

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

César Gustavo Serafim Lisboa

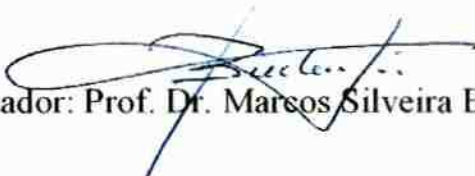
**Possibilidades de uso de polissacarídeos de plantas extraídos de
diferentes fontes, uma perspectiva de sustentabilidade**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

*César Gustavo
Serafim Lisboa*

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.


Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

L681a

Lisboa, César Gustavo Serafim

Possibilidades de uso de polissacarídeos de plantas extraídos de diferentes fontes, uma perspectiva de sustentabilidade / César Gustavo Serafim Lisboa. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Polissacarídeos. 2. Xiloglucano. 3. Galactomanano. 4. Hemicelulose. 5. Biotecnologia. I. Buckeridge, Marcos Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: A sustainable perspective for biotechnological applications of plant polysaccharides.

Palavras-chave em inglês: Polysaccharides; Xyloglucan; Galactomannan; Hemicellulose; Biotechnology.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Marcos Silveira Buckeridge, Ângelo Luiz Cortelazzo, Denis Ubida de Lima, Clovis Jose Fernandes de Oliveira Júnior, Telma Teixeira Franco.

Data da defesa: 29/08/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

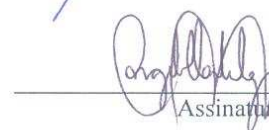
Campinas, 29 de agosto de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate


Assinatura

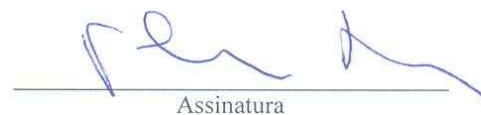
Prof. Dr. Clovis José Fernandes de Oliveira Junior


Assinatura

Prof. Dr. Denis Ubeda de Lima


Assinatura

Profa. Dra. Telma Teixeira Franco


Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Silva Tiné


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Henrique Netto de Alcântara


Assinatura

Ao meu pai, minha mãe,
meu irmão
e minha alegre companheira querida . . .
. . . minha família:
uma doce célula protetora desse
organismo complexo chamado
sociedade

Ofereço

Ao meu filho Victor Eduardo,
minha obra . . . esse maravilhoso ser
que ainda está por vir!

Dedico

AGRADECIMENTOS

- A minha família que, em meio a esforços e privações, sempre me apoiou em todas as horas necessárias para a realização desse trabalho: *"A vocês, eu ofereço esse trabalho!"*. *"Querido Nando, consegui meu irmão!"*
- Ao meu mestre e orientador Marcos Buckeridge que sempre esteve presentes em todas as decisões em minha caminhada profissional. – *"Foram longos 13 anos mestre! A despedida é assustadora, acredite!"*.
- À equipe e aos amigos da Suzano Papel e Celulose, por toda participação, ajuda, colaboração no trabalho e ensinamentos: Dra. Silvia Bugager, Evanice, Mário, Antônio, Geraldo, Cláudia, Roberto, Luciana, Paulo, Humberto e Reginaldo.
- Aos profissionais que compuseram a banca examinadora desse trabalho, pelas sugestões, ajuda e colaboração. Em especial os queridos amigos C2, Denis Lima, pH e Tiné.
- Aos grandes amigos que direta ou indiretamente colaboraram muito na execução desse trabalho: Patrícia Pinho, Aline Cavalari, Kelly Simões e Igor Borges.
- À equipe da Natura Cosméticos S/A pela colaboração e ajuda: Paula Silva, Pâmela, Sérgio, Alan, Gilson, Simone, Leda, José Renato, Cíntia, Pytel, Leandra, Kelen, Marcela, Patrícia e Ana Paula.
- Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. Em especial o querido Prof. Edson e a fantástica Liliam Panágio por toda ajuda e incentivo.
- A toda equipe diretiva e de professores do Colégio Arquidiocesano que, no momento crítico, foram fundamentais para a realização desse trabalho. *"Muito Obrigado mesmo!"* E uma saudação cheia de saudades a todos os meus alunos pela compreensão e entendimento durante o meu retiro.
- A toda equipe diretiva e de professores do Colégio ESI - São José, pela compreensão e reconhecimento de minha ausência. Em especial, minhas gestoras Ana, Iolanda e Ira. Daugna. E aos meus queridos pequenos que rezaram e torceram: *"O psor consegui crianças, obrigado!"*.
- Aos amigos da Natura Cosméticos S/A: Alan, Fabiano, Anderson, Siga, Isa, Aninha, Lilica, Vô, Pai, Tio, Dé Rodrigues, Paty Vanni, Cecília, Tânia, Iara, Pytel, André Novaes e Carvalho, Alan, Pesão, Iguatemi, Rafa, Wagninho, Alex, Davi, Roberto, Paulinho, Branca, Duzão, Rodrigo, Matheus e Braz.
- Aos amigos distantes: Tatá, Fausto, Lilis, Fernando Pelicice, Doug, Maitê, Régis Andriolo, Serginho, Japa, Lipe, Leo Esteves, Tonhão, Lauro, Marcelão, Rahal, Josa, Drica, Roberto e Humberto.
- À Turma do Vaso, em especial o meu amigo mais antigo de todos, Fabio Zuin.
- Às amigas de apoio, as queridas Tias Ana, Mary, Cida, Helena pelos conselhos e carinho.
- A Deus, Essa Inexplicável Força que aparece e sustenta quando precisamos.

ÍNDICE

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
POLISSACARÍDEOS: UMA REVISÃO DA PROPOSTA DE CLASSIFICAÇÃO, ASPECTOS GERAIS E INDUSTRIAIS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. CLASSIFICAÇÃO.....	13
3. NOMENCLATURA E SINONÍMIA.....	14
3.1. O conceito Fibra.....	14
3.2. O conceito Goma.....	16
3.3. O conceito Polissacarídeo de Reserva.....	17
3.4. O conceito Resina.....	18
4. PRINCIPAIS TIPOS DE POLISSACARÍDEOS.....	19
4.1. Polissacarídeos de plantas superiores.....	21
4.1.1. Amido.....	21
Características.....	21
Fonte.....	22
Estrutura.....	23
Aplicações.....	23
4.1.2. Celulose.....	24
Características.....	24
Fonte.....	24
Estrutura.....	25
Aplicações.....	25
4.1.3. Hemiceluloses.....	27
Características.....	27
Fonte.....	27
Estrutura.....	27
Aplicações.....	28
4.1.4. Polissacarídeos de reserva.....	28
Características.....	28

Fonte.....	29
Estrutura.....	31
Aplicações.....	31
4.1.5. Pectinas.....	35
Características.....	35
Fonte.....	35
Estrutura.....	36
Aplicações.....	37
JUSTIFICATIVA.....	40
OBJETIVOS.....	42
ARTIGO 1.....	43
ESTUDO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO, CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE GEL, POTENCIAL DE INTERAÇÃO COM CELULOSE E TOXICIDADE DO GALACTOMANANO DE SEMENTES DE FAVEIRO (<i>Dimorphandra mollis</i>).....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Resultados e Discussão.....	49
Conclusões.....	62
Parte Experimental.....	64
Referências.....	69
PATENTE 1.....	79
PROCEDE D'BTENTION DE POLYSACHARIDES A PARTIR DE SEMENCES DE JATOBÁ, COMPOSITION COSMETIC COMPRENANT LESDITS POLYSACHARIDES.....	80
Domaine de I' invention.....	80
Description de l' art antérieur.....	80
Résumé de I' invention.....	82
Description dès dessins.....	82
Description détaillée de I' invention.....	82
Procédé pour préparer les compositions décrites dans le tableau ci-dessus.....	87
Aplication cosmétique.....	88
Résultats.....	90
Conclusion.....	93
Revendications.....	94

Abrege descriptif.....	97
PATENTE 2.....	100
PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE E USO DE HEMICELULOSE COMO ADITIVO DE RESISTÊNCIA PARA APERFEIÇOAMENTO DE MATERIAL CELULÓSICO.....	101
Campo da invenção.....	101
Fundamentos da invenção.....	101
Reivindicações.....	113
Resumo.....	117
PATENTE 3.....	119
PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO.....	120
Campo da invenção.....	120
Fundamentos da invenção.....	120
Descrição das figuras.....	123
Descrição detalhada da invenção.....	124
Reivindicações.....	137
Resumo.....	148
PATENTE 4.....	149
PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXSUDADOS DE CULTURA DE CÉLULAS (PECC).....	150
Campo da invenção.....	150
Fundamentos da invenção.....	150
Descrição das figuras.....	152
Descrição detalhada da invenção.....	153
Reivindicações.....	163
Resumo.....	169
DISCUSSÃO.....	170
Desenvolvimento Sustentável.....	170
Posturas industriais atuais.....	172

Sinalizações sustentáveis para a produção em larga escala das matérias primas prospectadas na tese.....	174
Hemiceluloses de sementes e plântulas de eucalipto.....	175
Polissacarídeos exsudados de culturas de células.....	182
O xiloglucano de jatobá.....	188
O galactomanano de faveiro.....	195
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	203
REFERÊNCIAS.....	207
ANEXO 1.....	232

RESUMO

Aplicações biotecnológicas de polissacarídeos de plantas: uma estratégia sustentável para a produção em demanda

Atualmente, a busca por novas fontes de materiais pode levar ao depósito de patentes. Isto é importante para que novos produtos, que apresentem características inovadoras, potencial de redução de custos, rotas de produção ambientalmente corretas, partição de benefícios e, finalmente, possibilitem a exploração de novos mercados de maneira sustentável. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de uso de polissacarídeos de plantas de diferentes fontes nos setores de alimentos, farmacosméticos e papel. Os resultados são apresentados na forma de um artigo e 4 patentes. Os xiloglucanos de sementes de espécies nativas de plantas (*Hymenaea courbaril*) e de plântulas de eucalipto foram aplicados no processo de confecção do papel, demonstrando que suas propriedades mecânicas podem ser melhoradas. Resultados similares foram obtidos com galactomananos de sementes de *Sesbania virgata* e *Dimorphandra mollis*. O xiloglucano de *H. courbaril* foi estudado mais profundamente e demonstrou-se que pode ser também aplicado em cosméticos, pois não é citotóxico, é capaz de espessar formulações e interfere na produção de colágeno pela pele. As propriedades reológicas do galactomanano de *D. mollis* foram estudadas em comparação a outros galactomananos já utilizados na indústria. Demonstrou-se que ele é apropriado para várias aplicações em alimentos. Como um todo, nossos resultados indicam que tanto os polissacarídeos de sementes de espécies nativas como o de eucalipto podem ser utilizados em várias aplicações de tal forma que possam fazer parte de programas de uso sustentável da biodiversidade, levando a benefícios tecnológicos e também sociais.

ABSTRACT

Biotechnological applications of plant polysaccharides: a sustainable strategy for production and demand

Nowdays, the search for new sources of materials can lead to new patent deposits. This is important because new products that display innovative features, cost reduction potential, environmentally clean production routes, partition of benefits and finally, may turn possible to explore differential market shares. These may be excellent socio-environmental and market shares for biotechnology companies. In this context, the present work aimed at evaluating the potential of use of plant polysaccharides from different sources in the food, farmacosmetic and paper industrial sectors. In the present work, we present studies that focus on the use of seed polysaccharides on applications on paper, cosmetics and food industries. The results are presented in the form of one article and 4 patents. The xyloglucan from seeds of native tropical tree species (*Hymenaea courbaril* – jatobá, *Copaifera langsdorffii* – copaiba) and from seedlings of *Eucalyptus grandis* (eucalypt) were applied to paper making and we demonstrated that several properties of paper can be improved by using these xyloglucans during preparation. Similar results were obtained with galactomannans from *Sesbania virgata* and *Dimorphandra mollis*, two fast-growing legume trees. The polymers increased paper resistance to mechanical stress so that they can be applied for applications where more resistant papers (such as rapping paper) are used. The xyloglucan from *H. courbaril* was studied more deeply, demonstrating that it can be applied in cosmetics as it is not cytotoxic and can be used to improve skin biochemistry such as collagen production. Galactomannan from *D. mollis* was studied from the rheological point of view and its properties were compared with other commercially used galactomannans. Our results showed that *D. mollis* galactomannan is appropriate to several applications in food industries. As a whole, our results indicate that both, native seeds and seeds of eucalyptus, might be used in several industrial applications so that these might be used as part of programs of sustainable use of biodiversity, leading to social and technological benefits to society.

INTRODUÇÃO

Polissacarídeos: uma revisão da proposta de classificação, aspectos gerais, industriais.

1. Introdução

Os polissacarídeos são macromoléculas de alto peso molecular (escala de milhões de Daltons) resultantes da condensação de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses, bem como múltiplas hidroxilas. Cada um dos variados monômeros constituintes dos diversos tipos de polissacarídeos está ligado ao monômero vizinho por intermédio de uma ligação glicosídica formada pela ligação da hidroxila do carbono 1 (C-1) com qualquer outra do monômero subsequente, com eliminação de uma molécula de água (Stryer, 1995; von Poser, 2004).

Quimicamente podem ainda ser definidos como poliidroxi aldeídos ou poliidroxi cetonas e seus derivados, ou como substâncias que produzem estes compostos por hidrólise (Ucko, 1992; Buckeridge *et al.* 2008).

De todas as moléculas orgânicas da natureza, os polissacarídeos são os mais abundantes, sendo que sua quantidade corresponde à somatória de todos os outros tipos de matérias orgânicas juntas.

Nas plantas, apesar das diferenças marcantes entre as estruturas químicas dos variados tipos de polissacarídeos constituintes dos vegetais, suas propriedades físico-químicas podem ser consideradas semelhantes (Buckeridge *et al.*, 2000c). Assim, tais funções variam desde funções primárias dos polissacarídeos no vegetal, como a reserva (Buckeridge & Dietrich, 1996) e a função estrutural (Lima *et al.*, 2004), até funções secundárias, como controle de embebição (Potomati & Buckeridge, 2002; Tonini *et al.*, 2006; Tonini *et al.*, 2007), proteção mecânica (Groot &

Karssen, 1987; Groot *et al.*, 1988; Reid, 1995; Lisboa *et al.*, 2006) e controle do potencial osmótico das células (Bieleski, 1993).

