

CÍNTIA MARA RIBAS DE OLIVEIRA

**ESTUDO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO DE SEMENTES
DE *Magonia pubescens* St. Hil. (Tingüi)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadores: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin
Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA
2001

CÍNTIA MARA RIBAS DE OLIVEIRA

**Estudo do envoltório externo de sementes
de *Magonia pubescens* St. Hil. (Tingüi)**

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

Orientadores: Prof. Dr. Philip A. J. Gorin
Prof. Dr. Marcello Iacomini

CURITIBA

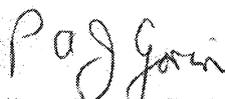
2001

CÍNTIA MARA RIBAS DE OLIVEIRA

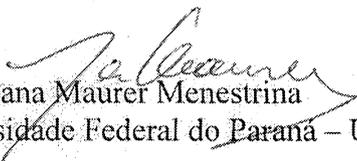
ESTUDO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO DE SEMENTES DE

Magonia pubescens ST. HIL. (TINGUI)

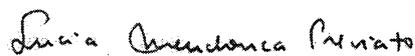
Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:



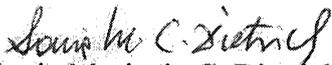
Dr. Philip Albert James Gorin (Orientador)
Universidade Federal do Paraná – UFPR



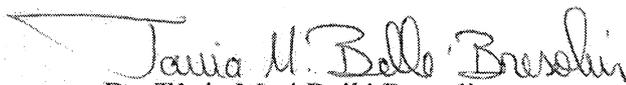
Dr. Juliana Maurer Menestrina
Universidade Federal do Paraná – UFPR



Dr^a Lucia Mendonça Previato
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Dr^a Sonia Machado C. Dietrich
Instituto de Botânica - SP



Dr. Tânia Mari Bellé Bresolin
Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI

Curitiba, 20 de novembro de 2001.

Orientador: Prof. Philip A. J. Gorin

Co-orientador: Prof. Marcello Iacomini

Colaboradores: Profa. Maria Rita Sierakowski

Prof. Yedo Alquini

“Quero que meus pés ainda caminhem muito,
quero que minhas mãos ainda tenham muito o que fazer,
que as minhas cantigas ressoem sempre.
Quero que os meus sonhos não acabem nunca.
Quero que os meus anseios ainda voem longe.
Quero que as minhas flores estejam sempre vivas,
que as minhas boas lembranças não murchem.
Quero que o medo nunca seja mais forte do que eu.”
(poema alemão traduzido por Frei Elzeário Schmitt)

Com muito amor, à princesa Bruna, minha
super-filha, aos meus pais Olga e Otílio, à vó
Bárbara, aos meus irmãos Carina e Júnior, ao
meu marido Jefferson e à Dona Ivone

Com saudades, ao meu eterno amigo Tio
Arlindo

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Gorin, pela orientação amigável, pelo contínuo estímulo, pela confiança e ensinamentos científicos.

Ao Prof. Marcello Iacomini, pela co-orientação e pela amizade de todos estes anos de Pós-Graduação.

À Profa. Maria Rita Sierakowski, com carinho, pela orientação dos experimentos de reologia desta tese e apoio constante durante o curso e período de correções da tese.

Ao Prof. Yedo Alquini, do Departamento de Botânica da UFPR, pela orientação na realização técnicas microscópicas e pelas palavras sempre amigáveis, no incentivo do trabalho.

À Profa. Fany Reicher, pelo acompanhamento do trabalho, pelos conselhos e apoio nesta caminhada, tanto como coordenadora do curso, quanto como amiga.

À amiga Marcele, que aceitou partilhar comigo os misteriosos caminhos do gel de Tingüi: obrigada pelos auxílios muito importantes durante este trabalho de tese, pela presteza e amizade sincera.

Às Professoras Maria Benigna e Juliana Maurer, pela análise crítica da tese, como integrantes da banca interna. Com muita admiração, agradeço as sugestões e auxílio nesta etapa tão importante.

Ao Prof. Jerson Lima da Silva e ao doutorando André Marco Gomes de Oliveira, do Departamento de Bioquímica Médica da UFRJ, pelo auxílio nas análises de microscopia de fluorescência.

À Themis e Eduardo Leitão, que tornaram minha estadia no Rio de Janeiro agradável e acolhedora.

À amiga Bruna e ao meu marido Jefferson, pela compreensão, pois muitas vezes tiveram que disputar com os experimentos e com a tese por um pouco de atenção.

Aos meus pais Olga e Otílio, à vó Barbara, à irmã Carina e ao irmão Júnior, por acreditarem na minha capacidade e estarem sempre próximos em todas as horas.

Ao meu amigo Tio Arlindo, companheiro e incentivador eterno... Mesmo hoje, ainda sinto a sua presença guiando meus atos e pensamentos. Sinto por não poder abraçá-lo e compartilharmos neste mundo a sensação de crescimento pessoal e profissional por mim vislumbrada.

Em especial à vó Barbara, pelas abdições, sacrifícios e orações que pela senhora me foram dedicados.

Às “Meninas da sala 247”, amigas de todas as gerações, Sandra, Silvia, Selene, Patrícia, Clarice, Lucimara, Juliana, Caroline, Elaine e Marcele, pelo companheirismo, pelos sorrisos e por permitirem que eu acessasse as particularidades de seus seres. Isto é válido também para o único entre as mulheres, Anderson. A presença de cada uma de vocês foi fundamental para o meu crescimento profissional e pessoal.

Às meninas e meninos das “extensões da sala 247”, Ana Helena, Ana Paula, Fernanda, Rodrigo Reis, Rodrigo Serrato, Thales e Ricardo, pelo carinho e pela convivência agradável.

Aos amigos Guilherme, Renato e César pelas “altas conversas” e pela demonstração de amizade sincera.

À amiga Lauren, pela cumplicidade e atenção amiga em todos os momentos de nossa convivência.

À Sandra Mara, em especial, pela forte amizade que conseguimos cultivar até hoje. Espero que, embora nossos caminhos possam tomar rumos distintos a partir de agora, nós consigamos manter a alegria do nosso convívio e sincronia.

Às amigas Paula e Rosiane, pelos agradáveis momentos que passamos juntas.

À Sandra Martin, pela relação de amizade estabelecida, um elo que desejo continuar cultivando.

Ao César e ao Lauro, pela disponibilidade para a realização das análises de CG-EM e RMN.

Às Professoras Fany Reicher e Joana Lea, por abrirem as portas do laboratório e viabilizarem a utilização do reômetro para os experimentos desta tese.

Às meninas do Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais, Gisele, Ana Paula, Luciane, Andréia, pelas conversas alegres, efusivas e espontâneas. Agradeço, em especial, a Gisele pelos ensinamentos e dicas sobre o “Rheo-Stress” e pelas referências.

À Profa. Joana Lea pela avaliação do projeto de tese e sugestões.

À Vice-coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Profa. Leda, um agradecimento especial pelo apoio e estímulo durante a jornada.

À Secretária da Pós-Graduação, Dona Marilza, pela presença sempre alegre e prestativa.

À Coordenadora do Curso de Farmácia do Centro Universitário Positivo, Profa. Márcia Itiberê, por depositar sua confiança no meu potencial profissional.

Às bibliotecárias Telma, Marilza e Rute, sempre tão solícitas.

A todos que, de algum modo, influenciaram positivamente na construção do meu mundo, toda a admiração e reconhecimento.

Ao CNPq e PRONEX-Carboidratos, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xvii
Lista de símbolos, siglas e abreviaturas	xviii
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Magonia pubescens</i> ST. HIL.....	1
1.1.1 Características Gerais da Planta.....	1
1.1.1.1 O envoltório externo das sementes.....	2
<i>Composição química do gel de “Magonia pubescens”</i>	6
1.2 A REOLOGIA COMO RECURSO PARA A AVALIAÇÃO DE GÉIS.....	7
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 MATERIAIS.....	19
3.2 MÉTODOS GERAIS.....	19
3.3 SEMENTES DE <i>Magonia pubescens</i> ST. HIL.....	20
3.4 ESTUDO MICROSCÓPICO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO DE SEMENTES DE <i>Magonia pubescens</i> ST. HIL. (TINGÜI).....	21
3.4.1 Isolamento do Envoltório Externo e de suas Camadas.....	21
3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	21
3.4.3 Microscopia de Luz e Microscopia de Fluorescência.....	22
- <i>Evidenciação de compostos aniônicos</i>	23
- <i>Evidenciação de carboidratos</i>	23
- <i>Evidenciação de carboidratos ácidos</i>	23
- <i>Evidenciação de β-glucanas</i>	24
- <i>Evidenciação de compostos fenólicos</i>	25

- Evidenciação de lignina.....	25
- Evidenciação de lipídeos.....	25
3.5 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE MONOSSACARÍDEOS LIVRES NAS REGIÕES 2, 3, 4 E 5 DO ENVOLTÓRIO EXTERNO	25
3.6 ESTUDO DOS CARBOIDRATOS DA 2ª REGIÃO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO.....	26
3.6.1 Fracionamento Etanólico do Hidrogel Original.....	26
3.6.1.1 Fracionamento de gMp1	27
3.6.2 Determinação da Composição Monossacarídica.....	28
3.6.2.1 Acetólise parcial.....	28
3.6.2.2 Hidrólise ácida.....	29
3.6.2.3 Redução.....	29
3.6.2.4 Acetilação.....	30
3.6.2.5 Dosagem de ácido urônico.....	30
3.6.2.6 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)...	31
3.6.2.7 Cromatografia em papel (CP).....	31
3.6.3 Métodos Espectroscópicos.....	32
3.6.3.1 Análises de ressonância magnética nuclear monodimensionais (RMN-1D).....	32
3.6.3.1.1 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 em estado sólido (Polarização Cruzada com Rotação no Ângulo Mágico – PC/RAM).....	32
3.6.3.1.2 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 em estado líquido (RMN- ¹³ C).....	32
3.6.3.1.3 Ressonância magnética nuclear de próton em estado líquido (RMN- ¹ H).....	33
3.6.3.2 Análises bidimensionais de ressonância magnética nuclear (RMN-2D)	33
3.6.4 Determinação da Homogeneidade Molecular por Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e	

Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS).....	34
3.6.5 Análises Reológicas da Fração gMp1.....	35
3.6.5.1 Avaliação do comportamento de fluxo.....	35
3.6.5.2 Avaliação do comportamento viscoelástico em modo estático	36
3.6.5.3 Avaliação do comportamento viscoelástico em modo dinâmico.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 ESTUDO MICROSCÓPICO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO DE SEMENTES DE <i>Magonia pubescens</i> ST. HIL. (TINGÜI).....	38
4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	38
4.1.2 Microscopia de Luz e Microscopia de Fluorescência.....	40
4.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS REGIÕES 2, 3, 4 E 5 DO ENVOLTÓRIO EXTERNO	48
4.3 ANÁLISES DAS REGIÕES 2, 3, 4 E 5 DO ENVOLTÓRIO EXTERNO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM ESTADO SÓLIDO ...	50
4.4 FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS DA 2ª REGIÃO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO.....	57
4.4.1 Fracionamento Etanólico do Hidrogel Original.....	57
4.4.1.1 Fracionamento de gMp1.....	63
4.5 ANÁLISES REOLÓGICAS DA FRAÇÃO gMp1.....	84
4.5.1 Avaliação do Comportamento de Fluxo da Fração gMp1.....	85
4.5.2 Análise do Comportamento Dinâmico da Fração gMp1.....	87
4.5.2.1 Varreduras de frequência.....	87
4.5.2.2 Influência da temperatura	90
4.5.2.3 Influência do parâmetro tempo	94
4.5.2.4 Experimentos de tensão temporária ou arraste (<i>creep and recovery</i>).....	96
5 CONCLUSÕES.....	100
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
ANEXOS.....	114

Lista de figuras

Figura 1: Árvore de <i>Magonia pubescens</i> St. Hil.....	2
Figura 2: a) Fruto e sementes de <i>Magonia pubescens</i> St. Hil. b) Semente de <i>Magonia pubescens</i> St. Hil. (Tingüi) após ter sido imersa em água destilada por 24 h.....	3
Figura 3: Envoltório externo da semente. A – Corte transversal na região sobre os cotilédones. 1 ^a = epiderme; 2 ^a = região formadora de gel; 3 ^a = região de células mortas; 4 ^a = região fibrilar; 5 ^a = região de células mortas. B – Corte transversal mostrando somente as três primeiras regiões.....	5
Figura 4: Respostas observadas em testes oscilatórios. A) Deformação em função do tempo. B) Comportamento de um sólido viscoelástico. C) Resposta de um líquido. D) Comportamento de um material viscoelástico	14
Figura 5: Espectros mecânicos dinâmicos de sistemas polissacarídicos. A) gel forte, B) gel fraco, C) solução diluída.....	16
Figura 6: Extrusão do gel de sementes de <i>Magonia pubescens</i> (Tingüi), observado via microscopia eletrônica de varredura.....	39
Figuras 7-10: Microscopia de luz do envoltório externo de sementes de <i>M. pubescens</i> . (Barra = 5 µm) Figura 7: Micrografias de secções tratadas com azul de toluidina 0,05%. A) Regiões 1, 2 e 3. B) Regiões 1, 2 e 3. C) Regiões 3, 4 e 5. Figura 8: Secções coradas com PAS. A) Regiões 1, 2 e 3. B) Regiões 3, 4 e 5. Figura 9: Coloração com vermelho de rutênio. A) Regiões 1, 2 e 3. B) Regiões 1 e 2. Figura 10: Reação com cloreto férrico	

10% em solução aquosa de carbonato de sódio 0,3%. A) Regiões 1, 2 e 3.	
B) Regiões 3, 4 e 5.....	42

Figura 11: (A) Micrografias de secções do envoltório externo de sementes de *M. pubescens*. (Barra = 5 µm) tratadas com reativo floroglucinol/HCl. A1) Regiões 1, 2 e 3. A2) Regiões 3, 4 e 5. (B) Micrografias de secções do envoltório externo de sementes de *M. pubescens* tratadas com Sudam III (Barra = 5 µm). B1) Regiões 1, 2 e 3. B2) Regiões 3, 4 e 5.

	44
--	----

Figura 12: Microscopia de Fluorescência do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens* (Tingüi). A) Autofluorescência das regiões 1 e 3 (330-360 nm). B) Autofluorescência da 4ª região a 330-360 nm. C) Coloração da segunda região com calcoflúor. D) Redução da reação positiva da segunda região com calcoflúor, quando as secções foram previamente digeridas com celulase por 4 h (25°C).....

	46
--	----

Figura 13: Espectros de RMN-¹³C-PC/RAM das quatro regiões mais internas do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens* (Tingüi). A) Região 2, B) região 3, C) região 4 e D) região 5.....

	51
--	----

Figura 14: Esquema do fracionamento etanólico do hidrogel inativado.....

	58
--	----

Figura 15: Espectro de RMN-¹³C (100,61 MHz) da fração gMp1 (estado gel) em D₂O (*probe* 10 mm) (70°C).....

	60
--	----

Figura 16: Espectro de RMN-¹³C (100,61 MHz) da fração gMp2 (estado gel) em D₂O (*probe* 10 mm) (70°C).....

	61
--	----

Figura 17: Espectro de RMN-¹³C (100,61 MHz) da fração gMp3 (estado gel) em D₂O (*probe* 10 mm) (70°C).....

	61
--	----

Figura 18: Esquema de fracionamento da fração S6U, solúvel em solução aquosa concentrada de uréia.	64
Figura 19: Perfil de eluição da fração S6U (em água Milli-Q) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada à multidetecção - espalhamento de luz (A) e índice de refração (B) (HPSEC-MALLS).....	65
Figura 20: Cromatografia de exclusão estérica, acoplada à multidetecção - espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS) da fração PUF30 (0,5 g.L ⁻¹ em nitrito de sódio 0,1 mol.L ⁻¹ , contendo azida sódica). A) Perfil de detecção por índice de refração. B) Gráfico de massas cumulativas.....	66
Figura 21: Espectro de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) da fração PUF30 em D ₂ O (probe 5 mm) (70°C).....	67
Figura 22: Análise comparativa das massas cumulativas das frações PUF30 (em verde) e PUF30R15 (em vermelho), por HPSEC-MALLS.....	68
Figura 23: Espectros de RMN- ¹³ C (100,61 MHz) das frações PUF30 (A) e PUF30R15 (B) em D ₂ O (probe 5 mm) (70°C).....	69
Figura 24: Espectro de RMN- ¹³ C do tipo DEPT135 da fração PUF30R15 em D ₂ O (probe 5 mm) (70°C).....	70
Figura 25: Espectro de ¹ H, ¹³ C RMN-HMQC (<i>heteronuclear multiple-quantum correlation</i>) da fração PUF30R15 em D ₂ O.....	71

Figura 26: Expansões de regiões do espectro de ^1H , ^{13}C RMN–HMQC (<i>heteronuclear multiple-quantum correlation</i>) da fração PUF30R15 em D_2O	72
Figura 27: Esquema de fracionamento alcalino da fração insolúvel em uréia (I6U).....	73
Figura 28: Cromatografia de exclusão estérica, acoplada à multidetecção - espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS) da fração ExNaS ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$ em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo azida sódica).....	74
Figura 29: Esquema das ultrafiltrações realizadas partindo-se da fração ExNaS.....	75
Figura 30: Perfil de eluição da fração ret300NaP (A) e NaP30 (B) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada à detecção por espalhamento de luz (em vermelho) e por índice de refração (em azul). Concentração da amostra: $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ em NaNO_2 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo $0,02\%$ de NaN_3	77
Figura 31: Espectros de RMN- ^{13}C das frações ret300NaP (A) e NaP30 (B) em D_2O	78
Figura 32: A) Espectro de RMN–HMQC (<i>heteronuclear multiple-quantum correlation</i>) da fração NaP30 em D_2O . B) Expansão da região anomérica.....	79
Figura 33: A) Espectro de RMN–COSY (<i>correlation spectroscopy</i>) da fração NaP30 em D_2O . B) Expansão da região anomérica.....	81
Figura 34: A) Espectro de RMN–TOCSY (<i>total correlation spectroscopy</i>)	

da fração NaP30 em D₂O. B) Expansão da região anomérica..... 82

Figura 35: Perfil cromatográfico da fração NaS30 em cromatografia em papel, comparado com padrões, conforme indicado na Figura..... 83

Figura 36: Reogramas da viscosidade absoluta (η) *versus* taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) da fração gMp1, em água Milli-Q (A) e em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ (B), nas concentrações de 2 (curvas em vermelho) e 4 g.L⁻¹ (curvas em preto), a 25°C..... 85

Figura 37: Variação da tensão de cisalhamento (τ) *versus* taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) da fração gMp1 a 25°C..... 88

Figura 38: Módulos de estocagem (G') e de perda (G'') em função da variação de frequência para a fração gMp1 em água, nas concentrações de 2 g.L⁻¹ (A) e 4 g.L⁻¹ (B), e em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ nas mesmas concentrações (respectivamente C e D), em temperatura de 25°C. 89

Figura 39: Reogramas em sistema dinâmico dos módulos de estocagem (G') e de perda (G'') em função da variação de temperatura aplicada (aquecimento e resfriamento) à fração gMp1 nas concentrações de 2 e 4 g.L⁻¹ em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ 91

Figura 40: Módulos de estocagem (G') e de perda (G'') da fração gMp1 em função do tempo de análise, para as concentrações de 2 g.L⁻¹ (A) e 4 g.L⁻¹ (B) em água Milli-Q, e em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ [2 g.L⁻¹ (C) e 4 g.L⁻¹ (D)]. Temperatura de análise: 25°C..... 95

Figura 41: Módulos de estocagem (G') e de perda (G'') da fração gMp1 em

função do tempo de análise, para as concentrações de 2 g.L^{-1} (A) e 4 g.L^{-1} (B) em $\text{LiCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ nas temperaturas de análise de 25 e 60°C 96

Figura 42: Reogramas em sistema dinâmico dos módulos de estocagem (G') e de perda (G'') em função da variação de frequência para a fração gMp1 em $\text{LiCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, nas concentrações de 2 g.L^{-1} (A) e 4 g.L^{-1} (B), a 25°C , antes e depois de uma curva de tempo em sistema oscilatório a 60°C . 97

Figura 43: Análise de tensão transitória da fração gMp1 nas concentrações de 2 (A) e 4 g.L^{-1} (B), em solução aquosa de $\text{LiCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Temperatura de análise 25°C 98

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição monossacarídica das regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo de sementes de <i>M. pubescens</i>	48
Tabela 2: Determinação qualitativa e quantitativa de monossacarídeos livres nas regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo de sementes de <i>M. pubescens</i>	49
Tabela 3: Principais deslocamentos químicos encontrados nos espectros de RMN- ¹³ C-PC/RAM das regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo de sementes de <i>M. pubescens</i>	55
Tabela 4: Comparação dos resultados de microscopia e de RMN- ¹³ C-PC/RAM obtidos para as regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo de sementes de <i>Magonia pubescens</i>	56
Tabela 5: Composição monossacarídica das frações gMp1, gMp2, gMp3, FIBR e SEtOH.....	59
Tabela 6: Deslocamentos químicos e respectivos assinalamentos dos principais sinais de RMN- ¹³ C das frações gMp1, gMp2 e gMp3.....	62
Tabela 7: Composição monossacarídica (%) das frações I6U; S6U; S6UF0,22; R3,0; PUF30; PUF30R15.....	65
Tabela 8: Composições monossacarídicas das frações ret300NaP, NaP30 e NaS30 analisadas através de CG-EM.....	76

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas

α - denota anomeridade alfa

β - denota anomeridade beta

δ - ângulo de fase

γ - deformação

δ - deslocamento químico

ω - frequência

$\dot{\gamma}$ - taxa de cisalhamento

τ - tensão

η - viscosidade

η^* - viscosidade dinâmica complexa

γ_0 - amplitude de deformação

τ_0 - amplitude de tensão

4-*O*-Me-GlcpA - ácido 4-*O*-metil glucurônico

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

COSY - *correlation spectroscopy*

CP - cromatografia em papel

D₂O - água deuterada

ExNa - extrato alcalino

ExNaS - sobrenadante do processo de congelamento e degelo

FIBR - material de natureza fibrilar isolado da 2^a região do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens*

G* - módulo de cisalhamento dinâmico complexo

G' - módulo de cisalhamento dinâmico elástico

G'' - módulo de cisalhamento dinâmico viscoso

GlcpA - ácido glucurônico

gMp1, gMp2 e gMp3 - géis desidratados obtidos a partir de fracionamento etanólico do hidrogel original de sementes de *Magonia pubescens*

HMQC - *heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*

HPSEC-MALLS - cromatografia de exclusão estérica acoplada à detecção por índice de refração e espalhamento de luz

I6U - fração insolúvel em uréia 6 mol.L⁻¹

IR - índice de refração

J - parâmetro de complacência de arraste

MEV - microscopia eletrônica de varredura

NaP30 - precipitado etanólico da fração ultrafiltrada em membrana de 30 KDa (via extração alcalina)

NaS30 - sobrenadante etanólico da fração ultrafiltrada em membrana de 30 KDa (via extração alcalina)

Pa - pascal

PUF30 - precipitado etanólico da fração ultrafiltrada em membrana de 30 KDa (via fração S6U)

PUF30R15 - fração maior que 15 KDa, resultante da diálise de PUF30 em saco de diálise de *cut off* 15 KDa

R-1 - refere-se ao H-1 de ramnose

U-1 - refere-se ao H-1 de ácido urônico

R3,0 - fração de gMp1 retida na membrana de 3 µm

ret300NaP - fração retida na membrana de 300 KDa (via extração alcalina)

RMN-1D - ressonância magnética nuclear monodimensionais

RMN-¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN-¹³C- PC/RAM - espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13 em estado sólido, de acordo com a técnica de Polarização Cruzada com Rotação no Ângulo Mágico

RMN-¹³C-DEPT- *distortionless enchancement by polarization transfer*

RMN-2D - ressonância magnética nuclear bidimensional

S6U - fração solúvel em solução concentrada de uréia

S6UF0,22 - filtrado final em membranas Millipore de 3, 0,8, 0,45 e 0,22 µm

TOCSY - *total correlation spectroscopy*

X-1 - refere-se ao H-1 de xilose de cadeia principal

Xs-1 - refere-se ao H-1 de xilose 2,4-di-*O*-substituída

RESUMO

Estudos do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens* foram realizados utilizando-se microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, assim como espectroscopia de RMN-¹³C de sólido (PC/RAM). Este envoltório é composto por cinco regiões e, quando as sementes são imersas em água, um gel é liberado a partir da segunda região. O gel contém principalmente oligossacarídeos celulósicos, agregados a uma xilana ácida ramificada. Além dos experimentos de microscopia e espectroscopia, as propriedades reológicas de uma fração do hidrogel original (fração gMp1) foram caracterizadas. A organização tridimensional do gel foi visualizada por microscopia eletrônica de varredura, tendo como característica predominante uma estrutura de exsudação lamelar. Quando coradas com azul de *p*-toluidina, as células da segunda região reagiram positivamente revelando a presença de dois componentes aniônicos com graus variados de carga. O citoplasma destas células, em oposição ao das outras regiões, apresentaram resposta positiva com o reagente ácido periódico-Schiff (PAS), demonstrando a presença de carboidratos contendo hidroxilas vicinais. Esta região PAS-positiva reagiu com o corante vermelho de rutênio, específico para substâncias ácidas, indicando que pelo menos parte destes carboidratos consiste em polissacarídeos ácidos. As células da segunda região apresentaram reação com calcoflúor, cuja intensidade reduziu em grande parte no citoplasma, quando os cortes foram pré-tratados com celulase, sugerindo que pelo menos parte das β -glucanas presentes neste estrato é representada por material celulósico. Compostos fenólicos não foram detectados na segunda região usando o teste do cloreto férrico e do floroglucinol/HCl, porém estavam presentes nas outras, tendo sido sugerida a presença de lignina para as paredes celulares dos estratos 3, 4 e 5. A técnica de RMN-¹³C-PC/RAM foi incorporada a este trabalho como um auxílio às análises microscópicas padrão dos componentes celulares. A espectroscopia de RMN de sólido apresentou resultados em concordância com os dados microscópicos, no entanto para algumas regiões a resposta foi mais sensível e quantitativa. Sinais de ressonância de lignina foram identificados para as regiões 3, 4 e 5 do envoltório externo. A presença majoritária de carboidratos foi prontamente identificada em todos os estratos analisados usando os dados de RMN. Análises reológicas de soluções aquosas da fração gMp1 do hidrogel original das sementes em estudo foram realizadas em modo dinâmico e estático de velocidade de cisalhamento. Experimentos envolvendo a aplicação de tensões crescentes sobre gMp1 nas concentrações de 2 e 4 g.L⁻¹ em H₂O e LiCl 0.1 mol.L⁻¹ revelaram características tixotrópicas. A avaliação das propriedades dinâmicas viscoelásticas na região linear (deformação de 1%, 1 Hz) demonstrou valores do módulo de cisalhamento dinâmico elástico (G') maiores que do viscoso (G''), para ambas as concentrações e solventes testados ao longo de toda a faixa de frequência analisada. Desta forma, foi possível classificar a fração gMp1 como um gel forte, havendo dependência da concentração, com G' e G'' apresentando valores superiores para concentrações crescentes. Para géis preparados em solução aquosa de LiCl, valores menores de G' e G'' foram encontrados. As associações intercadeias dos carboidratos da fração gMp1 não apresentaram dependência em relação ao tempo, tendo sido observados valores constantes de G' e G'' por 1800 s. Rampas de temperatura (5°-95°C) mostraram que gMp1 é um gel termoestável em modo de tensão controlada. Considerando todas as características da rede do gel gMp1, este componente de Tingüi parece ser único.

ABSTRACT

A study of the external coat from seeds of *Magonia pubescens* was carried out using light and scanning electron microscopy, as well as CP-MAS ^{13}C NMR spectroscopy. This coat consisted of five regions, and when the seeds were put in contact with water, a gel was extruded from their second layer. The gel contains mainly cellulosic oligosaccharides, aggregated with a branched acidic xylan. In addition to the microscopic and spectroscopic experiments, we now characterize the rheological properties of a fraction of crude hydrogel (fraction gMp1). The three-dimensional organization of the gel was visualised by scanning electron microscopy as a predominant feature, having an extruded cylindrical, laminated structure. When stained with *p*-toluidine blue, the cells of the second layer reacted positively revealing the presence of two anionic components. The cytoplasm of these cells, on the opposite side from the other layers, gave a positive response with the periodic acid-Schiff (PAS) reagent, showing the presence of carbohydrates containing vicinal hydroxyl groups. This PAS-positive region also reacted with ruthenium red, specific for acidic material, indicating that at least some of these carbohydrates are acidic polysaccharides. A positive reaction of cells of the second region following calcofluor staining, which decreased for the most part in the cytoplasm from this layer if samples were pretreated with cellulase, suggests that at least part of the β -linked glucan present in this layer is cellulosic material. Phenolic compounds were not detected in the second layer using the ferric trichloride and floroglucinol/HCl tests, but existed in others, the presence of lignin being suggested for cell walls of the three innermost layers. CP-MAS ^{13}C NMR was incorporated as an aid for the standard microscopic analysis of the cell components. The former technique gave results agreeing with those of the latter, and for some layers the response was more sensitive and quantitative. Resonances of lignin were identified for the three innermost layers. The presence of carbohydrates was readily identified for all analysed layers using the NMR data. We report dynamic viscoelastic and steady shear measurements of aqueous solutions of fraction gMp1 isolated from the *M. pubescens* crude gel. Stress-growth experiments at analyzed gMp1 concentrations of 2 and 4 g.L $^{-1}$ in H $_2$ O and 0.1 mol.L $^{-1}$ LiCl revealed pseudoplastic and thixotropic characteristics. Linear dynamic viscoelastic properties (1% strain, 1 Hz) showed that the magnitudes of the elastic component (G') were higher than those of the loss moduli (G''), for both concentrations and solvents over the entire frequency range. This frequency sweep data allowed the classification of gMp1 as a strong gel former, and showed a concentration dependence, with G' and G'' becoming greater with increasing concentration. When the gel was prepared in aqueous LiCl, lower G' and G'' values were found. The interchain associations of carbohydrates from gMp1 were not time-dependent, values of G' and G'' remaining constant over 1800 s. Heat treatment over a temperature range of 5°-95°C showed that gMp1 in a controlled stress is a heat-stable gel. Considering all the gelling characteristics of the gMp1 network, this Tingüi component appears to be unique.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Magonia pubescens* ST. HIL.

1.1.1 Características Gerais da Planta

Magonia pubescens (Família Sapindacea) (Figura 1), popularmente conhecida como “Tingüi”, “Timbó do cerrado” (LABOURIAU, 1973), “Tingüi-capeta”, dentre outras denominações (LORENZI, 1992), constitui parte da vegetação típica do cerrado brasileiro (LABOURIAU, 1973; JOLY *et al.*, 1980) e cresce em pequenos grupos nesta formação, estando muito presente em alguns locais e rara ou ausente em outros (LABOURIAU, 1973).

Por ser uma árvore que se adapta a terrenos fracos, é indicada para o reflorestamento de áreas de preservação permanente (LORENZI, 1992). Geralmente é uma planta baixa, porém pode, algumas vezes, chegar a apresentar de 5 a 12 metros (LABOURIAU, 1973).

Sua madeira é empregada na construção civil, por apresentar boa resistência a organismos xilófagos (LORENZI, 1992). Segundo informações da Cia. Siderúrgica Belgo-Mineira, esta espécie, dentre às pertencentes à flora do cerrado, é a que fornece o melhor carvão vegetal para a siderurgia (LABOURIAU, 1973).

Suas folhas e raízes maceradas em água resultam em um material ictiotóxico, usado por índios e caboclos para “tingüijar” (LORENZI, 1992) ou “tinguajar” (LABOURIAU, 1973) os peixes para posterior captura. Segundo LABOURIAU (1973), este material parece não exercer efeito sobre mamíferos. Em relação às sementes, as mesmas tornam-se altamente tóxicas para peixes e moluscos logo após a emergência da radícula.

De acordo com a classificação de van der PIJL (1972), citada por JOLY *et al.* (1980), as sementes de *Magonia* pertencem ao grupo das diásporas aladas, estando presentes em torno de 14,5 sementes por fruto de *M. pubescens*, arrançadas de maneira compacta em três grupos (LABOURIAU, 1973) (Figura 2A).

LABOURIAU (1973) apresentou um estudo detalhado acerca da morfologia da semente e do fruto, bem como sobre a germinação de *M. pubescens*. Estudos sobre a fisiologia da germinação foram também desenvolvidos por JOLY *et al.* (1980), analisando duas populações de *M. pubescens* de localidades distintas do cerrado, sem encontrar diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas.



Figura 1: Árvore de *Magonia pubescens* St. Hil. (Tingüi). Local: Fazenda Cana Brava, Paracatu, Minas Gerais.

1.1.1.1 O envoltório externo das sementes

De acordo com LABOURIAU (1973), a semente (9 x 4 cm) possui dois envoltórios, um externo de aspecto papiráceo, constituído por cinco camadas (Figura 3), formando a porção alada da mesma, e um interno, que recobre os cotilédones. O envoltório externo de sementes de *M. pubescens*, quando em contato com água, forma um hidrogel (LABOURIAU, 1973) (Figura 2B), recurso que poderia ser de importância para a adaptação da planta aos períodos de seca característicos do

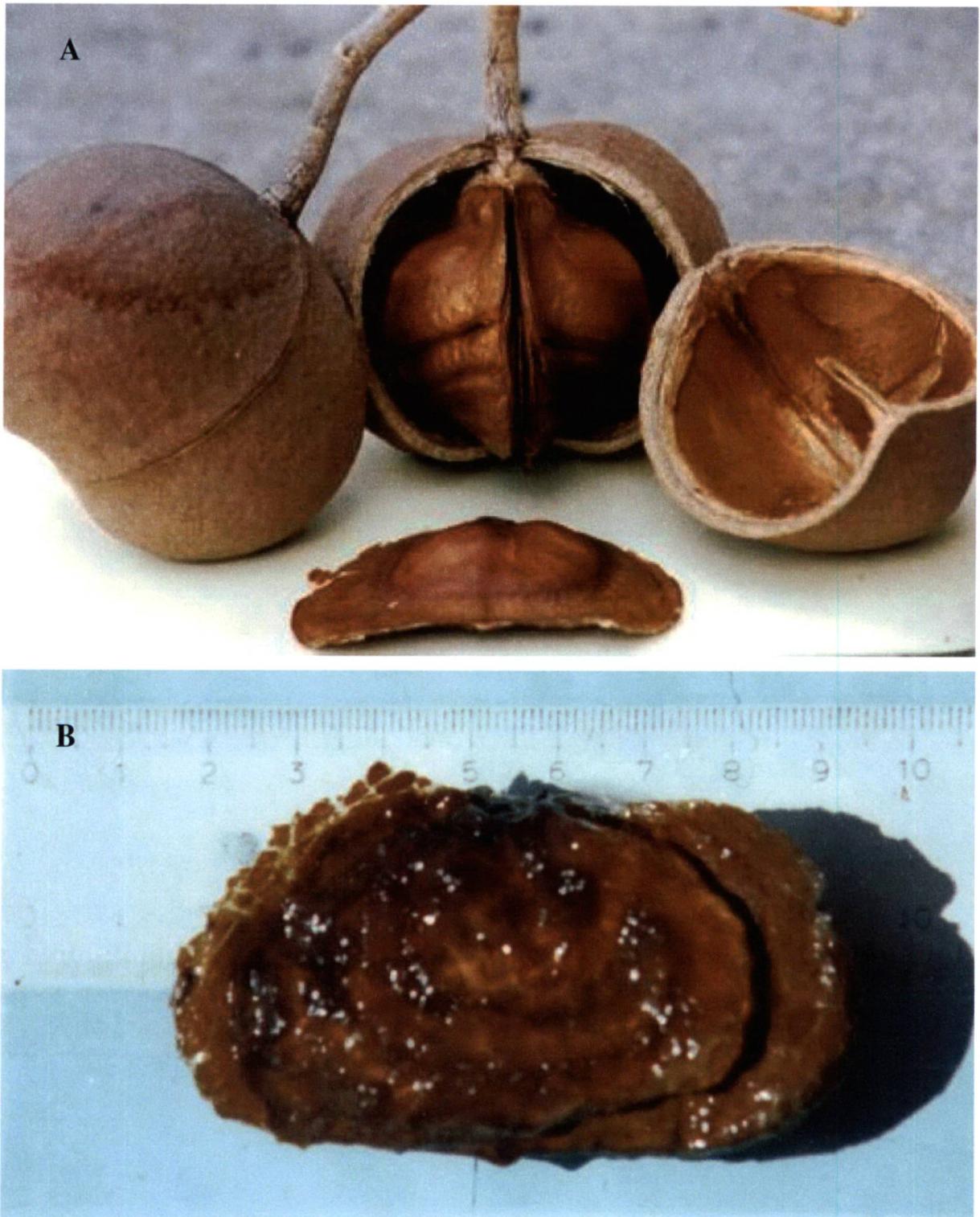


Figura 2: A) Fruto e sementes de *Magonia pubescens* St. Hil. B) Semente de *Magonia pubescens* St. Hil. (Tingüi) após ter sido imersa em água destilada por 24 h.

cerrado, funcionando como um reservatório de água para a planta jovem (JOLY *et al.*, 1980). Segundo LABOURIAU (1973), a hidratação do gel compete com a embebição do embrião, retardando a germinação quando não há quantidades suficientes de água para ambos os processos. Porém, a partir do momento em que não há suprimento externo de água, o embrião pode prosseguir seu desenvolvimento por aproximadamente um mês, utilizando a água contida no hidrogel. Popularmente, o hidrogel é usado como sabão pelo sertanejo (LABOURIAU, 1973).

Em relação às cinco regiões do envoltório externo das sementes de *M. pubescens*, foram descritos os seguintes aspectos morfológicos (LABOURIAU 1973; CORNER, 1976), conforme revelado na Figura 3:

1ª região: Fina, castanha, contendo apenas uma camada de células e comportando-se como uma epiderme.

2ª região: Apresenta células mucilaginosas de espessura variada, restringindo-se à porção que recobre os cotilédones. Em relação à velocidade de hidratação destas células, as mesmas aumentam sua espessura em 6 a 7 vezes durante um minuto de imersão em água e aproximadamente 15 vezes em dois minutos, ocorrendo a partir deste tempo um aumento lento.

