

1. INTRODUÇÃO

A nova planta formada por reprodução sexuada inicia-se como um embrião dentro da semente, o qual se origina do óvulo. Quando madura, a semente é o meio de dispersão do novo indivíduo. A semente, portanto, ocupa uma posição crítica na vida das plantas superiores. O sucesso com o qual o novo indivíduo se estabelece no tempo e no espaço, e o vigor da nova planta é fortemente determinado pelas características fisiológicas e bioquímicas da semente. De fundamental importância para este sucesso estão as respostas da semente ao ambiente e, em nível bioquímico, a suas reservas, as quais estão disponíveis para manter a nova planta nos estágios iniciais de crescimento antes que ela se torne independente, autotrófica, capaz de utilizar a energia solar. Além disso, para o homem, as sementes representam uma grande fonte de nutrientes. Cerca de 10% de todo o alimento para consumo humano vem diretamente de sementes, principalmente cereais e legumes (BEWLEY; BLACK, 1986).

Dentre as principais reservas que a semente pode utilizar, destacam-se, pela abundância e multiplicidade de usos, os carboidratos, que podem ocorrer na forma de oligossacarídeos, como os da família da rafinose ou a sacarose, ou ainda como polissacarídeos (AVIGAD; DEY, 1997).

O polissacarídeo de reserva mais amplamente distribuído é o amido, seguido das frutanas e dos polissacarídeos de reserva de parede. Cada um destes carboidratos apresenta características que os tornam mais convenientes para a planta, além de apresentarem poucos terminais redutores livres, uma vantagem quando comparados com a acumulação de monossacarídeos, o que poderia levar a

glicosilação não específica de elementos celulares (BUCKERIDGE; SANTOS; TINÉ, 2000).

Em algumas sementes, a parede celular dos tecidos de reserva (endosperma, cotilédones ou perisperma) está massivamente espessa e contém depósitos de polissacarídeos, os quais são mobilizados após germinação. Estes são os polissacarídeos de reserva de parede, os quais são classificados em três grupos: mananas, que inclui as mananas puras, galactomananas e glucomananas; xiloglucanas e galactanas (REID; EDWARDS, 1997).

Enquanto o amido possui somente a função de armazenamento, as frutanas e os polissacarídeos de parede possuem outras funções, além de reserva. As frutanas participam no controle osmótico de células e tecidos vegetais e os polissacarídeos de reserva de parede estão relacionados à rigidez (mananas presentes no endosperma de sementes de palmeiras, tomate e alface), relações hídricas (xiloglucanas nos cotilédones e galactomananas no endosperma de sementes de leguminosas) e expansão celular (galactanas de *Lupinus angustifolius*) (BUCKERIDGE; SANTOS; TINÉ, 2000).

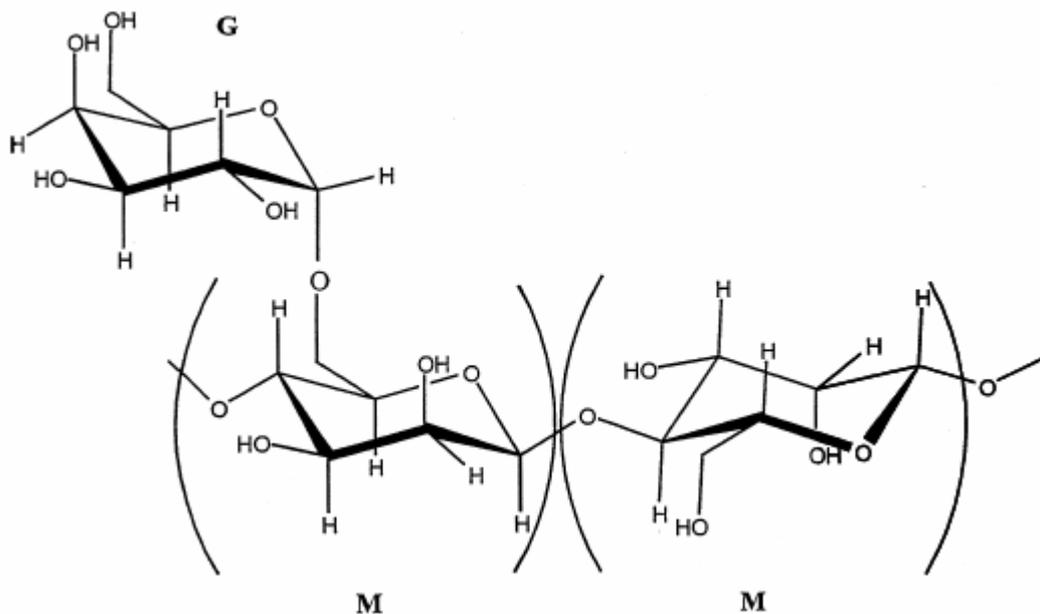
Entre os diferentes tipos de polissacarídeos de reserva de parede, abordaremos as galactomananas e as mananas puras que constituem o objeto de estudo deste trabalho.

1.1 GALACTOMANANAS

A estrutura das galactomananas, em plantas, consiste de uma cadeia linear de unidades β -D-manopiranosídicas, unidas entre si por ligações 1 \rightarrow 4, que são

substituídas por unidades simples α -D-galactopiranosídicas, ligadas à cadeia principal por ligações 1→6 (DEA; MORRISON, 1975). Dependendo da fonte botânica, o conteúdo de galactose nas galactomananas pode variar de 20 a 100%, caracterizando, assim, a relação manose:galactose. A representação esquemática deste polissacarídeo está mostrada na Figura 1.

FIGURA 1 - SEGMENTO REPRESENTATIVO DE UMA CADEIA DE GALACTOMANANA DE ORIGEM VEGETAL



FONTE: M. R. SIERAKOWSKI; M. MILAS; J. DESBRIÉRES; M. RINAUDO. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydr. Polym.**, Kidlington, v. 42, p. 51-57, 2000.

NOTA: M: representação das unidades de manose da cadeia principal em ligação β (1→4). G: representação da substituição por unidade de galactose em α (1→6).

A principal fonte de galactomananas nos vegetais é o endosperma de sementes, a maioria proveniente da família Leguminosae, sendo também encontradas nas sementes das famílias Annonaceae, Compositae, Convolvulaceae, Ebenaceae, Lagoniaceae, Malvaceae, Palmae, Solanaceae, Tiliaceae, Umbelliferae,

e provavelmente Cuscutaceae (DEA; MORRISON, 1975; SCHERBUKHIN; ANULOV, 1999).

O laboratório de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular desta Universidade já caracterizou diversas galactomananas de sementes de leguminosas nativas, como as galactomananas de *Mimosa scabrella* (GANTER *et al.*, 1992), *Schizolobium amazonicum* (PETKOWICZ *et al.*, 1998), *Schizolobium parahybae* (GANTER *et al.*, 1993), *Senna multijuga* (RECHIA *et al.*, 1992) e *Strypnodendron barbatiman* (REICHER *et al.*, 1991). Essas galactomananas possuem relações manose:galactose de 1,1:1; 3,0:1; 3,0:1; 2,3:1 e 1,5:1, respectivamente.

Já foram isoladas galactomananas cujas estruturas diferem da estrutura clássica. ISHURD *et al.*, 2005 isolaram, das sementes de *Retama raetam*, uma galactomanana cuja cadeia principal além das ligações $\beta(1\rightarrow4)$ é composta de cerca de 80% de ligações $(1\rightarrow3)$. A galactomanana de *Cassia absus* apresenta também algumas ligações em $(1\rightarrow3)$ na cadeia de manana, e substituições em O-2 por α -D-galactopiranoose, além das convencionais em O-6 (SONI; BOSE, 1985).

A hidrólise da galactomanana metilada de *Abutilon indicum* apresentou os seguintes derivados: 2,3,4,6-tetra-O-metil-galactose; 2,4,3-tri-O-metil-galactose; 2,3,6-tri-O-metil-manose e 2,3-di-O-metil-manose, na relação molar de 1:1:2:1. Estes dados indicam que esta galactomanana consiste de uma cadeia linear de unidades D-manopiranosídicas em ligações $\beta(1\rightarrow4)$, algumas destas unidades sendo substituídas em O-6 por duas unidades D-galactopiranosídicas ligadas $\alpha(1\rightarrow6)$. Na galactomanana de *Cassia corymbosa* este padrão de substituição também é observado (SINGH *et al.*, 1997; TEWARD *et al.*, 1984).

A bioquímica e fisiologia da síntese e mobilização das galactomananas foram extensivamente estudadas nas sementes de *Trigonella foenum-graecum*, *Cyamopsis tetragolobus*, *Trifolium repens* e *Ceratonia siliqua* (REID; BEWLEY, 1979; REID; EDWARDS, 1995).

O endosperma de *Trigonella foenum-graecum* é completamente preenchido com galactomanana e é considerado não vivo; as únicas células vivas do endosperma estão presentes na camada de aleurona que contorna o tecido de reserva. O polissacarídeo é depositado na parede celular do endosperma e ocorre até o preenchimento total da célula. Citoplasma e vacúolo desaparecem e são substituídos por uma massa de galactomanana, num processo que ocorre célula a célula; as células do endosperma próximas ao embrião são as primeiras a serem preenchidas. Já no endosperma de *Ceratonia siliqua* as células do tecido de reserva são vivas e as galactomananas estão presentes na parede celular espessada (REID; EDWARDS, 1995).

A síntese das galactomananas no endosperma ocorre com a geração de dois nucleotídeos-açúcar: GDP-G e UDP-G. Estes compostos são transformados pela 2-epimerase e 4-epimerase em GDP-manose e UDP-galactose, respectivamente, os quais são os doadores das unidades monossacarídicas para a construção das cadeias do polímero. Este processo é mediado por duas transferases: manosil transferase (na presença de Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+}) e galactosil transferase (Mg^{2+}). Foi descrito um aceptor glicosil endógeno (primer), mas sua natureza é pouco compreendida (DEY, 1978).

A estrutura tridimensional de galactomananas foi estudada por difração de raios X obtidos a partir de fibras policristalinas. O polímero forma uma estrutura

heilcoidal com passo de 10,38 Å. A hélice, estilo “fita”, relativamente estendida e flexível, seria a conformação que as galactomananas adotam no estado sólido. Os hidrogênios das cadeias laterais de galactose ligam-se a cadeia de manana intramolecularmente provendo estabilidade estrutural. A cadeia principal de manana é insolúvel, pois apresenta ligações (1→4)-diequatoriais, mas a solubilidade das galactomananas aumenta com o grau de ramificação, pois as substituições de galactose impedem o empacotamento das cadeias de manana no estado sólido e contribuem para a entropia conformacional em soluções pela livre rotação das ligações (1→6) (CHANDRASEKARAN; RADHA; OKUYAMA, 1998; DOYLE *et al.*, 2006).

As galactomananas podem interagir com outros polissacarídeos e formar géis, um exemplo é a mistura de galactomanana e xantana, que leva a geleificação, sendo que, separadamente, estes polissacarídeos não formam géis (BRESOLIN *et al.*, 1998). As galactomananas quando dispersas em água formam soluções de alta viscosidade. A viscosidade das soluções de galactomananas é controlada essencialmente pelo tamanho molecular e o nível de substituição influencia pouco nesta característica. Entretanto, o grau de substituição é um aspecto importante nas propriedades sinérgicas das galactomananas, já que as menos substituídas possuem a capacidade de interagir com outros polímeros, produzindo géis, em muito maior extensão do que aquelas mais substituídas (DEA; MORRISON, 1975; DEA; CLARK; McCLEARY, 1986). TAVARES *et al.* (2005) adicionaram galactomananas de diferentes relações manose:galactose a proteínas do soro do leite e perceberam que a diminuição da temperatura de geleificação e aumento na força do gel foram mais evidentes quando galactomananas menos substituídas foram utilizadas,

indicando que o grau de substituição é um caráter importante na interação das galactomananas com outros polímeros. McCLEARY *et al.* (1981) demonstraram, através de análises reológicas, que a interação da xantana com a galactomanana diminui com o aumento do grau de substituição das galactomananas.

As galactomananas têm sido usadas como veículo para agentes farmacêuticos, pois podem ser utilizadas como matriz na liberação controlada de drogas devido a sua biocompatibilidade e por produzir uma cinética de liberação de aproximadamente zero. A formulação galactomanana/xantana já foi utilizada como veículo de liberação controlada de fármacos como diclofenato de sódio e teofilina. As galactomananas são adicionadas a comprimidos efervescentes, pois, como são agentes espessantes, as galactomananas formam uma suspensão estável impedindo o assentamento das partículas, além de promover uma agradável sensação na boca (SCHIERMEIER; SCHMIDT, 2002; UGHINI *et al.*, 2003; VENDRUSCOLO *et al.*, 2005).

Galactomananas, em combinação com pectinas, têm sido usadas como revestimento de cápsulas e comprimidos com a finalidade de liberação controlada de drogas no intestino grosso. Isoladamente, estes polissacarídeos não podem ser utilizados como carreadores de drogas ao cólon devido a sua solubilidade em água. Entretanto, quando o revestimento produzido pela combinação de galactomanana e pectina possui $\text{pH} \geq 7$, ele torna-se elástico e insolúvel em fluidos gástricos e intestinais, e consegue atravessar o trato gastrointestinal superior, não ocorrendo liberação da droga no estômago e intestino delgado, havendo a liberação somente no intestino grosso (YANG; CHU; FIX, 2002).

Outro gel binário amplamente estudado é constituído por κ -carragenana e galactomanana. A adição de galactomanana melhora a qualidade do gel, quando comparado ao obtido pela κ -carragenana isolada. Em combinação com galactomanana, os géis tornam-se menos quebradiços, mais resistentes e com menor tendência a sinerese (GONÇALVES *et al.*, 1997).

As principais fontes de galactomananas usadas comercialmente provêm das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar), *Ceratonia siliqua* (goma alfarrobo ou locusto) e *Caesalpinia spinosa* (goma tara), embora esta última seja usada em menor escala. Visando fontes alternativas para a exploração comercial, GANTER *et al.* (1997) estabeleceram um protocolo de extração em escala piloto para as galactomananas de *Mimosa scabrella*.

As galactomananas possuem diversas aplicações comerciais, seja na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, entre outras (SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005). Os principais usos das galactomananas na indústria alimentícia são em produtos derivados do leite, como espessante; em sobremesas, como substitutos de gordura; e em particular, sorvetes, onde impedem a formação de cristais de gelo. Também são utilizadas em geléias, produtos em pó (sobremesas e pudins), panificação (misturas para bolo e glacê), temperos, molhos, sopas, alimentos enlatados e congelados. As galactomananas melhoram a textura e aparência destes alimentos e aumentam a sua resistência a variações de temperatura (SANFORD; BAIRD, 1983; REID; EDWARDS, 1995).

As galactomananas podem entrar na composição de alimentos dietéticos, uma vez que não são digeridas pelo organismo. A adição da galactomanana de guar em refeições ricas em carboidratos reduz o aumento pós-prandial de glucose e de

insulina no sangue. Além disso, melhorias no metabolismo de carboidratos e lipídeos em pacientes insulino dependentes e insulino não dependentes foram conseguidas usando preparações farmacêuticas de guar e alimentos adicionados da mesma goma. A ação fisiológica do guar parece depender principalmente da capacidade da goma de hidratar rapidamente e assim aumentar a viscosidade do bolo alimentar no estômago e no intestino delgado. A alta viscosidade no intestino delgado diminui a digestão e absorção de carboidratos, o que tende a reduzir a hiperglicemia pós-prandial. Também há indícios que a goma guar é capaz de diminuir o LDL sanguíneo. (ELLIS *et al.*, 1991; BEHR *et al.*, 1998).

Na indústria de cosméticos as galactomananas são utilizadas como espessantes e estabilizantes em cremes e loções (STEPHEN, 1983).

As galactomananas são adsorvidas pelas fibras de celulose e por isso são utilizadas na indústria de papel, pois melhoram as propriedades mecânicas do papel através da regulação do estado de floculação na suspensão de fibras celulósicas (NEWMAN; HEMMINGSON, 1998; LIMA; OLIVEIRA; BUCKERIDGE, 2003).

LOMBARDI e MERCÊ (2003) estudaram os complexos de galactomananas com íons metálicos Al^{3+} , Cu^{2+} e Pb^{2+} e verificaram que propriedades das soluções aquosas mostraram uma melhor complexação entre galactose e Al^{3+} . Os autores sugerem que a complexação de galactomananas com Al^{3+} pode ser uma alternativa para a eliminação de Al^{3+} residual no tratamento de águas.

Testes de atividade biológica já foram realizados com galactomananas. RAMESH, YAMAKI e TSUSHIDA (2002) demonstraram que a galactomanana de *Trigonella foenum-graecum* é capaz de ativar a fagocitose em macrófagos peritoniais, além de promover o crescimento de células HB4C5 (hibridoma que

produz anticorpos monoclonais contra câncer de pulmão) e inibir a secreção de IgM por estas células. Galactomananas sulfatadas de diversas fontes também mostraram atividades contra o vírus da dengue e da febre amarela, além de atividade anticoagulante e fibrinolítica (HUSSEIN; HELMY; SALEM, 1998; PIRES *et al.*, 2001; ONO *et al.*, 2003).

Dentre as muitas características das galactomananas, uma particularidade que merece atenção é a sua qualidade de indicador taxonômico dentro da família Leguminosae (ENGLER, 1964) ou ordem Fabales (CRONQUIST, 1981). Segundo a classificação de Engler, que será adotada neste trabalho, a família Leguminosae é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae. Na classificação de Cronquist a ordem Fabales compreenderia três famílias: Caesalpinaceae, Fabaceae e Mimosaceae. Muitas classes de compostos naturais têm contribuído na classificação da família Leguminosae, principalmente flavonóides e polissacarídeos de sementes. Em termos de polissacarídeos de sementes, três tipos de carboidratos proporcionam critério taxonômico: amido, galactomananas e amilóides (HEGNAUER; GRAYER-BARKMEIJER, 1993). Muitos autores têm tentado discutir a taxonomia da família Leguminosae em termos de rendimento em galactomanana extraída do endosperma assim como a relação manose:galactose (DEA; MORRISON, 1975; HEGNAUER; GRAYER-BARKMEIJER, 1993). Os rendimentos e as relações manose:galactose variam dentro das subfamílias e dentro do gênero. Em geral, baixos graus de substituição são característicos de espécies pertencendo a subfamília Caesalpinioideae, que é a mais primitiva das três subfamílias, enquanto galactomananas com percentuais médios a alto de galactose pertenceriam as subfamílias Faboideae e Mimosoideae, que são mais recentes

(REID: EDWARDS, 1995). Altos rendimentos em galactomanana são encontrados em sementes de Caesalpinioideae. O padrão evolucionário aceito para as Leguminosae, no qual as subfamílias Faboideae e Mimosoideae seriam derivadas da Caesalpinioideae, sugere que no curso da evolução houve uma redução no conteúdo de galactomanana e aumento na proporção de galactose (BUCKERIDGE *et al.*, 1995). A utilidade das galactomananas como indicador taxonômico torna-se importante quando se leva em consideração que a família Leguminosae é a segunda família dentro da classe das dicotiledôneas e a primeira em importância econômica. Por possuírem grande capacidade de adaptação a diferentes climas, as leguminosas cresceram em grande dispersão, como conseqüência há muita discordância sobre sua classificação (HEGNAUER; GRAYER-BARKMEUER, 1993). É o caso das espécies *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*, estudadas por PETKOWICZ *et al.* (1998) e ZAWADZKI-BAGGIO *et al.* (1992). Estas espécies forneceram galactomananas com idêntica relação manose:galactose (3,0:1) e a mesma distribuição de unidades de D-galactose ao longo da cadeia principal. Os autores mostraram ainda que, embora a galactomanana de *Cassia fastuosa* também apresente a mesma relação manose:galactose, a sua estrutura fina é significativamente diferente das espécies de *Schizolobium*, devido a diferenças nos padrões de oligossacarídeos obtidos por hidrólise parcial. Ademais, o tegumento das sementes de *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae* forneceu uma arabinana linear e neutra, enquanto o tegumento de *Cassia fastuosa* forneceu duas arabinanas acídicas. Estes resultados, em termos de quimiotaxonomia utilizando galactomananas, corroboram a sugestão de RIZZINI (1987), de que *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae* não são espécies diferentes.

1.2 MANANAS

As mananas de fontes vegetais consistem de cadeias lineares de unidades β -D-manose unidas por ligações 1 \rightarrow 4. Mananas β -D-(1 \rightarrow 4) ligadas também são encontradas como constituintes de parede celular de algas verdes e vermelhas. São consideradas mananas puras os polissacarídeos que contém 95% ou mais de unidades de D-manose, embora alguns autores estabeleçam este limite em 85% (ASPINAL, 1959; STEPHEN, 1983).

Mananas puras são relativamente raras em planta, sendo encontradas no endosperma de sementes da família Palmae, onde atuam como material de reserva, sendo consumidas durante a germinação das sementes. A presença deste polissacarídeo também já foi constatada em sementes de café, tomate, pimenta e centeio (AVIGAD; DEY, 1997; BRADBURY; HALLIDAY, 1990; GROOT *et al.*, 1988; WATKINS *et al.*, 1985).

O endosperma de sementes verdes de algumas espécies da família Palmae contém galactomananas, ao passo que, as sementes maduras de todas as espécies desta família que foram estudadas, consistem de mananas contendo apenas uma pequena proporção de unidades de galactose. Para KOOIMAN (1971), isto pode sugerir que a maior parte das unidades de galactose é removida durante a maturação destas sementes, resultando em uma parede celular que é muito menos sujeita a inchamento e dissolução em água. Este processo ocorre concomitantemente com a transição do endosperma de uma fase hidratada, gelatinosa para uma fase desidratada na maturidade. A extração seqüencial com água, NaOH 1 N e NaOH 4,5 N das sementes da palmeira *Borassus flabellifer* em

diferentes estágios de maturidade forneceu galactomananas e mananas. As extrações com água e NaOH 1 N forneceram galactomananas, enquanto que a extração com NaOH 4,5 N forneceu uma β -D-(1 \rightarrow 4)-manana. Com a maturidade a proporção de galactomananas diminui de 32% para 4%, enquanto que o percentual de manana elevou-se de 3% para 30%. O enriquecimento gradual no conteúdo de manana desta semente com a maturidade é considerado significativo, corroborando a idéia de que a galactomanana é substituída por uma manana nos estágios mais avançados da semente (RAO; MUKHERJEE, 1962).