2. Classificação

Constituintes essenciais de todos os organismos vivos (Bruneton, 1993), os polissacarídeos, tanto de origem vegetal como de outros reinos (Fungi e Monera, por exemplo), são divididos em dois grandes grupos. O grupo dos homoglicanos (polissacarídeos homogêneos ou homopolissacarídeos) e o grupo dos heteroglicanos (polissacarídeos heterogêneos ou heteropolissacarídeos).

O primeiro grupo refere-se aos polissacarídeos formados por apenas um tipo de monossacarídeo constituinte, ou seja, são resultantes da condensação de um grande número de monômeros iguais. Como exemplo deste grupo, cita-se o amido e a celulose, cujas estruturas e composições serão mais bem descritas a frente. Os polissacarídeos pertencentes ao segundo grupo são formados por mais de um tipo de monossacarídeo constituinte, isto é, são resultantes da condensação de diferentes tipos de monômeros. De uma maneira geral, os polissacarídeos podem ainda ser classificados pela sua solubilidade em água. No âmbito vegetal, a exemplo dos polissacarídeos solúveis, citam-se as gomas, os polissacarídeos de parede celular e pectinas (a diferença precisa entre estes termos será detalhada adiante) e, em relação aos polissacarídeos insolúveis, cita-se a celulose e, algumas hemiceluloses (Rombi, 1991; Bruneton, 1993; Spiller, 1994).

3. Nomenclatura e Sinonímia

A nomenclatura geral adotada para os polissacarídeos, é muito diferente do conceito científico propriamente dito. Constantemente, adotam-se os termos fibra, goma, polissacarídeo de reserva e, em alguns casos, resina para designar de maneira sinônima estas macromoléculas glicídicas. No entanto, cada um destes termos é utilizado para conceituar diferentes tipos de polissacarídeos ou outro tipo de composto, especialmente baseado nas diferenças de suas origens.

Sendo assim, mesmo em literatura conceituada, não é difícil detectar confusão, tanto nas traduções quanto na utilização destes termos. A conceituação destes, muitas vezes parece correta do ponto de vista genérico ou popular. Porém, do ponto de vista científico, os critérios para sua utilização são um pouco mais complexos (Lopes *et al.*, 1991).

Desta forma, este capítulo visa primeiro conceituar cientificamente a classificação dos polissacarídeos segundo estes termos, para depois, explanar as quatro classes ou tipos destas macromoléculas e suas principais aplicações biotecnológicas, que, evidentemente, acarretam em suas explorações industriais específicas.

3.1. O conceito Fibra

O termo fibra ou fibra alimentar foi criado por nutricionistas para designar determinados tipos de polissacarídeos. A utilização destes termos está relacionada a um conceito nutricional e/ou fisiológico, o que é muito diferente da criação de um termo para definir uma classe de substâncias do ponto de vista científico (von Poser, 2004).

Assim, embora não exista uma definição precisa para o termo, o conceito fibra alimentar é utilizado para designar toda e qualquer molécula orgânica cuja hidrólise total não é possível no trato gastro-intestinal humano (Buckeridge & Tiné, 2001), possui valor calórico baixo e, portanto, não apresenta valor nutricional (Trowell *et al.*, 1976).

Pertence a essa classe de substâncias toda e qualquer macromolécula de baixa ou alta solubilidade em água, utilizada na alimentação dos seres humanos que, apesar de não apresentarem valor nutricional, possuem papel fisiológico relacionado a controle de motilidade do trato digestório, aumento do volume fecal e, proteção contra doenças intestinais; uma vez que promovem uma seleção pré-biótica de bactérias simbioses do intestino humano (Cummings *et al.*, 1978; Smith & Holm, 1982). Nesse contexto, as fibras nutricionais com propriedades fisiológicas no corpo humano, também podem ser definidas como grandes fragmentos de parede celular vegetal com vários polissacarídeos insolúveis em água associados (Buckeridge & Tiné, 2001), sendo que, os mesmos, evidentemente, devem ser passíveis de ingestão.

Mesmo entendendo que a maioria das macromoléculas representantes desta classe trata-se de polissacarídeos, tais termos, segundo diversos autores (Bacon, 1979; Schneeman, 1986; Waitzberg *et al.*, 1990; Rombi, 1991; Spiller, 1994 e Campbell *et al.*, 1997, por exemplo) não podem ser utilizados trivialmente de forma sinônima por dois motivos:

- a) Alguns polissacarídeos vegetais utilizados na alimentação humana sofrem hidrólise total (e são absorvidos) pelo trato gastro-intestinal humano. Como um exemplo disso, também se pode citar os trabalhos de Gray e colaboradores (1993) que demonstraram que menos de 20% (correspondente à celulose) do total das macromoléculas constituintes

da parede celular vegetal (polímeros estes que, do ponto de vista nutricional, são considerados fibras) foi encontrado nas fezes de ratos e outros animais após ingestão de polissacarídeos constituintes da parede celular de espinafre marcados radioativamente.

- b) Algumas fibras alimentares (por definição, nutricional) utilizadas na alimentação humana, não são de origem glicídica, como por exemplo, a lignina, cuja natureza é fenólica. Ainda em relação a esta, sabe-se que seu uso em dietas é altamente benéfico, uma vez que atua prevenindo câncer de cólon e no tratamento de constipação (Tharanathan, 2002).

3.2. O conceito Goma

Todas as gomas possuem natureza glicídica e são polissacarídeos, porém, nem todos os polissacarídeos podem ser chamados de gomas, mesmo aqueles cujas aplicações industriais estão descritas há décadas. Em comunicação pessoal, pôde-se detectar que, as confusões quanto à utilização deste termo, estão relacionadas a traduções diretas do termo *gum* da língua inglesa para a portuguesa e há uma tendência dos biotecnólogos em chamar de “goma” todo e qualquer polissacarídeo cuja utilização industrial é explícita como a “goma” guar, “goma” caroba, “goma” gathi e etc; que, conforme veremos adiante, por definição técnico-científica, não podem ser consideradas gomas.

Assim, do ponto de vista científico, os polissacarídeos do tipo goma são de origem vegetal apenas e só ocorrem em dois órgãos das plantas, o caule e a raiz. Desta forma, as gomas são polissacarídeos resultantes de lesões físicas e biológicas sofridas pelos vegetais, ou seja, constituem exsudatos oriundos de traumatismos físicos (cortes, por exemplo) ou ação de microorganismos nestes dois órgãos citados. Em outros casos, são

resultantes de processos adaptativos do vegetal à variabilidade climática, constituindo a chamada “gomose fisiológica” (van Poser, 2004).

Quimicamente, as gomas, além de monômeros comuns, podem apresentar ácidos urônicos em sua estrutura o que dá um caráter ácido ao polissacarídeo.

Como exemplo das gomas mais comuns utilizadas industrialmente, cita-se a goma arábica, oriunda da planta *Acacia senegal* e a goma caraica, obtida da planta *Sterculia tomentosa* (outras gomas de aplicação industrial estão apontadas na Tabela 3).

3.3. O conceito Polissacarídeo de Reserva

Ao contrário das gomas, os polissacarídeos de reserva são constituintes naturais dos vegetais, isto é, não é necessário nenhum tipo de traumatismo de origem física ou biológica para que sejam produzidos. Neste ponto, esse tipo de polissacarídeo não é indicativo fisiológico ou patológico dos vegetais (van Poser, 2003).

De ocorrência predominante em tecidos de reserva (endosperma ou cotilédone) de sementes, os polissacarídeos de reserva são, em sua maioria, polímeros neutros. De acordo com Buckeridge & Reid (1996a) e Buckeridge *et al* (2000b), esses polissacarídeos tratam-se de hemiceluloses (maiores detalhes sobre esse termo serão fornecidos adiante) que, através de um mecanismo proposto pelos autores (conhecido como “transferência de funções”), adquiriram funções secundárias (diferentes da função primária estrutural) na parede celular de tecidos de sementes. Esses polímeros, com o passar do tempo, passaram a ser acumulados em maior quantidade. É por isso que podem ser extraídos para uso comercial com elevado rendimento.

Desta classe de polissacarídeos, os exemplos mais comuns constantemente citados, cuja aplicação industrial é mais conhecida, são a “goma”¹ guar (oriunda de sementes da espécie *Cyamopsis tetragonolobus*) e a “goma”² caroba ou LBG (oriunda das sementes da planta *Ceratonia siliqua*).

Convém reparar mais uma vez que, comercialmente, estes polissacarídeos são erroneamente conhecidos como gomas, resultando em inúmeros equívocos entre os fisiologistas, bioquímicos e biotecnólogos.

3.4. O conceito Resina

O termo resina é constantemente adotado para definir todo e qualquer tipo de exsudado de plantas. Dentre as classes explanadas acima esse termo é especialmente confundido com o termo goma, exatamente por este referir-se a exsudatos de plantas que são indicativos fisiológicos (Panda, 2001).

As resinas também podem ser consideradas indicativos fisiológicos nos vegetais, porém não possuem origem glicídica. Esses compostos, portanto, não são polissacarídeos, pois sua natureza é terpênica (van Poser, 2004).

¹ Reparar que o termo goma está colocado entre aspas, justamente para evidenciar a confusão de termos que é muito comum na literatura técnica e nas denominações, até mesmo, de especialistas.

² Idem nota 1.

4. Principais tipos polissacarídeos

De acordo com o trabalho de van Poser (2004), do ponto de vista de utilização industrial, pode-se sugerir uma divisão dos polissacarídeos, com aplicação biotecnológica, em quatro categorias:

- 1) Polissacarídeos de Bactérias
- 2) Polissacarídeos de Algas
- 3) Polissacarídeos Exsudados de Plantas
- 4) Polissacarídeos de Plantas Superiores

Cada uma destas categorias apresenta carboidratos específicos, cuja aplicação industrial é bem conhecida e, atualmente, os estudos parecem tender a se concentrar em como obter eficientemente tais polímeros em larga escala e de maneira menos impactante em relação ao meio ambiente.

Das quatro categorias propostas, exploraremos em detalhes, na presente introdução, apenas à última categoria, ou seja, a categoria relacionada aos Polissacarídeos de Plantas Superiores; que constituem o foco deste trabalho. Mesmo assim, um resumo dos principais representantes (que apresentam utilização comercial) de cada uma das quatro categorias citadas, sua constituição monomérica, fonte de obtenção e principais aplicações podem ser acompanhados nas tabelas 1, 2 e 3 (abaixo).

Tabela 1: Principais polissacarídeos de bactérias e o resumo de suas aplicações bítécnicas (*fonte preferencial de extração comercial).

Nome	Constituição	Fonte Biológica	Aplicações	Referências
Dextrano	glucose	<i>Leuconostoc mesenteroides*</i> , <i>Streptococcus metans</i>	sucedaneo do plasma, espessante, delivery system	Harboe <i>et al.</i> , 1989; Larsen <i>et al.</i> , 1991; Cui <i>et al.</i> , 1994 etc.
Xantana	ácido glucurônico, manose, glucose, grupos acetil e ácido pirúvico	<i>Xanthomonas campestris</i>	estabilizante, geleificante,	Bruneton, 1993; Sanderson, 1996; Katzbauer, 1998 etc.
Gelano	glucose, ácido glucurônico, glucose, ramnose	<i>Pseudomonas elodea</i>	estabilizante, espessante, bioencapsulamento de fármacos	Banik <i>et al.</i> , 2000; Majeti, 2000; Sabarinath <i>et al.</i> , 2002 etc.

Tabela 2: Principais polissacarídeos de algas e o resumo de suas aplicações bítécnicas (*fonte preferencial de extração comercial).

Nome	Constituição	Fonte Biológica	Aplicações	Referências
Algina	ácido manurônico, ácido glucurônico	<i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Laminaria hyperborea</i> , <i>Laminaria digitata</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>	espessantes, estabilizantes, protetores de mucosa gástrica	Sanderson, 1981; Bruneton, 1993; Hänsel, 1999 etc.
Carragena	galactose	<i>Chondrus crispus</i>	espessantes, estabilizantes, tratamento constipação, mucoprotetor em proctologia	Hansen, 1968; Bruneton, 1993; van Poser, 2004 etc.
Ágar	galactose	<i>Gelidium cartilagineum</i> , <i>Gracilaria confervoides</i> , <i>Pteroclaia capillacea</i>	geleificante para meio de cultura, laxativo,	Hoepfner <i>et al.</i> , 2002; van Poser, 2004 etc.
Fucano	fucose	<i>Fucus vesiculosus*</i> , <i>Dictyoya menstrualis</i> , <i>Spatoglossum schröderie</i> , <i>Pelvetia canaliculata</i>	anticoagulante, antitrombócito	Banik <i>et al.</i> , 2000; Majeti, 2000; Sabarinath <i>et al.</i> , 2002 etc.

Tabela 3: Principais polissacarídeos exsudatos de plantas e o resumo de suas aplicações bítecnológicas (*fonte preferencial de extração comercial).

Nome	Constituição	Fonte Biológica	Aplicações	Referências
Arábica	galactose, arabinose, ácido glucurônico, ramnose	<i>Acacia senegal</i>	agentes de textura, estabilizadores, <i>delivery system</i>	Joseleau & Ullman, 1990; Panda, 2001 etc.
Gathi	arabinose, galactose, xilose, manose	<i>Anogeissus latifolia</i>	emulsificante, adjuvante de drogas anti-tumorais	Panda, 2001
Karayca	ácido galaturônico, ramnose, galactose, ácido glucurônico	<i>Sterculia tomentosa</i> ,* <i>Sterculia urens</i> , <i>Cochlospermum gossypium</i>	espessantes, estabilizadores, aditivos em papel, laxantes	Balmaceda <i>et al.</i> , 1973; Panda, 2001 etc.
Tragacante	ácido tragacanto, ácido galacturônico, galactose, xilose, arabinose	<i>Astracantha gummifera</i>	Estabilizadores, espessantes, lubrificantes	Furtado, 1997; Panda, 2001 etc.