3ª região: Constituída de células mortas e desorganizadas, na semente madura. O envoltório externo pode ser facilmente dividido em duas porções através desta região, de tal forma que uma parte das células permanece aderida à 2ª região e a outra fica associada à 4ª região.

4ª região: Composta por células parenquimáticas, atravessadas por fibras dispostas em duas posições ortogonais e feixes vasculares.

5ª região: Última porção do envoltório externo, contendo células semelhantes às da 3ª região.

Segundo JOLY *et al.* (1980), análises do gel durante a germinação da semente revelaram que o conteúdo de açúcar total e de açúcar redutor deste sofre poucas alterações até o 14º dia. O hidrogel pode, no entanto, proteger a semente contra ataques de fungos, uma vez que ensaios do tipo antibiograma, relatados por LABOURIAU (1973), revelaram que *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e

Hormodendrum spp. não se desenvolvem em hidrogel puro (1 % m/m) ou em placas de ágar (Sabouraud ou Czapeck), com ou sem outra fonte de carboidrato, contendo cada, 10 mL de gel (1 % m/m) em 20 mL de meio.

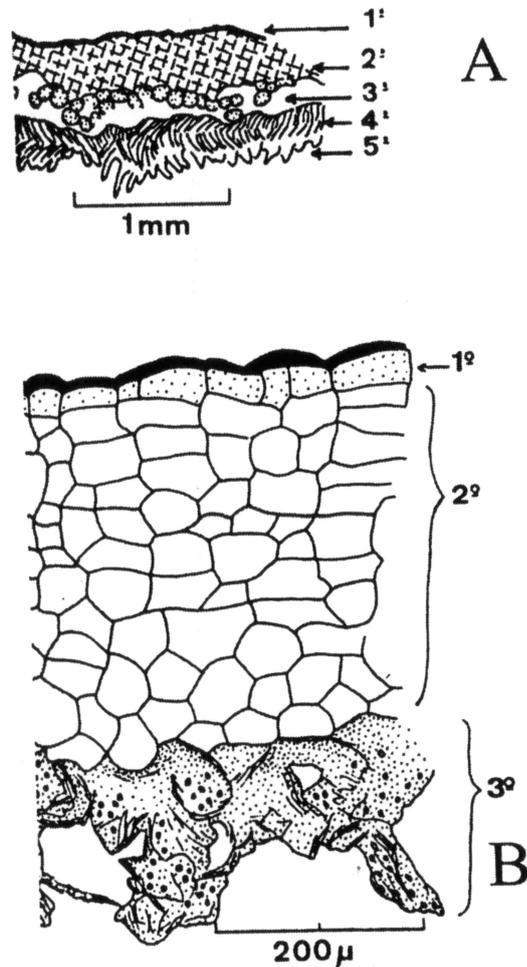


Figura 3: Envoltório externo da semente. A) Corte transversal na região sobre os cotilédones. 1^a = epiderme; 2^a = região formadora de gel; 3^a = região de células mortas; 4^a = região fibrilar; 5^a = região de células mortas. B) Corte transversal mostrando somente as três primeiras regiões. A região formadora de gel (2^a) encontra-se parcialmente hidratada, enquanto que na terceira região é possível observar as paredes perfuradas das células mortas. Corte a fresco, em cloro-iodeto de zinco (Fonte: LABOURIAU, 1973).

Quando, porém, as sementes de *M. pubescens* eram germinadas em temperaturas acima de 30°C, as mesmas eram fortemente atacadas pelos fungos *Botryodiplodia calspitosa* e *Penicillium janthinellum* (JOLY *et al.*, 1980).

Géis obtidos de sementes hidratadas por períodos variados (1 a 10 dias) foram avaliados por JOLY *et al.* (1980) em relação a suas propriedades fungistáticas tanto contra os fungos isolados de *M. pubescens* (*Botryodiplodia calspitosa* e *Penicillium janthinellum*), quanto contra *Physalospora obtusa* (25°C). Os géis apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento destes fungos, verificando-se que o poder fungistático não diminuía durante a germinação, uma vez que os halos observados nos experimentos com o gel removido no primeiro dia foram muito semelhantes aos do décimo dia. A perda das propriedades fungistáticas do gel foi observada por estes autores quando o gel era submetido por 15 min à temperatura de 100°C, no entanto estes não mencionaram que substância(s) poderia(m) estar envolvida(s) neste aspecto.

Em relação à ictiotoxicidade das sementes após a emergência da radícula, segundo LABOURIAU (1973), não há contribuição do hidrogel para tal fato.

Composição química do gel de “Magonia pubescens”

Os primeiros estudos acerca da estrutura química dos componentes do hidrogel foram realizados por GORIN *et al.* (1996), revelando ser o mesmo composto principalmente por carboidratos. Estes autores isolaram do gel, através de fracionamento utilizando hidróxido de cobre amoniacal, uma fração insolúvel (6% de rendimento, em relação ao gel original) contendo oligossacarídeos celulósicos (com 7-10 unidades de glucose) associados com uma β -xilana linear [com ligações do tipo (1→4)].

Outra estratégia utilizada por GORIN *et al.* (1996) foi a realização de tratamento alcalino (KOH 10%, 100°C, 16 h) do material original liofilizado, seguido por diálise, congelamento e degelo e fracionamento do precipitado de gelo e degelo com hidróxido de cobre amoniacal. A ocorrência de oligossacarídeos celulósicos foi

evidenciada também por esta metodologia, os mesmos estando em associação com uma β -xilana ácida, cuja cadeia principal, formada por ligações do tipo (1 \rightarrow 4) (28% de unidades não-substituída), apresenta-se parcialmente substituída em O-2, contendo 9% de terminais não-redutores de β -Xyl (1 \rightarrow 2) e 25% de 4-O-Me- α -Glc_pA (1 \rightarrow 2) e α -Glc_pA (1 \rightarrow 2). O sobrenadante de gelo e degelo tratado com cloreto de hexadeciltrimetilamônio (cetavlon) resultou numa fração precipitada em pH 7,0, com estrutura semelhante a do polímero anteriormente descrito, porém contendo adicionalmente terminais não-redutores de Gal_p (9%) e unidades de Rhap 2-O-substituídas (12%).

RIBAS DE OLIVEIRA (1997) avaliou diferentes métodos para o fracionamento dos carboidratos do hidrogel, dentre os quais pôde destacar o emprego de soluções aquosas concentradas de uréia como recurso interessante para a obtenção dos polissacarídeos ácidos presentes no material, tendo em vista sua capacidade de promover dissociação de agregados moleculares (MORRIS *et al.*, 1983; KATO & NEVINS, 1991; HAYASHI *et al.* 1994).

Considerando-se então que um dos pontos abordados pela presente tese relaciona-se às características físico-químicas do gel de sementes de *Magonia pubescens*, faz-se necessário, portanto, uma abordagem acerca do estudo de géis através da reologia, conforme exposto na seção que segue.

1.2 A REOLOGIA COMO RECURSO PARA A AVALIAÇÃO DE GÉIS

A reologia, também conhecida como ciência do fluxo, é o ramo da físico-química responsável pelos estudos das propriedades que caracterizam o comportamento de sistemas poliméricos quando sujeitos à deformação (SCHOTT, 1992), correlacionando a tensão (τ) e o gradiente de velocidade, conhecido também como taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). A constante de proporcionalidade entre essas duas

grandezas recebe o nome de viscosidade (η), podendo ser expressa através da seguinte equação:

$$\eta = \tau / \dot{\gamma}.$$

De acordo com WALTER (1998), pode-se definir viscosidade como a resistência que camadas de macromoléculas encontram em fluir umas sobre as outras. Desta forma, o fluxo de líquidos, em camadas paralelas que se movem arrastando junto com elas as camadas adjacentes, é denominado de fluxo laminar (SCHOTT, 1992).

Entre as moléculas de interesse para estudos físico-químicos e biológicos destacam-se os polissacarídeos, pois, possuindo grande capacidade de absorção de água, estas moléculas apresentam uma vasta possibilidade de aplicação industrial (BAYERLEIN, 1993). É fundamental, para a indústria, portanto, a compreensão dos princípios físicos e químicos que coordenam o grau e a velocidade de hidratação de géis (TANAKA, 1992).

Em geral, os polissacarídeos são empregados para conferir um aumento na viscosidade das soluções e auxiliar na formação de géis não-covalentes, na estabilização de emulsões ou floculação de materiais dispersos. Isto se deve, principalmente, às características de tais polímeros, como hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (SANDERSON, 1981).

Dentre os polissacarídeos atualmente utilizados em escala industrial, destacam-se principalmente aqueles isolados de plantas terrestres (exsudatos e mucilagens), de algas, de metabólitos bacterianos exógenos, ou ainda obtidos a partir de sínteses orgânicas parciais (WALTER, 1998). A existência de uma grande variedade de estruturas, por exemplo, entre os biopolímeros vegetais nativos, apresentando comportamento físico-químico original, conduz à valorização das fontes naturais e ao incremento da área de análises reológicas (FURDA, 1989), um benefício significativo para o controle de processos industriais que utilizam como matéria-prima estes tipos de moléculas.

Na área científica, o emprego de redes polissacarídicas ocorre, por exemplo, com o intuito de melhorar a resistência química (à acidez/basicidade), mecânica e

térmica de determinados materiais. No ramo petrolífero, misturas polissacarídicas geleificantes são empregadas na recuperação de petróleo; enquanto que na indústria alimentícia, o uso destes polímeros, com suas propriedades espessantes e geleificantes, permite a obtenção de produtos coloidais, cujos processos sensoriais de liberação de aroma e sabor são especificamente pré-determinados (WALTER, 1998).

Segundo JIRGENSONS e STRAUMANIS (1962), citados por WALTER (1998), um colóide, por definição, apresenta diâmetros moleculares ou macromoleculares hidratados (ao longo de um eixo rotacional) na faixa de 1 a 500 nm, estando os polissacarídeos enquadrados nesta classe. KANZAWA *et al.* (1989) relataram diâmetros correspondentes a 2,5-4,0 nm, para polissacarídeos geleificantes e, de 10 a 20 nm, para aqueles não-geleificantes.

Considerando-se a marcante afinidade dos polissacarídeos com sistemas aquosos, podendo incorporar água em quantidades correspondentes a muitas vezes o seu peso, tais moléculas são, denominadas hidrocolóides (WALTER, 1998). De acordo com KRUMEL e SARKAR (1975), os hidrocolóides podem ser compostos por polissacarídeos, que modificam significativamente o comportamento de fluxo de soluções aquosas. Algumas das propriedades físicas de um hidrocolóide que contribuem para as alterações reológicas de um produto são massa e distribuição molar, grau de interação intra- e intermolecular, bem como, sua capacidade de estabilizar emulsões e suspensões.

Seguindo sua condição coloidal, os polissacarídeos não podem, no entanto, ser considerados solúveis em água de acordo com o senso clássico utilizado para as micromoléculas (WALTER, 1998). Para estas, soluto e solvente encontram-se indistinguíveis até seus limites de solubilidade, originando um sistema monofásico. Um sistema envolvendo associação água-polissacarídeo é considerado uma dispersão heterogênea (WALTER, 1998).

Os sistemas coloidais formados por polissacarídeos geleificantes apresentam uma fase dispersora líquida (de baixa massa molar, como a água) e uma fase dispersa sólida, constituída pelo próprio polissacarídeo. Sendo assim, consistem em uma rede de natureza semi-sólida (CLARK, 1991). Muito embora a ocorrência de hélices duplas

esteja implicada nos processos de geleificação de muitos polissacarídeos, tais como, gelana, ágar e carragenanas, BRAUDO (1992) mostrou que a formação de hélices não é um pré-requisito geral para a geleificação, a qual pode resultar de interações por pontes de hidrogênio e de ligações intermoleculares por intermédio de cátions, como no caso de κ -carragenana em meio contendo íons potássio.

A formação de um gel resulta, portanto, da ocorrência de uma quantidade suficiente de zonas de junção molecular, de forma que estas uniões, decorrentes do contato direto entre as cadeias poliméricas, confirmam resistência a processos envolvendo tensões aplicadas à rede tridimensional formada (SCHOTT, 1992). No entanto, conforme MORRIS e MILES (1986), as redes dos géis podem apresentar-se de diferentes tipos, dependendo da natureza de seus componentes e dos mecanismos de geleificação envolvidos.

O sólido ideal sofre deformação quando uma tensão lhe é aplicada, porém retorna completamente a sua forma original quando tal pressão é removida. Esta capacidade de recuperação da forma é denominada de elasticidade (SCHOTT, 1992). Os géis são sólidos porosos, constituindo redes intumescidas (SILBERBERG, 1992), com grau significativo de elasticidade (CLARK, 1991; SCHOTT, 1992). Tais dispersões polissacarídicas podem, no entanto, apresentar um limite de pseudo-solubilidade, observado quando para cada molécula de polissacarídeo que deixa a fase líquida, uma outra ocupa novamente seu lugar, até que o sistema seja perturbado e mais moléculas de soluto deixem a fase líquida, depositando-se no fundo da dispersão existente (WALTER, 1998).

A maioria das dispersões de polissacarídeos tem sua viscosidade aumentada com o grau de polimerização de suas cadeias e com a concentração polissacarídica, porém reduzida diante de temperaturas crescentes (WALTER, 1998).

Para dispersões polissacarídicas extremamente diluídas, o comportamento de fluxo chega a ser de um fluido Newtoniano, ou melhor, sua viscosidade (η) independe da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), como por exemplo para a água, sendo consideradas líquidos viscosos (WALTER, 1998; FERRY, 1980).

Em dispersões polissacarídicas mais concentradas, o comportamento freqüentemente observado é não Newtoniano, sendo verificada a alteração da viscosidade do material frente a variações na taxa de cisalhamento (WALTER, 1998; FERRY, 1980). Os fluidos não Newtonianos, cuja viscosidade independe do fator tempo de ação do cisalhamento, podem ser classificados como pseudoplásticos, dilatantes ou plásticos.

Um fluido pseudoplástico apresenta redução em sua viscosidade, à medida que é submetido a taxas de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) crescentes (WALTER, 1998; FERRY, 1980), sendo a estrutura terciária completa e instantaneamente recuperada quando $\dot{\gamma}$ retorna a zero (WALTER, 1998). Durante o fluxo pseudoplástico, há a ruptura progressiva da estrutura do meio líquido, de modo que as cadeias de polímeros separam-se e se alongam, quando se aumenta a tensão de cisalhamento, oferecendo menor resistência ao fluxo do que em suas formas originais. A reconstrução de tal estrutura após cessar a tensão de cisalhamento aplicada se dá por meio de movimento browniano (SCHOTT, 1992).

Um fluido dilatante apresenta um aumento da viscosidade com o aumento de $\dot{\gamma}$ (WALTER, 1998; SCHOTT, 1992), devido aos choques entre as partículas permitirem que as mesmas se agrupem ao invés de deslizarem umas sobre as outras (SCHOTT, 1992).

Os materiais plásticos não fluem quando sujeitos a baixas tensões de cisalhamento, pois têm forças internas que os mantêm em inércia de fluxo, escoando apenas quando um valor crítico de tensão (ponto de ruptura) é alcançado (FERRY, 1980).

Um fluido pseudoplástico é denominado tixotrópico se após o declínio de sua viscosidade, o retorno para seu valor inicial é lento após a taxa de cisalhamento ter sido conduzida a zero, ou seja, um comportamento não-newtoniano, dependente do tempo (WALTER, 1998; SCHOTT, 1992). Os materiais ditos tixotrópicos restabelecem não instantaneamente, porém lentamente as uniões entre as cadeias, ou não conseguem retornar à forma inicial. A tixotropia é particularmente útil para as

formulações de suspensões e emulsões farmacêuticas, impedindo a sedimentação de partículas (SCHOTT, 1992).

A análise do comportamento de fluxo de dispersões polissacarídicas é um recurso reológico de extrema importância para a caracterização físico-química de polímeros. No entanto, para uma avaliação mais completa, faz-se necessário considerar que todos os materiais apresentam um caráter denominado viscoelástico, isto é, um comportamento situado entre características elásticas e viscosas.

O caráter de viscoelasticidade implica em fluxo viscoso combinado com deformação elástica, quando um material é submetido a tensões (SCHOTT, 1992). Para o estudo do comportamento viscoelástico de polissacarídeos, podem ser realizados experimentos reológicos em sistema estático, por intermédio de medidas de tensão temporária ou arraste (*creep and recovery*), ou ainda, em sistema dinâmico (oscilatório).

Pelo processo de *creep*, o material é submetido a uma tensão baixa (τ), constante, instantaneamente aplicada, observando-se então a correspondente deformação (γ) gerada em função do tempo (WALTER, 1998). Os resultados são expressos através do parâmetro de “complacência de arraste” em função do tempo, $J(t)$, resultante da relação deformação/ tensão de cisalhamento, conforme demonstrado através da equação

$$J(t) = \gamma(t)/\tau .$$

Para um sólido ideal, a energia utilizada na deformação é toda armazenada elasticamente, sendo recuperada após a remoção da tensão aplicada; enquanto que no caso de um líquido ideal, a energia empregada na deformação é totalmente dissipada na forma de calor, apresentando uma deformação linear ilimitada ao longo da tensão aplicada. Em um material viscoelástico, a energia usada na deformação é armazenada até um certo grau, dependente da predominância do caráter elástico ou viscoso do mesmo, aproximando-se de um sólido ou de um líquido (MITCHELL, 1984). Nestes experimentos, o período de recuperação, após a remoção da tensão, recebe a denominação de tempo de relaxação. Quanto maior for o tempo de relaxação, mais elástico do que viscoso é o gel (WALTER, 1998).

Um parâmetro que permite distinguir uma substância sólida de uma líquida é a deformabilidade da mesma. De acordo com a Lei de Hooke, a deformação (γ) de um corpo é proporcional à tensão (τ) nele aplicada. A deformação é adimensional, porém pode ser expressa em valores percentuais. Já a tensão é dada em Pascal (Pa) e compreende a força aplicada por unidade de área. Sendo assim, a rigidez de um material pode ser avaliada pela relação tensão/deformação (TAGER, 1978).

Na reometria dinâmica, os caracteres sólido e líquido de um sistema polissacarídico também podem ser quantificados. Esta consiste em um método não destrutivo de análise, que permite a determinação da estrutura do sistema “em repouso” (SCHRAMM, 1994; WALTER, 1998; RAO, 1992). Para tanto, uma onda senoidal de deformação ou tensão oscilatória é aplicada à dispersão, a uma dada frequência (ω) (Figura 4). A diferença de fase entre a tensão e a deformação oscilatória, denominada de ângulo de fase (δ), é medida e relacionada à viscoelasticidade da amostra (WALTER, 1998; RAO, 1992).

A razão entre tensão em fase e deformação aplicada é chamada módulo de cisalhamento dinâmico elástico ou de armazenamento (G') e pode ser expressa através da equação:

$$G' = (\tau_0 / \gamma_0) \cdot \cos \delta,$$

em que

G' = módulo de cisalhamento dinâmico elástico

τ_0 = amplitude de tensão

γ_0 = amplitude de deformação

δ = ângulo de fase (WALTER, 1998; TAGER, 1978; MITCHELL, 1984).

O módulo G' corresponde à medida da quantidade de energia armazenada pelo material, por ciclo de deformação senoidal, fornecendo, portanto, informações sobre o caráter sólido da amostra (WALTER, 1998; TAGER, 1978; MITCHELL, 1984).

Pode-se afirmar, então, que nas avaliações em sistema dinâmico (oscilatório), o correspondente ao parâmetro de complacência do sistema estático é o módulo de

elasticidade (G'). Quanto maior for o valor de G' , maior é o caráter sólido do gel (WALTER, 1998) e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (RAO, 1992).

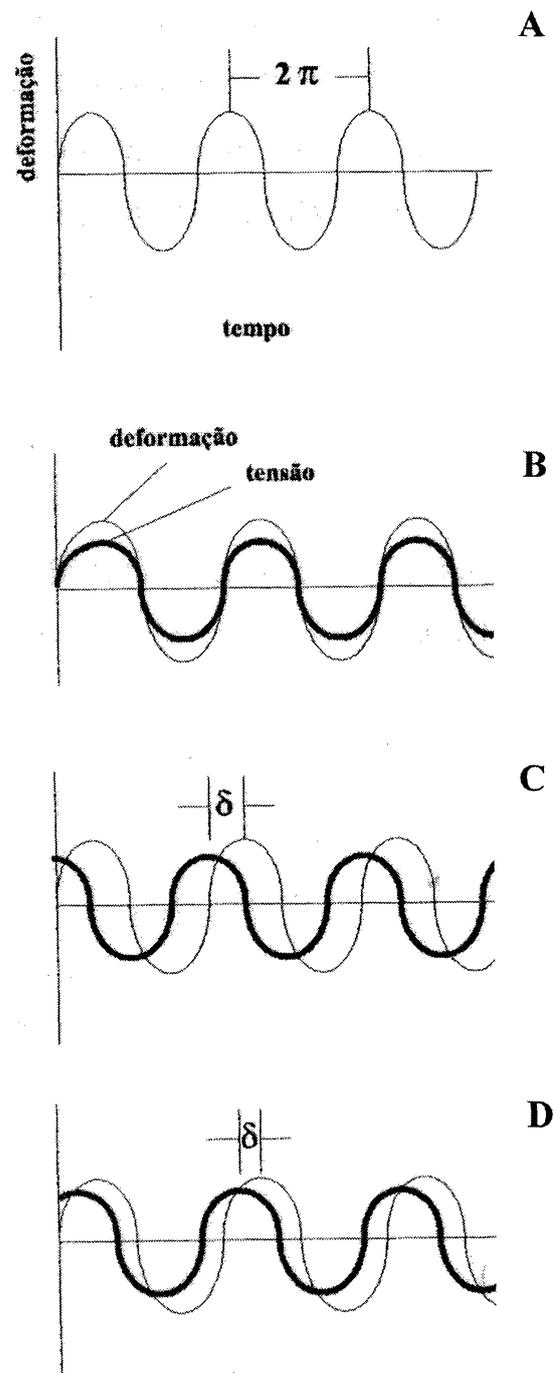


Figura 4: Respostas observadas em testes oscilatórios. A) Deformação em função do tempo. B) Comportamento de um sólido. C) Resposta de um líquido viscoso. D) Comportamento de um material viscoelástico (adaptação RAO, 1992).

Já a razão entre estes parâmetros fora de fase, denominada módulo de cisalhamento dinâmico viscoso ou de perda (G''), refere-se à energia dissipada na forma de calor durante o ciclo de deformação, servindo para estabelecer o caráter líquido do material, conforme a equação seguinte:

$$G'' = (\tau_0 / \gamma_0) \cdot \text{sen } \delta,$$

onde

G'' = módulo de cisalhamento dinâmico viscoso

τ_0 = amplitude de tensão

γ_0 = amplitude de deformação

δ = ângulo de fase (WALTER, 1998; TAGER, 1978; MITCHELL, 1984).

Para sólidos elásticos ideais, G'' corresponde a zero, ou seja, tensão e deformação estão em fase (Figura 4B); em contraste, para um líquido inelástico, G' é zero, uma vez que tensão e deformação estão 90° fora de fase (Figura 4C) (RAO, 1992).

A resposta global de tensão da amostra em relação à deformação imposta é denominada módulo de cisalhamento dinâmico complexo (G^*) e pode ser obtida a partir da seguinte equação: $G^* = (G'^2 + G''^2)^{1/2}$ (RAO, 1992).

Através de análises em sistema oscilatório, é possível determinar, portanto, a viscosidade dinâmica complexa (η^*) da amostra, dada pela razão entre o módulo de cisalhamento dinâmico complexo (G^*) e a frequência (ω), conforme demonstrado pela equação (RAO, 1992):

$$\eta^* = G^* / \omega .$$

Os sistemas polissacarídicos podem ser classificados de acordo com os perfis de seus espectros mecânicos dinâmicos, conforme demonstrado na Figura 5.

Quando a amostra polissacarídica apresenta o módulo de cisalhamento elástico (G') muito maior que o módulo de cisalhamento viscoso (G''), ambos

independentes da frequência, tem-se um material com caráter predominantemente

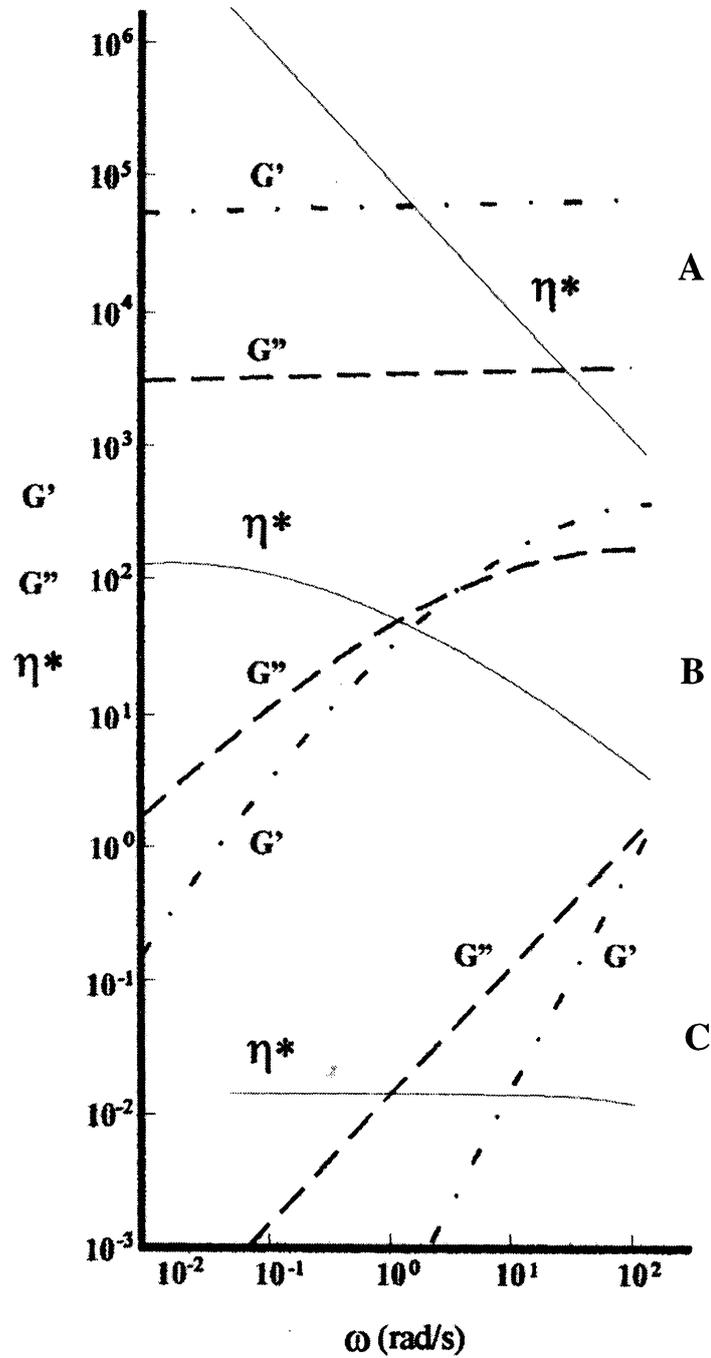


Figura 5: Espectros mecânicos dinâmicos de sistemas polissacarídicos. A) gel forte, B) gel fraco, C) solução diluída (Fonte: MORRIS, 1995).

sólido (Figura 5A). Neste caso, observa-se que os módulos em questão são paralelos entre si e independentes da variação de frequência, porém a viscosidade dinâmica complexa sofre redução drástica e linear com o aumento da frequência. Trata-se, portanto, de um gel forte (MORRIS, 1995).

Na Figura 5B, encontra-se o espectro dinâmico de um gel fraco ou solução concentrada, a partir do qual pode-se verificar, em baixas frequências de oscilação, valores maiores de G'' em relação a G' . Em altas frequências, o comportamento aproxima-se ao de um gel, predominando a resposta elástica (G') em relação à viscosa (G''), isto provavelmente porque a rede de emaranhados formada não tem tempo suficiente para ser desfeita em tais frequências (MORRIS, 1995).

Para soluções poliméricas viscosas (Figura 5C), o espectro dinâmico revela, principalmente em baixas frequências, valores significativamente maiores de G'' em relação a G' (MORRIS, 1995), com a η^* independente da frequência.

Tendo-se em vista, então, os pontos abordados na presente seção, é notória a importância da reologia como ferramenta imprescindível para a previsão industrial do comportamento de um material durante os processos de produção, transferência, armazenamento, ou ainda, em seus alvos de aplicação específicos (SCHRAMM, 1994).

Objetivos

2 OBJETIVOS

Considerando-se, então, a necessidade de ampliação dos conhecimentos acerca do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens*, bem como, a vasta aplicabilidade de géis polissacarídicos, o presente trabalho de tese tem como objetivos gerais o estudo dos componentes químicos do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens*, através de técnicas microscópicas e espectroscópicas, bem como, a avaliação de parâmetros reológicos do hidrogel presente no mesmo.

Para o cumprimento dos objetivos gerais mencionados, tem-se como objetivos específicos:

- analisar o fenômeno de extrusão do hidrogel de *Magonia pubescens* por intermédio de microscopia eletrônica de varredura;
- avaliar a natureza química dos constituintes do envoltório externo das sementes em questão, via microscopia de luz, espectroscopia de ressonância magnética nuclear em estado sólido e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;
- fracionar os componentes do hidrogel, caracterizando suas estruturas químicas através de análises de composição monossacarídica e técnicas mono e bidimensionais de ressonância magnética nuclear;
- analisar o comportamento reológico de uma fração derivada do hidrogel em módulo estático, estabelecendo seu comportamento de fluxo;
- avaliar o comportamento viscoelástico de uma fração derivada do hidrogel através de medidas estáticas (de tensão temporária - arraste) e medidas oscilatórias em módulo de cisalhamento dinâmico.

Materials e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Açúcares padrões (ácido glucurônico – forma sódica, arabinose, galactose, glucose, lactose, ramnose) e o corante vermelho de rutênio foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Papel para cromatografia nº 1, destinado às análises qualitativas, foi obtido da Whatman. Os reagentes utilizados na composição dos solventes cromatográficos (*n*-butanol, piridina), bem como o revelador para cromatografias nitrato de prata e a água deuterada usada nos experimentos de ressonância magnética nuclear foram provenientes da Merck A. G. (Darmstadt, Alemanha).

A resina glicol metacrilato (GMA) JB4 e o reagente calcoflúor White M2R (4,4'-bis{4-anilino-6-[bis(2-hidroxietilamino)]-1,3,5-triazina-2-il} -amino-2,2'-etilbenedisulfonato dissódico), ambos usados nos estudos microscópicos foram obtidos da Polysciences (Niles, Illinois, EUA).

Os demais solutos e solventes empregados para a realização dos experimentos apresentavam grau analítico, conforme especificado pelo fabricante.

3.2 MÉTODOS GERAIS

a- As pesagens de precisão foram feitas em balança analítica SAUTER, modelo KG-D-7470. Para pesagens superiores ao limite desta, utilizou-se uma balança HELMAC HM1000.

b- As evaporações sob pressão reduzida foram realizadas em rotaevaporador FISATON, modelo 802, acoplado a banho termostático (temperatura controlada em torno de 50°C).

c- As centrifugações foram executadas em equipamentos BECKMAN, modelos J21B (sob refrigeração) e GS-15 (em temperatura ambiente).

d- As diálises foram feitas utilizando-se tubos de celulose (limite de exclusão molecular de 15.000 Da) e de celulose benzoilados (limite de exclusão molecular de 1.200 a 2.000 Da).

e- Aparelhos CRYOLISE (New Brunswick Scientific Co. Inc.) e EDWARDS foram utilizados quando necessárias liofilizações de soluções.

f- A secagem dos precipitados etanólicos foi procedida em estufa a vácuo, em temperatura de 20°C.

g- Utilizou-se um potenciômetro MICRONAL, modelo B374, para as medidas e aferições de pH.

h- As análises espectrofotométricas foram realizadas em aparelhos TECNAL (modelo DME-21) e HITACHI (modelo U-2001).

i- Para as ultrafiltrações, foi empregado um sistema de ultrafiltração MILLIPORE.

3.3 SEMENTES DE *Magonia pubescens* ST. HIL.

As sementes de *Magonia pubescens* St. Hil., objetos de estudo do presente trabalho, foram gentilmente coletadas pela Dra. Maria Léa Salgado Labouriau, na Fazenda Cana Brava, região de Paracatú, Minas Gerais.

Para a determinação do peso seco do envoltório externo, as sementes foram secas em estufa 100°C até peso constante, e o envoltório externo isolado manualmente do envoltório interno correspondeu assim a 33% da massa seca das sementes. As sementes foram armazenadas em câmara fria (5°C ± 1°C).

3.4 ESTUDO MICROSCÓPICO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO DE SEMENTES DE *Magonia pubescens* ST. HIL. (TINGÜI)

A avaliação do envoltório externo das sementes de *Magonia pubescens*, através de técnicas microscópicas, foi realizada em colaboração com o Prof. Yedo Alquini, do Departamento de Botânica da UFPR.

3.4.1 Isolamento do Envoltório Externo e de suas Camadas

Para as análises microscópicas, o envoltório externo de sementes de *M. pubescens* foi separado manualmente do envoltório interno.

Para as análises via microscopia eletrônica de varredura (MEV), procedeu-se o fracionamento mecânico do envoltório externo, com o auxílio de uma lâmina metálica, isolando-se uma fração contendo apenas a primeira região em associação com a segunda região do envoltório externo.

Para os estudos através de microscopia de luz, o envoltório externo de sementes de *M. pubescens* foi seccionado de tal forma a se obter dois tipos de amostras para análise, uma contendo as três primeiras regiões agrupadas e outra contendo a quarta e quinta região em conjunto com resquícios da terceira.

Todas as etapas de isolamento do envoltório externo e separação das camadas foram acompanhadas por análises microscópicas a fresco do material.

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras contendo as duas primeiras regiões do envoltório externo das sementes em estudo foram então imersas em água destilada, permitindo-se a hidratação de acordo com os tempos de 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 e 4 min. Imediatamente após estes períodos de tempo, as amostras foram fixadas por 48 h, em

formaldeído:HOAc:EtOH 70% aq., 5:5:90 v/v (F.A.A. 70%) (JOHANSEN, 1940). Como controle, utilizou-se uma amostra não hidratada, fixada seguindo as condições anteriormente descritas. As amostras fixadas foram então processadas para MEV. Para tanto, foram submetidas a um primeiro estágio de desidratação, em temperatura ambiente, em série alcoólico-etílica crescente (EtOH 70, 95 e 100%), por 2 h em cada concentração. Para uma segunda fase de desidratação, utilizou-se o método do ponto crítico, em equipamento BALZERS CPD 010, realizando-se a troca do EtOH absoluto por CO₂. Após montagem em suporte metálico, as amostras foram submetidas à metalização com ouro, sob atmosfera de argônio, em aparelho BALZERS SCD 030 (SILVEIRA, 1989).

Os materiais foram examinados em microscópio eletrônico de varredura SEM 505 PHILLIPS, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR. As escalas foram projetadas nas mesmas condições das análises.

3.4.3 Microscopia de Luz e Microscopia de Fluorescência

Os materiais foram fixados por 48 h, em formaldeído:HOAc:EtOH 70% aq., 5:5:90 v/v (JOHANSEN, 1940).

O processamento destes materiais consistiu de desidratação, em temperatura ambiente, em série alcoólico-etílica ascendente (EtOH 70, 95 e 100%), por um período de duas horas em cada concentração; seguida por infiltração e inclusão em glicol metacrilato (GMA) JB4 (Polysciences), de acordo com especificações do fabricante e de FEDER e O'BRIEN (1968). A polimerização foi realizada em temperatura de 60°C, por 30 min.

A microtomização dos blocos foi realizada em micrótomo rotativo 820 SPENCER, obtendo-se secções transversais de 7 µm de espessura.

A avaliação dos componentes químicos do envoltório externo das sementes em estudo, via microscopia de luz, baseou-se nas seguintes técnicas histoquímicas:

- Evidenciação de compostos aniônicos

Para a detecção de compostos aniônicos, utilizou-se azul de *p*-toluidina O. Os cortes foram mergulhados em solução aquosa de azul de *p*-toluidina O (0,05%), por 5 min (25°C), de acordo com procedimento descrito por HADDAD (1989) e SAKAI (1973). As secções foram lavadas em água destilada e, quando secas, foram cobertas com lamínula, utilizando-se Entellan (Merck) como meio de montagem.

- Evidenciação de carboidratos

Para a identificação de carboidratos, utilizou-se a técnica do ácido periódico-Schiff (PAS), como recomendado por SPICER e SCHUTLE (1992), WERKER (1980), BUBRICK e GALUN (1980): As secções foram submetidas à hidratação por 5 min, seguida por oxidação com solução aquosa de ácido periódico (0,5%) por igual período de tempo. As amostras foram imediatamente lavadas com água destilada (3 vezes). Procedeu-se, então, coloração com o reagente de Schiff (solução aquosa de fuccina básica a 0,5 g%, contendo 0,5 g% de metabissulfito de sódio), por 20 min. As secções permaneceram imersas por 2 min em banho sulfuroso (solução de HCl 0,05 mol.L⁻¹, contendo 0,5 g% de bissulfito de sódio), procedimento este repetido por 3 vezes. Lavagens das secções com água corrente e água destilada foram sucessivamente realizadas. Após, as secções foram cobertas com lamínula.

- Evidenciação de carboidratos ácidos

Para a evidenciação de carboidratos ácidos, utilizou-se vermelho de rutênio, conforme recomendado por BUBRICK e GALUN (1980), WERKER (1980), DISCHE (1962). Para tanto, as amostras foram coradas em solução recém-preparada de vermelho de rutênio (0,05%) (Sigma) em tampão PBS, contendo 1% de glutaraldeído, por 2 h (25°C). Posteriormente, as secções foram lavadas com tampão PBS e, quando secas, cobertas com lamínula, empregando-se solução aquosa de glicerol a 50% como meio de montagem.

- Evidenciação de β -glucanas

A verificação da presença de β -glucanas foi realizada como recomendado por RATTEE e GREUR (1974), utilizando-se microscopia de fluorescência.

