

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

**DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO E DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO
DE PESOS MOLECULARES DO GALACTOMANANO DE SEMENTES DE
Dimorphandra mollis POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
NÁDIA REGINA RODRIGUES
aprovada pela Comissão Julgadora
em 16 de dezembro de 1997.

Campinas, 16 de dezembro de 1997.

Nadia Regina Rodrigues


Prof. Dr. GIL EDUARDO SERRA
Presidente da Banca

Orientador: Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
Co-orientador: Prof. Dra. Telma Teixeira Franco

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Campinas, Dezembro de 1997.



N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/ 32405	
PROC. 395/98	
C	D
PREÇO	24.990
DATA	22/03/98
N.º CPD	

CM-00105128-6

R618d

Rodrigues, Nadia Regina

Desenvolvimento analítico e determinação da distribuição de pesos moleculares do galactomanano de sementes de *Dimorphandra mollis* por cromatografia de permeação em gel / Nadia Regina Rodrigues. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Gil Eduardo Serra

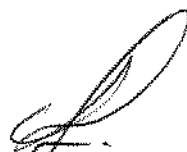
Co-orientador: Telma Teixeira Franco

1. *Dimorphandra mollis*. 2. Cromatografia de permeação em gel.
3. Polissacarídeos. I. Serra, Gil Eduardo II. Franco, Telma Teixeira.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA

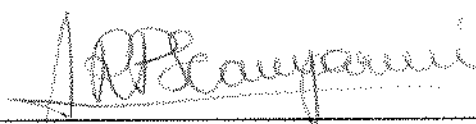


Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(orientador)



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(membro)

Dr. Marcos Silveira Buckeridge
(membro)



Prof. Dra. Adilma R. P. Scamparini

Campinas, 16 de dezembro de 1997.

Dedicatória

À minha filha Priscilla,
pela alegria de sua existência.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Telma Teixeira Franco, meu especial agradecimento pela amizade e dedicada participação como co-orientadora.

Ao meu orientador Dr. Gil Eduardo Serra, pela possibilidade de realização desse trabalho.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas pelo apoio institucional.

Ao Prof. Dr. Mário Politi e seu aluno Fabio H. Florenzano, do Laboratório de Fotoquímica - USP, pela atenção, ajuda e disponibilidade.

À Copersucar, na pessoa do Sr. José Alberto Sales, pelo empréstimo de equipamento para o trabalho desenvolvido.

Aos colegas Edilberto, Marcos, Adilson, Paulo, Jair e Sônia pelas diversas colaborações.

A Zé Lima pela paciência e dedicação.

À banca examinadora, pelas correções e sugestões valiosas.

À todas as pessoas que de alguma forma possibilitaram a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

1-INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1- Galactomanano.....	3
2.1.1- Generalidades.....	3
2.1.2- Composição em monossacarídeos.....	5
2.2- Cromatografia de permeação em gel.....	7
2.3- Determinação do peso molecular e sua distribuição (DPM).....	09
2.4- Espalhamento de luz.....	13
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1- Material.....	18
3.2- Determinação da razão manose : galactose.....	18
3.3- Determinação da Média de Peso Molecular.....	20
3.3.1- Peso Molecular Médio com Software CPG-Integrador.....	20
3.3.2- Peso Molecular Médio com Software CPG-Millennium.....	20
3.3.3- Peso Molecular Absoluto com Espalhamento de Luz.....	21
3.4- EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	23

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1- Razão manose : galactose.....	25
4.2- Peso Molecular Médio com Software CPG-Integrador	28
4.3- Peso Molecular e sua Distribuição (DPM) através de CPG- Milenium.....	36
4.4- Peso Molecular Absoluto através de Espalhamento de Luz.....	44
5- CONCLUSÕES.....	48
6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	49
7-ANEXO1 . Relatórios utilizados na determinação de pesos moleculares da amostra de <i>D. mollis</i> por GPC-Integrador.....	54
8-ANEXO 2. Relatórios utilizados na determinação de pesos moleculares da amostra de <i>D. mollis</i> por GPC-Millenium.....	55
9-ANEXO 3. Relatórios utilizados na determinação de pesos moleculares da amostra de <i>D. mollis</i> por LALLS.....	56

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Relação manose : galactose (M:G) em plantas leguminosas.....	6
TABELA 2. Variação da propriedade dos polímeros em relação ao peso molecular e dispersão em água.....	11
TABELA 3. Caracterização do peso molecular dos padrões de dextranas determinados através de vários métodos.....	19
TABELA 4. Faixa de concentração de polissacarídeo para caracterização de peso molecular.....	21
TABELA 5. Razão manose : galactose de semente de <i>D. mollis</i>	27
TABELA 6. Peso molecular médio de polissacarídeo de sementes de <i>D. mollis</i> e outras leguminosas determinado por HPSEC.....	28
TABELA 7. Média de determinações de peso molecular médio de galactomananos de <i>D. mollis</i> , com software GPC - Integrador e colunas em série KS 805,804 e 803.....	31
TABELA 8. Médias de pesos moleculares de uma amostra do galactomanano de <i>D. mollis</i> , com GPC Millenium	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química genérica de galactomanano.....	3
Figura 2. Esquema representativo de uma matriz para empacotamento de coluna de exclusão de tamanho (a), e mecanismo de cromatografia de exclusão (b).....	7
Figura 3. Distribuição do peso molecular do polímero; relação entre a curva e os pesos médios (Mp : peso molecular do ápice do pico; Mn : peso médio numérico; Mw : peso médio ponderal; Mv : peso médio viscosimétrico; Mz : peso médio por ultracentrifugação).....	9
Figura 4. Cromatograma representando a curva de distribuição de pesos moleculares com intervalos de volume da amostra, para utilização no cálculo do peso molecular ponderal médio de polímeros.....	10
Figura 5. Cromatogramas de três polímeros de mesmo peso molecular médio com diferentes distribuições (DPM).....	12
Figura 6. Diagrama representando o espalhamento de luz e seus detectores em um fotômetro.....	14
Figura 7. Representação gráfica de Zimm	15
Figura 8. Representação gráfica simulada por microcomputador para peso molecular de: $(1,038 \pm 0,04) 10^5 \text{g/mol}$	16
Figura 9. Cromatograma por CLAE de padrões de galactose (G) e manose (M). Coluna HPX-87P, fase móvel água deionizada, fluxo 1,0 mL/min temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.....	25
Figura 10. Cromatograma por CLAE de amostra do galactomanano hidrolisado da <i>D. mollis</i> , galactose (G) e manose (M). Coluna HPX-87P, fase móvel água deionizada, fluxo 1,0 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.....	26
Figura 11. Cromatograma por CLAE da amostra do galactomanano de <i>D. mollis</i> . Coluna SEC- 40XL e 30XL, fluxo 1,0 mL/min., fase móvel 0,02% NaN ₃ em água, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.....	29

Figura 12. Curva de calibração para determinação dos pesos moleculares de galactomanano da <i>D. mollis</i> , em três colunas KS 805, 804 e 803 em série protegidas com pré coluna Shodex KS - G sugar, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C com detector de índice de refração, GPC package. Padrões: dextranas de: V=5.000.000, IV=1.750.000, III=550.000, II=79.000, PM I=27.000.....	33
Figura 13. Exemplo de um cromatograma da determinação do peso molecular através do GPC Package Integrador do galactomanano de <i>D.mollis</i> em três colunas KS 805, 804 e 803 em série protegidas com pré coluna Shodex KS - G sugar, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.....	34
Figura 14. Curva de distribuição de peso molecular de galactomanano de <i>D.mollis</i> através do GPC-Package-Integrador com três colunas Shodex KS 805, 804 e 803 em série protegidas com pré coluna Shodex KS - G sugar , fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.....	35
Figura 15. Padrões de dextranas PM: V=5.000.000, VI=1.750.000, III=550.000, II=79.000, I=27.000, injetados separadamente em três colunas KS 805, 804 e 803 em série protegidas com pré coluna KS - G sugar e sobrepostos, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração, utilizando-se o software Millenium.....	38
Figura 16. Curva de calibração dos padrões de dextranas construída com software Millenium.....	39
Figura 17. Cromatograma da amostra padrão de dextrana 550.000 Da, em três colunas KS 805, 804 e 803, em série, protegidas com pré coluna KS - G sugar, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração, utilizando-se o software Millenium.....	40
Figura 18. Cromatograma de galactomanano de <i>D.mollis</i> em três colunas Shodex KS 805, 804 e 803, em série, protegidas com pré coluna Shodex KS - G sugar, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração, tilizando-se o software Millenium.....	43
Figura 19. Curva de calibração da absorbância x índice de refração do padrão de NaCl.....	46
Figura 20. Curva de calibração para obtenção do dn/dc da amostra de <i>D.mollis</i> ...	46

Figura 21. Gráfico de Zimm do padrão de dextrana $4,3 \times 10^5$ Da, obtido através de análises realizadas por fotômetro de espalhamento de luz.....	47
Figura 22. Gráfico de Zimm da amostra de galactomanano de <i>D. mollis</i> obtido através de análises realizadas por fotômetro de espalhamento de luz.....	47

RESUMO

O galactomano extraído de sementes de *Dimorphandra mollis* teve seu peso molecular e sua distribuição de pesos moleculares determinados através de diversas metodologias envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência com colunas de permeação em gel e detector de índice de refração com uso de software e fotômetro de espalhamento de luz (LALLS).

A *D. mollis* é popularmente conhecida como faveiro ou faveira. A obtenção de sementes de *D. mollis* pode ser feita através de extrativismo, pois é uma espécie importante em cerrados e caatinga nordestina, e a extração de tecidos do endosperma, ricos em galactomanano, é possível de ser feita com sucesso; as sementes apresentam alto teor de galactomanano, atingindo mais de 40% do seu peso.

A razão manose : galactose do galactomanano de *D. mollis* foi determinada com auxílio de cromatografia líquida de alta eficiência, coluna HPX - 87P à temperatura de 84°C com água deionizada como eluente, fluxo de 1,0 mL/min e detector de índice de refração.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi testada para determinação do peso molecular do galactomanano de *D. mollis* com diferentes metodologias para cálculo, primeiro sem auxílio de software específico para análise de cromatografia de permeação em gel, com colunas de exclusão SEC XL 40 e 30 em um forno a 55°C, 0,02% azida sódica como eluente e detector de índice de refração. Foi testado um software acoplado a um integrador, colunas de permeação em gel dispostas em série (KS 805, 804 e 803, e pré coluna KS-G), num forno com 55°C, 0,02% azida sódica como eluente, com fluxo de 1,0 mL/min e detector de índice de refração. Como os resultados obtidos foram pouco coerentes, foi testado um software de GPC acoplado a um micro-computador (programa Millenium) nas mesmas condições que os citados anteriormente. O valor de peso molecular obtido foi de aproximadamente $1,9 \times 10^6$ Da para o galactomanano em estudo.

Para comparação dos pesos moleculares do galactomanano de *D. mollis*, foi usado um fotômetro de espalhamento de luz "low angle laser light scattering" (LALLS), o qual deu como resultado do peso molecular do galactomanano em estudo aproximadamente $1,9 \times 10^6$ Da.

O galactomanano presente na *D. mollis* apresentou um peso molecular próximo a 2×10^6 Da e razão manose : galactose de 2 : 1, valores estes similares àqueles obtidos para goma guar.

Dentre as metodologias que permitem a determinação do Peso Molecular do galactomanano de *D. mollis* aquelas que usam GPC - Millenium (Waters) e de fotômetro de luz (LALLS) são recomendadas devido à sua aplicação para polímeros diversos.

SUMMARY

The galactomannan extracted from seeds of *Dimorphandra mollis* had its molecular weight and its distribution of molecular weight determined by various methods including high performance liquid chromatography (HPLC) with permeation columns gel and refraction index detector making use of software and low angle laser light scattering (LALLS).

“Faveiro” or “faveira” is the popular name by which *D. mollis* is known. Because of the importance of the species in the Brazilian Cerrado and Northe-astern Caatinga, its seeds can be easily obtained by extractivism. The extraction of endosperm tissue, which is rich in galactomannan, is possible to be done successfully. The seeds contain high quantities of galctomannan representing more than 40% of its net weight.

HPLC was tested to determined the *D. mollis* galactomannan molecular weight with different calculating methods. Initially, it was tested without the aid of a specific software to permeation gel chromatography analyses, with exclusion columns SEC 40 and 30 in a oven at 55°C, using 0.02% sodic azide mobile phase and refraction index detector. Afterwards, a software was coupled to the integrator with gel permeation columns settled in series (KS 805, 804, 803, and pre-column KS-G) in an oven at 55°C, using 0.02% sodic azide as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min and an refraction index detector. Since the data obtained were not accurate, a GPC software was coupled to a microcomputer (Millenium program) was tested with the same conditions employed previously. An approximated molecular weight of 1.9×10^6 Da was determined for galactomannan under study.

A photometer (LALLS) compared the molecular weight of the galctomannan from *D. mollis* giving a weight of approximately 1.9×10^6 Da.

The galactomannan found in *D. mollis* showed molecular weight near $2,0 \times 10^6$ Da and the ratio manose/galactose of 2:1, these figures are similar to those determined for guar gum.

Within the methodologies studied to determine the galactomannan molecular weight, those which make use of the GPC-millenium (Waters) and the light scattering photometer methods are recommended since they can be applied to different types of polymers.

1- INTRODUÇÃO

A *Dimorphandra mollis*, como várias outras plantas brasileiras, apresenta galactomanano em suas sementes; sendo este um polissacarídeo solúvel em água, um hidrocolóide estável em soluções aquosas, e que confere aumento de viscosidade (NEUKOM, 1989). A *D. mollis* é popularmente conhecida como faveiro ou faveira, possui porte arbóreo pequeno e sua casca tanífera encontra aplicação em curtumes, além de apresentar uma substância de grande importância terapêutica, a rutina (TOMASSINI & MORS, 1966; RIZZINI & MORSE, 1976). Sua madeira é empregada para tablado, confecção de caixas, compensados, forros, painéis, brinquedos e para lenha e carvão (ZPEVAK, 1994). A obtenção de sementes de *D. mollis* pode ser feita através de extrativismo, pois é uma espécie importante em cerrados e caatinga nordestina, e a extração de tecidos do endosperma, rico em galactomanano, é possível de ser feita com sucesso; as sementes apresentam alto teor de galactomanano, atingindo mais de 40% do seu peso seco (BUCKERIDGE & DIETRICH, 1990).

Os polissacarídeos de sementes de leguminosas têm sido objeto de interesse pelas indústrias de alimentos. Polissacarídeos complexos obtidos de plantas e microorganismos estão encontrando aplicação na indústria de alimentos (como aditivos para melhorar as propriedades funcionais dos alimentos processados), petrolífera, têxtil, papel, explosivos, mineração (DAVIDSON, 1980), farmacêutica e cosmética (WHISTLER & HYMOWITZ, 1979).

Os galactomananos, como os demais polissacarídeos tendem a apresentar polidispersão. Consequentemente existe dificuldade na determinação precisa do peso molecular desses materiais.

A cromatografia de permeação em gel vem sendo utilizada para determinar o peso molecular tanto para polímeros sintéticos como para naturais. Entretanto essa técnica ainda necessita ser devidamente desenvolvida para polissacarídeos.

A técnica de espalhamento de luz (EL) mais recentemente vem sendo empregada para determinação de peso molecular de polímeros bem como no estudo das interações inter e intra-moleculares desses compostos. Além disso, a técnica de EL tem sido utilizada no controle da síntese de polímeros, para acompanhamento das etapas de polimerização.

O objetivo deste trabalho é estudar a aplicação de metodologias de permeação em gel na determinação do Peso Molecular (PM) e na Distribuição do Peso Molecular (DPM) do galactomanano obtido de semente de *Dimorphandra mollis*, comparando os resultados obtidos com a técnica de espalhamento de luz para determinação do PM, e determinar a razão manose : galactose do polissacarídeo para sua caracterização.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GALACTOMANANO

Generalidades

Os galactomananos são polissacarídeos ramificados compostos por resíduos de D-manose e D-galactose. Sua estrutura básica é constituída de uma cadeia principal formada por resíduos de manose unidos entre si por ligações β -1,4. Ao esqueleto principal unem-se resíduos de galactose, através de ligações α -1,6, formando ramificações simples (DEA & MORRISON, 1975), como mostra a Figura 1.

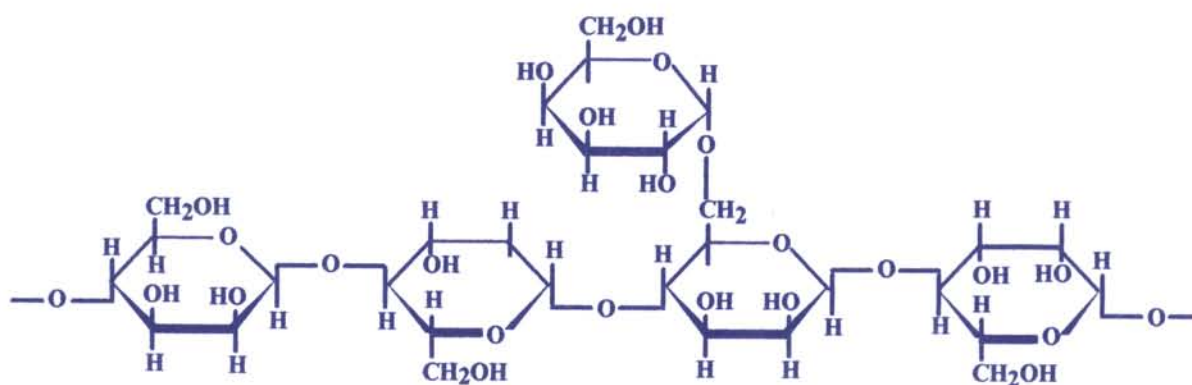


Figura 1. Estrutura química genérica de galactomanano

Existem três grupos principais de polissacarídeos de parede celular em sementes: os mananos (compreendendo os galactomananos, mananos puros e glucomananos), xiloglucanos e galactanos (REID, 1985).

A maioria dos galactomananos estudados possui estrutura básica similar à apresentada na Figura 1. Entretanto algumas variações foram encontradas, tais como, cadeias principais possuindo certa proporção de ligações 1,3 (KAPOOR & MUKHERJEE, 1971) e 1,2 (UNRAU & CHOY, 1970), e ramificações através de ligações 1,2 (KAPOOR & MUKHERJEE, 1971).

Embora os galactomananos estejam presentes em muitas leguminosas (DEA & MORRISON, 1975; BUCKERIDGE & DIETRICH, 1990), três espécies são utilizadas

comercialmente, como a goma guar obtida da *Cyamopsis tetragonolobus*, goma locusta (caroba) da *Ceratonia siliqua* e a goma tara da *Caesalpinia spinosa* (NEUKOM, 1989). O mercado para polissacarídeos utilizados como aditivos alimentares vem aumentando na ordem de 8 a 10% ao ano (LECACHEUX, & BRIGAND, 1988).

Os galactomananos são utilizados principalmente nas indústrias de alimentos, petrolífera, têxtil, papel, explosivo, mineração e cosmética. Na indústria petrolífera suas principais funções são: controle de viscosidade e redução de fricção. São utilizados para aumentar a produtividade de poços de petróleo, atuando como redutor de atrito no processo de fracionamento hidráulico pelo qual uma grande quantidade de fluido é bombeado rapidamente para dentro do poço para separar as camadas da rocha petrolífera. Por ter a propriedade de funcionar como espessante sob uma variedade de condições ambientais, a goma guar é utilizada na formulação de pastas e géis para explosivos e como espessantes de corantes da indústria têxtil. Na fabricação de papel a goma é adicionada à pasta de celulose pouco antes da formação das folhas, dando à elas uma formação mais homogênea, aumento da capacidade de dobrar e esticar e diminuição da porosidade (WHISTLER & HYMOWITZ, 1979).

Na mineração os galactomananos são amplamente utilizados na separação de líquidos e sólidos graças à capacidade da goma adsorver partículas de minerais hidratados unidas por pontes de hidrogênio. São também utilizadas na indústria tabagista como aglutinante na produção de tabaco reconstituído. Neste processo as folhas de fumo são misturadas com a goma e lançadas sobre uma cinta de metal como um filme que é retirado após secagem em processo contínuo (DAVIDSON, 1980). Na indústria cosmética e farmacêutica são utilizadas como espessantes de produtos líquidos, ou como aglutinadores de comprimidos (WHISTLER & HYMOWITZ, 1979).

Originalmente o galactomanano utilizado na indústria de alimentos era extraído de sementes de caroba, que é uma árvore nativa da Índia tropical; gradativamente o guar também ganhou mercado, sendo produzido em grande escala nos Estados Unidos. Apesar do grande esforço de pesquisa empreendido para compreender as propriedades hidrodinâmicas dessas duas gomas e encontrar substitutas, pode-se dizer que a goma caroba ainda, não possui competidoras para diversas de suas aplicações (DEA & MORRISON, 1975).

Uma propriedade muito importante dos galactomananos é a interação com outros polissacarídeos (sinergismo). Sistemas formados por galactomananos e carragenanas, xantanas e agar, têm sua estrutura modificada e podem formar gel. O mecanismo dessa interação não é completamente conhecido, mas existem teorias de

formação de redes dos polissacarídeos, as quais modificam as propriedades reológicas (FERNANDES, 1995).

Os galactomananos foram utilizados em sistemas de duas fases aquosas, em substituição a dextrana, polímero convencionalmente muito utilizado para a purificação de proteínas. Venâncio *et. al.*, 1995 utilizaram sistemas formados por polietileno glicol e derivados de goma guar para purificação de albumina bovina. Franco *et. al.*, 1996 observaram a formação de sistemas de duas fases aquosas formados por galactomananos de *D. mollis* e dextranas (2×10^6 e 5×10^5 Da), e por galactomananos de *Schizolobium parahybum* e dextrana 2×10^6 Da. Entretanto a elevada viscosidade dificulta o emprego desses sistemas na purificação em larga escala de proteína.

NEUKON(1989) afirma que a pureza das gomas é um fator importante de qualidade e depende diretamente do processo utilizado para sua extração. As sementes são descascadas, moídas e peneiradas. Este procedimento permite a separação parcial entre endosperma, onde se encontra o galactomanano, e o restante da semente.

Composição em monossacarídeos

Os galactomananos de diferentes espécies vegetais diferem com respeito à proporção entre os resíduos de D-manose e D-galactose na molécula, sendo inclusive proposta a utilização da razão manose : galactose para caracterização quimiotaxonômica (BAILEY, 1971).

As principais gomas comerciais apresentam razões manose : galactose diferentes. A goma guar possui razão 2:1, enquanto a goma tara 3:1 e a caroba 4:1. Este fator pode interferir em algumas de suas propriedades físicas (NEUKOM, 1989). Segundo GLICKISMAN, 1986 a dispersibilidade do polímero aumenta com a diminuição da razão manose:galactose; a goma guar portanto não necessita de aquecimento para interagir com a água; e o tamanho das partículas também interfere na solubilidade.