4.1. Polissacarídeos de Plantas Superiores

4.1.1. AMIDO

Características

Acredita-se que o amido seja, depois da celulose, o polissacarídeo mais abundante do reino vegetal. Durante o processo fotossintético, são produzidas moléculas de glicose, a partir de água e energia luminosa (Stryer, 1995; Alberts *et al.*, 1997). A glicose é utilizada como matéria-prima para a síntese enzimática dos carboidratos necessários ao crescimento e propagação do vegetal, sendo um deles, o amido.

Considerado a fonte preferencial de estocagem de energia pelas plantas (Tharanathan, 2002), o amido, típico de reserva, é um homopolissacarídeo dividido em dois tipos:

- a) amido do tipo amilose
- b) amido do tipo amilopectina

Caracteristicamente, esses dois tipos podem ou não sofrer hidrólise total no trato digestório humano, sendo esta característica importantíssima para a determinação de suas aplicações industriais, pelo menos no setor alimentício.

Fonte

Embora o amido possa ser encontrado em quase todas as espécies de vegetais, existe um número limitado de plantas utilizadas para a produção comercial em larga escala. Dentre elas, o milho e seus híbridos destacam-se como principais fontes, sendo cultivados tanto em países de climas temperados como tropicais (América do Norte, América Latina, Europa e Ásia) (Valdeirão & Janson, 1996).

Outras fontes comerciais são a batata (Europa e América do Norte), o trigo (América do Norte, Austrália, Europa e Ásia), mandioca (América Latina e Sudeste Asiático) e o arroz (Ásia) (Valdeirão & Janson, 1996).



Figura 1: Fotografias de duas das espécies comerciais utilizadas para a obtenção do polissacarídeo amido em larga escala. À esquerda (**A**), o milho (*Zea mays*) e a direita (**B**), o arroz (*Oryza sativa*). Em **C**, observa-se o grão de arroz, local específico de onde o amido é extraído, aumentado com e sem casca.

Estrutura

Quimicamente, o amido é um homopolímero constituído de repetições de unidades de glucose, unidas por ligações α -glucosídicas (Lehninger, 1989). Como citado, dependendo do posicionamento destas ligações efetuadas pelas unidades monoméricas durante a polimerização, formam dois tipos básicos de polímeros: a amilose e a amilopectina.

O amido do tipo amilose é uma cadeia linear de glucose α -1,4 ligadas (van Poser, 2004), com peso molecular bem mais baixo que o do tipo amilopectina (Valdeirão & Janson, 1996) e constitui cerca de 10 a 20% do amido total das células vegetais. O amido do tipo amilopectina é uma cadeia de glucose altamente ramificada, sendo formada por ligações do tipo α -1,4 e α -1,6 (van Poser, 2004), constituindo de 80 a 90% do amido total celular; com peso estimado em centenas de kDa (Valdeirão & Janson, 1996).

Aplicações

Após extração, o amido é um pó com cerca de 10 a 20% de umidade (dependendo da forma de estocagem) e insolúvel em água fria. Na indústria de alimentos, o amido, quando resistente à hidrólise enzimática no trato gastro-intestinal, atua como a maioria dos polissacarídeos classificados nutricionalmente como fibras (Tomlin & Read, 1990; Kasaoka *et al.*, 1997), isto é, está envolvido com a regulação da motilidade do trato digestório, especialmente o cólon intestinal (Brown *et al.*, 1979; Waitzberg *et al.*, 1990; Topping, 1991; Bruneton, 1993; Spiller, 1994).

No âmbito farmacêutico, sabe-se que a ingestão prolongada de amido resistente é benéfica no tratamento de doenças relacionadas à obesidade, como por exemplo, o câncer de mama (Kazaoka *et al.*, 1997) e o *Diabetes mellitus* (Spiller, 1994). Ainda nesse setor, estudos recentes

têm apontado o amido como responsável pelo estímulo à produção de insulina, diminuindo assim a taxa de glucose no sangue em diabéticos (Hospers *et al.*, 1994; Heijnem *et al.*, 1995).

No setor de produção de papel a utilização do amido como aditivo à massa celulósica tem como objetivo principal fornecer maior resistência física (interna e superficial) no papel. Entram como aditivos na fabricação de papéis *couché* de baixa e alta gramatura, em papéis *off-set* e papéis-cartões recobertos (Valdeão & Janson, 1996). Nesse setor, seus benefícios são geralmente: o aumento da resistência superficial, interna, à água ou a óleos; melhora de printabilidade e qualidade de impressão; diminuição de porosidade, bem como redução de custos (Shannon & Garwood, 1984).

4.1.2. CELULOSE

Características

A celulose é a macromolécula orgânica mais abundante da face da Terra, constituindo o principal componente da parede celular de células vegetais. Completamente insolúvel em água, esse polissacarídeo apresenta capacidade limitada de retenção hídrica sendo totalmente resistente à hidrólise no trato gastro-intestinal humano.

Fonte

A celulose pode ser obtida da parede celular de todas as células vegetais, bem como de algumas bactérias e alguns fungos. Porém, comercialmente, em virtude de sua principal aplicação (confecção de papel) as principais fontes são o eucalipto (*Eucalyptus grandis*) e espécies coníferas do gênero *Pinus*.



Figura 2: Fotografias das duas espécies utilizadas para a extração comercial da celulose. Na parte superior, um bosque de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) (A) com destaque para suas toras derrubadas em campo (B). Na parte inferior, um bosque de espécies do Gênero *Pinus* (C), outra fonte comercial para obtenção de celulose e, em (D) destaque para suas toras também expostas em campo que serão comercializadas para essa finalidade.

Estrutura

A celulose é um homopolissacarídeo formado por uma cadeia de unidades de glucose β -1,4 ligadas (van Poser, 2004).

Aplicações

Devido às ligações β -1,4 que agrupam os monômeros de glucose para formar a estrutura da celulose que, por sua vez, são altamente resistentes, a celulose atua no cólon humano como fibra insolúvel. Sendo assim, sua ação está envolvida também com o controle e regulação da motilidade do mesmo.

Além disso, esse polímero atua prevenindo câncer de cólon e no tratamento de constipação (Tharanathan, 2002).

Para atuar como espessante e estabilizante em alimentos, é necessário que a celulose seja convertida a uma forma solúvel em água (Bobbio & Bobbio, 1989). Assim, substituindo algumas hidroxilas da celulose por metilas, obtêm-se a metilcelulose. Da mesma forma, a substituição com grupamentos carboxílicos forma a carboximetilcelulose (Bobbio & Bobbio, 1992) e são estas celulosas quimicamente modificadas que atuam espessando, estabilizando e modificando as características de fluxos de suspensões no setor alimentício (Glicksman, 1982).

A carboximetilcelulose atua como agente de corpo em alimentos de baixas calorias. Em sorvetes, a mesma estabiliza a composição para controlar a formação de cristais de gelo, conferir corpo e controlar características de derretimento, fornecendo assim boa textura ao produto (Sanderson, 1981). Combinada com gelatina, pectina ou goma locusta, a carboximetilcelulose também atua como agente de volume em alimentos dietéticos (Bobbio & Bobbio, 1992).

Segundo van Poser (2004), no setor farmacêutico, é a mais importante matéria-prima, sendo empregada desde a confecção de compressas (gaze, algodão) até como adjuvantes na obtenção das mais variadas formas farmacêuticas (Lima Neto & Petrovick, 1997).

Certamente, a utilização comercial mais evidente deste polímero é na confecção de papel de todos os tipos, sendo, evidentemente, o principal componente deste produto.

4.1.3. HEMICELULOSES

Características

As hemiceluloses são homo ou heteropolissacarídeos extremamente complexos e quimicamente variáveis. Esses polissacarídeos não-pécticos e não-celulósicos são menos resistentes à hidrólise enzimática e são total ou parcialmente solúveis em água (Schneeman, 1986; Spiller, 1994).

Como exemplos destes polímeros, podem-se citar os arabinoxilanos, mananos, galactomananos, xiloglucanos (Manrique & Lajolo, 2001; Buckeridge & Tiné, 2001; Lima *et al.*, 2004; Lisboa *et al.*, 2006).

Fonte

Parede celular de células vegetais (Buckeridge *et al.*, 2008).

Estrutura

Não há uma estrutura em comum para estes polissacarídeos. Sua variedade química, normalmente está relacionada com a fonte a que pertence (Buckeridge *et al.*, 2008).

Cabe salientar aqui que há pelo menos dois grupos de hemiceluloses que são considerados polissacarídeos de reserva de parede celular, o grupo do xiloglucano, o grupo dos mananos cujas estruturas e propriedades serão explanadas logo adiante no item 4.1.4. (para maiores informações, ver *Teoria de transferência de função* em Buckeridge & Reid, 1996; Buckeridge *et al.*, 2000a; Buckeridge *et al.*, 2000b; Buckeridge *et al.*, 2000c; Buckeridge *et al.*, 2008).

Aplicações

Apesar de elevados investimentos, no campo industrial, pouco se conhece sobre as funções biotecnológicas das hemiceluloses. Mesmo assim, genericamente, pode-se dizer que são utilizadas como espessantes, estabilizadores e umectantes em formulações.

Especificamente no setor alimentício, atuam como adjuvantes, agentes de corpo em fibras de alimentos e em dietas hipocalóricas (Penna, 2002).

Farmacologicamente, tais polímeros vêm sendo investigados para utilização e vêm constituindo fortes candidatos para o tratamento de hiperglicemia e hipercolesterolemia (Schneeman, 1986; Spiller, 1994; Kazaoca *et al.*, 1997, De Paula *et al.*, 2005).

Na área de energia, as paredes celulares de resíduos vegetais vêm se tornando extremamente importantes para uso na produção de biocombustíveis. O Brasil está investindo fortemente para tentar obter a hidrólise enzimática das paredes celulares de cana, por exemplo, e, com os açúcares livres (produto dessa hidrólise enzimática), obter bioetanol por fermentação (Marques, 2008).

4.1.4. POLISSACARÍDEOS DE RESERVA DE PAREDE CELULAR

Características

Os polissacarídeos de reserva de parede celular são heteropolissacarídeos ácidos ou neutros cuja localização é em tecidos de reserva de sementes, predominantemente, as leguminosas. Nesses órgãos, fisiologicamente, em geral, atuam como retentores de água auxiliando com isso, a germinação.

Os polissacarídeos de reserva, portanto, são hemiceluloses e pectinas específicas de tecidos de reserva de sementes, polissacarídeos estes que, na parede celular, evoluíram para funções secundárias além da estrutural, ou seja, a reserva, o controle de embebição e a proteção mecânica (Buckeridge & Reid, 1996, Tonini *et al.*, 2006; Tonini *et al.*, 2007; Lisboa *et al.*, 2006, respectivamente). Foi exatamente por causa do desenvolvimento dessas funções secundárias (especificamente por desenvolverem, evolutivamente, a função de reserva) que tais polissacarídeos passaram a ser denominados polissacarídeos de reserva de parede celular. Eles podem ser extraídos em grandes quantidades das sementes que os acumulam (Buckeridge *et al.*, 2000b).

Sabe-se que eles, em sua maioria, são solúveis em água e formam dispersões viscosas e estáveis, absorvendo normalmente grande quantidade desse solvente que, além de se distribuir ao redor do embrião durante o processo de embebição e germinação das sementes, o protege contra a desidratação (Neukom, 1989; Buckeridge *et al.*, 2000b).

Fonte

Parede celular de células vegetais formadoras dos tecidos de reserva (cotilédone e endosperma) de sementes leguminosas (Buckeridge & Reid, 1996; Buckeridge *et al.*, 2000a; Buckeridge *et al.*, 2000b; Buckeridge *et al.*, 2000c; Buckeridge *et al.*, 2008). Comercialmente, os polissacarídeos desse grupo mais conhecidos são os obtidos de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus*, *Ceratona siliqua* (galactomanano, polissacarídeo do grupo dos mananos) e *Tamarindus indica* (xiloglucano).

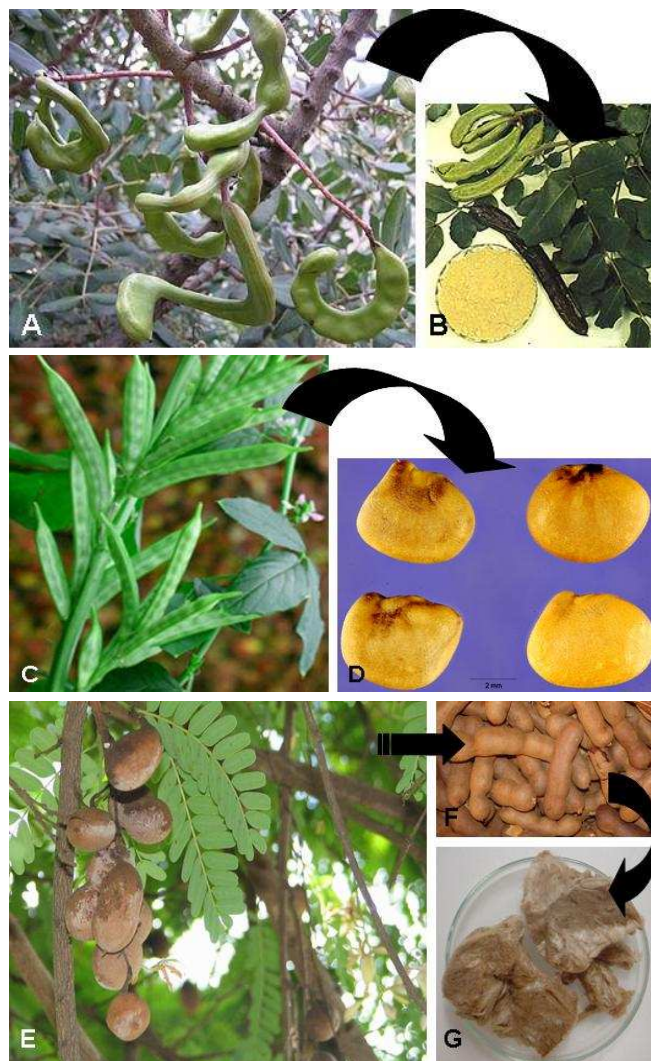


Figura 3: Fotografias de três espécies utilizadas para a extração comercial de polissacarídeos de reserva de sementes. As duas superiores utilizadas para extração comercial do galactomanano. Acima, a *Cyamopsis tetragonoloba* (A) utilizada para a produção do guar, com destaque para as vagens que contém as sementes acumuladoras do polissacarídeo e o polissacarídeo extraído seco (B). No meio, a *Ceratonia siliqua* (C), fonte comercial da caroba, locusta ou LBG, com destaque para as sementes acumuladoras do galactomanano (D). Abaixo, a *Tamarindus indica* (E), com destaque para os frutos (bagas) que contém as sementes que acumulam xiloglucano (F) e o xiloglucano extraído dos cotilédones dessas sementes (G).