A manana extraída de *Phytelephas macrocarpa*, espécie conhecida como “ivory nut”, constituem as mananas melhor caracterizadas. Duas mananas com a mesma estrutura química, mas que diferem na solubilidade, estão presentes nesta semente: a manana A, granular, que pode ser extraída com álcali e a manana B, fibrilar, que não pode ser extraída com álcali diretamente, e é separada da celulose por precipitação com cobre amoniacal. O tamanho das cadeias também varia entre as duas mananas, tendo sido determinado um grau de polimerização de 20 para a manana A e 80 para a manana B (TIMELL, 1957; MEIER, 1958; BACIC; HARRIS; STONE, 1988).

As mananas assemelham-se a celulose estereoquimicamente, exceto pela configuração axial do O-2 na manose, em oposição a equatorial na glucose. Porém, as mananas possuem uma massa molecular extremamente pequena quando comparadas à celulose e suas microfibrilas são muito mais sensíveis a tratamentos químicos e físicos (NIEDUSZYNSKI; MARCHESSAULT, 1972; MILLANE; HENDRIXSON, 1994). Por razões termodinâmicas, uma β -D-(1 \rightarrow 4)-manana, em solução, deve adotar uma conformação tipo “fita estendida”, onde os grupos

alcoólicos primários projetam-se alternadamente para ambos os lados da cadeia linear. Estes polissacarídeos são caracterizados pela eficiência de suas pontes de hidrogênio e pela perda de solubilidade (STEPHEN, 1983).

As mananas exibem polimorfismo cristalino, isto é, as transformações manana I – manana II podem ocorrer, assim como a celulose, onde o estado I, nativo, pode ser convertido em estado II por tratamento com solução concentrada de álcali. Por analogia a celulose a forma nativa e tratada com álcali são chamadas manana I e II, respectivamente (MEIER, 1958; CHANZY *et al.*, 1979).

NAVARINI *et al.* (1999) isolaram uma β -D-(1 \rightarrow 4)-manana, de sementes torradas de café, com algumas substituições por galactose e arabinose. Alguns autores consideram que as mananas presentes nas sementes de café podem ser responsáveis pela viscosidade de certos extratos de café, uma vez que o tratamento com mananases reduz significativamente a viscosidades destes extratos (OOSTERVELD *et al.*, 2004).

A polpa mucilagínosa das folhas das espécies do gênero *Aloe*, principalmente da *Aloe vera*, é usada para diferentes fins terapêuticos. O polissacarídeo presente nesta polpa consiste de uma β -D-(1 \rightarrow 4)-manana parcialmente acetilada. Muitas propriedades são atribuídas a este polissacarídeo, incluindo atividade anti-viral e anti-bacteriana; laxante; proteção contra radiação; antiinflamatória e imunoestimulante. Acemannan Immunostimulant™, um extrato da polpa rico em manana acetilada, já está licenciado para uso em fibrosarcoma de gatos e cães e para o uso em feridas (NI *et al.*, 2005; LEUNG *et al.*, 2006). Além disso, já foram demonstrados efeitos antiproliferativos e de ativação de macrófagos para a manana isolada de *Aloe saponaria* (SAMPEDRO *et al.*, 2004).

PETKOWICZ *et al.* (2001) foram os primeiros a isolarem, na família Leguminosae, uma manana linear. O polissacarídeo foi obtido a partir do endosperma de sementes de *Schizolobium amazonicum*. A estrutura da manana foi confirmada por dados de metilação, ressonância magnética nuclear e análise de difração de raios X. Posteriormente, PETKOWICZ, SCHAEFER e REICHER (2007) demonstraram que o mesmo polissacarídeo está presente nas sementes de *Schizolobium parahybae* e que este possui uma função estrutural na semente, já que 12 dias após germinação, a manana foi recuperada do endosperma remanescente.

Este dado, aliado com os resultados obtidos a partir das galactomananas destas espécies, reforça as similaridades entre os polissacarídeos de *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*, corroborando a sugestão de RIZZINI (1987). Com a finalidade de elucidar se *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae* são, na verdade, a mesma espécie neste trabalho foram utilizadas ferramentas de biologia molecular.

1.3 FAMÍLIA LEGUMINOSAE

A família Leguminosae, uma das maiores dentre as dicotiledôneas, compreende mais de 600 gêneros que reúnem 18000, sendo a terceira maior família dentre as dicotilêdoneas, somente atrás da família Compositeae e Orchidaceae. As espécies desta família estão espalhadas por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (JOLY, 1998).

São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores de matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anuais e perenes e também muitas trepadeiras; vivem nos mais variados ambientes, em diferentes altitudes e longitudes. As folhas são sempre de disposição alterna, compostas. Folhas e folíolos de todas as ordens sempre com pulvinos (articulações) na base que permitem movimentos aos folíolos e folhas (JOLY, 1998).

As flores são variadas, sempre cíclicas e fruto variado em geral legume, seco deiscente por duas valvas ou do tipo lomento, ou seco e indeiscente ou de pericarpo mais ou menos carnoso. As sementes são, às vezes, envoltas em mucilagem ou polpa doce, ou com arilo ou ainda com testa duríssima. Todas são plantas que vivem simbioticamente com certas bactérias, capazes de fixar o nitrogênio do ar, encontradas em nódulos, nas raízes (JOLY, 1998).

1.3.1 Taxonomia de leguminosas

O conceito de espécie é central nos estudos de evolução, ecologia e biologia da conservação. Na prática, a maioria das espécies é definida através de caracteres morfológicos, pois são os mais abundantes e muitas vezes os únicos disponíveis aos taxonomistas. A enorme complexidade dos sistemas reprodutivos das plantas dificulta a aplicação de conceitos imutáveis de espécies para estes organismos (TEMPLETON; MASKAS; CRUZAN, 2000).

No conceito filogenético, as espécies são reconhecidas pelo relacionamento filogenético (descendência). Quando comparados com indivíduos de outros grupos, os indivíduos de uma mesma espécie são muito mais relacionados entre si e seus genes mostram um ancestral comum recente. Este conceito pode falhar porque

diferentes genes podem apresentar diferentes padrões de coalescência, mas o uso de diversos genes pode minimizar o problema (AVISE, 2000).

Os estudos clássicos de taxonomia vegetal utilizaram caracteres morfológicos para separar as espécies, mas, durante a última década, o sequenciamento de DNA se tornou uma das técnicas mais utilizadas para inferir relações filogenéticas e taxonômicas de plantas. Reconstruir as relações filogenéticas das leguminosas é essencial para compreender a origem e diversificação desta família de grande importância econômica e ecológica (KASS; WINK, 1996). As análises filogenéticas começaram utilizando o gene plasmidial *rbcL*, que sintetiza a subunidade maior da ribulose-bifosfato carboxilase (KÄSS; WINK, 1996; DOYLE, 1997). Nestes trabalhos os autores confirmam que as subfamílias Mimosoideae e Faboideae são monofiléticas, enquanto a subfamília Caesalpinioideae é parafilética em relação as outras duas subfamílias.

As análises baseadas em dados moleculares fornecem uma quantidade de dados filogeneticamente informativos. A escolha do gene, ou marcador, é de grande importância, pois a região do DNA a ser analisada deve variar de acordo com o nível taxonômico que está sendo considerado. As regiões não codificadoras são mais usadas em estudos de níveis taxonômicos baixos, já nos estudos de taxa mais elevados, as seqüências a serem analisadas devem corresponder a regiões codificadoras, que sofrem alta pressão seletiva, sendo, portanto, mais conservadas (SMALL *et al.*, 1998). Nas análises de filogenia pode-se utilizar DNA nuclear (ncDNA) ou DNA cloroplastial (cpDNA). Recomenda-se utilizar diferentes marcadores, sendo pelo menos um deles nuclear (ncDNA).

Diversos genes podem ser úteis para a determinação das relações evolucionárias e a identificação de marcadores genéticos a nível intraespecífico, como os genes ITS, as regiões intergênicas entre os genes *trnL-trnF*, *rpl16-rpl14* *atpF-atpA*, dentre outros (TABERLET *et al.*, 1991).

HOSOKAWA *et al.* (2004) usaram gene *rpl16* e a região espaçadora de *rpl16-rpl14* para distinguir entre seis espécies do gênero *Papaver* (Papaveraceae). Comparando-se a seqüência de nucleotídeos foi possível distinguir cinco espécies: *P. bracteatum*, *P. orientale*, *P. pseudo-orientale*, *P. rhoeas* and *P. setigerum* e *P. somniferum*, enquanto as seqüências de *P. setigerum* e *P. somniferum* foram idênticas.

HOSOKAWA *et al.* (2005) utilizaram o gene *rpl16* e a região espaçadora de *rpl16-rpl14* para discriminar entre seis espécies do gênero *Scutellaria* (Lamiaceae). Os autores encontraram cinco diferenças de nucleotídeos na seqüência do gene *rpl16* e seis diferenças na seqüência espaçadora e o alinhamento das seqüências permitiu a distinção de seis espécies (*Scutellaria altissima*, *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria galericulata*, *Scutellaria incana*, *Scutellaria indica* e *Scutellaria lateriflora*).

TOMARI *et al.* (2002) discutiram a classificação do gênero *Cistanche* (Lamiaceae) baseado na amplificação do gene *rps2* e da região intergênica de *rpl16-rpl14*. Este gênero é muito utilizado na medicina chinesa e sua identificação baseada somente em características morfológicas é difícil. Os resultados encontraram variações intraespecíficas em *C. salsa* e *C. tubulosa* entre populações geográficas diferentes, fato não observado para *C. deserticola*. A árvore filogenética construída a partir das seqüências do gene *rps2* e da região intergênica de *rpl16-rpl14* obtidas

revelou que *C. salsa* e *C. deseticola* são espécies próximas, enquanto *C. tubulosa* é um grupo mais distante.

HOSOKAWA *et al.* (2006) utilizaram a região intergênica entre *atpF* e *atpA*, para identificar três variedades da espécie *Angelica acutiloba* (Apiaceae). Estas variedades não são facilmente distinguidas morfológicamente, mas com a utilização desta região do gene plasmidial foi possível diferenciar as três variedades (var. *acutiloba*, var. *iwatensis* e var. *sugiyame*).

Os genes do RNA ribossomal nuclear estão localizados em clusters de seqüência altamente repetitiva. Estes genes estão separados por espaçadores internos transcritos (ITS), sendo que o ITS1 está localizado entre os genes 18S e 5.8S, e o ITS2 entre os genes 5.8S e 26S. Este gene aliado ao espaçador intergênico entre os RNAs transportadores da leucina e fenilalanina (*trnL-trnF*) foram os escolhidos para serem utilizados neste trabalho. Estes genes são muito utilizados em trabalhos de taxonomia de leguminosas. Estudos envolvendo os gêneros *Leonardoxa*, *Trifolium*, *Gentiana*, *Genista*, *Gleditsia*, *Cystisus*, *Astragalus*, dentre outros, todos pertencentes à família Leguminosae foram realizados utilizando estes genes. (GIELLY *et al.*, 1996; SCHNABEL; WENDEL, 1998; WOJCIECHOWSKI; SANDERSON; HU, 1999; ALLAN; PORTER, 2000; BROUAT; GIELLY; McKEY, 2001; CUBAS; PARDO; TAHIRI, 2002; PARDO; CUBAS; TAHIRI, 2004; ELLISON *et al.*, 2006).

1.4 ESPÉCIES UTILIZADAS NESTE TRABALHO

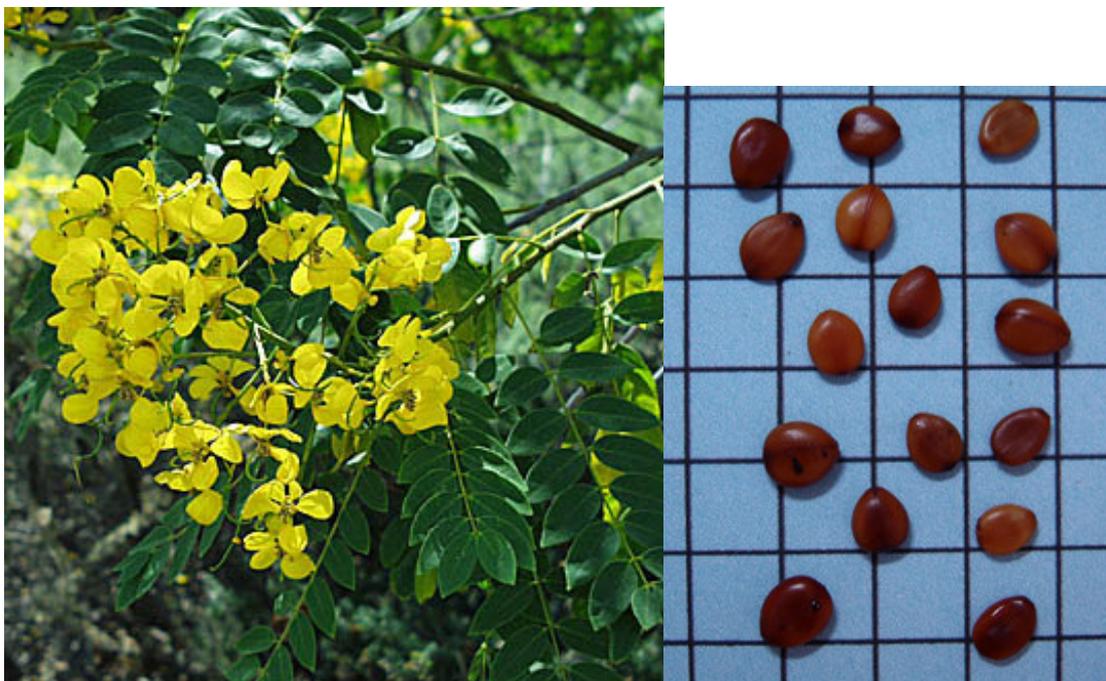
1.4.1 Subfamília Caesalpinioideae

Esta subfamília corresponde à cerca de 150 gêneros. São leguminosas arbustivas, arbóreas ou trepadeiras das matas, raramente são ervas. Apresentam folhas compostas, em geral, simplesmente pinadas ocorrendo também duplamente pinadas. Fruto em geral legume, às vezes falsamente septado, às vezes com uma só semente que cai envolta do endocarpo fibroso que funciona como asa (JOLY, 1998).

Esta família está muito bem representada no Brasil. O gênero com maior número de representantes é *Cassia*, conhecida por suas flores amarelas; outros gêneros freqüentes são: *Caesalpinia*, *Dimorphandra*, *Bauhinia*, *Copaifera*, *Hymenaea*, dentre outros (JOLY, 1998). As espécies utilizadas neste trabalho que pertencem a esta subfamília foram: *Cassia fastuosa*, *Delonix regia*, *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*.

1.4.1.1 *Cassia fastuosa*

A *Cassia fastuosa* (Figura 2), vulgarmente conhecida por cassia, é uma árvore da subfamília Caesalpinioideae, que apresenta comumente 8 a 12 metros de altura, podendo atingir até 40 metros, com tronco de 1.5-6 dm de diâmetro, podendo chegar a 1 m. A espécie é encontrada em floresta de terra firme, sobrevivendo entre capoeiras, é uma árvore sombreira em pastos, originalmente nativa de beiras rios e clareiras naturais (LORENZI, 1992).

FIGURA 2 – FLORES E SEMENTES DE *Cassia fastuosa*

FONTE: [www.metafro.be/prelude/view_symptom?si=V\(092\)](http://www.metafro.be/prelude/view_symptom?si=V(092)). Acessado em 2 jan. 2008

1.4.1.2 *Delonix regia*

Flamboyant é o nome vulgar da espécie *Delonix regia* (Figura 3), pertencente a subfamília Caesalpinioideae. É uma árvore de médio porte que cresce em regiões quentes a úmidas da Índia, África e América (zonas tropicais). Empregada na arborização de parques e jardins, e muito apreciada pelas qualidades ornamentais de suas flores. Suas flores são vermelhas e alaranjadas e suas vagens são compridas e grandes, contendo em média 20 sementes, com valvas que se enroscam e abrem na maturação, lançando as sementes à curta distância (BAILEY, 1954; BRAGA, 1976).

FIGURA 3 – ASPECTO GERAL E SEMENTES DE *Delonix regia*

FONTE: www.arbolesornamentales.com/Delonixregia.htm. Acessado em 2 jan. 2008

1.4.1.3 *Schizolobium amazonicum*

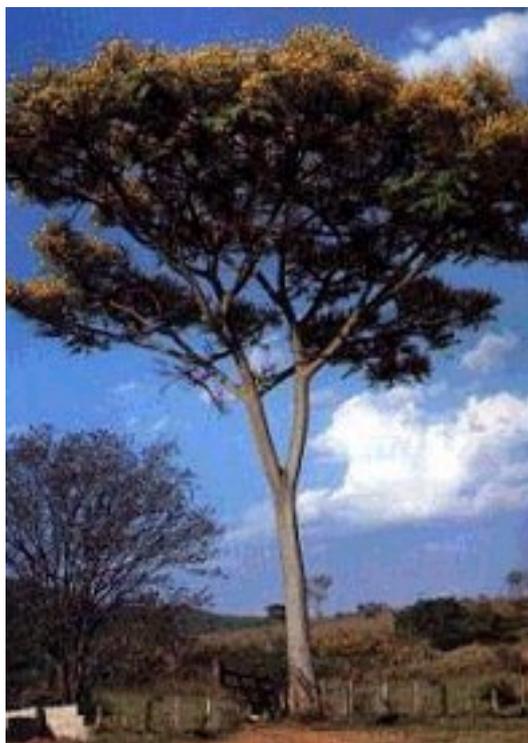
O *Schizolobium amazonicum* (Figura 4) é uma árvore nativa, que pertence à subfamília Caesalpinioideae. Ocorre abundantemente na Amazônia, sendo conhecido como pinho cuiabano, paricá ou faveira. É uma planta de grande porte e crescimento veloz, muito semelhante ao *Schizolobium parahybae*, porém distingue-se dele por florescer sem folhas, pelas flores e frutos menores, bem como pétalas mais oblongas, mais firmes e pedicelos articulados (RIZZINI, 1987). Durante algum tempo foi considerada como *Schizolobium parahybae*, entretanto estudos posteriores indicaram tratar-se de uma espécie autônoma, apesar dos caracteres quase idênticos. RIZZINI (1987) considera o gênero monotípico, classificando-o como *Schizolobium parahybae*, que se estenderia desde o sul do México, passando pela América Central e Amazônia até o sul do Brasil.

FIGURA 4 – ASPECTO GERAL E SEMENTES DE *Schizolobium amazonicum*

FONTE: heartgarden.com.au/shopping.asp?action=viewcart. Acessado em 9 jan. 2008

1.4.1.4 *Schizolobium parahybae*

O *Schizolobium parahybae* (Figura 5) é vulgarmente conhecido como guapuruvu, ficheira, faveira ou birosca e pertence à subfamília Caesalpinioideae. É uma árvore de grande porte, atingindo até 30 metros de altura e caule com mais de 1 metro de diâmetro, sendo uma das espécies de crescimento mais rápido na mata Atlântica. Possui tronco reto, cilíndrico, de casca lisa e cor cinzenta. As flores são bipenadas e os frutos bivalves com aproximadamente 16 cm de comprimento (RIZZINI, 1987).

FIGURA 5 – ASPECTO GERAL DE *Schizolobium parahybae*

FONTE: www.arvores.brasil.nom.br/florin/guapuru.htm. Acessado em 9 jan. 2008

1.4.2 Subfamília Mimosoideae

Esta subfamília, que é a menor dentre as leguminosas, compreende cerca de 40 gêneros. São plantas arbustivas ou arbóreas, de folhas, frequentemente, duplamente pinadas. As flores estão reunidas em inflorescências esféricas ou alongadas. O fruto seco, tipo legume ou indeiscente, possui sementes mergulhadas em polpa doce ou do tipo lomento (JOLY, 1998).

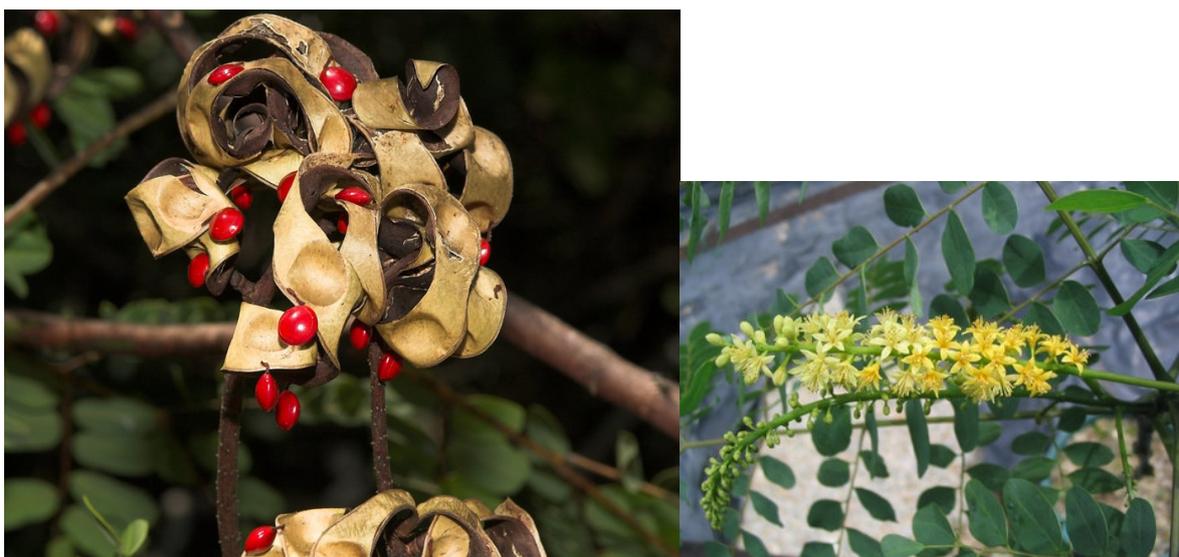
Representantes desta subfamília são abundantes nas regiões tropicais. Dentre os gêneros que se destacam no Brasil pelo número de espécies destacam-se os gêneros: *Mimosa*, *Calliandra*, *Parkia* e *Piptadenia* (JOLY, 1998). As espécies

utilizadas neste trabalho pertencentes a esta subfamília foram *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala*.

