$ g/mol após solubilização de 24h à temperatura ambiente. O maior valor obtido para massa molecular média foi aquele no qual ocorreu extração manual do endosperma. As extrações sequenciais de barbatimão apresentaram variação de M_w de $5,8 \times 10^5$ g/mol a $2,16 \times 10^6$ g/mol e foram solubilizadas por 16 horas, fato que justifica a sutil diferença em comparação ao resultado obtido para guar.

A tabela 15 são comparados os resultados obtidos por HPSEC-MALLS/RI/VIS das extrações diretas e sequenciais das galactomananas de guapuruvu.

TABELA 15 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DETERMINADOS POR HPSEC-MALLS/IR/VIS DAS GALACTOMANANAS EXTRAÍDAS DIRETA (GGd) E SEQUENCIALMENTE (GGs) DAS SEMENTES DE GUAPURUVU

Amostra	M_n ($\times 10^6$ g/mol)	M_w ($\times 10^6$ g/mol)	M_w/M_n	$R_g(w)$ (nm)	%Recup	$[\eta]_w$ (mL/g)
GG1d	$0,44 \pm 0,06^c$	$0,70 \pm 0,06^{abc}$	$1,59 \pm 0,26^a$	$75,60 \pm 3,92^{ab}$	$98,59 \pm 7,83^a$	$669,85 \pm 18,31^a$
GG2d	$0,65 \pm 0,12^a$	$0,94 \pm 0,37^a$	$1,41 \pm 0,31^a$	$98,30 \pm 29,21^a$	$99,31 \pm 3,81^a$	$983,20 \pm 12,59^a$
GG3d	$0,63 \pm 0,09^{ab}$	$0,89 \pm 0,04^{ab}$	$1,44 \pm 0,25^a$	$91,30 \pm 10,05^a$	$93,50 \pm 0,62^a$	$826,00 \pm 21,78^a$
GG4d	$0,46 \pm 0,01^{bc}$	$0,58 \pm 0,04^{bcd}$	$1,26 \pm 0,09^a$	$65,55 \pm 11,16^{ab}$	$88,70 \pm 20,33^a$	$868,65 \pm 54,80^a$
GG6d	$0,44 \pm 0,08^c$	$0,58 \pm 0,06^{cd}$	$1,32 \pm 0,17^a$	$62,42 \pm 14,98^{ab}$	$84,06 \pm 18,59^a$	$908,65 \pm 20,44^a$
GG24d	$0,41 \pm 0,02^c$	$0,51 \pm 0,02^{cd}$	$1,27 \pm 0,09^a$	$52,88 \pm 14,19^b$	$84,16 \pm 18,47^a$	$493,30 \pm 234,76^a$
GG48d	$0,23 \pm 0,02^d$	$0,32 \pm 0,04^d$	$1,37 \pm 0,07^a$	$44,37 \pm 8,15^b$	$94,17 \pm 11,77^a$	$380,55 \pm 137,39^a$
GG1s	$0,44 \pm 0,06^{bc}$	$0,70 \pm 0,06^a$	$1,59 \pm 0,26^a$	$75,60 \pm 3,92^a$	$98,59 \pm 7,83^a$	$669,85 \pm 18,31^a$
GG2s	$0,66 \pm 0,11^a$	$0,91 \pm 0,26^a$	$1,36 \pm 0,20^a$	$89,15 \pm 18,53^a$	$83,01 \pm 22,73^a$	$505,95 \pm 68,94^a$
GG3s	$0,51 \pm 0,04^{abc}$	$0,67 \pm 0,06^a$	$1,31 \pm 0,01^a$	$73,87 \pm 3,59^a$	$83,30 \pm 3,19^a$	$591,65 \pm 199,76^a$
GG4s	$0,56 \pm 0,11^{ab}$	$0,88 \pm 0,28^a$	$1,55 \pm 0,19^a$	$90,77 \pm 20,69^a$	$83,12 \pm 19,68^a$	$924,30 \pm 36,06^a$
GG6s	$0,60 \pm 0,05^{ab}$	$0,90 \pm 0,22^a$	$1,50 \pm 0,26^a$	$87,00 \pm 19,62^a$	$85,28 \pm 16,08^a$	$921,60 \pm 50,77^a$
GG24s	$0,32 \pm 0,06^{cd}$	$0,67 \pm 0,23^a$	$2,10 \pm 0,62^{ab}$	$73,33 \pm 17,32^a$	$82,23 \pm 7,24^a$	$552,10 \pm 173,38^a$
GG48s	$0,19 \pm 0,03^d$	$0,48 \pm 0,03^a$	$2,50 \pm 0,26^b$	$52,70 \pm 2,09^a$	$81,24 \pm 1,67^a$	$268,05 \pm 25,95^a$

NOTA: % Recup: taxa de recuperação (%); Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

Todas as extrações apresentaram taxa de recuperação elevada, principalmente as extrações diretas. A extração GG2d apresentou taxa de recuperação próxima a 100% e também os maiores valores encontrados para R_g , 98,3 nm, e para $[\eta]_w$, de 983,2 mL/g. O tempo de 3 horas de extração direta apresentou resultados semelhantes de rendimento, raio de giro, viscosidade intrínseca e recuperação, porém necessita de tempo maior de extração, fato que favorece a extração de 2 horas.

Nas extrações diretas, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros M_n , M_w e R_g e, exceto no tempo de 1 hora, houve tendência de diminuição em função do tempo de extração. Para as extrações seqüenciais, foi observada esta tendência na variável M_w/M_n .

Foi observado redução de massa molecular (M_w) e viscosidade intrínseca nos tempos de 24 e 48 horas de ambos os tipos de extração, assim como de R_g nas extrações de 48 horas e em GG24d. As amostras GG24s e GG48s mostraram-se mais polidispersas que as demais e tal resultado foi comprovado pelas análises estatísticas. Apesar de os valores M_n não representarem determinações absolutas nas análises de HPSEC-MALLS, o aumento do índice de polidispersão nos tempos mais estendidos sugere degradação da cadeia polimérica (POLLARD *et al.*, 2010).

A degradação de uma cadeia polimérica é o processo de redução de sua massa molecular, devido a quebras de ligações covalentes na cadeia principal, nas ramificações ou na separação das ramificações da cadeia principal. As quebras podem ocorrer aleatoriamente ou seqüencialmente (MICHEL, 1999).