Fontes: <http://www.floradecanarias.com/ceratoniasiliqua.html> (A), <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/carob.html> (B), <http://chezmarie.nuxit.net/plantes/guar.htm> (C), http://www.arsgrin.gov/npgs/images/sbml/Cyamopsis_tetragonoloba (D), <http://www.newbotany.com/TropickerastlinyTropicalplants/Tamarindusindica> (E), <http://www.arara.fr/BBTAMARINDO.html> (F), Foto: César Lisboa, UNICAMP (G).

Estrutura

Não há uma estrutura em comum para estes polissacarídeos, sua variedade química, conforme citado, normalmente está relacionada com a fonte a que pertence. Sendo assim, o tópico se limita a descrever a estrutura dos dois polissacarídeos de reserva mais conhecidas e utilizadas industrialmente, ou seja, o galactomanano (do grupo dos mananos) e o xiloglucano (citadas acima).

Os galactomananos são formados por uma cadeia linear de unidades de manose unidas por ligações glicosídicas β ,1-4, à qual unidades de galactose estão unidas por ligações do tipo α ,1-6 (Moe *et al.*, 1947; Unrau, 1961; Somme, 1968; Manzi & Cerezo, 1984).

Em relação ao xiloglucano, estruturalmente, ele é formado por um esqueleto central de celulose onde unidades de glucose aparecem ligadas entre si através de ligações glicosídicas tipo β ,1-4, podendo conter, nas ramificações laterais, unidades de xilose, xilosil- β ,1-2-galactose e xilosil- β ,1-2-galactosil- α ,1-2-fucose (Kooiman, 1961; York *et al.*, 1990; McCann & Roberts, 1991; Buckeridge *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 1998); todos estes tipos substituintes ligam-se às glucoses da cadeia principal através de ligações α ,1-6.

Aplicações

Muitas sementes de leguminosas contêm galactomananos com estrutura semelhante, mas somente o guar (nome comercial do galactomanano extraído da *Cyamopsis tetragonolobus*) e a locusta (também conhecida como “goma” caroba ou LBG – do inglês *Locust Bean Gum* – principais nomes comerciais do galactomanano extraído da *Ceratonia siliqua*) têm sido usadas extensivamente na indústria (Tharanathan, 1987). Ambos produzem, em meio aquoso, soluções

extremamente viscosas em baixas concentrações sendo assim utilizados em aplicações onde se deseja conferir à formulação: espessamento, estabilidade, retenção aquosa ou interação entre polímeros para modificação de propriedades de géis (Neukom, 1989; Willians *et al.*, 1991; Fernandes *et al.*, 1992). Sendo assim, as soluções viscosas que formam são claramente o foco de suas aplicações industriais (Edwards *et al.*, 2002).

Considerando suas aplicações, historicamente, é interessante citar que sua utilização é bem antiga, sendo, inclusive, utilizadas por povos antigos (egípcios, por exemplo) para unir bandagens de linho no processo de mumificação (Buckeridge *et al.*, 2000a).

De uma maneira geral, pode-se dizer que os galactomananos modificam o comportamento da água. Especialmente em alimentos, diminuem a fricção entre componentes de formulação, auxiliando no processo de palatabilidade. Eles também auxiliam no controle de cristalização de soluções saturadas de açúcar e impedem a formação de gelo em sorvetes de massa (Herald, 1986).

A primeira, comercialmente conhecida como “goma” guar, que tem efeito emoliente semelhante a óleos hidratantes, efeito de hidratação e formação de filme na pele (impede perda d’água transepidérmica), promove reparo de cutícula capilar e celular (diminui descamação epidérmica) (Pauly *et al.*, 1999). Neste sentido é utilizada em produtos cosméticos para a pele e cabelo.

O guar não forma gel, mas interage sinergisticamente com a goma xantana fornecendo aumento de viscosidade às soluções e formulações. Quando adicionado em mistura com polissacarídeos geleificantes como o ágar e a carragena, por exemplo, pode aumentar a força do gel e modificar sua estrutura (Rees, 1969; Kovacs, 1973; Sprenger, 1990).

Além disso, o guar não é desfavoravelmente afetado por pHs baixos (Glicksman, 1962), sendo efetivo em produtos ácidos como cremes cosméticos de efeito tensoativo e condicionadores para cabelos.

Em produtos laticínios, como queijos processados, fornece uma textura macia e reduz a sinerese. Ainda no setor alimentício, é muito eficiente para reter água em carnes, rações e glacês (Sprenger, 1990).

A segunda é conhecida comercialmente como “goma” LBG, locusta ou “goma” caroba, diferindo do guar pelo menor número de ramificações (Buckeridge *et al.*, 2000a). Nesse contexto, a porcentagem e distribuição das unidades de galactose na cadeia central de manose influenciam suas propriedades físicas (Whitney *et al.*, 1998).

A locusta é insolúvel em água fria, o que a torna, no setor alimentício, excelente estabilizante para sorvetes (Herald, 1986). Também atua diminuindo a assimilação de nutrientes, pois quando administrada na alimentação, funciona como um adjuvante de dietas hipocalóricas, uma vez que acaba formando um filme sobre o alimento ingerido, dificultando sua hidrólise e posterior absorção no organismo.

A caroba é classicamente usada na indústria de alimentos como espessante, estabilizador e agente geleificante quando combinada com outros polissacarídeos (Dea & Morrison, 1975, Reid & Edwards, 1995) em especial, a xantana com a qual acaba formando um gel binário quando a mistura é aquecida até 95° C, temperatura necessária para a desnaturação da estrutura helicoidal da xantana (Cairns *et al.*, 1986). Neste enfoque, a razão manose:galactose é também extremamente importante como fator comercial, sendo que seu baixo nível de ramificação (cerca de 3,8:1 na razão manose:galactose) (Buckeridge *et al.*, 2000a) favorece misturas ou interações comerciais com outros polímeros (Dea *et al.*, 1977).

Ainda nesse contexto, como o guar, a caroba não forma gel sozinha, mas pode atingir a propriedade de geleificação quando combinada com a xantana (Kovacs, 1973).

Outro polissacarídeo de reserva de parede celular é característico de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*), copaíba (*Copaifera* sp) e tamarindo (*Tamarindus indica*) é o xiloglucano. Comercialmente, existe registro da utilização do xiloglucano extraído de tamarindo, apenas. Em relação a este, descobriu-se recentemente que possui propriedade de atuar como agente estimulante de imunossupressão no tecido epitelial (Mansell, 1994; Pauly *et al.*, 1999), mecanismo este que vem sendo estudado desde a primeira proposição para o seu controle (1987) para glicosaminoglicanos por Gordon e colaboradores. Essa propriedade vem sendo explorada no setor cosmético para confecção de cremes com efeitos tensoativo e de restauração celular.

Mesmo com tais estudos e aplicações atuais, a utilização do xiloglucano de tamarindo não é recente. Assim, o polissacarídeo da semente do tamarindo (xiloglucano) possui aplicação no setor têxtil na confecção de roupas de *cotton*. No setor papeleiro, mesmo não tão efetivo quanto o amido e o galactomanano (resultados não publicados), é utilizado em suspensões celulósicas para fornecer melhoria de rendimento e resistência à folha formada (Lima *et al.*, 2003). Esse polissacarídeo é ainda utilizado na fabricação de explosivos e como agente de textura e de incremento de viscosidade em formulações a base de látex (Panda, 2001).

4.1.5. PECTINAS

Características

As pectinas são macromoléculas glicídicas com pesos moleculares que variam de 50 kDa até 150 kDa (Chourasia & Jain, 2004) constituintes da parede celular e da lamela média dos tecidos vegetais. São heteropolissacarídeos altamente solúveis em água, porém tendem a formar soluções menos viscosas que os demais hidrocolóides.

Por definição, podem ser considerados polissacarídeos ácidos também constituintes da parede celular (Buckeridge *et al.*, 2008).

Fonte

As pectinas são encontradas em abundância nos frutos cítricos. Dos alimentos humanos, alguns podem ser caracterizados por serem especialmente ricos em pectinas como, por exemplo, a laranja, a maçã e a cebola (Buckeridge & Tiné, 2001).

As pectinas são também abundantes no café, sendo este provavelmente uma das fontes de mais larga ocorrência e comercialização existentes (Martins *et al.*, 2005).

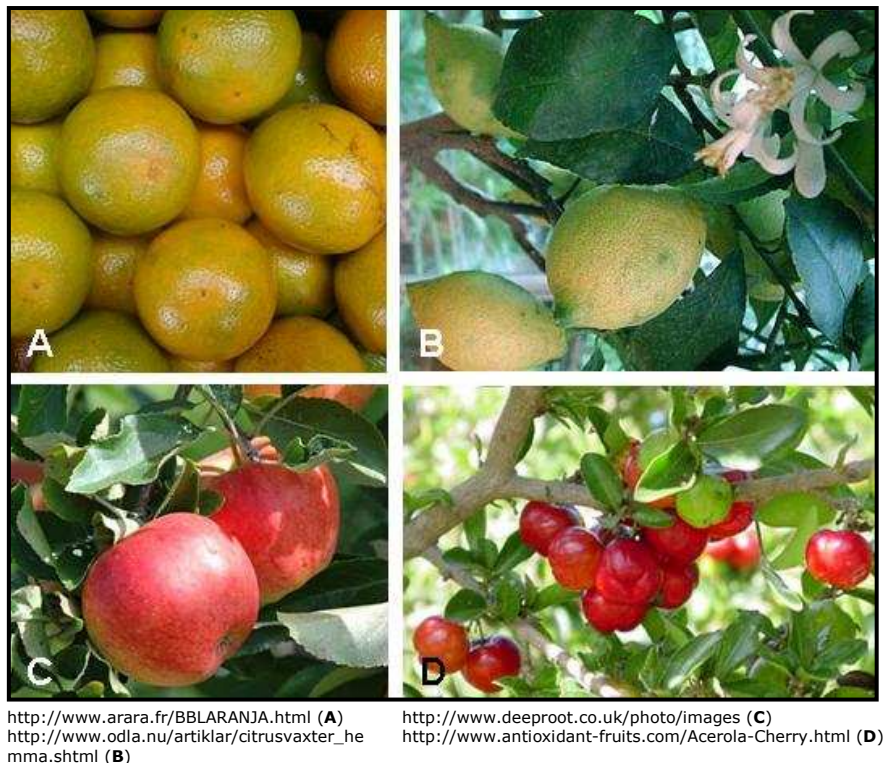


Figura 4: Fotografias de quatro espécies que constituem fontes de polissacarídeos do tipo pectina: a laranja (*Citrus sinensis*) (A), o limão (*Citrus limon*) (B), a maçã (*Malus domestica*) (C) e a acerola (*Malpighia glabra* L.) (D). Das quatro espécies destacadas, com exceção da maçã (C), todos são considerados frutos cítricos.

Estrutura

Estruturalmente, as pectinas são polímeros ricos em ácido galacturônico, com intercalações de ramnose no esqueleto central e ramificações com galactose, arabinose e até manose (Pausen, 2001; Chourasia & Jain, 2004, Buckeridge *et al.*, 2008).

Dependendo da fonte que derivam, as pectinas apresentam diferentes graus de metilesteres substituintes (Towle & Christensen, 1973). Diferentes tipos de polissacarídeos compõem o chamado domínio péctico da parede celular, podendo ser considerados assim, tipos de pectinas. Como exemplo destes, cita-se o ramnogalacturonano, o ácido poligalacturônico, o arabinano e o arabinogalactano [para uma revisão do

detalhe de suas estruturas químicas, ver Pausen ou Buckeridge & Tiné (2001)], porém o primeiro (ramnogalacturonano) pode ser considerado como a cadeia principal das pectinas (Buckeridge & Tiné, 2001).

Aplicações

Em relação as suas aplicações atuam como geleificantes de formulações alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. Além disso, funcionam como reguladores intestinais influenciando absorção de micro e macro nutrientes e mantendo o funcionamento adequado do trato gastro-intestinal (Tharanathan, 2002).

Especificamente no setor farmacêutico, as pectinas atuam como excelentes agentes hipocolesterolêmicos devido a sua habilidade de se ligar ao colesterol (LDL), o que seria importante no tratamento de hipercolesterolemia (Kritchevsky & Story, 1974) e, também, como agentes hipoglicemiantes.

Segundo Chourasia & Jain (2004) as pectinas também podem funcionar como carreadores de fármacos de liberação específica no cólon intestinal, atuando, como o dextrano, em *delivery systems*. Porém, devido ao fato das pectinas serem extremamente hidrofílicas, quando utilizadas isoladamente, na interação com o fármaco, não demonstram efetividade nesta aplicação, uma vez que rapidamente se dissolvem nos líquidos gastro-intestinais, liberando o fármaco antes do alvo e este, por sua vez, acaba sendo degradado química ou enzimaticamente. Mesmo assim, a pectina possui esta aplicação farmacológica e, para a resolução deste “problema” tal polímero pode ser associado ao fármaco ou à droga na presença de aditivos (Rubinstein *et al.*, 1990; Rubinstein & Radai, 1991) e estes, normalmente são polímeros hidrofóbicos como a celulose.

Voltando ao setor alimentício, segundo Penna (2002) a pectina é amplamente utilizada como espessante em iogurtes de frutas, apresentando certas vantagens de utilização em relação a outros hidrocolóides: a textura da base permanece inalterada durante armazenagem (não ocorre sinérese), ela impede a flotação e a separação dos pedaços de frutas da base e, finalmente, esta última, pode ser facilmente incorporada no iogurte na presença deste polímero (Bobbio & Bobbio, 1992; Furtado, 1997).