Amostras contendo as três primeiras regiões do envoltório externo das sementes de *M. pubescens* foram fixadas, desidratadas e emblocadas em glicol metacrilato. As secções obtidas foram tratadas com tampão glicina-NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (pH 8,8), por 30 min, para evitar a interferência de resíduos de aldeído presentes na solução de fixação. Após, as amostras foram submetidas à coloração com calcoflúor *white* M2R 0,1% aquoso, por 20 min (RATTEE & GREUR, 1974). Para observar a natureza celulósica das cadeias de β -glucanas, utilizou-se tratamento das secções com celulase (5 mg.mL⁻¹, em tampão acetato de sódio, pH 4,8), por 4 h em temperatura ambiente, seguido por coloração com calcoflúor *white* M2R 0,1% aquoso, de acordo com o descrito por SUMNER & van CAESELE (1989) e CHAUBAL *et al.* (1991).

Para todas as amostras, a autofluorescência das secções foi previamente avaliada, nas condições experimentais utilizadas.

Os controles para a reação foram os seguintes: secções incubadas apenas com a celulase em seu tampão, cortes tratados somente com tampão acetato de sódio pH 4,8, bem como, amostras submetidas a tratamento com enzima inativada e posterior reação com calcoflúor.

Um microscópio ZEISS Axioskop com epifluorescência, acoplado a uma câmera PHOTOMETRICS SENSYS (modelo KAF 1400-G2M), foi utilizado para a avaliação da fluorescência das amostras. O filtro de excitação empregado correspondeu à faixa de 330-360 nm. Um filtro de barreira de 420 a 480 nm e um espelho dicróico de 415 nm foram usados para estes experimentos.

As análises de microscopia de fluorescência foram realizadas no laboratório do Prof. Jerson Lima da Silva, do Departamento de Bioquímica Médica da UFRJ, contando com o auxílio técnico do doutorando André Marco Gomes de Oliveira.

- *Evidenciação de compostos fenólicos*

Utilizou-se coloração com cloreto férrico 10% em solução aquosa de carbonato de sódio 0,3%, para evidenciar a presença de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940). As secções coradas por 2 min foram lavadas com água destilada e cobertas com lamínula.

- *Evidenciação de lignina*

A coloração com floroglucinol acidificado com HCl concentrado foi realizada para a detecção de lignina (coloração vermelha). Os cortes (a fresco) foram observados após 5 min de reação (FOSTER, 1949; DISCHE, 1962; KRAUS & ARDUIN, 1997).

- *Evidenciação de lipídeos*

Para verificar a existência de lipídeos nas amostras, realizou-se coloração com Sudam III, de acordo com SASS (1951), utilizando cortes a fresco.

As secções coradas foram analisadas em microscópio óptico ZEISS MC 80, equipado com recurso fotográfico. As escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas sob as mesmas condições dos materiais em análise.

3.5 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE MONOSSACARÍDEOS LIVRES NAS REGIÕES 2, 3, 4 E 5 DO ENVOLTÓRIO EXTERNO

Após a separação e fracionamento do envoltório externo das sementes em estudo, as regiões 2, 3, 4 e 5 foram submetidas à hidrólise ácida com TFA 2 mol.L⁻¹, por 12 h, a 100°C, seguida por redução e acetilação. Os acetatos de alditóis foram analisados por CG-EM, determinando-se assim os componentes monossacarídicos neutros totais das regiões em questão.

Para a avaliação qualitativa e quantitativa dos monossacarídeos neutros originalmente livres, amostras (1 g) das regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo das

sementes em estudo foram submetidas à extração com MeOH:H₂O 4:1 (v/v) (proporção 1mg de material para 1 mL de MeOH:H₂O), a quente, por 1 h (2 vezes), que além de permitir a remoção de carboidratos de baixa massa molar, funciona como sistema de inativação enzimática de glicosidases que possam estar presentes no material.

Os extratos MeOH:H₂O assim obtidos para cada região foram avaliados quanto à presença de monossacarídeos livres, tendo sido submetidos à redução com NaBH₄. Após neutralização, as soluções foram concentradas sob pressão reduzida, os resíduos lavados com metanol e submetidos novamente a evaporações em rotaevaporador. Este processo foi repetido 3 vezes, procedendo-se, então, a acetilação dos alditóis obtidos e análise por cromatografia líquido-gasosa (seção 3.6.2.6). Utilizou-se alitol como padrão interno.

3.6 ESTUDO DOS CARBOIDRATOS DA 2ª REGIÃO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO

3.6.1 Fracionamento Etanólico do Hidrogel Original

Após o isolamento do restante da semente, a segunda região do envoltório externo foi tratada com MeOH:H₂O 4:1 (v/v) a quente, conforme descrito anteriormente.

O resíduo da extração com MeOH:H₂O 4:1 (v/v), correspondente à segunda região inativada enzimaticamente, foi seco a 20°C e homogeneizado em água destilada (até concentração de 1 mg.mL⁻¹), sob agitação mecânica, por 6 h (20°C) e, em seguida, centrifugado (14.000 r.p.m., 45 min, 5°C) para a remoção de um material de natureza fibrilar (fração FIBR).

O hidrogel isolado no sobrenadante da centrifugação teve seu volume reduzido em evaporador rotatório (até 1/5 do volume inicial) e foi, então, desidratado com três volumes de etanol, filtrado, e o material insolúvel tratado com etanol absoluto e seco

em estufa a vácuo, sob temperatura de 20°C. Este procedimento foi adotado em substituição à liofilização, a fim de se realizar uma desidratação menos drástica e, assim, minimizar a agregação molecular e conseqüente insolubilidade das frações, já observada por RIBAS DE OLIVEIRA (1997), e suas interferências tanto nos trabalhos reológicos, como nos estudos da homogeneidade das frações isoladas.

O sobrenadante etanólico da etapa anterior, após ter seu volume reduzido através de evaporação em rotaevaporador, apresentou aspecto de gel, tendo sido por isso reprecipitado com 3 volumes de etanol. Este processo foi repetido mais uma vez, e o sobrenadante etanólico final (SEtOH) não apresentou textura de gel.

Os géis desidratados, denominados, de acordo com sua ordem de precipitação, gMp1, gMp2 e gMp3, foram acetolisados, hidrolisados, reduzidos e acetilados para análise de sua composição monossacarídica. Os espectros de RMN-¹³C destas frações foram obtidos conforme condições descritas no item 3.6.3.1.2.

3.6.1.1 Fracionamento de gMp1

Para fins de fracionamento, o gel desidratado gMp1 foi tratado com solução aquosa de uréia 6 mol.L⁻¹, por 6 h, em temperatura ambiente (RIBAS DE OLIVEIRA *et al.*, 2000).

A fração solúvel em solução concentrada de uréia, S6U, foi filtrada em membranas Millipore de 3, 0,8, 0,45 e 0,22 µm para a remoção de possíveis agregados. A fração retida na membrana de 3 µm foi chamada R3,0.

O filtrado final S6UF0,22 foi submetido à ultrafiltração seqüencial em membranas com limite de exclusão de 300 e 30 KDa. O ultrafiltrado final, após precipitação com 3 volumes de EtOH, resultou em um precipitado, denominado PUF30. A fração PUF30 foi solubilizada em água destilada e dialisada em saco de diálise de *cut off* 15 KDa, dando origem à fração retida na membrana, denominada PUF30R15.

As composições monossacarídicas das frações S6U, S6UF0,22 e R3,0 foram determinadas por CG-EM, após as mesmas terem sido acetolisadas (20 h, 65°C), hidrolisadas (8 h, 100°C, TFA 2 mol.L⁻¹), reduzidas e acetiladas (seção 3.6.2).

A fração insolúvel em uréia 6 mol.L⁻¹ (I6U), após diálise (limite de exclusão da membrana: 1200 a 2000 Da), precipitação em EtOH 70% e secagem em estufa a vácuo (20°C), foi submetida à extração alcalina (NaOH 4%, por 2 h, em temperatura de 100°C).

O extrato alcalino (ExNa) neutralizado com ácido acético em banho de gelo e dialisado (membrana com *cut off* 1200 a 2000 Da) foi submetido ao processo de congelamento e degelo (RIBAS DE OLIVEIRA, 1997). O sobrenadante deste procedimento (ExNaS) foi ultrafiltrado em membrana de 300 KDa, isolando-se então as frações “Ret300Na” (maior que 300 KDa) e “ultrafiltrado300”.

A fração “ultrafiltrado300” foi submetida a procedimento de ultrafiltração em membrana de 30 KDa. O material ultrafiltrado oriundo deste processo foi precipitado com EtOH (3 volumes), originando um precipitado (fração NaP30) e um sobrenadante etanólico (fração NaS30).

3.6.2 Determinação da Composição Monossacarídica

3.6.2.1 Acetólise parcial

Para a determinação da composição monossacarídica das frações insolúveis em meio de hidrólise ácida total, originadas do hidrogel, foi necessário realizar procedimento de acetólise parcial (WOLFROM & THOMPSON, 1963a; GORIN *et al.*, 1996), previamente à hidrólise com ácido trifluoracético (TFA) 2 mol.L⁻¹.

As acetólises parciais foram feitas utilizando-se cerca de 5 mg de amostra e 0,5 mL da mistura Ac₂O-HOAc-H₂SO₄ (10:10:1, v/v), por 20 h em temperatura de 65°C. A reação foi interrompida adicionado-se gelo ao sistema, que permaneceu em repouso por 3 h.

O material foi a seguir extraído com CHCl_3 e a fase orgânica lavada 2 vezes com água destilada. A fase clorofórmica foi evaporada e ao resíduo, dissolvido em 5 mL de clorofórmio, foi adicionada uma solução metanólica de metóxido de sódio (NaOMe) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ até que a amostra apresentasse pH 10-12. Após 2 h de reação de deacetilação, o meio foi acidificado com HOAc e evaporado até *secura*. O resíduo foi ressuspensão em 5 mL de H_2O destilada e a solução foi deionizada com uma mistura de três partes de resina catiônica (Dowex 50W x 8, forma H^+) para uma de aniônica (Dowex 2 x 8, forma OH^-). As amostras foram submetidas à filtração, seguida por evaporação total e hidrólise ácida total com TFA 2 mol.L^{-1} conforme descrito a seguir.

3.6.2.2 Hidrólise ácida

As hidrólises ácidas foram realizadas em tubos hermeticamente fechados, contendo aproximadamente 3 mg de carboidratos e 1 mL de TFA 2 mol.L^{-1} , por 8 h, em temperatura de 100°C (GORIN *et al.*, 1996). O ácido foi removido por evaporação sob pressão reduzida, procedendo-se então adições de H_2O destilada (cerca de 1 mL) e sucessivas evaporações. Este procedimento foi repetido 6 vezes.

3.6.2.3 Redução

Os hidrolisados obtidos conforme descrito na seção 3.2.1.2 foram dissolvidos em H_2O destilada e submetidos à redução com NaBH_4 (WOLFROM & THOMPSON, 1963c), por 4 horas em temperatura ambiente ou *overnight* (4°C) (FOX *et al.*, 1990). A solução foi neutralizada pela adição de HOAc e evaporada até *secura*. O ácido bórico formado neste processo foi removido por evaporação em rotaevaporador sob a forma de borato de trimetila, tendo sido co-distilado com MeOH (SLONEKER, 1972). Esta operação foi repetida 3 vezes. Assim, os monossacarídeos aldoses passam a álcoois, denominados alditóis.

3.6.2.4 Acetilação

Após reação de redução, os alditóis formados foram acetilados empregando-se uma mistura de anidrido acético e piridina (1:1 v/v) (WOLFROM & THOMPSON, 1963b). A reação foi mantida *overnight* em temperatura ambiente ou realizada em estufa (100°C, por 1 h). A acetilação foi interrompida pela adição de gelo ao sistema, para a degradação do excesso de anidrido acético. Os produtos acetilados foram extraídos com CHCl₃. A piridina foi removida da fase clorofórmica mediante sucessivas lavagens com solução aquosa de CuSO₄ 2%. A fração orgânica foi submetida ainda a lavagens com água destilada, para eliminação do cobre remanescente, e à desidratação por adição de sulfato de sódio anidro, seguida de filtração.

Os acetatos de alditóis obtidos foram analisados por cromatografia líquida-gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) (SLONEKER, 1972).

3.6.2.5 Dosagem de ácido urônico

O método colorimétrico do sulfamato/*m*-hidroxibifenila (sensibilidade 0,97 a 38,8 µg de ácido urônico em 0,4 mL de amostra) foi utilizado para as determinações do conteúdo de ácido urônico das amostras, conforme descrito por FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991). As amostras foram previamente hidrolisadas com TFA 2 mol.L⁻¹, por 5 h (100°C) e neutralizadas com NaOH 2 mol.L⁻¹. As dosagens de ácido urônico foram realizadas com os materiais neutralizados. Para tanto, a 0,4 mL de amostra adicionaram-se 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio (4 mol.L⁻¹, pH 1,6) e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio 75 mmol.L⁻¹ em H₂SO₄ concentrado. Após aquecimento a 100°C, por 20 min, foram adicionados 80 µL de *m*-hidroxibifenila. O cromógeno obtido, cuja coloração é estável por 1 h, foi avaliado em 525 nm. A quantificação foi realizada com o auxílio de uma curva padrão de ácidos

urônicos dentro da sensibilidade do método, utilizando-se ácido glucurônico (Sigma) como padrão.

3.6.2.6 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

A determinação da composição monossacarídica das amostras foi realizada através da análise dos acetatos de alditóis por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) (SLONEKER, 1972). Estas análises foram feitas em um cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) modelo DB-225. As injeções nas colunas foram feitas partindo-se da temperatura de 50°C (mantida por 1 min), seguindo-se um aumento gradual de 40°C.min⁻¹ até 230°C, de acordo com prévia programação de temperatura. Finalmente, a temperatura foi mantida constante a partir deste valor. Hélio ultra puro foi utilizado como gás de arraste (fluxo de 1 mL.min⁻¹).

As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração através do software do equipamento. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/z (relação massa/carga) 90 a 220. Os compostos foram identificados por meio de seus perfis característicos de fragmentação (JANSSON *et al.*, 1976), adequadamente comparados com padrões.

3.6.2.7 Cromatografia em papel (CP)

As análises cromatográficas qualitativas em papel foram desenvolvidas segundo técnica descendente, em papel Whatman nº 1 (HOUGH & JONES, 1962), utilizando-se o sistema de solvente *n*-butanol-piridina-água (5:3:3, v/v).

Para a revelação dos carboidratos, utilizou-se a técnica de nitrato de prata alcalino (TREVELYAN *et al.*, 1950).

3.6.3 Métodos Espectroscópicos

3.6.3.1 Análises de ressonância magnética nuclear monodimensionais (RMN-1D)

3.6.3.1.1 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 em estado sólido (Polarização Cruzada com Rotação no Ângulo Mágico – PC/RAM)

As cinco regiões do envoltório externo de sementes de *M. pubescens* foram separadas mecanicamente, com o auxílio de uma lâmina de metal. As quatro regiões mais internas isoladas (100 mg de cada) foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13 em estado sólido, de acordo com a técnica de Polarização Cruzada com Rotação no Ângulo Mágico (RMN-¹³C-PC/RAM). Não foi possível a avaliação da primeira região do envoltório externo em função da presença de contaminantes provenientes da segunda região.

As análises foram realizadas em colaboração com o Dr. Lothar Bergter, da empresa Souza Cruz (Rio de Janeiro) e com o Dr. G. Torri, do Istituto Ronzoni (Itália), estando ambos os resultados em concordância. Para tais, utilizou-se espectroscópio BRUKER AC300P 300 MHz, em temperatura de 27°C, de acordo com os seguintes parâmetros: volume do rotor 0,7 mL (7 mm de diâmetro externo), rotação das amostras a 3,5 kHz, tempo de contato de 1000 µs, intervalo de pulso de 3 s, pulso de 90° de 7 µs, largura da janela espectral correspondente a δ -50 a 250 ppm, padrão glicina (C=O em δ 176,03 ppm).

3.6.3.1.2 Ressonância magnética nuclear de carbono-13 em estado líquido (RMN-¹³C)

Os espectros de RMN-¹³C foram obtidos na frequência-base de 100,61 MHz, em espectroscópio da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400, com recurso de Transformada de Fourier.

As amostras (40 mg de material) foram preparadas em óxido de deutério (D_2O 99,8%) e analisadas em tubos de 5 e 10 mm de diâmetro interno, em temperatura de $70^\circ C$. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm), em relação ao padrão externo Me_4Si ($\delta = 0$).

Os parâmetros empregados para as análises das frações com caráter de gel corresponderam aos seguintes: programa ZGDC (pulso de 90°); intervalo de pulso (D1) 0,4 s; tempo de aquisição de sinal (Aq) 0,7 s; número de scans 33,73.

A técnica de RMN- ^{13}C -DEPT (*distortionless enhancement by polarization transfer*) foi aplicada para análise de algumas frações.

3.6.3.1.3 Ressonância magnética nuclear de próton em estado líquido (RMN- 1H)

As análises de RMN- 1H foram realizadas na frequência-base de 400,13 MHz, em espectroscópio da marca BRUKER, série Avance, modelo DRX 400.

As amostras (10 mg de material) foram dissolvidas em 0,4 mL de D_2O (99,8%), congeladas e liofilizadas, sendo procedimento repetido por no mínimo 3 vezes. As análises foram procedidas em tubo de 5 mm de diâmetro interno, em temperatura de $70^\circ C$. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ (ppm), em relação à ressonância do padrão externo Me_4Si ($\delta = 0$).

3.6.3.2 Análises bidimensionais de ressonância magnética nuclear (RMN-2D)

Espectros de HMQC (*heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy*) foram realizados para determinadas frações, de forma a alcançar as correlações entre os 1H e seus respectivos ^{13}C presentes na estrutura.

As análises de RMN-2D para a fração NaP30 incluíram além de HMQC, as técnicas homonucleares COSY (*correlation spectroscopy*) e TOCSY (*total correlation spectroscopy*). Enquanto através do COSY pode-se correlacionar os deslocamentos

químicos de pares de núcleos de ^1H , um acoplado ao outro, a técnica de TOCSY permite observar as correlações entre todos os núcleos do sistema (ex.: H-1 com H-2; H-1 com H-3 e assim sucessivamente) e não exclusivamente entre os núcleos de apenas um par.

As análises de RMN-2D foram realizadas em temperatura de 30°C.

3.6.4 Determinação da Homogeneidade Molecular por Cromatografia de Exclusão Estérica Acoplada à Detecção por Índice de Refração e Espalhamento de Luz (HPSEC-MALLS)

Para as análises de HPSEC-MALLS, as amostras foram preparadas nas concentrações de 0,5 g.L⁻¹ em água Milli-Q ou em NaNO₂ 0,1 mol.L⁻¹ (contendo 0,02% de NaN₃), e, posteriormente, filtradas em membranas Millipore de porosidade 0,22 µm.

As soluções foram eluídas em cromatógrafo de exclusão estérica WATERS, equipado com quatro colunas WATERS dispostas de forma seqüencial e apresentando limites de exclusão 1 x 10⁶ (coluna 2000); 4 x 10⁴ (coluna 250) e 5 x 10³ (coluna 120). As colunas foram previamente equilibradas e eluídas com o mesmo solvente da amostra, com auxílio de bomba peristáltica WATERS 515.

A detecção do material eluído foi realizada através de detector de índice de refração (IR), em série com detector de espalhamento de luz em multiângulos. A resposta observada a partir do detector de índice de refração indica a massa em gramas das substâncias presentes, enquanto que o detector de espalhamento de luz identifica a massa molar das mesmas.

3.6.5 Análises Reológicas da Fração gMp1

Os estudos reológicos da fração gMp1 apresentados no presente trabalho foram executados sob a orientação da Profa. Maria Rita Sierakowski, do Departamento de Química da UFPR.

As medidas foram realizadas utilizando-se um reômetro Haake RS 75 Rheostress, acoplado a um termocirculador DC5B3, banho termostaticado Haake K15 e sistema Peltier TC81 de controle de temperatura ($\pm 0,2^\circ\text{C}$).

A geometria do sensor utilizado foi do tipo cone-placa (C60/2°), com diâmetro do cone de 60 mm, ângulo de 2°, tanto para as análises em sistema estático, quanto oscilatório (frequência 10^{-2} -10 Hz, deformação fixa).

As amostras, nas concentrações de 2 e 4 g.L⁻¹ da fração gMp1, foram preparadas em dois solventes, água ultrapura (obtida por equipamento Milli-Q) e solução aquosa de cloreto de lítio 0,1 mol.L⁻¹, com auxílio de agitação magnética (20°C, 16 h). As soluções resultantes permaneceram em repouso por 2 h, a fim de permitir a reorganização do material após a agitação e, em seguida, foram avaliadas em relação a seu comportamento reológico.

Os resultados apresentados são representativos de experimentos realizados em triplicata.

3.6.5.1 Avaliação do comportamento de fluxo

As análises reológicas estáticas da fração gMp1 foram feitas na temperatura de 25°C em modo de tensão controlada, medindo-se as deformações resultantes da aplicação de tensões entre 0,038 Pa e 100 Pa (crescentes e decrescentes).

3.6.5.2 Avaliação do comportamento viscoelástico em modo estático

O estudo do comportamento viscoelástico das amostras avaliado em modo estático foi realizado através da técnica de tensão temporária ou arraste (*creep and recovery*). Para tal, as amostras (2 e 4 g.L⁻¹) preparadas em solução de cloreto de lítio foram submetidas a uma tensão de cisalhamento (τ) constante e de pequena amplitude (0,5 Pa), por 600 s, em temperatura de 25°C. Após este período, a tensão foi totalmente removida e a resposta da amostra avaliada, praticamente em seu estado não perturbado.

3.6.5.3 Avaliação do comportamento viscoelástico em modo dinâmico

O comportamento viscoelástico de gMp1 foi analisado, medindo-se as respostas elástica (módulo de estocagem = G') e viscosa (módulo de perda = G'') do material, em função da frequência (ω), utilizando-se valores baixos de deformação (γ).

Uma varredura de tensão (0,2 a 200 Pa), em frequência de 1 Hz, foi feita para se determinar a região em que os módulos de perda e estocagem permanecem constantes com a variação da deformação, faixa esta denominada região viscoelástica linear do material, em que não há, por definição, perturbação significativa na estrutura do mesmo.

A deformação escolhida dentro da faixa viscoelástica linear para as análises do comportamento dinâmico correspondeu a 1%.

A influência dos parâmetros tempo e temperatura sobre as características reológicas dinâmicas da fração gMp1 foi estudada.

Análises dos módulos de estocagem (G') e de perda (G'') do gel foram realizadas em função do tempo, durante 1800 s, na frequência de 1 Hz e deformação pré-estabelecida, em temperaturas de 25° e 60°C.

Após as curvas de tempo a 60°C, o material foi resfriado até a temperatura de 25°C (com auxílio do programa computacional do equipamento) e submetido à análise

por varredura de frequência a 25°C, para a comparação com os resultados obtidos sem aquecimento. Como controle, o processo de aquecimento das amostras a 60°C foi também realizado em tubo hermeticamente selado.

Amostras de gMp1 nas concentrações de 2 e 4 g.L⁻¹ foram submetidas a uma rampa de temperatura, com aquecimento de 5 a 95°C ($\Delta T/t = 0,5^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$) e resfriamento de 95° a 5°C ($|\Delta T/t| = 0,05^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$), sendo o comportamento viscoelástico da fração acompanhado através dos módulos G' e G'', durante ambos os processos.

Em todos os experimentos realizados envolvendo a influência do fator temperatura no comportamento dinâmico das amostras, após o sensor alcançar a posição de medida, a superfície de amostra foi coberta com uma camada de óleo de silicone (sem qualquer efeito sobre as medidas), a fim de evitar a evaporação de solvente em altas temperaturas.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO MICROSCÓPICO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO DE SEMENTES DE *Magonia pubescens* ST. HIL. (TINGÜI)

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

De acordo com FAHN (1990), o fenômeno de extrusão de compostos mucilaginosos está diretamente relacionado à dispersão de sementes, podendo regular a germinação das mesmas, evitando sua desidratação. Em casos de ambientes com excesso de água, a mucilagem pode envolver a semente, evitando, em contraste, que a germinação se processe, em função da deficiência na passagem de oxigênio. Assim, a compreensão de como o processo ocorre em determinadas espécies vegetais é importante.

Os experimentos cujos resultados estão mostrados na Figura 6 (A-G) foram realizados com a finalidade de visualizar o processo de extrusão do gel do envoltório externo das sementes de *Magonia pubescens* St. Hil. (Tingüi). Nestes experimentos, amostras contendo as duas primeiras regiões do envoltório externo foram submetidas à hidratação em tempos crescentes e analisadas via MEV. A Figura 6A mostra o resultado de experimento controle, onde uma amostra não hidratada foi imersa diretamente na solução fixadora. Verifica-se que o período de fixação do material não contribui para o processo de hidratação e conseqüente extrusão de material celular.

A Figura 6B é resultado de experimentos nos quais as amostras foram submetidas a 0,5 min de hidratação. A MEV deste material, em vista frontal, mostra células epidérmicas em início de estriação, caracterizando o início do processo de hidratação (Figura 6B).

Para as amostras imersas em água destilada por 1,5 min, um deslocamento das células epidérmicas, gerado pela pressão do gel em fase inicial de liberação, foi observado, conforme demonstrado na eletromicrografia da Figura 6C. Um outro

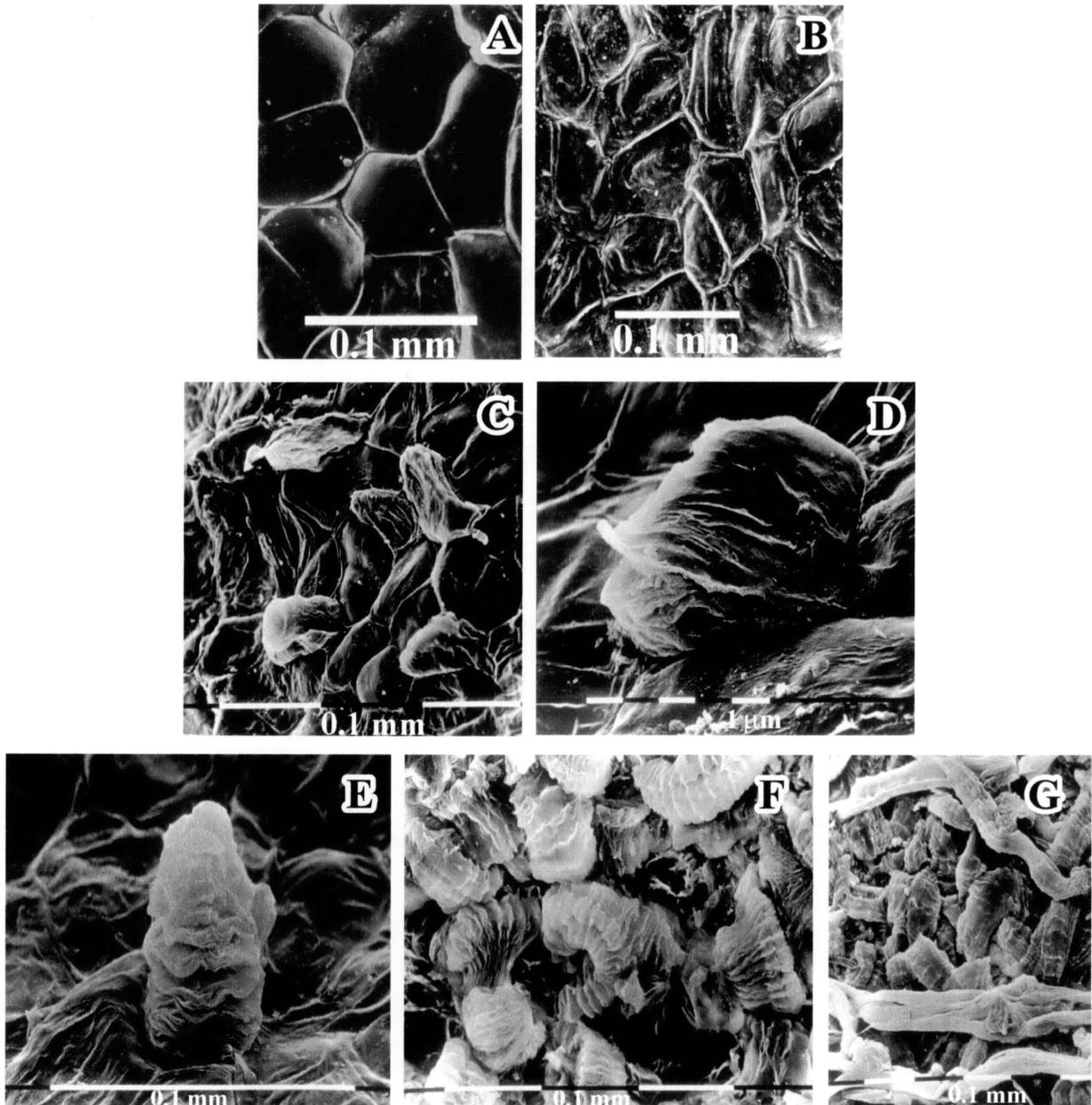


Figura 6: Extrusão do gel de sementes de *Magonia pubescens* (Tingüi), observado via microscopia eletrônica de varredura.

A) Controle: Vista frontal da primeira região do envoltório externo de uma amostra não hidratada submetida à fixação com F.A.A. 70%. B) Células epidérmicas após 0,5 min de hidratação (vista frontal). C), D) e E) Primeira região após 1,5 min de imersão em água. Visão do gel sendo liberado das células mucilaginosas da segunda região do envoltório externo. F) e G) Segunda região após período de hidratação correspondente a 2,5 min.

campo ainda referente a 1,5 min de hidratação mostrou em detalhe a organização tridimensional do gel liberado, com estrutura característica cilíndrica, lamelar, com filamentos sanfonados (Figuras 6D,E).

As amostras hidratadas por períodos de tempo superiores a 1,5 min, quando da observação de seu perfil, apresentaram grande quantidade de gel sendo liberada, fato que permitiu o acompanhamento da distensão dos filamentos mucilaginosos (Figura 6F,G). Vale destacar que a liberação do gel levou a uma diminuição do volume das células da primeira região, nitidamente observada nas Figuras 6B e 6C, em comparação com a Figura 6A. A hipótese de ocorrência de morte celular não pode ser descartada, embora experimentos específicos para avaliar tal possibilidade devam ainda ser realizados.

Estes resultados caracterizam o processo de extrusão do gel de *Magonia pubescens* como sendo semelhante ao observado para as sementes de *Cuphea calophylla*. As diferenças encontram-se na organização tridimensional dos materiais mucilaginosos liberados, que para *C. calophylla* apresenta forma helicoidal e não lamelar como para *M. pubescens*, bem como, no tempo de hidratação necessário para iniciar a liberação do material mucilaginoso, que para *C. calophylla* corresponde à imersão de 2 h em água (SCHOENBERG & HOFMEISTER, 1986).

4.1.2 Microscopia de Luz e Microscopia de Fluorescência

Com a finalidade de evidenciar a natureza química, bem como a distribuição celular dos constituintes do envoltório externo das sementes de *Magonia pubescens*, uma série de análises *in situ* foi realizada, avaliando-se a presença de compostos aniônicos, polissacarídeos, além de compostos fenólicos, como lignina.

O corante azul de *p*-toluidina possui propriedades metacromáticas e foi utilizado para a observação de moléculas aniônicas. O fenômeno da metacromasia ocorre de acordo com a variedade de estrutura química de cada ambiente do substrato e resulta em diferenciação de cores, em função do mecanismo de empilhamento das

moléculas do corante (BAKER, 1958; GRAHAM & JOSHI, 1996). Sendo assim, este corante, por sua natureza catiônica (LILLIE, 1977), garante a detecção de moléculas aniônicas, podendo produzir colorações histológicas distintas para moléculas com graus variados de carga.

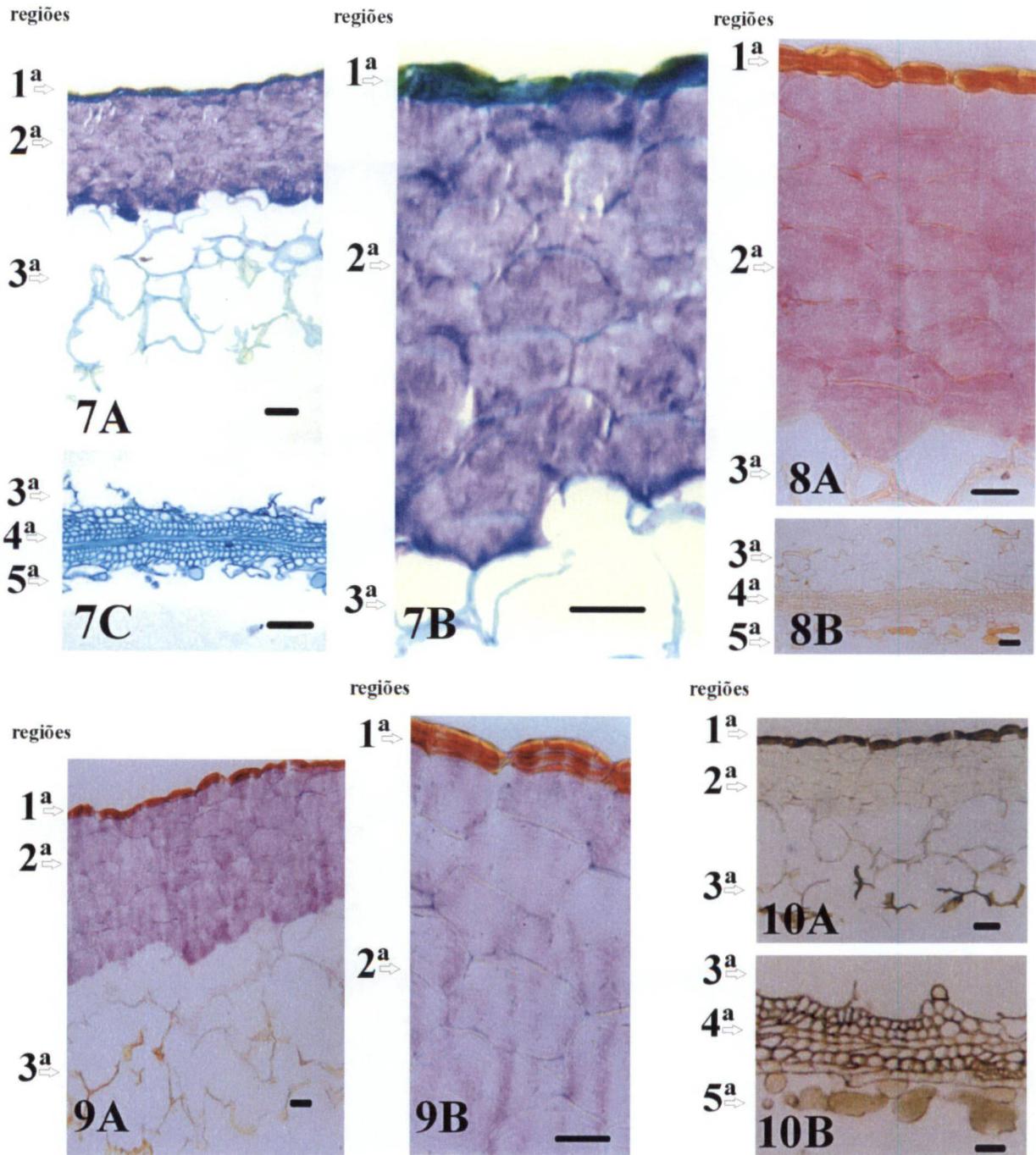
A análise, via microscopia fotônica, das três primeiras regiões do envoltório externo em estudo coradas com azul de *p*-toluidina O (Figura 7A,B) possibilitou o levantamento dos seguintes aspectos:

* A semente apresenta um estrato epidérmico, constituído de uma camada de células, contendo compostos fenólicos, evidenciados por sua coloração esverdeada em presença de azul de toluidina (Figura 7A);

* Internamente à epiderme, seguem 7 a 8 camadas de células parenquimáticas mucilaginosas, constituindo a segunda região do envoltório externo (Figura 7A,B). Nesta, as paredes e o conteúdo das células apresentam componentes com características de carga diferentes entre si, fato demonstrado pelas colorações distintas observadas (azul e púrpura, respectivamente). Isto se deve ao fenômeno de empilhamento das moléculas de azul de toluidina em graus variados. Sendo assim, é provável que as cargas negativas dos compostos da parede destas células estejam dispostas umas mais afastadas das outras, quando comparadas com as cargas presentes no conteúdo celular, criando um ambiente favorável a um intenso empacotamento das moléculas de corante.

* A terceira região compreende uma série de camadas de células parenquimáticas organizadas de forma irregular (Figura 7A).

Na Figura 7C, pode-se observar os resultados de microscopia de luz obtidos para a quarta região corada com azul de toluidina. Verificam-se resquícios do terceiro estrato na preparação que se encontram aderidos ao quarto. A presença de uma quinta região de células em formato arredondado também pôde ser observada. A quarta região é composta por 8 a 10 camadas de fibras, com células cujas paredes apresentam natureza lignificada (coloração verde-azulada com azul de toluidina).



Figuras 7-10: Microscopia de luz do envoltório externo de sementes de *M. pubescens*. (Barra = 5 μ m) Figura 7: Micrografias de secções tratadas com azul de toluidina 0,05%. A) Regiões 1, 2 e 3. B) Regiões 1, 2 e 3. C) Regiões 3, 4 e 5. Figura 8: Secções coradas com PAS. A) Regiões 1, 2 e 3. B) Regiões 3, 4 e 5. Figura 9: Coloração com vermelho de rutênio. A) Regiões 1, 2 e 3. B) Regiões 1 e 2. Figura 10: Reação com cloreto férrico 10% em solução aquosa de carbonato de sódio 0,3%. A) Regiões 1, 2 e 3. B) Regiões 3, 4 e 5.

Tendo em vista a presença de compostos aniônicos revelada através da coloração com azul de toluidina, foram empregados, a seguir, os reagentes ácido periódico-Schiff (PAS) (Figura 8) e vermelho de rutênio (Figura 9), específicos, respectivamente, para a verificação de polissacarídeos em geral e polissacarídeos ácidos. Ambas as reações são consideradas positivas quando do aparecimento de coloração avermelhada.