MANZI & CEREZO (1984) mostraram que a razão manose : galactose de 3:1 obtida para o galactomanano de *Gleditsia triacanthos* é na realidade um valor médio derivado de galactomanano cuja razão M:G varia de 2,0 até 4,2. Além disso, foram detectadas em todas as subfrações obtidas por filtração em gel, pequenas quantidades de xilose, arabinose e D ou L-fucose, que não puderam ser separadas por cromatografia de troca iônica. Esses autores sugeriram, baseados nessas observações e em estudos de metilação, a possibilidade de que algumas das cadeias laterais do

polissacarídeo possam ser terminadas em resíduos de L-arabinose e D-xilose. A Tabela 1 descreve a relação M:G de galactomanano de algumas plantas.

Tabela 1. Relação manose : galactose (M:G) de plantas leguminosas

Espécie	M : G	Referência
<i>Cassia grandis</i>	1,7	Buckeridge <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Ceratonia siliqua L.</i>	1,55 - 3,55	Dea & Morrison, (1975)
<i>Ceratonia siliqua L.</i>	4,04	Fernandes, (1995)
<i>Crotalaria juncea</i>	2,5	Buckeridge <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Crotalaria micans</i>	2,1	Buckeridge <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	1,68	Fernandes, (1995)
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	1,6	Piculell <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Dimorphandra mollis</i>	2,0 - 2,4	Franco <i>et al.</i> , (1996)
<i>Leucaena glauca</i>	1,3	Unrau, (1961)
<i>Leucaena leucocephala</i>	2,0 - 2,2	Buckeridge <i>et al.</i> , (1987)
<i>Mimosa platyphylla</i>	0,9	Buckeridge <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Mimosa scabrella</i>	1,0	Buckeridge <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Mimosa scabrella</i>	1,1	Ganter <i>et al.</i> , (1993)
<i>Mimosa sp.</i>	0,9	Buckeridge <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Prosopis juliflora</i>	1,2	Buckeridge <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Senna reticulata</i>	1,4	Buckeridge <i>et al.</i> , (1995a)
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	1,5	Ganter <i>et al.</i> , (1993)
<i>Schizolobium parahybum</i>	2,7	Franco <i>et al.</i> , (1996)
<i>Schizolobium parahybum</i>	3,0	Ganter <i>et al.</i> , (1993)

2.2. CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL

A cromatografia de permeação em gel (CPG) é predominantemente usada para análises de compostos de alta massa molecular, incluindo polímeros orgânicos (poliolefinas, poliestireno, poliamidas), silicone e biopolímeros (proteínas, ácidos nucleicos, oligossacarídeos, peptídeos, açúcares e glicóis). A CPG vem sendo utilizada desde os anos 60 (GUIMARÃES & COLLINS, 1995).

A cromatografia por filtração em gel, peneira molecular de difusão restrita ou por exclusão tem sua resolução baseada no tamanho efetivo das moléculas dos componentes da amostra em solução, sendo a única cromatografia com retenção mecânica e cuja coluna é recheada com matéria inerte com poros de tamanho controlado (Figura 2). De outra forma, na cromatografia convencional as separações são possíveis devido a partição entre os componentes da amostra na fase em movimento (fase móvel) e a fase estacionária. A CPG é usada para determinar a média do peso molecular e a sua distribuição, (KAMATH & WILD, 1990).

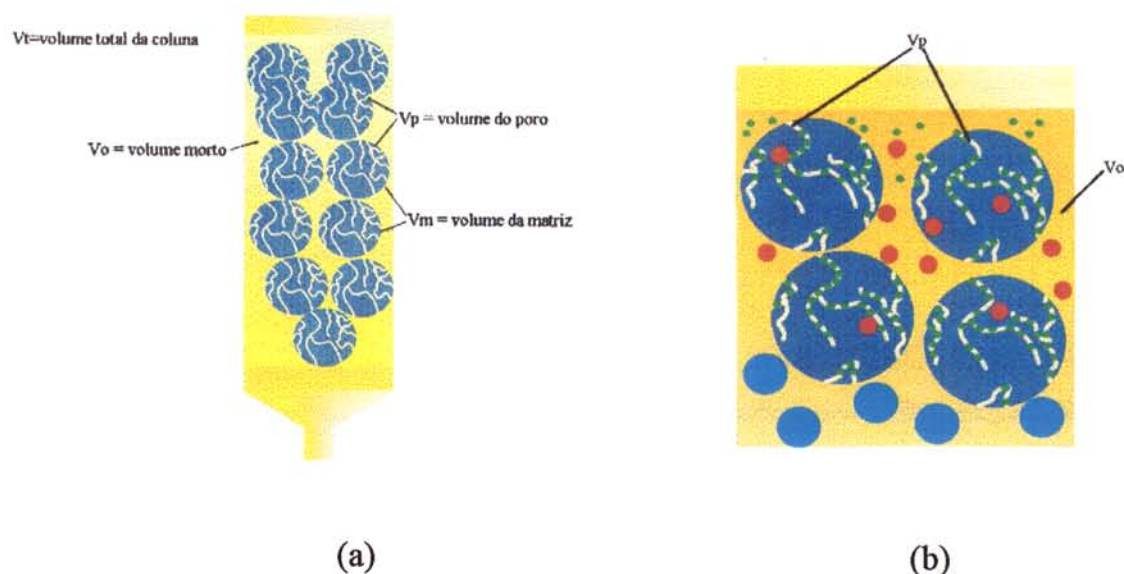


Figura 2. Esquema representativo de uma matriz para empacotamento de coluna de exclusão de tamanho (a), e mecanismo de cromatografia de exclusão (b).

Existem limites que determinam o intervalo de tamanho dos poros (Figura 2). O limite inferior, chamado limite de permeação, é aquele abaixo do qual as moléculas de menor tamanho são difundidas dentro dos poros do material; o limite superior, limite

de exclusão, é aquele acima do qual as moléculas não permeam os poros. Moléculas de tamanho intermediário entre ambos os limites são separadas total ou parcialmente de acordo com a seletividade característica de cada material. Então, são eluídas da coluna sem resolução moléculas menores que o limite de permeação e maiores do que o limite de exclusão, separando somente as que se encontram dentro destes limites (BILLMEYER & ALTGEL, 1971). As colunas operam em um intervalo correspondente a pesos moleculares entre 10^2 a 10^7 daltons, e dependendo do polímero elas influenciam os resultados de pesos moleculares e a sua distribuição. A combinação de colunas em série pode cobrir um extenso intervalo de pesos moleculares (FREEMAN, 1990).

Os materiais usados para a cromatografia de exclusão variam de acordo com a sua rigidez e com o intervalo de tamanho dentro do qual são úteis, isto é, o material a ser utilizado na coluna dependerá do tamanho efetivo das moléculas que devem ser separadas. Existem três tipos de materiais quanto à rigidez: polímeros fracos, semi-rígidos e rígidos. Os materiais fracos (não rígidos), constituídos de géis de polidextrano (Sephadex), poliacrilamidas (Bio-Gel P) e poliagaroses (Sepharose e Bio Gel A), usados normalmente com fases móveis aquosas e somente na cromatografia de exclusão clássica, os materiais semi-rígidos, constituídos de microesferas de um copolímero, como o poliestireno-divinilbenzeno, e são usados em cromatografia de exclusão clássica e líquida de alta eficiência e os materiais rígidos constituídos de partículas de sílica porosa ou de vidro poroso (GUIMARÃES & COLLINS, 1995).

O volume hidrodinâmico do polímero e o seu raio de giração afetam as suas relações com o tamanho do poro da fase estacionária. A força do solvente, ramificação do polímero e composição de co-polímeros também têm um efeito no processo de exclusão, sendo o fluxo e temperatura menos importantes (FREEMAN, 1990).

As dextranas constituem um grupo de polissacarídeos formados por uma cadeia principal de D - glucopiranoses ligadas em 1 - 6 com ligações ramificadas (1 - 3), as quais parecem ser relativamente longas e ocasionalmente distribuídas ao longo da cadeia principal linear (SMITT *et al.*, 1992). São polissacarídeos neutros, quimicamente inertes, que podem variar o PM de 40.000 até 100.000.000 de daltons (BOBBIO & BOBBIO, 1989). Elas têm sido utilizadas como referência (padrão) nas análises de polissacarídeos de alto peso molecular.

2.3. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR E SUA DISTRIBUIÇÃO (DPM)

Considerando a dificuldade em se determinar o peso molecular (PM) de polímeros aquosos, principalmente os de elevado PM, a CPG tem propriedades desejáveis, tais como: simplicidade técnica, insensibilidade a solventes e temperatura, condições amenas e versatilidade, pois é possível separar substância com massa molecular abaixo de mil ou vários milhões de daltons, variando a matriz do gel. Com calibração, os dados dos materiais são convertidos para uma curva de distribuição de peso molecular (Figura 3) e as médias dos seus respectivos pesos moleculares podem ser calculados.

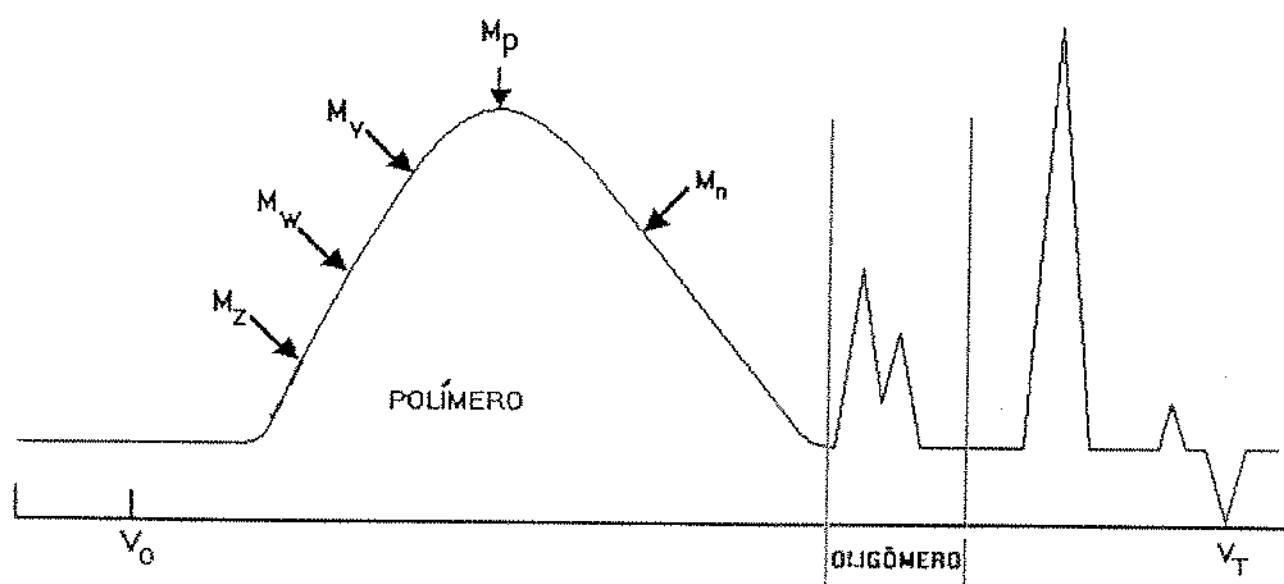


Figura 3. Distribuição do peso molecular do polímero; relação entre a curva e os pesos médios (M_p : peso molecular do ápice do pico; M_n : peso médio numérico; M_w : peso médio ponderal; M_v : peso médio viscosimétrico; M_z : peso médio por ultracentrifugação).

A média do peso molecular de um polímero é calculada em função do tamanho e do número de intervalos (fatiamento da curva) apropriados (Figura 4). A média ponderal é calculada:

$$\overline{M}_w = \frac{\sum H_i M_i}{\sum H_i}$$

Onde:

H_i = Altura da fatia i (em mV)

M_i = Peso molecular correspondente a fatia i

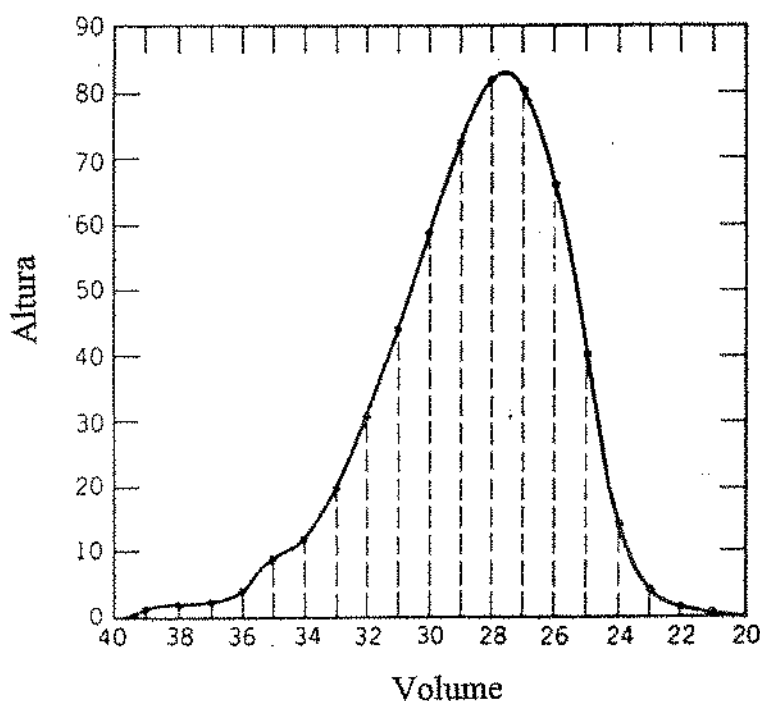


Figura 4. Cromatograma representando a curva de distribuição de pesos moleculares com intervalos de volume da amostra.

Compostos de alto peso molecular como os polímeros, são normalmente sólidos à temperatura e pressão ambientes, e também têm uma distribuição heterogênea dos componentes físicos e químicos; conseqüentemente, os polímeros exigem uma preparação cuidadosa para análises químicas, em geral. A Distribuição de Peso Molecular (DPM) do polímero é uma importante variável, uma vez que se relaciona com muitas de suas propriedades físicas, como: adesão, resistência, força elástica, fragilidade, permeabilidade a gases (Tabela 2). Não é necessário o cálculo de distribuição de peso molecular para se obter uma informação útil vinda da curva cromatográfica de exclusão de tamanho. Uma simples investigação dos cromatogramas frequentemente revela importantes informações. Por exemplo, dois ou mais polímeros podem ter média de peso molecular igual ou similar, mas uma distribuição de peso

podem ter média de peso molecular igual ou similar, mas uma distribuição de peso molecular bastante diferente. A DPM também é importante para características de processo, como por exemplo para a extrusão e a torção de fibras. A Figura 5 representa três cromatogramas indicando polímeros que possuem a mesma média de PM e diferente DPM (FREEMAN, 1990).

Tabela 2. Variação da propriedade dos polímeros em relação ao peso molecular e dispersão em água.

Propriedades	PM	Dispersão em água
Alongamento	A	D
Dureza	A	D
Fragilidade	A	D
Módulo de elasticidade	A	-
Resistência à abrasão	A	A
Resistência ao impacto	A	-
Resistência à inchação	A	-
Resistência química	A	A
Resistência à tração	A	A
Adesão	D	D
Solubilidade	D	θ
Temp. de amolecimento	A	A

A = aumenta, D = diminui, θ = pouco efeito, - = não há dados

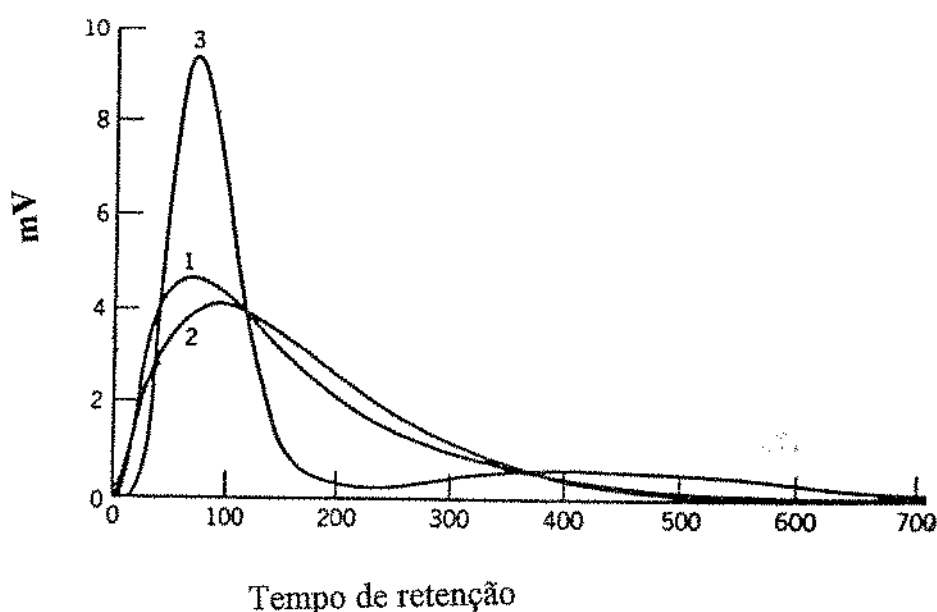


Figura 5. Cromatogramas de três polímeros de mesmo peso molecular médio com diferentes distribuições (DPM).

Os detectores que podem ser empregados na CPG são os de índice de refração, viscosidade e espalhamento de luz. Os detectores viscosimétrico e o de espalhamento de luz não devem ser empregados nas análises de amostras com baixo peso molecular pois elas causam baixo desvio de luz e pequena variação de viscosidade, esses detectores para amostras de alto peso molecular são mais sensíveis que o de índice de refração.

A cromatografia de alta eficiência (CLAE) por exclusão de tamanho com detector de concentração x viscosidade (relacionado ao ajuste da curva de Gauss de cromatogramas de concentração e viscosidade) tem sido utilizada como método para determinar peso molecular de pectinas em solução, bem como para soluções de tagacatina, goma locusta, carboximetil celulose, alginatos de sódio, pectina de maçã e goma arábica (HOAGLAND *et al.*, 1993).

HOAGLAND *et al.* (1993) também observaram um peso molecular diferente do apresentado na literatura para uma amostra comercial de goma locusta com o equipamento descrito no parágrafo anterior; concluíram que a amostra continha uma mistura de galactomananos com diferentes razões de manose : galactose, e que seus agregados poderiam estar presentes e terem formas significativamente diferentes, resultando na detecção de diferentes PM.

Os galactomananos apresentam polidispersão (geralmente homogênea) em relação ao peso molecular (SHARMAN *et al.*, 1978). Medidas efetuadas por diferentes métodos demonstraram que o peso molecular médio dos galactomananos varia de $6,0 \times 10^3$ *Sophora japonica*, até $1,9 \times 10^6$ Da, observado em *Cyamopsis tetragonolobus* (DEA & MORISON, 1975). Os mesmos autores sugerem que o alto valor encontrado para galactomanano de *Cyamopsis tetragonolobus* se deve à agregação molecular.

Foi constatado que cadeias de galactomanano adsorvem cadeias moleculares de agarose induzindo à formação de agregados mistos. Esta adsorção é diminuída na presença de iodeto. Através de um estudo em espalhamento de luz com misturas de carragenana e galactomanano foi demonstrado não haver qualquer associação dos mananos com este fenômeno, sugerindo que o galactomanano adsorve outros agregados de galactomanano, e não a molécula de manano (VIEBKE, 1995).

THURESSON *et al.* (1996) estudaram o efeito do aumento da polaridade pela adição de sais em soluções aquosas de derivados de celulose quimicamente modificadas. Foi observada a diminuição da solubilidade desses polímeros na presença dos sais NaCl, Na₂SO₄, NH₄SO₄ e aumento da solubilidade do polímero na presença de NaSCN. A explicação da diminuição da solubilidade foi atribuída ao efeito daqueles sais aumentarem a tensão superficial da água. Ao contrário, sais como o NaSCN, diminuem a tensão superficial da água (desorganizadores da estrutura molecular da água) aumentando a solubilidade do polímero.

Entretanto, KENNEDY *et al.* (1995) testaram dois eluentes aquosos na CPG a pH 7,0 (solução 0,05 M de ortofosfato de sódio em 0,25M de cloreto de sódio; solução 0,1M de nitrato de sódio em solução de azida sódica 0,02%) não observando qualquer influência dos sais testados.

2.4. ESPALHAMENTO DE LUZ

A técnica de espalhamento de luz (EL) é conhecida internacionalmente por LALLS (low angle laser light scattering).

A técnica consiste em submeter uma solução polimérica (previamente filtrada para eliminação de poeiras ou materiais interferentes) a um feixe de laser. A luz será então espalhada e detectada em diferentes ângulos (Figura 6). Amostras com baixo peso molecular necessitam de um sistema composto de somente três detectores, entretanto amostras com elevado peso molecular necessitam medidas simultâneas ou em série com 15 a 18 ângulos (WYATT, 1993).

A determinação do peso molecular absoluto por espalhamento de luz, somente tornou-se uma prática analítica precisa e rápida com o desenvolvimento da eletrônica, informática, tecnologia de fabricação de filtros, solventes altamente puros e de lasers. A utilização de qualquer solvente puro para calibração do EL é uma das vantagens da técnica em relação à CPG, sendo que padrões previamente calibrados por EL são necessários na CPG (WYATT, 1993).

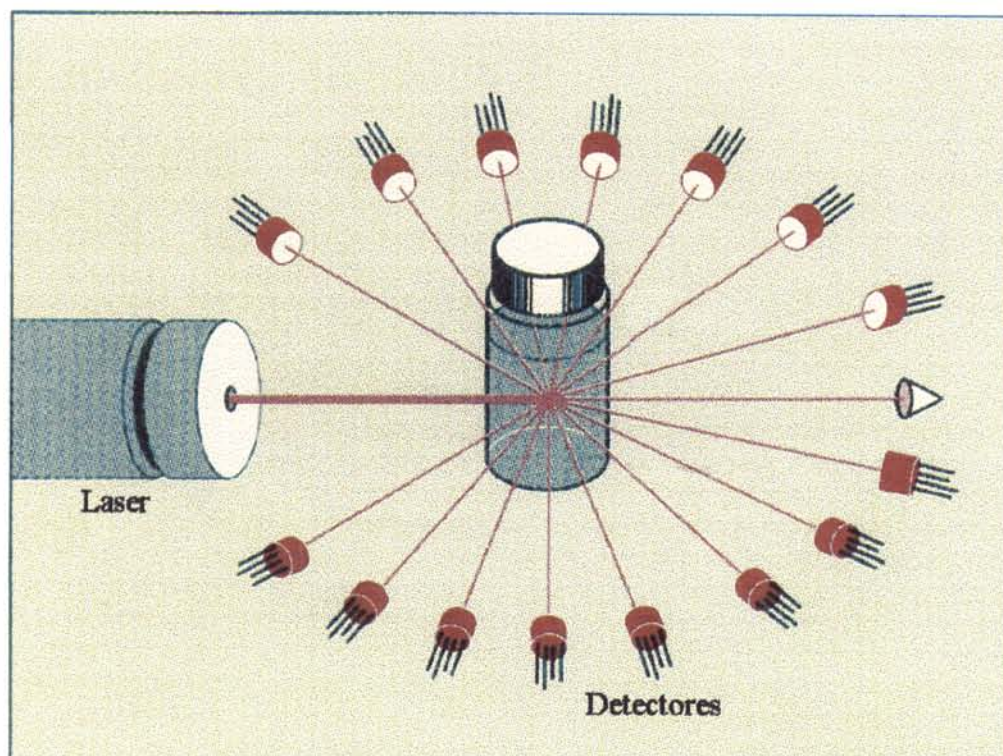


Figura 6. Diagrama representando o espalhamento de luz e seus detectores em um fotômetro.