Ainda assim, convém salientar que, quando ingeridas, em virtude das pectinas apresentarem grupos carboxílicos livres nas unidades de ácido urônico que constituem a molécula, elas podem comprometer a absorção de micronutrientes no trato gastro-intestinal humano, como o zinco, por exemplo (James *et al.*, 1978; Robertson *et al.*, 1979). Esses grupos carboxílicos possuem a capacidade de se ligar a metais pesados e, neste contexto, tal propriedade não é considerada um benefício (Tharanathan, 2002).

A Tabela 4 resume as principais classes de polissacarídeos de plantas superiores que têm utilização industrial. São mostradas, em alguns casos suas composições em monossacarídeos, fontes biológicas principais, aplicações principais e algumas referências bibliográficas.

Tabela 4: Principais polissacarídeos de plantas superiores e o resumo de suas aplicações bionotecnológicas

Nome	Constituição	Fonte Biológica	Aplicações	Referências
Amido	glucose	Milho, batata, mandioca, trigo, arroz	Aditivos em papéis, tratamento de câncer de mama e <i>Diabetes</i>	Shannon & Garwood, 1984; Spiller, 1994; Valdeirão & Janson, 1996 etc.
Celulose	glucose	parede celular de plantas e fungos	Reguladores intestinais e prevenção de câncer de cólon	Tharanathan 2002.
Hemiceluloses	variada (depende da fonte)	parede celular de plantas e fungos	espaçantes, estabilizadores, umectantes	Van Poser, 2004.
Polissacarídeos de Reserva	variada (depende da fonte)	sementes de leguminosas	espaçantes, estabilizadores, geleificantes, hidratante em pele, restaurador capilar, imunoestimulante, anti-viral, anti-bacteriana, laxativo, proteção contra radiação solar	Mandal & Das, 1980; Mansell, 1994; Pauly <i>et al.</i> , 1999 Ni <i>et al.</i> , 2004 etc.
Pectinas	ácido galacturônico, ramnose, galactose, arabinose, manose	Frutos cítricos	Geleificantes, reguladores intestinais, hipercolesterolemia, <i>delivery systems</i>	Kritchevsky & Story, 1974; James <i>et al.</i> , 1978; Robertson <i>et al.</i> , 1979; Tharanathan 2002 etc.

JUSTIFICATIVA

Conforme detalhadamente descrito, a importância biotecnológica dos polímeros naturais é indiscutível. De todos os polímeros naturais conhecidos, destaca-se a categoria dos polissacarídeos de plantas superiores (conforme definido). Esses últimos, cujas aplicações industriais já são bem conhecidas, vêm sendo utilizados há muito tempo, porém, resta saber se, do ponto de vista sócio-ambiental, seus respectivos processos de obtenção podem ser considerados compatíveis e, em complemento, se os mesmos podem ser prospectados para diversos e diferentes setores.

Nesse contexto, a percepção das grandes corporações atualmente excede a mera aplicabilidade da matéria-prima e/ou insumo a ser investigado. Tendencialmente parece ser possível também detectar preocupações corporativas em relação às variáveis ambientais e sociais, de seus processos produtivos. Isto parece ter forçado a seleção de um mecanismo de gestão interna que, não vise exclusivamente o lucro da matéria prima e/ou insumo que se produz em larga escala, mas um mecanismo que considere o impacto sócio-ambiental da tecnologia de produção (seja ele privado ou estatal). Nesse ponto, tecnologia de produção limpa, análise do impacto das tecnologias disponibilizadas, preocupação com todas as etapas do ciclo de produção do produto, vegetalização de fórmulas, substituição de matérias primas não renováveis, certificações normativas e partição de benefícios, são apenas alguns dos mecanismos que têm significativamente impactado no perfil produtivo as grandes companhias. Cabe citar que, parte das características desses mecanismos citados serão descritas adiante no item discussão.

Assim, define-se que é exatamente sob esse aspecto que a presente tese foi desenvolvida. Ou seja, mais que a análise e a discussão do

potencial biotecnológico e a sugestão de aplicações industriais dos polissacarídeos aqui estudados para diferentes setores; nossas discussões procuraram ensaiar, de forma generalizada, sobre a possibilidade de produção dessas matérias primas acerca das posturas corporativas atuais que as empresas “sócio-ambientalmente comprometidas” parecem estar adotando nesse milênio.

Desta forma, na definição do plano-diretriz dessa tese, estudou-se inicialmente às características físico-químicas de diferentes polissacarídeos a fim de utilizá-las para aplicação industrial de três diferentes setores: o farmocosmético, o alimentício e o de papel e celulose; para, em seguida, vislumbrar novas perspectivas de produção desses diferentes polímeros visando um foco sustentável. Isto é, a possibilidade de atendimento da demanda industrial sem, contudo, desconsiderar as variáveis ambientais e sociais envolvidas nas supostas cadeias produtivas caso tais insumos prospectados venham a ser produzidos em larga escala.

OBJETIVOS

Esse trabalho teve baseado na justificativa descrita, portanto, tais objetivos:

- 1) Estudar as características visco-reométricas do galactomanano de *Dimorphandra mollis*, bem como o seu potencial para o uso nos setores farmoscósmetico, alimentício e de papel e celulose.
- 2) Avaliar o potencial de utilização e modificação do xiloglucano de *Hymenaea corbaril* em formulações farmocsméticas.
- 3) Avaliar o potencial biotecnológico de polissacarídeos de reserva de parede celular de sementes como aditivos para o incremento das propriedades físicas do papel.
- 4) Avaliar o potencial biotecnológico de hemiceluloses de parede celular primária de sementes e plântulas de eucalipto como aditivos para o incremento das propriedades físicas do papel.
- 5) Avaliar o potencial biotecnológico de polissacarídeos exsudados de cultura de células como aditivos para o incremento das propriedades físicas do papel.
- 6) Refletir sobre as possibilidades ecologicamente adequadas e socialmente justas para a produção de polissacarídeos de plantas superiores em nível industrial.

ARTIGO 1

"Química Nova (em formato para submeter)"

ESTUDO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO, CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE GEL, POTENCIAL DE INTERAÇÃO COM CELULOSE E TOXICIDADE DO GALACTOMANANO DE SEMENTES DE FAVEIRO (*Dimorphandra mollis*).

PROSPECÇÃO DA UTILIZAÇÃO GALACTOMANANO DE SEMENTES DE FAVEIRO (*Dimorphandra mollis*) NAS GRANDES INDÚSTRIAS

César Gustavo Serafim Lisboa¹, Valéria Regina Panegassi², Gil Eduardo Serra² e Marcos Silveira Buckeridge³

1 Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural - UNICAMP

2 Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP -

3 Departamento de Botânica, Instituto de Biociências - USP

TECHNOLOGICAL POTENTIAL FOR USING GALACTOMANNAN OF SEEDS OF FAVEIRO (*Dimorphandra mollis*)

ABSTRACT

In order to obtain a purified polysaccharide, seeds of faveiro (*Dimorphandra mollis*) were imbibed in NaOH 5% solution at 100°C for 20 minutes. The result was the isolation of the endosperm from the coat and embryo tissues. Samples from the same fraction were analysed in a HAAKE RV20 rheometer, with variation of the concentration of galactomannan dispersed in water, temperature, pH and NaCl, demonstrating that the sample had a non-newtonian pseudoplastic behavior. From these analyses, the stability of viscosity was observed in the presence of NaCl and pH varying from 4.0 to 7.0. The viscosity decreased in higher temperatures. The sample was also mixed with xanthan (1:1) for the observation of gel formation. The same mixture showed a significant increase in viscosity, when compared to the viscosity shown by the dispersions of the polysaccharides separately. The extracted galactomannan can also interact with suspending cellulose and paper pumps, showing some potential application to increase the paper resistance by the addition of this polymer in paper kraft. The utilization of galactomannan of *D. mollis* in the cosmetic sector was also prospected by testing its photo and cytotoxicology *in vitro* using rat fibroblasts.

Key words: galactomannan; food; paper.

INTRODUÇÃO

Os galactomananos de sementes têm sido utilizados abundantemente na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética e as fontes de galactomanano comerciais mais conhecidas são guar, (*Cyamopsis tetragonolobus*), a locusta, (*Ceratonia siliqua*) e a tara (*Caesalpinia spinosa*). Na indústria de alimentos, os polissacarídeos mais utilizados são o guar e a locusta, sendo que, no setor farmacêutico e cosmético, apenas o guar é o mais comumente utilizado^{1,2}. No setor de papel e celulose, após os trabalhos de Whitney e colaboradores (1998)³ sobre interação de polissacarídeos do grupo dos mananos (para uma revisão ver Buckeridge⁴) com celulose bacteriana, a utilização do galactomanano e outros polissacarídeos de reserva de sementes nesse setor, vêm sendo apenas prospectada. Tal prospecção parece apenas objetivar, por enquanto, à tentativa de substituição de aditivos químicos para o aumento de resistência de folhas de papel e de outros derivados celulósicos de uso comercial^{5,6,7}.

Apesar de confirmado (desde 1978⁸) a capacidade de interação dos galactomananos com a celulose por suas respectivas cadeias centrais através de pontes de hidrogênio, os galactomananos citados, devido as suas estruturas ramificadas, também formam dispersões bastante viscosas. As unidades de galactose ligadas à cadeia principal de manose que correspondem a sua estrutura fina^{9,10}, dificultam a aproximação de moléculas de outros polissacarídeos, evitando sua agregação quando interagidos. Isso torna o galactomanano muito estável e apropriado para muitas aplicações industriais¹¹. Em alguns casos, esses polímeros são utilizados com outros polissacarídeos como a xantana ou carragenana, para formar gel. Sabe-se que quanto menos ramificado é o

galactomanano, maior o sinergismo entre as moléculas de polissacarídeos¹².

A capacidade de se ligar à água, o elevado potencial espessante, a estabilidade das soluções, a capacidade de interagir, sem formar agregados insolúveis com outros polímeros e a de, na presença de outros polissacarídeos, formar gel, são os principais motivos pelos quais os galactomananos são utilizados na indústria de alimentos^{12,13,14}. Nos setores cosmético e farmacêutico, além do aproveitamento das características citadas acima, também são exploradas as suas propriedades biológicas sobre a fisiologia de seres humanos e animais^{1,15}, dentre elas: o potencial pré-biótico, o efeito sobre a imunossupressão da pele, a hidratação e a restauração de estratos epidermais. Geralmente os galactomananos são utilizados nas formulações alimentares, farmacêuticas e cosméticas em concentrações que não excedem a 1% do produto final¹⁶. No setor de papel e celulose, sua utilização ainda carece de estudos comparativos e análise de custo benefício em relação ao amido de milho e ao amido modificado, que são os principais aditivos utilizados na confecção de pastas celulósicas, antes da projeção de uma suposta substituição.

Por serem neutros, os galactomananos geralmente são estáveis a variações de pH entre 4,0 e 8,0 e suas propriedades físico-químicas parecem não ser afetadas pela presença de sais e/ou outros açúcares de pequeno peso nas formulações¹⁷. Os galactomananos modificam o comportamento da água nos alimentos e diminuem a fricção entre seus componentes auxiliando também, no processamento e palatabilidade, no controle de cristalização de soluções saturadas de açúcar e impedindo a formação de cristais de gelo em sorvetes¹⁸.

Em formulações cosméticas, os galactomananos apresentam efeito emoliente (semelhante a óleos hidratantes), efeito de hidratação e

formação de filme na pele (impedimento a perda de água transepidérmica) e também promovem reparo da cutícula capilar e celular (diminuição de descamação epidérmica)¹. Mais especificamente, estudos recentes têm mostrado que o galactomanano pode vir a constituir uma alternativa para a substituição do ácido retinóico que, por sua vez é utilizado no reparo de danos epiteliais oriundos de mecanismos relacionados ao foto-envelhecimento. Jouandeaud¹⁹ e colaboradores constataram, em 2004, pela primeira vez, a sua ação benéfica de fragmentos de galactomanano na fisiologia e metabolismo da pele.

A solubilidade do galactomanano depende do número de unidades de galactose ligadas à cadeia principal de manose. O guar, por exemplo, é disperso em água fria, a tara é intermediária e a locusta só é totalmente dispersa em água quente, ou em água fria, mediante a um elevado tempo de cisalhamento. Os galactomananos, como outros hidrocolóides, são insolúveis em solventes orgânicos e podem ser precipitados em água com adição de etanol¹².

Na última década, galactomananos vêm sendo detectados em grande quantidade e apresentando composições variáveis em sementes de espécies nativas brasileiras^{20,21,22}. Algumas destas espécies tais como *Sesbania virgata* (sinonímia *S. marginata*)^{9,10} e *Dimorphandra mollis*²³ vêm sendo estudadas quanto aos aspectos metabólicos. A *D. mollis* apresenta altos teores de galactomanano nas sementes (cerca de 50% do peso seco) e estudos recentes indicam a possibilidade da extração seca da goma com um rendimento de cerca de 80%²⁴.

Os resultados com fibroblastos 3T3 (*in vitro*) aqui apresentados demonstram que o galactomanano do faveiro é fisiologicamente atóxico, o que permite aos autores sugerir que este polímero também apresenta potencial para aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética e de

alimentos. Além disso, o presente trabalho salienta seu potencial de utilização nestes setores através de detalhado estudo reológico e de formação de gel comparado aos polissacarídeos de utilização clássica para fins de espessamento como a xantana, locusta e o guar e, por fim, prospecta sua utilização no setor papaleiro através de prévio estudo de interação com celulose e pastas derivadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização reológica do Galactomanano

Os dados obtidos referem-se à amostra de galactomanano de *D. mollis* e guar. A amostra de *D. mollis* refere-se à da fração retida em peneira com 420µm de abertura e proveniente de sementes sem casca pela remoção com solução de hidróxido de sódio 5%²⁴.

Efeito da concentração de galactomanano

As determinações de viscosidade aparente foram realizadas a 25°C, na amostra de guar (**Figura 1A**) e na amostra de galactomanano de faveiro (**Figura 1B**). Cabe salientar que a amostra de guar foi utilizada como referência comparativa, uma vez que também se trata de um galactomanano, porém, com diferenças estruturais em sua constituição e uso comercial.