1.4.2.1 *Adenantha pavonina*

Popularmente conhecida como carolina, *Adenantha pavonina* (Figura 6) pertence a subfamília Mimosoideae. É uma planta nativa da Ásia e África tropical, que foi transplantada para toda a América tropical. Apresenta até 15 metros de altura e é empregada na arborização de parques e jardins. As folhas, pecioladas, apresentam de dois a cinco pares de pinas opostas, com seis a dez folíolos curtos e peciolados. Apresentam flores amarelo-pálidas ou raramente brancas. Suas vagens são compridas, estreitas, com valvas que se enroscam na maturação, lançando as sementes a curta distancias (JOLY, 1998).

FIGURA 6 – SEMENTES E FLOR DE *Adenantha pavonina*



FONTE: www.rainforestmagic.com.au/nikon-d70s.html. Acessado em 2 jan. 2008

1.4.2.2 *Leucaena leucocephala*

A *Leucaena leucocephala* (Figura 7), conhecida como leucena, é uma planta da subfamília Mimosoideae que pode ocorrer na forma de arbusto ou árvore pequena, entre 5 e 10 metros de altura. Folhas alternas bipinadas, com 25 cm de comprimento; entre 4-9 pares de pinas, com 8-10 cm. As vagens são agrupadas, achatadas, com 10-15 cm de comprimento e 2 cm de largura, marrom-escura, com um bico no ápice; cada vagem contém aproximadamente 20 sementes de coloração marrom, com 6 mm de comprimento (LORENZI, 1992).

FIGURA 7 – ASPECTO GERAL E SEMENTES DE *Leucaena leucocephala*



FONTE: www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html. Acessado em 2 jan. 2008

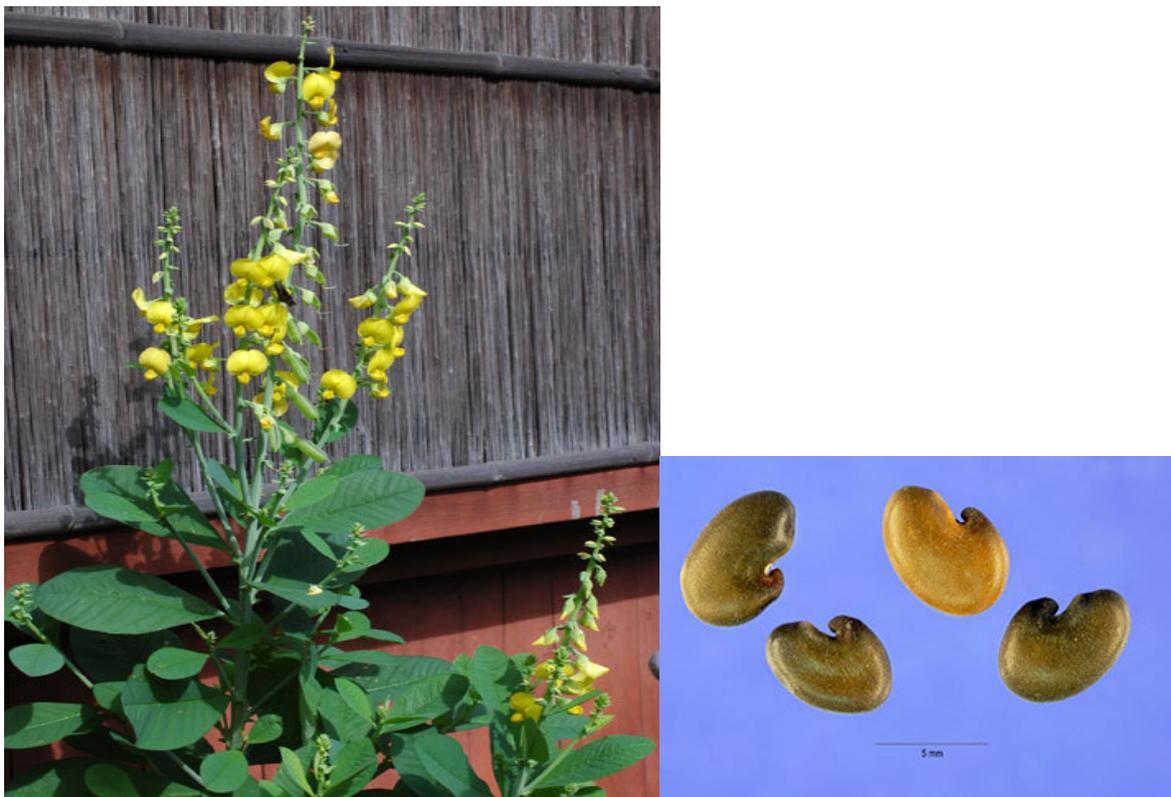
1.4.3 Subfamília Faboideae

Esta subfamília corresponde a 400 gêneros, sendo a maior entre as leguminosas. As folhas deste grupo são normalmente trifoliadas e as flores fortemente zigomorfas. O fruto em geral, é legume raramente indeiscente (JOLY, 1998).

Pertencem a esta subfamília todos os principais legumes utilizados pelo homem, como: *Phaseolus* (feijão), *Lens* (lentilha), *Glycine* (soja), *Arachis* (amendoim), entre outros. Dentre os gêneros nativos se destacam: *Erythrina*, *Desmodium*, *Andira*, *Sophora* e *Clitoria* (JOLY, 1998). As espécies *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* foram escolhidas como representantes desta subfamília neste trabalho.

1.4.3.1 *Crotalaria juncea*

Esta espécie (Figura 8), pertencente à subfamília Faboideae, é originária da Índia, com ampla adaptação a regiões tropicais. As plantas são arbustivas, de crescimento ereto, podendo atingir de 3,0 a 3,5 metros de altura. Possui um bom sistema radicular, que melhora a infiltração de água, e boa capacidade de fixar nitrogênio, promovendo, assim, uma elevada reciclagem de vários nutrientes no perfil do solo, contribuindo para um aumento de rendimento nos cultivos posteriores (BAILEY, 1954; BRAGA, 1976).

FIGURA 8 – ASPECTO GERAL E SEMENTES DE *Crotalaria juncea*

FONTE: plants.usda.gov/java/profile?symbol=CRJU. Acessado em 2 jan. 2008

1.4.3.2 *Sesbania virgata*

A *Sesbania virgata* (Figura 9) é uma espécie arbórea e de ocorrência natural no Brasil. Pertence a subfamília Faboideae, sendo recomendada para recuperação de áreas degradadas, com cerca de 6 m de altura. O fruto de *Sesbania virgata* é um legume indeiscente medindo entre 5 cm e contendo de 2 a 6 sementes. A semente é endospermica de coloração marrom, com 1 cm de comprimento (ARAÚJO *et al.*, 2004).

FIGURA 9 – ASPECTO GERAL E SEMENTES DE *Sesbania virgata*

FONTE: plants.usda.gov/java/profile?symbol=SEV17. Acessado em 2 jan. 2008

A partir do que foi exposto, nesta dissertação, comparou-se galactomananas de espécies pertencentes às diferentes subfamílias de Leguminosae e identificou-se a presença de mananas como resíduo insolúvel nas sementes das espécies estudadas. Para isto foram utilizados dois exemplares para cada subfamília: *Cassia fastuosa* e *Delonix regia* (Caesalpinioideae); *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala* (Mimosoideae); *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* (Faboideae).

Além disso, verificou-se a validade da utilização destes polissacarídeos como critério taxonômico dentro da família Leguminosae através do sequenciamento de DNA. Para isto, genes das espécies *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*, que apresentam grande similaridade nas estruturas de galactomananas, foram amplificados e seqüenciados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e comparar as galactomananas e os resíduos finais no endosperma de sementes de espécies das diferentes subfamílias de leguminosas e comprovar o caráter taxonômico das galactomananas utilizando seqüenciamento de DNA para classificação taxonômica das espécies do gênero *Schizolobium*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar o endosperma de sementes de *Cassia fastuosa*, *Delonix regia*, *Adenanthera pavonina*, *Leucaena leucocephala*, *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*.
- ✓ Extrair e caracterizar as galactomananas presentes no endosperma de *C. fastuosa*, *D. regia*, *A. pavonina*, *L. leucocephala*, *C. juncea* e *S. virgata* através de extrações aquosas e alcalinas.
- ✓ Caracterizar os resíduos finais obtidos após a remoção das galactomananas.
- ✓ Extrair o DNA cromossomal de *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*.
- ✓ Amplificar e sequenciar o gene ITS e a região espaçadora do gene *trnL – trnF* de *S. amazonicum* e *S. parahybae*.
- ✓ Utilizar os resultados obtidos para caracterização taxonômica das espécies do gênero *Schizolobium*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MÉTODOS GERAIS

Foram utilizados solventes e reagentes de grau de pureza PA - ACS. Os solventes foram removidos em evaporador rotatório a vácuo em temperatura de 50°C para as soluções de polissacarídeos e 40°C para hidrolisados e metilados.

As dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS, 1956), utilizando-se padrão de manose e as leituras efetuadas a 490 nm em espectrofotômetro BIOSPECTRO modelo SP-22.

As centrifugações durante as etapas de extração dos polissacarídeos e do DNA foram realizadas em centrifugas HITACHI HIMAC CR 21E ou SORVALL T6000D.

3.2 OBTENÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de *Delonix regia*, *Leucaena leucocephala* e *Schizolobium parahybae* foram adquiridas junto ao IPEF (Instituto de Pesquisas Florestais).

As sementes de *Adenantha pavonina* foram gentilmente cedidas pelo Dr. Renato Moreira, da Universidade Federal do Ceará.

As sementes de *Cassia fastuosa* foram coletadas em espécimes utilizados na arborização da cidade de Curitiba. A espécie possui uma exsicata no Herbário (UPCB) do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, sob o número 5904.

As sementes de *Schizolobium amazonicum* foram fornecidas pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa na Agropecuária) – CPATU – Belém, Pará. Um exemplar está depositado, sob o número 158478, no Herbário (IAN).

As sementes de *Sesbania virgata* e *Crotalaria juncea* foram doadas pelo Dr. Sérgio Miana de Faria (EMBRAPA Agrobiologia) e pelo Sr. José Aparecido Donizeti Carlos (Piraí Sementes), respectivamente.

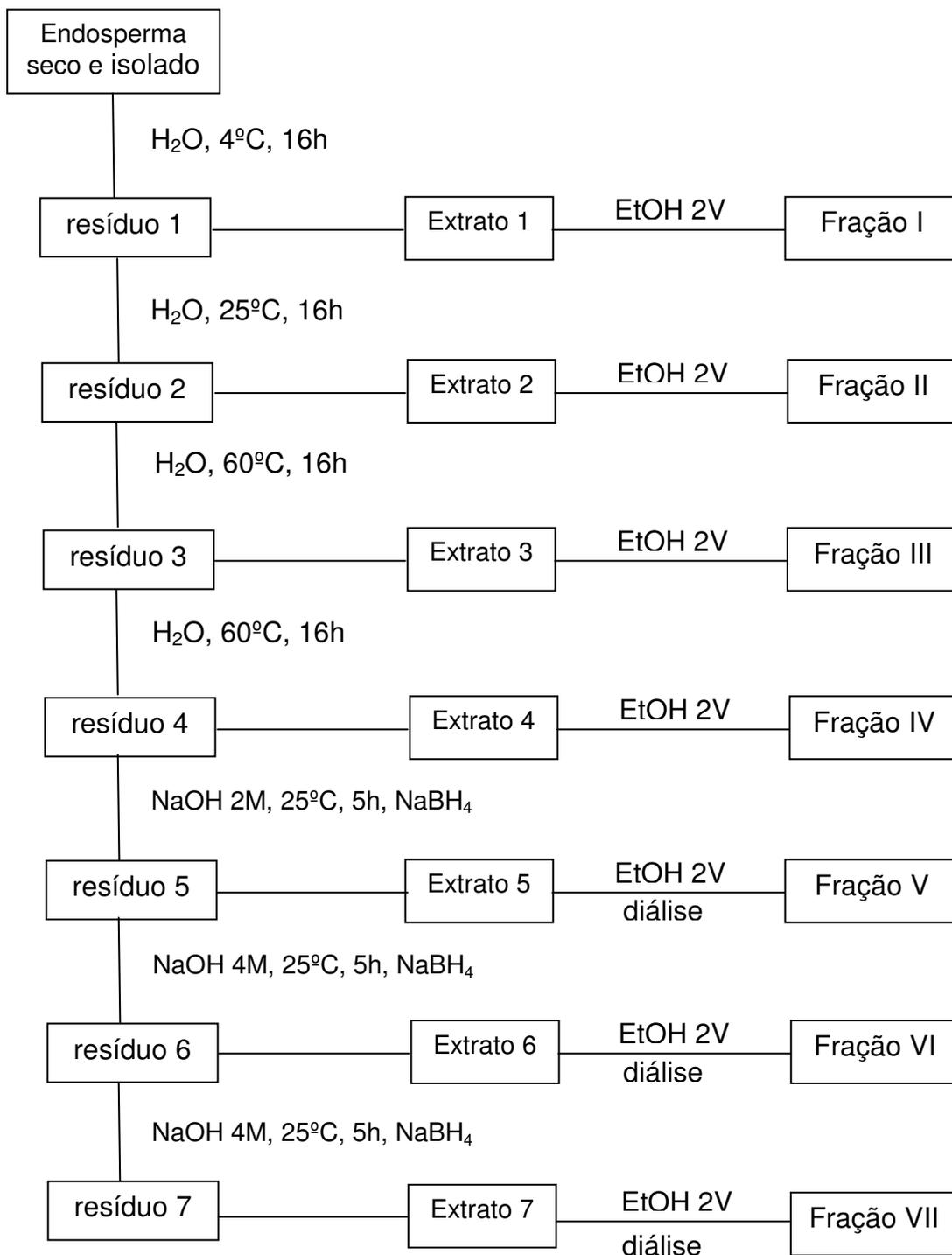
3.3 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Inicialmente as sementes foram submetidas à fervura em água por aproximadamente 20 minutos, para inativação das enzimas endógenas presentes nas sementes. As sementes permaneceram imersas em água por 24 horas e, após esse período, o endosperma foi separado do tegumento e do embrião e seco em estufa a vácuo. Para obtenção das galactomananas, os endospermas isolados e secos foram submetidos a extrações aquosas seqüenciais durante 16 horas, nas temperaturas de: 4°C, 25°C e 60 °C, sendo esta última realizada duas vezes. Após as extrações aquosas seqüenciais, o endosperma foi submetido a extrações aquosas alcalinas seqüenciais, na presença de NaBH₄, com NaOH 2 M e duas extrações com NaOH 4 M (Figura 10). As frações originadas foram centrifugadas a 10000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante precipitado com a adição de dois volumes de etanol absoluto.

O precipitado foi lavado três vezes com etanol absoluto e seco em estufa a vácuo. As frações originadas das extrações alcalinas foram solubilizadas em água e dialisadas contra água corrente por dois dias para remoção do excesso de álcali.

Para obtenção dos resíduos finais, os endospermas restantes das extrações seqüenciais foram submetidos a extrações alcalinas até completa remoção dos polissacarídeos solúveis.

FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DOS ENDOSPERMAS DAS SEMENTES



O fluxograma de extrações (Figura 10) foi o mesmo para as espécies estudadas. Para a identificação das frações resultantes das extrações, utilizou-se a inicial do nome científico da espécie seguida do número romano que identifica a seqüência da extração. No caso das espécies cujo nome científico inicia-se com a mesma letra, a segunda letra do nome científico foi utilizada em uma das espécies como forma de diferenciação (Tabela 1).

TABELA 1 - RESUMO DA NOMENCLATURA DAS FRAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS.

	Fração	<i>Adenanthera</i>	<i>Cassia</i>	<i>Crotalaria</i>	<i>Delonix</i>	<i>Leucaena</i>	<i>Sesbania</i>
Extração	originada	<i>pavonina</i>	<i>fastuosa</i>	<i>juncea</i>	<i>regia</i>	<i>leucocephala</i>	<i>virgata</i>
H ₂ O 4°C	I	A I	C I	R I	D I	L I	S I
H ₂ O 25°C	II	A II	C II	R II	D II	L II	S II
H ₂ O 60°C	III	A III	C III	R III	D III	L III	S III
H ₂ O 60°C	IV	A IV	C IV	R IV	D IV	L IV	S IV
NaOH 2M	V	A V	C V	R V	D V	L V	S V
NaOH 2M	VI	A VI	C VI	R VI	D VI	L VI	S VI
NaOH 4M	VII	A VII	C VII	R VII	D VII	L VII	S VII

3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

As hidrólises ácidas foram realizadas por dois métodos:

- para as galactomananas - TFA 1M, durante 5 horas a 100°C. Ao término da hidrólise o ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965)
- para os resíduos finais - H₂SO₄ 72% (p/p), durante 1 hora, em banho gelo, seguido de diluição para 7% a 100°C, durante 6 horas. Ao final da hidrólise o

ácido foi neutralizado com carbonato de bário e o sal resultante removido por filtração (SEAMAN *et al.*, 1954).

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4), em meio aquoso, a 25°C (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Em seguida, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica Lewatit S-100 para remoção do cátion sódio (Na^+) e para decompor o excesso de agente redutor. A seguir, o material foi filtrado, evaporado até securo e lavado sucessivamente com metanol para a remoção do ácido bórico remanescente, na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1 v/v) durante 16 horas a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). O processo foi interrompido com adição de gelo moído e o material acetilado extraído com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% (m/v) e água de forma intercalada. A fase clorofórmica foi transferida a um tubo de hemólise, evaporada a temperatura ambiente e analisada por cromatografia líquido-gasosa.

Para as análises de cromatografia líquido-gasosa (GLC) utilizou-se um cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 A II, equipado com detector de ionização em chama, utilizando nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Foi utilizada uma coluna capilar [30 m x 0,25 mm de diâmetro] DB-225, com espessura de filme 0,25 μm , sendo a temperatura do detector 300°C e do injetor 250°C (SLONEKER, 1972).

3.5 POLARIMETRIA

As análises de rotação óptica foram efetuadas em polarímetro digital PDA 8200-ACATEC, em lâmpada de halogênio com filamento de tungstênio, filtro de 589 nm e caminho óptico de 1,0 dm. As galactomananas foram solubilizadas em água em uma concentração de 0,5% (m/v). As mananas foram solubilizadas em uréia 50%, posteriormente, centrifugadas, sendo que os sobrenadantes foram utilizados na leitura de rotação óptica. A concentração de polissacarídeos dos sobrenadantes foi determinada pelo método do fenol-sulfúrico. Os valores experimentais do ângulo de desvio da luz plano polarizada α , fornecidos pelo aparelho, foram utilizados para o cálculo da rotação óptica específica dos polissacarídeos, $[\alpha]_D^{25}$, das soluções conforme a equação: $[\alpha]_D^{25} = \alpha/L.c \times 100$, onde: L corresponde ao comprimento do caminho óptico (dm) e c a concentração da solução.

3.6 CROMATORAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRICA ACOPLADA A DETECÇÃO POR ESPALHAMENTO DE LASER MULTIÂNGULOS E ÍNDICE DE REFRAÇÃO (HPSEC-MALLS/RI)

As amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio (NaNO_2) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo azida de sódio (NaN_3) $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ para uma concentração final de 1 mg.mL^{-1} , sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de $0,22 \mu\text{m}$. Em seguida foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) equipado com detector de índice de refração diferencial, modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas, quatro colunas de gel permeação WATERS em série,

com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 . O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo azida de sódio $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, com fluxo de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$, monitorado através de bomba peristáltica WATERS 515.

3.6.1 Determinação do dn/dc e Cálculo da Massa Molar das galactomananas

A taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) foi determinada para as galactomananas obtidas a partir da primeira extração de *Adenantha pavonina*, *Crotalaria juncea*, *Leucaena leucocephala* e *Sesbania virgata*, sendo que para cada amostra foram utilizadas cinco concentrações. Para isto, foi preparada uma solução na concentração de 1 mg.mL^{-1} em NaNO_2 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo NaN_3 $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, filtrada em membrana de $0,45 \mu\text{m}$, sendo então diluídas. As massas molares foram determinadas a partir do perfil de eluição e valores de dn/dc . Os cálculos foram efetuados pelo software ASTRA.

3.7 DETERMINAÇÃO DO dn/dc E CÁLCULO DA MASSA MOLAR DAS MANANAS

Para a determinação da taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) para as mananas, as amostras foram solubilizadas em uréia 50% (m/v) e centrifugadas posteriormente. A concentração de polissacarídeo dos sobrenadantes obtidos foi determinada pelo método do fenol-sulfúrico, a partir do qual foram realizadas as diluições das amostras utilizando-se cinco concentrações. Para cada concentração obtida foram realizadas leituras do índice de refração em refratômetro manual. O valor de dn/dc foi obtido a partir do coeficiente angular da curva índice de refração x concentração da amostra.

A fim de calcular a massa molar das mananas utilizou-se o gráfico de Zimm Plot, que consiste na varredura de diversas concentrações de amostra por diversos ângulos de espalhamento de luz. A partir deste gráfico, é possível obter-se os valores de massa molar, R_g (raio de giro) e A_2 (coeficiente virial). As análises de Zimm Plot foram realizadas em equipamento de espalhamento de luz dinâmico BROOKHAVEN INSTRUMENTS, o qual inclui um goniômetro BI-200SM, um fotomultiplicador e um autocorrelator digital com laser He-Ne (632.8nm) como fonte de luz. As medidas foram realizadas a 25°C utilizando o ângulo de 90° como referência. As mananas foram solubilizadas em uréia 50% (m/v), centrifugadas e o sobrenadante utilizado para as análises de Zimm Plot. A concentração de açúcar dos sobrenadantes foi determinada pelo método do fenol-sulfúrico, a partir do qual foram realizadas as diluições das amostras. As amostras foram diretamente filtradas em vials cilíndricos de 25 mm de diâmetro, utilizando membranas de acetato de celulose com poro de 0,22 μm , que foram imersos em banho de decalina a temperatura de 25°C. As leituras foram realizadas utilizando cinco concentrações entre 0,1 e 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e com ângulos de 30° a 150°.