Na análise das sementes do gênero *Cassia*, pertencentes à subfamília Caesalpinoideae, Pollard *et al.* (2010) desenvolveram um protocolo para retirar o tegumento que impedia a entrada de água no endosperma durante a imersão das sementes previamente à moagem. Esse procedimento pode ter afetado a taxa de recuperação das extrações, cujo valor máximo foi de 67%. As taxas de recuperação de guapuruvu foram superiores a 80% em todas as análises, resultado possivelmente favorecido pela técnica de extração utilizada para a espécie, que determina a fervura das sementes inteiras para inativação enzimática e a moagem do endosperma puro.

Os resultados obtidos por HPSEC-MALLS/IR/VIS da extração GG2d foram comparados com dados provenientes da literatura (GANTER *et al.*, 1995; BRESOLIN

et al., 1997; PETKOWICZ *et al.*, 1999; VIANNA-FILHO, 2009) na tabela 16. Exceto em Petkowicz *et al.* (1999), em que a extração foi realizada a 4°C, os valores obtidos na literatura correspondem a extrações aquosas a 25°C, em tempos variados.

TABELA 16 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS COMPARATIVOS ENTRE A EXTRAÇÃO GG2d E DADOS DE GALACTOMANANAS DE GUAPURUVU E ENCONTRADOS NA LITERATURA

	Rend (%)	M _w (x10 ⁶ g/mol)	M _w /M _n	R _g (w) (nm)	%Recup	[η] _w (mL/g)
GG2d	24,9	0,94 ± 0,37	1,41 ± 0,31	98,30 ± 29,21	99,31 ± 3,81	983,20 ± 12,59
Guapuruvu*	25,0	1,35	ND	108,6	ND	850,0

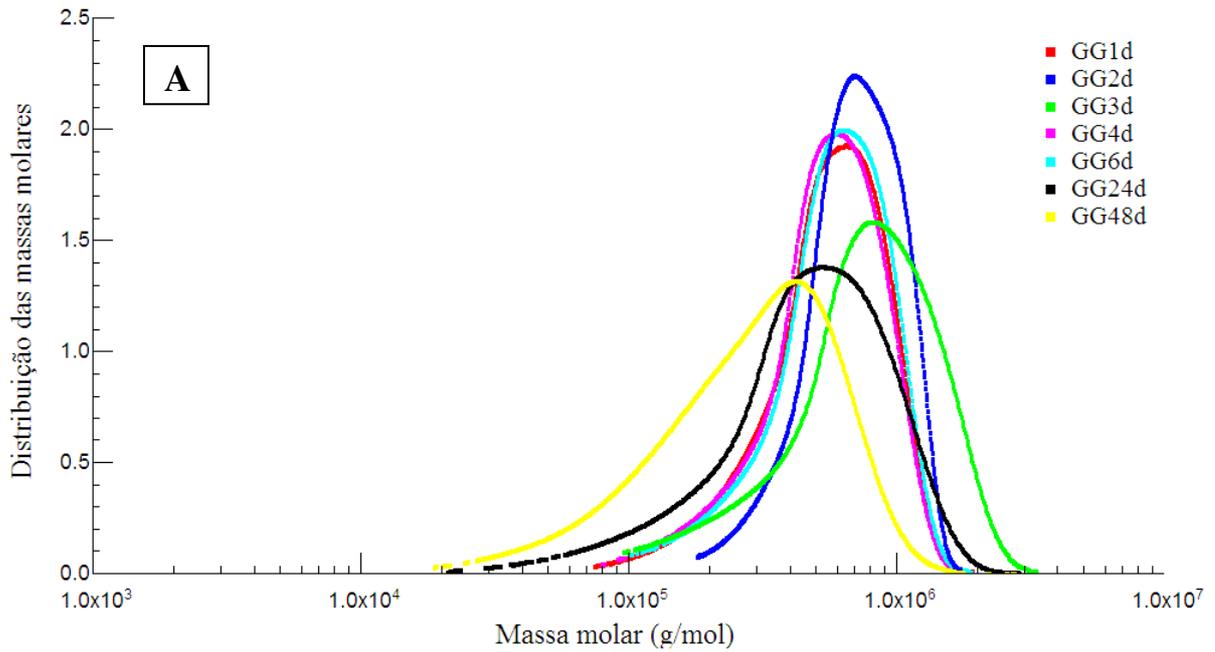
NOTAS: * fontes: GANTER *et al.*, 1995; BRESOLIN *et al.*, 1997; PETKOWICZ *et al.*, 1999; VIANNA-FILHO, 2009; Rend (%): rendimento (%); % Recup: taxa de recuperação (%); ND: dado não disponível

É possível notar, a partir da análise comparativa da tabela 18, que apenas o resultado de M_w obtido para GG2d foi ligeiramente inferior ao verificado na literatura. Os resultados de obtidos por Pollard *et al.* (2008) no processo de melhoramento da extração de 2 horas de alfarroba, esta que apresenta relação Man:Gal semelhante à da galactomanana de guapuruvu, foram inferiores aos obtidos para GG2d exceto para M_w (0,99x10⁶ g/mol). Para taxa de recuperação os autores obtiveram 78,5% e o valor de índice de polidispersão variou entre 1,5 a 1,8. Tais evidências garantem a viabilidade do processo de extração direta até 2 horas para a galactomanana de guapuruvu.

Nas extrações diretas das 3 espécies analisadas (bracatinga, barbatimão e guapuruvu), foi observado que nas amostras que apresentaram os maiores valores de M_w também foram encontrados os maiores valores de R_g. Esses resultados estão de acordo com a teoria de Flory, cuja equação indica a proporcionalidade entre raio de giro e massa molecular (PATEL *et al.*, 2006).

A figura 19 correlaciona a distribuição de massas moleculares em função das massas moleculares (g/mol) das extrações diretas e seqüenciais de guapuruvu:

EXTRAÇÕES DIRETAS



EXTRAÇÕES SEQUÊNCIAIS

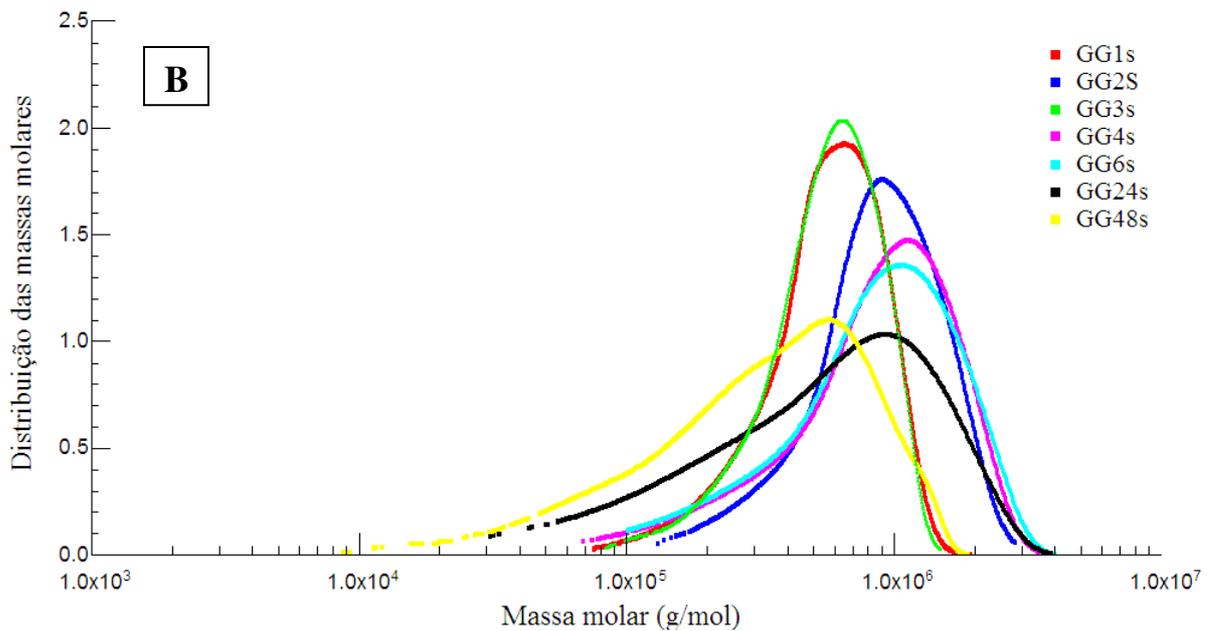


FIGURA 19 – DISTRIBUIÇÃO DAS MASSAS MOLECULARES (g/mol) DAS EXTRAÇÕES DIRETAS (A) E SEQUENCIAIS (B) DE GALACTOMANANAS DE GUAPURUVU

Nas extrações diretas, o perfil menos polidisperso foi o de 2 horas, cuja amplitude de massas partiu de 2×10^5 g/mol atingindo 2×10^6 g/mol. Conforme já

mencionado, esta amostra foi apontada como a melhor extração pelos valores elevados de rendimento: 24,9%, taxa de recuperação: 99,31%, M_w : $9,4 \times 10^5$ g/mol, R_g : 98,3 nm e $[\eta]$: 983,20 mL/g.

A partir de 24 horas, foi observado alargamento das bases e formação de um “ombro” em GG24d. Além dessa indicação, o processo de degradação da cadeia polimérica foi evidenciado pela redução de M_w e da viscosidade neste tempo de extração.

Foi verificado nas extrações seqüenciais que a amostra que proporcionaram pico mais elevado e mais estreito foi a de 3 horas, seguida pela extração de 1 hora. Com o passar do tempo, as amostras apresentaram deslocamento para maiores massas moleculares, chegando a 4×10^6 g/mol no tempo de 24 horas.

A extração GG48s apresentou base bastante estendida, variando as massas de 9×10^3 g/mol a 2×10^6 g/mol, e um ombro à esquerda, que evidenciou degradação. Assim como ocorreu com o resultado de $0,48 \times 10^6$ g/mol para M_w , a extração de 48 horas apresentou valores diminuídos de raio de giro, 52,7 nm, e de viscosidade, 268,05 mL/g.

Avaliando a distribuição das massas moleculares das extrações de bracinga, barbatimão e guapuruvu, observou-se que os últimos tempos de extração, usualmente a partir de 24 horas, demonstraram a presença de agregados pela expansão das bases dos picos e, de maneira contrária, sinalizaram processos evidentes de degradação, pela deformação dos picos e diminuição dos valores de M_w . Este fenômeno também foi evidenciado em processos de extração de galactomananas comerciais e em xiloglucanas (PICOUT *et al.*, 2002; POLLARD *et al.*, 2008).

Foi observado para todas as espécies que no parâmetro de viscosidade intrínseca não houve diferenças estatisticamente significativas em ambos os processos de extração ao longo do tempo. Tal resultado pode ser justificado, neste aspecto, pela baixa amostragem do experimento.

Sinais de desagregação foram observados nas extrações das 3 espécies, como nas comparações entre 4 e 6 horas da extração direta de bracinga e entre 2 e 3 horas das extrações seqüenciais tanto de barbatimão quanto de guapuruvu. Esse fenômeno é caracterizado quando praticamente não há alteração de $[\eta]$, mas ocorre redução de M_w .

Ao contrário da viscosidade intrínseca, a massa molecular é fortemente afetada pela presença de agregados, e a dimensão dos agregados contribui amplamente com a intensidade de espalhamento de luz (PICOUT *et al.*, 2002).

A fim de se verificar a presença de agregados no sistema, foram comparados o raio de giro – $R_g(z)$ – proveniente das análises por HPSEC-MALLS/IR e o raio de giro como parâmetro reológico, $R_g(\eta)$, obtido matematicamente pela equação de Flory-Fox (equação 14, página 44). Assim como ocorre com as médias das massas moleculares, os raios de giro provenientes de HPSEC-MALLS são obtidos em função do número de moléculas, do peso e do fator z. O $R_g(z)$ determina a fração “z” em determinado intervalo de tempo.

Em solventes θ , tendo viscosidade intrínseca $[\eta]_w$ e massa molecular média (M_w) conhecidas, o parâmetro de viscosidade ($\Phi\varepsilon$) pode ser calculado (equações 15 e 16, página 45) a partir do fator de expansão da cadeia (ε) e de α , que corresponde à relação logarítmica dupla visualizada no gráfico $[\eta]$ versus M_w (FLORY, 1953; GIDLEY *et al.*, 1991; FREITAS *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2010). Para todos os cálculos, foi selecionado apenas 1 valor de α para cada tempo de extração, obtido através do programa ASTRA. Dessa forma, cada extração obteve apenas um resultado de $R_g(\eta)$.