Apesar da ampla e sofisticada teoria que fundamenta a utilização do espalhamento de luz (EL), sua técnica é simples. O procedimento para determinação do PM absoluto consiste em três etapas principais: calibração, normalização da amostra (dn/dc) e preparo da amostra com precisão e ausência de interferentes (WYATT, 1993).

Para normalização da amostra, é necessário conhecer a variação do índice de refração (dn) em relação a variação da concentração (dc) de cada solução polimérica a ter o seu peso molecular absoluto determinado. Quando dados da literatura são inexistentes, o dn/dc deve ser determinado experimentalmente para cada polímero.

O gráfico de Zimm, representado na figura 7, se baseia na seguinte equação:

$$\frac{KC}{R_{\theta}} = \left\{ 1 + \frac{16\pi^2 R_g}{3\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2} \right\} \left\{ \frac{1}{M} + 2BC \right\}$$

quando a concentração e o ângulo são iguais a zero, $\frac{KC}{R_{\theta}}$ é igual a $\frac{1}{M}$

onde:

o valor de R_{θ} é o raio da amostra medido para cada concentração e ângulo; R_g é o raio de giração; θ é o ângulo da luz espalhada; N é o número de partículas por centímetro cúbico; C é a concentração da amostra; B é a linha de extrapolação; λ é o comprimento de onda da luz no meio; dn/dC é o incremento de índice de refração específico do soluto

o valor de $\frac{KC}{R_{\theta}}$ é colocado em um gráfico em função de $\sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) + KC$,

onde:

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/dC)^2}{\lambda^4 N}$$

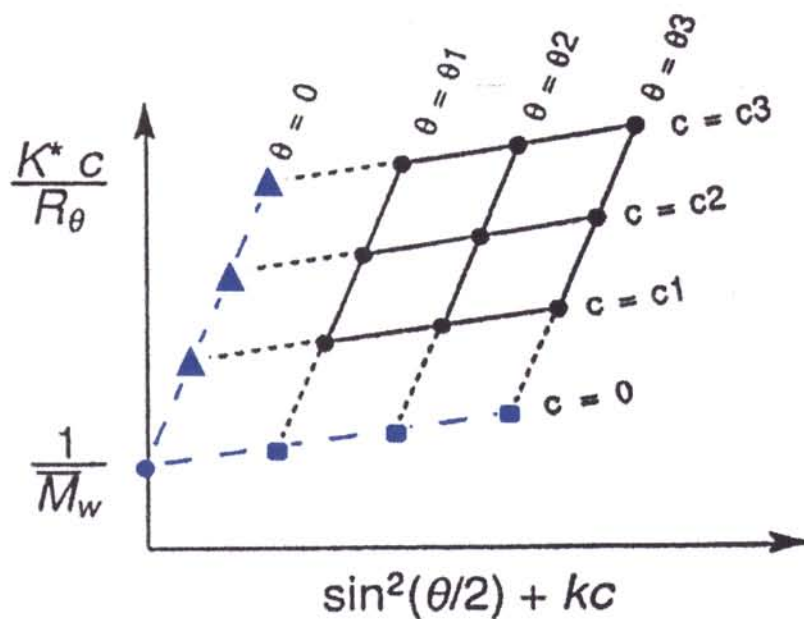


Figura 7. Gráfico de Zimm. Onde "c" indica as concentrações e "θ" indica os ângulos, as linhas cheias representam os pontos experimentais e as tracejadas as extrapolações para "c" e "θ" iguais a zero.

Existem programas computacionais para simulação de Gráficos de Zimm e predição do peso molecular absoluto, com limite superior até 10^5 (Figura 8) (WYATT, 1995).

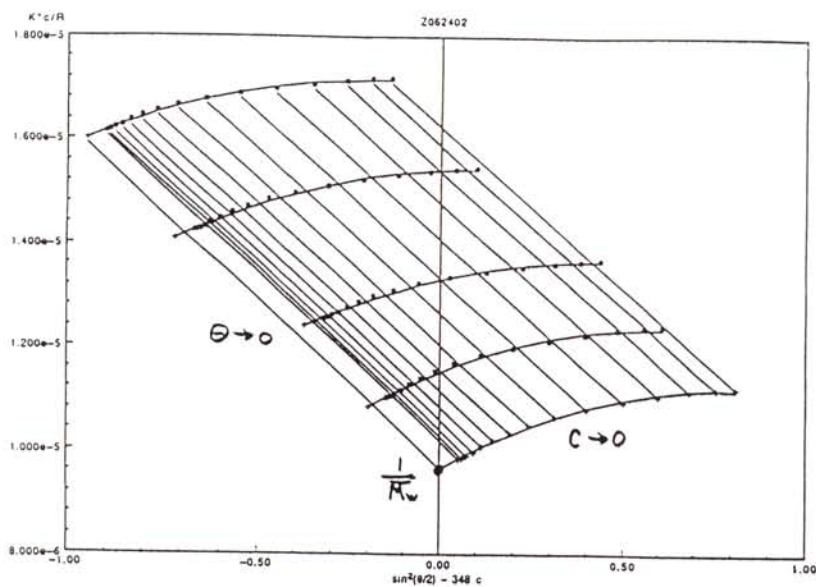


Figura 8. Representação gráfica simulada por microcomputador para peso molecular de: $(1,038 \ 0,04)10^5 \text{g/mol}$.

Os principais fatores que influenciam a precisão das medidas por EL são: rigor da obtenção do índice do dn/dc ; precisão no preparo das soluções com diferentes concentrações; conhecimento do software específico para a melhor obtenção do Gráfico de Zimm e conhecimento dos modelos de ajuste de concentração e ângulo (WYATT, 1993).

A técnica de detecção para o espalhamento de luz permite várias aplicações (WYATT, 1995): determinação do peso molecular absoluto e o tamanho de uma grande variedade de polímeros; acompanhamento de síntese de produtos farmacêuticos, poliméricos e biotecnológicos; elevada reprodutibilidade e aumento do rigor; no controle de qualidade de acompanhamento de crescimento bacteriano; estudos de simetria, agregação e ramificação de moléculas; com operação em temperatura até 210°C; diversibilidade de solventes (orgânicos e aquosos).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Amostras de galactomanano proveniente das sementes trituradas de *Dimorphandra mollis* foram preparadas por Valéria R. Panegassi no Instituto de Botânica, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. As sementes foram trituradas em um moinho tipo faca (Tecnal, Modelo MR/M, tipo Willye). Com este material foi preparada uma solução 1% em água, que foi submetida à extração dos galactomananos a 80°C durante 6 horas sob refluxo; o extrato obtido foi filtrado em tecido de algodão, sob vácuo. O resíduo do filtro foi descartado. Os galactomananos foram precipitados com etanol 96° GL, na proporção de 1 volume da amostra e 5 de álcool; após agitação manual, a solução foi armazenada em geladeira (5°C) durante 1 noite e filtrada em tecido de algodão; o polissacarídeo retido no filtro foi solubilizado em água quente e em seguida seco em estufa.

Os padrões de D (+) Manose, D (+) Galactose e Glicose, foram adquiridos da Sigma, (St. Louis, USA) e os demais da Merck (AG).

Os padrões de polissacarídeos de Dextranas foram adquiridos da American Polymer Standards Corporation, (Mentor, USA) já devidamente caracterizados conforme Tabela 3.

3.2. DETERMINAÇÃO DA RAZÃO MANOSE : GALACTOSE

A determinação da razão manose:galactose dos galactomananos da *D.mollis* foi calculada após análise desses açúcares por HPLC. A metodologia de padronização externa e alturas fornecidas pelo integrador, foram utilizadas para cálculo.

Preparo da amostra

Os polissacarídeos foram hidrolisados com ácido sulfúrico. Para esta hidrólise 5 mg de galactomanano, 0,1 mL de ácido sulfúrico 72% foram transferidos para banho a 30°C e mantida durante 45 minutos até a amostra estar totalmente dispersa no ácido. A seguir 1,7 mL de água destilada foram adicionados e a hidrólise do material foi realizada durante 1h em autoclave a 120°C. Após a hidrólise são adicionados 3,2 mL de água destilada. O material hidrolisado foi neutralizado com carbonato de bário p.a.; centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm para separar o material insolúvel. O

sobrenadante foi aplicado em coluna de troca iônica (Dowex - Sigma), a qual é eluída em 5 volumes de água deionizada e concentrado (DUBOIS *et al.*, 1956). As concentrações de amostras e padrões foram preparadas com 0,5% dos monossacarídeos em água deionizada e posteriormente analisadas em HPLC sob as seguintes condições:

coluna:	HPX - 87P
temperatura:	84C
fluxo:	1 mL/min
fase móvel:	água deionizada
detector:	índice de refração

Tabela 3. Caracterização do peso molecular dos padrões de dextranas determinados através de vários métodos.(1)

Dextranas	Mp(2)	Mw(CPG)(2)	Mw(EL)(2)	Mn(2)	Mv(2)
Peso molecular declarado					
5.000.000	4.500.000	4.900.000	4.300.000	1.500.000	1.860.000
1.750.000	1.450.000	1.750.000	1.550.000	1.250.000	451.500
550.000	350.000	548.300	517.000	346.500	165.000
79.000	68.000	78.800	75.000	49.400	83.000
27.000	23.000	27.000	26.500	19.300	28.000

(1) American Polymer Science

(2) **Mp** - Peso molecular do ápice do pico, caracterizado por cromatografia de permeação em gel; **Mw(CPG)** - Distribuição de P M, caracterizado por cromatografia de permeação em gel; **Mw(EL)** - Peso médio ponderal, caracterizado por espalhamento de luz de laser (LALLS); **Mn** - Peso médio numérico, caracterizado por osmometria de membrana, osmometria de pressão de vapor e análise de grupos terminais e **Mv** - Peso médio viscosimétrico, caracterizado por viscosimetria.

3.3. DETERMINAÇÃO DA MÉDIA DE PESO MOLECULAR.

3.3.1. PESO MOLECULAR MÉDIO COM SOFTWARE GPC PACKAGE

A determinação do PM foi conduzida com colunas Shodex (item 3.4.), sendo o cálculo conduzido através de integrador dotado de software GPC Package Waters.

3.3.2. PESO MOLECULAR MÉDIO COM SOFTWARE GPC MILLENIUM

Preparo das amostras

Soluções de amostras de galactomananos 0,01% foram preparadas em azida sódica 0,02% e mantidas sob agitação (agitador magnético) por 20 horas à temperatura ambiente e depois armazenadas em geladeira para serem submetidas à análise de acordo com descrito por BERGQUIST, (1995).

Preparo dos padrões

Foram utilizados padrões de dextrana numa concentração de: 0,02% para padrões de 27.000 a 1.750.000 daltons e 0,01% para o padrão de 5.000.000 daltons; o solvente utilizado para essas soluções foi água com azida sódica 0,02%. Soluções de dextrana padrão de diferentes pesos moleculares foram preparadas de acordo com descrito por (BERGQUIST, 1995).

Condições analíticas

Foram utilizados os equipamentos citados no item 3.4., sendo as colunas Shodex dispostas em série, a 55°C e o software Millenium GPC. A quantidade de amostra foi de 300 µL. A fase móvel foi água deionizada contendo azida sódica 0,02%, e fluxo de 1,0 ml/min.

Para determinação do peso molecular os seguintes cuidados devem ser observados, de acordo com descrito por Bergquist, 1995:

- 1 - Nunca usar ultra som (possível quebra das cadeias maiores).
- 2 - A concentração do polissacarídeo deve se situar entre 0,01 a 0,05%, de acordo com a Tabela 4, para evitar problemas de viscosidade.

4. Faixa de concentração de polissacarídeo para caracterização de peso molecular.

Faixa de PM	Concentração do padrão	Concentração da amostra
0 a 25.000	0,05%	<0,25%
25.000 a 200.000	0,02%	<0,1%
200.000 a 2.000.000	0,02%	<0,05%
>2.000.000	0,01%	<0,02%

3 - Para amostras e padrões de peso molecular inferior a 200.000 a injeção pode ser feita imediatamente após a dissolução. Para pesos moleculares superiores a 200.000 deve haver um período de equilíbrio de algumas horas dependendo do PM (pesos muito altos 16-20 horas), para que a cadeia se distenda.

4 - Soluções de polímeros aquosos podem ser armazenados em geladeira por 90 dias.

5 - Para polímeros de difícil dissolução usar calor conforme a fase móvel.

6 - O volume máximo recomendado na injeção é de 1% do volume interno da coluna vazia, multiplicado pelo número de colunas na série.

7 - As colunas devem ser instaladas em ordem decrescente de porosidade.

8 - Para curva de calibração mais exata injetar padrões individualmente.

3.3.3. PESO MOLECULAR ABSOLUTO COM ESPALHAMENTO DE LUZ

Para determinação do PM absoluto foi utilizado um fotômetro de espalhamento de luz, Down DPS Laser Photometer, Wyatt Technology Corporation. Essas análises foram realizadas com a colaboração do Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As amostras analisadas por EL devem ser cuidadosamente preparadas, considerando a grande sensibilidade da determinação do PM absoluto e ainda o fato do galactomanano ser dissolvido em solução aquosa, visto o uso de solventes orgânicos para a solubilização de polímeros ser mais comum.

Na determinação do PM absoluto da amostra de *D. mollis*, foi analisado também padrão de dextrana com Pesos Moleculares já caracterizados pelo fornecedor e que incluem o PM Absoluto e PM Médios com diversas metodologias (Tabela 3).

Um dos parâmetros que deve ser conhecido é o dn/dc de cada amostra, normalmente encontrado em literatura; como para a amostra a ser analisada não há dados em literatura, esse valor foi determinado em laboratório. Para essas determinações foram preparadas amostras com concentrações conhecidas e determinados os seus respectivos índices de refração.

Preparo das amostras

Para a determinação do peso molecular absoluto de cada amostra foram preparadas oito soluções, com concentrações de 0,01 a 0,50 g/100mL em água contendo 0,02% azida, e filtradas em membranas Milipore 0,45 μ m (sem causar perturbação nas amostras, para evitar a formação de bolhas). Os frascos utilizados para as amostras devem estar limpos, com ausência de partículas, para evitar erros de leitura.

Determinação da Concentração

O teor de açúcar total das amostras foi determinado pelo método fenol sulfúrico. Foram pipetados 0,5 mL da solução de amostras contendo de 10 a 70 mg de açúcar, e padrões de glicose no intervalo entre 7 a 145 mg, para um tubo de ensaio. A seguir 0,5 mL de água e 0,5 mL da solução de fenol 5% foram pipetados, seguidos de 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (SEAMAN et al., 1945).

A absorbância da cor amarelo-laranja foi medida a 490 nm em espectrofotômetro UV-VIS.

Determinação do Índice de Refração

Para se obter o índice de refração (I.R.) das amostras foi utilizado o NaCl como padrão, por possuir valores de índice de refração conhecidos pela literatura. As condições de operação do detector de índice de refração foram as seguintes:

sensibilidade:	4
fator de escala:	20
fluxo:	0,2 ml/min

vel: solução aquosa de azida sódica 0,02%

A absorbância das amostras e padrões foram obtidas no detector de I.R. em (m.V). Com os índices de refração das soluções padrão de NaCl da literatura e os seus respectivos mV determinados através das soluções preparadas, obteve-se a curva de calibração mV x I.R. e foram determinados os índices de refração das amostras. Os resultados se encontram discutidos no item 4. 4.

Determinação do dn/dc

Depois de se obter o índice de refração e as concentrações das amostras, foi montada uma curva Concentração x Índice de Refração e o dn/dc foi obtido através do declive da reta. Os resultados se encontram discutidos no item 4.4.

$y = mx + b$, onde:

m = declive da reta (dn/dc)

y = concentração

x = índice de refração

b = interceção da reta no eixo y

3.4. EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Bomba de HPLC série 1050 - Hewlett Packard

Injetor - Reodyne

Forno de coluna CHM - Waters

- Três colunas 8 x 300 mm e pré coluna, série KS - Showa Denko, com os seguintes limite de exclusão e conectadas nesta ordem:

Pré - coluna KS-G

Limite de exclusão (Da)

KS - 805 5×10^6

KS - 804 4×10^5

KS - 803 5×10^4

- Coluna HPX - 87 C 7,8 x 300 mm - Bio Rad

- Coluna HPX-87P; 7,8 x 300 mm - Bio-Rad

- Coluna SEC XL 40 e 30; 7,8 x 300 mm - Bio Rad

- Detector Differential Refractometer - Waters

- Integrador 746 equipado com GPC package - Waters

- Micro Power Mate 433 - Nec, equipado com Millenium Cromatography
Manager GPC software - Waters

- Fotômetro Down DPS Laser - Wyatt

- Espectrofotômetro UV - VIS DU 70 - Beckman

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RAZÃO MANOSE : GALACTOSE DO GALACTOMANANO

As análises dos monossacarídeos manose e galactose do polissacarídeo de *D. mollis* foram conduzidas segundo as condições descritas no item 3.2.

Em teste preliminar foi testada uma coluna de troca iônica HPX-87C, com a qual não se obteve boa separação dos monossacarídeos. A seguir foi testada a coluna HPX 87P, que mostrou boa separação conforme cromatograma dos padrões de manose e galactose (Figura 9).

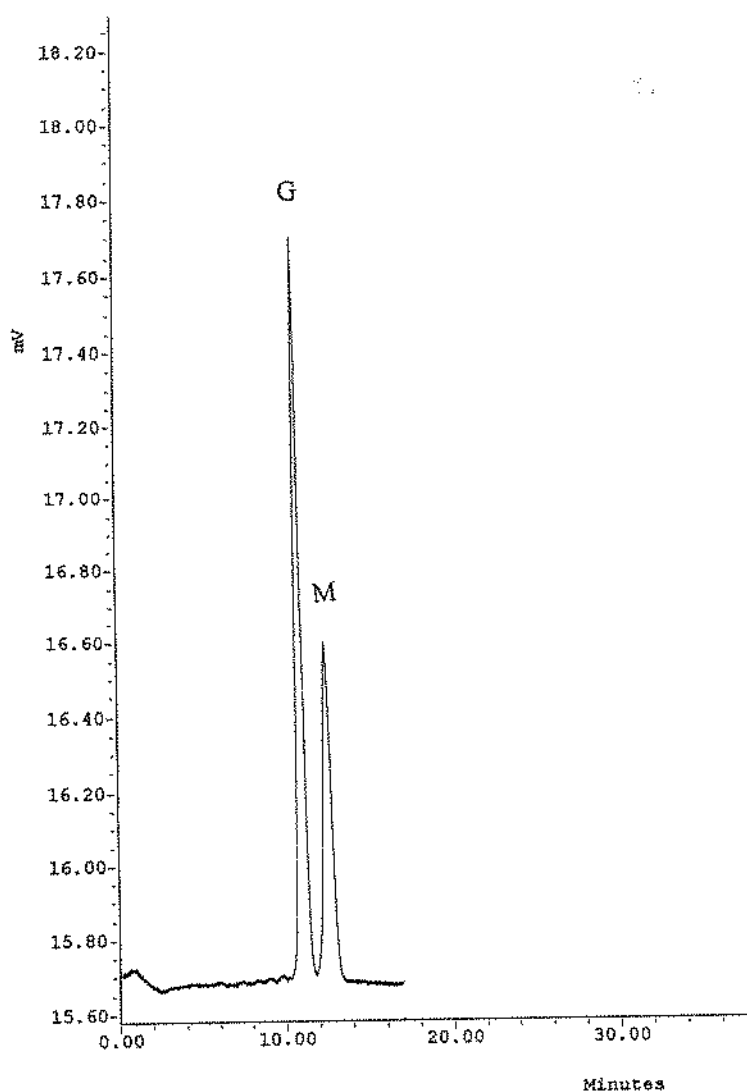


Figura 9. Cromatograma por CLAE de padrões de galactose (G) e manose (M). Coluna HPX-87P, fluxo 1,0 mL/min, fase móvel água deionizada, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.

Os cálculos para se obter a concentração de manose e galactose, foram feitos comparando-se os picos dos cromatogramas das amostras com os picos dos padrões, utilizando-se padronização externa. A Figura 10 é um exemplo de cromatograma típico de amostra do galactomanano hidrolisado da *D.mollis*.

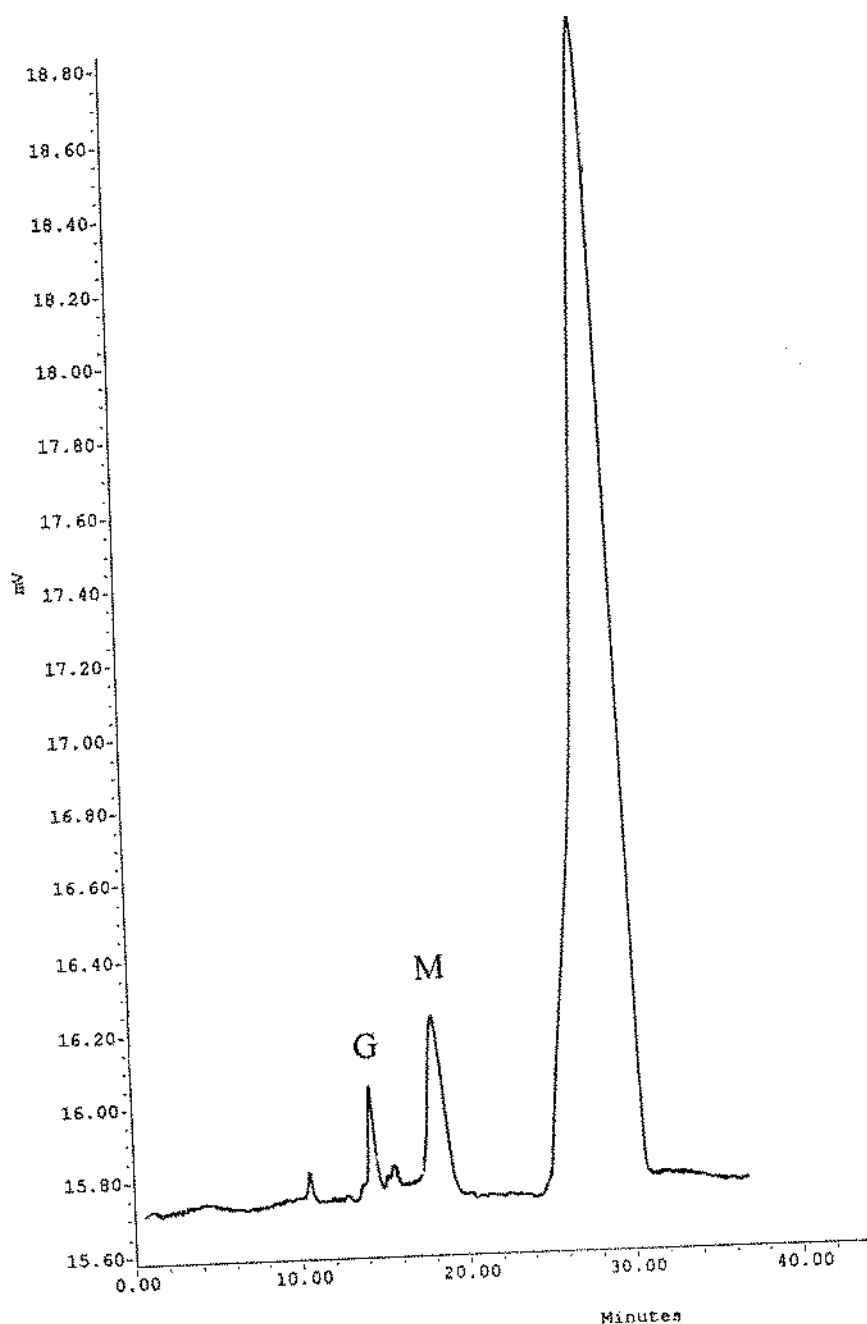


Figura 10. Cromatograma por CLAE de amostra do galactomanano hidrolisado da *D. mollis*, galactose (G) e manose (M). Coluna HPX-87P, fluxo 1,0 mL/min, fase móvel água deionizada, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.

polissacarídeos de sementes inteiras foram analisados e observou-se uma variação da razão M:G entre 2,0 a 2,2 conforme Tabela 5, com média de 2,1. A razão M:G da *D. mollis* comparada aos dados apresentados por NEUKOM (1989) mostrou-se praticamente igual à da goma guar (2,0), e inferior às gomas tara (3,0) e caroba (4,0).