3.8 ANÁLISES DE METILAÇÃO

3.8.1 Metilação das galactomananas

As galactomananas secas foram metiladas duas vezes pelo método de CIUCANU e KEREK (1984). Solubilizou-se 10 mg do polissacarídeo em 0,5 mL de DMSO, seguida da adição de cerca de 200 mg de NaOH seco e pulverizado. O sistema foi agitado durante 20 minutos em aparelho Vortex, adicionando-se em

seguida 0,5 mL de iodeto de metila, repetindo-se a agitação em aparelho Vortex por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de gelo e ácido acético até neutralidade. O polissacarídeo metilado foi extraído três vezes com clorofórmio e a fase clorofórmica que contém os monossacarídeos metilados foi lavada cerca de 10 vezes com água.

Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados com H_2SO_4 72% (p/v), reduzidos, acetilados e analisados por cromatografia líquido gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS). As análises por GLC-MS foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN-MAT, com injetor a 50°C e “rampa” de 50°C por minuto até 220°C , equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,52 mm de diâmetro) revestidas com OV-225 e gás hélio como gás de arraste (1mL/minuto).

3.8.2 Metilação das mananas

As mananas foram metiladas de acordo com o método de Haworth, conforme descrito por HIRST e PERCIVAL (1960). O polissacarídeo (10 mg) foi solubilizado em 10 mL de NaOH 40% (m/v) em presença de NaBH_4 . Em intervalos de 30 minutos, por 10 vezes, foram adicionadas alíquotas de dimetil sulfato e o sistema permaneceu sob agitação, a temperatura ambiente, por mais 18 horas após a décima adição do agente metilante. O processo de adição do dimetil sulfato em intervalos de 30 minutos (10 vezes) é repetido e após a última adição foi acrescentado 50 mL de água e o sistema levado a ebulição por 30 minutos sob refluxo. Após o resfriamento, o meio foi neutralizado com ácido acético, em banho de gelo, dialisado e seco em rotaevaporador. Após este procedimento, o

polissacarídeo foi submetido a uma metilação pelo método de Ciucanu e Kerek, conforme já descrito (item 3.8.1).

Os polissacarídeos metilados foram hidrolisados com H₂SO₄ 72% (p/v), reduzidos, acetilados e analisados por cromatografia líquido gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS). As análises por GLC-MS foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN-MAT, com injetor a 50°C e “rampa” de 50°C por minuto até 220°C, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,52 mm de diâmetro) revestidas com OV-225 e gás hélio como gás de arraste (1mL/minuto).

3.9 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As determinações de RMN foram realizadas em aparelho BRUKER, modelo AVANCE DRX-400, com ressonância de ¹³C, de 400MHz. As galactomananas e mananas foram solubilizadas em D₂O e solução de uréia 50% (m/v) em D₂O, respectivamente, e analisadas utilizando temperatura de 70°C. Para a amostra de celulose foi utilizado o solvente S1 (NaOH 8%/Tiouréia 6,5%/Uréia 8%/D₂O) e analisada a 25°C, conforme JIN et al. (2007). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante analisado. O tempo de análise foi de aproximadamente 12 horas, sendo utilizado acetona como padrão interno.

3.10 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro de policristais da marca SHIMADZU no Departamento de Física da Universidade Federal do Paraná, sob orientação do Prof. Dr. Irineu Mazzaro. O aparelho estava configurado na forma de varredura θ - 2θ , usando tubo de Cu e monocromador no feixe de saída. Os polissacarídeos foram colocados em um suporte padrão de alumínio com varreduras de 3° a 60° , com “scan” de 2° por minuto.

3.11 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Para extração do DNA a partir de folhas jovens, as sementes de *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae* foram germinadas. As sementes foram lavadas com água destilada e desinfetadas com hipoclorito de sódio 1% (v/v) por 20 minutos, seguido de nova lavagem com água destilada. Em seguida, as sementes foram mergulhadas em água recém-fervida para quebra de dormência, e deixadas 24 horas em água para embebição. As sementes que apresentaram inchamento foram plantadas em cubas plásticas (40 cm de comprimento x 26 cm de largura x 7,3 cm de altura) contendo vermiculita autoclavada, sob condições ambientais não controladas. Após o rompimento da radícula, as sementes foram plantadas em vasos contendo terra autoclavada, onde foram mantidas até o aparecimento dos folíolos. O tempo aproximado para aparecimento dos folíolos foi de duas semanas.

3.12 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

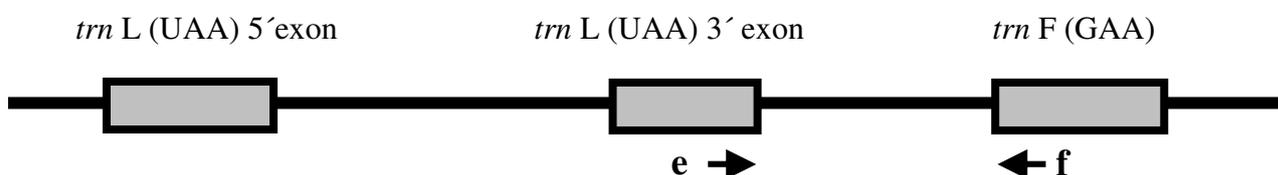
O DNA genômico foi isolado a partir dos folíolos de *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*, após germinação, utilizando o protocolo de DOYLE e DOYLE (1990) modificado. De acordo com este protocolo, cerca de cinco gramas de tecido foliar fresco foram moídos com repetidas adições de nitrogênio líquido e transferido para um tubo de propileno (50 mL) contendo 20 mL de tampão de extração pré aquecido a 65°C (CTAB 2%; NaCl 1,4M; Na₂EDTA 20mM pH 8; 100 mM Tris-HCl, pH 8 e β-mercaptoetanol 0,25%). Esta solução foi levemente agitada e incubada a 65°C durante uma hora em banho de água, resfriado a temperatura ambiente seguido da adição de volume equivalente de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução resultante foi agitada e centrifugada a 15.000 rpm, por 15 min a temperatura de 28°C. Em seguida o extrato aquoso superior foi transferido para uma proveta e o DNA precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto. O precipitado foi centrifugado a 7000 rpm por 10 min a 28°C e lavado com etanol 70%, duas vezes e seco em estufa a vácuo a temperatura ambiente para remoção do etanol residual. Por fim, o DNA foi solubilizado em cerca de 1,5 mL de água milli-Q estéril, mantido a temperatura ambiente por 24 horas, transferido para tubos plásticos de 1 mL e estocado a 4°C. Para confirmar a identidade do material obtido o DNA foi submetido a uma eletroforese em gel de ágar 1% (5 V/cm) em tampão TBE (Trisbase 89 mmol/L, Tris ácido bórico 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L pH 8,0), durante aproximadamente 40 min, corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL e fotografado sob luz UV para avaliação aproximada da qualidade e concentração do DNA.

3.13 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO INTERGÊNICA DO GENE *trnL* - *trnF*

A amplificação da região intergênica do gene *trnL-trnF* foi obtida através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase) utilizando-se um termociclador EPPENDORF MASTER CYCLE. Para uma reação de PCR com volume final de 25 μL , utilizou-se 100 ng do DNA genômico como molde; 2,5 μL de tampão da reação Taq DNA polimerase 10X (concentração final: Tris HCl 20 mmol.L^{-1} , KCl 50 mmol.L^{-1}); 2 mmol.L^{-1} de MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de dNTP, 1 U da Taq DNA polimerase e 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada primer e o volume foi completado com água MilliQ estéril. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para esta reação foram os primers “e”: 5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC -3' e “f”: 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG -3', conforme descrito por WHITE *et al.* (1991). Os primers foram comprados da empresa RW Genes. O esquema de anelamento destes primers está mostrado na Figura 11.

A reação de amplificação foi realizada com os seguintes ciclos de temperaturas: 1) 94°C/ 5 min (1 ciclo), 2) 95°C/ 30 s, 50°C/ 30 s, 72°C/ 2 min (35 ciclos) 3) 72°C/ 5 min. Para confirmação da amplificação, 2,0 μL da reação foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% ou agar 1% em tampão TBE. A eletroforese foi desenvolvida em 5V/cm por aproximadamente 2 horas, coradas com brometo de etídeo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e fotografado sob luz UV para avaliação do sucesso da reação.

FIGURA 11 – ESQUEMA DE ANELAMENTO DOS PRIMERS “e” (FORWARD) E “f” (REVERSE)



3.14 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS

A amplificação da região ITS foi obtida através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase) utilizando-se um termociclador EPPENDORF MASTER CYCLE. Para uma reação de PCR com volume final de 50 μ L, utilizou-se 0,1 μ L do DNA genômico (100 ng) como molde; 5,0 μ L de tampão da reação Taq DNA polimerase 10X (concentração final: Tris HCl 20 mmol.L⁻¹, KCl 50 mmol.L⁻¹); 2 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 200 μ mol.L⁻¹ de dNTP, 1 U da Taq DNA polimerase e 0,5 μ mol.L⁻¹ de cada primer. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para esta reação foram os primers “ITS5”: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3' e “ITS4”: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', conforme descrito por WHITE *et al.* (1991). Os primers foram comprados da empresa RW Genes.

A reação de amplificação foi realizada com os seguintes ciclos de temperaturas: 1) 94°C/ 5 min (1 ciclo), 2) 94°C/ 30 s, 54°C/ 30 s, 72°C/ 2 min (35 ciclos) 3) 72°C/ 5 min. Para confirmação da amplificação, 2,0 μ L da reação foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% ou agar 1% em tampão TBE.

A eletroforese foi desenvolvida em 5V/cm por aproximadamente 2 horas, coradas com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e fotografado sob luz UV para avaliação do sucesso da reação.

3.15 PURIFICAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO

Para a preparação dos produtos de PCR para a reação de sequenciamento foi realizada uma etapa de purificação, adicionando-se 12 µL de acetato de amônio 7,5 M e 70 µL de etanol absoluto. Os tubos foram incubados em gelo por 30 minutos e centrifugados por 20 minutos a 13000 rpm. O DNA foi lavado com etanol 80% duas vezes, seco a vácuo e dissolvido em 10 µL de água milli-Q estéril.

3.16 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR AMPLIFICADOS

Para a reação de sequenciamento foi utilizado 1 µL do produto de amplificação purificado; 4 µL de reativo ET (Dye Terminator Kit-Amersham Biosciences); 0,5 µL de primer e água milli-Q estéril até um volume de 10 µL. O programa usado no termociclador EPPENDORF MASTER CYCLE foi o seguinte: 95°C/ 20 s e 60°C/ 1 min 15 s (28 X). Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados adicionando-se 10 µL de água milli-Q estéril; 2 µL de acetato de amônio 7,5 mmol.L⁻¹ e 60 µL de etanol absoluto. Os tubos centrifugados por 15 min a 13000 rpm, descartado o sobrenadante e o produto lavado com etanol 70% duas vezes. O excesso de etanol foi removido usando dessecador a vácuo e as amostras foram mantidas a -20°C até análise no seqüenciador automático ABI 377.

3. 17 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Com a obtenção das seqüências isoladas a partir dos primers “e” e “f” de *Schizolobium amazonicum*, as seqüências foram alinhadas através do programa ClustalW. Posteriormente, utilizou-se este programa para alinhar as seqüências de *S. amazonicum* com as seqüências de espécies de maior similaridade obtidas através do programa BLAST. As seqüências alinhadas foram usadas para análise filogenética, através do método Neighbour-Joining e visualizadas através do programa PHYLIP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DAS ESPÉCIES *Cassia fastuosa* E *Delonix regia* PERTENCENTES À SUBFAMILIA CAESALPINIOIDEAE

O endosperma de *Cassia fastuosa*, isolado e seco, corresponde a 60% do peso da semente, um valor superior ao descrito por WHISTLER e SMART (1953) para espécies da subfamília Caesalpinioideae, cujo valor varia entre 8 e 40%. Já o conteúdo de endosperma das sementes de *Delonix regia* foi inferior ao determinado para *Cassia fastuosa*, correspondendo a 35% do peso seco das sementes, neste caso dentro da faixa descrita por WHISTLER e SMART (1953) para as Caesalpinioideae (8-40%).

As extrações seqüenciais do endosperma forneceram galactomananas (Tabela 2), que são os polissacarídeos predominantes nestas sementes, conforme já demonstrado em trabalhos anteriores (TAVARES, 1994; PETKOWICZ, 1998; BENTO, 2006).

O rendimento de galactomanana solúvel em água a temperatura ambiente para a *Cassia fastuosa* correspondeu a 30% do endosperma, valor semelhante ao obtido para outras espécies de subfamília Caesalpinioideae: *Cassia grandis* (37%), *Senna alata* (32%), *Dimorphandra mollis* (41%), entre outras. (DEA; MORRISON, 1975; DEY, 1978). Este valor está de acordo com a distribuição modal, em relação ao rendimento, da maioria das espécies de Caesalpinioideae proposta por BUCKERIDGE *et al.* (1995), onde a maioria das Caesalpinioideae possui um rendimento em termos de galactomanana solúvel a temperatura ambiente de 25,1 a 30%. O rendimento total de galactomananas solúveis em água obtidas a partir das

sementes de *Cassia fastuosa* corresponde a aproximadamente 55% do endosperma seco.

TABELA 2 – RENDIMENTO, RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE E ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE *Cassia fastuosa* E *Delonix regia* PERTENCENTES A SUBFAMÍLIA CAESALPINIOIDEAE

<i>Cassia fastuosa</i>				<i>Delonix regia</i>			
Fração	Rend. ^a	Man:Gal ^b	$[\alpha]_D^{25}$	Fração	Rend. ^a	Man:Gal ^b	$[\alpha]_D^{25}$
C I	21,2	3,0:1	+ 28,4 ^o	D I	4,7	3,0:1	+ 36,9 ^o
C II	8,7	3,2:1	+ 20,5 ^o	D II	4,4	3,4:1	+ 32,0 ^o
C III	23,2	4,0:1	+ 9,5 ^o	D III	23,3	4,0:1	+ 15,3 ^o
C IV	3,2	4,8:1	- 5,2 ^o	D IV	12,2	4,2:1	+ 10,6 ^o
C V	5,4	6,7:1	- 16,7 ^o	D V	8,8	4,8:1	- 2,7 ^o
C VI	4,0	6,8:1	- 30,7 ^o	D VI	6,5	5,2:1	- 3,3 ^o
C VII	1,6	10:1	- 31,7 ^o	D VII	5,0	6,8:1	- 9,0 ^o

(a): em relação ao endosperma seco (%)

(b): determinada por GLC

Para *Delonix regia*, o rendimento de galactomananas solúveis em água a temperatura ambiente foi de aproximadamente 10%, um valor considerado baixo para espécies da subfamília Caesalpinioideae (BUCKERIDGE *et al.*, 1995). Entretanto este rendimento é semelhante a espécies do gênero *Bauhinia*, cujas espécies *B. hollophylla* e *B. obtusata* apresentaram rendimentos de 13,7 e 10,8%, respectivamente (DEA e MORRISON, 1975). As frações com maior rendimento foram as extraídas com água a temperatura de 60°C, indicando que as galactomananas de *Delonix regia* são extraídas de forma mais eficientes a temperaturas mais altas. O rendimento total das galactomananas solúveis em água

para esta espécie correspondeu aproximadamente a 45% do endosperma seco, um conteúdo semelhante foi obtido para as espécies *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*, as quais pertencem à mesma subfamília que *Delonix regia* (GANTER *et al.*, 1993; PETKOWICZ *et al.*, 1998).

O alto percentual de galactomananas no endosperma é uma característica da subfamília Caesalpinioideae, enquanto baixos conteúdos são típicos da subfamília Faboideae. O rendimento em galactomananas solúveis em água no endosperma de *Cassia fastuosa* é superior ao descrito para *Ceratonia siliqua*, conhecida como goma guar, que é utilizada como fonte comercial de galactomanana (DEA; MORRISON, 1975).

Pode-se observar pela Tabela 2 que, a cada extração, a relação manose:galactose se altera de valores menores (galactomananas mais substituídas) para valores maiores (menor conteúdo de galactose) para ambas as espécies. As extrações do endosperma de *Cassia fastuosa* deram origem a galactomananas com valores crescentes de manose:galactose, variando de 3,0:1 até 10:1, indicando a presença de uma “família” de galactomananas. Para *Delonix regia*, inicialmente as galactomananas apresentam relação manose:galactose de 3,0:1 e esta relação decresce até o valor de 6,8:1. O aumento na relação manose:galactose está de acordo com a solubilidade destes polissacarídeos, que é esperada de diminuir com a redução no conteúdo de galactose (DEA; MORRISON, 1975).

A relação manose:galactose de ambas as espécies das galactomananas extraídas com água a temperatura ambiente manteve-se dentro da faixa de 3,0-3,5, que é a faixa onde se encontra a maioria das relações manose:galactose de espécies da subfamília Caesalpinioideae. Esta subfamília é a que apresenta os

maiores rendimentos em termos de galactomananas e a que apresenta polissacarídeos com as maiores relações manose:galactose dentre as subfamílias de leguminosas (BUCKERIDGE *et al.*, 1995).

Na literatura, a maioria das descrições de galactomananas de leguminosas envolve a caracterização de um único tipo de polissacarídeo (CHAUBEY; KAPOOR, 2001). Apesar da importância da relação manose:galactose nas diversas aplicações das galactomananas, a ocorrência de uma “família” de galactomananas em uma mesma semente tem sido pouco explorada. É o caso de KAPOOR (1972) que descreve a ocorrência de única galactomanana com relação manose:galactose de 2,0:1 em sementes de *Delonix regia*.

Entretanto, a ocorrência de uma “família” de galactomananas no endosperma de sementes de uma mesma espécie já foi descrita para *Gleditsia triacanthos*, onde foram isoladas quatro grupos de galactomananas com diferentes relações manose:galactose, obtidas por extrações aquosas a diferentes temperaturas (MANZI; MAZINNI; CERREZO, 1984). Uma “família” de galactomananas também foi obtida nas espécies de *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*, onde os endospermas destas espécies, submetidos a extrações aquosas a diferentes temperaturas, forneceram uma série de galactomananas com diferentes conteúdos de galactose (PETKOWICZ *et al.*, 1998).

A alteração nos valores de relação manose:galactose é acompanhada pela variação dos valores de rotação óptica específica. À medida que decresce o conteúdo de ramificações por α -galactose na cadeia da β -manana, a rotação óptica específica altera-se desde valores positivos para a galactomanana mais substituída para valores negativos e decrescentes com a redução da quantidade de galactose.

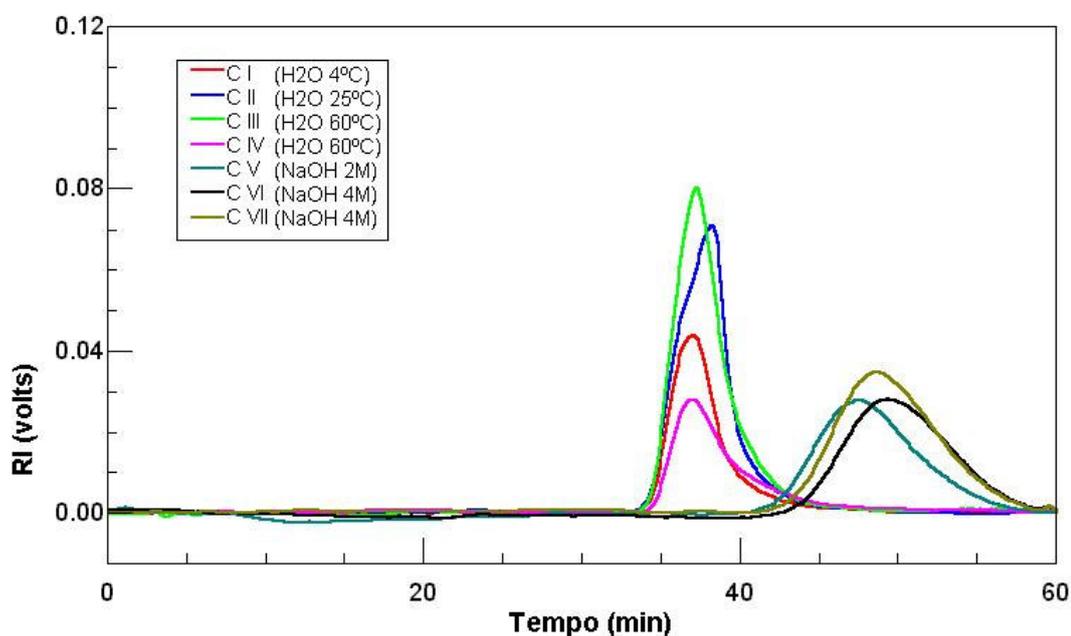
Os valores de rotação óptica específica mudam de + 28,4° para – 31,7° para *Cassia fastuosa* e de + 36,9° para – 9,0° para a galactomanana de *Delonix regia* (Tabela 2).

NOBLE *et al.* (1986) correlacionaram a rotação óptica específica com o conteúdo de galactose para uma ampla faixa de galactomananas. Estes estudos forneceram uma relação linear entre a rotação óptica específica e a proporção de galactose, que obedece a equação $[\alpha]_D^{25} = 268g - 44,5$, sendo g = conteúdo de galactose na galactomanana. Quando esta fórmula é aplicada as frações C I e D I, este polissacarídeo apresenta um conteúdo de galactose de 0,27 e 0,30, respectivamente, um valor próximo ao obtido por GLC que corresponde a 0,31.

Para verificar se as frações obtidas a partir das extrações seqüenciais de *Cassia fastuosa* eram homogêneas, todas as frações obtidas para esta espécie foram analisadas por HPSEC-RI, conforme mostrado na Figura 12. Todas as amostras mostraram-se homogêneas, indicando a presença de um único polissacarídeo. Este resultado confirma a existência de uma “família” de galactomananas no endosperma de cassia, excluindo-se a possibilidade que o decréscimo na relação manose:galactose seja devido à co-extração de uma manana.

Para a obtenção do resíduo final do endosperma de *Cassia fastuosa* e *Delonix regia* foram realizadas extrações alcalinas até a remoção total dos polissacarídeos solúveis. A hidrólise dos resíduos finais insolúveis mostrou a presença de manose como componente majoritário. A composição monossacarídica obtida foi de 95,1% de manose e 4,9% de galactose, para ambas as espécies, indicando a presença de uma manana pura, de acordo com a definição de ASPINALL (1959).