No tocante ao citoplasma das células da segunda região, as micrografias revelaram intensa resposta com o reagente PAS (Figura 8A), indicando a presença de carboidratos contendo hidroxilas vicinais, oxidadas pelo ácido periódico (PA) da técnica (HAYAT, 1993). Este resultado, em conjunto com as avaliações feitas através da reação com azul de toluidina, suscitou a possibilidade do material mucilaginoso contido nestas células ser constituído, pelo menos em parte, de polissacarídeos ácidos. A reação de coloração com vermelho de rutênio (Figura 9A,B) serviu como confirmação deste fato, uma vez tendo sido detectada coloração avermelhada intensa na região citoplasmática das células contendo o gel.

As demais regiões do envoltório externo apresentaram uma baixa resposta com os reagentes PAS (Figura 8B) e vermelho de rutênio (dado não mostrado). A possibilidade de uma penetração insuficiente dos corantes nestas secções não pode ser descartada, sendo este fato descrito para o vermelho de rutênio (HAYAT, 1993).

A presença de compostos fenólicos foi detectada pela coloração marrom intenso observada pela reação com cloreto férrico na primeira e em proporções menores na terceira, quarta e quinta regiões do envoltório externo (Figura 10A,B), sugerindo, de acordo com a sensibilidade da técnica, que, na região onde o hidrogel é produzido, os compostos fenólicos estão ausentes. Com a finalidade de se detectar a presença de lignina, cortes a fresco foram corados com floroglucinol/HCl. A Figura 11 (A1) mostra que a 2ª região apresenta reação negativa ao corante, evidenciando a ausência de lignina na região do hidrogel, enquanto que nas regiões 3 e 4 alguma presença de lignina foi evidenciada pelo corante (Figura 11 A2).

Não foi detectada a presença de lipídeos na região formadora de gel, segundo a reação com Sudam III (Figura 11 B1), o que seria esperado em se tratando de células

destinadas à reserva de água para a germinação da semente. Para as regiões 3, 4 e 5, a resposta observada através da coloração mencionada foi fraca (Figura 11 B2).

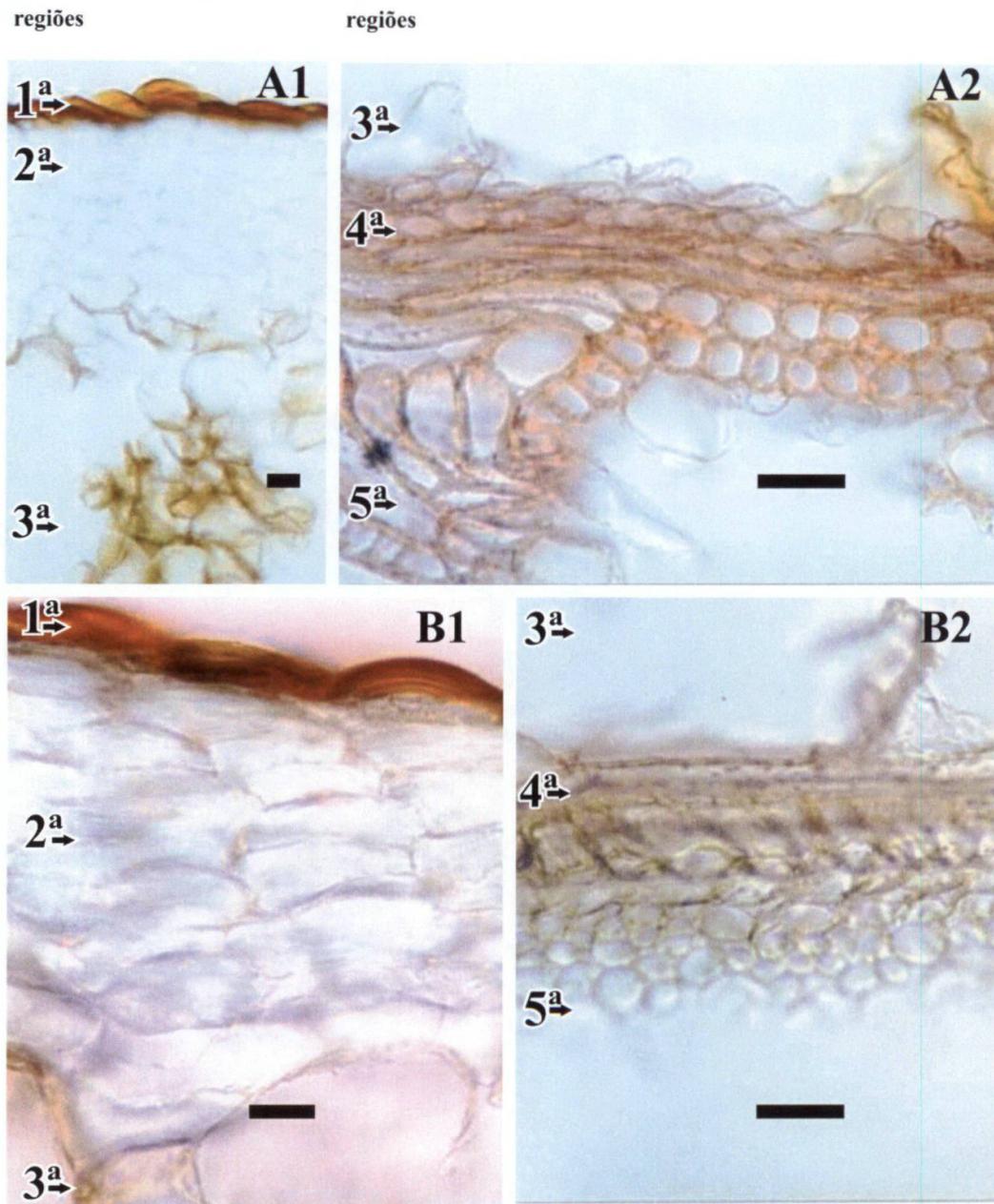


Figura 11: (A) Micrografias de seções do envoltório externo de sementes de *M. pubescens*. (Barra = 5 μm) tratadas com reativo floroglucinol/HCl. A1) Regiões 1, 2 e 3. A2) Regiões 3, 4 e 5. (B) Micrografias de seções do envoltório externo de sementes de *M. pubescens* tratadas com Sudam III (Barra = 5 μm). B1) Regiões 1, 2 e 3. B2) Regiões 3, 4 e 5.

Estes resultados são interessantes e analisados de forma conjunta sugerem fortemente que o hidrogel presente na 2ª região do envoltório externo é constituído principalmente por carboidratos.

É amplamente reconhecido que o composto fluorescente calcoflúor *white* M2R interage por meio de pontes de hidrogênio com β -glucanas (RATTEE & GREUR, 1974) e com oligossacarídeos celulósicos apresentando mais de quatro unidades de glucose (WOOD, 1980). Segundo MAEDA & ISHIDA (1967), os possíveis sítios de ligação do calcoflúor podem ser tanto os grupamentos hidroxílicos das moléculas-alvo, quanto as ligações glicosídicas em regiões amorfas ou cristalinas destes polímeros.

O modo de interação deste corante com polissacarídeos baseia-se na sua adsorção específica aos polímeros de configuração β , que apresentam unidades adjacentes de β -D-glucopiranosil unidas por ligação (1 \rightarrow 4) (MAEDA & ISHIDA, 1967; WOOD, 1980). De acordo com estes mesmos autores, a relação configuração β dos polímeros – interação com o corante poderia ser análoga à existente entre o iodo e o amido (configuração α , forma helicoidal) e, como afirmam WOOD & FULCHER (1983), parece depender, portanto, de quesitos estereoespecíficos.

Assim, a possibilidade da existência de β -glucanas na 2ª região foi avaliada pela complexação do reativo calcoflúor, tendo sido revelada pelo conseqüente aparecimento de fluorescência nas células em foco (Figura 12C). A parede destas células apresentou, segundo esta reação, maior densidade de β -glucanas, quando comparada com a região citoplasmática.

Verifica-se, nas Figuras 12A e 12B, a autofluorescência associada aos diferentes estratos do envoltório externo das sementes. Autofluorescência foi ausente na 2ª região do envoltório externo e foi verificada apenas para as demais regiões do envoltório em questão, indicando a presença de compostos com duplas ligações conjugadas, como os fenólicos (Figura 12A,B).

Portanto, os resultados obtidos usando-se as colorações com azul de toluidina (Figura 7), cloreto férrico (Figura 10), floroglucinol/HCl (Figura 11A), bem como, o padrão de autofluorescência (Figura 12A,B) evidenciaram a presença de lignina nas regiões 1, 3, 4 e 5 do envoltório externo.

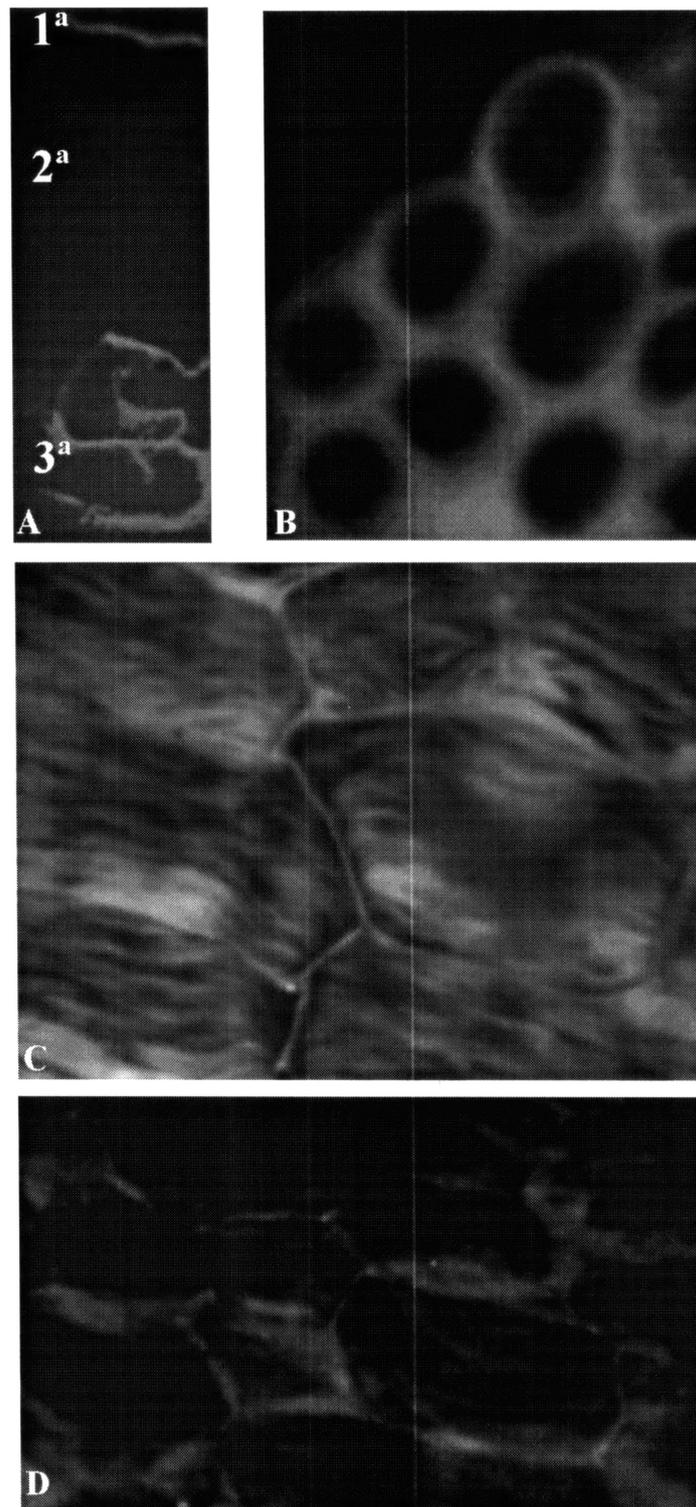


Figura 12: Microscopia de Fluorescência do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens* (Tingüi). A) Autofluorescência das regiões 1 e 3 (330-360 nm). B) Autofluorescência da 4^a região a 330-360 nm. C) Coloração da segunda região com calcoflúor. D) Redução da reação positiva da segunda região com calcoflúor, quando as seções foram previamente digeridas com celulase por 4 h (25°C).

Em relação aos ensaios de microscopia de fluorescência realizados utilizando-se a coloração com calcoflúor, faz-se necessário salientar que a autofluorescência intensa apresentada pelas regiões 1, 3, 4 e 5 (Figuras 12A,B) inviabilizou qualquer avaliação precisa através do procedimento acima proposto. A possibilidade de que tão intensa autofluorescência fosse resultado da presença de interferentes oriundos do processo de inclusão do material em historesina foi descartada, uma vez que a mesma resposta foi obtida em cortes do material a fresco. Este dado serviu, portanto, como confirmação adicional dos resultados encontrados por azul de toluidina, cloreto férrico e floroglucinol acidificado no tocante à presença de compostos fenólicos e lignina.

A avaliação por calcoflúor, precedida ou não pelo tratamento com enzima celulase foi considerada, portanto, apenas para a região formadora de gel (região 2).

O tratamento dos cortes com celulase por 4 horas, seguido de reação com calcoflúor (Figura 12D) revelou que parte das moléculas marcadas corresponde a compostos celulósicos e que os mesmos encontram-se distribuídos majoritariamente no citoplasma. Vale destacar que incubações por tempos superiores não alteraram a resposta (dados não mostrados). Portanto, o fato de ainda ocorrer complexação com calcoflúor *white*, mesmo a amostra tendo sido degradada com celulase, sugere fortemente a presença de outros tipos de β -glucanas, além de material celulósico nas células mucilaginosas.

Segundo MORI e BELLANI (1996), a eficiência do método do calcofluor *white* M2R para a identificação de material celulósico é garantida para amostras desprovidas de fenóis e lignina, condição esta obedecida pela segunda região do envoltório externo.

De acordo com FAHN (1990), a ocorrência de mucilagens em sementes é comum. As mucilagens podem ou não conter microfibrilas celulósicas, sendo as que possuem tal componente, mucilagens de maior força estrutural e que permanecem por isso mais aderidas à semente. Células epidérmicas de sementes de Cruciferae, como, por exemplo, *Lepidium sativum*, apresentam mucilagem contendo microfibrilas celulósicas como constituintes de parede celular primária. Exemplos de mucilagens desprovidas de microfibrilas celulósicas são encontradas em sementes de *Linum usitatissimum* e espécies de Plantago, como parte de parede secundária.

No caso das sementes de *M. pubescens*, o presente trabalho encontra-se em concordância com estudos anteriores realizados por GORIN *et al.* (1996), demonstrando ambos a presença de mucilagem contendo microfibrilas celulósicas. Segundo estes autores, o gel de sementes de *M. pubescens* consiste principalmente de compostos celulósicos em associação com polissacarídeos ácidos.

4.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS REGIÕES 2, 3, 4 E 5 DO ENVOLTÓRIO EXTERNO

A fim de complementar os dados de microscopia em relação ao conteúdo de carboidratos dos estratos do envoltório externo, a composição monossacarídica das regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo foi avaliada através de CG-EM e os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Composição monossacarídica das regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo de sementes de *M. pubescens* *.

REGIÃO	Composição monossacarídica (%)						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
2	25	-	1	66	-	5	3
3	7	traços	3	47	4	21	18
4	7	traços	6	57	5	6	18
5	4	2	4	9	11	53	18

- não detectado.

* As amostras foram hidrolisadas (TFA 2 mol.L⁻¹, overnight, 100°C), reduzidas e acetiladas (piridina:anidrido acético, 1:1 v/v). Os alditóis acetatos foram analisados por CG-EM (coluna DB225).

Verifica-se, na Tabela 1, que as regiões 2, 3 e 4 apresentam xilose como principal monossacarídeo, sugerindo a presença de xilanas no envoltório externo. Quantidades significativas de ramnose estão presentes na região 2, enquanto que para os demais estratos analisados, os percentuais de ramnose encontram-se baixos. Para a região 5, o monossacarídeo predominantemente encontrado foi galactose. A presença de iguais quantidades de glucose foi detectada para os estratos 3, 4 e 5.

Com a finalidade de verificar dentre os carboidratos das regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo a presença de monossacarídeos neutros livres, amostras destas regiões foram submetidas à extração com MeOH:H₂O. Os extratos MeOH:H₂O obtidos, após redução com boroidreto de sódio e acetilação, foram avaliados por CG-EM para a verificação qualitativa e quantitativa da presença de monossacarídeos neutros livres. Os resultados encontrados estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Determinação qualitativa e quantitativa dos monossacarídeos livres presentes nas regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo de sementes de *M. pubescens*^(a).

Região	Extrato MeOH:H ₂ O rendimento (%) ^(b)	% de monossacarídeos livres ^(c)	Composição monossacarídica (%)							
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
2	3	0,2	3	-	5	10	6	16	50	
3	12,5	0,22	-	-	-	-	-	100	-	
4	10	0,03	-	7	-	1	8	27	57	
5	35	0,3	-	20	-	17	16	33	14	

^(a) As amostras das quatro camadas citadas foram submetidas à extração com MeOH:H₂O (4:1 v/v) a quente. As amostras dos extratos metanólicos foram reduzidas, acetiladas e analisadas por CG-EM para a determinação de suas composições monossacarídicas. Utilizou-se alitol como padrão interno para avaliação quantitativa.

^(b) Rendimento em relação à massa seca da amostra da camada.

^(c) Percentual em relação à massa seca da amostra da camada.

A presença de monossacarídeos livres naturais nas regiões celulares avaliadas foi evidenciada, em percentuais distintos em relação ao peso seco das camadas.

As regiões 2 e 4 contêm principalmente glucose como monossacarídeo livre, enquanto que as regiões 3 e 5 apresentam galactose como principal monossacarídeo livre, em concordância com a presença de galactose nos hidrolisados destas regiões (Tabela 1).

4.3 ANÁLISES DAS REGIÕES 2, 3, 4 E 5 DO ENVOLTÓRIO EXTERNO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM ESTADO SÓLIDO

Os experimentos de microscopia contribuíram para o estudo dos componentes celulares do envoltório externo, entretanto, como, para tais análises, as amostras devem ser previamente submetidas a processos de desidratação, fixação, bem como a reações com corantes, poderia haver um prejuízo da organização nativa dos mesmos.

Além disso, as técnicas histoquímicas PAS e vermelho de rutênio utilizadas nas regiões 3, 4 e 5 do envoltório externo das sementes de *M. pubescens*, demonstraram fraca resposta para a ocorrência de carboidratos. Com a finalidade de esclarecer se esta seria uma limitação dos métodos empregados ou se, de fato, tais moléculas estariam em baixa concentração e, ainda, com o intuito de obter informações mais detalhadas no tocante aos constituintes do envoltório externo das sementes de *M. pubescens*, as regiões 2, 3, 4 e 5 deste envoltório foram isoladas mecanicamente e estudadas por ressonância magnética nuclear de carbono-13 em estado sólido, por meio da técnica de Polarização Cruzada com Rotação no Ângulo Mágico (RMN-¹³C-PC/RAM).

Os resultados destas análises estão mostrados na Figura 13, onde se observa que os espectros de RMN-¹³C-PC/RAM obtidos para todas as regiões apresentaram sinais alargados, característicos para esta metodologia.

Verifica-se na Figura 13 que a presença de carboidratos foi confirmada para todas as regiões analisadas, em função da região anomérica típica em $\delta \sim 100$. Muito embora as análises microscópicas de seções transversais coradas com PAS (Figura 8) e vermelho de rutênio (Figura 9) tenham apresentado baixa resposta em relação à

presença de carboidratos para as regiões 3, 4 e 5 do envoltório externo, a ocorrência

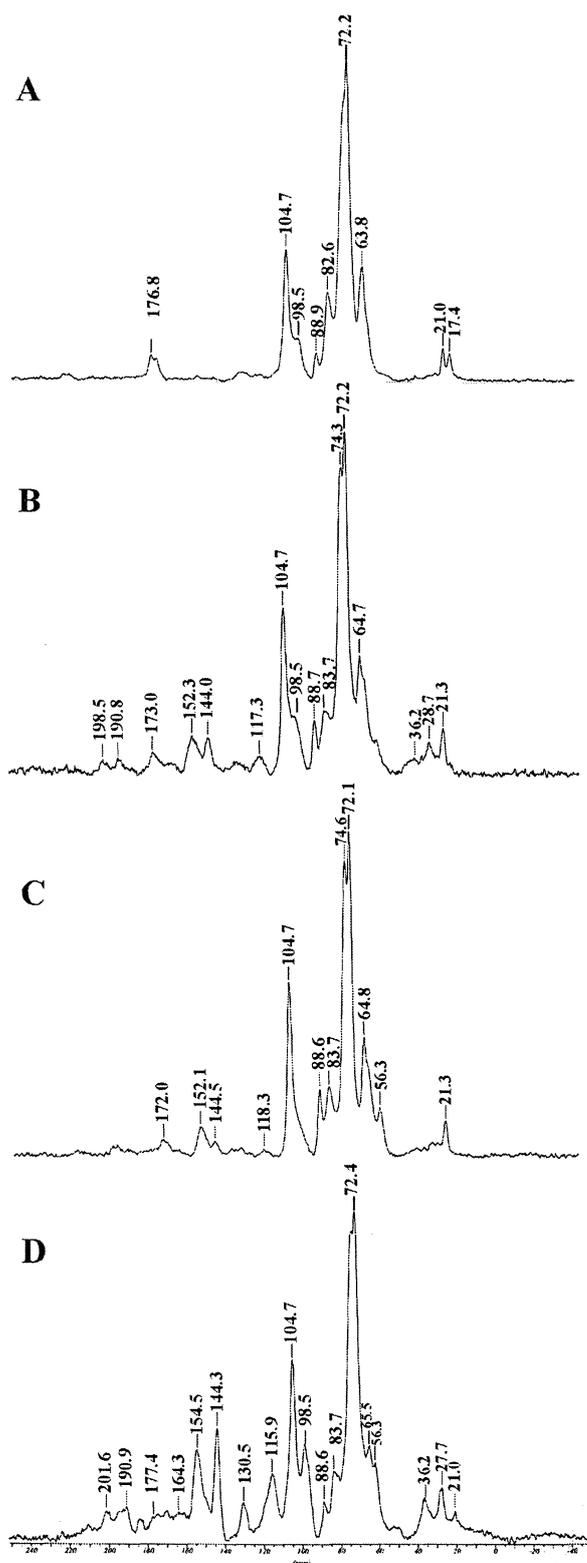


Figura 13: Espectros de RMN- ^{13}C -PC/RAM das quatro regiões mais internas do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens* (Tingüi). A) Região 2, B) região 3, C) região 4 e D) região 5. Os espectros foram obtidos a 27°C.

destes foi confirmada pelo método de RMN-¹³C-PC/RAM, em conjunto com as análises de composição monossacarídica (Tabela 1).

A segunda região é, na verdade, constituída quase que exclusivamente por carboidratos, conforme demonstrado por RMN-¹³C-PC/RAM (Figura 13A). Os principais sinais observados foram: em δ 176,8 (C=O de ácido urônico e de acetato), 104,7 (C-1, β -Xylp, β -GlcP), 98,5 (C-1, α -GlcPA e/ou seu derivado 4-O-Me), 63,8 (C-5, β -Xylp), 21,0 (CH₃, acetato) e 17,3 (C-6, α -Rhap). A presença de polissacarídeos com configuração- β na segunda região do envoltório externo, indicada pela coloração com calcoflúor, foi confirmada pela predominância do sinal anomérico em δ 104,7. A ocorrência de xilose na região 2, sugerida fortemente pelo sinal pronunciado referente a seu carbono anomérico (δ 104,7), pôde ser confirmada pela análise de composição monossacarídica (Tabela 1).

Segundo REIS *et al.*, citados por VISSER *et al.* (1992), em se tratando de associação celulose/hemiceluloses, é possível, por exemplo, que as cargas negativas de heteroxilanas ácidas participem do arranjo tridimensional com as microfibrilas celulósicas. De acordo com VARNER e LIN (1989), a interação entre xilanas e microfibrilas de celulose ocorre de maneira inversamente proporcional ao grau de substituição das cadeias laterais das primeiras.

O sinal significativo de C-6 de ramnose em δ 17,3 presente na região 2 está em concordância com o resultado de CG-EM obtido para a mesma (Tabela 1).

Nas regiões 3, 4 e 5, há a predominância de carboidratos, segundo revelado pelos espectros de RMN-¹³C-PC/RAM (Figura 13B,C,D). Tais amostras apresentaram percentuais de ramnose encontram-se baixos, justificando a ausência de seu sinal de CH₃ nos espectros de RMN-¹³C-PC/RAM (Figura 13B,C,D). Foram ainda observados, para as regiões 3, 4 e 5, um sinal de grupamento carboxílico em δ ~175, referente a C-6 de ácido urônico, bem como, um sinal em campo alto (δ 21), devido a ocorrência de grupos O-acetil nas amostras.

Diferenças estruturais foram verificadas entre as regiões, tendo-se em vista a ausência de sinais, tais como o de C-6 de ramnose (δ 17,4) para as regiões 3, 4 e 5, e

do sinal de carbono anomérico para ácido urônico (δ 98,5) para a 4ª região. Também foram verificadas diferenças nas proporções de ressonâncias referentes a *O*-substituição (região δ 81-89), demonstrando que os carboidratos dos diferentes estratos vegetais são distintos entre si em relação às proporções de suas ligações glicosídicas.

Nos espectros de todas as regiões, a presença de celulose cristalina foi identificada através do sinal correspondente a C-4 (em δ 88,6-88,9), assim como a existência de material amorfo de natureza celulósica e/ou hemicelulósica devido ao sinal em δ 83,7. Tais assinalamentos foram feitos em comparação aos valores de RMN-¹³C-PC/RAM relatados por GAMBLE *et al.* (1996) para *Lespedeza cuneata*.

Em relação ao terceiro estrato, verificou-se através da região anomérica do espectro da Figura 13B, que o mesmo apresenta unidades de β -xilopiranosose e/ou β -glucopiranosose, de acordo com o sinal em δ 104,7, bem como, unidades de α -Glc₁A, devido à ocorrência de um ombro em δ 98,5, confirmada também pelo sinal de C-6 da carbonila.

A presença de um ombro em δ 98,5 não é tão evidente no espectro obtido para a 4ª região (Figura 13C), porém o mesmo constitui um sinal significativo para o estrato 5 (Figura 13D).

Os estratos 3, 4 e 5 apresentaram outros sinais, além dos referentes a carboidratos. Segundo GAMBLE *et al.* (1996), a presença de estruturas contendo anéis aromáticos pode ser identificada pelos deslocamentos em δ 25,1, 35,0, 131,4, 145,4 e 154,9. MARTINEZ *et al.* (1999) descreve a verificação da presença de lignina através dos sinais em δ 148 e 153. A existência de carbonos *O*-substituídos de mono-, di- e tri-hidroxi-fenóis de taninos é observada, segundo van BERGEN *et al.* (1997), pelos deslocamentos em δ 130 (carbonos aromáticos *O*-substituídos), 145 (carbonos *O*-aril em di-hidroxi-fenóis) e em 153 (carbonos *O*-aril em mono-hidroxi-fenóis).

Comparando-se, então, os sinais de ressonância observados para as regiões 3, 4 e 5 do envoltório externo da semente em estudo com os dados de literatura anteriormente citados, é possível afirmar que, para tais estratos, os sinais em δ 25-40

são consistentes com CH₂ de lignina e/ou taninos, enquanto que em δ 120-160 encontram-se as ressonâncias referentes a duplas ligações destes componentes. As regiões 3, 4 e 5 são, portanto, constituídas principalmente por carboidratos e lignina e/ou taninos, em oposição à segunda região, que contém majoritariamente apenas carboidratos.

Muito embora a terceira região tenha sua origem a partir de células da segunda rompida durante o desenvolvimento da semente, as semelhanças entre os espectros de ambas não pareceram tão acentuadas, provavelmente devido ao fato da 3ª região apresentar quase que exclusivamente restos de parede celular, sendo praticamente desprovida do material correspondente ao conteúdo celular. A presença de compostos fenólicos no terceiro estrato, observada por RMN e sugerida pelos ensaios de microscopia, é consistente com o fato do processo de lignificação estar relacionado à morte celular e ao desaparecimento do citoplasma (REID, 1997), conforme observado para esta região.

Os sinais de ressonância mais importantes dos espectros de RMN-¹³C-PC/RAM das quatro regiões analisadas e seus respectivos assinalamentos encontram-se resumidos na Tabela 3.

Estabelecendo-se uma comparação entre os resultados de RMN-¹³C-PC/RAM e aqueles da análise microscópica do envoltório externo das sementes de *M. pubescens*, foi possível verificar as diferenças em relação à composição química dos estratos que o compõe, conforme demonstrado na Tabela 4.

Para todas as regiões, pôde-se caracterizar, por RMN-¹³C-PC/RAM, a presença de carboidratos como sendo majoritária. Lignina e/ou taninos foram detectados por esta técnica como componentes significativos dos estratos 3, 4 e 5. Os espectros de RMN-¹³C-PC/RAM parecem fornecer, portanto, as “impressões digitais químicas” de cada região celular do envoltório externo.

A concordância das análises de composição monossacarídica com os resultados de RMN-¹³C-PC/RAM endossa o aspecto da sensibilidade da ressonância em estado sólido como método de análise, quando comparada aos resultados das colorações destinadas à visualização de carboidratos via microscopia de luz.

Tabela 3: Principais deslocamentos químicos encontrados nos espectros de RMN-¹³C-PC/RAM das regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo de sementes de *M. pubescens*.

Assinalamentos	Deslocamentos químicos (p.p.m)			
	2ª região	3ª região	4ª região	5ª região
C-6 de ramnose	17,4	nd	nd	nd
grupos <i>O</i> -acetil	21,0	21,3	21,3	21,0
CH ₂ de lignina e/ou taninos	nd	25-40	nd	25-40
C-4 celulose cristalina	88,9	88,7	88,6	88,6
Celulose e/ou hemicelulose amorfa	82,6	83,7	83,7	83,7
C-1 α -Glc _p A e/ou 4- <i>O</i> -Me α -Glc _p A	98,5	98,5	nd	98,5
C-1 β -Xyl _p e/ou C-1 β -Glc _p	104,7	104,7	104,7	104,7
Carbonos aromáticos <i>O</i> -substituídos	nd	nd	nd	130,5
Carbonos <i>O</i> -aril em di-hidroxi-fenóis	nd	144,0	144,5	144,3
Carbonos <i>O</i> -aril em mono-hidroxi-fenóis	nd	152,3	152,1	154,5
C-6 de ácido urônico e/ou acetatos	~175	~175	~175	~175

nd - não detectado

Os dados presentes estão em concordância com o tipo de associação encontrada, de uma maneira geral, em paredes celulares vegetais entre hemiceluloses, microfibrilas celulósicas e polímeros de lignina (VISSER *et al.*, 1992).

O presente trabalho de tese propõe a espectroscopia de RMN-¹³C-PC/RAM como uma ferramenta que, aliada às avaliações microscópicas, possibilita superar as limitações desta, pois possibilita a análise dos materiais em seu estado sólido original, não necessitando de modificações químicas adicionais.

Outra vantagem da espectroscopia de RMN-¹³C-PC/RAM é o fato desta ser mais quantitativa e sensível, em comparação às técnicas histoquímicas empregadas.

Tabela 4: Comparação dos resultados de microscopia e de RMN-¹³C-PC/RAM obtidos para as regiões 2, 3, 4 e 5 do envoltório externo de sementes de *Magonia pubescens*.

Componentes e testes										
Região	Compostos fenólicos			Carboidratos		Material ácido			Celulose	
	Autofluorescência	FeCl ₃	RMN ¹	PAS	RMN ²	Vermelho de Rutênio	RMN ³	Azul de Toluidina	Calcoflúor <i>white</i>	RMN ⁴
2	-	-	-	+	r	+	r	+	+	r
3	+	+	r	s	r	s	r	+	nd	r
4	+	+	r	s	r	s	r	+	nd	r
5	+	+	r	s	r	s	r	+	nd	r

As respostas dos ensaios estão apresentadas conforme segue: +, reação positiva; -, reação negativa; s, reação levemente positiva; r, ressonância detectada; nd, não determinado.

¹ Principais valores de ressonância em δ 120-160, assinalados para duplas ligações de lignina e/ou taninos.

² Região anomérica característica em δ ~100.

³ Sinais em δ ~175 correspondendo a C=O de ácido urônico e acetato.

⁴ Celulose cristalina (C-4, δ 88,6); celulose amorfa e/ou hemicelulose (δ 83,7).

Segundo BELL e van STADEN (1993), alterações físicas no envoltório de sementes estão envolvidas no processo de germinação. Dentre as mudanças que podem auxiliar em tal evento pode-se incluir a degradação do envoltório da semente (BELL & van STADEN, 1993), bem como alterações em sua permeabilidade (WERKER, 1997).

O estudo das características químicas do envoltório de sementes usando RMN-¹³C-PC/RAM poderia, assim, apenas acrescentar em termos de conhecimentos acerca da biologia de plantas, permitindo, por exemplo, a investigação da natureza química do mesmo em sementes armazenadas no solo e sua influência no processo de dormência das mesmas.

É importante destacar que, até o presente, a técnica de RMN-¹³C-PC/RAM não havia sido utilizada como auxílio à microscopia na investigação de componentes químicos celulares do envoltório externo. Tal estratégia pode, portanto, ser empregada

em estudos de correlação entre as áreas de botânica e bioquímica, particularmente, por exemplo, na compreensão de mecanismos de germinação e crescimento vegetal.

4.4 FRACIONAMENTO DOS CARBOIDRATOS DA 2ª REGIÃO DO ENVOLTÓRIO EXTERNO

Considerando-se o fato da segunda região do envoltório externo ser constituída principalmente por carboidratos, procedeu-se o isolamento do gel que a constitui para a realização de estudos químicos e físico-químicos.

4.4.1 Fracionamento Etanólico do Hidrogel Original

A segunda região do envoltório externo das sementes em estudo, após ter sido inativada com MeOH:H₂O, foi hidratada e submetida à centrifugação conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

A partir do processo de centrifugação foi possível o isolamento de um material insolúvel, de natureza fibrilar, denominado fração FIBR, que quando avaliado em relação a sua composição monossacarídica constituía-se, principalmente, por glucose (Tabela 5), sugerindo a presença de microfibrilas celulósicas na 2ª região do envoltório externo. Este dado é concordante com as micrografias de fluorescência obtidas a partir do tratamento de seções transversais do envoltório externo com calcoflúor *white* (Figura 12C,D), que permitiram a visualização de um material fibrilar contendo ligações do tipo β -(1→4).

Segundo FAHN (1990), mucilagens de sementes podem ser divididas em duas classes, de acordo com a presença ou ausência de microfibrilas celulósicas. LINDBERG *et al.* (1990) isolaram, também por meio de centrifugação de soluções diluídas, microfibrilas de celulose a partir de mucilagem de sementes de *Cydonia oblonga*.

O hidrogel desprovido de material fibrilar foi submetido então a fracionamento etanólico, conforme descrito na seção Materiais e Métodos e demonstrado na Figura 14.

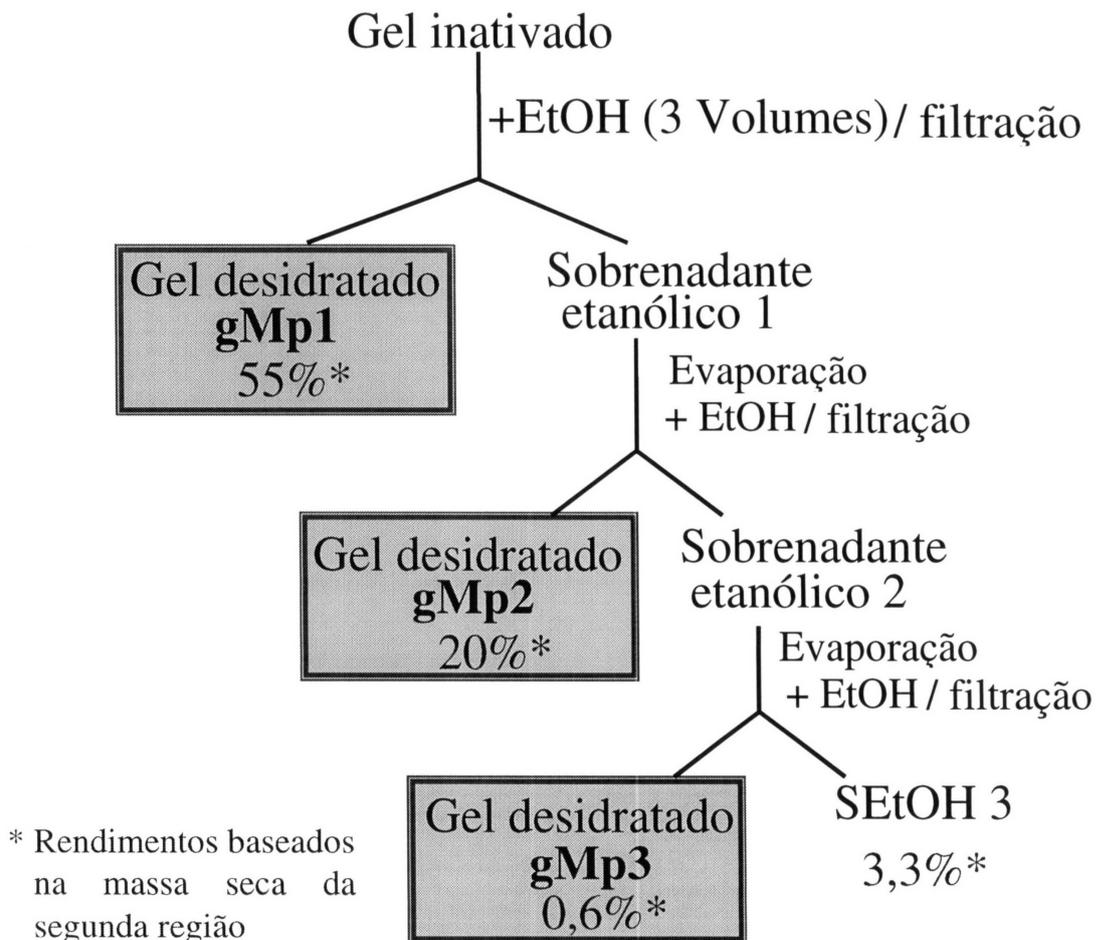


Figura 14: Esquema do fracionamento etanólico do hidrogel inativado.