Tabela 5. Razão manose:galactose de galactomanano de sementes inteiras de *D. mollis*.

repetição	1	2	3
manose:galactose	2,0	2,0	2,2
média	2,1		

Testes paralelos de determinação da razão M:G foram realizados para verificação da metodologia, em goma guar (Sigma, U.S.A.) e *Schizolobium parahybum* (Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente) com resultados de 1,8 e 2,7, respectivamente. Esses resultados são bastante próximos daqueles de guar de 1,6 e 1,7 obtidos por FERNANDES, 1995; PICULELL *et al.*, 1994 respectivamente e *S. parahybum* de 3,0 obtido por GANTER *et al.*, 1993.

De acordo com BUCKERIDGE & REID (1995) a relação M:G dos galactomananos situa-se no intervalo entre 1 a 4, dependendo da estrutura do polissacarídeo. O grau de ramificação por galactose dos galactomananos parece estar associado com a sua solubilidade em água; à medida que o teor de galactose diminui, mais insolúvel se torna o polímero, sendo que moléculas que contêm menos de 10% de galactose precipitam.

PO MOLECULAR MÉDIO COM SOFTWARE CPG-INTEGRADOR (ERS)

Para determinar o Peso Molecular Médio de um polímero podemos utilizar uma técnica rápida e simples como a cromatografia de permeação em gel (CPG). Todavia, se o desenvolvimento analítico para polímeros solúveis em solventes orgânicos podem ser encontrados em grande número na literatura, o mesmo não acontece para os polímeros em solução aquosa, como é o caso do polissacarídeo em estudo. O desenvolvimento analítico foi realizado utilizando a CPG com a aparelhagem descrita no item 3.4.

Foram realizadas algumas análises preliminares de polissacarídeos (Tabela 6), utilizando o integrador em modo normal, ou seja, sem o GPC Package da Waters, com padrões de dextranas p.a., conforme FRANCO *et al.* (1996). Nessas análises foram utilizadas duas colunas, em série, de exclusão por tamanho com alta resolução (HPSEC - High Performance Size Exclusion Column). A eluição foi conduzida com solução 0,02% de azida sódica em detector de índice de refração. Exemplo de cromatograma ilustrando a eluição de um polissacarídeo em colunas HPSEC tipo SEC XL 40 e 30 em série, encontra-se na Figura 11.

Tabela 6. Peso molecular médio de polissacarídeos de sementes *D. mollis* e outras leguminosas determinados por análise em HPSEC (colunas SEC XL 40 e 30 em série).

Espécies	Peso molecular médio de galactomananos ⁽¹⁾ (Daltons)
<i>Dimorphandra mollis</i>	2x10 ⁶
<i>Copaifera langsdorfii</i>	2x10 ⁶
<i>Hymenea courbaril</i>	2x10 ⁶
<i>Lupinus angustifolius</i> (2)	0,7x10 ⁶
<i>Schizolobium paraibum</i>	2x10 ⁶

(1) média de 4 determinações

(2) galactano (FRANCO *et al.*, 1996)

As amostras de galactomananos e galactano de *C. lansgdorfii*, *H. courbaril*, *L. angustifolia* e *S. parahibum*, cedidos pelo Dr. Marcos Buckeridge do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente (São Paulo), foram analisadas para permitir comparação da eficácia da metodologia.

Foi observado que somente o galactano apresentou peso molecular de valor intermediário $0,7 \times 10^6 \text{ Da}$. As outras amostras apresentaram elevado valor de peso molecular $2 \times 10^6 \text{ Da}$ comparáveis com o valor estimado por viscosimetria para peso molecular do galactomanano de goma locusta de $1,7 \times 10^6 \text{ Da}$ (GARNIER et al. 1995).

O galactomanano de *D. mollis* mostrou um peso molecular médio de $2 \times 10^6 \text{ Da}$ através da metodologia normal de HPLC sem uso de software específico.

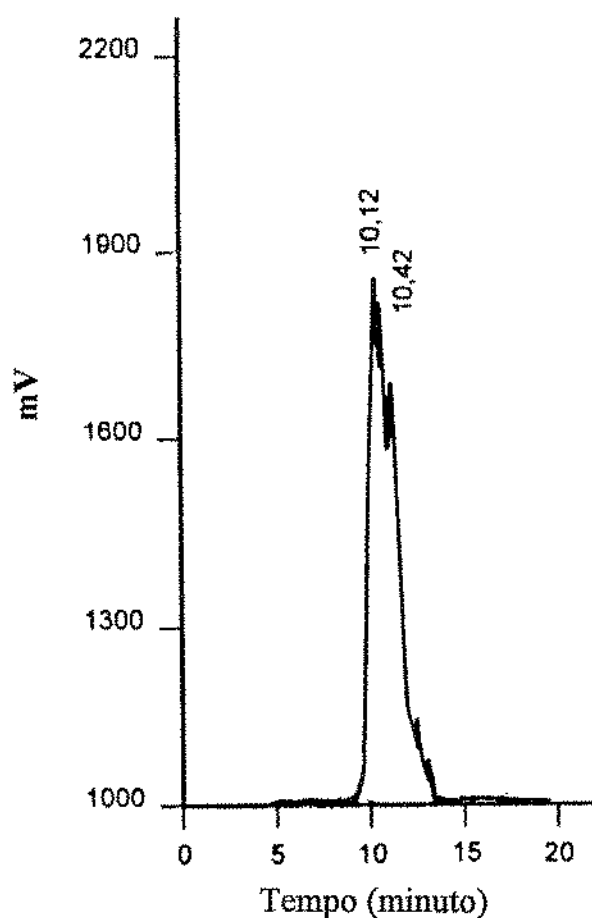


Figura 11. Cromatograma por CLAE da amostra do galactomanano de *D. mollis*. Coluna SEC- 40XL e 30XL, fase móvel 0,02% de NaN_3 , fluxo de 1,0 mL/min temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.

Segundo FLATT *et al.* (1992), informações sobre peso molecular são obtidas comparando o tempo de retenção da distribuição da amostra com distribuição similar de padrões como por exemplo dextranas de altos pesos moleculares. Os padrões de dextranas utilizados pelos autores estavam no intervalo de $0,75 \times 10^6$ até $4,95 \times 10^6$ Da. Os valores estimados para as amostras através da curva dos padrões foram razoavelmente similares quando comparados com dados da literatura, apesar da necessidade de extrapolação de valores. Os autores não conseguiram monodispersidade para os padrões de dextranas com peso molecular acima de 5×10^6 Da. Os valores de M_w e M_n da goma em análise foram calculados através de CPG e os resultados obtidos utilizando o software Maxima 820 GPC package, da Waters para uso em integrador.

Com o objetivo de melhorar a qualidade da determinação de peso molecular, o software GPC-Integrador foi testado. Uma curva de calibração padrão obtida para os padrões de dextranas de diferentes pesos moleculares está representada na Figura 12. Os resultados obtidos para as amostras são apresentados na Tabela 7. Na figura 13 está apresentado um exemplo de cromatograma da amostra de *D. mollis* eluída através de três colunas em série (item 3.4).

Esse software tem sido utilizado para cálculo de distribuição de peso molecular de polímeros sintéticos de baixa dispersão, sendo utilizado no controle de matéria prima e de produto final, em indústrias e laboratórios de pesquisas. Entretanto para amostras de galactomananos os resultados de PM, sugerem que esse software é inadequado para amostras de elevada polidispersão.

Tabela 7. Média (4 repetições) de determinações de peso molecular médio de galactomanano de *D. mollis*, com software GPC - Intergrador e colunas Shodex em série KS 805,804 e 803.

Polissacarídeos	PM médio	PM (limite inferior)	PM médio (limite superior)	Índice de polidispersão
<i>D. mollis</i> (2)				
1	7,5x10 ⁶	1,3x10 ⁶	1,4x10 ⁷	6,0
2	6,7x10 ⁶	0,8x10 ⁶	1,3x10 ⁷	8,1
3	6,1x10 ⁶	1,0x10 ⁶	1,1x10 ⁷	6,1
4	6,8x10 ⁶	1,4x10 ⁶	1,2x10 ⁷	4,7
média	6,8x10 ⁶	1,1x10 ⁶	1,3x10 ⁷	6,2
Goma Caroba (1)	7,6x10 ⁶	1,5x10 ⁶	1,3x10 ⁷	7,3
Goma Guar (1)	8,9x10 ⁶	1,0x10 ⁶	1,3x10 ⁷	5,9
<i>Hymenaea courbaril</i> (2)	3,2x10 ⁶	0,06x10 ⁶	2,7x10 ⁷	57

(1)Sigma

(2) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de S. Paulo

Os valores apresentados na Tabela 7 para peso molecular médio foram acima daqueles descritos na literatura. Para *D. mollis* a média de PM foi de 6,8x10⁶, para a *Goma Caroba* 7,6x10⁶ e para a *Goma Guar* 9,0x10⁶ Da. O maior índice de polidispersão foi observado para *Hymenaea courbaril*, 57, para *D. mollis*, 6,2, Guar, 7,3 e para *Caroba*, 7,3. Os PM das amostras estão acima do limite de exclusão das colunas de 5,0x10⁶Da.

Utilizando também um conjunto de padrões de dextranas e o mesmo software utilizado neste trabalho, FLATT *et al.* (1992) obtiveram pesos moleculares para suas amostras de valores similares aos descritos em literatura. Entretanto esses valores tiveram que ser extrapolados para PM acima de 5×10^6 Da.

Os resultados relativos aos pesos moleculares médios (limite superior, inferior e índice de polidispersão) de alguns galactomananos calculados pelo pacote estatístico estão descritos na Tabela 7. Os resultados obtidos por esse pacote estatístico, não reproduzem aqueles obtidos por outras técnicas. Os resultados são referentes ao ápice do pico e para polímeros com alta dispersão como é o caso desses polissacarídeos os resultados são pouco confiáveis.

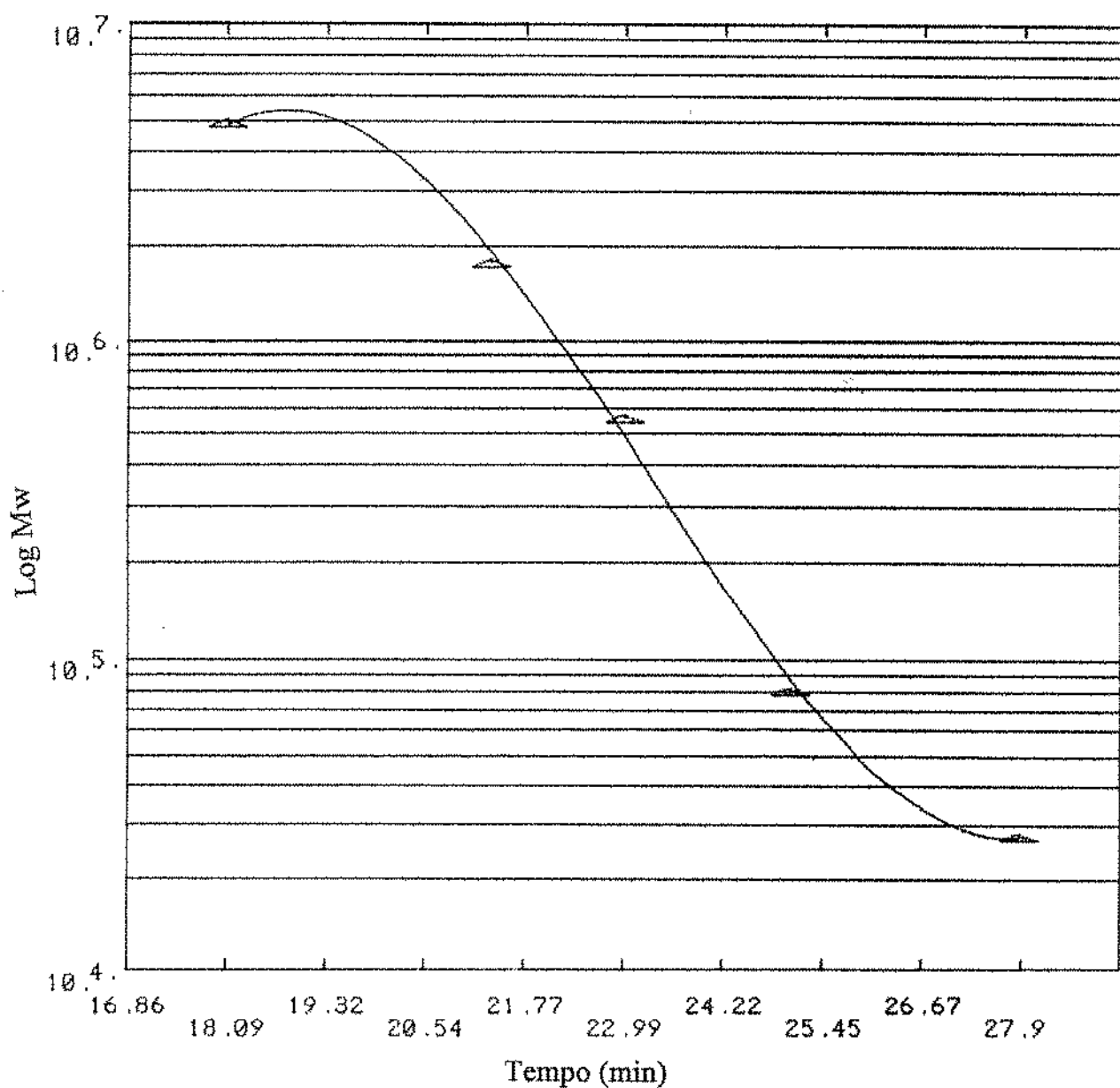


Figura 12. Curva de calibração para determinação dos pesos moleculares de galactomanano da *D. mollis*, em três colunas KS 805, 804 e 803 em série protegidas com pré coluna Shodex KS - G, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C com detector de índice de refração, software GPC Package Integrador. Padrões de dextranas PM: V = 5.000.000, IV = 1.750.000, III = 550.000, II = 79.000 e I = 27.000.

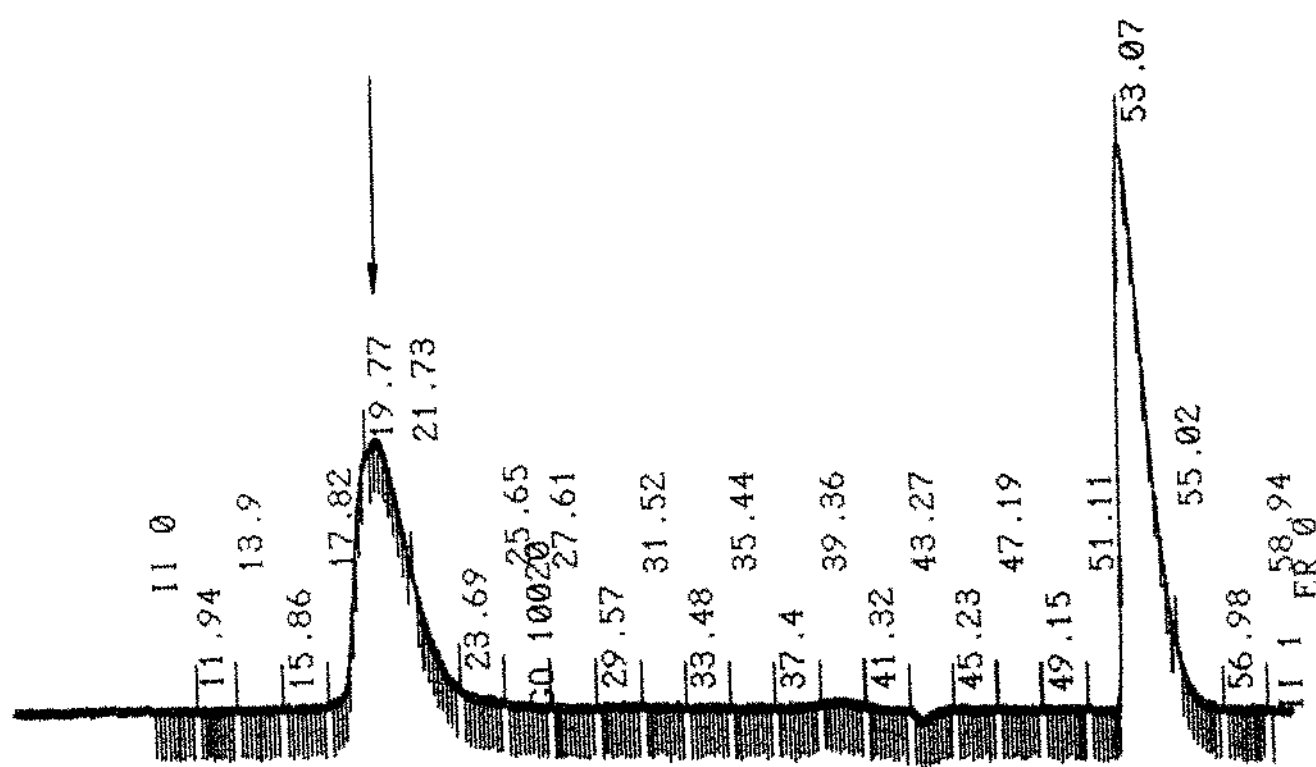


Figura 13. Exemplo de um cromatograma da determinação do peso molecular através do GPC Package Integrador do galactomanano de *D.mollis* em três colunas KS 805, 804 e 803 em série protegidas com pré coluna Shodex KS - G, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.

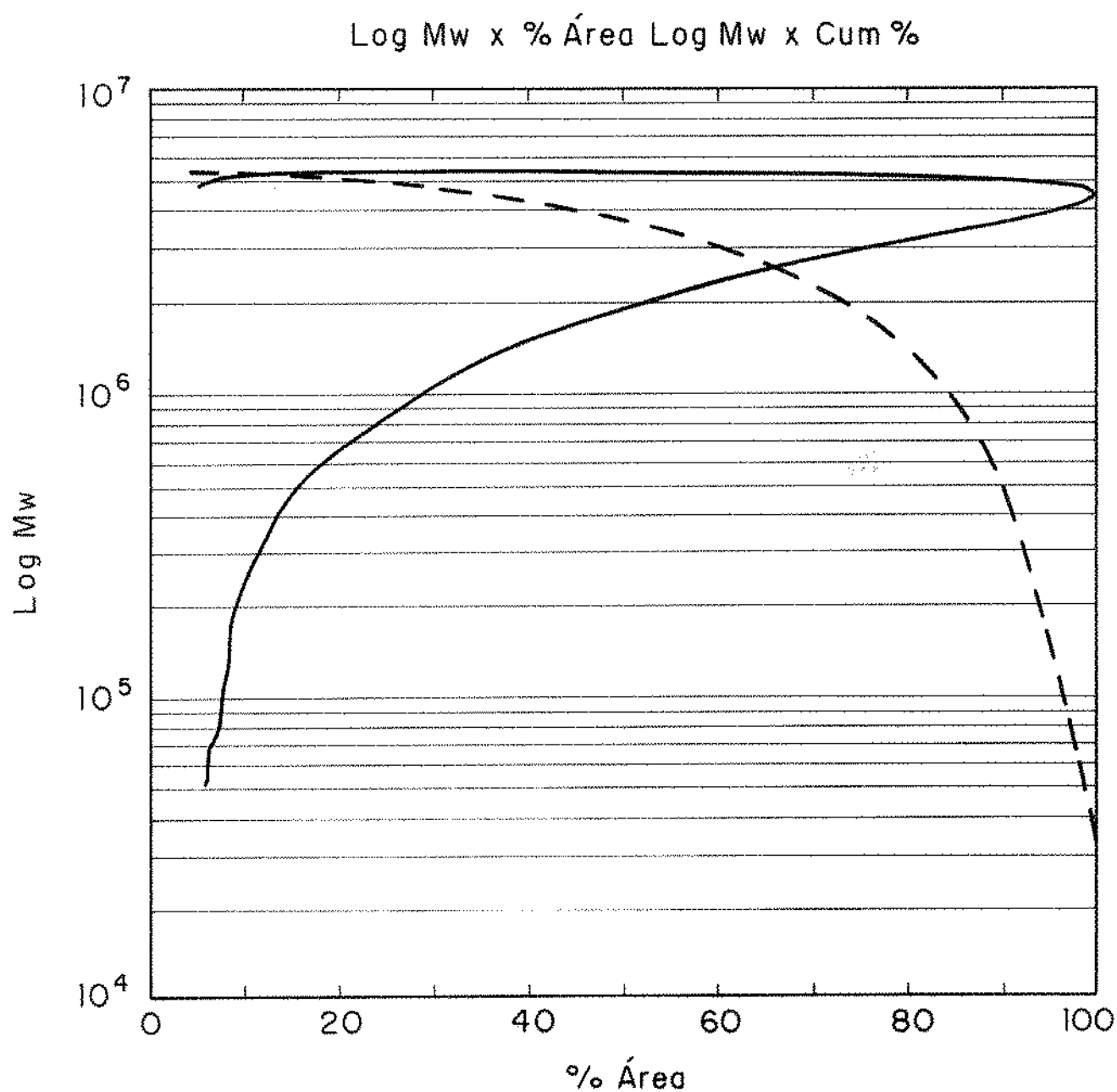


Figura 14. (—) Curva de distribuição de peso molecular de galactomanano de *D.mollis* através do GPC-Package-Integrador com três colunas Shodex KS 805, 804 e 803 em série protegidas com pré coluna Shodex KS - G, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração.

(---) Curva cumulativa.