A comparação entre $R_g(z)$ (nm) e $R_g(\eta)$ (nm) das extrações diretas e seqüenciais de bracinga, barbatimão e guapuruvu encontra-se na tabela 17:

TABELA 17 – COMPARAÇÃO ENTRE $R_g(z)$ E $R_g(\eta)$ DAS EXTRAÇÕES DIRETAS E SEQÜENCIAIS DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU

continua

Bracatinga					
	$R_g(z)$ (nm)	$R_g(\eta)$ (nm)		$R_g(z)$ (nm)	$R_g(\eta)$ (nm)
GM1d	110,37 ± 43,39 ^a	121 ^a	GM1s	110,37 ± 43,39 ^a	121 ^a
GM2d	56,70 ± 22,86 ^a	116 ^a	GM2s	65,65 ± 11,35 ^a	111 ^a
GM3d	100,10 ± 39,97 ^a	115 ^a	GM3s	98,97 ± 30,83 ^a	133 ^a
GM4d	94,63 ± 40,33 ^a	131 ^a	GM4s	86,67 ± 47,47 ^a	124 ^a
GM6d	82,76 ± 31,70 ^a	116 ^a	GM6s	87,80 ± 28,62 ^a	124 ^a
GM24d	97,07 ± 49,05 ^a	129 ^a	GM24s	84,53 ± 31,04 ^a	114 ^a
GM48d	45,50 ± 7,31 ^a	97 ^a	GM48s	63,93 ± 12,33 ^a	96 ^a

TABELA 17 – COMPARAÇÃO ENTRE $R_g(z)$ E $R_g(r)$ DAS EXTRAÇÕES DIRETAS E SEQUENCIAIS DE BRACATINGA, BARBATIMÃO E GUAPURUVU

conclusão

Barbatimão					
	$R_g(z)$ (nm)	$R_g(\eta)$ (nm)		$R_g(z)$ (nm)	$R_g(\eta)$ (nm)
GS1d	$125,50 \pm 76,43^a$	169 ^a	GS1s	$125,50 \pm 76,43^a$	169 ^a
GS2d	$87,70 \pm 19,17^a$	133 ^a	GS2s	$154,10 \pm 136,94^a$	185 ^a
GS3d	$76,00 \pm 23,46^a$	124 ^a	GS3s	$80,50 \pm 22,39^a$	145 ^a
GS4d	$87,38 \pm 22,13^a$	141 ^a	GS4s	$79,55 \pm 18,63^a$	132 ^a
GS6d	$85,30 \pm 38,67^a$	139 ^a	GS6s	$106,43 \pm 75,90^a$	137 ^a
GS24d	$85,10 \pm 57,57^a$	109 ^a	GS24s	$71,80 \pm 38,69^a$	112 ^a
GS48d	$74,88 \pm 17,17^a$	116 ^a	GS48s	$48,07 \pm 5,59^a$	66 ^a
Guapuruvu					
	$R_g(z)$ (nm)	$R_g(\eta)$ (nm)		$R_g(z)$ (nm)	$R_g(\eta)$ (nm)
GG1d	$89,00 \pm 8,35^{ab}$	112 ^{ab}	GG1s	$89,00 \pm 8,35^a$	112 ^a
GG2d	$112,57 \pm 42,26^a$	146 ^a	GG2s	$105,65 \pm 39,35^a$	124 ^a
GG3d	$103,97 \pm 15,91^a$	128 ^{ab}	GG3s	$82,40 \pm 3,45^a$	123 ^a
GG4d	$72,50 \pm 11,87^{ab}$	120 ^{ab}	GG4s	$111,93 \pm 38,52^a$	138 ^a
GG6d	$69,94 \pm 16,60^{ab}$	110 ^{ab}	GG6s	$107,83 \pm 38,82^a$	121 ^a
GG24d	$59,93 \pm 14,35^b$	117 ^b	GG24s	$98,13 \pm 40,17^a$	111 ^a
GG48d	$52,27 \pm 27,06^b$	95 ^b	GG48s	$73,53 \pm 3,90^a$	77 ^a

Conforme demonstrado na tabela 17, houve diminuição dos valores de $R_g(\eta)$ para as galactomananas das 3 espécies ao longo dos tempos de extração. Observou-se que tais valores, obtidos a partir de cálculos matemáticos, foram superiores aos valores de $R_g(z)$ para todas as galactomananas. Embora essa diminuição tenha sido observada pelos valores da tabela, a análise estatística comprovou que não houve diferenças significativas para as extrações de bracatinga e barbatimão ou mesmo para as extrações sequenciais de guapuruvu. Exceto no tempo de 1 hora, foi verificada uma tendência de diminuição dos valores ao longo do tempo, tanto para $R_g(\eta)$ quanto para $R_g(z)$, nas extrações diretas de guapuruvu.

O detector de espalhamento de luz (MALLS) é sensível a agregados, enquanto o parâmetro de viscosidade sofre pouca influência dessas moléculas (GIDLEY, 1991). A análise por HPSEC-MALLS inclui a passagem das soluções de galactomananas por

4 colunas acopladas em série, com limite de exclusão de 7.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 e 5.10^3 g/mol. Ao percorrer as colunas, os polissacarídeos sofreram cisalhamento e houve desagregação. A diferença visualizada entre os valores de $R_g(\eta)$ e $R_g(z)$ é mínima, considerando o erro das médias de $R_g(z)$, e confirma que os resultados obtidos por HPSEC-MALLS/IR/VIS, nas tabelas 13,15 e 17 referem-se a amostras desagregadas.

De acordo com Freitas *et al.* (2005), pode-se utilizar o aquecimento para reduzir agregados e com isso ocorre uma boa aproximação entre os valores dos raios de giro obtidos por espalhamento de luz e o calculado por viscosimetria. Segundo Gidley *et al.* (1991), a diferença de resultados encontrados para viscosidade intrínseca proveniente dos cálculos matemáticos ($[\eta]_r$) e a viscosidade obtida pelo detector viscosimétrico ($[\eta]_z$) são conseqüências da polidispersão molecular e do volume de exclusão, que influencia $R_g(\eta)$.

O raio de giro $R_g(z)$ também é empregado em cálculos comparativos relacionados às propriedades moleculares. Os valores de $R_g(z)$ são utilizados em conjunto com os valores de R_h na obtenção do fator rho (ρ), na ausência de agregados, para definição da arquitetura molecular (WITTGREN, PORSCH, 2002; FREITAS *et al.*, 2005).

O parâmetro segundo coeficiente virial (A_2) está presente na equação de Rayleigh/Debye/Gans (eq. 3, página 37), que relaciona a intensidade de luz espalhada com propriedades físico-químicas da molécula. O parâmetro A_2 classifica a qualidade do solvente. Quanto menor for o valor de A_2 , melhor será o solvente (KOSTANSKI, KELLER, HAMIELEC, 2004).

Foram calculados os valores de A_2 para as extrações de 1 hora de bracinga, barbatimão e guapuruvu, que resultaram respectivamente em $9,1 \times 10^{-5}$, $8,7 \times 10^{-5}$ e $4,7 \times 10^{-5}$ cm³mol/g². Esses resultados indicam que NaNO₂ é um bom solvente para as galactomananas das 3 espécies e causa expansão das cadeias, conseqüentemente nos valores de R_h , visto que este parâmetro é obtido pela interação polímero-solvente.