Tais resultados são apresentados nas **Figuras 1A e 1B** em função da variação da concentração de polissacarídeo, onde se pode observar que as viscosidades aparentes dos dois galactomananos testados, apresentam uma redução com o aumento da taxa de deformação. Considerando particularidades da aferição (aparelho e método), tanto para o guar (**Figura 1A**) quanto para o galactomanano de faveiro (**Figura 1B**),

diferenças significativas na viscosidade aparente, que decai de maneira exponencial em função do aumento da taxa de deformação, começam a ser observadas a partir da concentração de 1,5%.

Para o galactomanano de faveiro, quedas exponenciais mais acentuadas são observadas nas concentrações de 2,5 e 3%, sendo que o perfil das quedas plotadas (**Figura 1B**) é muito semelhante nas concentrações 1,5 e 2% e também entre as concentrações 2,5 e 3%. Nessas concentrações, o valor máximo observado com o mínimo de taxa de deformação adotada para 1,5 e 2% foi de 3027 e 3518,3 cP (respectivamente), e para as concentrações de 2,5 e 3%, tal valor aumenta para 9700 e 11563 cP (respectivamente).

Também se pode observar que, apesar do perfil exponencial das quedas, a força aplicada nas amostras, em especial nas de concentrações 2,5 e 3%, não foi suficiente para atingir um mínimo de detecção da viscosidade aparente como foi possível detectar com o guar (**Figura 1A**) a partir de cerca de 60 (s^{-1}) de taxa de deformação.

Para um maior efeito comparativo (dose-resposta) entre os dois galactomananos, estipulou-se uma taxa de deformação ($100 s^{-1}$) e, na **Figura 2**, pode-se observar as curvas de viscosidade aparente em função da concentração dos mesmos. Novamente, mesmo com taxa de deformação fixa, aumentos consideráveis na viscosidade (cP) são detectados a partir de 1,5% de concentração.

Conforme a figura, em uma concentração de 1% e taxa de deformação igual a 100s^{-1} , o galactomanano de *D. mollis* apresentou viscosidade aparente de 199cP e o guar 334cP. Em concentrações até 2,5%, a viscosidades aparentes dos dois galactomananos são bem próximas, sendo que, acima desta concentração o guar tende a apresentar viscosidade muito mais elevada (**Figura 2**).

Para os setores industriais de cosmética, alimentos e, até mesmo o farmacêutico; os estudos reológicos de hidrocolóides são de suma importância; uma vez que auxiliam o entendimento de suas naturezas físico-químicas resultando na detecção de precoces instabilidades de formulações caso os mesmos venham a ser adicionados em um produto final. Assim, na análise de um reograma, o aspecto de interesse primordial nas projeções de estabilidade é a mínima alteração desse comportamento em condições comparáveis de temperatura, pH, tensão de cisalhamento etc.

Nesse contexto, os resultados expressos nas **Figuras 1A e 1B** permitiram concluir que ambos os galactomananos de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) e de *Dimorphandra mollis* apresentam um comportamento não-newtoniano pseudoplástico, uma vez que, com o aumento da força aplicada (taxa de deformação) a viscosidade diminuiu em relação à viscosidade inicial. De acordo com Dahms, 1996²⁵, tal característica, por exemplo, é interessante para produtos cosméticos, pois, permite um espalhamento adequado e uma melhor cobertura da pele; sendo, quase sempre, um requisito para as formulações desse setor.

Para os dois galactomananos analisados, principalmente a partir da concentração de 1,5%, o perfil exponencial das quedas viscosimétricas detectadas indicam um comportamento tixotrópico, uma vez que a viscosidade diminui proporcionalmente em relação à taxa de deformação

aplicada. Reid & Edwards (1995)²⁶ afirmam que a locusta possui as mesmas características e tal comportamento reológico também pode ser sustentado para o guar em outros trabalhos sobre as mesmas condições de ensaio²⁷.

Efeito da variação de pH

Para o galactomanano de faveiro, a viscosidade aparente detectada em função de uma curva de pH apresentou um platô mais elevado (cerca de 180cP) entre os pHs 4,0 e 7,0. Em pH baixo, de 4,0 e 2,5 a viscosidade é decrescente; sendo que, nos pHs mais elevados, entre pH 7,0 e 9,0, ela oscila entre 160 -170cP (**Figura 3**).

Na **Figura 3** o patamar detectado entre os pHs 4,0 e 7,0, demonstra relativa semelhança ao observado com galactomanano de *Sesbania aculeata*²⁸. O galactomanano dessa espécie também apresenta valores de viscosidade mais altos em pHs entre 3,0 e 8,0 quando analisado à taxa de deformação de $97,41s^{-1}$. Assim, com um pouco mais de tolerância tanto à acidez quanto à alcalinidade, a viscosidade do galactomanano de *S. aculeata* também permaneceu elevada em uma longa faixa (platô) assim como o de *Dimorphandra mollis* aqui estudado. Os menores valores de viscosidade para *S. aculeata* também foram encontrados abaixo de pH 3,0, ou seja, no extremo ácido da faixa adotada.

A variação de viscosidade em diferentes valores de pH pode ser atribuída à comum dificuldade dos hidrocolóides de se dispersarem em meios muito ácidos ou básicos. Mesmo assim, Carlson e co-autores (1962)²⁹, trabalhando com guar, verificaram que a viscosidade do polissacarídeo é maior quando o polímero é hidratado pelo menos 2h antes de acertar o pH. Os dados foram comparados com 1h e com 15min de hidratação prévia do polissacarídeo e os resultados indicaram que quanto

maior o tempo de hidratação, maior a viscosidade da dispersão. Estas observações confirmam a estabilidade do galactomanano em pH variável, pois o polissacarídeo foi hidratado em pHs previamente ajustados em soluções tampões com o objetivo de realizar os ensaios nas faixas de pH descritos.

A estabilidade da viscosidade do galactomanano com a variação de pH é esperada, uma vez que este polissacarídeo é neutro. A tolerância da viscosidade do galactomanano de faveiro a uma longa faixa de pH (observada na **Figura 3**) é uma característica muito importante, pois demonstra que, se o mesmo fosse um espessante comercial, poderia tolerar os diferentes pHs nas mais distintas formulações, ampliando as categorias de produtos derivados de tais formulações. Nesse ponto se conclui que as análises realizadas com a variação de pH podem fornecer informações importantes para a manipulação de alimentos e formulações cosméticas, por exemplo.

Efeito da variação da temperatura

Os resultados representados na **Figura 4** revelam que a viscosidade aparente do galactomanano de faveiro decresce consideravelmente quando a temperatura aumenta de 20 para 80°C.

No entanto, podemos observar que a viscosidade diminui lentamente entre 20 e 50°C, sendo que, a partir desta temperatura (50° C), decresce com maior intensidade encontrando seus menores valores quando chega a 70 e 80°C. A 20°C a viscosidade observada é de 208cP, e atinge 160, 89 e 61cP a 50, 70 e 80°C, respectivamente (**Figura 4**).

Essa redução da viscosidade da dispersão do galactomanano observada, pode ser atribuída à hidrólise térmica da molécula de polissacarídeo durante o aquecimento, e/ou, com o aumento da energia

cinética entre as moléculas, à diminuição da resistência à taxa de deformação (força) aplicada à dispersão.

A viscosidade da dispersão do guar também decai consideravelmente com o aumento da temperatura^{29,30}, mas em relação ao efeito da temperatura sobre a viscosidade de outros polímeros utilizados para os mesmos fins em diversas formulações, ela é tão discreta que os formuladores a consideram estável.

Diferentemente do galactomanano de faveiro, quando o galactomanano de *S. aculeata* é disperso a 1%, à taxa de deformação de $97,41\text{s}^{-1}$, sua viscosidade diminui pouco entre as temperaturas de 40 e 60°C. No entanto, como o galactomanano de *D. mollis* (**Figura 4**), a partir de 60°C, o decréscimo é bem acentuado²⁸.

Efeito da adição de NaCl

Conforme citado, para o estudo da variação da viscosidade do galactomanano de faveiro em função de uma concentração eletrolítica (dose-resposta), adicionou-se NaCl comercial à amostra do mesmo.

De acordo com a **Figura 5**, até 5% de adição de NaCl não há variação na viscosidade. Porém, com a adição de 5-15% desse sal, a viscosidade se reduz e começa a aumentar novamente a partir de 15% chegando a quase retornar à concentração inicial com 25% de adição deste.

O fato da viscosidade do galactomanano de faveiro tender a aumentar a partir da adição de 15% de NaCl, demonstra considerável tolerância eletrolítica. Os resultados desse experimento corroboram, mais uma vez aqueles descritos para o guar²⁹, cujo aumento de viscosidade em função da adição desse sal também evidencia a tolerância eletrolítica de suas dispersões.

Não foi preciso estudar a resposta da amostra em concentrações superiores a 25% de NaCl, uma vez que tal concentração nunca será reproduzida em qualquer que seja a formulação industrial.

Interação galactomanano:xantana para formação de gel

Escolheu-se para este estudo de interação, a xantana devido a sua conhecida capacidade de formar gel em associação com outros polímeros e seu extenso uso no setor cosmético e farmacêutico^{14,31}. E, para o conhecimento do desempenho do galactomanano de faveiro em relação a esse parâmetro, utilizou-se também, para fins comparativos, os galactomananos comerciais: guar e locusta.

Nesse contexto, parâmetros como a fracturabilidade, dureza e adesividade, resultantes da interação da galactomanano:xantana, foram plotados em função da proporção dos dois hidrocolóides na mistura (**Tabela 1**) para a formação de gel.

Quando a proporção entre galactomanano de *D. mollis* e xantana foi igual a 100:0 (respectivamente), ou seja, quando o galactomanano estava isolado, não foi observada resistência à penetração da sonda. Ao adicionar xantana ao galactomanano, quando a proporção entre eles é 75:25, a fracturabilidade observada foi de 89,2g. Na mesma **Tabela** observa-se que o máximo de fracturabilidade (118g) e, conseqüentemente de dureza do gel formado (98,5g), são obtidos quando a proporção entre galactomanano de *D. mollis*:xantana é de 50:50. Esses resultados corroboram com dados observados por Kovacs (1973)³¹, Sprenger (1990)³², Williams (1991)¹⁴ e Fernandes (1994)³³, cujos respectivos trabalhos também envolveram a associação dos mesmos tipos de polímeros (galactomanano e xantana), porém, com diferença da fonte de galactomanano utilizada.

Quando a proporção entre os dois polissacarídeos passou a ser 25:75 (galactomanano:xantana, respectivamente), o valor apresentou novo decréscimo, tanto para fracturabilidade (69,2g) quanto para dureza (58,9g) . Também foi obtida a fracturabilidade da xantana isolada, que demonstrou ser mínima, ou seja, 24,7g. Tal valor evidencia ainda mais a necessidade de associação dos dois polissacarídeos para detectar aumento de resistência à sonda durante o experimento.

Na **Tabela 2** pode-se observar a fracturabilidade obtida a partir do galactomanano de *D. mollis*, guar e locusta em interação com a xantana. Nessa **Tabela**, os resultados de fracturabilidade e dureza a partir da interação entre galactomanano de *D. mollis* e xantana (118 e 98,5g, respectivamente) mostraram-se superiores aos resultados apresentados pela interação guar:xantana (44,06 e 38,3g, respectivamente), porém inferiores aos resultados da interação entre locusta e xantana (197,5 e 175,2g para fracturabilidade e dureza, respectivamente). No caso da interação entre guar e xantana, não foi possível observar a formação de gel uniforme.

Com relação à adesividade, os valores resultantes da interação faveiro:xantana e guar:xantana, não apresentaram diferenças estatísticas (-10,1 e -7,3, respectivamente). Também se observa que na interação locusta:xantana, a adesividade é maior (-68,9) quando comparada às outras interações.

Conforme observado na **Tabela 2**, os maiores resultados de fracturabilidade e dureza dos géis galactomanano:xantana formados na proporção 1:1, correspondem à interação locusta:xantana. Este resultado era esperado, uma vez que a interação entre galactomanano:xantana é maior quanto menor for a razão manose:galactose do polissacarídeo, isto é, quanto menos ramificado o polímero for.

Nesse ponto, a diferença entre o guar e a locusta para a interação com xantana é a estrutura química, uma vez que, preferencialmente tais polímeros interagem pela cadeia central³⁴. Assim, como a razão manose:galactose do guar é 1,8:1, da locusta é 3,5:1²⁶ e, no caso do galactomanano de *D. mollis* sugere-se que a razão manose:galactose seja 2,7:1²²; era esperado que seus valores de fracturabilidade e dureza na avaliação do gel formado fossem intermediários aos valores detectados para guar e locusta. Os valores mais elevados para locusta, aqui representados, corroboram com os resultados de Morris (1993)³⁵ que também estudou a interação do galactomanano dessa fonte com outros polímeros comparando, da mesma forma, com o guar. Esta, por sua vez, mostrava-se sempre superior. Outros autores também observaram uma relação entre o máximo de sinergismo a 1% de políssacarídeos totais e a razão manose:galactose dos galactomananos ensaiados (tara e locusta)³³.

Também cabe salientar que, apesar dos galactomananos menos ramificados tenderem a interagir melhor com outros polímeros, muitas vezes, galactomananos de graus (proporções) semelhantes de ramificação interagem de maneira distinta com outros polímeros. Tais diferenças sinérgicas dessas associações podem ser atribuídas à distribuição estatística das ramificações de galatose ao longo da estrutura fina propriamente dita destes polímeros³⁶.

Além do estudo de fracturabilidade e dureza na formação de gel, a variação da viscosidade aparente também foi avaliada em função da adição de xantana à solução de galactomanano de faveiro antes da formação de gel. Na **Figura 6**, pode-se observar um acréscimo na viscosidade da dispersão, quando ambos os polissacarídeos estão presentes.

O galactomanano de *D. mollis* disperso em água a 1% apresentou viscosidade aparente de 199cP. Quando foi adicionada a xantana, as amostras preparadas tiveram suas viscosidades acrescidas, sendo que o maior valor foi observado quando a proporção galactomanano:xantana foi igual a 50:50 (434cP à taxa de deformação de 100 s^{-1}) que também coincide com os resultados máximos de fracturabilidade e dureza apresentados na **Tabela 1**.