4.3. PESO MOLECULAR E SUA DISTRIBUIÇÃO (DPM) ATRAVÉS DE CPG MILLENIUM

A CPG é principalmente usada para o estudo da distribuição de peso molecular. Entretanto, a DPM determinada por CPG pode ser influenciada por vários fatores como o efeito do alargamento de pico e a resolução incompleta que podem fornecer uma informação enganosa. A largura da DPM é medida pelo índice de polidispersão, ou seja, pela razão entre a média dos pesos médios ponderais e os pesos médios numéricos.

Para determinação das médias do peso molecular e da sua distribuição, foram utilizados os equipamentos descritos no item 3.4, com o software Millenium. As colunas foram conectadas em série, do maior para o menor intervalo de exclusão (intervalo esse entre $2,7 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^6$ Da). A série de colunas foi suficiente para cobrir todo o intervalo do peso molecular do polissacarídeo de *D. mollis*. Para utilização adequada das colunas foi calculada a eficiência das mesmas, com a injeção de etileno glicol (0,12% em água) e através da seguinte fórmula:

$$N_t = \frac{n^2}{\sum 1/N_i}$$

onde:

N_t é o número de pratos teóricos da série; n é o número de colunas em série; N_i é o número de pratos teóricos de cada coluna individual.

O número de pratos teóricos totais calculado foi de 50.000, resultado adequado para utilização das colunas.

Para a utilização da técnica, o polímero deve estar totalmente solúvel no solvente (água). A boa solubilidade do galactomanano de *D. mollis* foi verificada experimentalmente. Esta constante já era esperada, pois o valor encontrado para a razão M : G foi bastante baixo (2,0), devido ao elevado teor de galactose, conferindo maior hidrossolubilidade a este polímero.

Para a calibração foram utilizados padrões de dextranas como referência. Foram injetados cinco padrões de dextranas de $2,7 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^6$ Da; as injeções foram realizadas separadamente, e depois sobrepostas, através do programa do software utilizado, conforme mostrado na Figura 15.

Na calibração através do Millenium foi utilizado a opção para padrões de polidispersão larga, uma curva de 3ª ordem foi obtida e a regressão calculada pelo computador. A calibração utilizada foi a de ponto por ponto; o programa utiliza uma série linear de relações entre dois valores de calibração.

Por intermédio dos pesos moleculares dos padrões de dextranas (Figura 15) foi construída uma curva de calibração (Figura 16) para cálculo dos pesos moleculares dos polímeros. Um padrão de dextrana (Figura 17), foi injetado e o seu peso molecular obtido foi $5,2 \times 10^5$ Da sendo o seu peso molecular fornecido pelo fabricante de $5,5 \times 10^5$ Da. A diferença entre os pesos moleculares obtidos foi aceitável porque o erro de metodologia por GPC é de até 10%.

A média dos valores dos pesos moleculares da amostra de *D. mollis* foi de $1,9 \times 10^6$ Da.

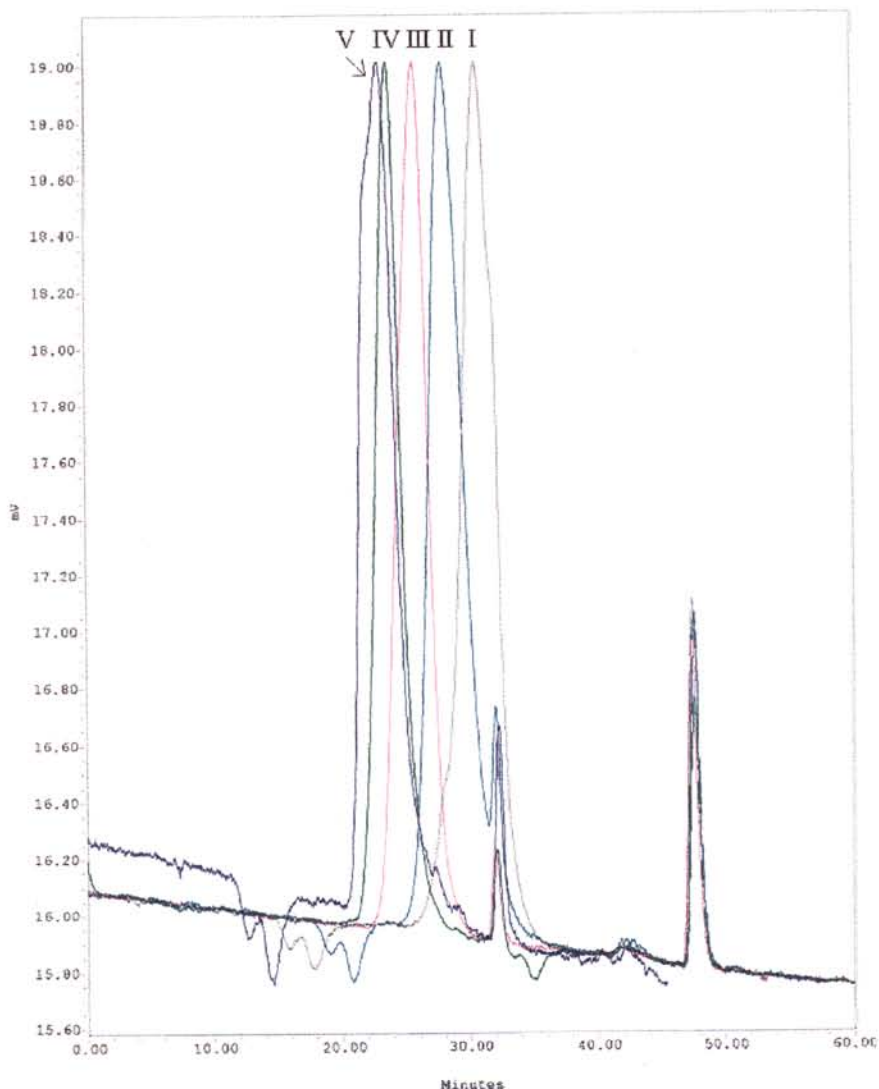
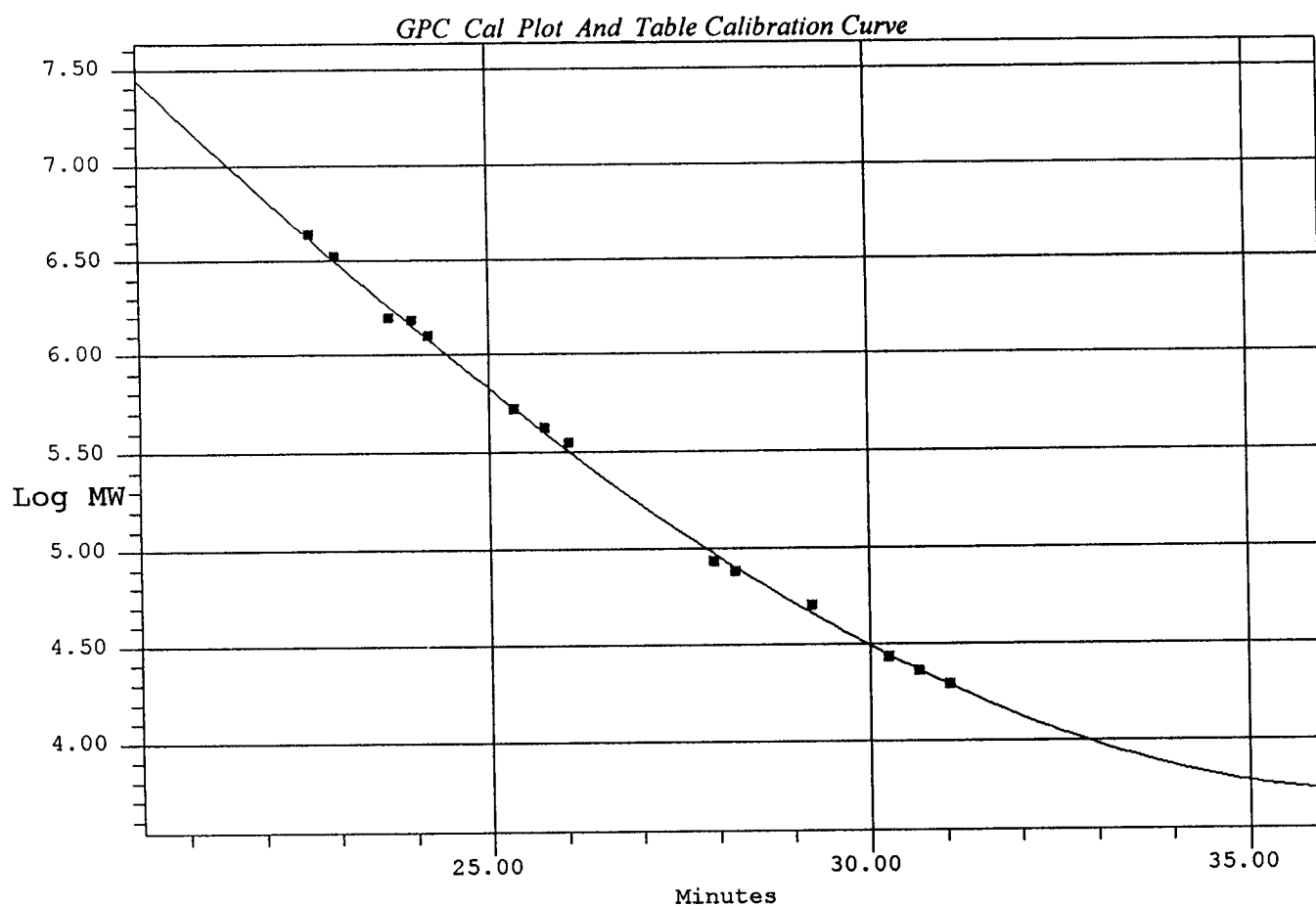


Figura 15. Padrões de dextranas PM: V = 5.000.000, IV = 1.750.000, III = 550.000, II = 79.000 e I = 27.000 Da, injetados separadamente em três colunas KS 805, 804 e 803 em série protegidas com pré coluna KS - G e sobrepostos; fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração, utilizando-se o software Millenium.

Viscometry Broad Integration Parameters

Threshold 25.000 uV/sec
Peak Width 360.00 sec

Table 'Viscometry Broad Integration Parameters' contains no data.



GPC_Cal_Plot_And_Table Calibration Information

Processing Method	nadia3	System	GPC
Channel	SATIN	Date	30-NOV-97
Type	GPC	Manual Coeffs	No
Data Origin		Order	3
A	15.112940	B	-0.263477
C	-0.010841	D	0.000261
E	0.000000	F	0.000000
R	0.999188	R ²	0.998376
Standard Error	0.167204	Vo	20.383 ml,min
Vt	36.000 ml,min	Valid	Yes
Mo		b	
Slope		K	1.000000000 dl/g
alpha	0.000000		

Figura 16. Curva de calibração dos padrões de dextranas construída com software GPC Millenium.

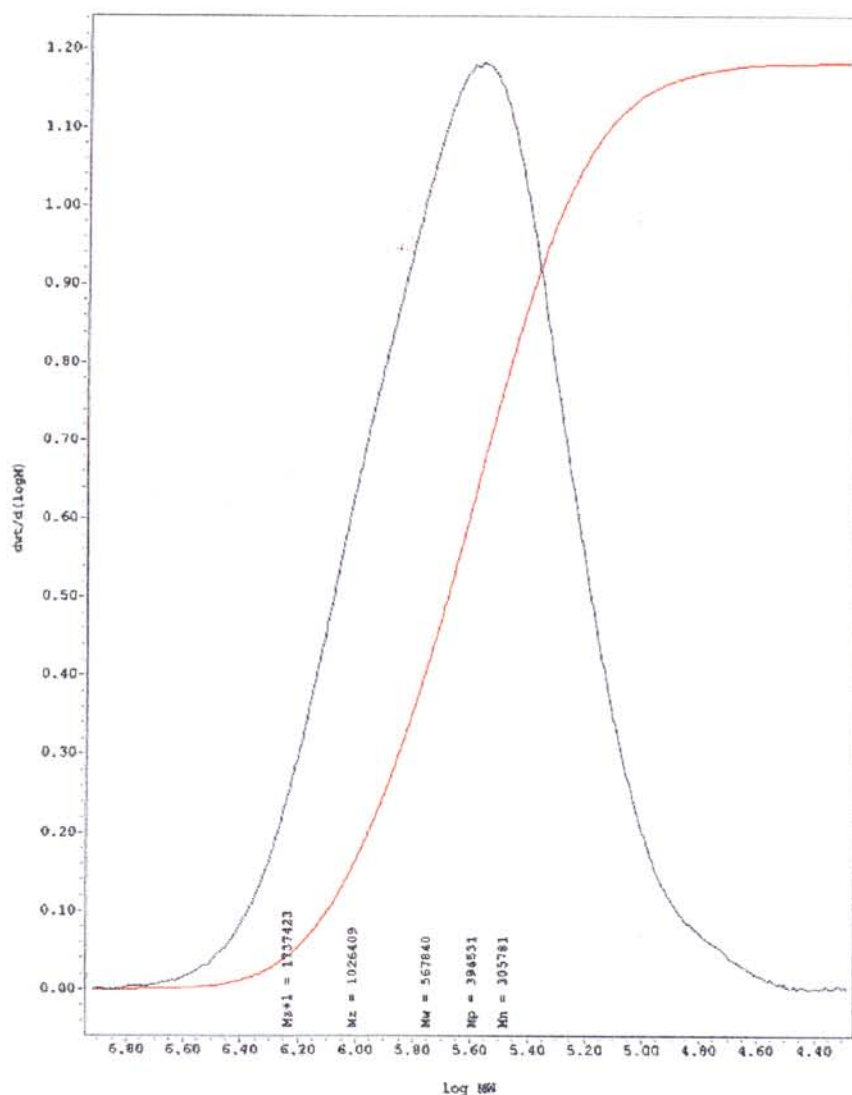


Figura 17. Cromatograma do padrão de dextrana 550.000 Da, em três colunas KS 805, 804 e 803, em série, protegidas com pré coluna KS - G, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração, utilizando-se o software Millenium.

(—) Curva cumulativa.

As amostras de galactomanano de *D.mollis* foram injetadas nas mesmas condições das amostras anteriores em diferentes dias. A figura 18 mostra um exemplo desses cromatogramas. Os resultados obtidos estão discutidos na tabela 8.

Tabela 8. Resultados das médias de pesos moleculares de uma amostra do galactomanano de *D.mollis*, com GPC Millenium.

Repetições	Mw	Mp	Mn	Mz+1
1	2,1x10 ⁶	3,1x10 ⁶	9,4x10 ⁵	3,9x10 ⁶
2	1,6x10 ⁶	2,7x10 ⁶	8,2x10 ⁵	2,5x10 ⁶
3	1,7x10 ⁶	3,0x10 ⁶	8,7x10 ⁵	2,5x10 ⁶
4	1,7x10 ⁶	3,0x10 ⁶	9,3x10 ⁵	2,5x10 ⁶
5	1,7x10 ⁶	2,8x10 ⁶	8,9x10 ⁵	2,5x10 ⁶
6	2,4x10 ⁶	3,5x10 ⁶	9,7x10 ⁵	4,7x10 ⁶
média	1,9x10 ⁶	2,6x10 ⁶	9,0x10 ⁵	3,1x10 ⁶

Mw: peso médio, Mp: peso molecular do ápice do pico; Mn: peso médio numérico; ponderal; Mz+1: peso médio por ultracentrifugação.

De acordo com a literatura, a técnica de CPG foi empregada para determinação do peso molecular de outros polissacarídeos.

KENNEDY *et al.* (1995) analisaram seis diferentes amostras de hidroximetilcelulose utilizando três colunas em série acopladas em ordem decrescente de diâmetro de poros. Os pesos moleculares médios encontrados situam-se no intervalo entre 1,3x10⁵ e 1,9x10⁶Da. A dispersão encontrada variou para cada tipo de amostra (entre 2 e 12), indicando no caso de amostras comerciais que trata-se de polissacarídeos relativamente homogêneos, devido ao baixo valor relativo de dispersão. Neste trabalho foi observado o efeito da concentração do polissacarídeo: concentrações elevadas acima de 1,0 mg /mL promoviam erro no PM calculado, com valores abaixo do esperado, provavelmente devido ao efeito da viscosidade sobre os poros das colunas. Esses autores realizaram uma extrapolação da curva de calibração,

uma vez que o polímero utilizado como padrão de calibração não estava disponível no mercado na faixa de peso molecular adequada às amostras em análise.

Segundo SEYMOUR & CARREHER, 1971, distribuições largas (broad) de peso molecular podem ocorrer, como caso de polímeros sintéticos e alguns naturais. Os polímeros sintéticos ou naturais apresentam moléculas com vários pesos moleculares que produzem cromatograma mono, bi, tri ou polimodal. Algumas proteínas específicas e ácidos nucleicos que apresentam peso molecular definido são chamadas de monodispersas.

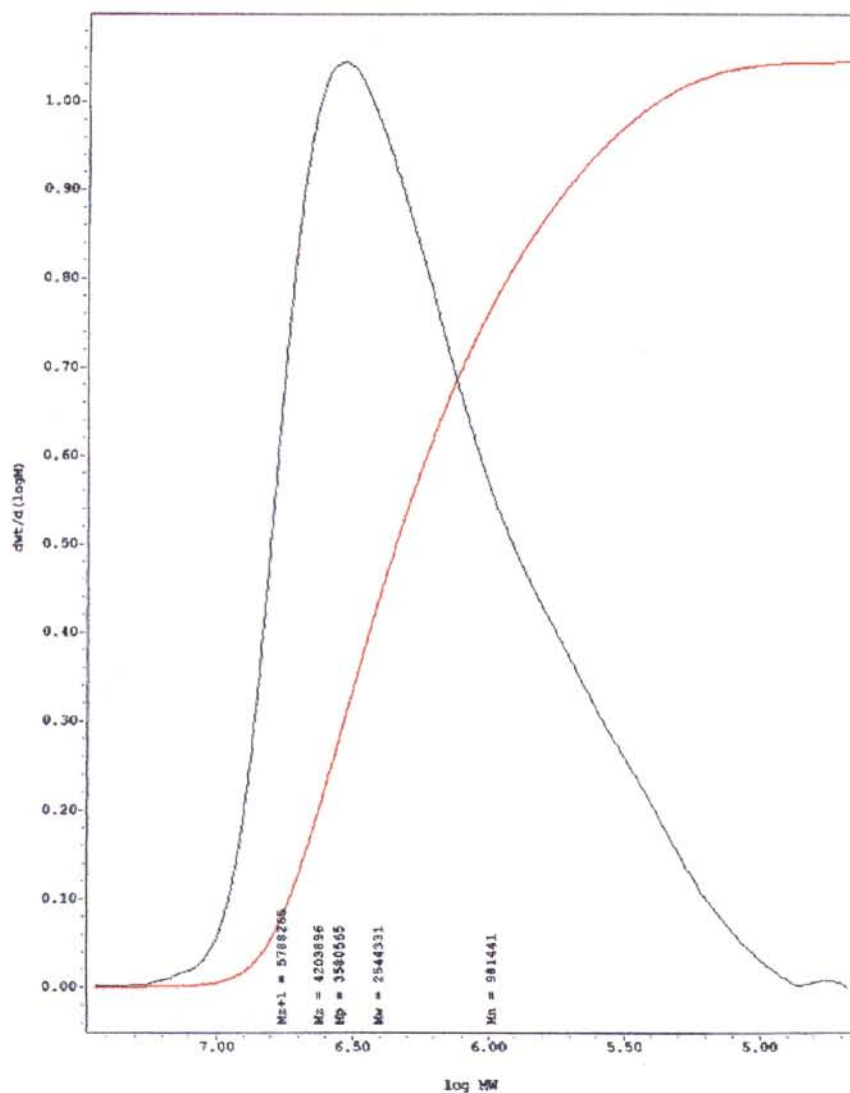


Figura 18. Cromatograma de galactomanano de *D.mollis* em três colunas Shodex KS 805, 804 e 803, em série, protegidas com pré coluna Shodex KS - G, fase móvel 0,02% de azida sódica, fluxo de 0,9 mL/min, temperatura da coluna 50°C e detector de índice de refração,utilizando-se o software Millenium.

(—) Curva cumulativa.

4.4. PESO MOLECULAR ABSOLUTO ATRAVÉS DE ESPALHAMENTO DE LUZ

Após a determinação dos pesos moleculares por CPG, decidimos investigá-los também pela técnica de espalhamento de luz. A literatura específica para determinação de pesos moleculares de polissacarídeos vegetais tem relatado a significativa dificuldade desta análise.

Para normalização da amostra, é necessário conhecer a variação do índice de refração (dn) em relação a variação da concentração (dc) de cada solução polimérica a ter o seu peso molecular absoluto determinado. Quando dados da literatura são inexistentes, o dn/dc deve ser determinado experimentalmente para cada polímero o qual é utilizado na construção do gráfico de Zimm.

Para determinação do dn/dc , um detector de índice de refração foi utilizado, a absorbância das amostras e dos padrões foram obtidas nesse detector em mV, sendo sua calibração feita com padrão de NaCl com concentrações e índice de refração conhecidos da literatura. Foram preparados padrões de NaCl com concentrações conhecidas e injetados no detector de I.R..

Uma curva de calibração foi construída com os valores de mV obtidos no detector para soluções padrão de NaCl com diferentes concentrações e seus respectivos valores de índice de refração (Figura 19). Através dessa curva, os valores de índice de refração das amostras em diferentes concentrações foram obtidos. Depois de se construir uma curva com os índices de refração e as concentrações das amostras respectivas, o valor do dn/dc foi calculado através da inclinação da reta (Figura 20).

Os valores de dn/dc obtidos para a amostra de *D.mollis* em estudo foi de 0,145 mL/g e para os padrões de dextranas usados nas análises este valor foi de 0,147mL/g segundo, o fabricante.

Um padrão de dextrana foi utilizado para confirmação da calibração prévia do aparelho de espalhamento de luz, obtendo-se um PM de $4,3 \times 10^5$ (Figura 21), sendo $5,2 \times 10^5$ Da o valor fornecido pelo fabricante.

O peso molecular absoluto é o mais importante parâmetro para caracterização de polímeros lineares. Nas várias técnicas para determinar o PM é necessário considerar que o galactomanano é um polissacarídeo, com tendência a apresentar elevada polidispersão dificultando a determinação precisa do PM (HAAS *et al.*, 1984). Ainda, segundo os autores, em moléculas com peso a partir de 5×10^6 Da a possibilidade de erro pode ser muito significativa através do espalhamento de luz.

Para o polissacarídeo de *Dimorphandra mollis* o valor de PM encontrado foi de $1,9 \times 10^6$ Da através do gráfico de Zimm (Figura 22) com a técnica de EL. Esse valor é similar à média encontrada por CPG-Millennium de $1,9 \times 10^6$ Da.

De acordo com a literatura (BERGQUIST, 1995) a incubação do polissacarídeo em repouso por mais de 24 horas é suficiente para completa desagregação das cadeias poliméricas e, conseqüentemente melhor, concordância entre os valores de PM encontrados. É possível que os PM destes polissacarídeos sejam realmente muito maiores do que aqueles relatados em literatura para galactomananos e xiloglucanos de outras espécies vegetais, já que não existem relatos dos valores de PM encontrados para o polissacarídeo investigado nesse trabalho.