FIGURA 12 - PERFIS DE ELUIÇÃO PARA AS FRAÇÕES OBTIDAS DO ENDOSPERMA DE *Cassia fastuosa* POR HPSEC-RI



A rotação óptica específica deste polissacarídeo solubilizado em uréia 50% (m/v) foi de $-111,9^\circ$ para *Cassia fastuosa* e -51° para *Delonix regia*. O valor de rotação óptica obtido para cassia é muito mais negativo que os valores determinados para outras mananas conhecidas: $[\alpha]_D^{25} = -38,2^\circ$, -48° e -41° para as mananas de “ivory nut”, *Borassus flabellier* e *Porphyra umbicalis*, respectivamente. Esta diferença pode ser devido aos diferentes solventes utilizados (NaOH para as mananas de “ivory nut” e *Borassus flabellier* e anidrido fórmico para a de *Porphyra umbicalis*) que podem promover diferentes arranjos conformacionais nas moléculas, os quais podem afetar os valores de rotação óptica (RAO; MUKHERJEE, 1962).

Os dados de análise de metilação para estes resíduos insolúveis indicaram tratar-se de uma β -(1 \rightarrow 4)-D-manana (Tabela 3). Os polímeros apresentaram 2,3,6-Me₃-Man como derivado metilado majoritário, indicando a predominância de unidades de manose não substituídas. Além deste, verificou-se a presença dos

derivados: 2,3,4,6-Me₄-Man (terminais não redutores); 2,3-Me₂-Man (unidades de manose substituídas por galactose) e 2,3,4,6-Me₄-Gal (unidades de galactose).

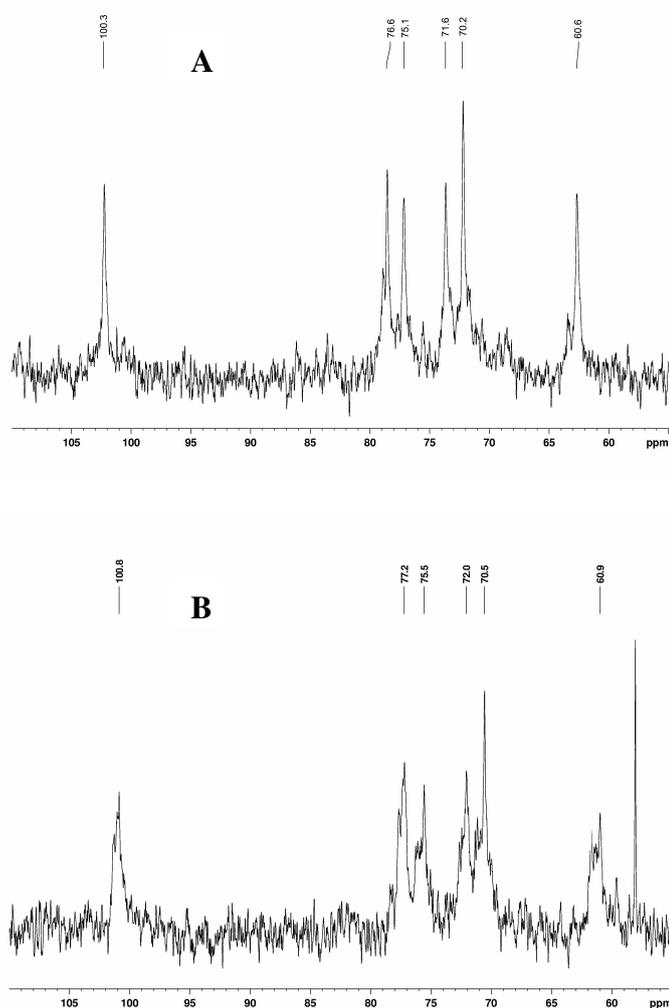
TABELA 3 – ANÁLISE POR METILAÇÃO DA MANANA DE *Cassia fastuosa* E *Delonix regia* NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS

Derivados Metilados	<i>Cassia fastuosa</i>	<i>Delonix regia</i>
	mol% ^a	mol% ^a
2,3,4,6-Me ₄ -Man	3,0	2,6
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	3,1	3,5
2,3,6-Me ₃ -Man	89,7	89,7
2,3-Me ₂ -Man	4,2	4,2

(a): GLC-MS em coluna capilar de OV-225.

As mananas foram solubilizadas em uréia e submetidas à análise por espectroscopia de RMN-¹³C, conforme mostrado na Figura 13 para a manana de *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*. O espectro apresenta seis sinais principais que correspondem a uma β-(1→4)-D-manana. Os sinais menores se devem provavelmente a presença de poucas unidades de galactose. A atribuição dos sinais (Tabela 4) foi feita comparando-se com dados da literatura obtidos para uma manana em solução de NaOD 5% (GORIN; MAZUREK, 1975), para a manana de *Schizolobum amazonicum* (PETKOWICZ *et al.*, 2001) e para os valores determinados por JARVIS (1990) para a manana de *Phoenix dactylifera*.

FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN-¹³C DA MANANA DE *Cassia fastuosa* E *Delonix regia* em uréia 50% (D₂O)



NOTA: Espectro de RMN-¹³C para **A**: *Cassia fastuosa*; **B**: *Delonix regia*.

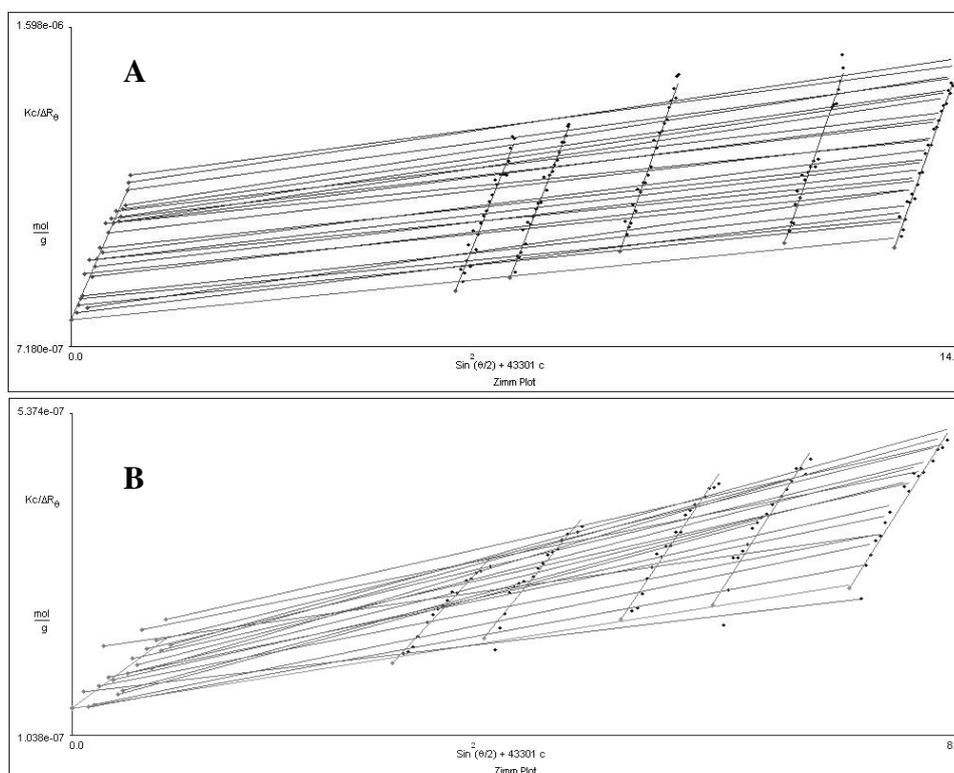
TABELA 4 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN-¹³C PARA A MANANA DE *Cassia fastuosa* E *Delonix regia*

	δ (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
→4)-β-Man-(1→ <i>C. fastuosa</i>	100,3	70,2	71,6	76,6	75,1	60,6
→4)-β-Man-(1→ <i>D. regia</i>	100,8	70,5	72,0	77,2	75,5	60,9

A massa molar da manana de *Cassia fastuosa* e *Delonix regia* foi determinada utilizando-se o método de Zimm (Figura 14). A técnica foi escolhida devido à dificuldade de solubilização das mananas, que são insolúveis na maioria dos os solventes, e a limitação do tipo de solvente quando se trabalha com colunas de gel permeação. Utilizando-se o método de Zimm foi possível determinar a massa molar das mananas solubilizadas em solução de uréia 50% (m/v). Esta é a primeira tentativa de determinação de massa molar de mananas através deste método.

Além da massa molar, a técnica utilizada permite a determinação do segundo coeficiente virial (A_2), que foi de $3,8 \times 10^{-4}$ para a manana de *Cassia fastuosa* e $4,9 \times 10^{-4}$ para a manana de *Delonix regia*. Estes valores indicam que a solução de uréia 50% (m/v) é um solvente adequado para a solubilização da manana, ou seja, este solvente não promoveria a agregação ou repulsão dos polissacarídeos (WYATT, 1993).

O valor de massa molar (M_w) obtido para a manana de *Cassia fastuosa* foi de $1,263 \pm 0,019 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ e o obtido para a manana de *Delonix regia* foi de $7,11 \pm 0,59 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$. Embora os valores de coeficiente virial A_2 indiquem que a solução de uréia utilizada foi um solvente adequado, os valores de massa molar obtidos foram extremamente elevados, sugerindo a presença de agregados moleculares.

FIGURA 14 – GRÁFICO DE ZIMM PARA A MANANA DE *Cassia fastuosa* E *Delonix regia*

NOTA: Gráfico de Zimm para **A**: *Cassia fastuosa*; **B**: *Delonix regia*.

4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DAS ESPÉCIES *Crotalaria juncea* E *Sesbania virgata* PERTENCENTES À SUBFAMILIA FABOIDEAE

O endosperma de *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* corresponde a 15% e 18% do peso das sementes, respectivamente. Este valor é o esperado para espécies da subfamília Faboideae, as quais possuem uma quantidade menor de endosperma em suas sementes (WHISTLER; SMART, 1953).

Os endospermas secos e isolados de *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* foram submetidos a extrações seqüências com água e álcali conforme descrito na

Figura 10 da página 50. As frações originadas apresentaram manose e galactose como componentes majoritários na composição monossacarídica. Estes resultados indicam a presença de galactomananas como principal componente do endosperma destas espécies.

TABELA 5 – RENDIMENTO, RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE E ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE *Crotalaria juncea* E *Sesbania virgata* PERTENCENTES A SUBFAMÍLIA FABOIDEAE

<i>Crotalaria juncea</i>				<i>Sesbania virgata</i>			
Fração	Rend. ^a	Man:Gal ^b	$[\alpha]_D^{25}$	Fração	Rend. ^a	Man:Gal ^b	$[\alpha]_D^{25}$
R I	9,9	2,0:1	+ 24,8 ^o	S I	3,4	1,5:1	+ 30,0 ^o
R II	14,4	2,0:1	-	S II	1,2	1,5:1	-
R III	14,8	2,0:1	-	S III	1,4	1,5:1	-
R IV	4,7	2,0:1	-	S IV	1,8	1,5:1	-
R V	9,5	2,3:1	-	S V	25,5	1,6:1	-
R VI	2,2	2,3:1	-	S VI	26,1	1,6:1	-
R VII	1,1	2,0:1	-	S VII	12,1	1,5:1	-

(a): em relação ao endosperma seco (%)

(b): determinada por GLC

O rendimento das galactomananas solúveis em água a temperatura ambiente corresponde a aproximadamente 25% do endosperma seco para *Crotalaria juncea*. DEA e MORRISON (1975) obtiveram para a mesma espécie sob a mesma condição um rendimento de 25,6%. Em relação à *Sesbania virgata*, o rendimento das galactomananas solúveis em água a temperatura ambiente foi de aproximadamente 5%, um valor considerado baixo. DEY (1978) ao estudar as espécies *Sesbania marginata* e *Sesbania punicea* obteve rendimentos de 21% e 16%, respectivamente.

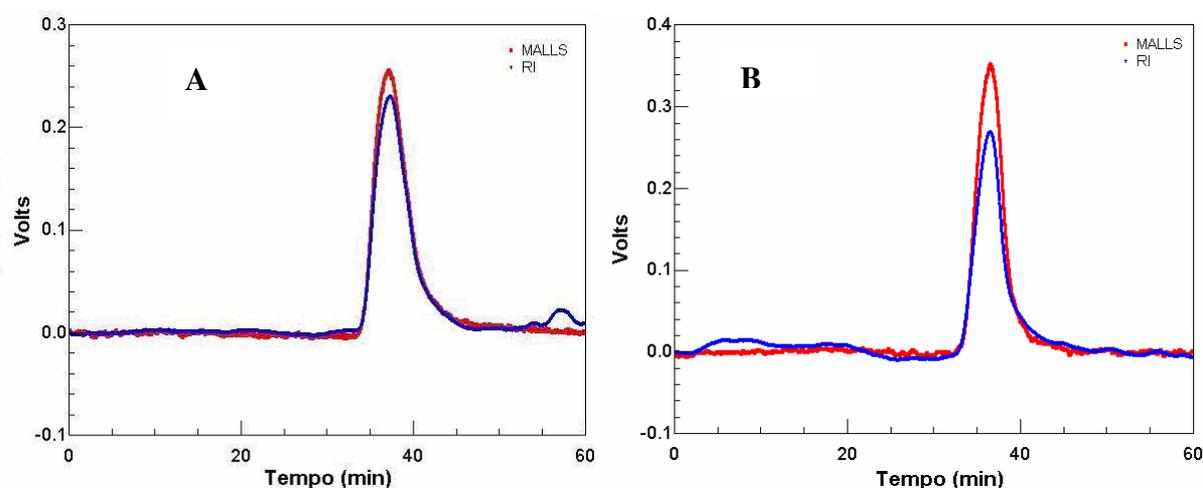
BUCKERIDGE *et al.* (1995) demonstraram que os rendimentos de galactomananas solúveis em água a temperatura ambiente para espécies da subfamília Faboideae está na faixa de 15 a 20%, ou seja, a maioria das espécies desta subfamília apresentou esta porcentagem de galactomanana solúvel. A espécie *Crotalaria juncea* apresenta uma porcentagem maior que a maioria das espécies desta subfamília. A porcentagem total de galactomanana solúvel em água foi de 43%, um valor considerado alto para a subfamília Faboideae e que se aproxima aos valores obtidos para *Cassia fastuosa* e *Delonix regia* que pertencem à subfamília Caesalpinioideae. O rendimento total de galactomananas solúveis em água foi de 8% para *Sesbania virgata*, entretanto o rendimento de galactomananas extraídas com álcali foi muito superior (60%) mostrando que as galactomananas desta espécie são mais eficientemente removidas com soluções alcalinas do que soluções aquosas.

Diferentemente de *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*, a relação manose:galactose manteve-se constante para todas as frações obtidas, independente da força da extração. A relação manose:galactose foi de aproximadamente 2,0:1 para a galactomanana de *Crotalaria juncea* e de 1,5:1 para a galactomanana de *Sesbania virgata*. De acordo com BUCKERIDGE *et al.* (1995), a maioria das galactomananas das Faboideae possui relação manose:galactose na faixa entre 1,0:1-1,5:1.

Para *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*, pertencentes à subfamília Faboideae, apenas um tipo de galactomanana compõe o endosperma, contrastando com as espécies pertencentes à subfamília Caesalpinioideae estudadas neste trabalho.

As galactomananas obtidas na primeira extração aquosa foram analisadas por HPSEC-MALLS/RI para análise de homogeneidade. O perfil de eluição para as amostras R I e S I está mostrado na Figura 15.

FIGURA 15 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA GALACTOMANANA OBTIDA DO ENDOSPERMA DE *Crotalaria juncea* E *Sesbania virgata*



NOTA: Perfil de HPSEC-MALLS/RI para a fração RI de *Crotalaria juncea* (A) e SI de *Sesbania virgata* (B).

A presença de um único pico detectado por ambos os detectores (MALLS e RI) indica que a amostra é homogênea. A massa molar calculada pelo software ASTRA a partir do perfil de homogeneidade e dos valores de dn/dc (0,187 para *Crotalaria juncea* e 0,202 para *Sesbania virgata*) foi de $2,07 \times 10^5$ g.mol⁻¹ para a galactomanana de *C. juncea* e $7,68 \times 10^5$ g.mol⁻¹ para a galactomanana de *S. virgata*. Este valor foi semelhante ao obtido por PETKOWICZ (1993) para a galactomanana de *S. amazonicum*, cujo valor foi de $7,5 \times 10^5$ g.mol⁻¹.

As galactomananas de *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* foram caracterizadas por metilação e ressonância magnética nuclear de carbono treze. Os

dados de metilação mostram uma estrutura convencional para as galactomananas: uma cadeia principal de manose ligada (1→4) indicado pela presença do derivado 2,3,6-Me₃-Man tendo ramificações laterais de galactose unidas por ligações (1→6), indicada pela presença do derivado 2,3-Me₂-Man e 2,3,4,6-Me₄-Gal. A relação manose:galactose obtida por esta análise foi de 1,9:1 (*Crotalaria juncea*) e 1,4:1 (*Sesbania virgata*), semelhante ao obtido por cromatografia líquido gasosa (Tabela 6).

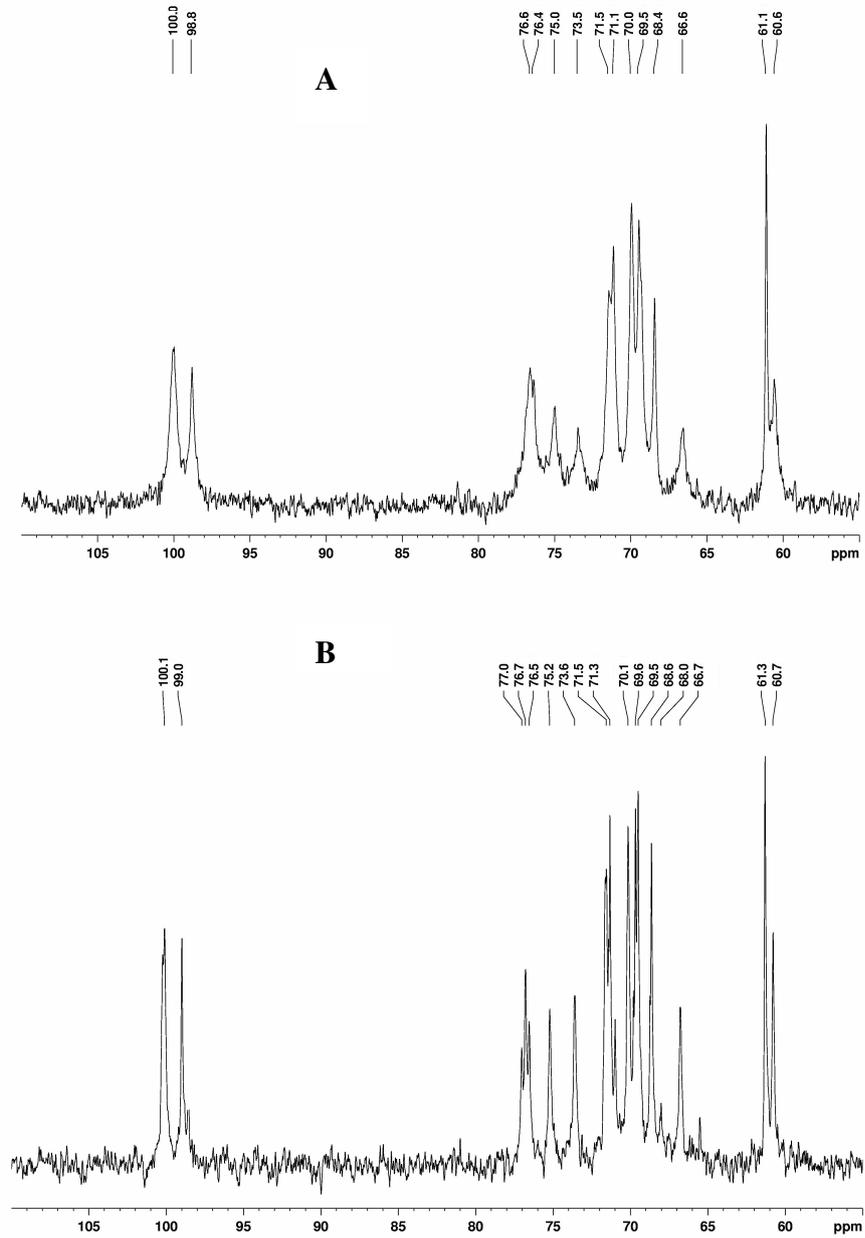
TABELA 6 – ANÁLISE POR METILAÇÃO DA GALACTOMANANA DE *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS

Derivados Metilados	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Sesbania virgata</i>
	mol% ^a	mol% ^a
2,3,4,6-Me ₄ -Man	2,7	3,8
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	24,5	28,8
2,3,6-Me ₃ -Man	48,2	42,2
2,3-Me ₂ -Man	24,6	25,2

(a): GLC-MS em coluna capilar de OV-225.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ¹³C (Figura 16) apresentaram sinais bem definidos e corroboram os dados de metilação confirmando a estrutura de uma β-D-manana com ramificações em α(1→6) por unidades de galactose. A atribuição de sinais, mostrada na Tabela 7, foi realizada a partir de galactomananas já descritas na literatura (GANTER *et al.*, 1994; PETKOWICZ *et al.*, 1998).

FIGURA 16 – ESPECTRO DE RMN-¹³C DA GALACTOMANANA DE *Crotalaria juncea* E *Sesbania virgata* EM D₂O



NOTA: Espectro de RMN-¹³C para a fração RI de *Crotalaria juncea* (A) e SI de *Sesbania virgata* (B).