As frações gMp1, gMp2 e gMp3 resultantes do tratamento etanólico foram secas em estufa a vácuo, originando filmes de carboidratos, denominados de xerogéis (WALTER, 1998). Segundo WALTER (1998), filmes de polissacarídeos apresentam grande interesse em termos de aplicação, sendo usados para proteger o sabor e aroma de frutas e vegetais contra fatores ambientais.

Os resultados da análise de composição monossacarídica das frações gMp1, gMp2 e gMp3, após hidrólise total estão apresentados na Tabela 5.

As três frações apresentaram os mesmos componentes monossacarídicos, porém em proporções variadas, o que sugere ser o tratamento com etanol um processo interessante para o fracionamento do hidrogel original.

Os hidrogéis desidratados gMp2 e gMp3 apresentaram composições monossacarídicas semelhantes entre si, porém distintas de gMp1. Enquanto o material gMp1 apresentou glucose como componente majoritário, gMp2 e gMp3 continham xilose como monossacarídeo principal. A fração gMp1 parece conter a mesma associação de xilanas ácidas e material celulósico, descrita por GORIN *et al.* (1996) para o hidrogel original de Tingüi, o que justificaria o fato desta ter precipitado primeiro com etanol.

Precipitações etanólicas fracionadas do gel (inativado enzimaticamente) nas proporções etanol:amostra 1:1, 2:1 e 3:1 (com ou sem a presença de LiCl) não resultaram em alterações de resultados de rendimento ou composição monossacarídica, possibilitando apenas a informação adicional de que gMp1 precipita já com a proporção etanol:amostra de 1:1.

Tabela 5: Composição monossacarídica das frações gMp1, gMp2 e gMp3, FIBR e SEtOH ^(a).

Fração	Rendimento (%) ^(b)	Composição monossacarídica (%)						
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác. Urôn. ^(c)
gMp1	55	16	5	20	0	2	37	20
gMp2	20	15	6	33	1	5	14	26
gMp3	0,6	19	7	39	1	5	13	16
FIBR	12	7	4	12	2	9	57	9
SEtOH 3	3,3	11	11	23	6	14	35	1

^(a) Determinada por CG-EM após amostras das frações terem sido acetolisadas (20 h, 60°C), desacetiladas, hidrolisadas (8 h, 100°C, TFA 2 mol.L⁻¹), reduzidas e acetiladas.

^(b) Em relação à massa seca da segunda camada.

^(c) As amostras foram hidrolisadas (TFA 2 mol.L⁻¹, 5 h), neutralizadas e dosadas pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991).

Os espectros de RMN- ^{13}C dos géis gMp1, gMp2 e gMp3 encontram-se, respectivamente, nas Figuras 15, 16 e 17, apresentando sinais de carboidratos.

Muito embora as análises de composição monossacarídica das frações gMp1, gMp2 e gMp3 tenham revelado diferenças no tocante aos teores de xilose e glucose, os espectros de RMN- ^{13}C apresentaram-se muito semelhantes entre si. Tal resultado pode ser explicado, uma vez que os mesmos foram realizados com as frações em estado de gel, restringindo a detecção apenas para as moléculas de maior mobilidade. É possível, portanto que os componentes de gMp1 contendo glucose estejam constituindo a rede rígida do gel, não sendo detectados por tal tipo de análise. A ausência de sinais das porções moleculares mais rígidas das redes de gMp1, gMp2 e gMp3 parece análoga ao alinhamento de macromoléculas biológicas em campo magnético em presença de agentes de orientação tais como géis de poliacrilamida, conforme descrito por SASS *et al.* (2001).

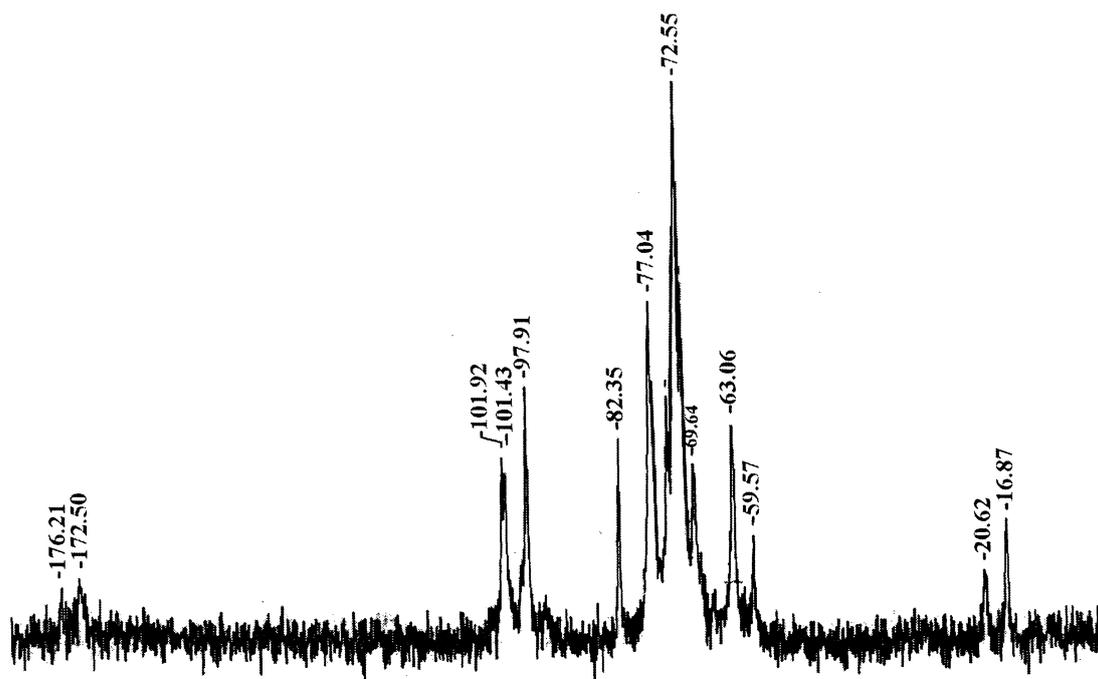


Figura 15: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração gMp1 (estado gel) em D_2O (probe 10 mm) (70°C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

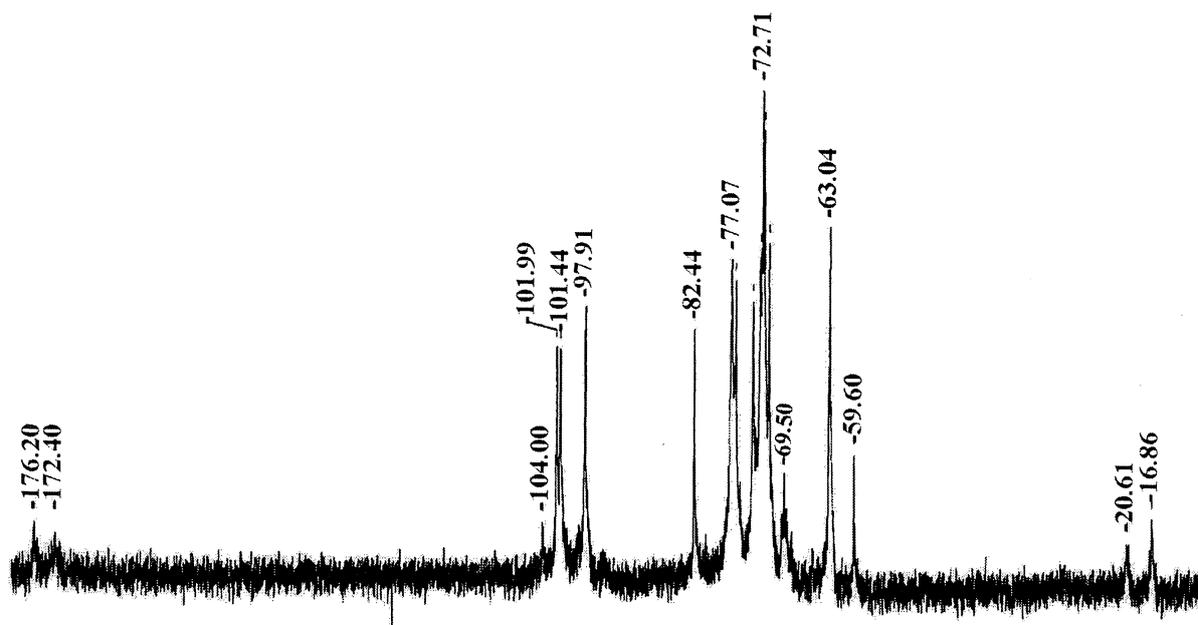


Figura 16: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração gMp2 (estado gel) em D_2O (probe 10 mm) (70°C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

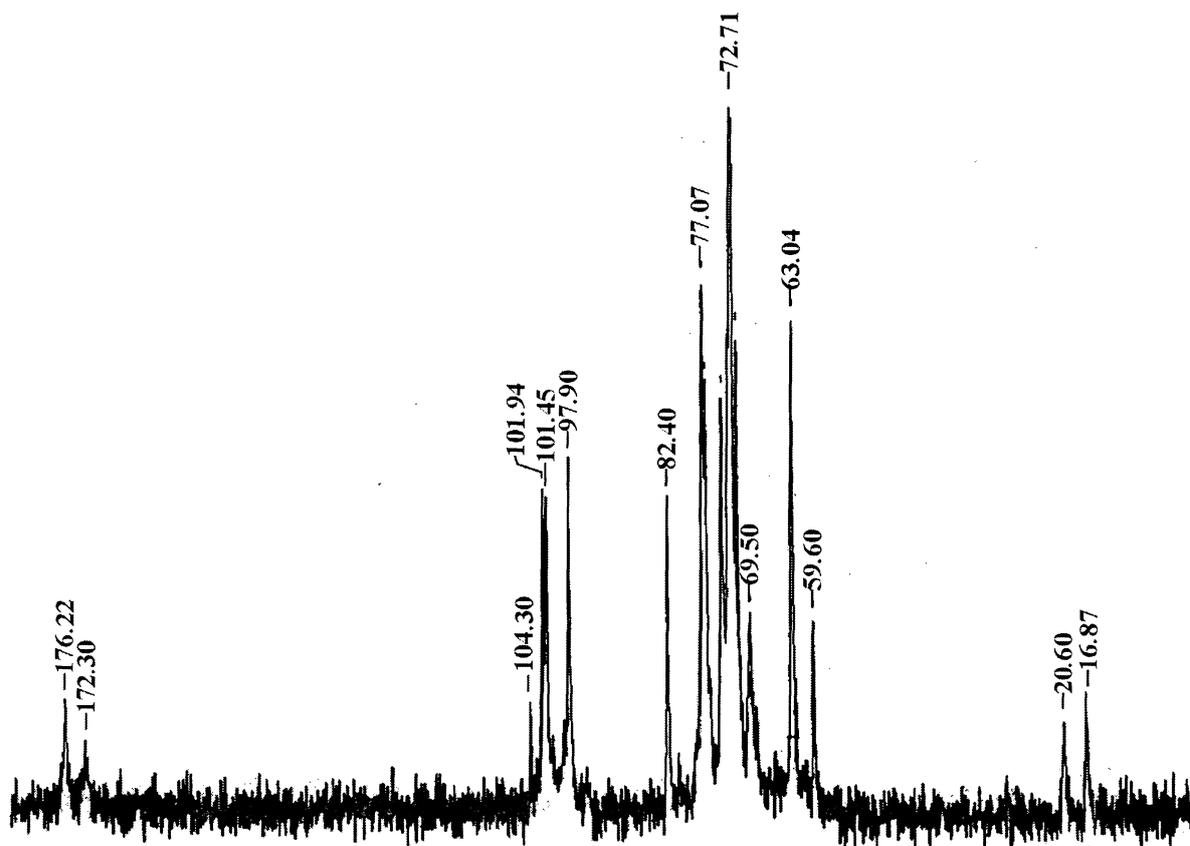


Figura 17: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração gMp3 (estado gel) em D_2O (probe 10 mm) (70°C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

A Tabela 6 contém os principais deslocamentos químicos e respectivos assinalamentos das frações gMp1, gMp2 e gMp3.

Os espectros de gMp2 e gMp3 apresentaram um sinal em $\delta \sim 104$ adicional em relação aos encontrados para a fração gMp1, provavelmente pertencente a uma região estrutural de maior mobilidade molecular.

Tabela 6: Deslocamentos químicos e respectivos assinalamentos dos principais sinais de RMN-¹³C das frações gMp1, gMp2 e gMp3.

Assinalamentos	Deslocamentos químicos (p.p.m)		
	gMp1	gMp2	gMp3
C-6 Rha	16,87	16,86	16,87
Grupos <i>O</i> -acetil	20,62	20,61	20,60
O-Me	59,57	59,60	59,60
C-5 Xyl	63,06	63,04	63,04
C-4 <i>O</i> -Me	82,35	82,44	82,40
C-1 α -Glc pA e/ou 4-Me- α -Glc pA	97,91	97,91	97,90
C-1 β -Xyl p	101,92	101,99	101,94
C-1 β -Glc pA ou β -Gal	nd	104,00	104,30
C-6 de α -Glc pA/ 4-Me- α -Glc pA	176,21;	176,20;	176,22;
e/ou C=O de acetatos	172,50	172,40	172,30

nd - não detectado

Após as análises de RMN-¹³C das frações gMp1, gMp2 e gMp3, em temperatura de 70°C, observou-se que estas apresentavam comportamentos distintos diante do fator aquecimento. Enquanto o material gMp1 preservava visualmente seu caráter de gel, gMp2 e gMp3 apresentavam reduções significativas nesta propriedade.

Os resultados de CG-EM e RMN-¹³C obtidos para as frações gMp1, gMp2 e gMp3 estão de acordo com aqueles descritos por GORIN *et al.* (1996), comprovando ser o hidrogel original de Tingüi uma mistura de carboidratos com estruturas químicas

semelhantes às encontradas por LINDBERG *et al.* (1990) para a mucilagem de sementes de *Cydonia oblonga*.

4.4.1.1 Fracionamento de gMp1

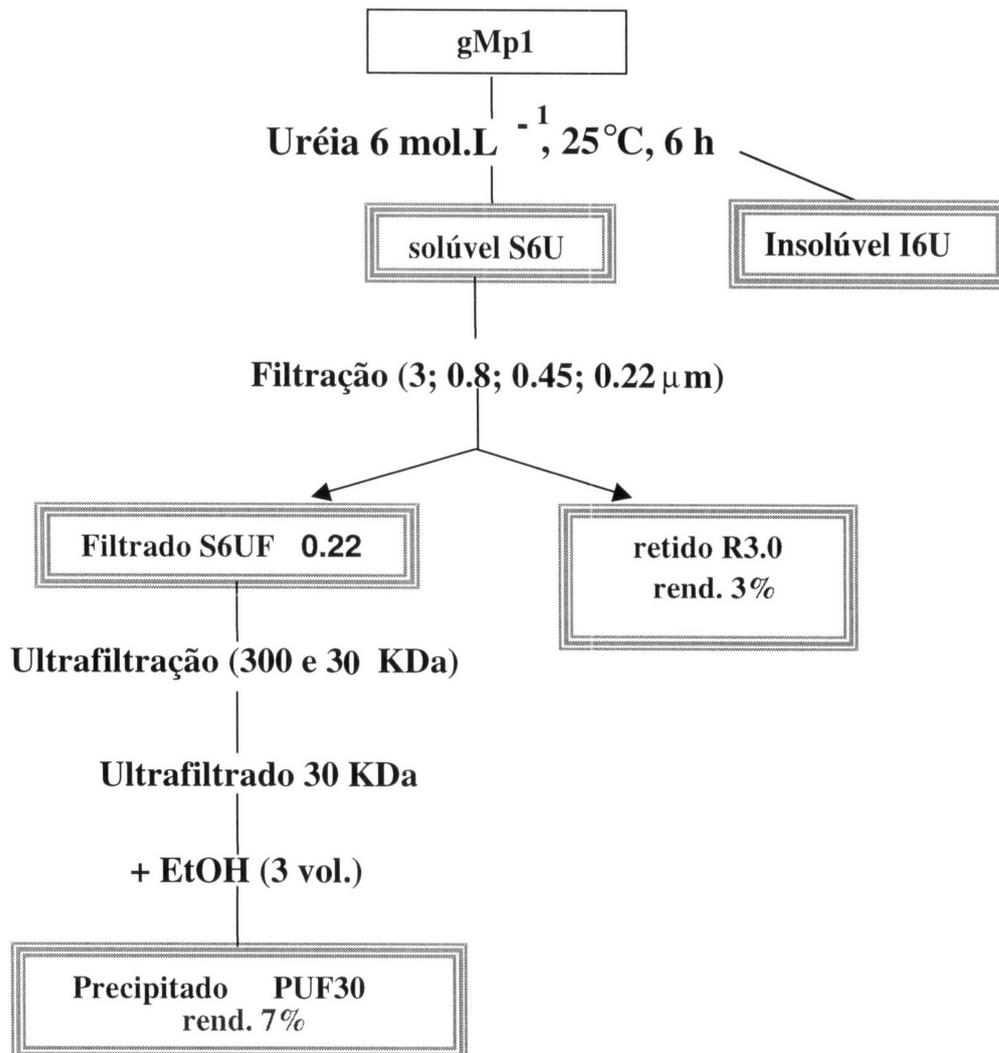
A fim de fracionar os carboidratos presentes na fração gMp1 e caracterizar suas estruturas químicas por meio de análises de CG-EM e de espectroscopia de RMN, esta foi tratada com solução aquosa concentrada de uréia, originando os materiais denominados solúvel (S6U) e insolúvel (I6U). A fração S6U foi submetida a filtrações em membranas Millipore (3, 0,8, 0,45 e 0,22 μm) e o filtrado final recebeu a denominação de S6UF 0,22. A fração S6UF 0,22 foi submetida a processos de ultrafiltração, conforme demonstrado na Figura 18.

A fração solúvel em uréia aquosa S6U, quando analisada por cromatografia de exclusão estérica, acoplada à multidetecção (HPSEC-MALLS) (Figura 19) apresentou pelo detector de índice de refração um pico majoritário e pequena quantidade de contaminantes de massas molares inferiores. Pelo perfil observado através da detecção por espalhamento de luz foi verificada também a presença de um componente de elevada massa molar, em quantidade ínfima conforme índice de refração. Em relação à composição monossacarídica, a fração S6U apresentou-se constituída principalmente glucose, arabinose, xilose e ácido urônico, conforme apresentado na Tabela 7.

A ultrafiltração em membranas de 300 e 30 KDa resultou na fração PUF30, que foi analisada por (HPSEC-MALLS), em relação a seu perfil de homogeneidade (Figura 20A) e apresentou ainda contaminantes de baixa massa molar. Esta heterogeneidade pôde ser comprovada através do gráfico de massas cumulativas da fração PUF30 (Figura 20B), que demonstra a presença de moléculas com massas distintas.

Avaliando-se a composição monossacarídica da fração PUF30 em comparação a de S6U (Tabela 7) verificou-se redução total do teor de glucose e aumento do

percentual de ramnose. Aparentemente, a fração PUF30 está na forma de agregados em R3.0, uma vez que a composição monossacarídica de ambas apresenta semelhanças (Tabela 7).



Os rendimentos estão expressos em relação à fração gMp1.

Figura 18: Esquema de fracionamento da fração S6U, solúvel em solução aquosa concentrada de uréia.

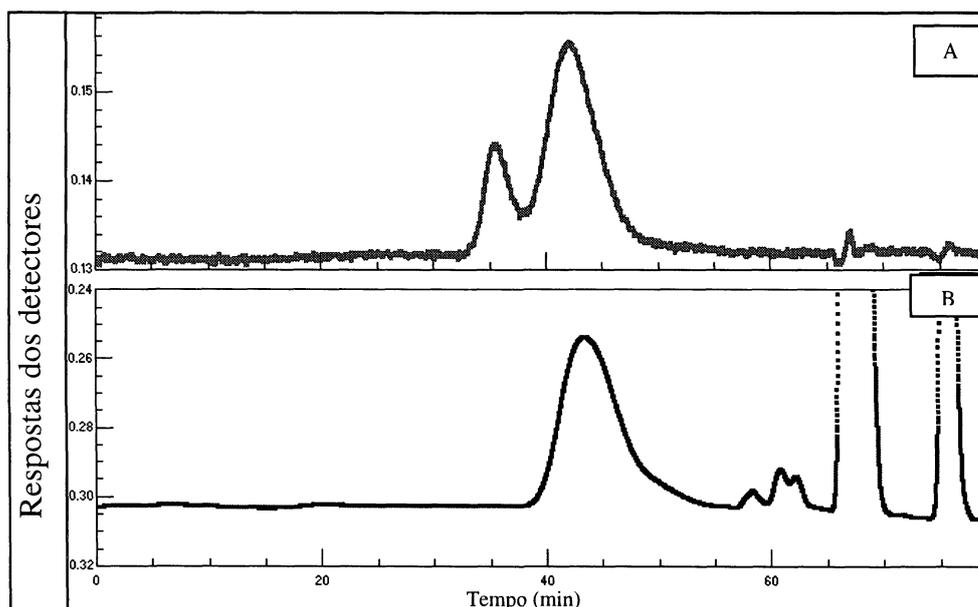


Figura 19: Perfil de eluição da fração S6U (em água Milli-Q) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada à multidetecção - espalhamento de luz (A) e índice de refração (B) (HPSEC-MALLS).

Tabela 7: Composição monossacarídica (%) das frações I6U; S6U; S6UF0,22; R3,0; PUF30 e PUF30R15 ^(a).

Fração	Rendim. (%) ^(b)	Composição monossacarídica (%)						
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Urôn. ^(c)
I6U	12	8	5	23	1	3	48	12
S6U	21,7	6	20	19	9	8	24	14
S6UF0,22	17,5	15	8	8	16	4	25	24
R3,0	3,9	21	20	27	3	3	7	19
PUF30	7,0	29	2	43	-	2	-	24
PUF30R15	5,0	14	-	36	-	5	-	45

- não detectado

^(a)Determinada por CG-EM após amostras das frações terem sido acetolisadas (20 h, 60°C), desacetiladas, hidrolisadas (8 h, 100°C, TFA 2 mol.L⁻¹), reduzidas e acetiladas.

^(b) rendimento em relação à fração gMp1.

^(c) As amostras foram hidrolisadas (TFA 2 mol.L⁻¹, 5 h), neutralizadas e dosadas pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991).

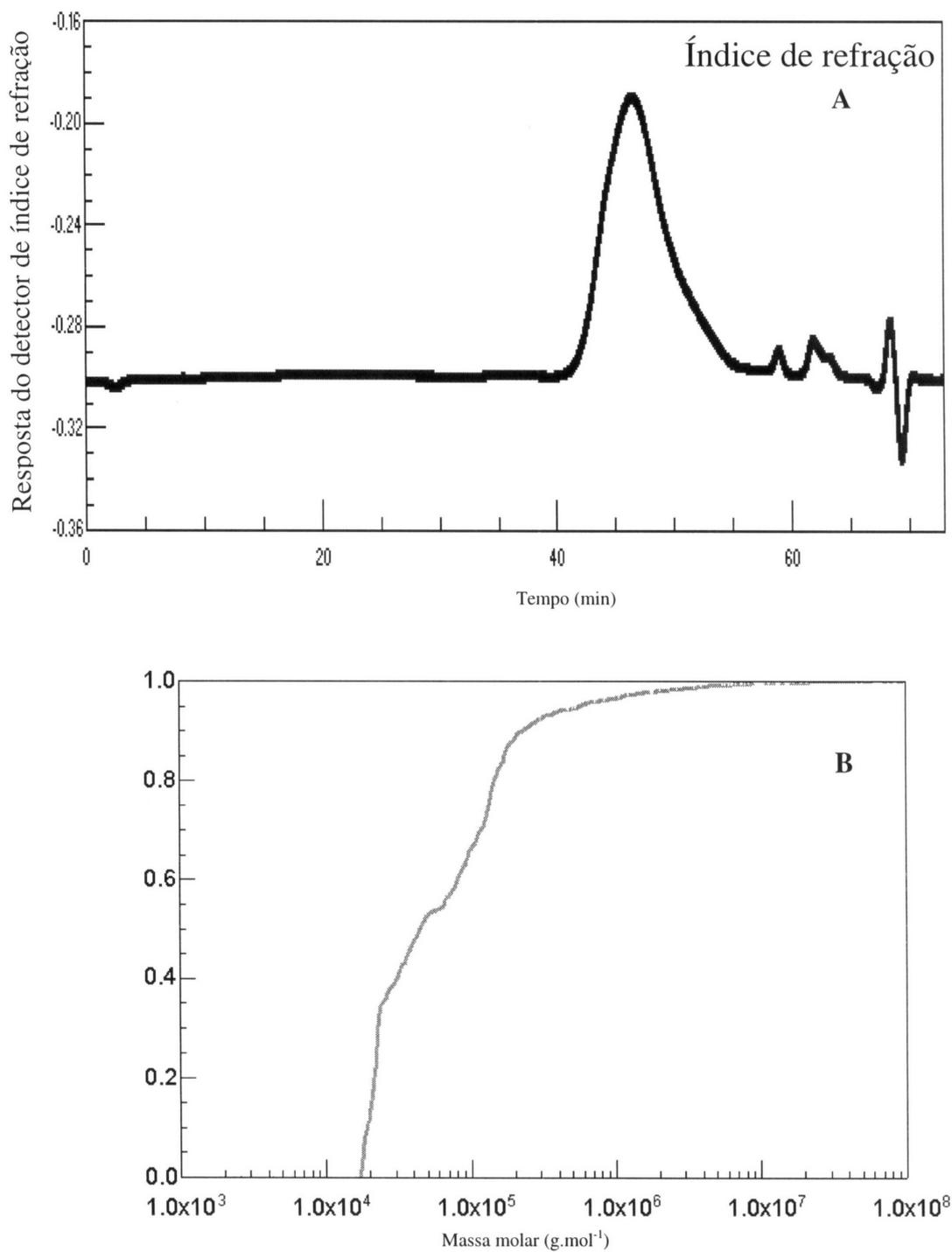


Figura 20: Cromatografia de exclusão estérica, acoplada à multidetecção - espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS) da fração PUF30 (0,5 g.L⁻¹ em nitrito de sódio 0,1 mol.L⁻¹, contendo azida sódica). A) Perfil de detecção por índice de refração. B) Gráfico de massas cumulativas.

A análise de RMN- ^{13}C da fração PUF30 foi realizada, e o resultado encontra-se na Figura 21. A presença de um sinal em δ 102,04 corresponde a unidades de β -Xylp-(1 \rightarrow 4) de cadeia principal, e em δ 101,53 tem-se o indicativo de unidades de β -Xylp-2,4-di-*O*-substituídas. A presença de ácido urônico na fração foi evidenciada pelos sinais em campo baixo correspondentes a carbonila (δ 177,38; 173,47), bem como pelo sinal anomérico em δ 97,93 (que denota configuração α) (LEÓN DE PINTO *et al.*, 1994).

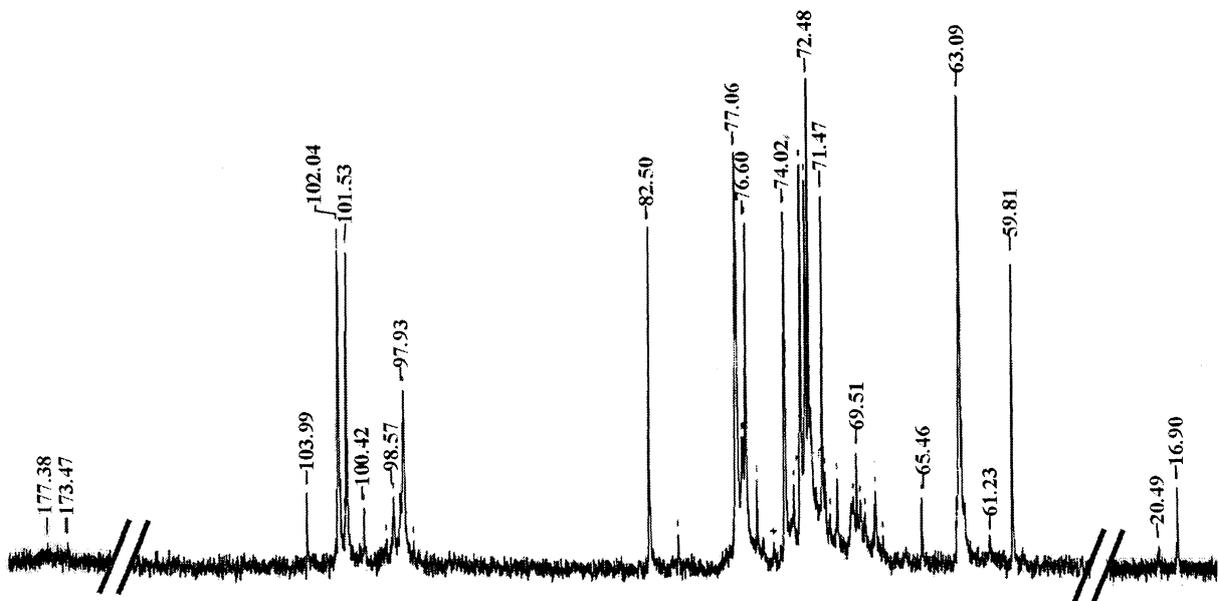


Figura 21: Espectro de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) da fração PUF30 em D_2O (*probe* 5 mm) (70°C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

Na tentativa de obter uma amostra homogênea, a fração PUF30 foi submetida à diálise em sacos de 15 KDa, resultando em um material com massa molar superior a 15 KDa, denominado PUF30R15.

A análise da fração PUF30R15 através de HPSEC-MALLS revelou uma melhora na homogeneidade em relação ao material PUF30, conforme demonstrado pela análise dos perfis de massas cumulativas para ambas frações (Figura 22). Para a fração PUF30R15, é possível observar que praticamente 90% das moléculas apresentam massas molares entre 20 e 30.000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. A alteração na homogeneidade também pôde ser verificada através da determinação da composição monossacarídica (Tabela 7) de PUF30R15, que demonstrou um aumento significativo no percentual de ácido urônico em relação a PUF30.

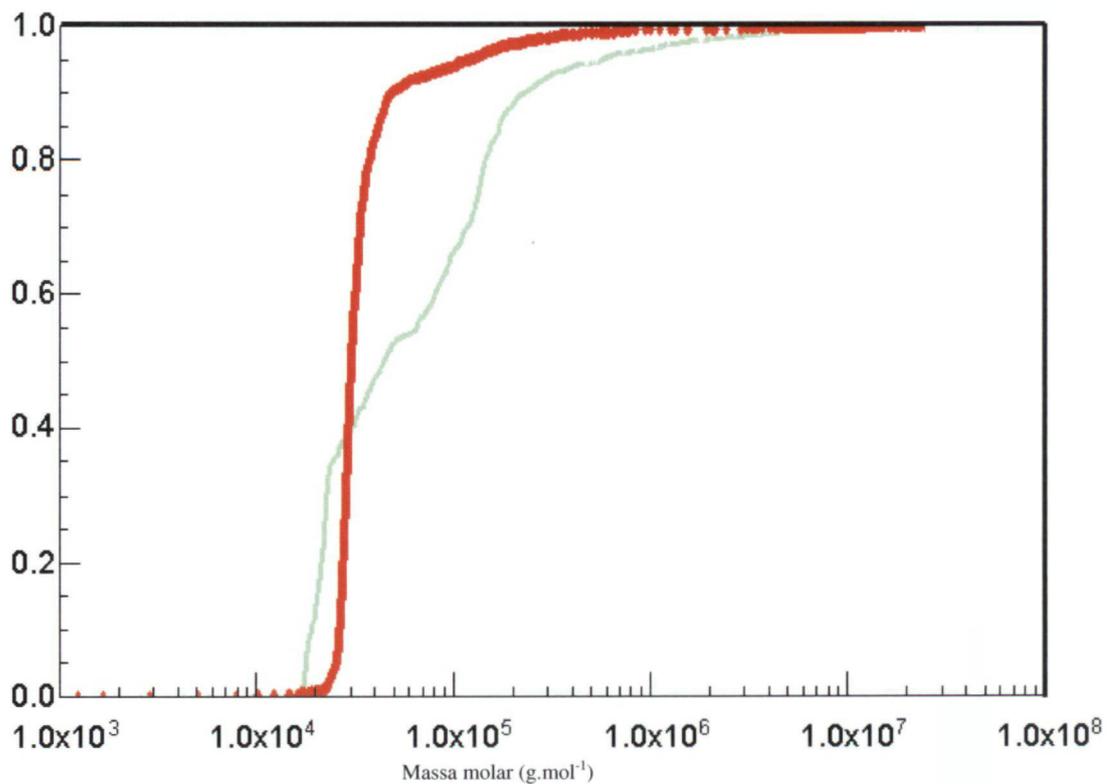


Figura 22: Análise comparativa das massas cumulativas das frações PUF30 (em verde) e PUF30R15 (em vermelho), por HPSEC-MALLS.

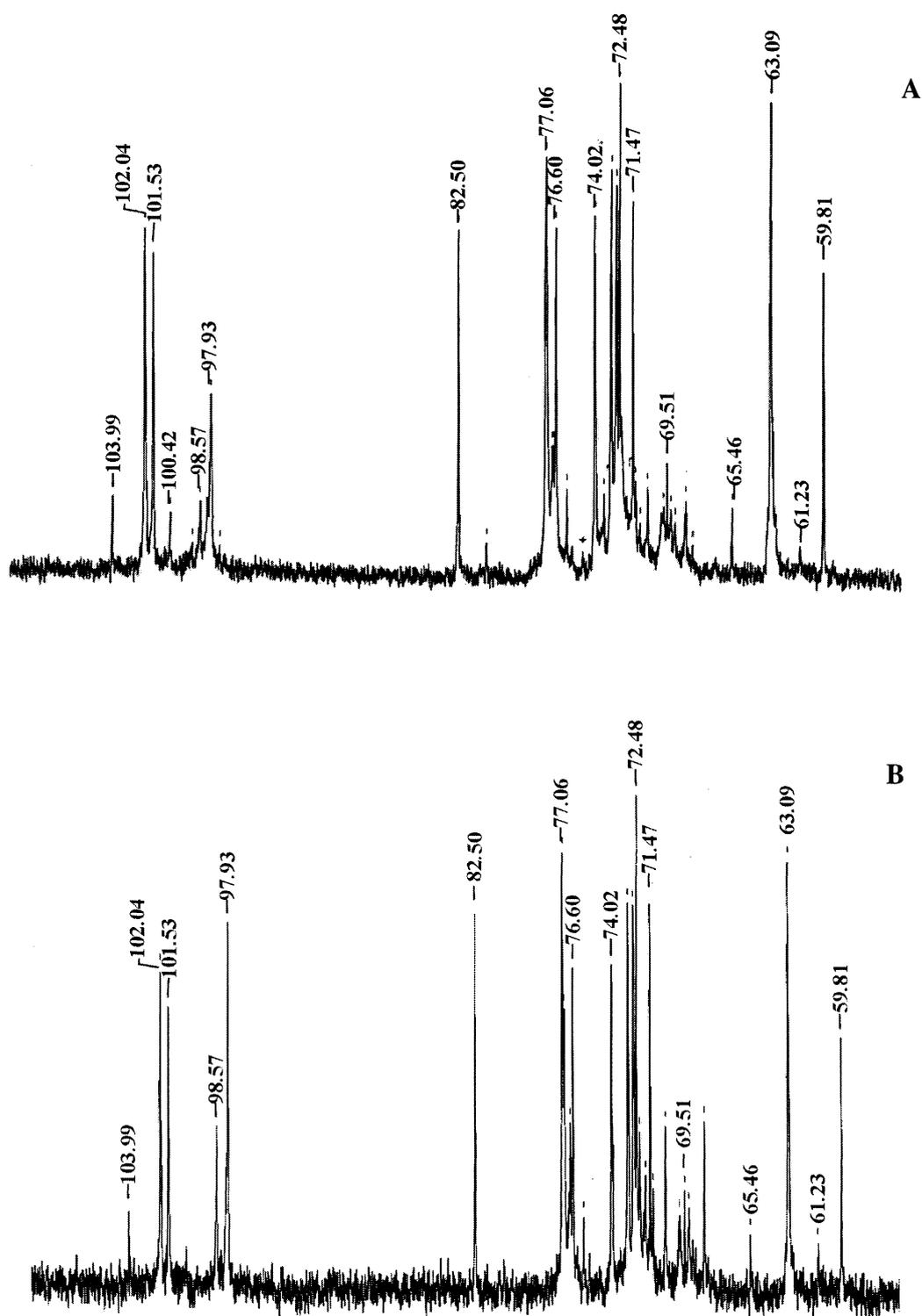


Figura 23: Espectros de RMN- ^{13}C (100,61 MHz) das frações PUF30 (A) e PUF30R15 (B) em D_2O (*probe* 5 mm) (70°C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

Comparando-se os espectros de RMN- ^{13}C das frações PUF30 e PUF30R15 (Figura 23), observou-se para PUF30R15 uma variação na proporcionalidade dos sinais da região anomérica, principalmente no tocante a C-1 de $\alpha\text{-Glc}p\text{A}$ e/ou 4-Me- $\alpha\text{-Glc}p\text{A}$, confirmando os resultados obtidos por HPSEC-MALLS e CG-EM.

O espectro de RMN- ^{13}C -DEPT da fração PUF30R15 (Figura 24) comprovou a existência de CH_2 livre, através da inversão dos sinais em δ 61,23, 63,09 e 65,46. A fração foi então submetida à análise de RMN-HMQC e as correlações entre os ^1H e seus respectivos ^{13}C assinaladas (Figuras 25 e 26).