Conforme observado nos resultados das análises de concentração por filtrações os agregados foram removidos, preferencialmente, pela filtração a 0,22 µm. Entretanto, nos resultados obtidos por HPSEC-MALLS/IR/VIS, tais moléculas foram desagregadas pelo cisalhamento das colunas de gel permeação. Foi observado pelos

resultados de A_2 que o solvente NaNO_2 proporciona pequena expansão da cadeia, o que pode alterar os valores de R_g e R_h .

Para a obtenção dos valores de R_h , as soluções de galactomananas foram tratadas com centrifugação seguida de filtração com membranas de porosidade 1,2 e 0,45 μm e dessa forma, os agregados não foram completamente removidos e impossibilitaram a obtenção do fator rho (ρ) com a utilização dos resultados de R_h .

Segundo a classificação de Kanao (2003), geralmente o valor de ρ diminui com ramificação do polissacarídeo. Para estruturas globulares, o fator rho resulta entre 1,5 e 1,8, para cadeias lineares flexíveis, gira em torno de 0,774 (que é o valor estipulado para esferas rígidas) e para valores acima de 2,0, a flexibilidade da cadeia tende a aumentar.

Kai, Petkowicz (2010) analisaram que os resultados obtidos para ρ nas extrações diretas de xiloglucanas de *Hymenaea courbaril*, filtradas em membranas de porosidade 0,22 μm , que decresceram de 1,3 a 0,9 conforme aumentou o tempo de extração. Segundo os autores, os resultados caracterizaram cadeias ramificadas e apresentaram um direcionamento à forma globular das cadeias.

As técnicas adotadas neste trabalho para análises de polímeros envolvendo tipos e tempos de extração, purificação por filtração e centrifugação, análise de concentração, espalhamento de luz com multidetecção (HPSEC-MALLS) acoplada a detectores IR e VIS proporcionaram uma avaliação realizada pela 1ª vez para as galactomananas de fontes nativas brasileiras como bracinga, barbatimão e guapuruvu. Tais metodologias podem servir de modelo para análise de polissacarídeos de outras espécies.

A importância da avaliação individual das 3 espécies foi confirmada pelos resultados, pois mesmo as galactomananas extraídas de sementes pertencentes à mesma subfamília apresentam diferentes comportamentos quanto aos rendimentos, composição monossacarídica e propriedades físico-químicas em solução.

5. CONCLUSÃO

As galactomananas obtidas a partir de extrações aquosas, direta e seqüencial, de sementes de bracatinga, barbatimão e guapuruvu foram avaliadas quanto aos rendimentos. Foi observado que para a bracatinga, o tempo de extração direta é indiferente, pois em todos os tempos o rendimento é semelhante. Para barbatimão ocorreu aumento de rendimento a partir de 6 horas, enquanto nas extrações de guapuruvu a porcentagem de rendimento, considerando a moagem de endosperma puro, apresentou elevação conforme o tempo, mantendo-se acima de 25%.

As extrações seqüenciais apresentaram rendimento elevado apenas na primeira hora de extração, exceto guapuruvu, que em 2 horas ainda manteve rendimento de 20%, em relação ao endosperma isolado. Ainda que o processo de extração seqüencial aparente vantagem econômica pelo uso apenas da quantidade inicial de sementes moídas, este método não traduz benefícios em relação a rendimento e parâmetros obtidos por HPSEC-MALLS/IR/VIS.

Ao longo dos tempos de extração, as galactomananas de bracatinga e barbatimão não apresentaram modificações expressivas nas relações Man:Gal, com variações de 1,1:1 a 1,2:1 para bracatinga e de 2,0:1 a 2,6:1 para barbatimão. Para as galactomananas de guapuruvu, as razões Man:Gal das extrações seqüenciais foram crescentes, partindo de 2,5:1 em 1 hora até 4,2:1 em 48 horas. A origem botânica de cada espécie apresentou influência sobre tais resultados, pois bracatinga e barbatimão pertencem à subfamília Mimosoideae e guapuruvu, à Caesalpinoideae, já conhecida por abranger sementes que apresentam relações Man:Gal elevadas e passíveis de alteração por diferentes processos de extração.

Através das análises de concentração foi verificado que não houve diferenças estatisticamente significativas nas filtrações de 1,2 μm para 0,45 μm e de 0,45 μm para 0,22 μm para os tempos de 2 e 48 horas das extrações seqüenciais e diretas das 3 espécies. A perda de concentração caracterizou a eluição de material na membrana de filtração, efeito visualizado nas amostras de GM2d, GS48d e GG2d e na filtração de 0,22 μm de GS2d. Assim, em experimentos realizados sem o auxílio de colunas de gel

permeação as amostras devem, necessariamente, sofrer filtrações para remoção de agregados moleculares.

A presença e remoção de agregados moleculares foram observados pela diminuição do perfil de espalhamento de luz (MALLS 90°), acompanhada de elevação de concentração (IR) e viscosidade (VIS) ou manutenção desta na filtração com membrana de porosidade 0,45 μm , na extração direta de 2 horas de barbatimão (GS2d), e ao longo de todo processo para extrações diretas de 48 horas de bracatinga (GM48d) e guapuruvu (GG48d). A viscosidade mostrou-se mais sensível à concentração do que aos agregados em todas as análises, exceto para GG48d.

Sinais de degradação foram verificados através dos resultados obtidos por HPSEC-MALLS/IR/VIS especialmente nos tempos de 24 e 48 horas de barbatimão e guapuruvu. De acordo com as análises estatísticas, ficou claro que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de M_w , M_w/M_n , R_g e taxa de recuperação considerando os processos direto e seqüencial de extração. Entretanto foi observada influência do tempo de extração sobre a distribuição das massas, que confirmou a presença de moléculas degradadas. Foram selecionados os tempos de extração que apresentaram os melhores resultados para cada espécie, considerando o mínimo tempo de extração e resultados obtidos por HPSEC-MALLS/IR/VIS, sendo 1 hora (GM1d), 6 horas (GS6d) e 2 horas (GG2d) das extrações diretas, respectivamente para bracatinga, barbatimão e guapuruvu.

Foi observado que em todos os tempos de ambos os tipos de extração, os valores de $R_g(\eta)$ foram superiores aos valores de $R_g(z)$, porém essas diferenças são mínimas quando o erro das médias é considerado. Tais resultados comprovaram que os polímeros sofreram cisalhamento durante a passagem pelas colunas do HPSEC-MALLS, eliminando agregados, e que os demais resultados obtidos por este método são confiáveis.