TABELA 7 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN-¹³C PARA A GALACTOMANANA DE *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*

		δ (ppm)					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
α-Gal(1→	<i>C. juncea</i>	98,9	68,5	70,0	69,6	71,5	61,2
	<i>S. virgata</i>	99,0	68,6	70,1	69,7	71,6	61,3
→4)-β-Man-(1→ não substituída	<i>C. juncea</i>	100,1	71,2	71,5	76,5	75,0	60,6
	<i>S. virgata</i>	100,1	71,3	71,6	76,6	75,2	60,8
→4)-β-Man-(1→ substituída	<i>C. juncea</i>	100,1	71,2	71,5	76,7	73,5	66,6
	<i>S. virgata</i>	100,1	71,3	71,6	76,8	73,6	66,8

O resíduo das extrações seqüenciais foi submetido a extrações alcalinas adicionais, a fim de remover o remanescente dos polissacarídeos solúveis, e então o material insolúvel obtido foi hidrolisado e analisado por GLC na forma de acetatos de alditóis. Para *Crotalaria juncea* o resíduo insolúvel apresentou 96,1% de manose e 3,9% de galactose e para *Sesbania virgata*, 94,8% de manose e 5,2% de galactose, indicando tratar-se de mananas puras. A rotação óptica específica destes polímeros apresentou um valor negativo de $[\alpha]_D^{25} = -49,1^\circ$ e $-50,8^\circ$ para *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*, respectivamente. Estes valores estão próximo aos descritos na literatura para a manana de *Borassus flabellier* (-48°) e *Porphyra umbicalis* (-41°) (RAO; MUKHERJEE, 1962).

A análise de metilação confirmou a presença de mananas puras 1→4 ligadas. O derivado metilado majoritário foi o 2,3,6-Me₃-Man, indicando a presença de unidades de manose em ligações (1→4). Os derivados 2,3,6-Me₃-Man e 2,3,4,6-Me₄-Gal mostram as unidades de manose substituídas em O-6 e as ramificações de galactose, respectivamente (Tabela 8).

TABELA 8 – ANÁLISE POR METILAÇÃO DA MANANA DE *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS

Derivados Metilados	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Sesbania virgata</i>
	mol% ^a	mol% ^a
2,3,4,6-Me ₄ -Man	1,1	1,2
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	2,7	2,2
2,3,6-Me ₃ -Man	92,9	91,4
2,3-Me ₂ -Man	3,3	5,2

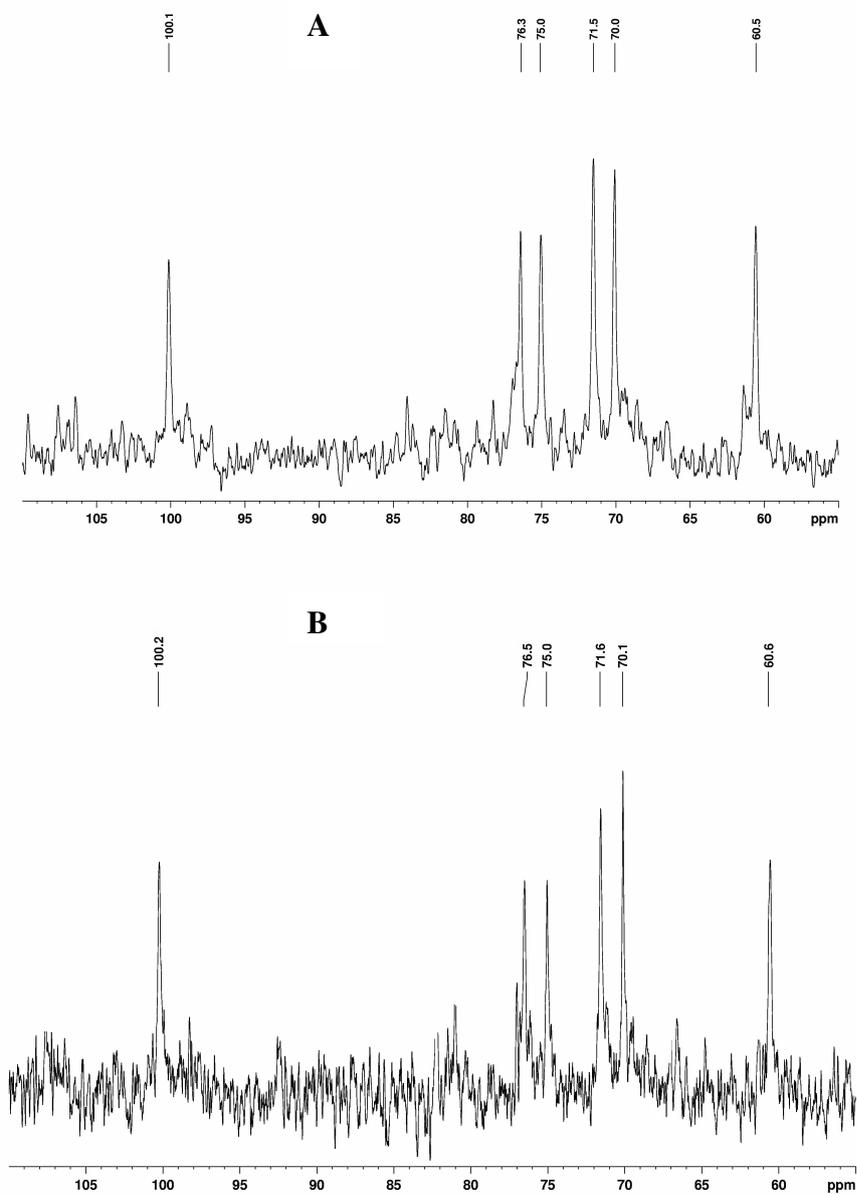
(a): GLC-MS em clouna capilar de OV-225.

Os espectros de ressonância magnética nuclear dos polímeros confirmaram a estrutura da manana, com seis sinais típicos de unidades de manose em ligações β -(1 \rightarrow 4). Na Figura 17 está representado o espectro obtido para a manana de *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*. A atribuição dos sinais, indicada na Tabela 9 foi realizada a partir de mananas já descritas na literatura (GORIN *et al.*, 1975; PETKOWICZ *et al.*, 2001; PETKOWICZ; SCHAEFER; REICHER, 2007).

TABELA 9 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN-¹³C PARA A MANANA DE *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*

	δ (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
\rightarrow 4)- β Man-(1- <i>C. juncea</i>	100,1	70,0	71,5	76,3	75,0	60,5
\rightarrow 4)- β Man-(1- <i>S. virgata</i>	100,2	70,1	71,6	76,5	75,0	60,6

FIGURA 17 – ESPECTRO DE RMN-¹³C DA MANANA DE *Crotalaria juncea* E *Sesbania virgata* EM URÉIA 50% (D₂O)



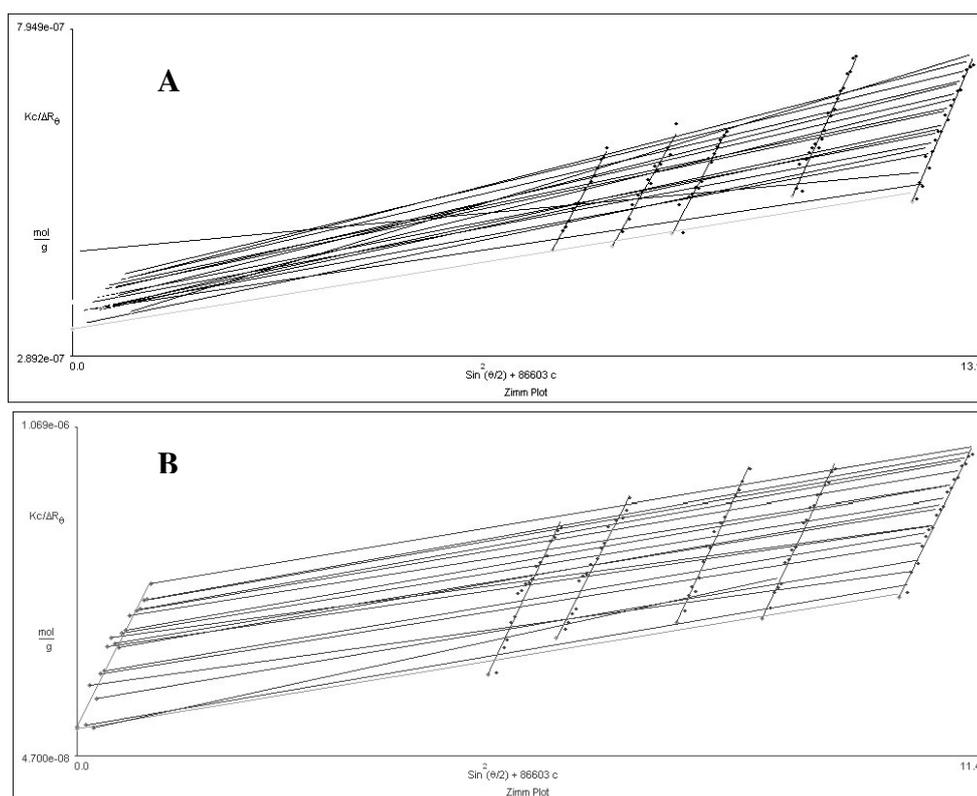
NOTA: Espectro de RMN-¹³C para **A**: *Crotalaria juncea*; **B**: *Sesbania virgata*.

A massa molar (Mw) da manana de *Crotalaria juncea* determinada através do método do Zimm (Figura 18) foi de $2,68 \pm 0,12 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, valor semelhante ao encontrado para a manana de *Cassia fastuosa*, mas inferior ao encontrado para a manana de *Delonix regia*. Para a manana de *Sesbania virgata* (Figura 18), a massa

molar (M_w) da manana foi de $7,2 \pm 1,2 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, valor semelhante ao encontrado para a manana de *Delonix regia*, mas superior ao encontrado para a manana de *Cassia fastuosa* e *Crotalaria juncea*.

O valor do segundo coeficiente virial A_2 foi de $7,5 \times 10^{-4}$ e $1,75 \times 10^{-3}$ para *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*, respectivamente, indicando que o solvente utilizado para a solubilização da manana (uréia 50%) é um bom solvente (WYATT, 1993), ou seja, houve interação entre solvente e amostra.

FIGURA 18 – GRÁFICO DE ZIMM PARA A MANANA DE *Crotalaria juncea* E *Sesbania virgata*



NOTA: Gráfico de Zimm para **A**: *Crotalaria juncea*; **B**: *Sesbania virgata*.

As espécies *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*, pertencentes à subfamília Faboideae, apresentaram galactomananas com um único grau de substituição,

Man:Gal de 2,0:1 e 1,5:1, respectivamente. Apesar de não apresentarem uma “família” de galactomananas no endosperma como as espécies da subfamília Caesalpinioideae estudadas nesta dissertação, estas espécies compartilham de uma mesma característica: a presença de uma manana pura como resíduo final das extrações.

4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DAS ESPÉCIES *Adenantha pavonina* E *Leucaena leucocephala* PERTENCENTES À SUBFAMÍLIA MIMOSOIDEAE

O endosperma das sementes de *Adenantha pavonina* corresponde a 15% da semente, mas o embrião é o componente principal das sementes perfazendo 45% do peso seco das sementes. O tegumento e o embrião correspondem a maior parte da semente de *Leucaena leucocephala*, correspondendo a 38% e 40% do peso seco da semente. O endosperma perfaz somente 18%. FAROOQI e KAPOOR (1987) investigaram as sementes de 14 espécies da subfamília Mimosoideae e apenas quatro continham de 13-30% de endosperma com rendimentos de 10 a 20% de galactomananas.

Os endospermas secos foram submetidos a extrações seqüenciais aquosas e alcalinas, conforme Figura 10 da página 50. As extrações forneceram polissacarídeos compostos predominantemente de manose e galactose indicando tratar-se de galactomananas (Tabela 10).

TABELA 10 - RENDIMENTO, RELAÇÃO MANOSE:GALACTOSE E ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES DE *Adenantha pavonina* E *Leucaena leucocephala* PERTENCENTES A SUBFAMÍLIA MIMOSOIDEAE

<i>Adenantha pavonina</i>				<i>Leucaena leucocephala</i>			
Fração	Rend. ^a	Man:Gal ^b	$[\alpha]_D^{25}$	Fração	Rend. ^a	Man:Gal ^b	$[\alpha]_D^{25}$
A I	15,6	1,6:1	+ 108,2 ^o	L I	27,0	L I	+ 46,4 ^o
A II	6,8	1,6:1	-	L II	7,0	L II	-
A III	5,1	1,6:1	-	L III	15,5	L III	-
A IV	4,9	1,6:1	-	L IV	2,6	L IV	-
A V	35,1	1,5:1	-	L V	6,0	L V	-
A VI	0,9	1,7:1	-	L VI	4,7	L VI	-
A VII	0,8	1,6:1	-	L VII	1,5	L VII	-

(a): em relação ao endosperma seco (%)

(b): determinada por GLC

As galactomananas solúveis em água perfazem cerca de 30% do endosperma seco para *Adenantha pavonina*. Este valor é semelhante ao descrito para *Cyamopsis tetragonolobus*, pertencente à mesma subfamília, que é utilizada como fonte comercial de galactomanana. Segundo DEA e MORRISON (1975), o conteúdo de galactomanana para esta espécie seria de 34%. Já para *Leucaena leucocephala*, as galactomananas solúveis em água correspondem a 52% do endosperma seco. Este valor é superior ao obtido para *Ceratonina siliqua* e *Cyamopsis tetragonolobus*, ambas utilizadas como fontes de galactomananas comerciais.

O rendimento das galactomananas solúveis a temperatura ambiente para *Adenantha pavonina* foi de 22%, um valor semelhante ao obtido por TAVARES (1998), que determinou um rendimento de 25% para galactomananas solúveis em água a temperatura ambiente. As galactomananas de *Leucaena leucocephala*

solúveis em água a temperatura ambiente perfazem aproximadamente 35%, um valor superior ao obtido por SIERAKOWSKI *et al.* (2000).

A análise da Tabela 10 mostra que a relação manose:galactose manteve-se constante para todas as frações. A relação manose:galactose para *Adenantha pavonina* foi de aproximadamente 1,6:1 independente da força de extração. Para as galactomananas extraídas do endosperma de *Leucaena leucocephala* a mesma relação manose:galactose foi obtida (1.6:1) para todas as frações. SIERAKOWSKI *et al.* (2000) obtiveram a mesma relação manose:galactose para a galactomanana de *Leucaena leucocephala* extraída em água a temperatura ambiente e McCLEARY (1979) em um estudo sobre interação de galactomanana de leucena com xantana também obtiveram o mesmo valor.

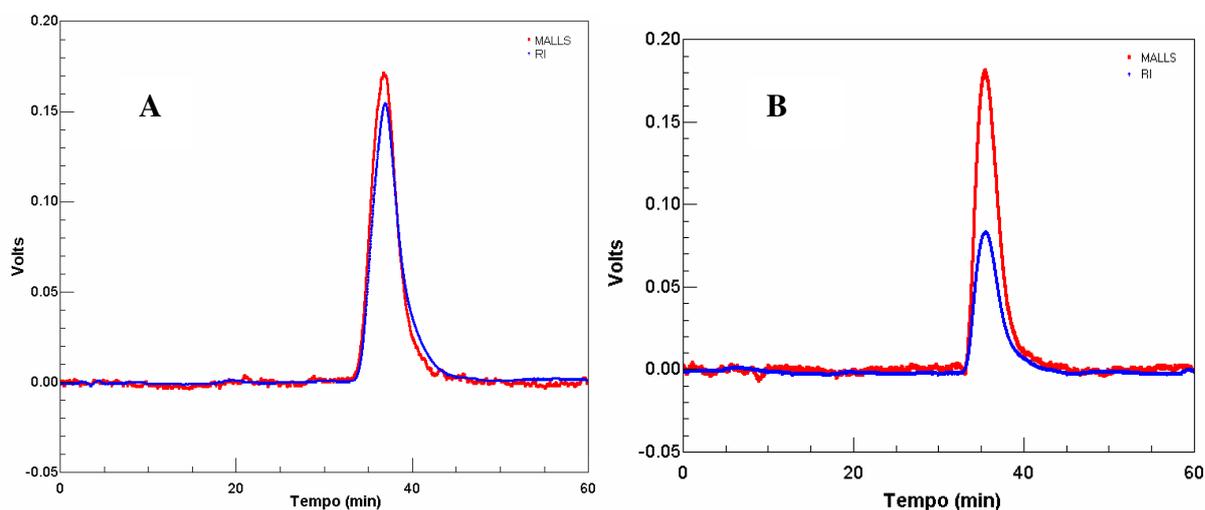
Sementes de *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala*, pertencentes à subfamília Mimosoideae, apresentam em seus endospermas galactomananas nível de substituição invariável assim como *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*, que pertencem à subfamília Faboideae. Entretanto este resultado contrasta aos obtidos para *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*, pertencentes à subfamília Caesalpinioideae, que apresentaram uma “família” de galactomananas sugerindo que esta característica seria exclusiva da subfamília Caesalpinioideae.

A rotação óptica da galactomanana de *Adenantha pavonina* forneceu um valor de $[\alpha]_D^{25} = + 108,2^\circ$. Este valor é alto quando comparado a galactomananas de outras espécies com relação manose:galactose semelhantes, como $+ 40,2^\circ$ para *Cassia renigera* (Man:Gal 1,6:1) e $+ 48,8^\circ$ para *Lagonichium farctum* (Man:Gal 1,9:1) (DEA; MORRISON, 1975). A rotação óptica da galactomanana de *Leucaena leucocephala* forneceu um valor de $[\alpha]_D^{25} = +46,4^\circ$, valor próximo ao determinado para a

galactomanana de *Cassia renigera* (+ 40,2^o) que tem a mesma relação manose:galactose (DEA; MORRISON, 1975).

As galactomananas A I e L I, provenientes da primeira extração aquosa a temperatura ambiente foram analisadas por HPSEC-MALLS/RI (Figura 19). Verificou-se a presença de um único pico para ambas as frações, indicando que estas são homogêneas.

FIGURA 19 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC-MALLS/RI DA GALACTOMANANA OBTIDA DO ENDOSPERMA DE *Adenantha pavonina* E *Leucaena leucocephala*



NOTA: Perfil de HPSEC-MALLS/RI para a fração AI de *Adenantha pavonina* (A) e LI de *Leucaena leucocephala* (B).

A massa molar calculado a partir do perfil de homogeneidade e do valor de dn/dc (0,245 mL.mg⁻¹ para *Adenantha pavonina* e 0,180 mL.mg⁻¹ para *Leucaena leucocephala*) foi de $2,23 \times 10^6$ g.mol⁻¹ para a galactomanana de *Adenantha pavonina*, um valor alto quando comparado a galactomananas já descritas (GANTER *et al.*, 1994; PETKOWICZ *et al.*, 1998). Este valor alto de massa molar poderia ser responsável pelo valor elevado de rotação óptica específica obtido para este polissacarídeo. A massa molar determinada a partir do perfil de eluição para a

galactomanana de *Leucaena leucocephala* foi de $1,35 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$. Este valor é próximo ao obtido para as galactomananas de *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* estudadas nesta dissertação, entretanto é menor ao determinado para a galactomanana de *Adenantha pavonina*.

A estrutura da galactomanana extraída em água a temperatura ambiente de *Leucaena leucocephala* já foi bem caracterizada por diversos autores, embora a comparação das galactomananas obtidas em diferentes condições de extração não tenha sido realizada anteriormente (SIERAKOWSKI *et al.*, 2001; ONO *et al.*, 2004; LOMBARDI e MERCE, 2003).

A análise de metilação da galactomanana de *Adenantha pavonina* (Tabela 11) indicou uma estrutura convencional. O polissacarídeo metilado apresentou 41,5% do derivado 2,3,6-Me₃-Man, correspondente a unidades de manose não substituídas; 27,7% de 2,3-Me₂-Man, o qual corresponde a unidades de manose substituídas; 25,8% de 2,3,4,6-Me₄-Gal (ramificações de galactose) e 5,0% de 2,3,4,6-Me₄-Man (terminais redutores).

TABELA 11 – ANÁLISE POR METILAÇÃO DA GALACTOMANANA DE *Adenantha pavonina* NA FORMA DE ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS

Derivados Metilados	mol% ^a	M.S. (m/z) ^a
2,3,4,6-Me ₄ -Man	5,0	87,101,117,129,145,161,179,189,205
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	25,8	87,101,117,129,145,161,179,189,205
2,3,6-Me ₃ -Man	41,5	87,99,101,117,129,141,159,173,189,203,217
2,3-Me ₂ -Man	27,7	85,101,111,117,127,142,159,171,187,201,217

(a): GLC-MS em clona capilar de OV-225.

O espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da galactomanana (Figura 20) confirmou a estrutura do polímero. Na região do carbono anomérico é possível distinguir três sinais, os quais correspondem a unidades de β -D-manopiranosose substituída (δ 100,2), β -D-manopiranosose não substituída em O-6 (δ 100,0) e unidades de α -D-galactopiranosose (δ 98,8). A atribuição dos sinais está mostrada na Tabela 12 (GANTER *et al.*, 1994; PETKOWICZ *et al.*, 1998).