PICULLEL *et al.* (1994) analisaram polissacarídeos utilizando um fotômetro de espalhamento de luz modelo Wyatt Dawn como o utilizado neste estudo. As soluções aquosas dos polissacarídeos foram preparadas com a adição de água ou solução de sal às amostras secas, seguido de aquecimento a 95°C , obtendo-se resultado considerados adequados para o polissacarídeo estudado.

De acordo com a literatura os valores de dn/dc das amostras de guarana e hidroxipropil guarana, a razão dn/dc foi de $0,155 \text{ mL/g}$ com peso molecular de $2,8 \times 10^6$ e $0,149 \text{ mL/g}$ com peso molecular de $4,5 \times 10^6$, respectivamente, e ambos em NaCl 1M (PEZRON *et al.*, 1988).

GIDLEY *et al.* (1991) encontraram $dn/dc = 0,163 \text{ mL/g}$ para polissacarídeos de sementes de tamarindo. No experimento com soluções de goma xantana, MILAS *et al.* (1990) encontraram $0,155 \text{ mL/g}$ para o dn/dc e MW de $5,3 \times 10^6$ por espalhamento de luz.

I.R. (589 nm)*	abs(mV)	Conc. (g/100g H ₂ O)
165	15,3	0,094
182	17,0	0,104
587	64,7	0,368
974	103,1	0,563
1191	126,9	0,690

* de acordo com B. Refractometric Calibration Data

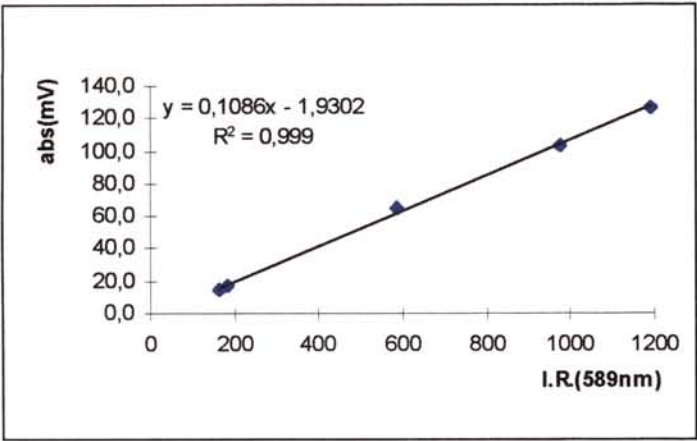
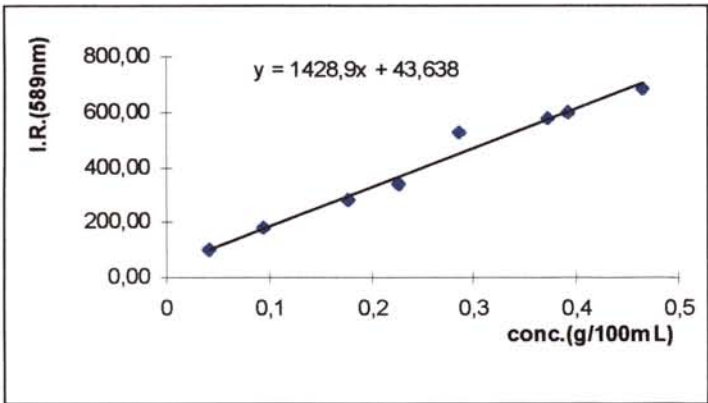


Figura 19.Curva de calibração da absorbância x índice de refração do padrão de NaCl.

Conc.(g/100mL)	I.R. (589 nm)
0,042	100,30
0,094	179,09
0,177	280,13
0,227	339,45
0,286	525,77
0,372	573,04
0,392	598,07
0,464	688,18



$dn/dc = 0,143 \text{ mL/g}$

Figura 20. Curva de calibração para obtenção do dn/dc da amostra de *D. mollis*.

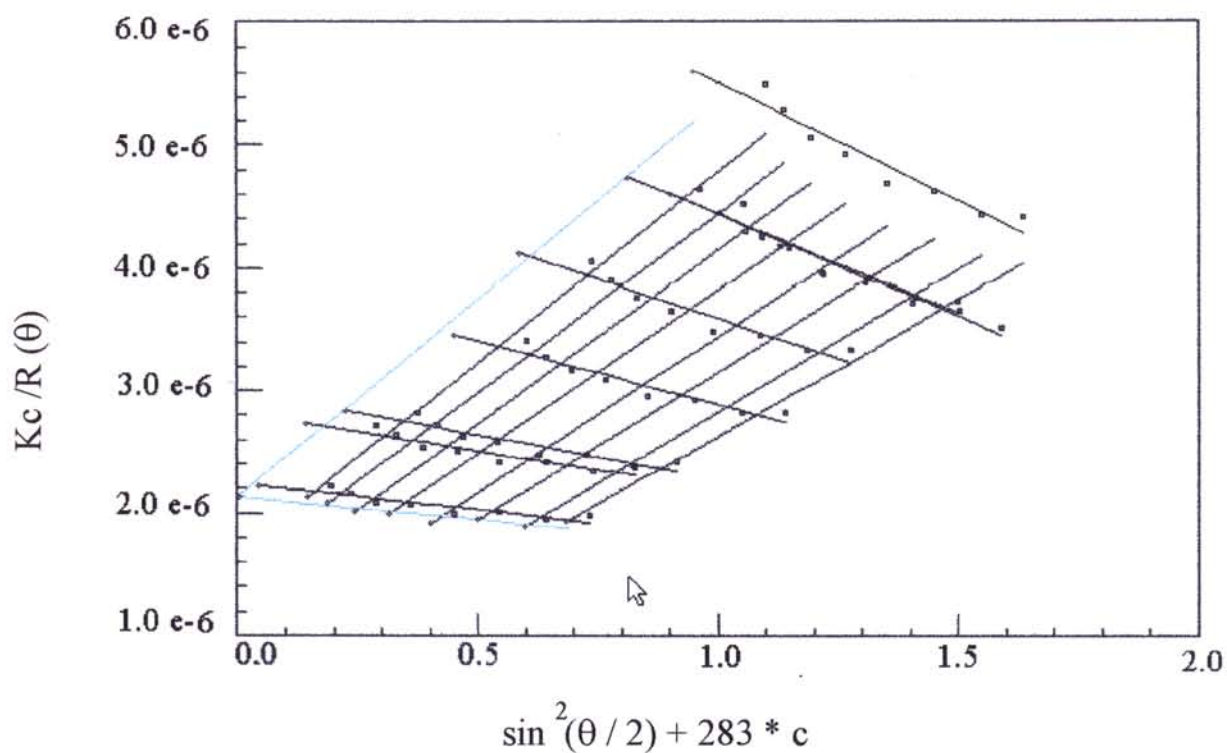


Figura 20. Gráfico de Zimm do padrão de Dextrana 5,5x10⁵Da, obtido através das análises realizadas por fotômetro de espalhamento de luz.

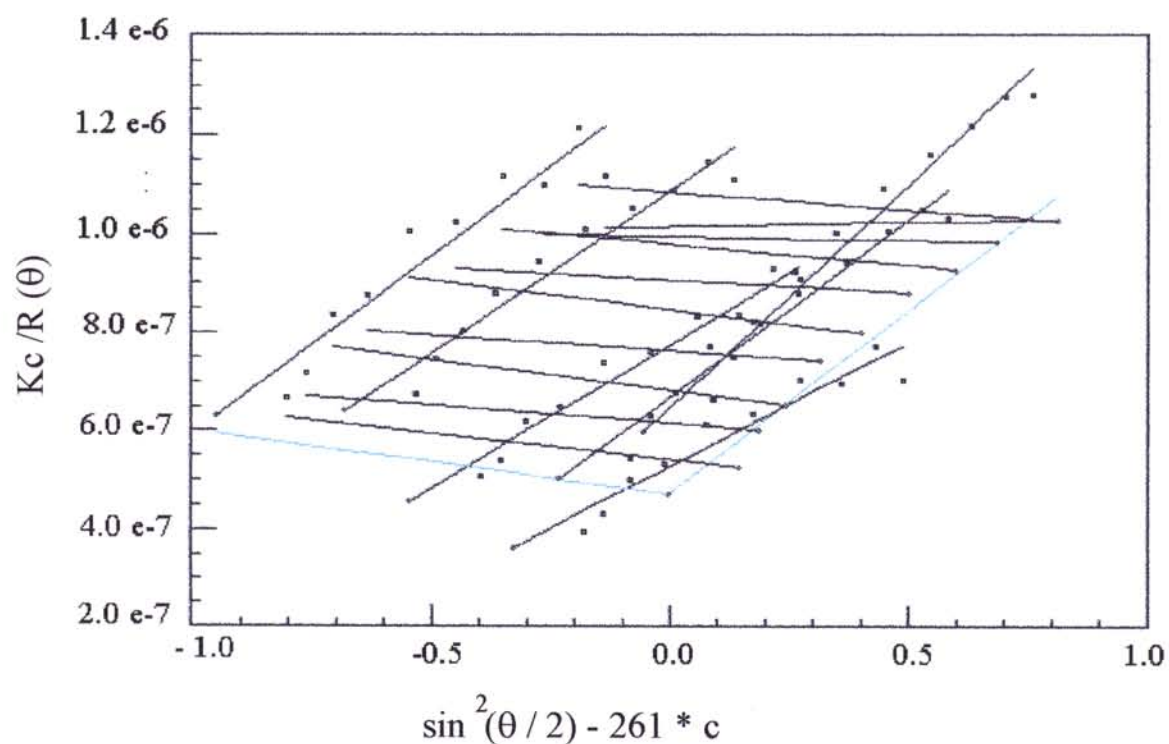


Figura 21. Gráfico de Zimm da amostra de galactomanano de *D. mollis* obtido através das análises realizadas por fotômetro de espalhamento de luz.

5.CONCLUSÕES

- O galactomanano presente na *D. mollis* apresenta um peso molecular próximo a 2×10^6 Da e razão manose : galactose de 2 : 1, cujos valores foram similares àqueles determinados para goma guar.

- A determinação do peso molecular do galactomano através de cromatografia líquida com duas colunas de exclusão (SEC XL 40 e 30) permitiu obter resultados de aproximadamente 2×10^6 Da.

- O uso de software para integrador (Waters) não permitiu reproduzir os resultados de peso molecular do galactomanano, por este apresentar dispersão elevada.

- O emprego do software GPC Millenium (Waters), que contempla programa para polímeros de alta dispersão, permitiu a obtenção da curva de distribuição e cálculo do Peso Molecular Médio por CPG, com valor de aproximadamente $1,9 \times 10^6$ Da.

- O emprego de fotômetro de espalhamento de luz (LALLS) para leitura e determinação do Peso Molecular Absoluto, forneceu resultado similar ao GPC Millenium e à cromatografia líquida com colunas de exclusão.

- Dentre as metodologias que permitiram a determinação do Peso Molecular do galactomanano de *D. mollis*, aquela com GPC - Millenium (Waters) e a com uso de fotômetro de luz (LALLS) são recomendadas devido à sua aplicação para polímeros diversos de alto peso molecular.

BIBLIOGRAFIA

- 1-ANDERSON, E. Endosperm mucilages of legumes occurrence and composition. **Industrial and Engineering Chemistry**, v 4, n 12, p 2887 - 2890, 1949.
- 2-BAILEY, R. W. Polisaccharides in the leguminosae. In : HARBORNE J. B.; BOULTER D. & TURNER B. L. **Chemotaxonomy of the leguminosae**. Academic Press, New York, p.503-541, 1971.
- 3-BERGQUIST, C. W. Curso básico de cromatografia de permeação em gel Waters Comercial, São Paulo, 1995.
- 4-BILLMEYER JR., F.W.& ALTGEL, K.H. The sizes of polymer molecules and the GPC separation In: ALTGELT, K. H. & SEGAL L. **Gel permeation chromatography**, Marcel Dekker New York, 1971, p 3 - 11.
- 5-BOBBIO F. O. & BOBBIO P.A.. **Carboidratos. Introdução à química de alimentos**, São Paulo, Varela, 1989 p 11 - 70.
- 6-BUCKERIDGE, M. S. & DIETRICH, S. M. C. Galactomannan from Brazilian native legume seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v 13, n 2, p 109 -112, 1990.
- 7-BUCKERIDGE, M. S. , DIETRICH, S. M. C. & MALUF A. M. Galactomanano de sementes de diferentes populações de *Leucaena leucocephala*. **Revista Brasileira de Botânica**, v 10, p 25 - 27, 1987.
- 8-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, n 4, p 871 - 875, 1995a.
- 9-BUCKERIDGE, M. S.; PANEGASSI V.R., & DIETRICH, S. M. C. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth (Leguminosae) following germination. **Revista Brasileira de Botânica**, v 18, n 2, p 171 - 175, 1995b.
- 10-BUCKERIDGE, M. S.& REID, J. S. G. Purification of a novel -galactosidase or exo-(1,4) --galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. **Planta**, v192, p 502 - 511, 1994.
- 11-DAVIDSON,R. L. Handbook of water-soluble gums and resins. Kinapport Press p 596, 1980.

- 12-DEA, I. C. M. & MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advance in Carbohydrate Chemistry Biochemistry**, v 31, p 241 -312, 1975.
- 13-DUBOIS, M.; GILLES, K. A; HAMILTON, J. K.; ROBERTS, P. A. & SMITH,F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v 28, p 350 - 356, 1956.
- 14-FERNANDES, P. B. Influence of galactomannan on the struture and thermal behaviour of xanthan / galactomannan mixtures. **Journal of Food Engineering**, v 24, p 269 - 283, 1995.
- 15-FLATT J. H.; HARDIN R. S.; GONZALEZ J. M.; DOGGER D. E.; LIGHTFOOT E. N. & CAMERON D. C. An anionic galactomannan polysaccharide gum from a newly-isolated lactose-utilizing bacterium. *I. strain description and gum characterization*. **Biotechnology Progress**, v 8, p 327 - 334, 1992.
- 16-FRANCO,T.T.; RODRIGUES N.R.; SERRA, G.E. PANEGASSI; V. R. & BUCKERIDGE, M. S. Characterization of storage cell wall polysaccharides from Brazilian legume seeds and the formation of aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v 680 p 255 - 265, 1996.
- 17-FREEMAN, W. J. Characterization of polymers. In: KROSCWITZ, J. I. **Polymers: polymer characterization and analysis..** ed. J. Wiley & Sons, 1990, p. 1 - 38 .
- 18-GANTER J. L. M. S.; BAGGIO S. F. Z.; LEITNER S. C. S.; SIERAKOWSKI M. R. & REICHER F. Structural studies on galactomannans from brazilian seeds **Journal Carbohydrate Chemistry** v 12, n 6, p 753 - 767, 1993.
- 19-GARNIER, C., SCHORSCH C. & DOUBLIER, J. L. Phase separation in dextran / locust bean gum mixtures **Carboydrate Polymers**, v 28, p 313 - 317.
- 20-GIDLEY M. J.; LILLFORD P. J.; ROWLANDS D. W.; LANG P.; DENTINI M.; CRESCENZI V.; EDWARDS M.; FANUTTI C. & REID J. S. G. Struture and solution properties of tamarind-seed polysaccharide. **Carbohydrate Research**, v 214, n 2, p 299-314, 1991.
- 21-GLICKISMAN, M. **Food Hidrocolloids** CRC Press, Boca Ratan,Florida, 1986 v 3, p 157 - 159.

- 22-GUIMARÃES, L. P. L. & COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In Collins, C. H. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas : Editora da Unicamp, 1995, p 183 - 238.
- 23-GOYOCOOLEA, F.,M., MORRIS, E., R. & GIDLEY M., J. Viscosity of galactomannans atalkaline and neutrall pH: evidence of "hyperentanglement" in solution. **Carbohydrate Polymers** v 27, p 69 - 71, 1995.
- 24-HAAS R. Flow behavior of dilute polyacrylamide solutions through porous media. 2.Indirect determination of extremely high molecular weights and some aspects of viscosity decrease over long time intervals. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals** v 23, p 316 - 319, 1984.
- 25-HOAGLAND, P. D.; FISHMAN, M. L.; KONJA, G. & CLAUSS, E. Size exclusion chromatography with viscosity detection of complex polysaccharides: component analysis. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v 41, n 8, p 1274 - 1281, 1993.
- 26-KAMATH, P. M. & WILD, L. Chromatography in Polymers In: Kroschwitz, J. I **Polymer characterization and analysis** ed J. Wiley & Sons pg 11 - 30, 1990.
- 27-KENNEDY, J. F.; Z. S. RIVIERA; LOYD, L.L.; WARNER F. P. & SILVA, M. P. C. da Determination of the molecular weigt distribution of hydroxyethylcellulose by gel filtration chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v 26, p 31 - 34, 1995.
- 28-KAPOOR,V.P. & MUKHERJEE, S. Isolation of five oligosaccharides from the galactomannan of *Cassia absus* seed. **Phytochemistry**, v 10, p 655 - 659, 1971.
- 29-LECACHEUX, D. & BRIGAND, G. Preparative fractionation of natural polysaccharides by size exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v 8 p 119 - 130, 1988.
- 30-MANZI A. E. & CEREZO, A.S.. The galactomannan-like oligosaccharides from the esperm of the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Carbohydrate Research**, v 134, p 115 -134, 1984.
- 31-MILAS,M.; RINAUDO,M.; KINIPPER, M. & SCHUPPISER, J. L. Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions. **Macromolecules**, v 23, n 9, p 2506 - 2511, 1990.

- 32-NEUKOM, H. Galactomannans: properties and applications. **Lebensmittel - Wissenschaft und Technologie**, v 22, n 2, p 41 - 45, 1989.
- 33-PEZRON E.; LEIBLER L.; RICARD A. & AUDEBERT R. Reversible gel formation induced by ion complexation. 2. Phase diagrams. **Macromolecules**, v 21, n 4, p 1126 -1131, 1988.
- 34-PICULELL L.; ZHANG W.; TURQUOIS T.; ROCHAS C.; TARAVEL F. R. & WILLIAMS P. A. Effects of added galacto - and gluco-mannans on the NMR spectro of ^{133}Cs ions in kappa-carrageenan gels. **Carbohydrate Research**, v 265, p 281 - 290, 1994.
- 35-REID J.S.G., 1985. Galactomannans in Biochemistry of Storage Carbohydrate. **Green Plants**, academia Press, London, chap 7, p 265 - 288,.
- 36-RIZZINI, C. T. & MORS, W. B. 1976. Botânica Econômica Brasileira. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, p 67 - 70.
- 37-SEAMAN, J. F.; BUHL, J. L. & HARRIS, E. E.. Quantitative saccharification of wood and cellulose. **Industrial Engineering Chemistry**, v. 17, p 35 - 37, 1945.
- 38-SEYMOUR, R. B. & CARRAHER, C. E. Molecular weight of polymer. In: **Introdution of polumer chemistry** ed Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1971 p 87 - 121.
- 39-SHARMAN, W. R.; RICHARDS, E. L. & MALCOLM, G. M. Hidrodynamic properties of aqueous solution o f galactomannans. **Biopolymers**, v 17, p 2817 - 2833, 1978.
- 40-SMITT J. A. M.; VAN DIJK J.A.P.P.; MENNEN M.G. & DAOUD M. **Macromolecules**, v 25, p 3585 - 3590, 1992.
- 41-SORENSEN, W. R. Characterization of polymer. In: Kroschwitz J. I. **Polymers: polymer characterization and analysis** ed J. Wiley & Sons, p. 78, 1990.
- 42-THURESSON, K.; SVANTE, N. & BJORN, L. Influence of cosolutes on phase behavior and viscosity of a nonionic cellulose ether. The effect of hydrophobic modification. **Langmuir**, v 12, n 10, p 2412 - 2417, 1996.
- 43-TOMASSINI, E & MORS, W. B. *Dimorphandra mollis* Benth e *D. gordeniana* Tul., novas e excepcionais fontes de rutina. **Academia Brasileira de Ciência**, v 38, p 321 - 323, 1966.

- 44-UNRAU, A. M. The constitution of a galactomannan from the seed of *Leucaena glauca*. **Journal Organic Chemistry**, v 26, p 3097 - 3101, 1961.
- 45-UNRAU, A. M. & CHOY, Y. M. Identification of linkages of a galactomannan isolated from seed of *Caesalpinia pulcherrima*. **Carbohydrate Research**, v 14, p 151 - 158, 1970.
- 46-VENÂNCIO, A.; ALMEIDA C.; DOMINGUES L. & TEIXEIRA J. A. Protein partition on a derivative guar gum based aqueous two-phase system. **Bioseparation**, v4 p 1 - 6 , 1995.
- 47-VIEBKE, C. Association processes involving helix-forming biopolymers in solutions and gels. **Dissertation Abstracts International**, v 56, n 3C, p 733, 1995.
- 50-WHISTLER, R. L. & HYMOWITZ T. 1979 Guar: Agronomy, production, industrial use and nutrition. Purdue University, Press, Indiana 124 p.
- 48-WHISTLER, R. L. & HYMOWITZ T. 1979 Guar: Agronomy, production, industrial use and nutrition. Purdue University, Press, Indiana 124 p.
- 49-WYATT P. J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules **Analytica Chimica Acta**, v 272, p 1 - 40, 1993.
- 50-WYATT TECHNOLOGY CORPORATION Introduction to light scattering for absolute macromolecular characterization. Course 111 Light Scattering and GPC, 1995.
- 51-ZPEVAK, F. A.. Efeitos do ácido abscísico, potencial hídrico, temperatura e tratamentos para quebra de dormência na germinação de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. São Carlos 1994 Tese de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 96 p.

ANEXO 1. Relatórios utilizados na determinação de pesos moleculares da amostra de *D. mollis* por GPC-Integrador.

Version 2.00 Program Selection Menu

1. Replay (for internal raw data storage)
2. GPC (for Gel Permeation Chromatography)
3. RS-232C Communications Only

0. DIAGNOSTICS

SELECT PROGRAM [0 - 3] = 2

GPC now active

AT [0.5,1,2,4,8,16,32,64,128,256,512,1024,2048,4096] (1.) = 8

CS [0.1,0.25,0.5,1,2,4,5,8,10,16,20] (1.) = .25

PF=150

GPC? [Y/N] (N) Y

Special Functions? [Y/N] (N)

FI=1. FE=1. MN=0.

PRESS 'ENTER' TO SKIP ENTRY

FILE NAME () = "CARBOIDRATOS"

DATA ACQUISITION

Initial Delay (0.) = 10

End of Data (0.) = 35

Memory is available for 1375. slices

Number of Slices (0.) = 100

Slice Width = 0.25 minutes

Reference Peak time (0.) = 53.4

Reference Window [0.01-.5] (0.1) =

TIME FUNCTION VALUE

TT= 59 TF= ER TV= 1

TT=

Begin Baseline (0.) = 11

End Baseline (0.) = 58.5

Begin Data Proc.(0.) = 17

End Data Proc.(0.) = 30

An error has been detected

ID=10. (<= BB= 11. (<= BP= 17. (< EP= 30. (<= EB= 58.5 (<= ED= 35.