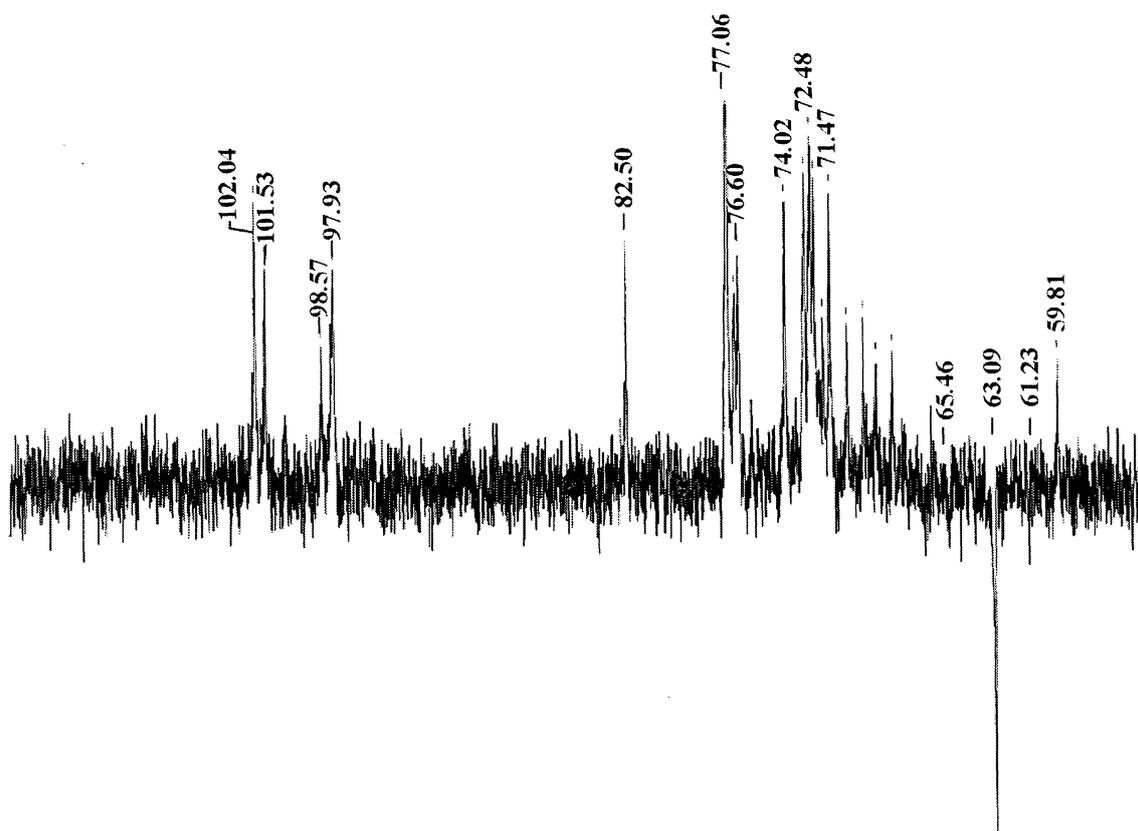


Figura 24: Espectro de RMN- ^{13}C do tipo DEPT135 da fração PUF30R15 em D_2O (probe 5 mm) (70°C). Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

O sinal de ^{13}C em δ 63,09 (Figura 23b/24) pôde ser assinalado como o de C-5 de unidades internas de $\beta\text{-Xyl}p\text{-(1}\rightarrow\text{4)}$ não-substituídas, graças às correlações do espectro de HMQC (Figura 25) entre $\text{H-5}_{\text{ax}}/\text{C-5}$ de xilose em δ 3,40/63,09 e entre

H-5_{eq}/C-5 de xilose em δ 4,13/63,09. A substituição da cadeia principal por α -Glc pA e/ou 4-Me- α -Glc pA no C-2 de Xyl foi associada à correlação em δ 4,59/101,53, enquanto que a correlação anomérica correspondente às unidades de β -Xyl p-(1 \rightarrow 4) não-substituídas encontrava-se em δ 4,45/102,04 (Figura 26). A correlação encontrada em δ 3,23/82,50 foi assinalada como correspondente a H-4/C-4 de 4-Me- α -Glc pA (KARDOSOVA *et al.*, 1998; VIGNON & GEY, 1998; SHATALOV *et al.*, 1999). A presença de acetil foi confirmada pela correlação $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ em δ 1,29/20,49, o que permite supor que o tratamento com solução concentrada de uréia não remove estes grupos.

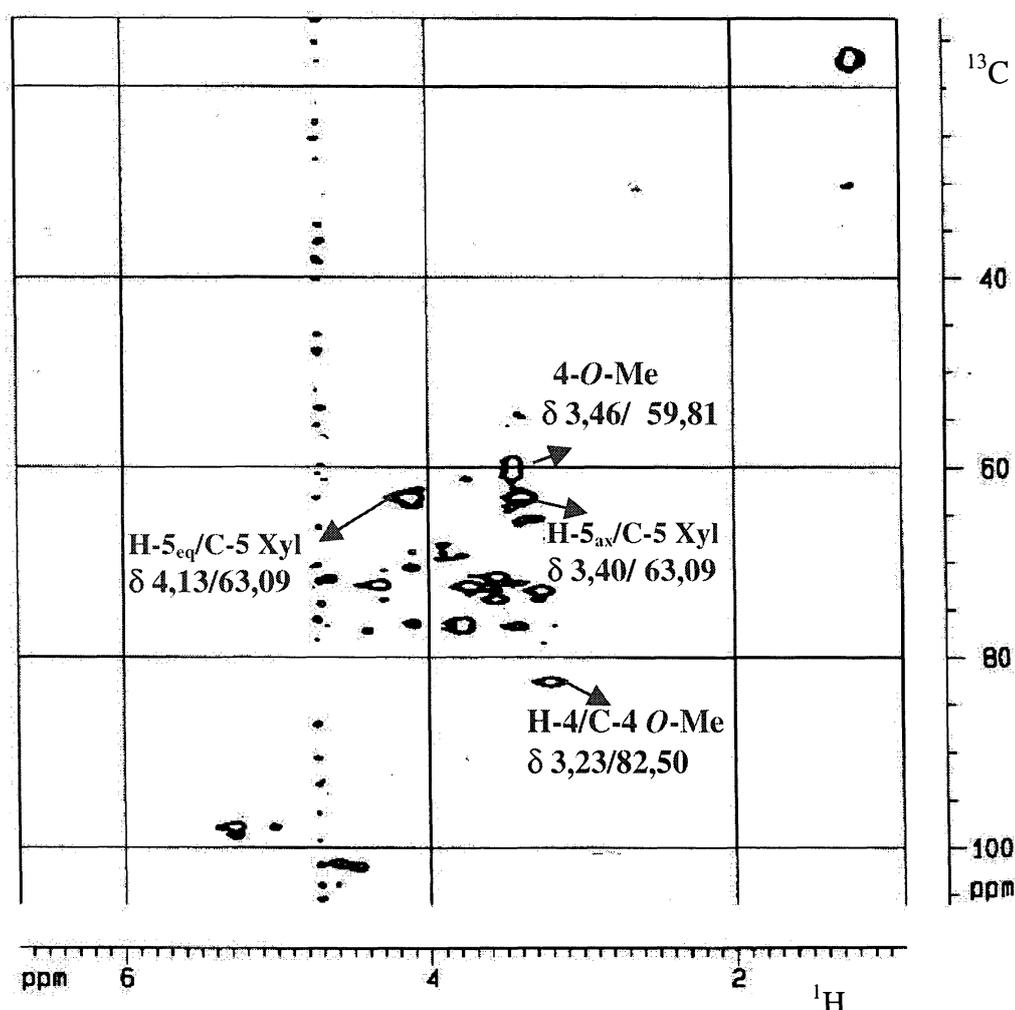


Figura 25: Espectro de ^1H , ^{13}C RMN-HMQC (*heteronuclear multiple-quantum correlation*) da fração PUF30R15 em D_2O . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

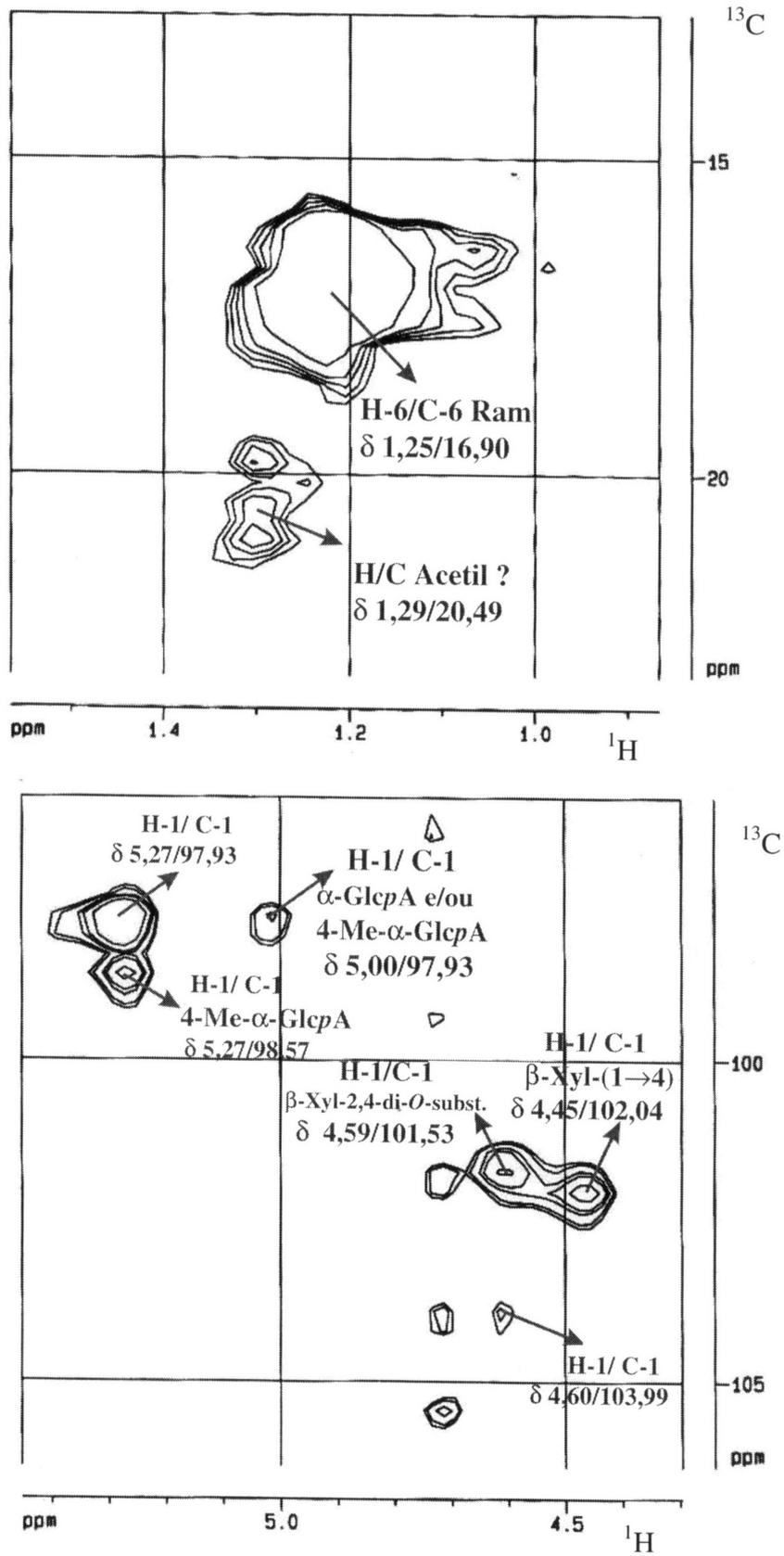


Figura 26: Expansões de regiões do espectro de ^1H , ^{13}C RMN-HMQC (*heteronuclear multiple-quantum correlation*) da fração PUF30R15 em D_2O .

Conforme apresentado nas Figuras 25 e 26, as correlações no espectro de ressonância magnética nuclear bidimensional do tipo HMQC da fração PUF30R15 permitiram evidenciar a presença de uma β -xilana ácida com cadeia principal β -Xylp-(1 \rightarrow 4) e substituição em C-2 por unidades de α -Glc pA e/ou 4-Me- α -Glc pA e parcialmente acetilada, em concordância com o isolado por GORIN *et al.* (1996).

No tocante ao material insolúvel em solução aquosa de uréia 6 mol.L⁻¹ (fração I6U), o mesmo foi submetido à extração com NaOH 4% (2 h, 100°C). Este processo resultou em um extrato alcalino, denominado ExNa, o qual foi fracionado conforme mostrado na Figura 27. Após o congelamento e degelo do extrato ExNa, o sobrenadante deste tratamento (fração ExNaS) foi avaliado quanto a sua homogeneidade molecular por HPSEC-MALLS (Figura 28), mostrando ser uma fração heterogênea. Sendo assim, a fração ExNaS foi submetida a fracionamentos adicionais por ultrafiltração, conforme apresentado no esquema da Figura 29.

As principais frações originadas ret300NaP, NaP30 e NaS30 foram analisadas quanto as suas composições monossacarídicas através de CG-EM e os resultados estão demonstrados na Tabela 8.

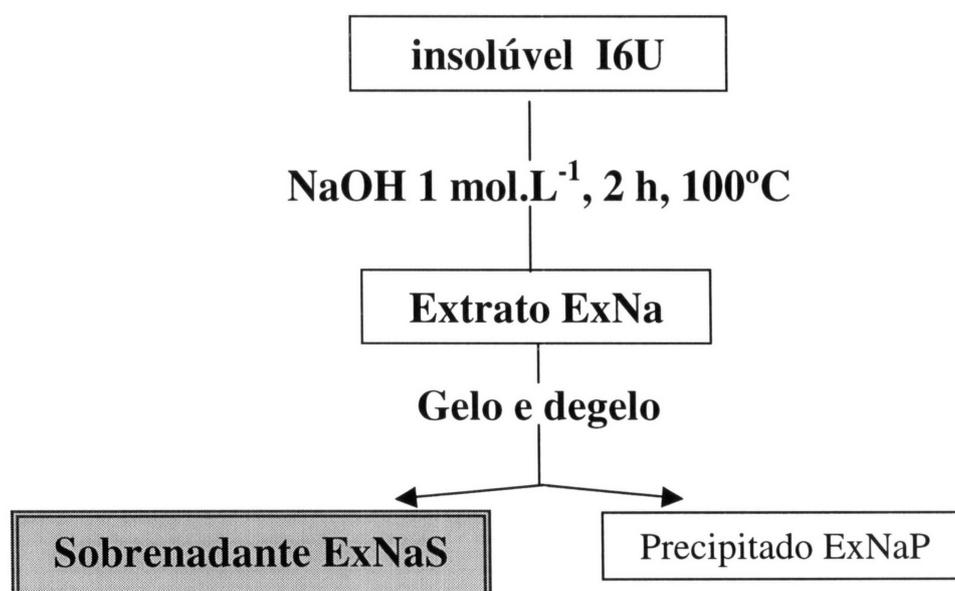


Figura 27: Esquema de fracionamento alcalino da fração insolúvel em uréia (I6U).

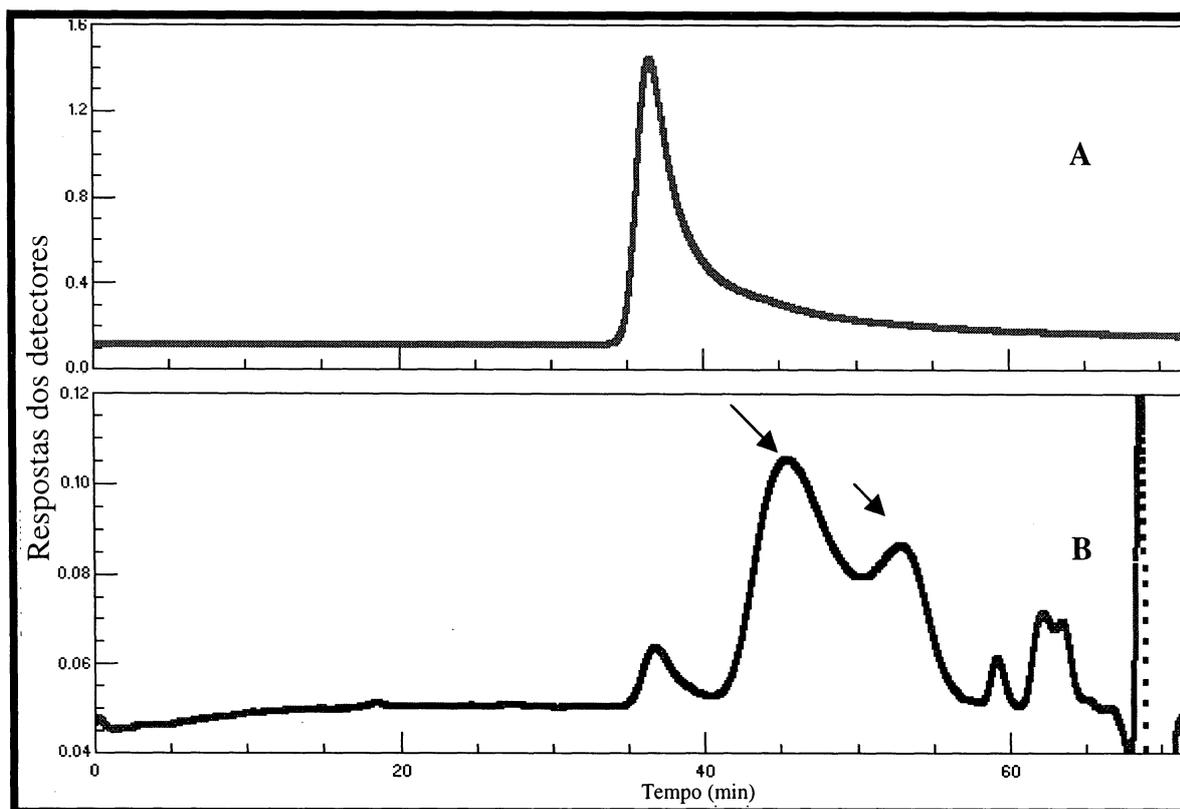


Figura 28: Cromatografia de exclusão estérica, acoplada à multidetecção - espalhamento de luz e índice de refração (HPSEC-MALLS) da fração ExNaS ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$ em nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, contendo azida sódica). A) Perfil de detecção por espalhamento de luz. B) Perfil de detecção por índice de refração.

Muito embora as frações ret300NaP e NaP30 tenham apresentado massas molares distintas ($> 300 \text{ KDa}$ e $< 30 \text{ KDa}$), tendo sido selecionadas respectivamente no material retido na membrana de 300 KDa e no ultrafiltrado por membrana de 30 KDa , suas composições monossacarídicas são muito semelhantes (Tabela 8), o que indica a presença de polímeros com graus diferenciados de polimerização ou agregação molecular.

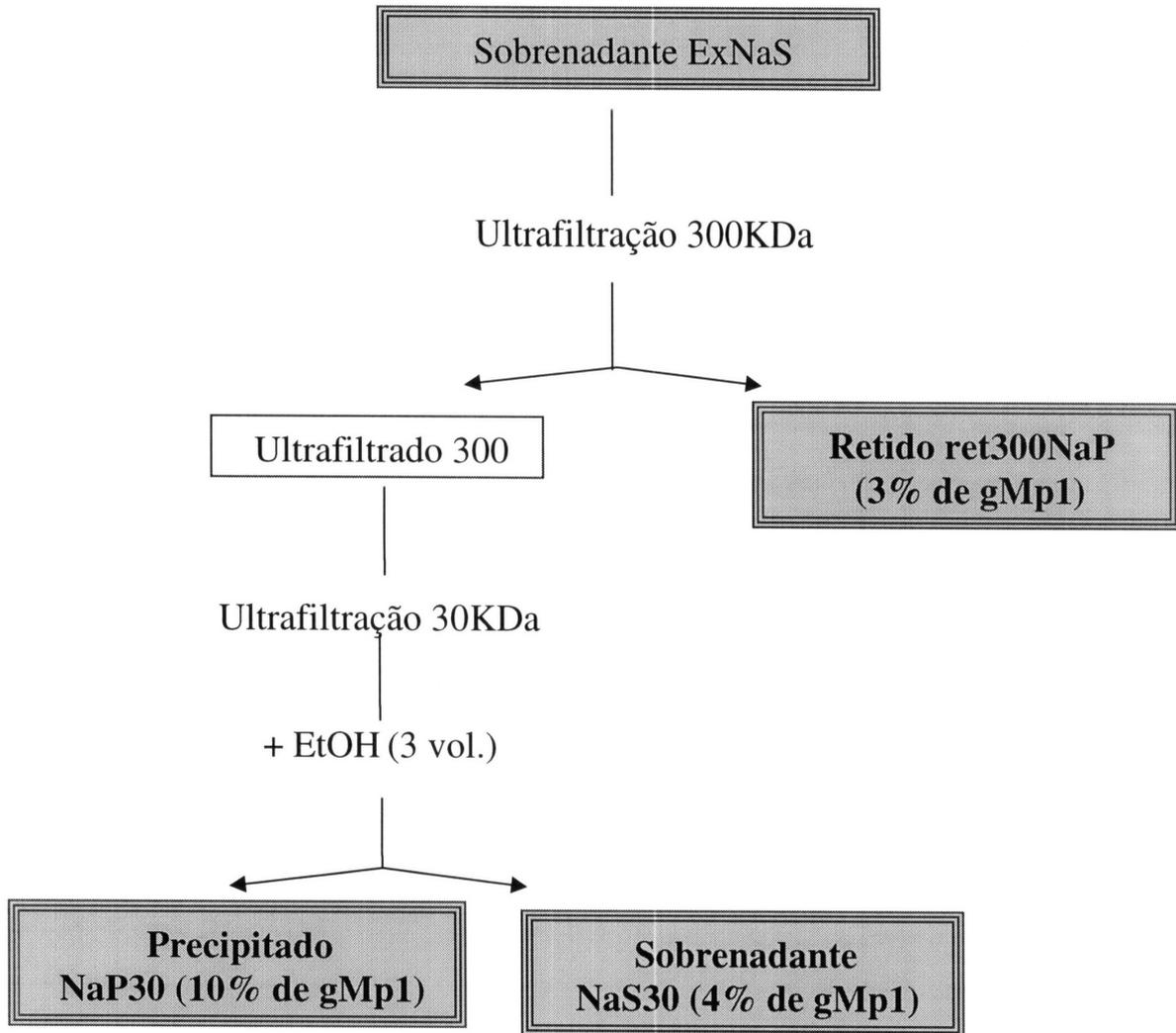


Figura 29: Esquema das ultrafiltrações realizadas partindo-se da fração ExNaS.

Tabela 8: Composições monossacarídicas das frações ret300NaP (maior que 300 KDa), NaP30 (precipitado etanólico da fração ultrafiltrada em membrana de 30 KDa) e NaS30 (sobrenadante etanólico da fração ultrafiltrada em membrana de 30 KDa).

Fração	Rend. (%) ^(a)	Composição monossacarídica (%) ^(b)						
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Äc. Urôn. ^(c)
ret300NaP	3	22	-	44	5	2	8	19
NaP30	10	23	-	45	6	2	7	17
NaS30	4	62	2	9	4	14	6	3

^(a) Baseado na massa de gMp1.

^(b) Determinada por CG-EM após amostras das frações terem sido acetolisadas (20 h, 60°C), desacetiladas, hidrolisadas (8 h, 100°C, TFA 2 mol.L⁻¹), reduzidas e acetiladas.

^(c) As amostras foram hidrolisadas (TFA 2 mol.L⁻¹, 5 h), neutralizadas e dosadas pelo método de FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991).

A Figura 30 apresenta os perfis de homogeneidade molecular das frações ret300NaP e NaP30 em análise por HPSEC-MALLS, que comprovaram serem estas constituídas por polímeros de massas molares distintas.

As frações ret300NaP e NaP30 foram analisadas por espectroscopia de RMN-¹³C e os resultados estão mostrados na Figura 31.

Observou-se, a partir da análise de RMN-¹³C das frações ret300NaP e NaP30 (Figura 31), semelhanças em relação aos sinais encontrados para a fração PUF30R15. Porém, o menor número de carbonos anoméricos para ret300NaP e NaP30 pode ser justificado pelo fato destas terem sido obtidas a partir de tratamento alcalino, o que implica em perda de grupos acetil.

A análise de espectroscopia de RMN-HMQC foi realizada para a fração NaP30 (Figura 32), apresentando semelhanças em relação à fração PUF30R15 (Figuras 25 e

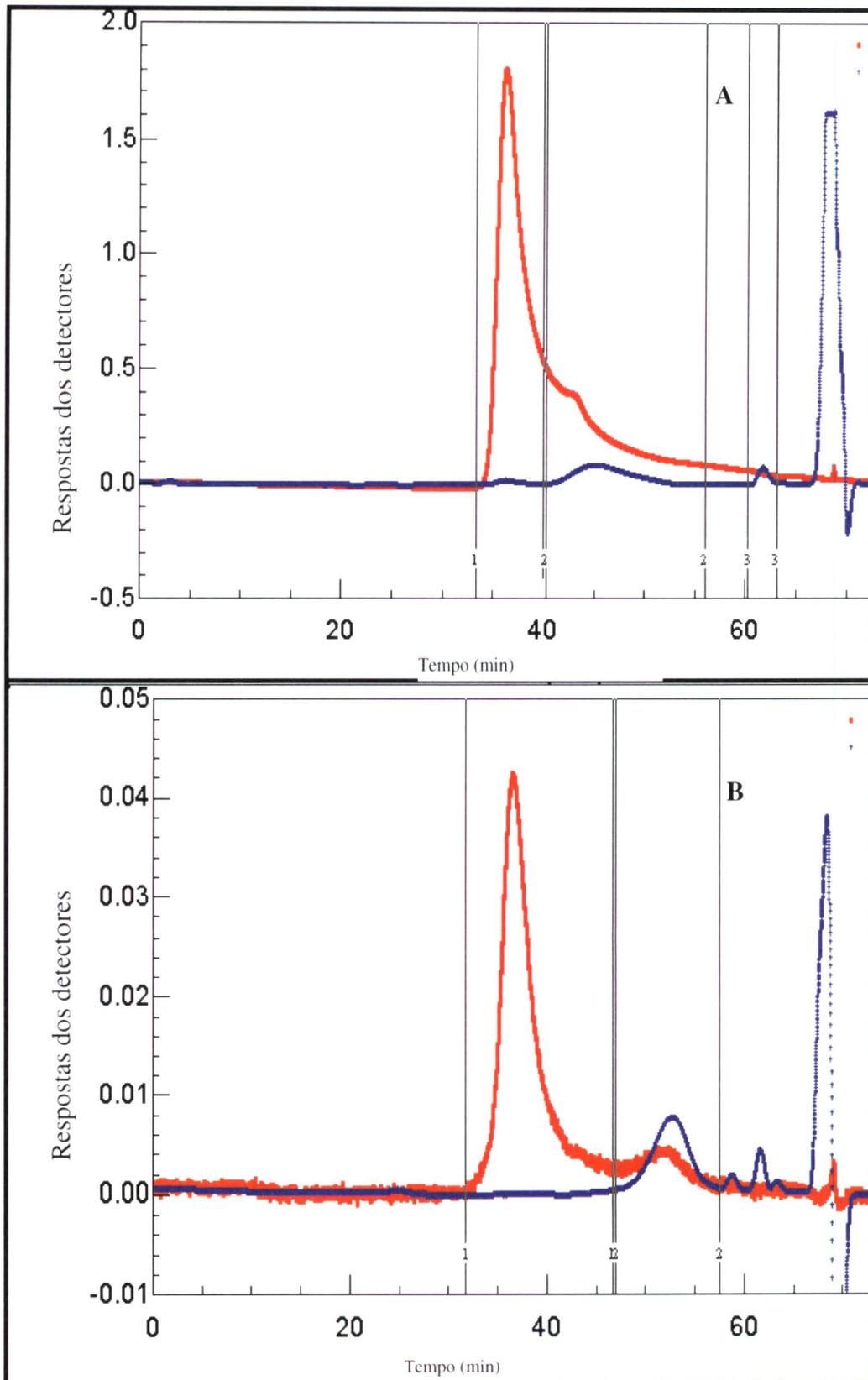


Figura 30: Perfil de eluição da fração ret300NaP (A) e NaP30 (B) em cromatografia de exclusão estérica, acoplada à detecção por espalhamento de luz (em vermelho) e por índice de refração (em azul). Concentração da amostra: $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ em NaNO_2 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo $0,02\%$ de NaN_3 .

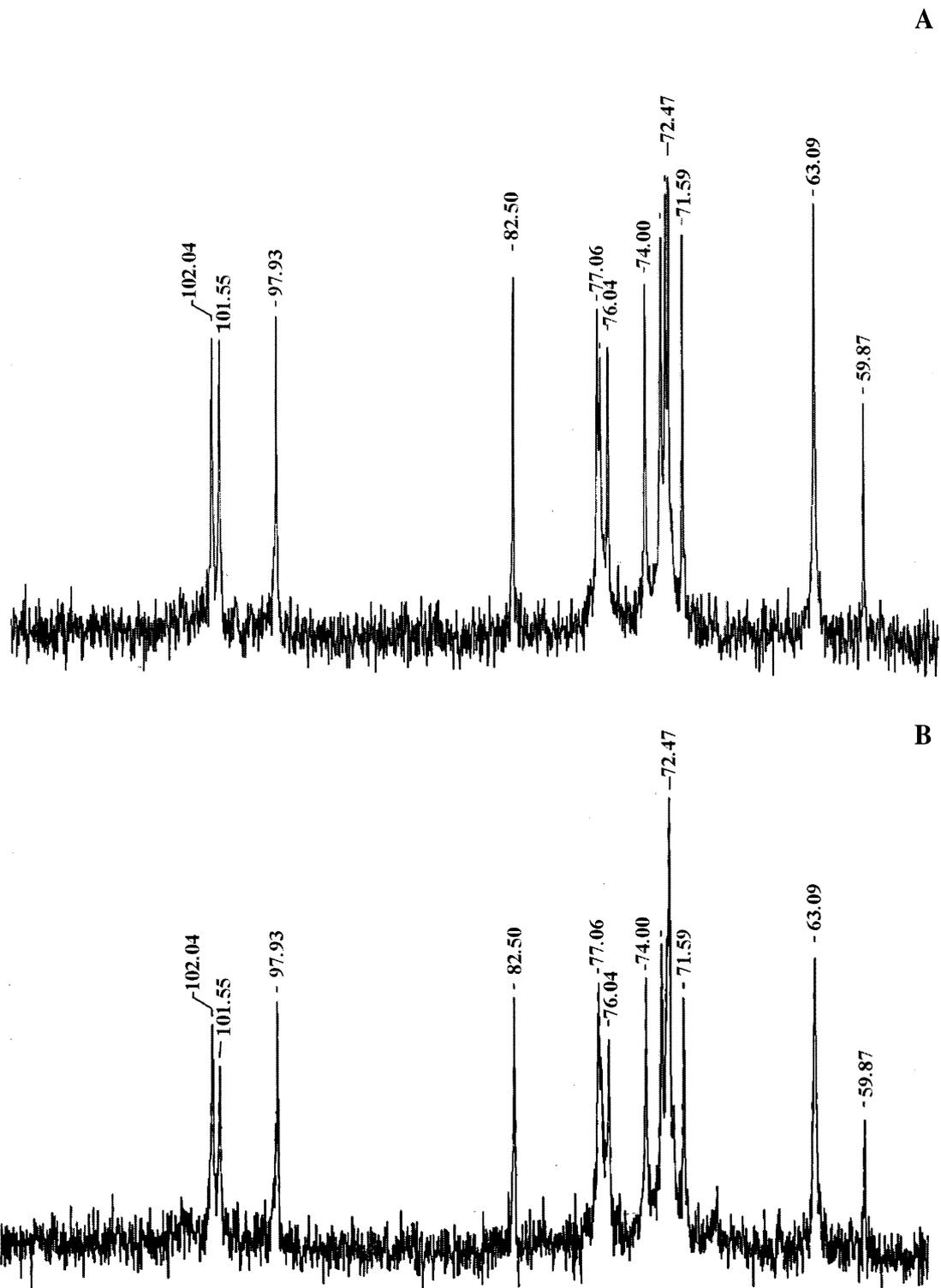


Figura 31: Espectros de RMN- ^{13}C das frações ret300NaP (A) e NaP30 (B) em D_2O . Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

26). Porém, a região anomérica do espectro de HMQC de NaP30 (Figura 32B) continha um número menor de correlações, correspondentes a H-1/C-1 de β -Xylp (1 \rightarrow 4) não-substituída (δ 4,45/102,04), H-1/C-1 de β -Xylp substituída em C-2 por α -Glc pA e/ou 4-Me- α -Glc pA (δ 4,59/101,55) e a H-1/C-1 de α -Glc pA e/ou 4-Me- α -Glc pA (δ 5,26/97,93).

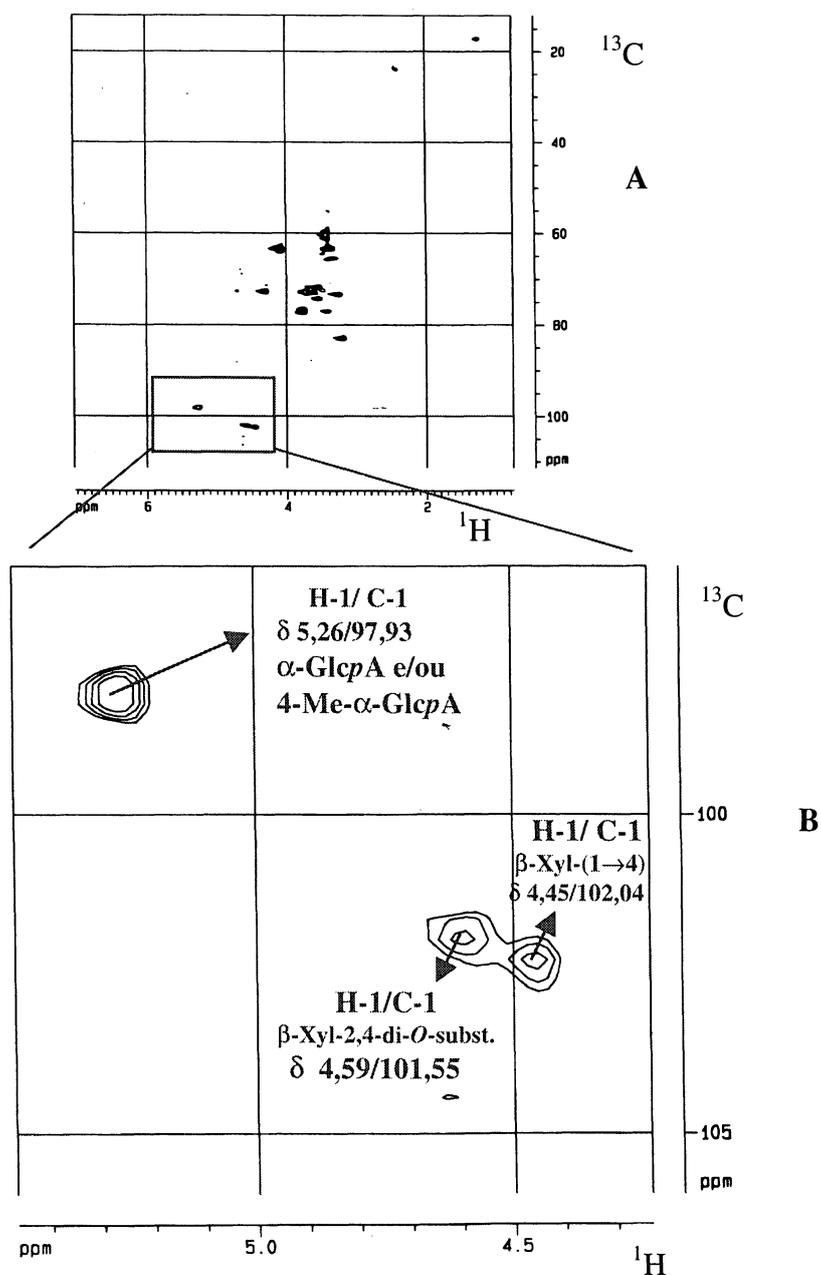


Figura 32: A) Espectro de RMN-HMQC (*heteronuclear multiple-quantum correlation*) da fração NaP30 em D_2O . B) Expansão da região anomérica. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m.

Através dos espectros de COSY e TOCSY foi possível o assinalamento dos prótons correspondentes às unidades de ácido urônico em configuração α , conforme demonstrado através das Figuras 33 e 34. Em relação às unidades de ramnose, o espectro de COSY permitiu o assinalamento de H-2 (δ 3,40) a partir de H-1 (δ 4,59) e dos demais prótons a partir de H-6 (δ 1,26), em conjunto com a análise dos dados de TOCSY. Os assinalamentos correspondentes às unidades de xilose de cadeia principal β -(1 \rightarrow 4) foram também possíveis, utilizando-se a associação dos três recursos bidimensionais apresentados (Figuras 32, 33 e 34). Sobreposições dos sinais anoméricos de ramnose e de xilose 2,4-di-*O*-substituída. As presentes análises de RMN mono- e bidimensionais da fração NaP30 permitiram, portanto, a comprovação da ocorrência de xilanas ácidas no hidrogel de Tingüi.

O sobrenadante etanólico do material ultrafiltrado em membrana de 30 KDa (fração NaS30) apresentou ramnose como principal componente monossacarídico (Tabela 8), sendo distinto das demais frações encontradas neste trabalho.

A análise direta da fração NaS30 por cromatografia em papel revelou a presença de monossacarídeos livres ramnose, xilose e ácido urônico, bem como de oligossacarídeos e de material na origem, correspondente a cadeias de massa molar mais elevada (Figura 35). A presença de monossacarídeos livres em NaS30 foi quantificada após redução com boroidreto de sódio, acetilação e análise através de CG-EM. Os resultados demonstraram em relação à proporção de monossacarídeos neutros, um total de 95% de ramnose e 5% de xilose. A fração NaS30 foi, ainda, submetida à hidrólise, redução e acetilação e apresentou 62% de ramnose, 2% de arabinose, 9% de xilose, 4% de manose, 14% de galactose e 6% de glucose. A determinação de ácido urônico para a fração resultou em 3% de ácido urônico. Estudos futuros serão necessários para se determinar a estrutura química dos oligossacarídeos presentes nesta fração, permitindo talvez uma correlação com as estruturas dos polímeros de gMp1.

Os assinalamentos presentes nos espectros de RMN em solução obtidos para as principais frações de gMp1 estão apresentados como anexo (p. 115).