FIGURA 20 – ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA GALACTOMANANA DE *Adenantha pavonina* EM D_2O

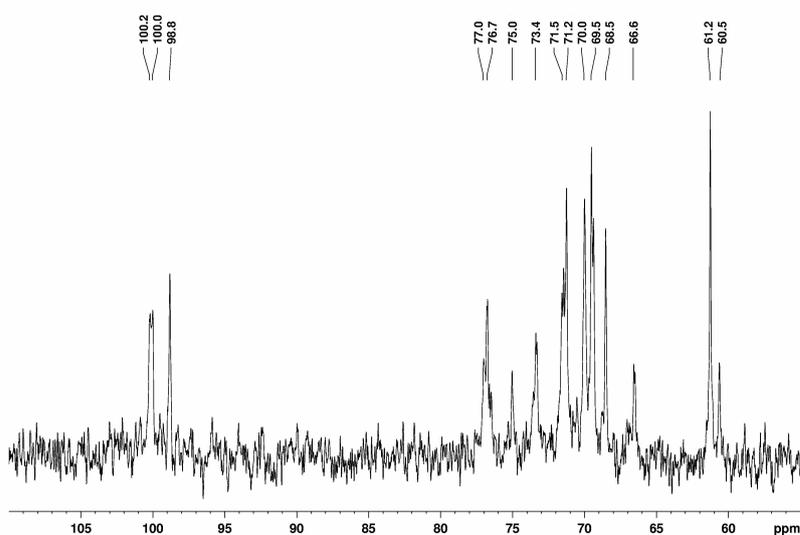


TABELA 12 – ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN- ^{13}C PARA A GALACTOMANANA DE *Adenantha pavonina*

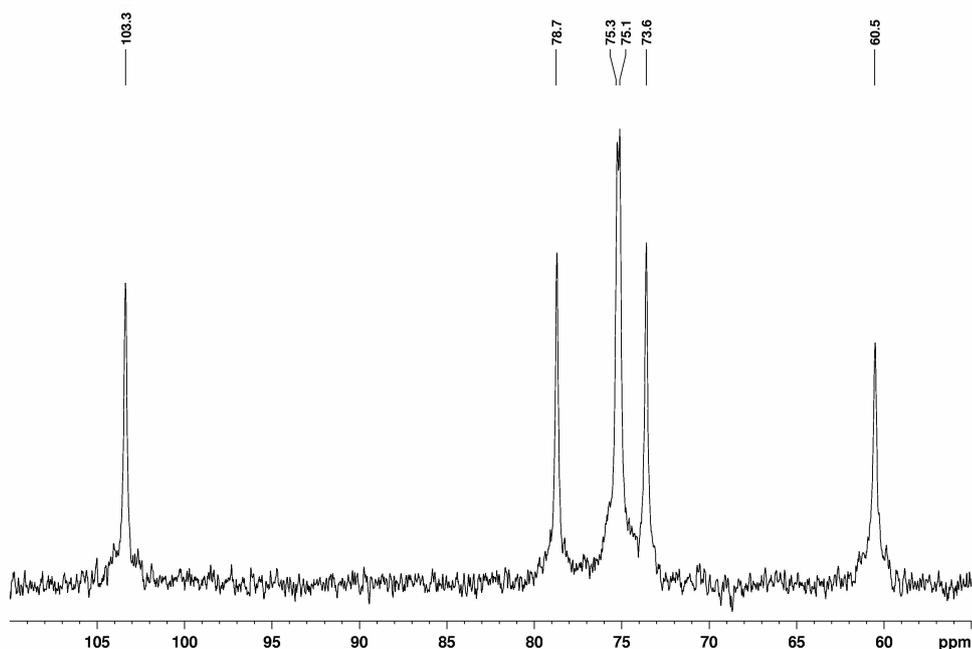
	δ (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α -Gal(1 \rightarrow	98,8	68,5	70,0	69,6	71,6	61,3
\rightarrow 4)- β Man-(1- não substituída	100,2	71,2	71,6	76,8	75,0	60,6
\rightarrow 4)- β Man-(1- substituída	100,0	71,2	71,6	77,0	73,4	66,6

Da mesma forma que para os resíduos das extrações das espécies anteriores, foram realizadas extrações alcalinas adicionais, a fim de se obter o resíduo final insolúvel de *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala*. O resíduo final insolúvel resultante das extrações seqüenciais do endosperma das espécies da subfamília Mimosoideae foi hidrolisado e analisado na forma de acetatos de alditóis. O resíduo final insolúvel de *Adenantha pavonina* apresentou na sua composição monossacarídica: 72,2% de glucose, 23,0% de manose e 4,8% de galactose. E o resíduo final insolúvel de *Leucaena leucocephala* apresentou 82,3% de glucose e 17,7% de manose. Pode-se observar que o monossacarídeo predominante foi glucose, sugerindo a presença de celulose no resíduo das extrações de ambas as espécies. Este resultado se distingue do encontrado para as espécies das subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae analisadas nesta dissertação, onde encontramos uma manana como resíduo insolúvel das extrações do endosperma.

A celulose é conhecida pela sua eficiência em formar pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, responsáveis por sua insolubilidade (KLEMM, *et al.*, 2005). Por esse motivo, para análise do resíduo insolúvel obtido do endosperma de *Leucaena leucocephala* por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C foi utilizado o solvente S1 (NaOH 8%, tiouréia 6,5%, uréia 8% e D_2O) conforme descrito por JIN *et al.*, 2007. Utilizando este solvente foi possível obter o espectro de RMN- ^{13}C do resíduo insolúvel de *Leucaena leucocephala*, o qual apresenta seis sinais característicos de unidades de D-glucose em ligações $\beta(1\rightarrow4)$, confirmando a presença de celulose (Figura 21).

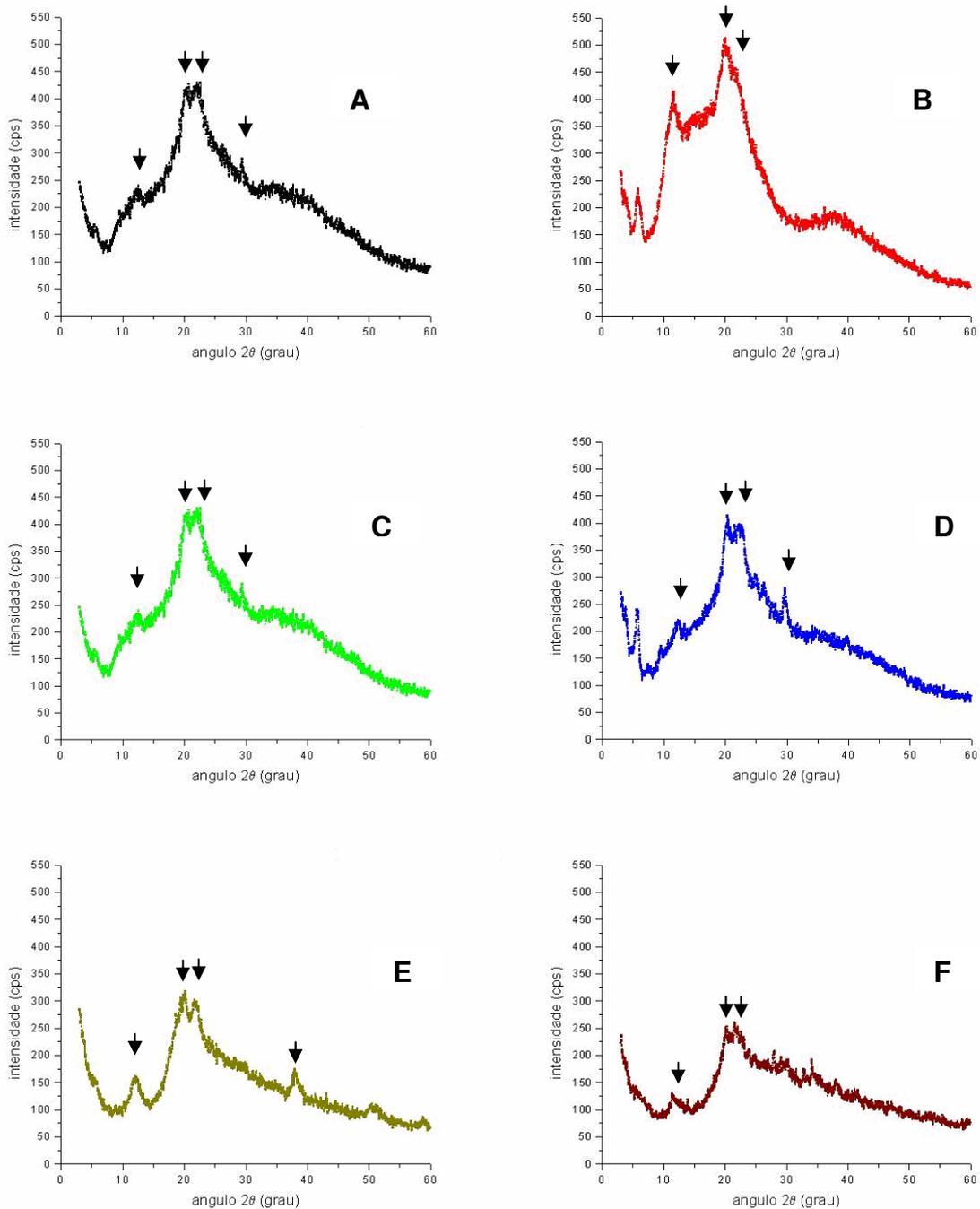
O espectro de RMN-¹³C apresenta seis sinais distintos em δ 103,3, δ 78,7, δ 75,3, δ 75,1, δ 76,3 e δ 60,5 ppm, os quais correspondem respectivamente ao C-1, C-4, C-3, C-5, C-2 e C-6 das unidades de glucose ligadas $\beta(1\rightarrow4)$. As atribuições dos sinais foram realizadas comparando-se com espectros da celulose em solução e no estado sólido já caracterizados na literatura. (JIN, *et al.*, 2007; PRINCI *et al.*, 2005; BARDET; EMSLEY; VINCENDON, 1997).

FIGURA 21 – ESPECTRO DE RMN-¹³C DA CELULOSE DE *Leucaena leucocephala* EM SOLVENTE S1



Os padrões de difração de raios-X obtidos para os resíduos insolúveis do endosperma das diferentes espécies estudadas estão mostrados na Figura 22.

FIGURA 22 – PADRÃO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X OBTIDO PARA OS RESÍDUOS FINAIS INSOLÚVEIS ISOLADOS DO ENDOSPERMA DAS SEMENTES *DE Adenanthera pavonina*, *Cassia fastuosa*, *Crotalaria juncea*, *Delonix regia*, *Leucaena leucocephala* e *Sesbania virgata*



NOTA: Difração de raios-X dos resíduos obtidos para **A:** *Cassia fastuosa*; **B:** *Delonix regia*; **C:** *Crotalaria juncea*; **D:** *Sesbania virgata*; **E:** *Adenanthera pavonina* e **F:** *Leucaena leucocephala*. As flechas indicam os ângulos utilizados para o cálculo das distâncias interplanares.

As distâncias interplanares foram calculadas a partir da fórmula $\lambda = d \sin \theta$, onde θ corresponde ao ângulo e λ a 1,543. As distâncias interplanares obtidas para as mananas foram 7,54; 4,48; 4,06 e 3,01 Å, semelhantes aos valores determinados por PETKOWICZ (1998) para a manana de *Schizolobium amazonicum* na forma hidratada, confirmando que os resíduos finais insolúveis isolado de *Cassia fastuosa*, *Delonix regia*, *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* são mananas puras. Já as distâncias interplanares obtidas para os resíduos insolúveis do endosperma de *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala*, foram de 7,26; 4,42; 4,08 e 2,36 Å, sugerindo a ausência de mananas nestes materiais. Estes resultados estão de acordo com os dados anteriores que mostraram a presença de celulose nestes resíduos. Estes valores são próximos aos obtidos por KONO *et al.* (1999) que obteve valores de 7,2; 4,3; 3,8 e 2,5 Å para celobiose, confirmando a presença de celulose nestes resíduos.

Podemos observar que as espécies *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala* que pertencem a subfamília Mimosoideae forneceram galactomananas com relação manose:galactose constantes. O mesmo ocorreu para as espécies *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* que pertencem à subfamília Faboideae. Entretanto as espécies *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*, ambas pertencentes à subfamília Caesalpinioideae, forneceram a partir de diferentes condições de extrações, uma “família” de galactomananas. Este fato também foi observado por MANZI *et al.* (1984) e PETKOWICZ *et al.* (1998) para as espécies *Gleditsia trichanthos* e *Schizolobium amazonicum*, as quais também pertencem à subfamília

Caesalpinioideae, sugerindo que esta característica é exclusiva das espécies que pertencem a esta subfamília.

As relações manose:galactose obtidas para as diferentes espécies estudadas mostram que as galactomananas de espécies de Caesalpinioideae são as menos substituídas, confirmando a sugestão de que no curso da evolução houve um aumento na proporção de galactose (HEGNAUER; GRAYER-BARKMEIJER, 1993). Adicionalmente, considerando o padrão evolucionário aceito para as Leguminosae, no qual as subfamílias Mimosoideae e Faboideae seriam derivadas da subfamília Caesalpinioideae, pode-se sugerir que no curso da evolução houve uma redução no grau de polidispersão das galactomananas. A síntese de uma “família” de galactomananas foi substituída pela síntese de um único tipo de polissacarídeo.

Além disso, o resíduo final das extrações de *Cassia fastuosa*, *Delonix regia*, *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* continha mananas puras, enquanto que a análise do resíduo final das espécies estudadas pertencentes à subfamília Mimosoideae indicou a presença de celulose em ambas as espécies.

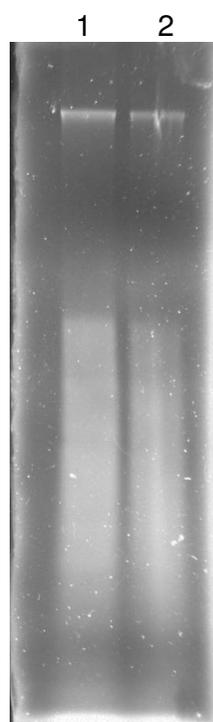
Os modelos de parede celular existentes e os dados obtidos por PETKOWICZ, SCHAEFER e REICHER (2007) para as sementes de *Schizolobium parahybae*, que mostram que a manana não é consumida durante a germinação, sugerem que este polissacarídeo tem função estrutural, provavelmente substituindo a celulose. As espécies *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*, pertencentes à mesma subfamília que *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae*, espécies onde já foram isoladas mananas puras, indicam que este polissacarídeo está presente nas espécies desta subfamília. Durante a evolução das leguminosas, a presença de manana foi retida para as espécies da subfamília Faboideae, já que *Crotalaria*

juncea e *Sesbania virgata* apresentaram este polímero em seus resíduos finais. Entretanto a presença de celulose para *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala* sugerem que durante a evolução das Mimosoideae houve uma alteração no padrão de parede celular, ocorrendo à substituição de manana por celulose.

4.4 TAXONOMIA DE *Schizolobium amazonicum* E *Schizolobium parahybae*

O DNA genômico das espécies *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae* foi extraído e submetido à eletroforese, conforme Figura 23.

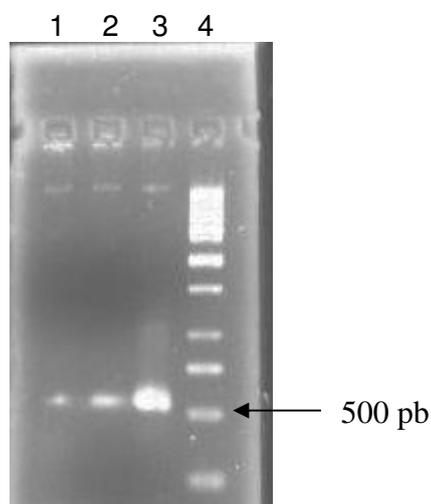
FIGURA 23 – PERFIL ELETROFORÉTICO DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO DE *Schizolobium amazonicum* E *Schizolobium parahybae*



NOTA: Eletroforese em gel de ágar 1% do DNA genômico extraído de *Schizolobium amazonicum* (linha 1) e de *Schizolobium parahybae* (linha 2)

O DNA genômico das duas espécies foi usado como molde para amplificação do PCR do espaço intergênico cloroplasmático do gene *trnL-trnF* e dos espaçadores internos transcritos dos genes ribossomais nucleares (ITS). O fragmento amplificado para o espaço intergênico do gene *trnL-trnF* é mostrado na Figura 24. Não houve sucesso na amplificação da região ITS para ambas as espécies. O fragmento amplificado para o espaço intergênico do gene *trnL-trnF* de *Schizolobium amazonicum* foi seqüenciado a partir das duas extremidades, utilizando-se os mesmos primers da amplificação. As seqüências obtidas foram montadas em uma seqüência contígua com 529pb, como mostrado no apêndice, correspondente ao tamanho do fragmento obtido na amplificação por PCR.

FIGURA 24 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA DOS PRODUTOS DE PCR DA REGIÃO INTERGÊNCIA DO GENE *trnL-trnF*



NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de PCR amplificados corados em brometo de etídio: 1 e 2: região intergênica de *trnL-trnF* amplificada de *Schizolobium parahybae*; 3: região intergênica de *trnL-trnF* amplificada de *Schizolobium amazonicum*; 4: marcadores de peso molecular.

A seqüência contígua obtida para *Schizolobium amazonicum*, foi usada para uma busca por similaridade junto ao GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizado o

programa BLASTN, que compara a seqüência de nucleotídeos fornecida com um banco de dados de seqüências de nucleotídeos (Tabela 13).

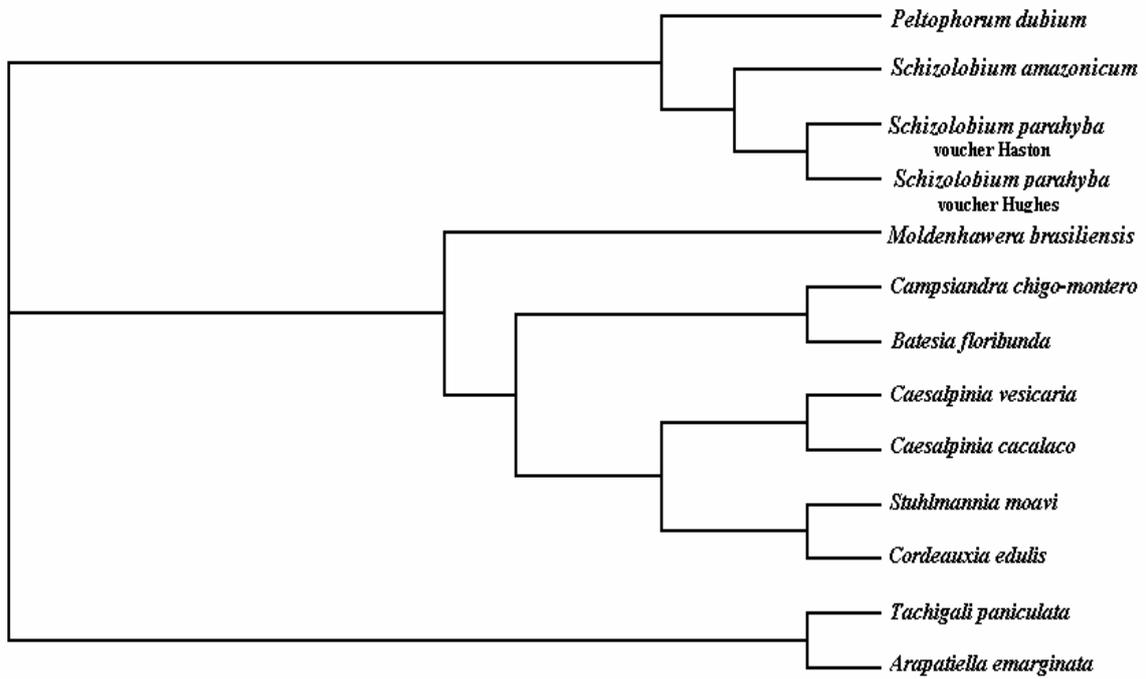
TABELA 13 – RESULTADOS DA BUSCA POR SIMILARIDADE NO GENBANK COM O PROGRAMA BLAST

Espécie	Alinhamentos mais significativos	Valor Indentidades Gaps	Extensão do alinhamento
<i>Schizolobium amazonicum</i>	<i>Schizolobium parahybae</i> voucher Haston (AY899711.1)	0.0 491/498 (98%) 1/498 (0%)	1036
	<i>Schizolobium parahybae</i> voucher Hughes (AY899710.0)	0.0 460/466 (98%) 1/466 (0%)	1005
	<i>Campsiandra chigomontero</i> (AF430765.1)	0.0 499/528 (94%) 15/528 (2%)	1094
	<i>Batesia floribunda</i> (AF430762.1)	0.0 495/526 (94%) 14/526 (2%)	1088
	<i>Peltophorum dubium</i> (AF430785.1)	0.0 498/529 (94%) 23/529 (4%)	1084
	<i>Caesalpinia vesicaria</i> (AF430742.1)	0.0 495/528 (93%) 18/528 (3%)	1093
	<i>Stuhlmannia moavi</i> (AF430789.1)	0.0 492/525 (93%) 19/525 (3%)	1086
	<i>Caesalpinia cacalaco</i> (AF430709.1)	0.0 492/527 (93%) 17/527 (3%)	1091
	<i>Moldenhawera brasiliensis</i> voucher Carvalho (AY899702.1)	0.0 495/532 (93%) 24/532 (4%)	1086
	<i>Tachigali paniculata</i> (AF430790.1)	0.0 490/528 (92%) 25/528 (4%)	1063
	<i>Cordeauxia edulis</i> (AF430771.1)	0.0 489/525 (93%) 20/525 (3%)	1090
	<i>Arapatiella emarginata</i> voucher Thomas (AY899688.1)	0.0 480/513 (93%) 22/513 (4%)	1068

De forma geral, o resultado do BLAST para *Schizolobium amazonicum* mostrou maior similaridade com as duas seqüências da espécie de *Schizolobium parahyae*, com 98% de identidade na região alinhada de Também houve grande similaridade com outras espécies de leguminosas, em torno de 94 ou 93%.

A seqüência obtida para *Schizolobium amazonicum* e seqüências da mesma região de espécies relacionadas foram usadas para construir a árvore mostrada na Figura 25. Na análise filogenética pretendeu-se avaliar a proximidade da seqüência de *Schizolobium amazonicum* com as espécies de maior similaridade obtidas a partir do programa BLAST. Apesar das características muito semelhantes em termos de galactomananas, manana e distribuição das unidades de D-galactose ao longo da cadeia principal, a análise do grau de similaridade (que não apresentou 100% de semelhança entre as espécies de *S. amazonicum* e *S. parahyae*) e da árvore filogenética sugere que *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahyae* são espécies distintas. Portanto, a utilização das galactomananas como critério taxonômico deve ser utilizado com ressalvas, pois, apesar da relação manose:galactose ser taxonômica dependente (espécies próximas apresentam relações manose:galactose semelhantes), ela não poderia ser utilizada para caracterização taxonômica em termos de espécie.

FIGURA 25 – ÁRVORE FILOGENÉTICA MOSTRANDO A RELAÇÃO DE *Schizolobium amazonicum* COM ESPÉCIES PRÓXIMAS



5. CONCLUSÕES

✓ A partir do endosperma das sementes de *Cassia fastuosa* e *Delonix regia*, pertencentes à subfamília Caesalpinioideae, foram obtidas por extrações aquosas e alcalinas seqüenciais, galactomananas menos substituídas e com valores crescentes de relação manose:galactose. As relações manose:galactose alteraram-se de 3,0:1 a 10:1 para *C. fastuosa* e 3,0:1 a 6,8:1 para *D. regia*. Para as espécies *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata*, da subfamília Faboideae, apenas um tipo de galactomanana está presente no endosperma e a relação manose:galactose obtida foi de 1,5:1 para *C. juncea* e 2,0:1 para *S. virgata*. As galactomananas de *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala* (subfamília Mimosoideae) apresentaram relação manose:galactose de 1,6:1 independente da força de extração.