The parameters above can logically exhibit only those relations shown.
Please refer to the DATA ACQUISITION section of the GPC
manual for details.

Please make the appropriate corrections now.

DATA ACQUISITION

Initial Delay (10.) =

End of Data (35.) = 59

Memory is available for 1268. slices

Number of Slices (100.) = 250

Slice Width = 0.196minutes

Reference Peak time (53.4) =

Reference Window [0.01-.5] (0.1) =

Begin Baseline (11.) =

End Baseline (58.5) =

Begin Data Proc.(17.) = 15

End Data Proc.(30.) = 20

PRESENTATION OF DATA

Graph Sample Data? [Y/N] (N) Y

Slice Interval [1-10] (1.) = 7

Print Slice Data? [Y/N] (N) Y

Slice Marker on Plot? [Y/N] (N) Y

CALIBRATION DATA

Universal Calibration? [Y/N] (N)

ELUTION TIME MOLECULAR WEIGHT

RT= 18.09 CC= 4900000

RT= 21.36 CC= 1750000

RT= 23.02 CC= 548300

RT= 25.07 CC= 78800

RT= 27.9 CC= 27000

RT=

Please wait . . .

Calculating Calibration Coefficients

Calibration Report

Elution Time	Actual M.Wt.	Linear	Quad.	Cubic
18.09	4900000.	6815784.	5994083.	4858913.
21.36	1750000.	1062900.	1163492.	1890601.
23.02	548300.	413819.	464701.	481628.
25.07	78800.	129086.	138165.	84866.
27.9	27000.	25849.	22412.	26641.

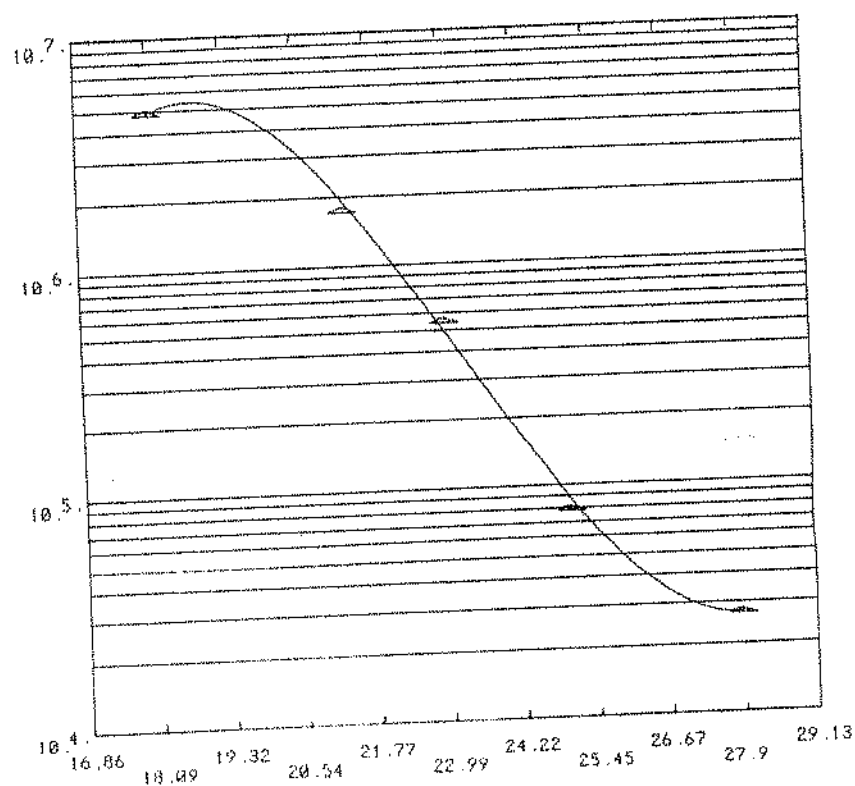
Regression Analysis

	Linear	Quad.	Cubic
Coefficients			
D0	11.298059	0.9615181	-65.888836
D1	-.2467962	-.0385628	9.9757575
D2		-.0045415	-.4448432
D3			0.0063663
Correlation (r^2)	0.9630455	0.9696748	0.9982453
Std. Error of Est.	0.2071017	0.2297721	0.0781654

Calibration Curve

Fit Type: Cubic

Log MW. vs. Ret. Time



9.75

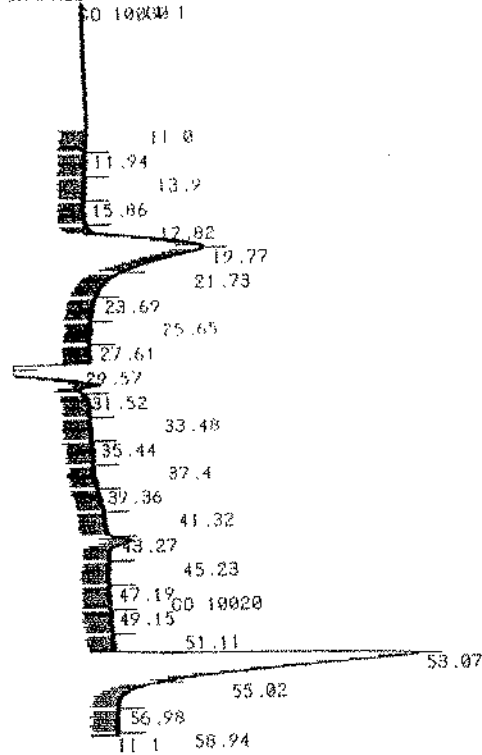
Press the [SAMPLE] key to enter sample information

SAMPLE TABLE...
 ANALYST () AN=" NADIA"
 Use Mark-Houwink Sample Constants? [Y/N] (N) Y
 Mark-Houwink Sample Constants
 K (0.) =
 a (0.) =
 Injs/Sample (1) =
 SAMPLE INDEX NAME
 SI= 1 SN=" DIN. MOLLIS"
 SI=
 END OF DIALOG

SAMPLE TABLE...
 ANALYST () AN=" NADIA"
 Use Mark-Houwink Sample Constants? [Y/N] (N)
 Injs/Sample (1) =
 SAMPLE INDEX NAME
 SI=
 END OF DIALOG

SAMPLE TABLE...
 ANALYST () AN=" NADIA"
 Use Mark-Houwink Sample Constants? [Y/N] (N)
 Injs/Sample (1) =
 SAMPLE INDEX NAME
 SI= 1 SN=" DIN. MOLLIS"

CHANNEL A INJECT 23-01-96 09:52:22



23-01-96 09:52:22 CH= "A" PS= 1.

FILE 1. METHOD 0. RUN 1 INDEX 1
SAMPLE 1

RT	AREA	MW/Slice	%AREA	CUMX
17.413	0.	3549524.46	0.	0.
17.614	0.	3787254.66	0.	0.
17.815	0.	4373875.66	0.	0.
18.006	0.	4730091.98	0.	0.
18.208	0.	5019090.77	0.	0.
18.399	36.	5221761.07	0.014	0.014
18.6	2159.	5352453.04	0.01	0.024
18.801	6428.	5395649.5	2.412	3.235
18.992	11343.	5357137.42	4.256	7.491
19.193	16179.	5238291.14	6.071	13.562
19.384	17851.	5059024.74	7.448	21.01
19.585	22043.	4811384.89	8.271	29.281
19.776	23033.	4531657.55	8.642	37.923
19.977	22643.	4203267.25	8.496	46.419
20.178	21261.	3852999.63	7.977	54.397
20.369	18999.	3511093.01	7.129	61.525
20.57	16590.	3151858.67	6.225	67.75
20.761	14549.	2819278.02	5.459	73.209
20.962	12572.	2485165.94	4.717	77.926
21.163	10766.	2172580.42	4.04	81.966
21.354	9325.	1898744.18	3.499	85.464
21.555	7826.	1636687.95	2.936	88.401
21.746	6512.	1413195.38	2.443	90.844
21.947	5259.	1204372.16	1.973	92.817
22.138	4353.	1030063.74	1.633	94.451
22.339	3450.	870287.38	1.294	95.745
22.54	2890.	732808.03	1.004	96.829
22.731	2339.	620829.97	0.878	97.707
22.932	1882.	520386.75	0.706	98.413
23.123	1421.	439594.92	0.533	98.946
23.324	957.	367750.37	0.359	99.305
23.525	907.	307725.19	0.34	99.646
23.716	682.	259999.44	0.256	99.902
23.917	163.	218059.37	0.061	99.963
24.108	99.	184878.62	0.037	100.
24.31	0.	155833.66	0.	100.
24.501	0.	132922.32	0.	100.
24.702	0.	112907.98	0.	100.
24.903	0.	96389.36	0.	100.
25.094	0.	83381.12	0.	100.
25.295	0.	72029.47	0.	100.
25.486	0.	63094.41	0.	100.
25.687	0.	55303.49	0.	100.
25.888	0.	48889.2	0.	100.
26.079	0.	43058.95	0.	100.
26.28	0.	39502.36	0.	100.
26.471	0.	36118.43	0.	100.
26.672	0.	33233.72	0.	100.

ANEXO 2. Relatórios utilizados na determinação de pesos moleculares da amostra de *D. mollis* por GPC-Millennium.

Report Method: GPC_Calibration_Report

Version: 2.10

Sample: dext 29 K

Processed: 11/30/97 12:52:45 PM

Vial: 6

Inj: 1

Channel: SATIN

Processing Method: nadia3

Millennium v2.10

Date Printed: 12:53:42 PM, November 30, 1997

Method Name: nadia3

Date Created: 11/30/97 12:50:13 PM

Method Type: GPC

GPC Parameters

GPC Technique	Relative Calibration
Fit	3rd Order
Vo	ml,min
Vt	ml,min
X-axis	Time (min)
Flow Rate	1.000 ml/min
Std Reference Peak	False
Unk Reference Peak	False
Ref Peak RT	0.001 min
Ref Peak RT Window	1.000 %
Mol Wt Marker 1	Daltons
Mol Wt Marker 2	Daltons
Mol Wt Calib Order	High to Low
Axial Disp. Corr.	0.000 ml,min
Concentration Start	min
Concentration End	min
Front Conc Thres	15.000 %
Back Conc Threshold	15.000 %
Viscosity Start	min
Viscosity End	min
Front Visc Thres	15.000 %
Back Visc Threshold	15.000 %
Visc. Data Fit Type	1st Order

Narrow Integration Parameters

Minimum Area	0 uV*sec
Minimum Height	0 uV
Touchdown	50.000 uV/sec
Peak Width	30.00 sec

Table 'Narrow Integration Events' contains no data.

Broad Integration Parameters

Threshold	5.000 uV/sec
Peak Width	555.00 sec

Broad Integration Events

#	Start (min)	Event	Stop (min)
1	0.000	Inhibit Integration	17.000
2	44.000	Inhibit Integration	50.000

Viscometry Narrow Integration Parameters

Minimum Area	0 uV*sec
Minimum Height	0 uV
Touchdown	50.000 uV/sec
Peak Width	30.00 sec

Table 'Viscometry Narrow Integration Events' contains no data.

Millennium Calibration Report
 Report Method: GPC_Calibration_Report
 Sample: dext 29 K
 Vial: 6

November 30, 1997

Page: 2 of 3

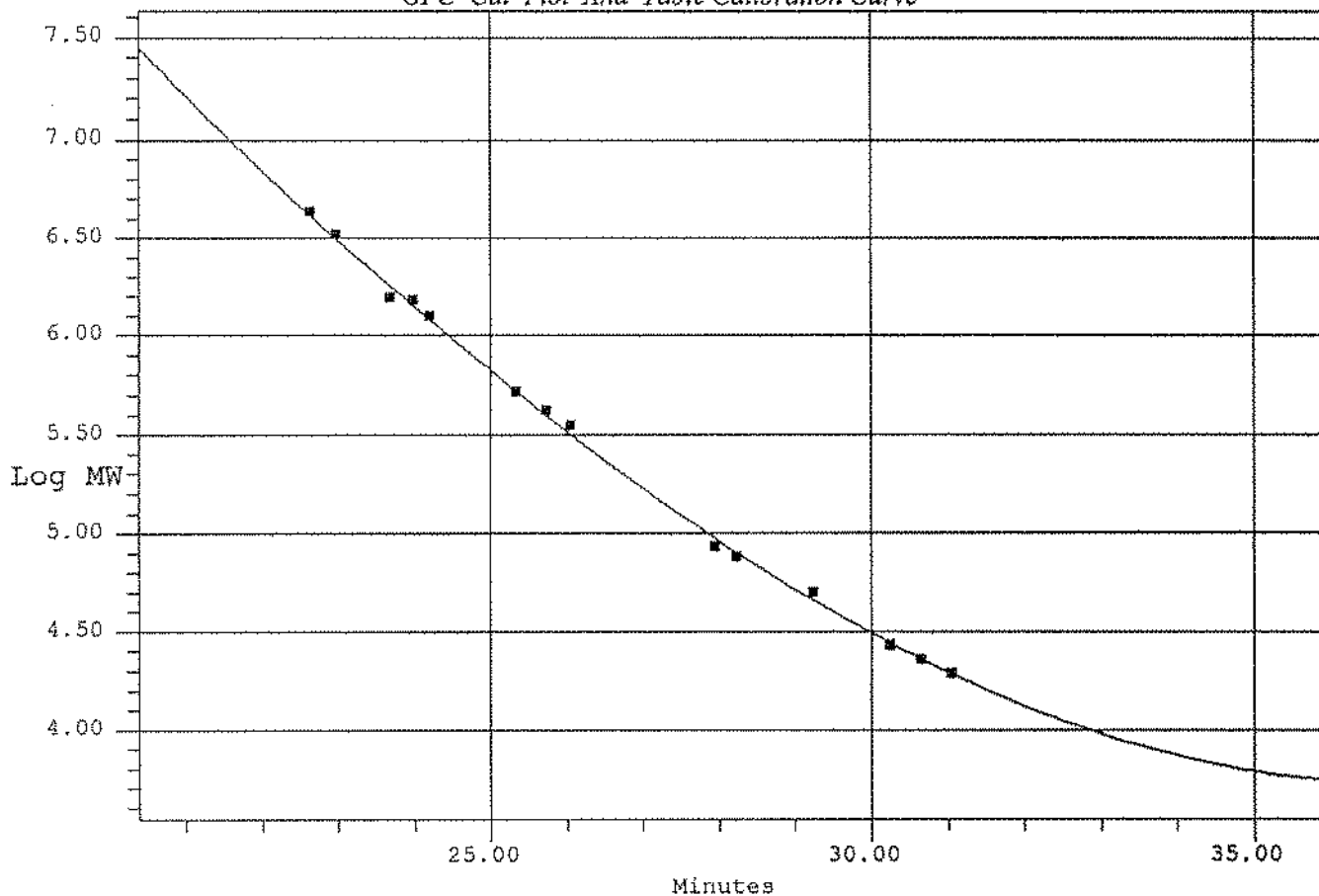
Version: 2.10
 Processed: 11/30/97 12:52:45 PM
 Channel: SATIN

Viscometry Broad Integration Parameters

Threshold 25.000 uV/sec
 Peak Width 360.00 sec

Table 'Viscometry Broad Integration Parameters' contains no data.

GPC Cal Plot And Table Calibration Curve



GPC Cal Plot And Table Calibration Information

Processing Method	nadia3	System	GPC
Channel	SATIN	Date	30-NOV-97
Type	GPC	Manual Coeffs	No
Data Origin		Order	3
A	15.112940	B	-0.263477
C	-0.010841	D	0.000261
E	0.000000	F	0.000000
R	0.999188	R^2	0.998376
Standard Error	0.167204	Vo	20.383 ml,min
Vt	36.000 ml,min	Valid	Yes
Mo		b	
Slope		K	1.000000000 dl/g
alpha	0.000000		

GPC Cal Plot And Table Narrow Standard table

#	Retention Time (min)	Elution Volume (ml)	Mol Wt (Daltons)	Log Mol Wt	Calculated Weight (Daltons)	% Residual
1	22.649	22.649	4300000	6.633468	4101228	4.847

Millennium Calibration Report	December 1, 1997	Page: 3 of 4
Report Method: GPC_Calibration_Report	Version: 2.10	
Sample: dext 1750 K	Processed: 11/30/97 12:54:47 PM	
Vial: 3	Inj: 1	Channel: SATIN

GPC_Cal_Plot_And_Table Narrow Standard table

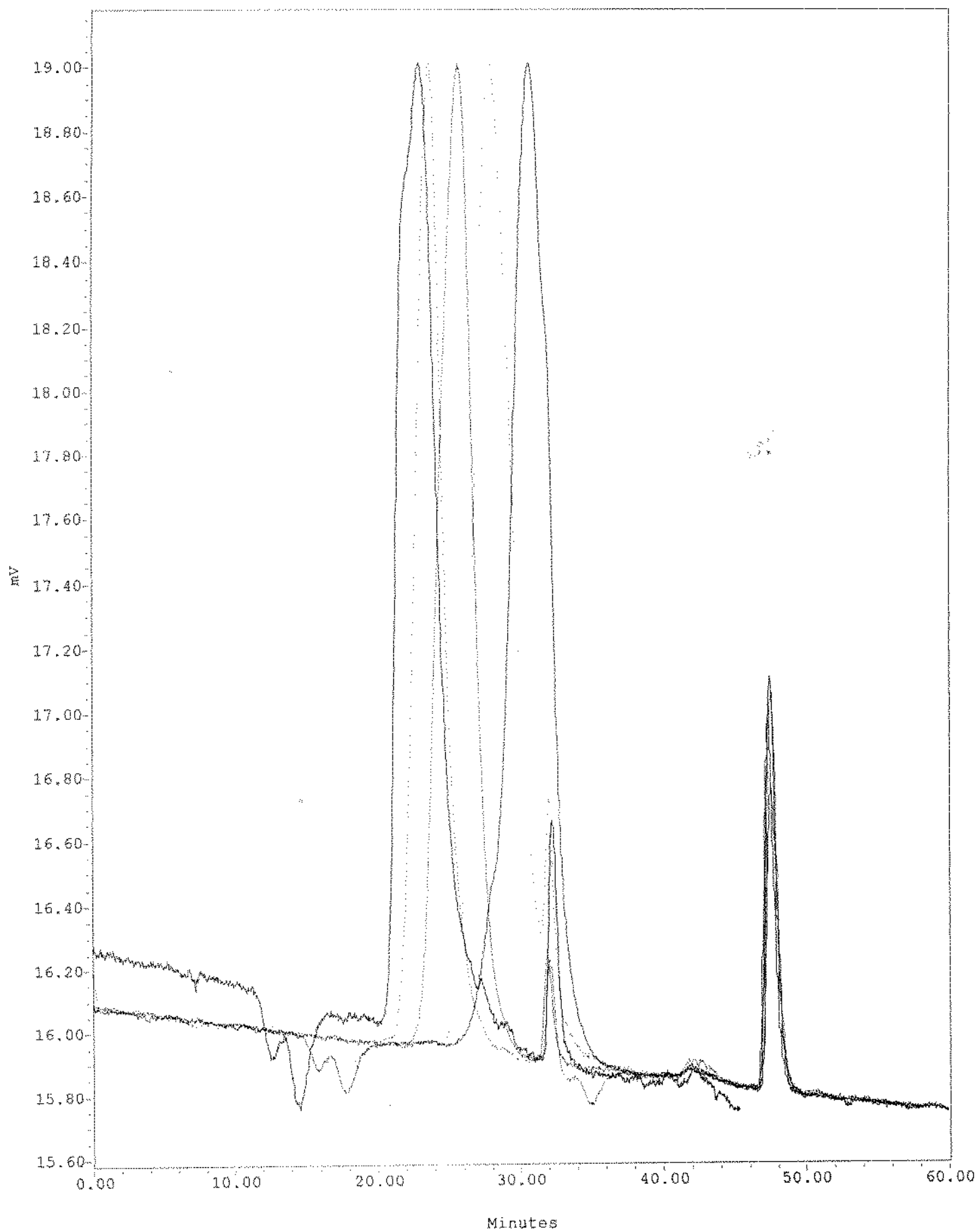
#	Retention Time (min)	Elution Volume (ml)	Mol Wt (Daltons)	Log Mol Wt	Intrinsic Visc (dl/g)	K (dl/g)
2	22.983	22.983	2838561	6.453098	1.000000	1.000000000
3	23.672	23.672	1550000	6.190332	1.000000	1.000000000
4	23.700	23.700	1530110	6.184723	1.000000	1.000000000
5	23.660	23.660	1500000	6.176091	1.000000	1.000000000
6	24.144	24.144	1250000	6.096910	1.000000	1.000000000
7	25.360	25.360	517000	5.713491	1.000000	1.000000000
8	25.733	25.733	417429	5.620582	1.000000	1.000000000
9	26.058	26.058	346500	5.539703	1.000000	1.000000000
10	45.478	45.478	75000	4.875061	1.000000	1.000000000
11	47.290	47.290	49400	4.693727	1.000000	1.000000000
12	47.617	47.617	45820	4.661052	1.000000	1.000000000
13	30.371	30.371	26500	4.423246	1.000000	1.000000000
14	30.667	30.667	23343	4.368150	1.000000	1.000000000
15	31.110	31.110	19300	4.285557	1.000000	1.000000000

GPC_Cal_Plot_And_Table Narrow Standard table

#	alpha	Hydrodynamic Volume (dl)	Log (MolWt [n])	Calculated Weight (Daltons)	% Residual	Manual	Ignor
1	0.000000	4300000	6.633468	5252559	-18.135	No	No
2	0.000000	2838561	6.453098	3295605	-13.868	No	No
3	0.000000	1550000	6.190332	1669688	-7.168	No	No
4	0.000000	1530110	6.184723	1625501	-5.868	No	No
5	0.000000	1500000	6.176091	1687533	-11.113	No	No
6	0.000000	1250000	6.096910	1081473	15.583	No	No
7	0.000000	517000	5.713491	398165	29.846	No	No
8	0.000000	417429	5.620582	302653	37.923	No	No
9	0.000000	346500	5.539703	241246	43.629	No	No
10	0.000000	75000	4.875061	47875	56.657	No	No
11	0.000000	49400	4.693727	55615	-11.175	No	No
12	0.000000	45820	4.661052	56522	-18.935	No	No
13	0.000000	26500	4.423246	30744	-13.804	No	No
14	0.000000	23343	4.368150	28270	-17.429	No	No
15	0.000000	19300	4.285557	25230	-23.504	No	No