Especificações comerciais do guar também sinalizam acréscimo na viscosidade aparente do polissacarídeo com adição de xantana. Quando o mesmo é disperso a 1% isoladamente, sua viscosidade aparente em algumas especificações é cerca de 200cP a 25°C à taxa de deformação 100 s^{-1} , sendo que pode atingir 377cP quando ocorre a associação guar:xantana na proporção 1:1.

Na literatura corrente, também existem registros de observações do aumento da viscosidade aparente na interação xantana:guar, em relação a viscosidade detectada para a xantana ou o guar isolados³⁷. Porém, diferente dos resultados detectados nesse trabalho, o máximo de viscosidade foi observado com 80% de guar e 20% de xantana com 1% de polissacarídeos totais.

Sabe-se que a associação entre guar e xantana proporciona um incremento na viscosidade aparente de qualquer dispersão aquosa³², sendo que, propicia maior estabilidade à dispersão em condições mais acidificadas. Essa característica é muito importante porque a estabilidade de uma dispersão é sempre requerida mesmo sob variações de pH e temperatura, bem como de concentração eletrolítica durante o preparo de uma formulação³⁴.

Estudo de cito e fototoxicidade

Conforme descrito, o estudo de cito e fototoxicidade de um ativo ou ingrediente de formulação farmocossmética pode ser definido pela porcentagem de viabilidade celular de células (fibroblastos) de camundongos recém natos e, para detectar a fototoxicidade propriamente dita, é necessária a presença e ausência de uma fonte de radiação UV durante o ensaio.

De acordo com a **Figura 7**, as células mantiveram-se viáveis durante o ensaio (uma semana) em todas as concentrações de galactomanano de faveiro verificadas, sendo que, acima de 1% de concentração de galactomanano as células proliferaram chegando a um incremento de cerca de 20% de proliferação. Sendo assim, ainda que esse experimento não seja específico para tal conclusão, pode-se sugerir que o galactomanano de faveiro tende a estimular a divisão celular.

Tecnologicamente, esse resultado permite reforçar a possibilidade de uso do galactomanano de faveiro para formulações cosméticas e farmacêuticas (especialmente), uma vez que, tal estudo, consiste em um dos primeiros experimentos de segurança que se realiza quando uma matéria-prima, insumo ou ativo é, inicialmente prospectado nesses setores. Mesmo que outros estudos de segurança, dermatológicos e até mesmo clínicos, tenham de ser ainda realizados, pode-se sugerir que esses resultados contribuem para o início da prospecção de uso do mesmo nos setores citados.

Interação com pastas celulósicas em suspensão

Na **Figura 8**, pode-se acompanhar a quantidade (em gramas) de galactomanano de faveiro absorvida por cada grama de celulose contida em cinco diferentes tipos de polpas celulósicas. Quanto mais alta for essa

absorção, melhor a interação entre o galactomanano de *D. mollis* e a celulose suspensa.

De acordo com esses resultados, a polpa celulósica que apresentou maior interação com o galactomanano de *D. mollis*, foi a pasta mecânica seca, cujo valor de adsorção (0,32 g) mostrou-se superior à quantidade de polímero absorvido pela celulose microcristalina (purificada para comercialização).

O segundo maior valor de absorção (0,31 g) foi o da pasta escura de alto rendimento, seguido da pasta celulósica pré-branqueada, sendo que o menor valor de absorção correspondeu ao valor adsorvido pela pasta celulósica *flash dryer* (0,26 g). Tais valores de absorção descritos para as polpas (pasta) correspondem a um percentual de 82,44; 74,11 e 68,9% (respectivamente) de absorção de galactomanano durante o ensaio.

Ainda comparando as polpas, o resultado representado pela porcentagem de interação entre o galactomanano de faveiro e a celulose da pasta PMS (quase 85%) foi o mais significativo, uma vez que este demonstrou ser superior ao percentual de interação do polímero com a celulose purificada (84,05%).

Estudos envolvendo a utilização de galactomanano na tentativa de aumentar a resistência de derivados celulósicos não são recentes. Os primeiros estudos nesse sentido começam a tomar forma na segunda metade da década de 60^{38,39}, inclusive, tais autores já relacionavam o peso molecular e a relação galactose:manose do polímero com grau de afinidade pela celulose. Isso demonstra que tal afinidade do galactomanano de faveiro pela celulose, evidenciada pela análise do percentual de adsorção do mesmo por parte da celulose (**Figura 8**), era esperada. No entanto, até o final da década de 90, não se acreditava que

galactomananos, com proporção manose:galactose inferior a 4:1, eram capazes de interagir de maneira significativa com a celulose⁴⁰.

Somente no início do século XXI, começaram os primeiros experimentos comparando o grau de interação de polissacarídeos de diferentes grupos (mananos e xiloglucanos) com derivados celulósicos⁴¹ que culminaram em Lima et al. (2003)⁷. Nesse último, a interação desses polímeros com a celulose foi estudada no papel propriamente dito, incrementando suas propriedades físicas e mecânicas. Assim, o experimento da **Figura 8** corrobora com a interação observada por Lima e colaboradores do galactomanano de faveiro com a celulose no próprio papel, com o diferencial de que, pela primeira vez, se analisa o potencial de interação do mesmo com diferentes pastas celulósicas (que já possuem uso comercial) de características mecânicas e químicas completamente distintas. Esse tipo de prospecção de interação é muito diferente de análises de interação efetuadas em folhas propriamente ditas. Assim, esse diferencial do presente trabalho, torna tais resultados mais importantes do ponto de vista tecnológico, uma vez que essas diferentes pastas resultam na produção de diferentes tipos de papéis com diferentes aplicações comerciais.

Ainda na **Figura 8**, conforme previamente citado, se observa uma maior afinidade do galactomanano de faveiro pela celulose de pastas mecânicas (PMS: pasta mecânica seca e PEAR: pasta escura de alto rendimento), isto é, pastas que poderão ou não sofrer tratamento químico em seu refino, a depender de sua utilização. Hannuksela et al (2002)⁶ confirma essa observação ao afirmar que, o interessante sobre os galactomananos, que são neutros, é sua afinidade pela celulose de polpas sem aditivos químicos (que acabam carregando eletroliticamente o sistema) demonstrando maior afinidade quando o sistema apresenta

concentrações elevadas de detritos, finos, material particulado e lignina, ou seja, pastas mecânicas. Os autores ainda sugerem que, usar galactomananos como aditivos para este tipo de pastas, particularmente, poderá vir a constituir, no futuro, um atrativo comercial no setor.

CONCLUSÕES

A viscosidade aparente do galactomanano de sementes de *D. mollis* tem um aumento considerável com o acréscimo da concentração do polissacarídeo na dispersão em água. A partir dos resultados das análises reológicas realizadas, concluiu-se que o galactomanano de *D. mollis* apresenta comportamento não-newtoniano com características pseudoplásticas, pois retorna às suas propriedades iniciais após ter sofrido uma taxa de deformação que vai até 100s^{-1} , indicando ausência de efeito do tempo.

A viscosidade do galactomanano de *D. mollis* obtida a partir da fração de sementes sem casca (retiradas com hidróxido de sódio 5%) e separadas em peneira com $420\mu\text{m}$ de abertura, determinada em dispersão a 1% de galactomanano, com taxa de deformação de 100s^{-1} , é de cerca de 200cP. Nas mesmas condições de ensaio a goma guar apresentou uma viscosidade média semelhante.

A dispersão do galactomanano é facilitada quando o solvente se encontra em pH variando entre 4,0 e 7,0, onde foi observada maior estabilidade da viscosidade deste polissacarídeo.

O galactomanano de *D. mollis* tem a capacidade de interagir com xantana, resultando na formação de gel e no aumento da viscosidade das dispersões preparadas a partir da associação do galactomanano de *D. mollis*:xantana em determinadas proporções (50:50). Esse gel formado

apresentou menor fracturabilidade e dureza em relação ao gel de locusta:xantana.

Este trabalho mostra que as sementes de *D. mollis* representam um potencial para produção de goma, indicando a importância de estudos complementares para aplicações comerciais. Nesse ponto, tal polímero merece estudos de prospecções industriais mais detalhados, em especial para o setor farmacossético e papelero; sendo que, as primeiras evidências nesse sentido são o fato de que o mesmo, não apresentou potencial cito e fototóxico, bem como significativa capacidade de interação com celulose suspensa.

Finalizando, sabe-se que a utilização do galactomanano em diversos setores industriais há muito tempo é conhecida (indústria alimentícia e farmacossética), as propriedades desse hidrocolóide são aproveitadas em diversos tipos de formulações, produtos e em outros setores também. Não podemos, entretanto, prever exatamente o comportamento reológico de um alimento ou emulsão cosmética processados, por exemplo, pois são substâncias complexas. Mas estas informações podem fornecer subsídios para o desenvolvimento tecnológico em ambas as indústrias.

Assim, com a contínua exploração das fontes comerciais conhecidas para a sua extensa utilização nos setores citados nesse trabalho, torna-se necessário a descoberta de outras fontes para obter esse polímero para as mesmas finalidades ou, devido às suas particularidades, para finalidades mais específicas.

Mesmo que o estudo careça de maiores detalhes, a importância desse trabalho reside no fato de se tratar de uma das primeiras prospecções detalhadas para o uso desse galactomanano nos setores aqui citados. Em complemento, esse estudo é ainda uma continuação importante do trabalho de Panegassi et al. 2000, onde os autores, além de

apontarem claramente o potencial de aplicação do faveiro no setor alimentício, desenvolveram um processo controlado de extração em bancada do polissacarídeo que, tecnologicamente tem grande potencial para ser adaptado para a extração em larga escala.

PARTE EXPERIMENTAL

As sementes de *Dimorphandra mollis* são provenientes da caatinga da Parnaíba (Piauí), fornecidas pela empresa PVP S/A.

Para a análise de interação do galactomanano de *D. mollis* com a celulose, utilizou-se além da Celulose Microcristalina (CM) (Sigma Chem. Co), quatro diferentes pastas celulósicas oriundas de fornecedores estratégicos da empresa Suzano de Papel e Celulose:

Flash Dryer (FD): pasta química

Pasta Pré-branqueada (PPB): pasta química

Pasta Mecânica Seca (PMS): pasta mecânica

Pasta Escura de Alta Rendimento (PEAR): pasta mecânica

Obtenção do Galactomanano

O galactomanano de faveiro foi obtido como descrito na literatura²⁴.

Caracterização reológica do Galactomanano

O instrumento utilizado foi o reômetro rotativo HAAKE (modelo Rotovisco RV20). Foi utilizado o sistema de placas paralelas PQ 45 com 45mm de diâmetro e 1mm de distância entre as placas. As análises foram efetuadas com taxa de deformação variando entre $0-100s^{-1}$, sendo determinados 20 pontos nessa faixa. A temperatura pôde ser controlada de forma eficiente mesmo com altas tensões de cisalhamento⁴². O torque

foi medido numa das placas enquanto a outra girava. O instrumento estava acoplado a um computador para aquisição e processamento dos resultados, e o controle de temperatura foi feito por um banho termostatizado.

Para efetuar as análises reométricas, as amostras foram dispersas em água a 40°C e agitação constante durante cerca de 20 minutos. A adição lenta da goma à água e a hidratação prévia à temperatura ambiente facilitou a dispersão e evitou a formação de grumos. Após o aquecimento, as amostras preparadas com goma nas concentrações superiores a 1,5% permaneceram cerca de 1h em agitação constante à temperatura ambiente para a total dispersão. As análises foram iniciadas 2h após a preparação das dispersões e, nesse tempo foram mantidas em condições climatizadas (25°C). As análises foram efetuadas em triplicata, foi calculado o valor médio para cada ensaio e construídos os reogramas. A compreensão dos dados obtidos está representada de forma a facilitar a comparação com os dados de literatura referentes aos estudos das gomas comerciais.

Efeito da concentração no comportamento reológico

O comportamento reológico do galactomanano foi avaliado nas seguintes concentrações de polissacarídeo disperso em água: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0% a uma temperatura constante de 25°C^{28,29}. Como parâmetro comparativo foi avaliado o comportamento reológico da goma guar comercial nas mesmas concentrações.

Para os ensaios descritos a seguir foram utilizadas as mesmas condições de dispersão do galactomanano descritas anteriormente e as dispersões foram preparadas na concentração de 1% de polissacarídeo em água destilada.

Efeito da variação do pH no comportamento reológico

Antes de iniciar os ensaios de viscosidade com variação de pH, foi preparado tampão citrato fosfato 0,05M com pH 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 e tampão tris-maleato 0,05M com pH 8,0 e 9,0. A seguir, o galactomanano de faveiro foi disperso a 1% nos diferentes tampões com agitação constante durante 20 min a 40°C.

Efeito da da temperatura no comportamento reológico

Amostras do galactomanano de faveiro dispersas em água a 1% em agitação constante durante 20 min a 40°C foram analisadas quanto ao comportamento reológico nas seguintes temperaturas: 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, separadamente.

Efeito do NaCl no comportamento reológico

Às dispersões de galactomanano de faveiro a 1%, foi adicionado NaCl comercial nas concentrações de: 5; 10; 15; 20 e 25 %. Em seguida a amostra foi novamente agitada durante 20min²⁹.

Interação galactomanano-xantana para formação de gel

O galactomanano foi submetido à interação com xantana através da preparação de dispersões dos polissacarídeos (galactomanano de faveiro:xantana) em água nas seguintes proporções: 100:0; 75:25; 50:50; 25:75 e 0:100. As dispersões foram preparadas de modo a apresentar um teor de 1% em polissacarídeos totais. Após o seu preparo, as misturas foram aquecidas a 60°C com agitação constante, durante 30 min³³. As amostras obtidas foram colocadas em recipientes com 4 cm de diâmetro e 2 cm de altura e deixadas durante 24 h a temperatura

ambiente. Os parâmetros de textura dos géis como fracturabilidade, dureza e adesividade, foram determinados através do método de compressão, usando Analisador de Textura SMS Modelo TA-XT2 munido de sonda com 25 mm de diâmetro com penetração de 10 mm a 5 mm/s, força igual a 20 g e sensibilidade 20 g. Estas condições de determinação foram selecionadas através de testes até o encontro das condições mais adequadas. Como descrito, os parâmetros determinados neste estudo foram dureza, fracturabilidade e adesividade correspondentes ao pico de força da primeira compressão (programa "return to start").