Os resultados aqui apresentados favorecem a aplicação industrial desses polissacarídeos como potenciais fontes de galactomananas, pois dispensam importação e favorecem o custo-benefício de produção.

REFERÊNCIAS

ACHAYUTHAKAN, P.; SUPHANTHARIKA, M. Pasting and rheological properties of waxy corn starch as affected by guar gum and xanthan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 9–17, 2008.

AL-ASSAF, S.; PHILIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. Controlling the molecular structure of food hydrocolloids. **Food hydrocolloids**, v. 20, p. 369-377, 2006.

ANDRADE, C. T., AZERO, E. G., LUCIANO, L., & GONCALVES, M. P. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: Comparison with locust bean gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 181–185, 1999.

AZERO, E.G.; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing - Material properties**, v. 21, p. 551-556, 2002.

BAILEY, R.W. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. Londres: Academic Press, 1971.

BASU, T.K.; SRICHAMROEN, A. Health Benefits of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum leguminosae*). In: WATSON, R.; PREEDY, V.R. Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables. Academic Press, 2009. p. 425-435.

BEHR, S.R.; MUSTAD, V.A.; WALKER, D.; BLOCH, B.S.; BLOCH, T.D.; RD; LD. Cholesterol-lowering effect of food bars containing guar gum in healthy women and men. **Journal of the American Dietetic Association**, 1985.

BENTO, J.F. **Aspectos taxonômicos de polissacarídeos de endosperma de leguminosas**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BLOG TIMBLINDIM. Disponível em:
<<http://timblindim.wordpress.com/arvores/barbatimao>> Acesso em: 22/09/2009.

BOUZOUITA, N.; KHALDI, A.; ZGOULLI, S.; CHEBIL, L.; CHEKKI, R.; CHAABOUNI, M.M.; THONART, P. The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia. **Food chemistry**, v. 101, p. 1508-1515, 2007.

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

BROOKHAVEN – Particle size standards and microspheres – Dynamic Light Scattering – <http://www.brookhaven.co.uk/dynamic-light-scattering.html> - Acesso em 16/12/2009.

BRUMMER, Y; CUI, W.; WANG, Q. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. **Food hydrocolloids**, v. 17, p. 229-236, 2003.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C.; LIMA, D.U. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. In: GUPTA, A.K.; NAUR, N. **Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation**, São Paulo: Elsevier Science B. V., p. 283-316, 2000.

BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R.; ROCHA, D.C.; DIETRICH, S.M.C. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. **Phytochemistry**, v. 38(4), p. 871-875, 1995.

BURCHARD, W. Solubility and solution structure of cellulose derivatives. **Cellulose**, v. 10, p. 213-225, 2003.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras – Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Embrapa, p. 338-471, 1994.

CERQUEIRA, M.A.; PINHEIRO, A.C.; SOUZA, B.W.S.; LIMA, A.M.P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J.A.; MOREIRA, R.A.; COIMBRA, M.A.; GONÇALVES, M.P.; VICENTE, A.A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 408-414, 2009.

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

CHU, B. **Laser light scattering – Basic principles and practice**. 2. ed. San Diego: Academic Press Inc., 1991.

CUI, S.W.; ESKIN, M.A.N.; WU, Y.; DING, S. Synergisms between yellow mustard mucilage and galactomannans and applications in food products — A mini review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 121-130, p. 249-256, 2006.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**, 2. ed. The New York Botanical Garden: New York, p. 261, 1988.

CUNHA, P.L.R.; CASTRO, R.R.; ROCHA, F.A.C.; PAULA, R.C.M. de.; FEITOSA, J.P.A. Low viscosity hydrogel of guar gum: Preparation and physicochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, p. 99–104, 2005.

CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M. de.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649–660, 2009.

CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M. de.; FEITOSA, J.P.A. Purification of guar gum for biological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 324–331, 2007.

DA SILVA, J.A.L.; GONÇALVES, M.P. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. **Food Hydrocolloids**, v. 4, p. 277–287, 1990.

DAAS, P.; GROLLE, K.; VLIET, T.; SCHOLS, H.; DE JONGH, H. Toward the recognition of structure–function relationships in galactomannans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4282–4289, 2002.

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

DAKIA, P.A.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. **Food chemistry**, v. 102, p. 1368-1374, 2007.

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

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

DOYLE, J.P.; GIANNOULI, P.; MARTIN, E.J.; BROOKS, M.; MORRIS, E.R. Effect of sugars, galactose content and chainlength on freeze-thaw gelation of galactomannans. **Carbohydrate polymers**, v. 64, p. 391-401, 2006.

ELIAS, T.S. Mimosoideae. In: POLHILL, R.M., RAVEN, P.H. **Advances in Legume Systematics**, Part 1. Royal Botanic Gardens Kew, 1981.

ESPOSITO, F.; ARLOTTI, G.; BONIFATI, A.M.; NAPOLITANO, A.; VITALE, D.; FOGLIANO, V. Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. **Food Research International**, v. 38, p. 1167-1173, 2005.

ERNANI, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras**. Colombo, ed. Embrapa-SPI, p. 47 e 475, 1994.

FERNANDES, P.B. Determination of the physical functionality of galactomannans in xanthan gum/galactomannan mixed systems by periodate oxidation. **Food Control**, v. 5, p. 244-248, 1994.

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

FREITAS, R.A.; MARTIN, S.; SANTOS, G.L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M.S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.-R. Physico-chemical properties of seed xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 507–514, 2005.

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

FUNAMI, T.; KATAOKA, Y.; HIROE, M.; ASAI, I.; TAKAHASHI, R.; NISHINARI, K. Thermal aggregation of methylcellulose with different molecular weights. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 46–58, 2007.

FUNAMI, T.; KATAOKA, Y.; NODA, S.; HIROE, M.; ISHIHARA, S.; ASAI, I.; TAKAHASHI, R.; NISHINARI, K. Functions of fenugreek gum with various molecular weights on the gelatinization and retrogradation behaviors of corn starch-1: Characterizations of fenugreek gum and investigations of corn starch/fenugreek gum composite system at a relatively high starch concentration; 15 w/v%. **Food Hydrocolloids**, v. 22; 763–776, 2008.

GABORIEAU, M.; NICOLAS, J.; SAYE, M.; CHARLEUX, B.; VAIRON, J.P.; GILBERT, R.G.; CASTIGNOLLES, P. Separation of complex branched polymers by size-exclusion chromatography probed with multiple detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 215–223, 2008.

GANTER, J.L.M.S. **Estudos dos carboidratos de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga) - Análise estrutural dos oligossacarídeos e propriedades reológicas da galactomanana**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.

GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 1, 1995.

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*. **Carbohydrate Polymers**, v. 17, p. 171-175, 1992.

GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Mimosaceae* spp. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 55-62, 1999.

GANTER, J.L.M.S.; SABBI, J.C.; REED, W.F. Real-time monitoring of enzymatic hydrolysis of galactomannans. **Biopolymers**, Tulane University-USA, v. 59, n. 4, p. 226-242, 2001.

GANTER, J.L.M.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; REICHER, F. Structural studies on galactomannans from Brazilian seeds. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 12(6), p. 753-767, 1993.

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

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

GOMEZ, C., NAVARRO, A., MANZANARES, P., HORTA, A., CARBONELL, J.V. Physical and structural properties of barley (1→3), (1→4)-β-D-glucan. Part I. Determination of molecular weight and macromolecular radius by light scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 32, p. 7-15.

GRIMM, A.; KRÜGER, E.; BURCHARD, W. Solution properties of B-D-(1,3)(1,4)-glucan isolated from beer. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, p. 205-214, 1995.

GRIZARD, D.; BARTHOMEUF, C. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, p. 563-588.

HUANG, Q., ZHANG, L. Solution properties of (1→3)-α-D-glucan and its sulfated derivative from *Poria cocos* mycelia via fermentation tank. **Biopolymers**, v. 79, p. 28-38, 2005.

JONES, A.R. Light scattering for particle characterization. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 25, p. 1-53, 1999.

JOSHI, H.; KAPOOR, V.P. Cassia grandis Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1907-1912, 2003.

KAI, K.C.; PETKOWICZ, C.L.O. Influence of extraction conditions on properties of seed xyloglucan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 223-228, 2010.

KANAO, M.; MATSUDA, Y.; SATO, T. Characterization of polymer solutions containing a small amount of aggregates by Static and Dynamic Light Scattering. **Macromolecules**, v. 36, p. 2093-2102, 2003.

KAPOOR, V.P.A. A galactomannan from the seeds of *Delonix regia*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1129-1132, 1972.

KERKER, M. **The scattering of light and other electromagnetic radiation**. New York: Academic Press, 1969.

KHOURYIEH, H.A.; HERALD, T.J.; ARAMOUNI, F.; ALAVI S. Intrinsic viscosity and viscoelastic properties of xanthan/guar mixtures in dilute solutions: Effect of salt concentration on the polymer interactions. **Food Research International**, v. 40, p. 883-893, 2007.

KLEIN, A.N.; BRUNATTO, S.F. Apostila de metalurgia do pó. Material Didático Disciplina TM710 da Pós Graduação de Metalurgia do Pó. UFPR, 1994.

KOOIMAN, P. Structures of the galactomannans from seeds of *Annona muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor*, and *Sophora japonica*. **Carbohydrate Research**, v. 20, n. 2, p. 329-337, 1971.

KOOP, H.S.; PRAES, C.E.O.de; REICHER, F.; PETKOWICZ, C.L.O.; SILVEIRA, J.L.M. Rheological behavior of gel of xanthan with seed galactomannan: Effect of hydroalcoholic-ascorbic acid. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 559-563, 2009.

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

LANDAU, L.D; LIFSCHITZ, E.M. **Statistical Physics**. 3 ed. Oxford: Pergamon Press, 1963.

LANG, P.; BURCHARD, W. Structure and aggregation behavior of tamarind seed polysaccharide in aqueous solution. **Makromolekular Chemistry**, v. 194, p. 3157–3166, 1993.

LARIZADOU, A.; BILIADERIS, C.G.; IZYDORCZYK, M.S. Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 68-75, 2000.

LI, W.; WANG, Q.; CUI, S.W.; HUANG, X.; KAKUDA, Y. Elimination of aggregates of (1/3) (1/4)-B-D-glucan in dilute solutions for light scattering and size exclusion chromatography study. **Food hydrocolloids**, v. 20, p. 361-368, 2006.

LOPES, G.C.; MACHADO, F.A.V.; TOLEDO, C.E.M.; SAKURAGUI, C.M.; MELLO, J.C.P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 925–931, 2009.

LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de Polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2001.

LUCYSZYN, N. **Galactomananas: novas fontes de biopolímeros e aplicações na indústria alimentícia**. 198 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1994.

MARTINS, R.M.; SILVA, C.A.da; BECKER, C.M.; SAMIOS, D.; CHRISTOFF, M.; BICA, C.I.D. Anionic surfactant aggregation with (Hydroxypropyl)cellulose in the presence of added salt. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 944-953, 2006.

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

MCCLEARY, B.V.; DEA, I.C.M.; WINDUST, J.; COOKE, D. Interaction properties of D-galactose-depleted guar galactomannan samples. **Carbohydrate Polymers**, v. 4, p. 253-270, 1984.

MCCLEARY, B.V.; MATHESON, N.K. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. **Phytochemistry**, v. 15, p. 43-37, 1976.

MENDES, M.M.; OLIVEIRA, C.F.; LOPES, D.S.; VALE, L.H.F.; ALCÂNTARA, T.M.; IZIDORO, L.F.M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Anti-Snake Venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 859-866, 2008.

MICHEL, R.C. **Processos de dissolução, agregação e degradação em polímeros hidrossolúveis – Acompanhamento por Difractometria Diferencial e por Espalhamento de Luz**. Rio de Janeiro, 1999. Tese de Doutorado em Ciências – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO.

NETOPILÍK, M.; PODZIMEK, S.; KRATOCHVÍL, P. Determination of the interdetector volume by s-detection in size-exclusion chromatography of polymers with on-line multiangle light-scattering detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 37–41, 2004.

NICOLAU, A.; MARIATH, R.M.; SAMIOS, D. Study of the properties of polymers obtained from vegetable oil derivatives by light scattering techniques. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 2, p. 452-457, 2009.

NISHIDA, K.; KAJI, K.; KANAYA, T.; FANJAT, N. Determination of intrinsic viscosity of polyelectrolyte solutions. **Polymer**, v. 43, p. 1295-1300, 2002.

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

NOLETO, G.R.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÊ, A.L.R.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S.C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa Cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 5, p. 749-757, 2009.

OSTER, G. Light Scattering. In: **Techniques of Chemistry**. New York: Weissberger, A.; Rossiter, B.W., v. 1, parte 3, p. 75-117, 1972.

PATEL, T.R.; PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.B.; HARDING, S.E. Pressure cell assisted solution characterization of galactomannans. 3. Application of analytical ultracentrifugation techniques. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3513-3520, 2006.