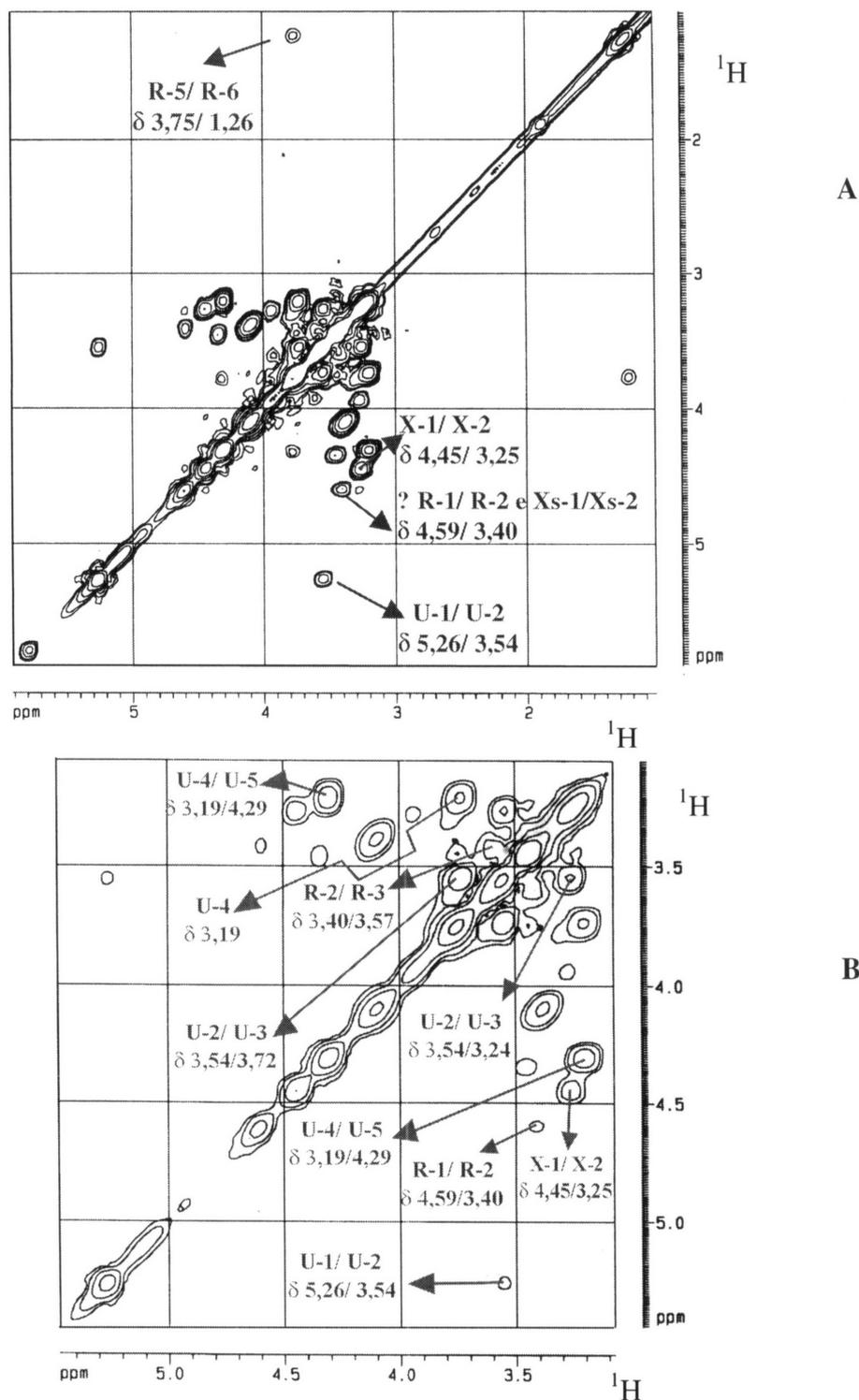


Figura 33: A) Espectro de RMN-COSY (*correlation spectroscopy*) da fração NaP30 em D₂O. B) Expansão da região anomérica. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m. R-1, U-1, X-1, Xs-1 referem-se respectivamente a H-1 de ramnose, H-1 de ácido urônico, H-1 de xilose de cadeia principal e H-1 de xilose 2,4-di-*O*-substituída e assim sucessivamente para os demais prótons.

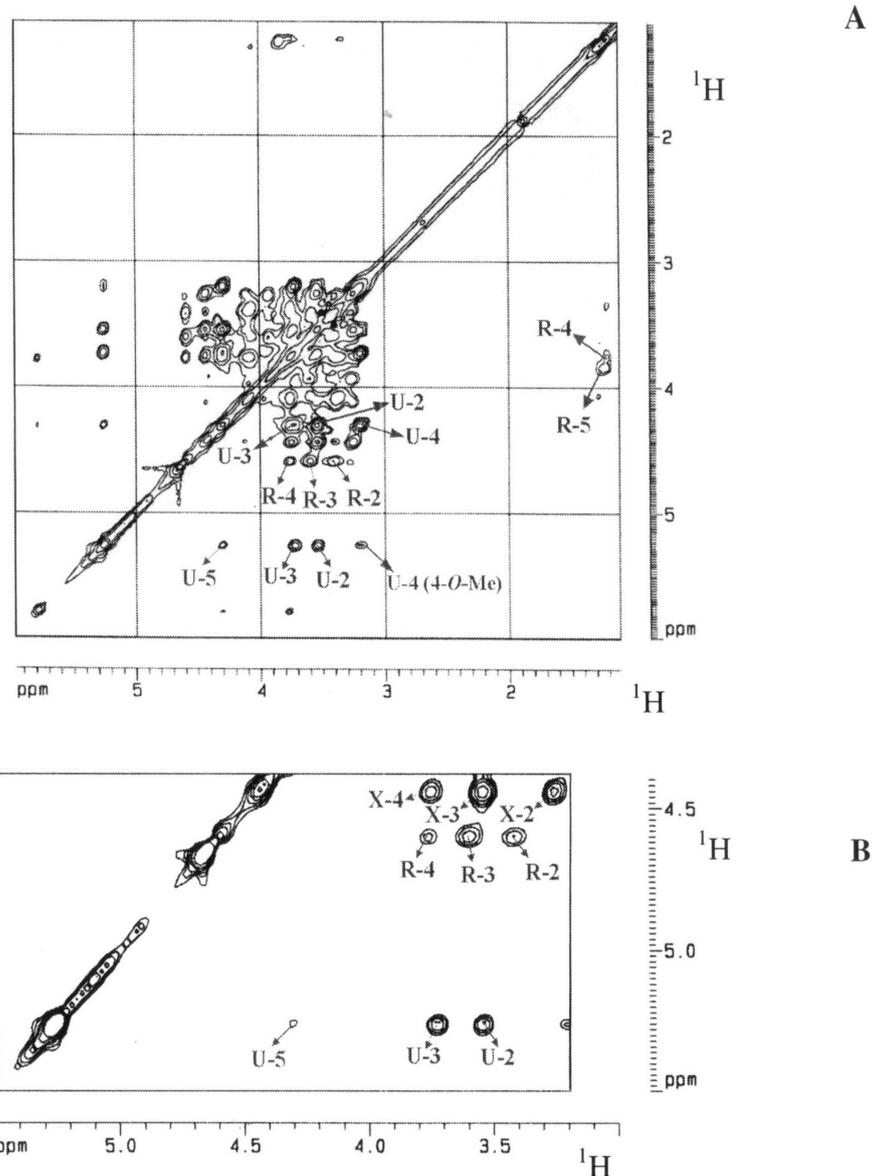


Figura 34: A) Espectro de RMN-TOCSY (*total correlation spectroscopy*) da fração NaP30 em D_2O . B) Expansão da região anomérica. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m. Os deslocamentos químicos são expressos em δ p.p.m. R-1, U-1, X-1, Xs-1 referem-se respectivamente a H-1 de ramnose, H-1 de ácido urônico, H-1 de xilose de cadeia principal e H-1 de xilose 2,4-di-*O*-substituída e assim sucessivamente para os demais prótons.

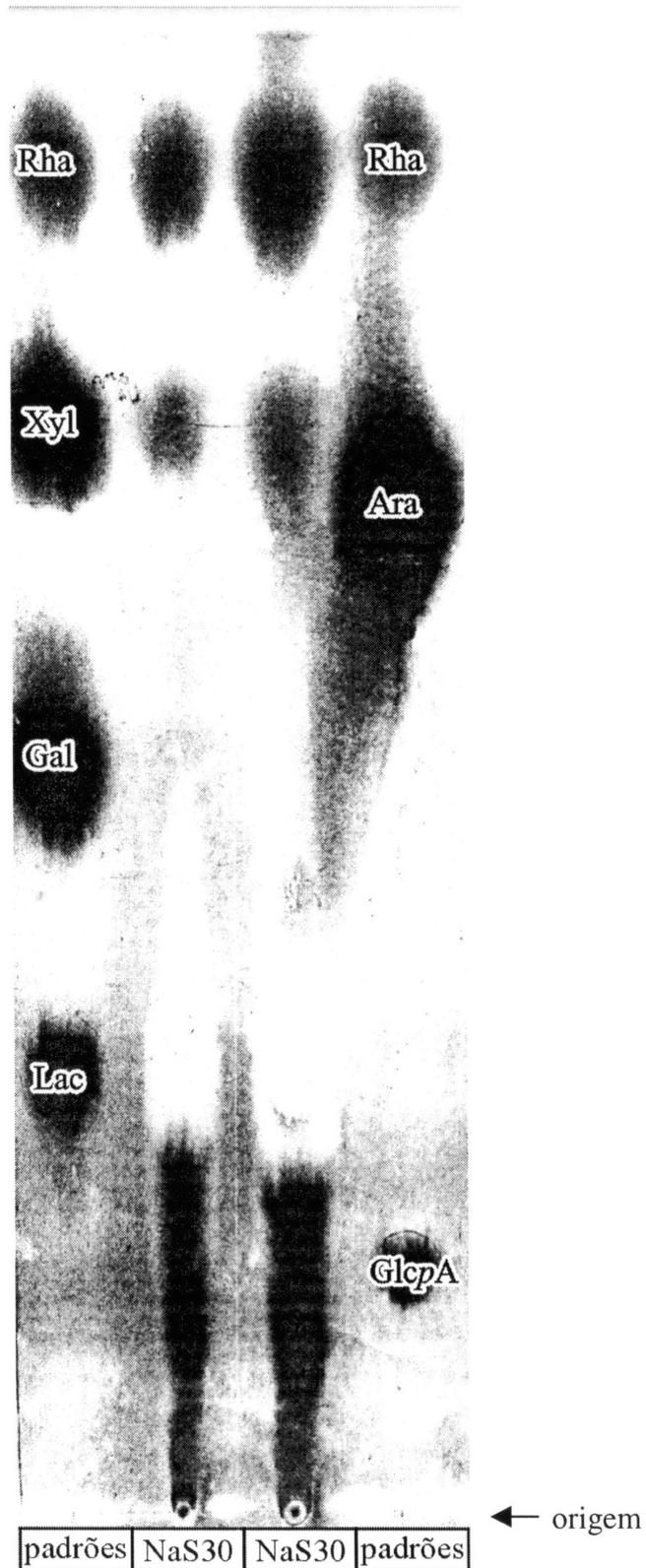


Figura 35: Perfil cromatográfico da fração NaS30 em cromatografia em papel, comparado com padrões, conforme indicado na Figura. O solvente utilizado foi *n*-butanol:piridina:água (5:3:3 v/v). Tempo de corrida 24 h. Revelador: nitrato de prata alcalino.

Os espectros de RMN em solução obtidos para as frações produzidas a partir da segunda região apresentam-se concordantes com o espectro de RMN desta em estado sólido (Figura 13B). A distinção parece estar no sinal referente à celulose cristalina, em δ 88,7, presente no espectro de RMN em estado sólido da 2ª região (Figura 13B), porém ausente nas frações derivadas de gMp1 (Figuras 15, 23 e 31). Estes dados, em conjunto com as colorações da 2ª região com calcoflúor (Figura 12C,D) e com a composição monossacarídica da fração FIBR (Tabela 5), sugerem fortemente a presença de material de natureza celulósica na 2ª região, removido por meio de centrifugação (na forma de fração FIBR), não sendo, portanto detectado em gMp1 ou demais frações derivadas da segunda camada.

4.5 ANÁLISES REOLÓGICAS DA FRAÇÃO gMp1

Considerando-se, portanto, o maior rendimento da fração gMp1 em relação ao hidrogel original, bem como o fato desta estar provavelmente envolvida na propriedade de termoestabilidade a 100°C do mesmo, citada por GORIN *et al.* (1996), a fração gMp1 foi escolhida para as análises reológicas subsequentes.

A caracterização das propriedades reológicas de gMp1 é interessante, mesmo não sendo esta uma fração homogênea em termos moleculares, considerando-se que a busca de novos materiais com possibilidades de aplicação industrial parece ser constante, não importando se os mesmos consistem em polímeros isolados ou misturas sinérgicas. Um exemplo característico do uso de misturas de carboidratos é o uso da mucilagem de sementes de *Cydonia oblonga*, uma associação de 4-*O*-Me-glucuronoxilana ramificada e parcialmente acetilada com microfibrilas celulósicas (LINDBERG *et al.*, 1990), na indústria alimentícia em confeitos, graças a sua habilidade de alterar as propriedades destes sistemas (SANDFORD & BAIRD, 1983).

A seguir encontram-se descritos os resultados das análises reológicas da fração gMp1 realizadas sob condições estáticas e dinâmicas a fim de caracterizar suas propriedades em água e em solução aquosa de cloreto de lítio 0,1 mol.L⁻¹. A escolha

do solvente $\text{LiCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi feita, uma vez que não foi possível a obtenção de amostras homogêneas em soluções de NaCl em diferentes concentrações e tempos de homogeneização. Provavelmente, este fato pode ser explicado considerando-se o raio menor do íon lítio, o que permitiu sua penetração eficiente na rede do gel.

4.5.1 Avaliação do Comportamento de Fluxo da Fração gMp1

As curvas de viscosidade da fração gMp1 nas concentrações e solventes estados, estão mostradas na Figura 36.

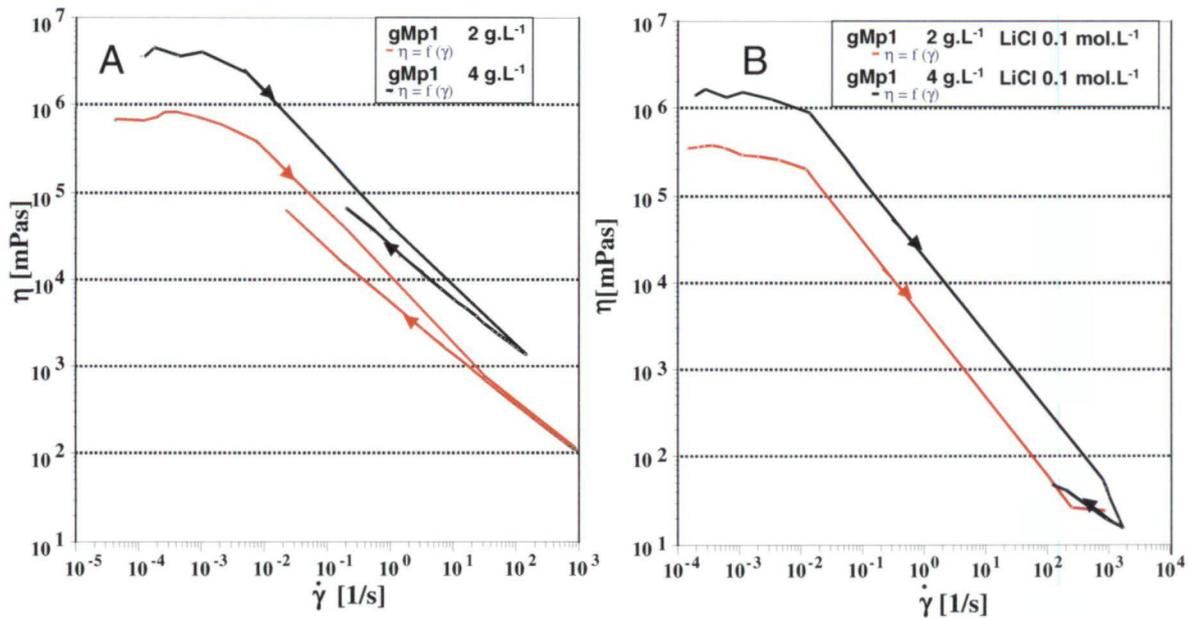


Figura 36: Reogramas da viscosidade absoluta (η) versus taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) da fração gMp1, em água Milli-Q (A) e em $\text{LiCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (B), nas concentrações de 2 (curvas em vermelho) e 4 g.L^{-1} (curvas em preto), a 25°C .

Em ambas as concentrações (2 e 4 g.L^{-1}) do material seja em água Milli-Q ou em $\text{LiCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, observou-se comportamento pseudoplástico, uma vez que seus

valores de viscosidade absoluta diminuem à medida que a taxa de cisalhamento aumenta.

O primeiro platô Newtoniano foi observado para todas as condições de análise em baixas taxas de cisalhamento, demonstrando a alta viscosidade do material em tais condições. Este dado é importante por sugerir o comportamento do material em situações próximas ao repouso. Não foi possível, porém, a visualização do segundo platô Newtoniano dentro da faixa de cisalhamento analisada.

A fração gMp1 preparada em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ apresentou valores menores de viscosidade absoluta em ambas as concentrações analisadas, quando comparado às soluções apenas em água. Isso era esperado uma vez que a amostra contém ácido urônico em sua composição sendo considerada um polieletrólito. A presença de LiCl na dispersão de carboidratos parece diminuir o efeito de repulsão entre as cargas das cadeias dos poliânions pela blindagem exercida pelos íons do sal, ocorrendo assim a neutralização do poliânion (DAMASKIN & PETRI, 1981; WALTER, 1998). Portanto, o poliânion que em água é mais rígido, relaxa tal rigidez em presença de cátions, por ocorrer a blindagem dos sítios carregados de sua molécula, permitindo que a cadeia primária adquira uma conformação mais flexível (WALTER, 1998).

Em relação às amostras em água, após as mesmas terem sido submetidas a altas taxas de cisalhamento, verificou-se que a curva de viscosidade resultante da redução da taxa de cisalhamento (sentido de retorno) apresentou diminuição dos valores de viscosidade absoluta em comparação aos obtidos no processo envolvendo aplicação de índices crescentes. Este resultado pode ser referido como uma característica tixotrópica do material, ou seja, a dependência temporal da viscosidade absoluta devido aos processos de associação-dissociação que ocorrem no mesmo durante o cisalhamento.

A área entre as linhas de aumento e diminuição de cisalhamento” permite calcular a histerese do material, sendo possível afirmar que a fração gMp1 não recupera instantaneamente sua viscosidade absoluta, após ter sido submetida a altas tensões de cisalhamento.

Entretanto, observou-se que quando a taxa de cisalhamento era reduzida a zero e os materiais, após 3 min de repouso, eram submetidos a novo ciclo de cisalhamento, ocorria a sobreposição deste com o primeiro ciclo. Tal resultado revela que a reestruturação das interações que compõem a rede molecular de gMp1 em água ocorre rapidamente após o cisalhamento e seu restabelecimento é completo. Sendo assim, o material é não Newtoniano e dependente do tempo, o que o enquadra como um fluido tixotrópico.

Não foi possível a visualização destes eventos para as amostras de gMp1 em LiCl 0,1 mol.L⁻¹, devido às limitações técnicas do sensor empregado.

A Figura 37 mostra as análises de gMp1 em água e solução de cloreto de lítio, plotando-se os valores de tensão de cisalhamento em função de taxa de cisalhamento, obtendo-se então as curvas de fluxo. Os perfis sugerem que as propriedades de *yield-stress* das soluções resultam do alinhamento e associação das moléculas de carboidrato. É possível que interações cooperativas estejam ocorrendo, formando um gel físico, que precisa de uma tensão inicial (τ_0) para iniciar o escoamento. Isto significa que, quando submetido a uma tensão de até τ_0 , o material se comporta como um sólido e em valores superiores se comporta como um fluido. Novamente, pode-se observar que em água há necessidade de se aplicar uma tensão de cisalhamento maior que em solução de LiCl 0,1 mol.L⁻¹. O caráter inicial de sólido da fração gMp1 é, portanto, mais acentuado quando a mesma é preparada exclusivamente em água.

4.5.2 Análise do Comportamento Dinâmico da Fração gMp1

4.5.2.1 Varreduras de frequência

O efeito da variação de frequência sobre os módulos de perda (G'') e de estocagem (G') para a fração gMp1 nas concentrações e condições de solvente descritas na seção Materiais e Métodos foi analisado (Figura 38).

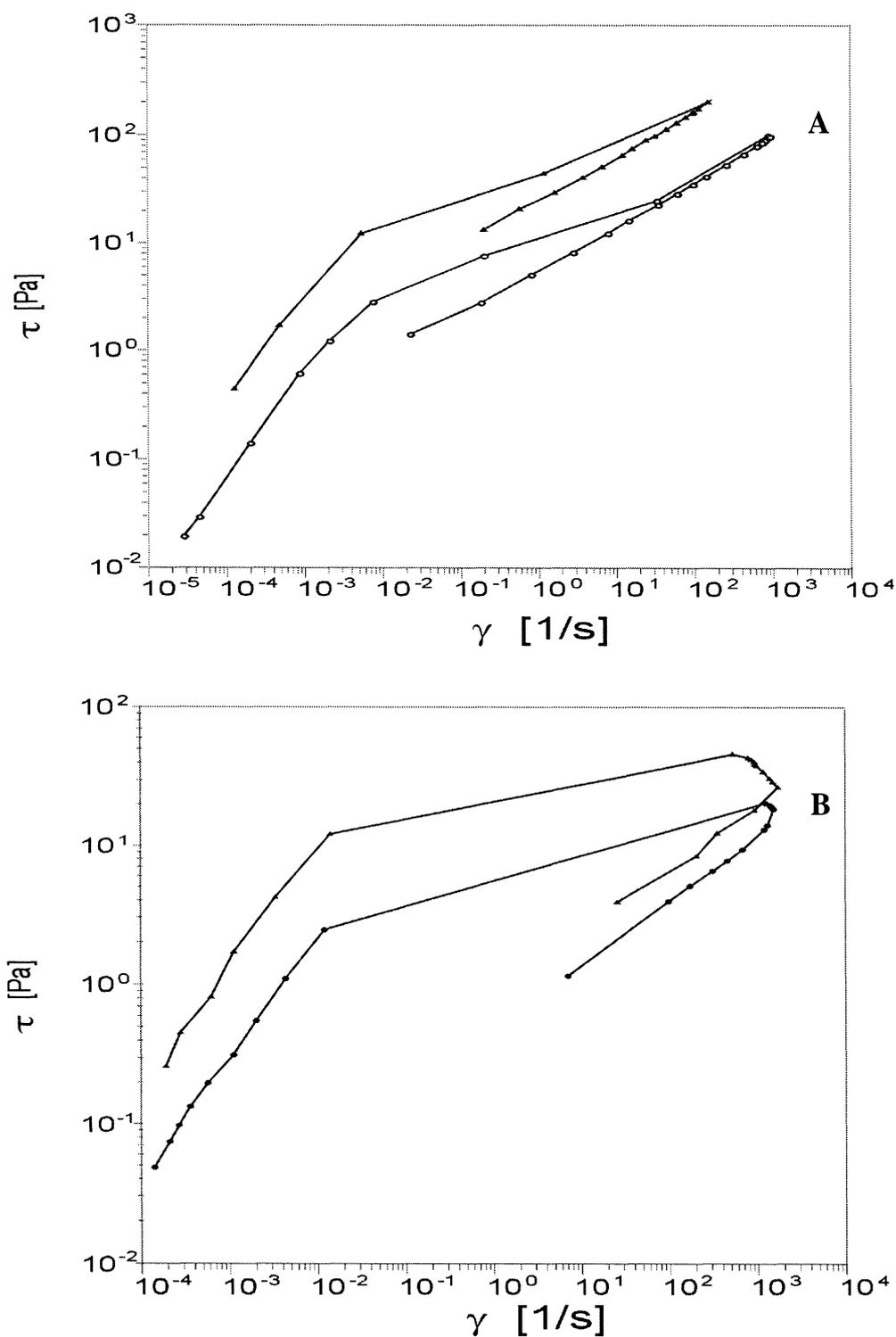


Figura 37: Variação da tensão de cisalhamento (τ) versus taxa de cisalhamento (γ) da fração gMp1 a 25°C. A) gMp1 em água Milli-Q: triângulos fechados = concentração de 4 g.L⁻¹; círculos abertos = 2 g.L⁻¹. B) gMp1 em LiCl 0,1 mol.L⁻¹: triângulos fechados = concentração de 4 g.L⁻¹; círculos fechados = 2 g.L⁻¹.

Nestes experimentos, as medidas oscilatórias foram realizadas dentro da região viscoelástica linear, onde os módulos G' e G'' são independentes da amplitude de deformação. A deformação usada para o regime viscoelástico correspondeu a 1% e está em concordância com a faixa de valores empregada em análises reológicas de polissacarídeos (entre 1 e 10%) (RIDOUT *et al.*, 1998; SHORSCH *et al.*, 1997).

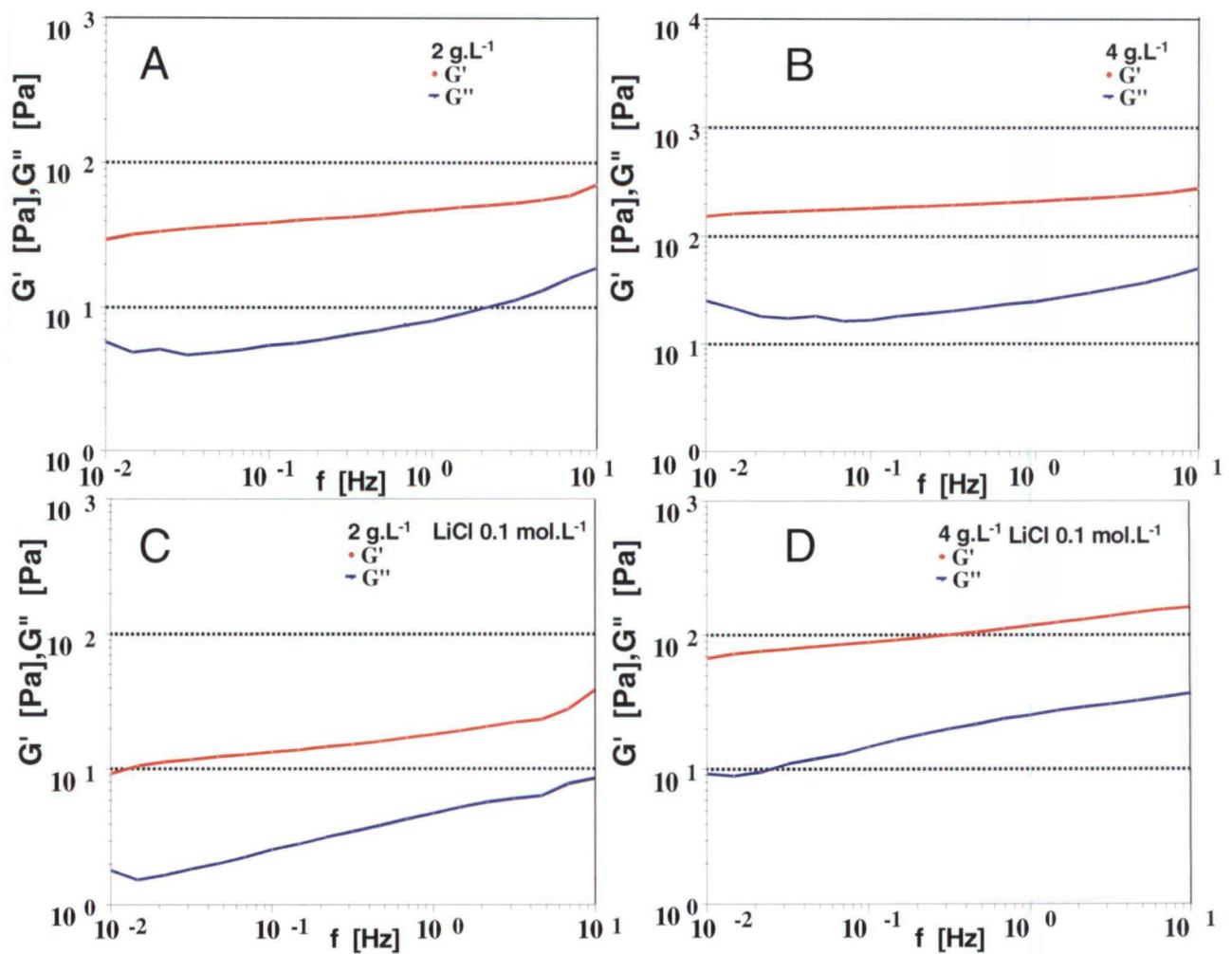


Figura 38: Módulos de estocagem (G') e de perda (G'') em função da variação de frequência para a fração gMp1 em água, nas concentrações de 2 g.L⁻¹ (A) e 4 g.L⁻¹ (B), e em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ nas mesmas concentrações (respectivamente C e D), em temperatura de 25°C.

Avaliando os módulos de cisalhamento G' e G'' , nos espectros mecânicos da Figura 38, observou-se para ambas as concentrações e solventes um comportamento de gel forte, pois, em uma ampla faixa de frequência, o módulo de estocagem (G'), uma medida da energia de deformação armazenada, é maior que o módulo de perda G'' (energia dissipada durante o fluxo) (LAPASIN & PRICL, 1995), sendo os módulos praticamente paralelos na faixa de frequência analisada.

A força dos géis preparados pôde ser comparada, nos reogramas da Figura 38, também através da observação do parâmetro $\tan \theta (= G''/G')$ em uma determinada frequência. Quanto menor o valor da $\tan \theta$, maior a força da rede do gel. Para a frequência de 1 Hz, os valores de $\tan \theta$ da fração gMp1 em água, nas concentrações de 2 g.L⁻¹ e 4 g.L⁻¹ foram, respectivamente, 0,2 e 0,1, o que corresponde a valores de G' de 5,6 e 10 vezes maiores que G'' . Já para a fração gMp1 em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ nas mesmas concentrações, os valores de G' foram, respectivamente, 4 e 5 vezes maiores que G'' .

Esta análise demonstra que os géis mais fortes são obtidos quando a fração gMp1 é preparada em água, uma vez que seus valores de G' e G'' apresentam-se maiores do que para as amostras em soluções aquosas de cloreto de lítio, em concordância com os maiores valores de viscosidade (η) observados nos estudos em sistema estático para o primeiro solvente.

4.5.2.2 Influência da temperatura

A exposição de sistemas poliméricos a altas temperaturas por períodos de tempo longos pode gerar mudanças em sua estrutura molecular. Estas alterações, em princípio, podem não ser evidentes, entretanto, em termos de busca de novos materiais é importante sua caracterização prévia ao processamento dos mesmos, permitindo otimizar sua utilização. Testes reológicos oscilatórios são sensíveis a tais mudanças estruturais internas sendo, portanto, ideais para estudos acerca de termo-susceptibilidade de materiais.

Dentro desta concepção, o efeito da temperatura sobre o comportamento viscoelástico dinâmico linear de gMp1 foi avaliado dentro da faixa de 5 a 95°C, permitindo o estudo da termoestabilidade que foi sugerida por GORIN *et al.* (1996) como uma propriedade para o hidrogel original.

Nos experimentos cujos resultados estão mostrados na Figura 39, as medidas dos parâmetros mecânicos foram realizadas durante o aquecimento e resfriamento, a fim de verificar a ocorrência de transição conformacional e/ou fusão.

A fração gMp1 nas concentrações testadas de 2 g.L⁻¹ e 4 g.L⁻¹, apresentou grande estabilidade térmica, conforme demonstrado através da avaliação dos valores dos módulos G' e G'', na faixa de temperatura estudada (Figura 39). Os perfis dos módulos durante o aquecimento e resfriamento apresentaram valores semelhantes.

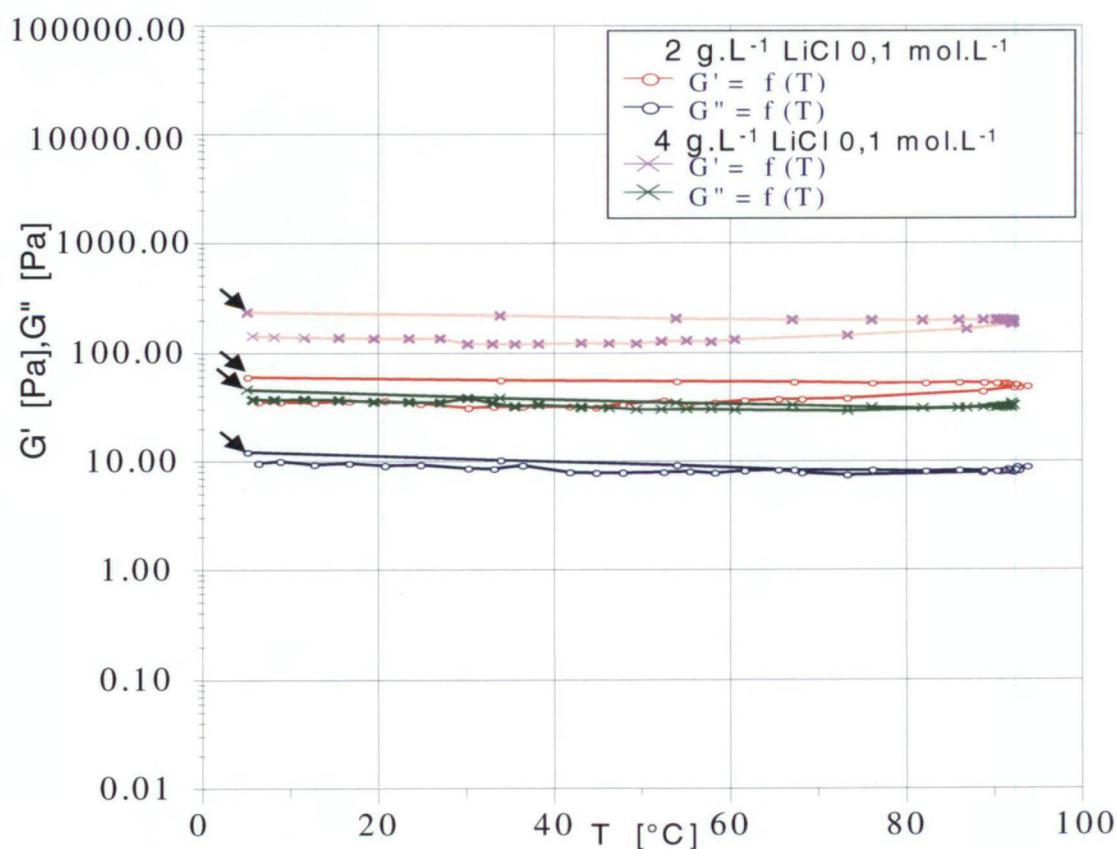


Figura 39: Reogramas em sistema dinâmico dos módulos de estocagem (G') e de perda (G'') em função da variação de temperatura aplicada (aquecimento e resfriamento) à fração gMp1 nas concentrações de 2 e 4 g.L⁻¹ em LiCl 0,1 mol.L⁻¹. As curvas assinaladas com setas correspondem aos perfis de resfriamento.

Durante o processo de aquecimento, os valores de G' e G'' mantiveram-se constantes, sofrendo leves alterações durante o resfriamento, tendo sido observados valores um pouco maiores de G' e G'' em relação aos apresentados no aquecimento, provavelmente devido à formação de zonas de junção adicionais na rede. Estes resultados sugerem que o aquecimento não gera fusão nem degradação ou transição conformacional do material, não afetando, portanto, significativamente seu comportamento de gel. Esta propriedade foi também verificada para gMp1 em água. Não sendo observada fusão para o material gMp1 nas condições estudadas, esta característica pode ser de grande interesse industrial, visto que alguns produtos alimentícios requerem redes de gel estáveis ao aquecimento (ex.: para produtos submetidos a frituras) (SANDFORD *et al.*, 1984).

As curvas de temperatura confirmaram, portanto, que o caráter geleificante da fração analisada depende principalmente de interações moleculares fortes, sendo controlado pela estrutura química e interações físicas, porém não por condições termodinâmicas, uma vez que não foram observadas alterações significativas em G' e G'' com as variações de temperatura.

Considerando-se a redução significativa do caráter sólido das frações gMp2 e gMp3, constatada visualmente após as análises de RMN em temperatura de 70°C, bem como o teor reduzido de glucose na composição das mesmas, é possível sugerir a relação da termoestabilidade de gMp1 com o conteúdo significativo de glucose desta. Provavelmente, os componentes celulósicos da fração gMp1 estabelecem uma forte interação com as xilanas do meio, o que contribui para a termoestabilidade incomum da presente rede física. BLAKE e RICHARDS (1971) já haviam relatado em seus estudos de métodos de fracionamento de hemiceluloses de plantas que a associação física, por pontes de hidrogênio, entre xilanas e uma matriz celulósica é forte, podendo ser apenas parcialmente revertida. Os estudos utilizando gMp1 como modelo confirmaram por reologia tal situação.

A estabilidade térmica é uma vantagem da fração gMp1, quando comparada a outras soluções poliméricas, tais como as de xantana, cuja *performance* reduz com o aumento da temperatura (MILAS & RINAUDO, 1986; RINAUDO *et al.*, 1979).

Outros exemplos e comparações de materiais cujo caráter geleificante é controlado por condições termodinâmicas podem ser dados, como os casos de soluções aquosas de goma guar e de carboximetilcelulose (CMC) que, quando submetidas a aquecimento, apresentam redução permanente de sua viscosidade, sem, no entanto, ocorrer ruptura de ligações (RAO *et al.*, 1981).

Para soluções de ágar aquecidas, o comportamento termodinâmico é diferente daquele observado para a fração analisada do gel de Tingüi, pois essas geleificam apenas quando resfriadas até aproximadamente 30°C, permanecendo então estáveis (LIPS *et al.*, 1988). Polímeros de metilcelulose geleificam reversivelmente quando submetidos a aquecimento entre 40-50°C (informações Dow Chemical Co., 1990; WALTER, 1998). Soluções de gelana, assim como observado para gMp1, não fundem (65-125°C) (WALTER, 1998).

A propriedade de termoestabilidade já foi observada para suspensões de microfibrilas de celulose de beterraba (composição: 85% de celulose, 11% de hemiceluloses e pectinas e 4% de minerais) analisadas a 25, 40 e 60°C (LOWYS *et al.*, 2001). Entretanto, a rede de gMp1 difere das microfibrilas descritas por estes autores, as quais após serem secas não podem ser redispersas, devido a interações fortes por meio de pontes de hidrogênio entre as fibras desidratadas. Comparando nossos resultados com aqueles encontrados para tais dispersões celulósicas, pode-se sugerir que a presença das xilanas em gMp1 seja importante para a habilidade de redispersão.