✓ Em *Cassia fastuosa*, *Delonix regia*, *Crotalaria juncea* e *Sesbania virgata* foram isoladas mananas puras no resíduo final das extrações após remoção das galactomananas. Estes polissacarídeos foram caracterizados por metilação e espectroscopia de RMN-¹³C. A massa molecular determinada pelo método de Zimm das mananas obtidas para *C. fastuosa*, *D. regia*, *C. juncea*, *S. virgata* foi de $1,263 \times 10^6$; $7,11 \times 10^6$; $2,68 \times 10^6$ e $7,2 \times 10^6$ g.mol⁻¹, respectivamente. O resíduo das extrações de *Adenantha pavonina* e *Leucaena leucocephala*, pertencentes à subfamília Mimosoideae, apresentou como componente majoritário glucose. A presença de celulose neste resíduo foi confirmada por RMN-¹³C. A análise de difração de raios X confirmou a identidade dos resíduos.

- ✓ A partir da análise da região intergênica *trnL-trnF* pode-se sugerir que *Schizolobium amazonicum* e *Schizolobium parahybae* são de fato espécies distintas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 269-276, 1965.

ALLAN, G.J.; PORTER, J.M. Tribal delimitation and phylogenetic relationships of the Loteae and Coronilleae (Faboideae: Fabaceae) with special reference to *Lotus*: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. **Am. J. Bot.**, v. 87, p. 1871-1881, 2000.

ARAÚJO, E.C.; MENDONÇA, A.V.R.; BARROSO, D.G.; LAMÔNICA, K.R.; SILVA, R.F. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. **Rvta. Bras. Sem.**, v. 26 (1), p. 105-110, 2004.

ASPINALL, G.O. Structural Chemistry of the hemicelluloses. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 14, p. 429-468, 1959.

AVIGAD, G.; DEY, P.M. Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. p.143-204.

AVISE, J.C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. London: University Press, 447p. 2000.

BACIC, A.; HARRIS, P.J.; STONE, B.A. Structure and function of plant cell walls. In: PREISS, J. **The Biochemistry of Plants**, New York: Academic Press, v. 14, 1988. p. 297-371.

BAILEY, L.H. **Manual of Cultivated Plants**. New York, 1954.

BARDET, M.; EMSLEY, L.; VINCENDON, M. Two dimensional spin-exchange solid-state NMR studies of ¹³C-enriched wood. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v.8, p. 25-32, 1997.

BEHR, S.H.; MUSTAD, V.A.; WALTER, D.; BLOCH, T.D. Cholesterol-lowering effect of food bars containing guar gum in healthy women and men. **Journal of the American Dietetic Association**. Poster Section: Medical Nutrition Therapy, 1998.

BENTO, J.F. **Aspectos comparativos entre mananas e galactomananas de sementes de leguminosas**. Curitiba, 2006. Monografia de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. Seeds germination, structure and composition. In: **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York: Plenum Press, 1986. p. 1- 27.

BRADBURY, A.G.W.; HALLIDAY, D.J. Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. **J. Agr. Food Chem.**, v.38, p. 389-392, 1990.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Edição comemorativa do II Congresso Brasileiro de Florestas Tropicais. Mossoró 18 a 24 de julho de 1976.

BRESOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Xanthan-galactomannan interaction as relate to xanthan conformation. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 23, p. 263-275, 1998.

BROUAT, C.; GIELLY, L.; McKEY, D. Phylogenetic relationships in the genus *Leonardoxa* (Leguminosae: Caesalpinioideae) inferred from the chloroplast trnL intron and *trnL-trnF* intergenic spacer sequences. **Am. J. Bot.**, v. 88(1), p. 143-149, 2001.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Galactomannans from Brazilian legume seeds. **Revta. Brasil. Bot.**, São Paulo, v.13, p. 109-112, 1992.

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

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H.P.; TINÉ, M.A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, v.38, p. 141-156, 2000.

CHANDRASEKARAN, R.; RADHA, A.; OKUYAMA, K. Morphology of galactomannans: an X-ray structure analysis of guaran. **Carbohydr. Res.**, v. 306, p. 243-255, 1998.

CHANZY, H.; DUBÉ, M.; MARCHESSAULT, R.H.; REVOL, J.F. Single crystals and oriented crystallization of ivory nut mannan. **Biopolymers**, v. 18, p. 887-898, 1979.

CHAUBEY, M.; KAPOOR, V.P. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. **Carbohydr. Polym.**, v. 332 (4), p. 439-444, 2001.

CIUCANU, I.; KEREK, V. A simple and rapid method for permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, v. 131, p. 209-217, 1984.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p. XII-XVIII.

CUBAS, P.; PARDO, C.; TAHIRI, H. Molecular approach to the phylogeny and systematics of *Cytisus* (Leguminosae) and relate genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (*trnL-trnF* intergenic spacer). **Syst. Evol.**, v. 233, p. 223-242, 2002.

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

DEA, I.C.M.; MORRISON, A. Chemistry and intractions of seed galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 31, p. 241-312, 1975.

DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannan. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 35, p. 341-376, 1978.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; BALLENGER, J.A.; DICKSON, E.E.; KAJITA T. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcl* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **Am. J. Bot.**, v. 84, p. 541-554, 1997.

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

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

ELLIS, P.R.; DAWOUD, F.M.; MORRIS, E.R.; Blood glucose, plasma insulin and sensory responses to guar containing wheat breads: effects of molecular weight and particle size of guar gum. **British Journal of Nutrition**. London, v. 66, p. 363-379, 1991.

ELLISON, N.W.; LISTON, A.; STEINER, J.J.; WILLIAMS, W.M.; TAYLOR, N.L. Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium* – Leguminosae). **Mol. Phylogen. Evol.**, v. 39, p. 688-705, 2006.

ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. Berlin: Gerbruder Borntraeger, 164. 193p.

FAROOQI, M.H.; KAPOOR, V.P.A. Some Indian plant gums – their botany, chemistry and utilization. **Indian Forester.**, v. 94(9), p. 662-666, 1987.

GANTER, J.L.M.S.; CARDOSO, A.T.M.; KAMINSKI, M.; REICHER, F. Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 21, p. 137-140, 1997.

GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17 (1), p. 13-19, 1994.

GANTER, J.L.M.S.; MILAS, M.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydr. Polym.**, v. 17, p. 171-175, 1992.

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

GIELLY L.; YUAN, Y.M.; KUPFER, P.; TABERLET, P. Phylogenetic use of noncoding in the genus *Gentiana* L.: chloroplast *trnL* (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. **Mol. Phylogen. Evol.**, v. 5(3), p. 460-466, 1996.

GONÇALVES, M.P.; GOMES, C.; LANGDON, M.J.; VIEBKE, C.; WILLIAMS, P.A. Studies on κ -carrageenan/locust bean gum mixtures in the presence of sodium chloride and sodium iodide. **Biopolymers**, v. 41(6), p. 657-671, 1997.

GORIN, P.A.J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ^{13}C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Can. J. Chem.**, v. 53, p. 1212-1223, 1975.

GROOT, S.P.C.; KIELISZEWSKAROKICKA, B.; VERMEER, E.; KARSEEN, C.M. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls and gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle profusion. **Planta**, v. 174, p. 952-958, 1988.

HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEUER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, v. 34 (1), p. 3-16, 1993.

HIRST, E.L.; PERCIVAL, E. Methylation of polysaccharides and fractionation of the methylated products. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 287-298, 1960.

HOSOKAWA, K.; HISHIDA, A.; NAKAMURA, I.; SHIBATA, T. The sequences of the spacer region between the *atpF* and *atpA* genes in the plastid genome allows discrimination among three varieties of medicinal *Angelica*. **Planta Med.**, v. 72, p. 570-571, 2006.

HOSOKAWA, K.; MINAMI, M.; NAKAMURA, I.; HISHIDA, A.; SHIBATA, T. The sequences of the plastid gene *rpl16* and the *rpl16-rpl14* spacer region allow discrimination among six species of *Scutellaria*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p. 105-108, 2005.

HOSOKAWA, K.; SHIBATA, T.; NAKAMURA, I.; HISHIDA, A. Discrimination among species of *Papaver* based on the plastid *rpl16* gene and the *rpl16-rpl14* spacer sequence. **Forensic Sci. Inter.**, v. 139, p. 195-199, 2004.

HUSSEIN, M.M.D.; HELMY, W.A.; SALEM, H.M. Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivatives. **Phytochemistry**, v. 48 (3), p. 470-483, 1998.

ISHURD, O.; KERMAGI, A.; ZGHEEL, F.; FLEFLA, M.; ELMABRUK, M.; YALIN, W.; KENNEDY, J.F.; YUANJIANG, P. Structural aspects of water-soluble galactomannans isolated from the seeds of *Retama raetam*. **Carbohydr. Polym.**, v. 59, p. 531-535, 2005.

JARVIS, M.C. The ^{13}C -n.m.r spectrum of (1 \rightarrow 4)- β -D-mannans in intact endosperm tissue of the date (*Pheonix dactylifera*). **Carbohydr. Res.**, v. 197, p. 276-280, 1990.

JIN, H.; ZHA, C.; GU, L. Direct dissolution of cellulose in NaOH/thiourea/urea aqueous solution. **Carbohydr. Res.**, v. 342, p. 851-858, 2007.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo: Companhia Editorial nacional, 777 p., 1998.

KAPOOR, V.P.A. A galactomannan from the seeds of *Delonix regia*. **Phytochemistry**, v. 11(3), p. 1129-1132, 1972.

KASS, E.; WINK, M. Phylogenetic relationship in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences cpDNA (*rbcl*) and ncDNA (ITS 1 and 2). **Mol. Phylog. Evol.**, v. 8, p. 65-88, 1996.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition** v. 44, p. 3358-3393, 2005.

KONO, H.; NUMATA, Y.; NOGAI, N.; ERATA, T.; TAKAI, M. Studies of the series of cellooligosaccharide peracetates as a model for cellulose triacetate by ^{13}C CP/MAS NMR spectroscopy and X-ray analyses. **Carbohydr. Res.**, v. 322, p. 256-263, 1999.

KOOIMAN, P. Structures of the galactomannan from seeds of *Annora muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor* and *Sophora japonica*. **Carbohydr. Res.**, v. 20, p. 329-337, 1971.

LEUNG, M.Y.K.; LIU, C.; KOON, J.C.M.; FUNG, K.P. Polysachharides biological responses modifiers. **Immunology Letters**, v. 105, p. 101-114, 2006.

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

LOMBARDI, S.C.; MERCÊ, A.L.R.; Properties of complexes of galactomannan of *Leucaena leucocephala* and Al^{3+} , Cu^{2+} and Pb^{2+} . **Bioresource Technolgy**, v. 89, p. 63-73, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Ed. Plantarum, 163 p., 1992.

MANZI, A.E.; MAZZINI, M.N.; CERESO, A.S. The galactomannan system from the endosperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Carbohydr. Res.**, v. 125, p. 127-143, 1984.

McCLEARY, B.V. Enzymic hydrolysis fine structure and gelling interaction of legume seed D-galactose-D-mannans. **Carbohydr. Res.**, v.71, p. 205-230, 1979.

McCLEARY, B.V.; AMADO, R.; WAIBEL, R.; NEUKOM, H. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydr. Res.**, v. 92, p. 269-285, 1981.

MEIER, H. On the structure of cell walls and cell wall mannans from ivory nuts and from dates. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 28, p. 229-240, 1958.

MILLANE, R.P.; HENDRIXSON, T.L. Crystal structure of mannan and glucomannans. **Carbohydr. Polym.**, v. 25, p. 245-251, 1994.

NAVARINI, L.; GILL, R.; GOMBAC, V.; ABATANGELO, A.; BOSCO, M.; TOFFANIN, R. Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica*: isolation and characterization. **Carbohydr. Polym.**, v. 40, p. 71-81, 1999.

NEWMAN, R.H.; HEMMINGSON, J.A. Interactions between locust bean gum and cellulose characterized by ^{13}C n.m.r. spectroscopy. **Carbohydr. Polym.**, v. 36, p. 167-172, 1998.

NI, Y.; TURNER, D.; YATES, K.M.; TIZARD, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1745-1755, 2005.

NIEDUSZYNSKI, I.; MARCHESSAULT, R.H. The crystalline structure of poly- β ,D(1 \rightarrow 4)mannose: mannan I. **Can. J. Chem.**, v. 50, p. 2130-2138, 1972.

NOBLE, O.; PEREZ, S.; ROCHAS, C.; TARAVEL, F.R. Optical rotation of branched polyssaccharides. **Polym. Bulletin**, v.16, p. 175-180, 1986.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I.M.; COIMBRA, T.L.M.; GORIN, P.A.J.; SIERAKOWSKI, M.R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**. v. 60, p. 201-208, 2003.

OOSTERVELD, A.; COENEN, G.J.; VERMEULEN, N.C.B.; VORAGEN, A.G.J.; SCHOLS, H.A. Structural features of acetylated galactomannans from green *Coffea arabica* beans. **Carbohydr. Polym.**, v. 58, p. 427-434, 2004.

PARDO, C.; CUBAS, P.; TAHIRI, H. Molecular phylogeny and systematics of *Genista* (Leguminosae) and related based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (*trnL-trnF* intergenic spacer). **Plant. Syst. Evol.**, v. 244, p. 93-119, 2004.

PETKOWICZ, C.L.O. **Biopolímeros da semente de *Schizolobium amazonicum* (pinho cuiabano): galactomananas e arabinanas**. Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica)-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

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

PETKOWICZ, C.L.O.; REICHER, F.; CHANZY, H.; TARAVEL, F.R.; VUONG, R. Linear mannan in the endosperm of *Schizolobium amazonicum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 44, p. 107-112, 2001.

PETKOWICZ, C.L.O.; SCHAEFER, S.; REICHER, F. The mannan from *Schizolobium parahybae* is not a reserve polysaccharide. **Carbohydr. Polym.**, v. 69, p. 659-664, 2007.

PETKOWICZ, C.L.O.; SIERAKOWSKI, M.R.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, R. Galactomannanas and arabinans from seeds of Caesalpinaceae. **Phytochemistry**, v. 49 (3), p. 737-743, 1998.

PIRES, L.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. An active heparinoid obtained by sulphation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydr. Polym.**, v. 46, p. 165-169, 2001.

PRINCI, E.; VICINI, S.; PROIETTI, N.; CAPITANI, D. Grafting polymerization on cellulose based textiles: A ^{13}C solid state NMR characterization. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 1196-1203, 2005.

RAMESH, H.P.; YAMAKI, K.; TSUHIDA, T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydr. Polym.**, v. 50, p. 79-83, 2002.

RAO, C.V.N.; MUKHERJEE, A.K. Constitution of a mannan from the kernel of palmyra palm nut. **J. Indian Chem. Soc.**, v. 39, p. 711-716, 1962.

RECHIA, C.G.V.; SIERAKOWSKI, M.R.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Polysaccharides from the seeds of *Senna multijuga*. **Int. J. Biol. Macrobiol.**, v. 17 (6), p. 409-412, 1995.

REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D.; CORRÊA, J.B.C. Seed gum of *Stryphnodendron barbatiman*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 28, p. 353-361, 1991.

REID, J.S.G.; BEWLEY, J.D. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*), an endospermic leguminous seed. **Planta**, v. 147(2), p. 145-150, 1979.

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

RIZINNI, C.T. **Árvores e Madeiras Úteis do Brasil**. São Paulo: Edgar Blucher, 1987. p. 133-134.

SAMPEDRO, M.C.; ARTOLA, R.L.; MURATURE, M.; MURATURE, D.; DITAMO, Y.; ROTH, G.A.; KIVATINITZ, S. Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. **Int. Immunopharmacol.**, v. 4, p. 411-418, 2004.

SANFORD, P.A.; BAIRD, J.; Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. **The polysaccharides vol. 1**, New York: Academic Press, 1983. p. 411-490.

SCHERBUKHIN, V.D.; ANULOV, O.V. Legume Seed Galactomannan (Review). **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 35 (3), p. 229-244, 1999.

SCHIERMEIER, S.; SCHMIDT, P.C. Fast dispersible ibuprofen tablets. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 295-305, 2002.

SCHNABEL, A.; WENDEL, J.F. Cladistic biogeography of *Gleditsia* (Leguminosae) based on ndhF and rpl16 chloroplast gene sequences. **Am. J. Bot.**, v. 85(12), p. 1753-1765, 1998.

SEAMAN, J.F.; MOORE, W.E.; MITCHELL, R.L.; MILLET, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **Tappi**, v. 37, p. 336-343, 1954.

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

SINGH, V.; MISHRA, U.C.; KHARE, G.C.; GUPTA, P.C. A neutral seed gum from *Abutilon indicum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 33, p. 203-205, 1997.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Modelling the rheological behavior of galactomannan aqueous solution. **Carbohydr. Polym.**, v. 59, p. 339-350, 2005.

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

SMALL, R.L.; RYBURN, J.A.; CRONN, R.C.; SEELANAN, T.; WENDEL, J.F. The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *Adh* sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. **Am. J. Bot.**, v. 85, p. 1301-1315, 1998.

SONI, S.K.; BOSE, S. Seed galactomannans and their structures. **J. Scient. Industr. Res.**, v. 44, p. 544-547, 1985.

STEPHEN, A.M. Other plant polysaccharide. In: ASPINALL, G.O. **The polysaccharides vol.2**, New York: Academic Press, v. 2, p. 98-180, 1983.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal Primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Mol. Biol.**, v. 17, p. 1105-1109, 1991.

TAVARES, C.; MONTEIRO, S. R.; MORENO, N.; LOPES DA SILVA, J.A. Does the branching degree of galactomannans influence their effect on whey protein gelation? **Colloids and Surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects**. v. 270, p. 213-219, 2005.

TAVARES, G. A. **Estrutura e propriedades físico-químicas da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* Willd. (Cassia)**. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica)-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

TAVARES, R.O. **Galactomanana de *Adenantha pavonina* L.: aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas**. Curitiba, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica)-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará.

TEMPLETON, A.R.; MASKAS, S.D.; CRUZAN, M.B. Genes trees: A powerful tool for exploring the evolutionary biology of species and speciation. **Plant Species Biology**, v. 15, p. 211-222, 2000.

TEWARD, K.; KHARE, N.; SINGH, V.; GUPTA, P.C. A non-sonic seed-gum from *Cassia corybosa*. **Carbohydr. Res.**, v.135, p. 141-146, 1984.

TIMELL, T.E. Vegetable ivory as a source of a mannan polysaccharide. **Can. J. Chem.**, v.35, p. 333-338, 1957.

TOMARI, N.; ISHIZUKA, Y.; MORIYA, A.; KOJIMA, S.; DEYAMA, T.; MIZUKAMI, H.; TU, P. Pharmacognostical studies of cistanchis herba (III): phylogenetic relationship of the *Cistanche* plants based on plastid *rps2* gene and *rpl16-rpl14* intergenic spacer sequences. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 2, p. 218-222, 2002.

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

VENDRUSCOLO, C.W.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 1-11, 2005.

WATKINS, J.T.; CANTIFLLE, D.J.; HUBER, D.J.; NELL, T.A. Gibberelic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. **J. Am. Hort. Sci.**, v. 110, p. 61-65, 1985.

WHISTLER, R.L.; SMART, C.L. **Polysaccharide Chemistry**. New York: Academic Press, 1953, p. 292-301.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.; Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylo-genetics. IN: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 315-322.

WOJCIECHOWSKI, M.F.; SANDERSON, M.J.; HU, J.M. Evidence on the monophyly (Fabaceae) and its major subgroups based on nuclear ribosomal DNA ITS and chloroplast DNA *trnL* intron data. **Syst. Bot.**, v. 24(3), p. 409-437, 1999.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65-68, 1963a.

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

YANG, L.; CHU, J.S.; FIX, J.A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 235, p. 1-15, 2002.

ZAWADZKI - BAGGIO, S.F.; SIERAKOWSKI, M.R.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F. A linear (1-5) linked α -L-arabinofuranan from seeds of guapuruvu (*Schizolobium parahybum*), **Carbohydr. Res.**, v. 233, p.265-269, 1992.

APÊNDICE – Sequência contígua da região intergênica *trnL-trnF* de *Schizolobium amazonicum*

		10	20	30	40	50	60
primer forward	-					
primer reverse	+	TATTGAAACTGGTGACACGAGGATTTTCAGTCCTCTGCTCTACCGGGTGAGCTATCCCGA					
S. amazonicum						
		70	80	90	100	110	120
primer forward	-					
primer reverse	+	CCATTTCGTGACGCATCATCCTCATTTTAAGAGATTACTTGAGTATATGTCAACTAAATAA					
S. amazonicum						
		130	140	150	160	170	180
primer forward	-					
primer reverse	+	AAATAAAAAGGCGAAAAAAAAATTTACAAAGTCTTATCCAAGTCCGGAATTTCTTGGA					
S. amazonicum						
		190	200	210	220	230	240
primer forward	-					
primer reverse	+	TCTTCCAAAATAAGACTTTGTAAGTTTCAGTCGGAGTAATGATATGTATTGTTAATCATT					
S. amazonicum						
		250	260	270	280	290	300
primer forward	-					
primer reverse	+	CAAATGAGGATTCCCTTGCTCAAAGATAAGATGTTCAATTTGTACGTTTATCATATAGAAAC					
S. amazonicum						
		310	320	330	340	350	360
primer forward	-					
primer reverse	+	CCAATTTTACGTATATCATATATATCACATTACATATTCCAAACATATTCCACATATGCC					
S. amazonicum						
		370	380	390	400	410	420
primer forward	-					
primer reverse	+	AAGACTTGTGATAAGAAAAAAGAAAAATTCACCTCAGATCCGTTTGTGAAAGAAATAGAATG					
S. amazonicum						
		430	440	450	460	470	480
primer forward	-					
primer reverse	+	AATAAGAAACATAACGAATTTGGAACCCTAAAAAAGAGGATATAGGATATAT-ATT					
S. amazonicum						
		490	500	510	520		
primer forward	-					
primer reverse	+	A					
S. amazonicum		AGATTACAGAGTTAAACGGGCTTTTGGGGATAGAGGGACTGAACCACA					
		AGATTACAGAGTTAAACGGGCTTTTGGGGATAGAGGGACTGAACCACA					