PETKOWICZ, C.L.O. **Polissacarídeos de sementes de Leguminosae-Caesalpinoideae e análise conformacional de galactomananas**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998.

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

PETKOWICZ, C.L.O.; MILAS, M.; MAZEAU, K.; BRESOLIN, T.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.; RINAUDO, M. Conformation of galactomannan: experimental and modelling approaches. **Food Hydrocolloids**, v. 13, p. 263–266, 1999.

PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.B. On the Mark–Houwink parameters for galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, p. 145–148, 2007.

PICOUT, D.R.; ROSS-MURPHY, S.B.; ERRINGTON, N.; HARDING, S.E. Pressure Cell Assisted Solution Characterization of Polysaccharides. 2. Locust Bean Gum and Tara Gum. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 761–767, 2002.

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

POLLARD, M.A.; FISCHER, P.A. Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans - What is the quantitative basis? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 184–190, 2006.

POLLARD, M.A.; EDER, B.; FISCHER, P.; WINDHAB, E.J. Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinioideae and Faboideae subfamilies by multidetection aqueous SEC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 70–84, 2010.

POLLARD, M.A.; KELLY, R.; FISCHER, P.A.; WINDHAB, E.J.; EDER, B.; AMADÒ, R. Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 683–692, 2007.

POLLARD, M.A.; KELLY, R.; FISCHER, P.A.; WINDHAB, E.J.; EDER, B.; AMADÒ, R. Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1596-1606, 2008.

RAYMENT, P.; ROSS-MURPHY, S.B.; ELLIS, P.R. Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures — I. Steady shear measurements. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 2, p. 121-130, 1995.

REED, W.F. Coupled Multiangle Light-scattering and Viscosimetric Detectors for Size exclusion chromatography with application to polyelectrolyte characterization. In: MARTIN POTZCHKA, **ACS Symposium Series**. v. 635, Washington, p.7-34, 1996.

REED, W.F. Data evaluation for unified multi-detector size exclusion chromatography – molecular mass, viscosity and radius of gyration distributions. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 196, p. 1539-1575, 1995.

REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; FONTANA, J.D.; CORREA, J.B. Properties of the seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, p. 342-357, 1992.

REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D.; CORREA, J.B.C. Seed Gum Of *Stryphnodendron Barbatiman* (Barbatimão). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28, p. 353-361, 1991.

REID, J. S. G.; EDWARDS, M. E. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds, In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their Application**. New York: Marcel Dekker, Inc., p.155-186, 1995.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE-DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 281-285, 1993.

SANFORD, P.A.; BAIRD, J. **Industrial utilization of polysaccharides**. In *The Polysaccharides*, Vol. 2, ed. G. O. Aspinall. Academic Press, New York, pp. 411-490, 1983.

SANTOS, A. **Sementes de bractiga**. 2009. 1 fotografia, color, 10 x 15 cm.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Teaching light scattering spectroscopy: The dimension and shape of tobacco mosaic virus. **Biophysical Journal**, v. 71, p. 1641-1650, 1996.

SCIARINI, L.S.; MALDONADO, F.; RIBOTTA, P.D.; PÉREZ, G.T.; LEÓN, A.E. Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. **Food hydrocolloids**, v. 23, p. 306-313, 2009.

SECOUARD, S.; GRISEL, M.; MALHIAC, C. Flavour release study as a way to explain xanthan–galactomannan interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1237-1244, 2007.

SEMENOVA, M.G. Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems. **Food hydrocolloids**, v. 21, p. 23-45, 2007.

SHIRANI, G.; GANESHARANEE, R. Extruded products with Fenugreek (*Trigonella foenum-graecium*) chickpea and rice: Physical properties, sensory acceptability and glycaemic index. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 44–52, 2009.

SLAUGHTER, S.L.; ELLIS, P.R.; JACKSON, E.C.; BUTTERWORTH, P.J. The effect of guar galactomannan and water availability during hydrothermal processing on the hydrolysis of starch catalysed by pancreatic α -amylase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1571, p. 55–63, 2002.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 6, p. 20-24, 1972.

SMIRNOVA, N.I.; MESTECHKINA, N.M.; SHERBUKHIN, V.D. Fractional Isolation and Study of the Structure of Galactomannan from Sophora (*Styphnolobium japonicum*) Seeds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 517-521, 2004.

SOUZA, C.F.de. **Galactomanana de sementes de *Caesalpinia férrea* var, *Férrea*: Estrutura, modificação química e caracterização de propriedades**. 114 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V.P. Seed galactomannans: an overview. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 295-317, 2005.

STRELITZKI, R.; REED, W.F. Automated Batch Characterization of Polymer Solutions by Static Light Scattering and Viscometry. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 73, p. 2359–2368, 1999.

TANGLERTPAIBUL, T.; RAO, M.A. Intrinsic viscosity of tomato serum as affected by methods of determination and methods of processing concentrates. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 6, p. 1642-1688, 1987.

VENDRUSCOLO, C.W. **Goma xantana e galactomanana (*M. scabrella*): desenvolvimento de matrizes hidrofílicas para liberação modificada de teofilina**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

VENDRUSCOLO, C.W.; FERRERO, C.; PINEDA, E.A.G.; SILVEIRA, J.L.M.; FREITAS, R.A.; JIMENEZ-CASTELLANOS, M.R.; BRESOLIN, T.M.B. Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: Effect of drying method. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 1, p. 86-93, 2009.

VIANNA-FILHO, R.P. **Aplicação de polissacarídeos em emulsão cosmética: Análises reológicas**. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

UGHINI, F.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; BRESOLIN, T.M.B. Evaluation of xanthan and highly substituted galactomannan from *M. scabrella* as a sustained release matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 271, p. 197-205, 2004.

WANG, Q.; HUANG, X.; NAKAMURA, A.; BURCHARD, W.; HALLETT, F.R. Molecular characterization of soybean polysaccharides: an approach by size exclusion chromatography, dynamic and static light scattering methods. **Carbohydrate Research**. v. 340, p. 2637-2644, 2005.

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

WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, B.; YAO, J.; WANG, Y. Structure-antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 46, n. 1, p. 59-66, 2010.

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

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods of Carbohydrate Chemistry**, New York, v.2, p. 65-68, 1963a.

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

YAMAKAWA, H. **Modern Theory of Polymer Solutions**, Harper and Row: New York, 1971.

YANG, L.; ZHANG, L.-M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 349, 361, 2009.

YOUNG, R.J.; LOVELL, P.A. **Introduction to polymers**. Kingstonon-Thames, UK: Nelson Thomes Ltda, 1991.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)