DEA e REES (1974) afirmam que a capacidade de uma xilana associar-se a componentes celulósicos depende de parâmetros conformacionais. VARNER e LIN (1989) relacionam a capacidade de associação entre xilanas e microfibrilas de celulose como inversamente proporcional ao grau de ramificação daquelas.

Segundo NELSON e FENNEMA (1991), filmes termoestáveis de celulose são úteis na indústria alimentícia, pois obstruem a migração de lipídeos em alimentos fritos.

O presente trabalho de tese pode, portanto, abrir novos caminhos de investigação para o aperfeiçoamento das propriedades de reidratação de xerogéis de

celulose, além de apresentar o gel de Tingüi como material promissor em termos de estudos futuros acerca de sua aplicabilidade.

Considerando as propriedades fungistáticas relatadas por JOLY *et al.* (1980) para o hidrogel original de Tingüi, este pode, por exemplo, ser uma alternativa interessante para o uso em filmes de proteção de sementes, frutas e vegetais.

Graças a sua característica termoestável, a fração gMp1 pode ser útil para a complementaridade de propriedades de outros carboidratos. A importância da complementaridade entre biopolímeros pode ser exemplificada com o seguinte processo: dispersões de amido tendem indesejavelmente a se tornar mais fluídas pelo aquecimento, prejudicando os padrões de qualidade de caldas e molhos; no entanto, este ponto é corrigido pela adição de soluções de metilcelulose (1-2,9%), o que permite inclusive a redução do conteúdo calórico destes produtos (HENDERSON, 1988; citado por WALTER, 1998).

4.5.2.3 Influência do parâmetro tempo

Tendo-se em vista o fato de dispersões polissacarídicas poderem sofrer processo de separação de fases espontaneamente em função do tempo, concomitante a um decréscimo dos parâmetros de viscosidade (WALTER, 1998), procedeu-se o estudo da influência deste fator sobre as dispersões de gMp1, em temperatura de 25 e 60°C.

Nas análises executadas em sistema oscilatório, dentro do período de tempo avaliado (1800 s), não foram observadas alterações nos módulos de estocagem (G') e de perda (G'') (Figura 40). Tais análises foram repetidas com estas mesmas amostras, a cada hora, totalizando mais quatro medidas com perfis sobrepostos aos da Figura 40, o que revela a capacidade da fração gMp1 em estabilizar suspensões, evitando que as mesmas formem sistemas heterogêneos com viscosidade diminuída.

As curvas de tempo em modo oscilatório realizadas na temperatura de 60°C demonstraram valores de G'' praticamente idênticos aos encontrados a 25°C. Valores de G' levemente superiores foram verificados a 60°C. Os dados obtidos para as

concentrações de 2 e 4 g.L⁻¹ em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ estão mostrados na Figura 41. Respostas semelhantes foram encontradas para as soluções da fração gMp1 em água.

A curva de tempo a 60°C serviu, como um parâmetro adicional, para avaliar a termoestabilidade da fração gMp1. A rede tridimensional de gMp1 parece ser, portanto, estável, uma vez que as condições em que tais medidas oscilatórias foram realizadas não foram suficientes para modificá-la.

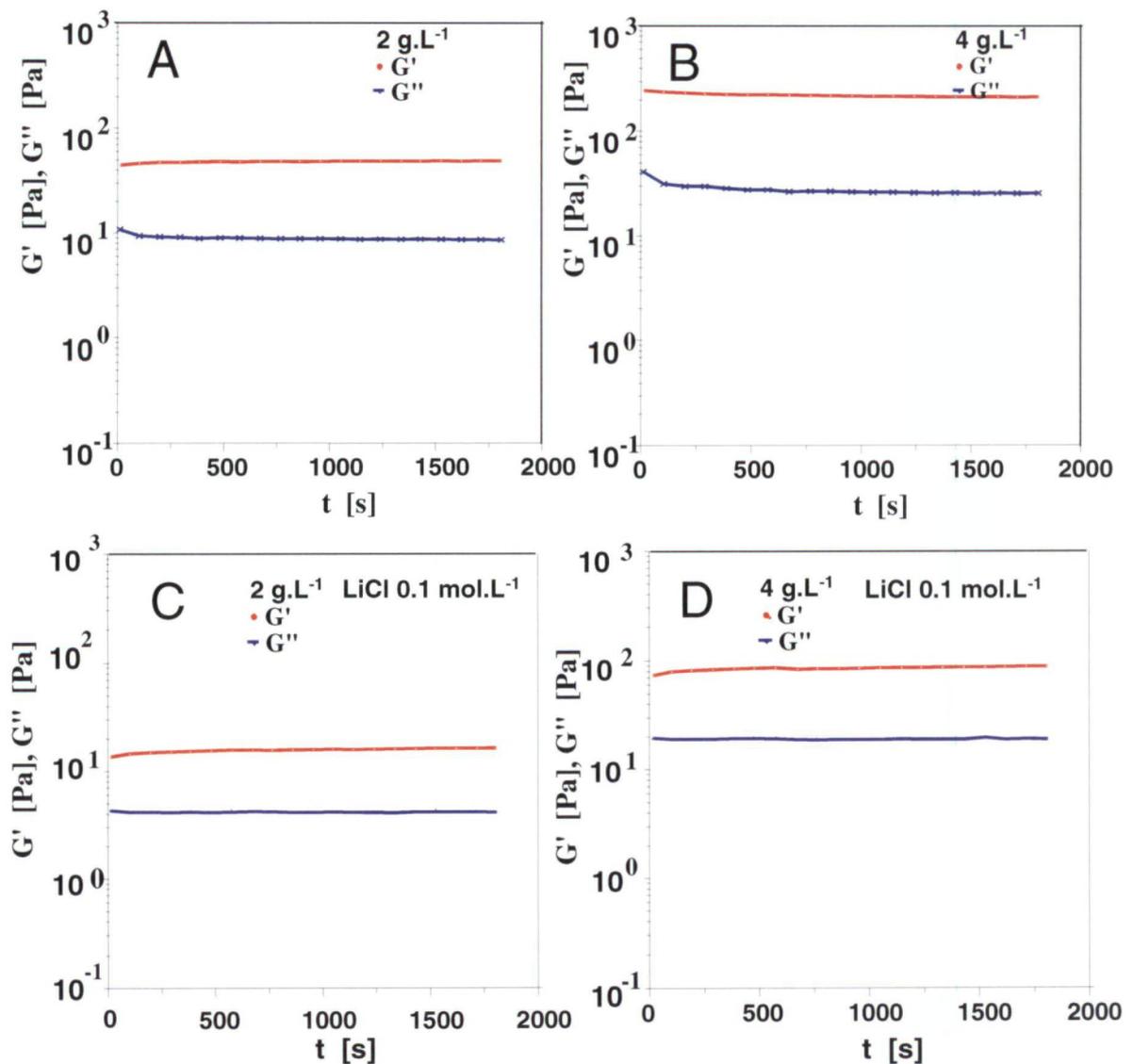


Figura 40: Módulos de estocagem (G') e de perda (G'') da fração gMp1 em função do tempo de análise, para as concentrações de 2 g.L⁻¹ (A) e 4 g.L⁻¹ (B) em água Milli-Q, e em LiCl 0,1 mol.L⁻¹ [2 g.L⁻¹ (C) e 4 g.L⁻¹ (D)]. Temperatura de análise: 25°C.

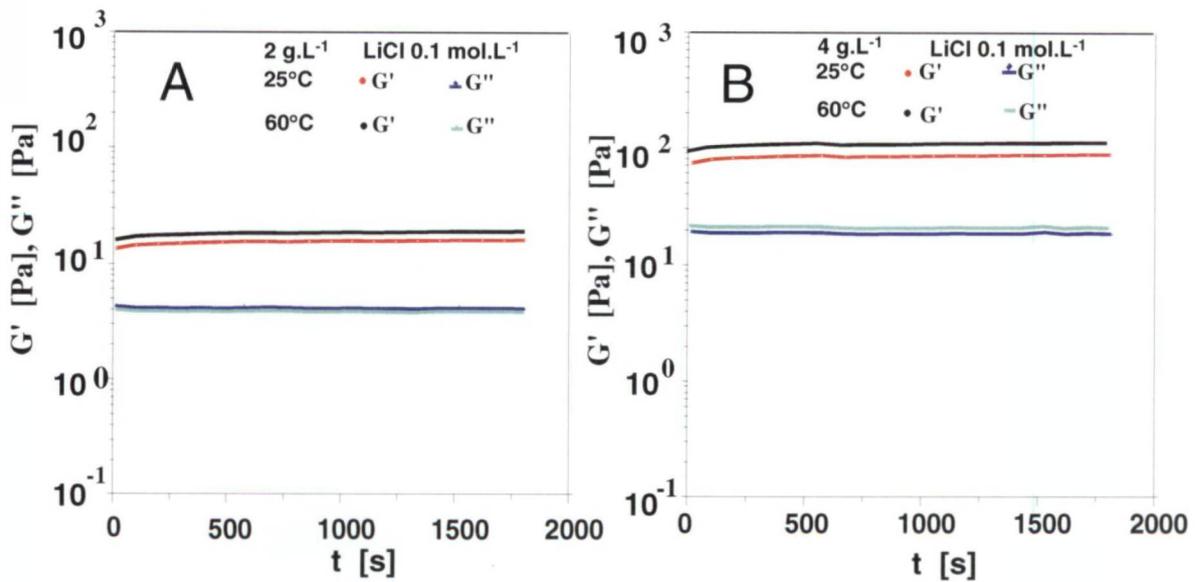


Figura 41: Módulos de estocagem (G') e de perda (G'') da fração gMp1 em função do tempo de análise, para as concentrações de 2 g.L^{-1} (A) e 4 g.L^{-1} (B) em $\text{LiCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ nas temperaturas de análise de 25 e 60°C .

Os materiais sujeitos às curvas de variação de tempo a 60°C foram resfriados até 25°C , tendo sido a seguir avaliados por meio de varreduras de frequência (Figura 42). Os resultados comprovam mais uma vez que os módulos G' e G'' da fração gMp1 sofrem pouca inferência em função de meia hora de aquecimento a 60°C , com valores de G' e G'' levemente superiores após o aquecimento.

4.5.2.4 Experimentos de tensão temporária ou arraste (*creep and recovery*)

Medidas reológicas em sistema estático envolvendo tensão temporária ou arraste foram realizadas para auxiliar na caracterização do comportamento viscoelástico da fração gMp1 em $\text{LiCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, permitindo o uso de baixas taxas de cisalhamento, para demonstrar de que maneira a energia utilizada na deformação é armazenada (total ou parcialmente) e recuperada após a remoção da tensão aplicada.

Tais medidas são úteis, por exemplo, para avaliar como produtos respondem a um baixo valor de estresse estático.

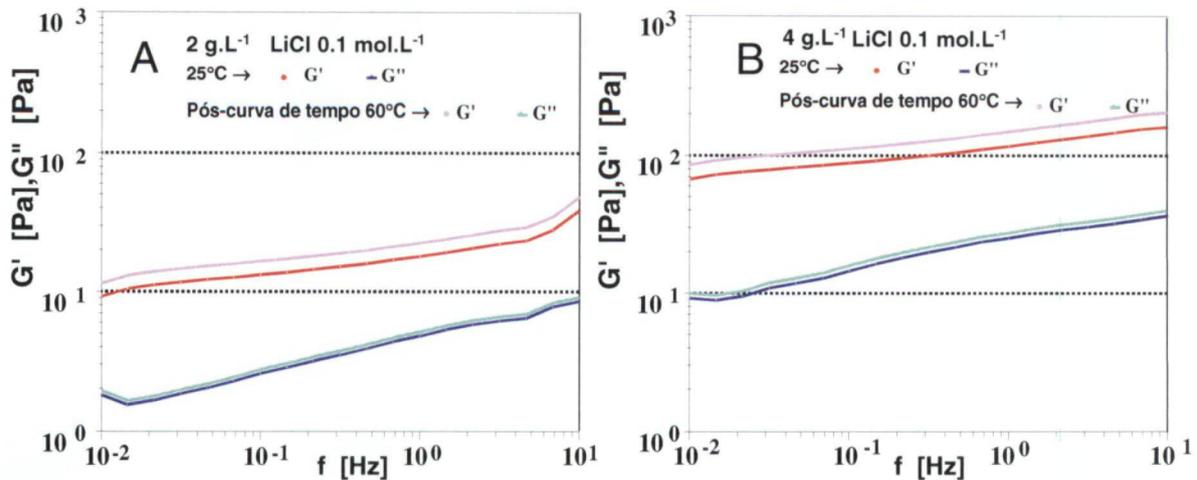


Figura 42: Reogramas em sistema dinâmico dos módulos de estocagem (G') e de perda (G'') em função da variação de frequência para a fração gMp1 em LiCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, nas concentrações de 2 g.L^{-1} (A) e 4 g.L^{-1} (B), a 25°C , antes e depois de uma curva de tempo em sistema oscilatório a 60°C .

Os experimentos de *creep and recovery* foram realizados na região de resposta linear da fração e os dados estão apresentados na Figura 43.

Pôde-se observar que as concentrações de 2 (A) e 4 g.L^{-1} (B) da fração gMp1 em solução de LiCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ apresentaram valores de complacência (J) de $0,1$ e $0,025 \text{ Pa}^{-1}$, respectivamente. A fração gMp1 na concentração de 4 g.L^{-1} possui um caráter mais elástico do que a 2 g.L^{-1} , pois tem menor valor de complacência em relação a esta. Estes dados encontram-se em concordância com os valores de viscosidade absoluta obtidos para ambas as concentrações em modo estático, bem como com os valores de G' e G'' no modo dinâmico. Quando os materiais foram submetidos a tensões muito menores, tais como $0,02$ - $0,2 \text{ Pa}$, os mesmos praticamente não apresentaram complacência.

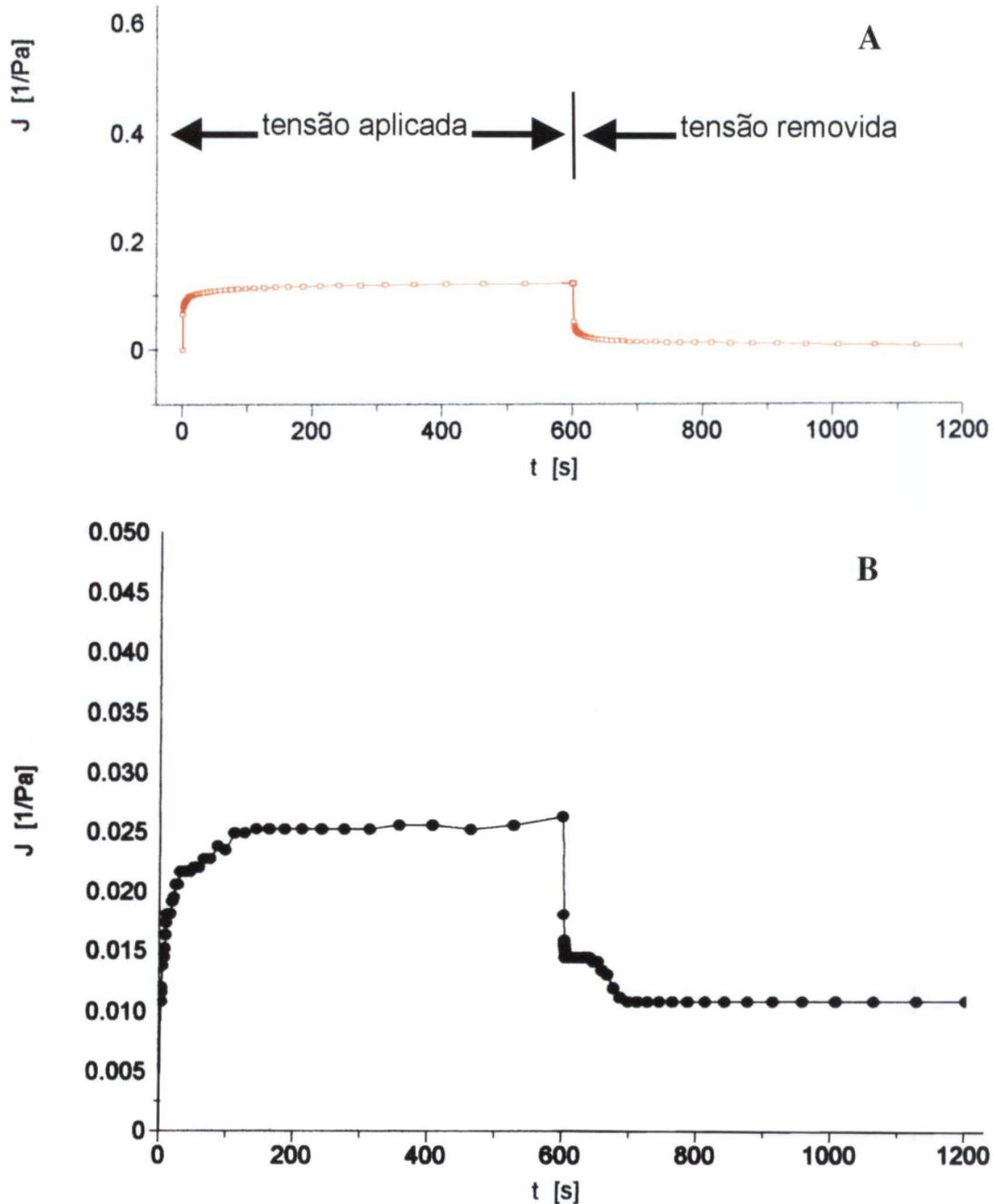


Figura 43: Análise de tensão transitória da fração gMp1 nas concentrações de 2 (A) e 4 g.L⁻¹ (B), em solução aquosa de LiCl 0,1 mol.L⁻¹. Temperatura de análise 25°C.

O perfil das soluções de gMp1 pode ser comparado ao de um líquido viscoelástico, ou seja, durante o tempo de relaxação, após a remoção da tensão, ocorre a recuperação parcial do parâmetro de complacência (MITCHELL, 1984), muito

embora a diferença dos valores de complacência entre os estados inicial e final das amostras seja baixa. Quanto maior a recuperação, mais elástica é considerada a amostra (SCHRAMM, 1994).

Os resultados desta série de experimentos permitem afirmar que a fração gMp1 corresponde a uma mistura sinérgica natural presente no envoltório de sementes de *M. pubescens*, apresentando propriedades reológicas incomuns, quando comparada a outros carboidratos com capacidade geleificante. O interesse industrial é inerente à necessidade de muitas indústrias no tocante a agentes geleificantes com características especiais adequadas a processos e finalidades de uso.

Como as soluções de gMp1 são altamente viscosas em baixas concentrações, tendo caráter tixotrópico, além de constituírem géis fortes e termoestáveis até 95°C, este material seria promissor, por exemplo, na indústria petrolífera, de óleos e lubrificantes, alimentícia, cosmética, farmacêutica, entre outras.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

- As análises microscópicas do envoltório externo de sementes de *M. pubescens* permitiram, em conjunto com os estudos de RMN-¹³C de sólido e de composição monossacarídica, a distinção dos constituintes químicos de suas regiões.
- A técnica de RMN-¹³C de sólido apresentou-se como metodologia viável, sendo mais sensível e quantitativa para a análise dos componentes do envoltório externo.
- Todas as regiões do envoltório externo analisadas apresentaram majoritariamente carboidratos em sua composição, entretanto diferenças puderam ser assinaladas no tocante à presença de compostos fenólicos detectada apenas para as regiões 3, 4 e 5.
- Segundo análises de microscopia de fluorescência e estudos de composição monossacarídica, a segunda região do envoltório externo é constituída por células mucilaginosas contendo material fibrilar celulósico.
- A precipitação fracionada com etanol do hidrogel original permitiu o isolamento de três frações com caráter de gel, dentre as quais a fração gMp1 (constituída principalmente por xilose e glucose) foi analisada por métodos reológicos.
- Os procedimentos de fracionamento de gMp1 demonstraram, de acordo com as análises de composição monossacarídica e de RMN, ser esta uma fração constituída principalmente por xilanas com cadeia principal β -(1→4), substituída em C-2 por unidades de ácido glucurônico e/ou ácido 4-O-metil-glucurônico, em associação com material celulósico.
- As análises das propriedades reológicas da fração gMp1 em sistema estático, através de comportamento de fluxo, mostraram ser este um material altamente viscoso, com comportamento tixotrópico nas concentrações de 2 e 4 g.L⁻¹ em água e

LiCl 0,1 mol.L⁻¹. As amostras preparadas sem a adição de LiCl 0,1 mol.L⁻¹ apresentaram maiores valores para a viscosidade absoluta.

- As análises das propriedades reológicas da fração gMp1 em sistema dinâmico mostraram ter esta um comportamento de gel forte em uma ampla faixa de frequência, nas condições analisadas, bem como característica termoestável dentro da faixa de 5 a 95°C. As amostras de gMp1 em água apresentaram um caráter de gel mais forte do que as preparadas com a adição do sal de cloreto de lítio a 0,1 mol.L⁻¹.

- Em sistema dinâmico não foram observadas variações no caráter de gel forte do material em função do fator tempo, uma vez que os valores dos módulos G' e G'' permaneceram constantes durante o período de tempo analisado.

- Considerando-se as propriedades reológicas da fração gMp1, a mesma apresenta-se promissora para futuros estudos envolvendo sua aplicação.

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, J. R. **Principles of Biological Microtechnique**. London: Methuen, 1958. p. 256-258.
- BAYERLEIN, F. Technical applications of galactomannans. In: MEUSER, F.; MANNERS, D. J.; SEIBEL, W. **Plant polymeric carbohydrates**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1993. p. 191-202.
- BELL, W. E.; van STADEN, J. Seed structure and germination of *Dichrostachys cinerea*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 59, p. 9-13, 1993.
- van BERGEN, P.F.; HATCHER, P.G.; BOON, J. J.; COLLINSON, M. E.; LEEUW, J.W. Macromolecular composition of the propagule wall of *Nellumbo nucifera*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 45, p. 601-610, 1997.
- BLAKE, J. D.; RICHARDS, G. N. An examination of some methods for fractionation of plant hemicelluloses. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 18, p. 253-268, 1971.
- BRAUDO, E. E. Mechanism of galactan gelation. **Food Hydrocolloids**, Kidlington, v. 6, p. 25-43, 1992.
- BUBRICK, P., GALUN, M. Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Correlation between binding patterns and cell wall cytochemistry. **Protoplasma**, Viena, v. 104, p. 167-173, 1980.

- CHAUBAL, R.; WILMOT, V. A.; WYNN, W. K. Visualization, adhesiveness, and cytochemistry of the extracellular matrix produced by urediniospore germ tubes of *Puccinia sorghi*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, p. 2044-2054, 1991.
- CLARK, A. H. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In: DICKINSON, E. **Food polymers, gels and colloids**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991. p. 322-338.
- CORNER E.J.H. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1976. v.1, p. 245.
- DAMASKIN, B. B.; PETRI, O. A. Interaccion íon-íon en las soluciones de electrolitos. In: **Fundamentos de la electroquímica teórica**. Moscou: Editorial MIR, 1981. p. 43-74.
- DEA, I. C. M.; REES, D. A. An aggregation with change of conformation in solutions of hemicellulose xylans. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 29, p. 363-372, 1974.
- DISCHE, Z. Color reactions of carbohydrates. In: WHISTLER, R. L.; WOLFROM, M. L.; BeMILLER, J. N.; SHAFIZADEH, F. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York:Academic Press, 1962. v.1, p. 475-514,.
- FAHN, A. **Plant Anatomy**. 4.ed. London: Pergamon Press, 4th edition, 1990. p. 522-525.
- FEDER N., O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, p. 123-142, 1968.

- FERRY, J. D. Illustration of viscoelastic behavior of polymeric systems. In: FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. 3^a ed. New York: John Wiley & Sons, 1980. p. 33-55.
- FILISETTI-COZZI T.M.C.C., CARPITA N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 197, p. 157-162, 1991.
- FOSTER, A.S. **Practical plant anatomy**. Princeton: D. van Nostrand, 1949. 228 p.
- FOX, A.; MORGAN, S. L.; GILBART, J. Preparation of alditol acetates and their analysis by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS). In: **Analysis of Carbohydrates by GLC-MS**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 87-117.
- FURDA, I. Complexity of dietary fiber analysis. **Frontiers in Carbohydrate Research**, London: Elsevier Applied Science, 1989. v. 1, p. 83-97.
- GAMBLE, G. R.; AKIN, D. E.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Biological degradation of tannins in *Sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) by the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus* analyzed by solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinston, v. 62, p. 3600-3604, 1996.
- GORIN, P. A. J.; TEIXEIRA, A. Z. A.; TRAVASSOS, L. R.; LABOURIAU, M. L. S.; IACOMINI, M. Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 282, p. 325-333, 1996.

- GRAHAM E. T., JOSHI P. A. Plant cuticle staining with Bismarck brown Y and azure B or toluidine blue O before paraffin extraction. **Biotechnic & Histochemistry**, Baltimore, v. 71, p. 92-95, 1996.

- HADDAD, A. Obtenção e coloração de cortes semi-finos. In: HADDAD, A.; SESSO, A.; SILVEIRA, M.; SOUZA, W.; BARTH, O. M.; MACHADO, R. D.; Souto-Padrón, T. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. v. 1, p. 65-70.

- HAYASHI, T.; OHSUMI, C.; KATO, Y.; YAMANOUCHI, H.; TORIYAMA, K.; HINATA, K. Effects of amino acid medium on cell aggregation in suspension-cultured rice cells. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 58, n.2, p. 256-260, 1994.

- HAYAT, M. A. **Stains and Cytochemical Methods**. New York: Plenum Press, 1993. p. 319.

- HOUGH, L.; JONES, J. K. N. Chromatography on paper. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 1, p. 21-31, 1962.

- JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chemical Communications**, University of Stockholm, Sweden, London, v. 8, p. 1-71, 1976.

- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.

- JOLY, C. A.; FELIPPE, G. M.; DIETRICH, S. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Physiology of germination and seed gel analysis in two populations of *Magonia pubescens* St. Hil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 3, p. 1-9, 1980.

- KANZAWA, Y., KOREEDA, A.; HARADA, A.; HARADA, T. Electron microscopy of the gel-forming ability of polysaccharide food additives. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 53, p.979-986, 1989.
- KARDOSOVA, A.; MATULOVA, M.; MALOVIKOVA, A. (4-*O*-Methyl- α -D-glucurono)-D-xylan from *Rudbeckia fulgida*, var. *Sullivantii* (Boynton et Beadle) **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 308, p. 99-105, 1998.
- KATO, Y.; NEVINS, D. J. Enzymic dissociation of Zea shoot cell-wall polysaccharides. **Plant Cell Physiology**, Kioto, v. 32, n. 5, p. 713-720, 1991.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia**. Seropédica: Edur, 1997. p. 53.
- KRUMEL, K. L.; SARKAR, N. Flow properties of gums useful to the food industry. **Food Technology**, Chicago, April, p. 36-44, 1975.
- LAPASIN, R.; PRICL, S. Rheology of polysaccharide systems. In: LAPASIN, R.; PRICL, S. **Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications**. London: Black Academic & Professional, 1995. p. 251-293.
- LABOURIAU, M. L. S. A semente de *Magonia pubescens* St. Hil. - Morfologia e germinação. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 501-536, 1973.
- LEÓN DE PINTO, G.; MARTINEZ, M.; RIVAS, C. Chemical and spectroscopic studies of *Cercidium praecox* gum exudate. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 260, p. 17-25, 1994.

- LILLIE, R. D. **H. J. Conn's Biological Stains**. 9. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1977. p. 428.

- LIPS, A.; HART, P. M.; CLARK, A. H. Studies of biopolymer gels by compressive de-swelling. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. Eds. **Gums and Stabilizers in the Food Industry**. Oxford: IRL, 1988, v. 4, p. 39-49.

- LINDBERG, B.; MOSIHUZZAMAN, M.; NAHAR, N.; ABEYSEKERA, R. M.; BROWN, R. G.; WILLISON, J. H. M. An unusual (4-*O*-methyl-D-glucurono)-D-xylan isolated from seeds of the quince tree (*Cydonia oblonga*) **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 207, p. 307-310, 1990.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Plantarum Ltda, 1992. p. 307-310.

- LOWYS, M.-P.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. Rheological characterization of cellulosic microfibril suspensions. Role of polymeric additives. **Food Hydrocolloids**, Kidlington, v. 15, p. 25-32, 2001.

- MAEDA, H.; ISHIDA, N. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 62, p. 276-278, 1967.

- MARTINEZ, A. T; ALMENDROS, G.; GONZALEZ-VILA, F. J.; FRUND, R. Solid-state spectroscopic analysis of lignins from several Austral hardwoods. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 15, p. 41-48, 1999.

- MILAS, M.; RINAUDO, M. Properties of xanthan gums in aqueous solutions: role of the conformational transition. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 158, p. 191-204, 1986.

- MITCHELL, J. R. Rheological techniques. In: GRUENWEDEL, D. W.; WHITAKER, J. R. **Food analysis: principles and techniques**. New York: Marcel-Dekker, 1984. p.151-220.
- MORI, B.; BELLANI, L. M. Differential staining for cellulosic and modified plant cell walls. **Biotechnic & Histochemistry**, Baltimore, v. 71, p. 71-72, 1996.
- MORRIS, E. R. Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharides and their applications**. New York: Marcel-Dekker, 1995. p. 517-546.
- MORRIS, V.J.; FRANKLIN, D.; ANSON, I.-K. Rheology and microstructure of dispersions and solutions of the microbial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* (xanthan gum). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 121, p. 13-30, 1983.
- MORRIS, V. J.; MILES, M. J. Effect of natural modifications on the functional properties of extracellular bacterial polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 8, p. 342-348, 1986.
- NELSON, K. L.; FENNEMA, O. R. Methylcellulose films to prevent lipid migration in confectionery products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, p. 504-509, 1991.
- RAO, M. A. Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid foods. In: RAO, M. A.; STEFFE, J. F. **Viscoelastic properties of foods**. New York: Elsevier Applied Science, 1992. p. 207-231.

- RAO, M. A.; WALTER, R. H.; COOLEY, H. J. Effect of heat treatment on the flow properties of aqueous guar gum and sodium carboxymethylcellulose (CMC) solutions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, p. 896-902, 1981.
- RATTEE, I.D.; GREUR, M. M. **The Physical Chemistry of Dye Absorption**. New York: Academic Press, 1974. p. 181-182.
- REID, J.S.G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B., Eds. **Plant Biochemistry**, New York: Academic Press, 1997. p. 205-236.
- RIBAS DE OLIVEIRA, C. M. **Estudo de métodos para o fracionamento dos carboidratos presentes no hidrogel de sementes de *Magonia pubescens* St. Hil. (Tingüi)**. Curitiba, 1997. 142 f. Tese (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- RIBAS DE OLIVEIRA, C. M; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Utilization of concentrated aqueous urea in extraction of carbohydrates of the hydrogel formed by seeds of Tingüi (*Magonia pubescens*). In: MATTOSO, L. H. C.; LEÃO, A. FROLLINI, E. **Natural Polymers and Composites: Proceedings from the Third International Symposium on Natural Polymers and Composites - ISNaPol 2000**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2000. p. 181-184.
- RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.; MORRIS, V. J. Synergistic interactions of acetan with carob or konjac mannan. **Macromolecules**, Washington, DC, ev. 31, p. 2539-2544, 1998.
- RINAUDO, M. Viscosity of water-soluble polymers. In: **Polymer hydrossoluble**. Aim, 1987. p. 195-219.

- RINAUDO, M.; MILAS, M.; MOAN, M. Influence de la température et du gradient de vitesse sur la viscosité des solutions diluées de xanthane. **European Polymer Journal**, New York, v. 15, p. 903-906, 1979.
- SAKAI, W.S. Single method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.
- SANDERSON, G. R. Polysaccharides in foods. **Food Technology**, Chicago, v. 35, p. 50-57, 1981.
- SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL GO, Ed. **The polysaccharides 2**. New York: Academic Press, 1983. p. 411-490.
- SANDFORD, P. A.; COTTRELL, I. W.; PETTITT, D. J. Microbial polysaccharides: new products and their commercial applications. **Pure & Applied Chemistry**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 879-892, 1984.
- SASS, H.-J.; MUSCO, G.; GREZESIEK, S. The use of polyacrylamide gels and other mixed solid/liquid phases for macromolecular NMR: Diffusional properties and residual alignment by mechanical stress or embedding of preoriented substances. **VIII ENCONTRO DE USUÁRIOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**, Rio de Janeiro, 2001. Mangaratiba. p. 38.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951. 391 p.

- SCHOENBERG, M.M.; HOFMEISTER, R.M. The epidermis of seed in *Cuphea calophylla* ssp. mesostemon (Koehne) Lourt. **Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 16, p. 3-10, 1986.
- SCHOTT, H. Reología. In: GENNARO, A. R. **Remington: Farmacia**. Buenos Aires: Panamericana, 1992. v. 2, p. 461-482.
- SCHRAMM, G. A. **Practical approach to rheology and rheometry**. Karlsruhe, Gebrueder HAAKE GmbH, 1994. 209 p.
- SHATALOV, A. A.; EVTUGUIN, D. V.; PASCOAL-NETO, C. (2-O- α -D-Galactopyranosyl-4-O-methyl- α -D-glucurono)-D-xylan from *Eucalyptus globulus* Labill. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 320, p. 93-99, 1999.
- SHORSCH, C.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. L. Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: comparison of sugar gum with locust bean gum. **Carbohydrate Polymers**, Shannon, v. 34, p. 165-175, 1997.
- SILBERBERG, A. Gelled aqueous systems. In: GLASS, J. E. **Polymers in aqueous media: performance through association**. 2. ed. Washington: American Chemical Society, 1992. p. 3-14.
- SILVEIRA M. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SOUZA, W de. **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica: técnicas básicas**. Rio de Janeiro, Brasil: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1989. v. 1, p. 60-64.
- SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of alditol acetates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 6, p. 20-24, 1972.

- SPICER, S.S.; SCHUTLE, B.A. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v. 40, p. 1-38, 1992.

- SUMNER, M.J.; CAESELE, L.V. The ultrastructure and cytochemistry of egg apparatus of *Brassica campestris*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 67, p. 177-190, 1989.

- TAGER, A. A. **Physical chemistry of polymers**. 2. ed. Moscow: Mir Publishers, 1978. 652 p.

- TANAKA, T. Phase transition of gels. In: HARLAND, R. S.; PRUD'HOMME, R. K. **Polyelectrolyte gels: properties, preparation and applications**. Washington: American Chemical Society, 1992. p. 1-21.

- TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, London, v. 166, n. 4219, p. 444 -445, 1950.

- VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plant cell wall architecture. **Cell**, Cambridge, v. 56, n. 2, p. 231-239, 1989.

- VIGNON, M. R.; GEY, C. Isolation, ¹H and ¹³C NMR studies of (4-O-methyl- α -D-glucurono)-D-xylans from luffa fruit fibres, jute bast fibres and mucilage of quince tree seeds. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 307, p. 107-111, 1998.

- VISSER, J.; BELDM, G.; KUSTERS-van SOMEREN, M. A.; VORAGEN, A. G. J. **Xylans and Xylanases**, New York: Elsevier Science Publishers, 1992. v. 7, p.1-15.

- WALTER, R. H. **Polysaccharide Dispersions: Chemistry and Technology in Food**. San Diego: Academic Press, 1998. 236 p.

- WERKER, E. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 85, p. 271-287, 1980.

- WERKER, E. **Seed anatomy**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1997.

- WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetolysis. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 3, p. 143-149, 1963a.

- _____. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 2, p. 211-215, 1963b.

- _____. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 2, p. 65-67, 1963c.

- WOOD, P.J. Specificity in the interaction of the direct dyes with polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 85, p. 271-287, 1980.

- WOOD, P.J.; FULCHER, R.G. Dye interactions: a basis for specific detection and histochemistry of polysaccharides. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Seattle, v. 31, p. 823-826, 1983.

Anexos

Assinalamentos dos espectros de RMN em estado líquido das principais frações derivadas de gMp1.

Fração		Deslocamentos químicos						
		1	2	3	4	5	6	4-O-Me
PUF30								
α -L-Rhap-(1→	¹ H ¹³ C							
→4)-β-D-Xylp-(1→	¹ H ¹³ C	102,04				63,09		
→4)-β-D-Xylp-(1→ 2 ↓ α -Uro	¹ H ¹³ C	101,53						
α -D-GlcpA/ 4-O-Me- α -D-GlcpA-1→	¹ H ¹³ C	97,93			82,50		173,47 177,38	59,81
PUF30R15								
α -L-Rhap-(1→	¹ H ¹³ C							
→4)-β-D-Xylp-(1→	¹ H ¹³ C	4,45 102,04				3,40 ax 4,13 eq 63,09		
→4)-β-D-Xylp-(1→ 2 ↓ α -Uro	¹ H ¹³ C	4,59 101,53						
α -D-GlcpA/ 4-O-Me- α -D-GlcpA-1→	¹ H ¹³ C	5,00/ 5,27 97,93/ 98,57			3,23 82,50		173,47 177,38	3,46 59,81
Ret300NaP								
α -L-Rhap-(1→	¹ H ¹³ C	101,55						
→4)-β-D-Xylp-(1→	¹ H ¹³ C	102,04				63,09		
→4)-β-D-Xylp-(1→ 2 ↓ α -Uro	¹ H ¹³ C	101,55						
α -D-GlcpA/ 4-O-Me- α -D-GlcpA-1→	¹ H ¹³ C	97,93			82,50			59,87

NaP30								
α -L-Rhap-(1→	^1H	4,59	3,40	3,57	3,72	3,75	1,26	
	^{13}C	101,55						
→4)- β -D-Xylp-(1→	^1H	4,45	3,25	3,55	3,77			
	^{13}C	102,04				63,09		
→4)- β -D-Xylp-(1→ 2 ↓ α -Uro	^1H	4,59	3,40					
	^{13}C	101,55						
α -D-GlcpA/ 4-O-Me- α -D-GlcpA-1→	^1H	5,26	3,54	3,72	3,19	4,29		
	^{13}C	97,93			82,50			59,87