GPC_Cal_Plot_And_Table Narrow Standard table

#	Ignore [n]	Standard Type
1	No	Broad
2	No	Broad
3	No	Broad
4	No	Broad
5	No	Broad
6	No	Broad
7	No	Broad

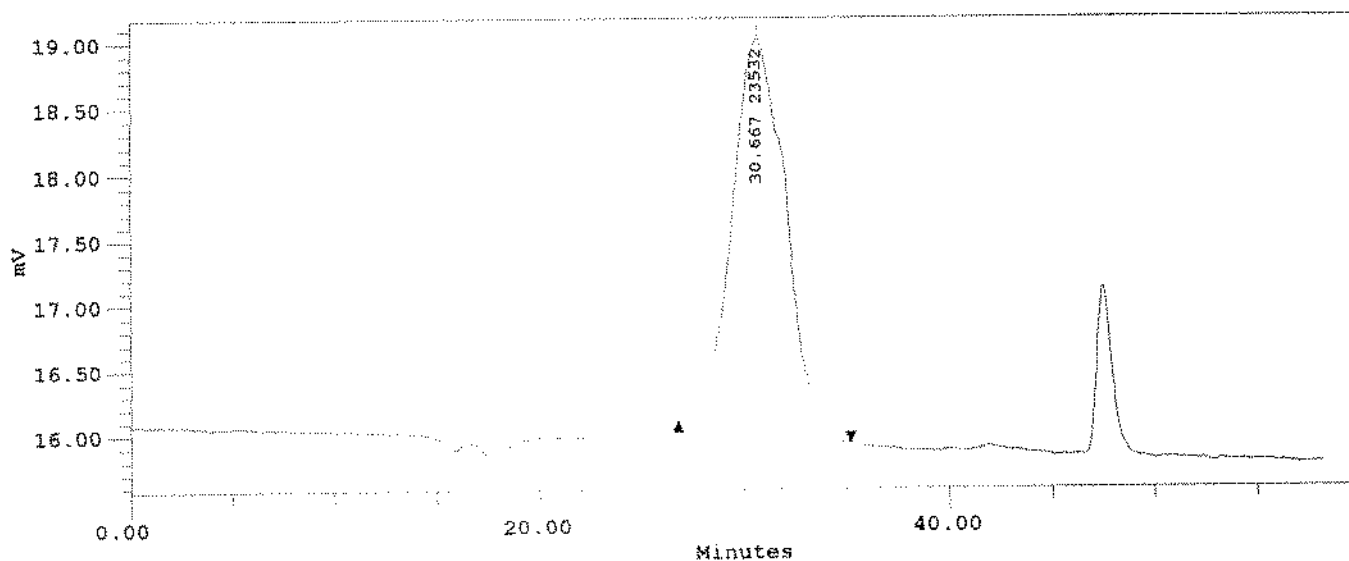


SampleName: dext 29 K Vial: 6 Inj: 1 Ch: SATIN Type: Broad Standard

Millennium Results Report	December 2, 1997	Page: 1 of 2
Report Method: GPC_Result_Report	Version: 2.10	
For Sample: dext 29 K	Vial: 6	Injection: 1
Channel: SATIN	Processed: 12/02/97 04:20:48 PM	Channel: SATIN
Channel Descr: ri		

Millennium Sample Information

Project Name:	GPC	Sample Type:	Broad Standard
Sample Name:	dext 29 K	Volume:	300.00
Vial:	6	Run Time:	60.0 min
Injection:	1	Date Processed:	12/02/97 04:20:48 PM
Channel:	SATIN	Dilution:	1.00000
Date Acquired:	02/03/97 03:53:01 PM		
Scale Factor:	1.00		
Acq Meth Set:	GPC_MS		
Processing Method:	reginal		



Peak Results

#	Name	Ret Time (min)	% Area	Mn (Daltons)	MP (Daltons)	Mw (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)
1		30.667	100.00	19289	23532	36507	36849	50361

Peak Results

#	Mz+1/Mw	Mz/Mw	Polydispersity
1	1.899904	1.390140	1.374253

Millennium Results Report
Report Method: GPC_Result_Report
For Sample: dext 29 K
Proc Chan: SATIN
Channel Descr: ri

December 2, 1997

Page: 2 of 2

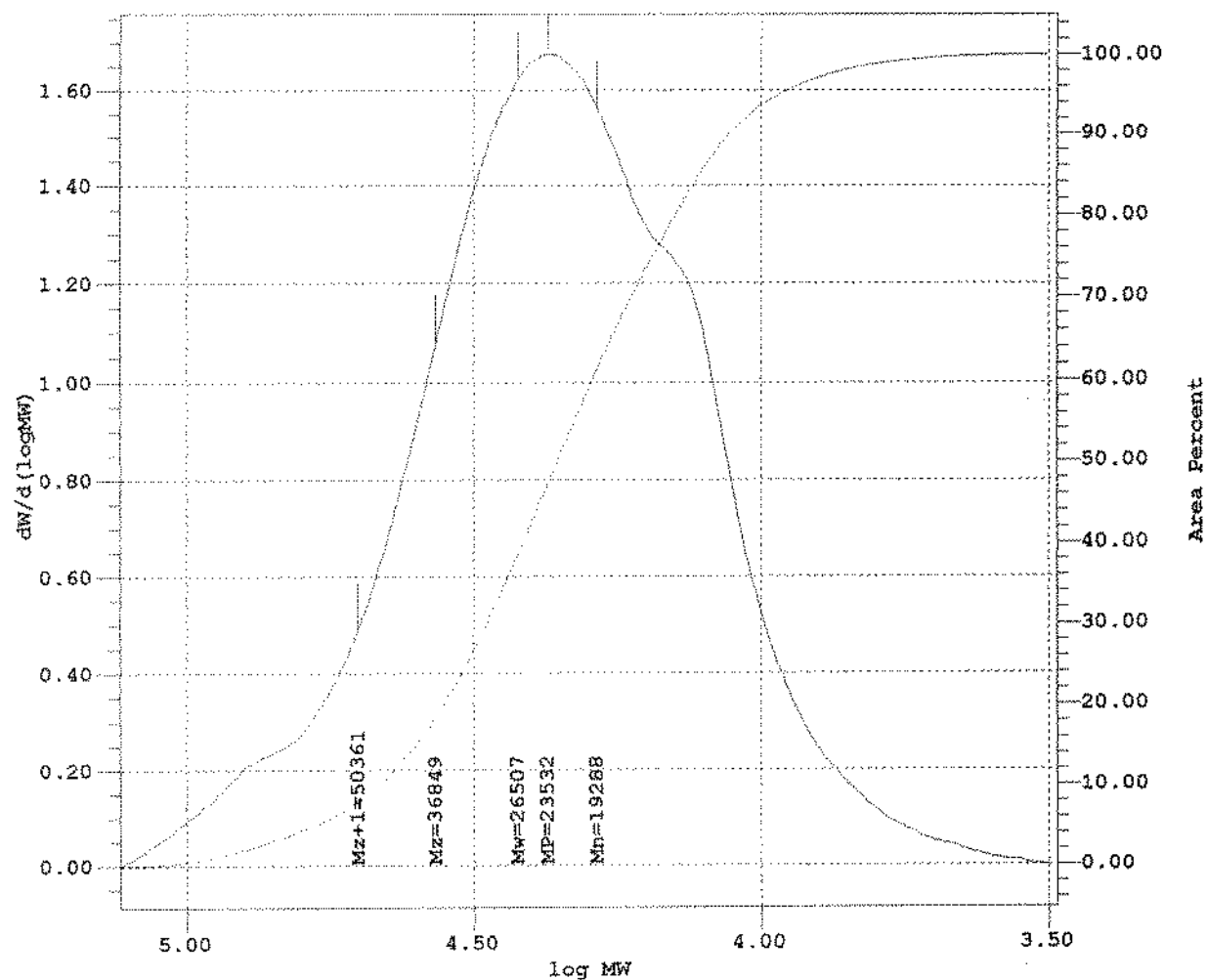
Version: 2.10

Vial: 6

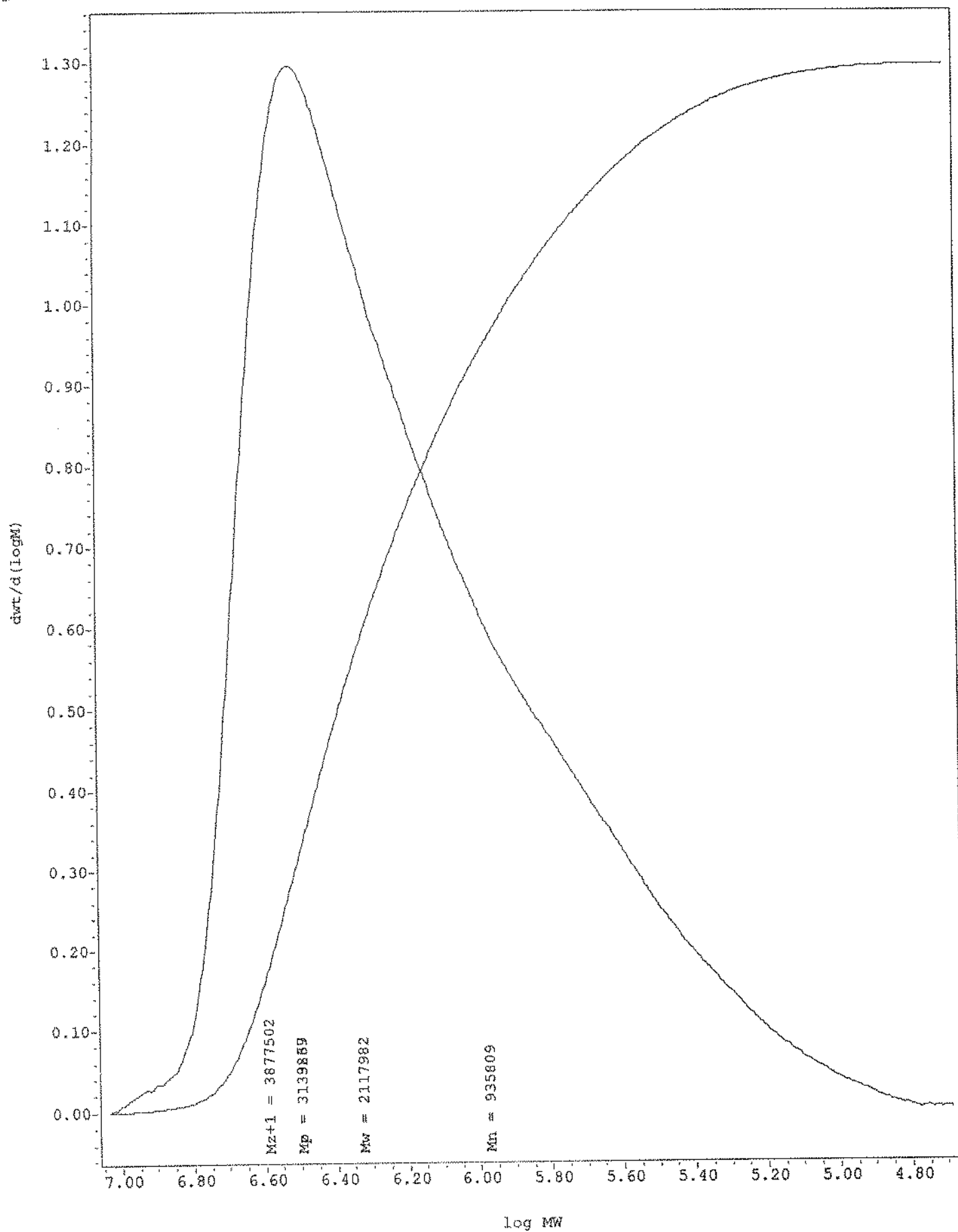
Injection: 1

Channel: SATIN

Processed: 12/02/97 04:20:48 PM



Black: Distribution Light Red: Theoretical Green: Observed
Cyan: Fitted Blue: g' Magenta: Cumulative



SampleName: D. Mollis 1 5 Vial: 3 Inj: 1 Ch: SATIN Type: Broad Unknown

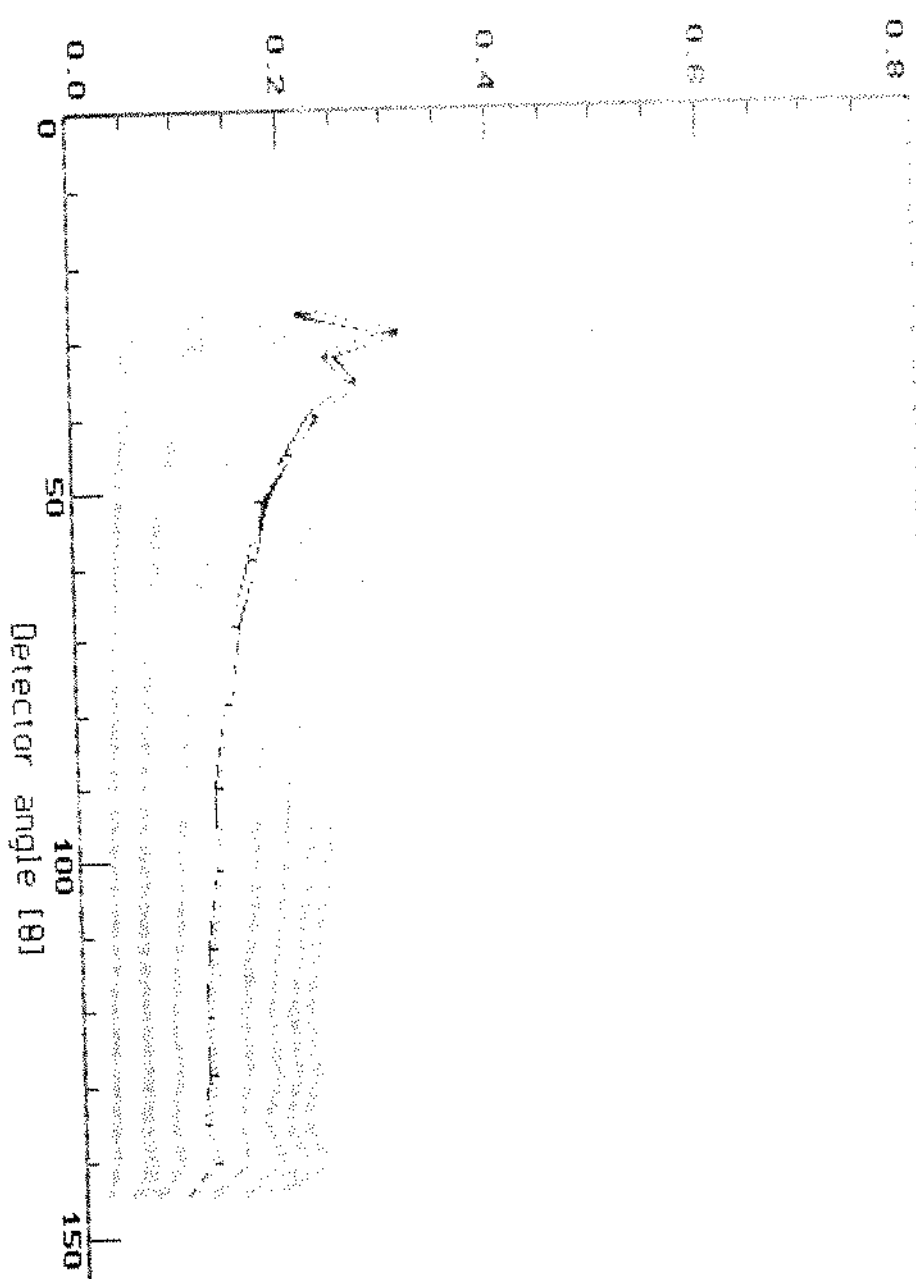
ANEXO 3. Relatórios utilizados na determinação de pesos moleculares da amostra de *D. mollis* por LALLS.

File Collect Process Options **NAD1910**

Set Selection

4.1.2.3

Normalized volts



Set
Conc. 18
File 3 04e-03
NAD1910

OK Options Table Aurora

435

NADIA2

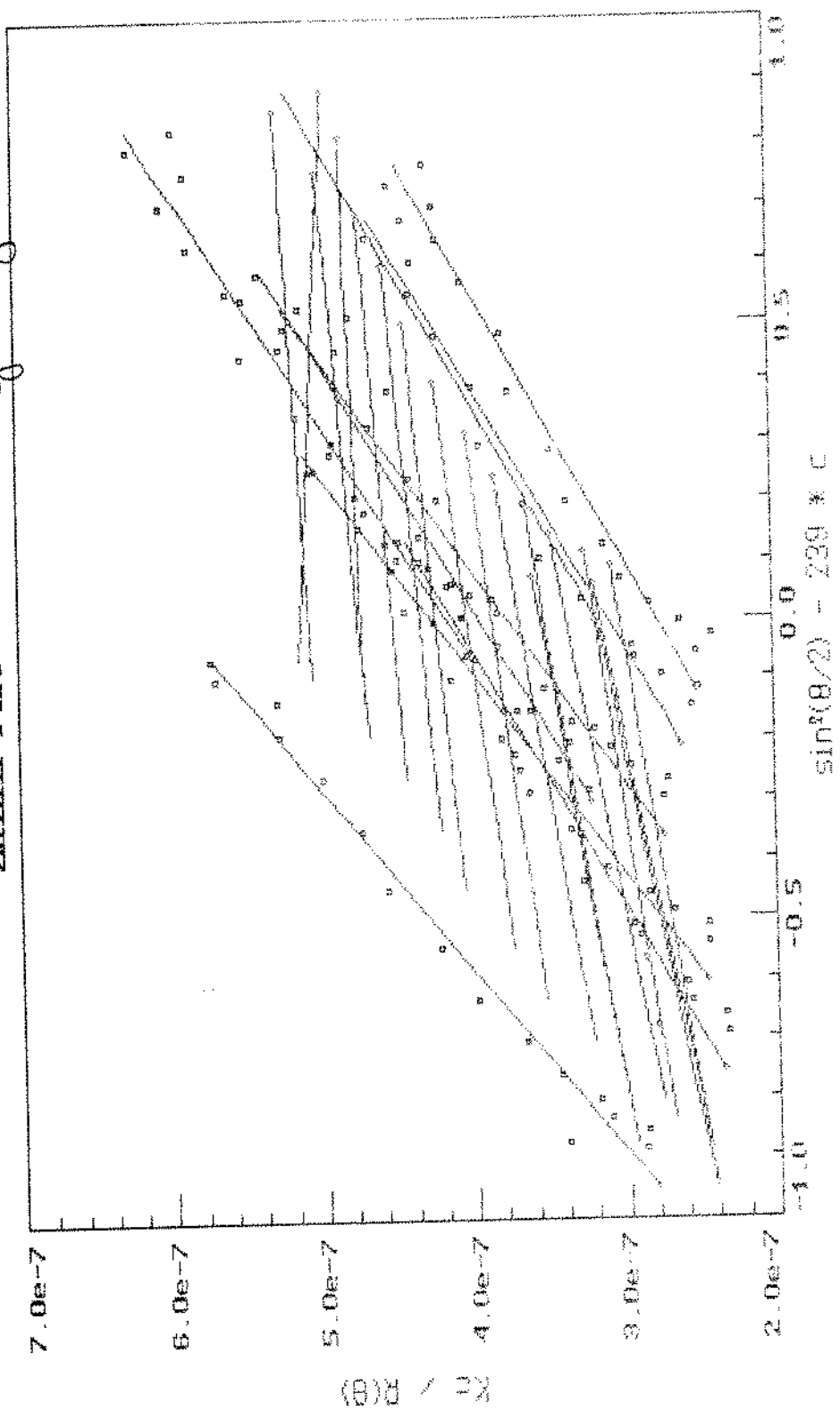
Options

Process

Collect

File

Zimm Plot - NADIA2 *Geno Juan.*



RMS Radius : 55.6 +/- 1.9 nm
 MW : 3.15 +/- 0.30e6 g/mol 300000
 A2 : -9.31e-06 mol ml/g

OK

Options

File

Collect

Process

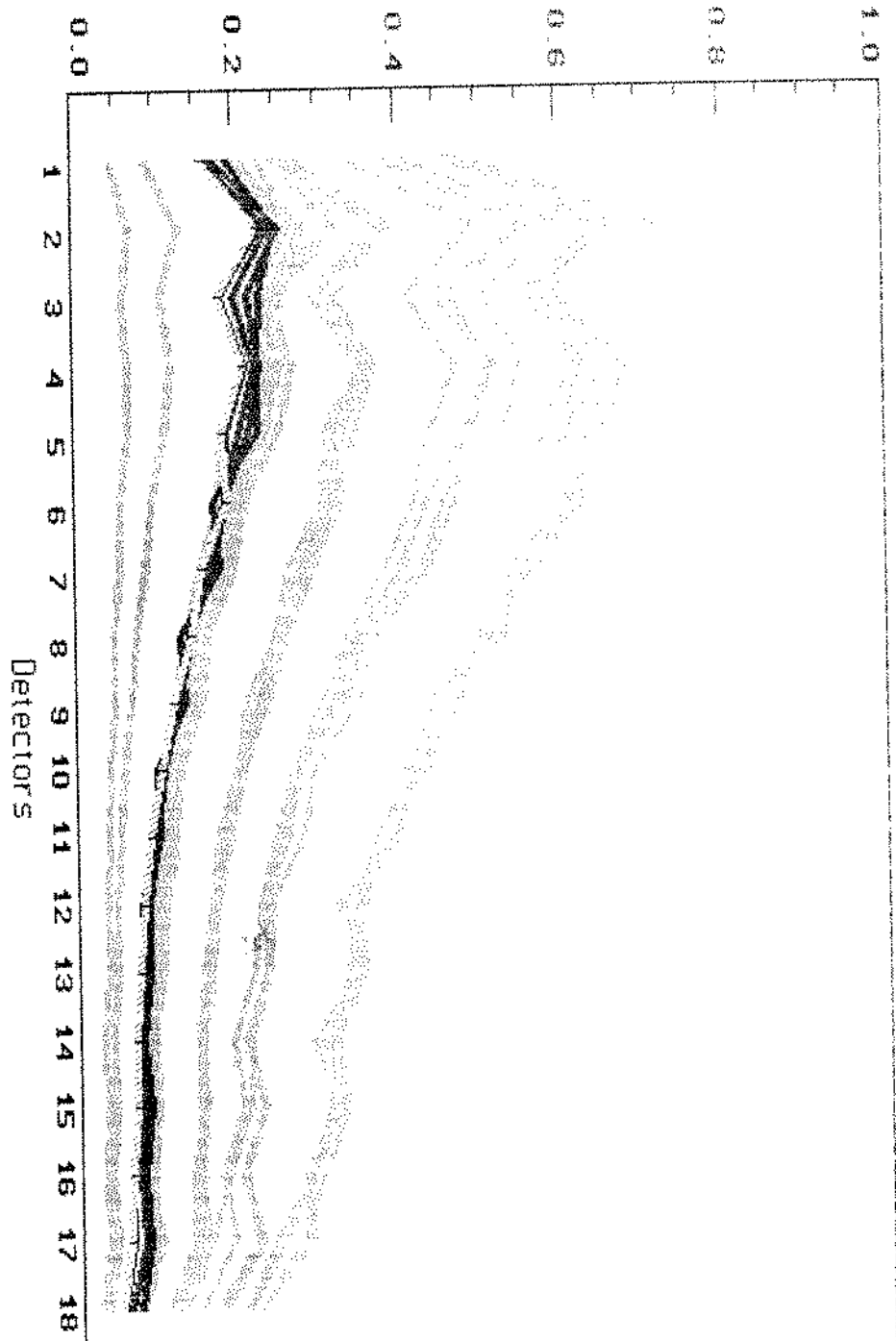
Options

MAD194

4:34 PM

Set Selection

Normalized volts



Set
Code 11
File 8.70E-05
MAD194

OK

Options

Label

Print