Para efeito de comparação foram preparadas dispersões de locusta-xantana e guar-xantana contendo 1% de polissacarídeos totais, proporções de 50:50. As interações foram submetidas à análise em Analisador de Textura TA-XT2 como descrito acima.

Todas as amostras preparadas foram também submetidas à determinação da viscosidade a 25°C, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Estudo de cito e fototoxicidade

Incubou-se com o galactomanano de faveiro, por um período de 24 horas, células 3T3, ou seja, fibroblastos de pele de camundongo recém nato.

A toxicidade é determinada em função da viabilidade celular em meio a este ensaio, o qual é monitorado pela incubação das células 3T3 com *Neutral Red*. Este último é um corante vital, que é incorporado pelas supostas células vivas após tais 24 horas de contato com a amostra que se deseja dosear. A fototoxicidade ou fotoirritação é definida como a resposta tóxica da pele causada depois da primeira exposição do tecido epitelial a certos produtos e/ou ativos com uma subsequente exposição à luz solar ou

que é induzida pela irradiação da pele depois da administração sistêmica de um ativo e/ou produto. Tal exposição à luz corresponde a uma dose não citotóxica de radiação UVA (verificada através de triplicata de controle)⁴³.

A metodologia do teste de fototoxicidade consiste na comparação da citotoxicidade de um ativo na presença e na ausência de luz. A Fototoxicidade é medida pela captação do *Neutral Red* pelas células que sobrevivem à incubação com o ativo ou produto⁴³.

Interação do galactomanano com pastas celulósicas

Na preparação das pastas, cada uma delas foi seca em estufa (40° C) por 36 horas, para posterior pulverização em moinho de facas (Tecnall Modelo TE-580). O pó de cada uma das pastas foi suspenso em água destilada a 4%. A solução foi centrifugada a 10000G com descarte do sobrenadante. Em seguida, o precipitado foi novamente suspenso em água destilada e a solução centrifugada em seqüência. Tal procedimento foi repetido por três vezes até lavagem exaustiva dos finos de cada uma das pastas.

Para as análises de interação do galactomanano de faveiro com diferentes pastas, 600µl de solução 0,1% de galactomanano em tampão acetato de sódio 25mM pH 5,0 foram adicionados a 400µl de solução aquosa (4%) das diferentes pastas. Em seguida o material foi exaustivamente agitado em aparelho VORTEX Gene-2, deixado por 15 min a 30° C e centrifugado a 10000G por 3min. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur o sobrenadante foi coletado e submetido à dosagem de açúcar total⁴⁴ e, por diferença sobre o valor inicial, efetuou-se a quantificação de açúcar adsorvido pela celulose das pastas celulósicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Dra. Silvia Bugager, consultora de pesquisa e desenvolvimento da Suzano Papel e Celulose, pelas sugestões e pastas celulósicas cedidas.

Marcos Buckeridge agradece suporte financeiro da FAPESP e do CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Pauly, M.; Freis, O.; Pauly G. *Cosmet. Toil.* **1999**, 114, 65.
2. Tood, P. A.; Benfield, P.; Goa, K. L. *Drugs*, **1990**, 39, 917.
3. Whitney, S. E. C.; Bringham, J. E.; Darke, A. H.; Reid, J. S. G.; Gidley, M. G. *Carbohydr. Res.* **1998**, 307, 299.
4. Buckeridge, M. S.; Tiné, M. A.; Santos, H. P.; Lima, D. U. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **2000a**, 12, 137.
5. Capek, P.; Kubachová, M.; Alföldi, J.; Bilisiers, L.; Lisková, D.; Kákoniová, D. *Carbohydr. Res.* **2000**, 329, 635.
6. Hannuksela, T.; Maija, T.; Holmbom, B. *Cellulose*, **2002**, 9, 261.
7. Lima, D. U.; Oliveira, R. C.; Buckeridge, M. S. *Carbohydr. Polym.* **2003**, 52, 367.
8. Chanzy, H.; Dube, M.; Marchessault, R. H. *Tappi.* **1978**, 61, 81.
9. Lisboa, C. G. S.; Tonini, P. P.; Tiné, M. A.; Buckeridge, M. S. *Braz. Jour. Plant Physiol.* **2006**, 18, 269.
10. Tonini, P. P.; Lisboa, C. G. S.; Silva, C. O.; Mazzoni-Viveiros, S. C.; Buckeridge, M. S. *Trees*, **2007**, 21, 13.
11. Buckeridge, M. S.; Santos, H. P.; Tiné, M. A. *Plant Physiol.* **2000b**, 38, 141.
12. Neukom, H. *Lebensm. Wissens. Tec.* **1989**, 22, 41.

13. Fernandes, P. B.; Gonçalves, M. P.; Doublier, J. L. *Carbohydr. Polym.* **1992**, *19*, 261.
14. Williams, P. A.; Day, D. H.; Langdon, M. J.; Phillips, G. O.; Nishinari, K.; *Food hydroc.*, **1991**, *4*, 489.
15. Pausen, B. S. *Curr. Organ. Chem.* **2001**, *5*, 939.
16. Seaman, J. K. Em *Handbook of Water-soluble Gums and Resins*; Davidson, R. L., ed.; McGraw-hill: EUA, **1980**, cap. 6.
17. Glicksman, M. *Adv. Food Res.* **1962**, *11*, 109.
18. Herald, C. T. Em *Food Hydrocolloids*; Glicksman, M, ed.; CRC Press: Florida, **1986**, cap. 5.
19. Jouandeaud, M.; Bordes, S.; Soulie, C. *Cosmet. Toil.* **2004**, *119*, 67.
20. Buckeridge, M. S.; Dietrich, S. M. C. *Rev. Bras. Bot.* **1990**, *13*, 109.
21. Buckeridge, M. S.; Panegassi, V. R.; Dietrich, S. M. C. *Rev. Bras. Bot.* **1995a**, *18*, 171.
22. Buckeridge, M. S.; Dietrich, S. M. C.; Lima, D. U. Em *Carbohydrate reserve in plants: synthesis and regulations*; Gupta, A. K.; Kaur, N., eds; Elsevier: Amsterdam, **2000c**, cap.7.
23. Buckeridge, M. S.; Panegassi, V. R.; Rocha, D. C.; Dietrich, S. M. *Phytochem.* **1995b**, *38*, 871.
24. Panegassi, V. R.; Serra, G. E.; Buckeridge, M. S. *Ciên.Tec. Alim.* **2000**, *20*, 406.
25. Dahms, G. H. *Perfum. Kosm.*, **1996**, *75*, 675.
26. Reid, J. S. G.; Edwards, M. E. Em *Food Polysaccharides and Their Applications*; Alistair, M.; Stephe, M. D., eds; New York: New York, **1995**.
27. Whistler, R. L.; Hymowitz, T. *Guar: agronomy, production, industrial use and nutrition*. Purdue University Press: Indiana, **1979**.

28. Wankhede, D. B.; Sawate, A. R.; Patil, H. B.; Ismail, S.; Deshpande, H. W.; Hashmi, S. H. *Starch/stärke*, **1995**, 47, 415.
29. Carlson, W. A.; Ziegenfuss, E. M.; Overton, J. D. *Food Tec.* **1962**, 16, 50.
30. Carlson, W. A.; Ziegenfuss, E. M.; *Food Tec.* **1965**, 19, 64.
31. Kovacs, P. *Food Tec.* **1973**, 27, 26.
32. Sprenger, M. *Dair. Indust. Intern.* **1990**, 55, 19.
33. Fernandes, P. B. *Food Contr.* **1994**, 5, 244.
34. Igoe, R. S. *Food Tec.* **1982**, 36, 72.
35. Morris, V. J. *Carbohydr. Polym.* **1993**, 53.
36. Dea, I. C. M.; Clark, A. H.; McCleary, B. V. *Carbohydr. Res.* **1986**, 147.
37. Morris, E. R. *Em Gums and stabilizers for the food industry - application of hydrocolloids*; Phillips, G. O.; Wedlock, D. J.; Williams, P. A., eds.; Pergamon Press, **1984**, v. 3, 57.
38. Clayton, D. W.; Phelps, G. R. *Jour. Polymer.* **1965**, 11, 197.
39. Hansson, J. *Holzfors.*, **1970**, 23, 77.
40. Tenkanen, M.; Paananen, A.; Kroon-Batenburg, I. *Carbohydr. Europe*, **2000**, 28, 34.
41. Kroon-Bratenburg, L. M. J.; Leeftang, B. R.; Van Kuik, J. A.; Kroon, J. *223rd. Acs National Meeting*, Orlando, USA, **2002**.
42. Bourne, M. C. Food texture and viscosity: concept and measurement, viscosity and consistency. *Lond. Acad. Pres.* **1982**, 5, 199.
43. Borenfreund E.; Puerner J.A. *Toxicol. Lett.* **1985**, 24, 119.
44. Dubois, M; Gilles, A; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. *Analyt. Chem.* **1956**, 28, 350.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Viscosidade aparente (cP) da goma guar (A) e do galactomanano de *Dimorphandra mollis* (B), a 25°C, dispersos em água a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0%, em função da variação da taxa de deformação.

Figura 2: Comparação da viscosidade aparente (cP) do galactomanano de *Dimorphandra mollis* e da goma guar, em função da concentração do galactomanano, medida à temperatura de 25°C a uma taxa de deformação constante de 100s⁻¹.

Figura 3: Viscosidade aparente do galactomanano de *Dimorphandra mollis* dispersa em água a 1% em função da variação do pH da dispersão a 25°C à taxa de deformação de 100s⁻¹.

Figura 4: Viscosidade aparente do galactomanano de *Dimorphandra mollis* dispersa em água a 1% em função da variação da temperatura durante a análise reométrica à taxa de deformação de 100s⁻¹.

Figura 5: Viscosidade aparente (cP) do galactomanano de *Dimorphandra mollis* dispersa em água a 1% em função da variação de concentração de cloreto de sódio (%) na dispersão a 25°C à taxa de deformação de 100s⁻¹.

Tabela 1: Parâmetros de textura (médias de três repetições) obtidos a partir de produtos da interação de galactomanano de *Dimorphandra mollis*-xantana em diferentes proporções em água a 1% analisados em Analisador de Textura TA-XT2 à temperatura ambiente, munido de sonda com 25mm de diâmetro, penetração de 10mm à velocidade de 5mm/s, força igual a 20g e sensibilidade 20g¹

Tabela 2: Parâmetros de textura (médias de três repetições) obtidos a partir de produtos da interação de galactomanano de *Dimorphandra mollis*-xantana, guar-xantana e locusta-xantana em água a 1% na proporção 50:50 analisados em Analisador de Textura TA-XT2 à temperatura ambiente, munido de sonda com 25mm de diâmetro, penetração de 10mm à velocidade de 5mm/s, força igual a 20g e sensibilidade 20g¹.

Figura 6: Viscosidade aparente (cP) em função da proporção galactomanano:xantana em solução aquosa a 1% de polissacarídeos totais à taxa de deformação de 100s^{-1} .

Figura 7: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos de camundongos recém natos (células 3T3) em função da concentração de galactomanano de *Dimorphandra mollis* na presença e na ausência de radiação ultravioleta.

Figura 8: Interação do galatomanano de *Dimorphandra mollis* com a celulose detectada através de quantidade de galactomanano adsorvido por grama de polpa celulósica em suspensão. Os resultados das adsorções são detectados em 5 tipos de polpas (pastas) celulósicas suspensas: PMS (pasta mecânica seca), PEAR (pasta escura de alto rendimento), PPB (pasta pré-branqueada), FD (*flash dryer*) e CM (celulose microcristalina – Sigma).

Figura 1a

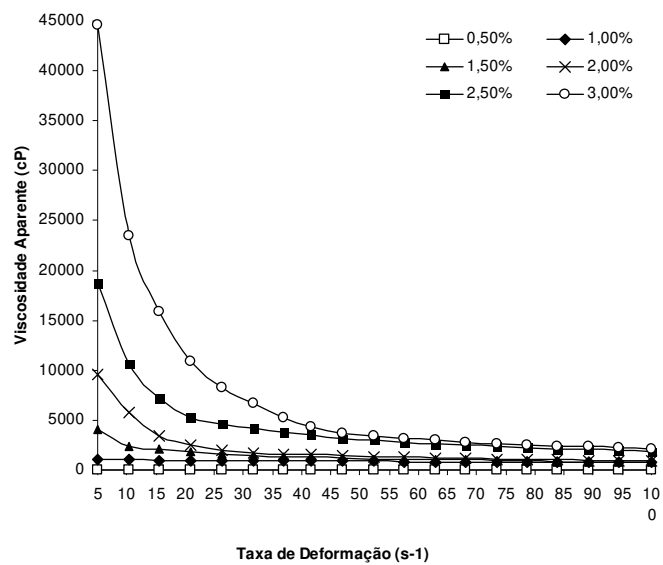


Figura 1b

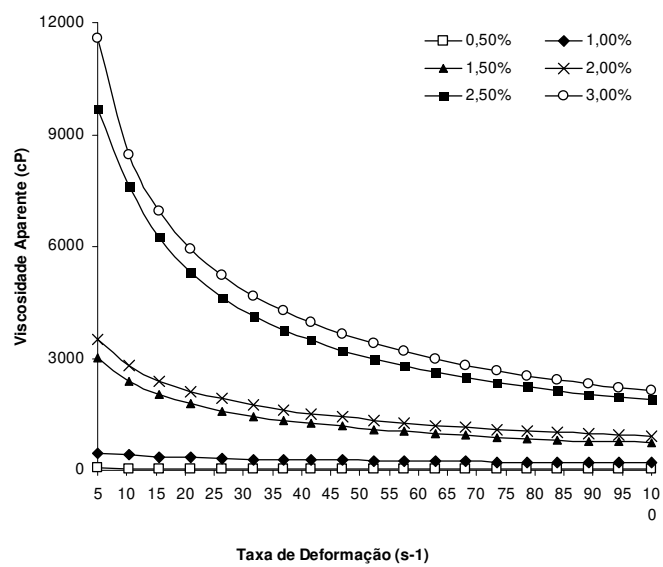


Figura 2

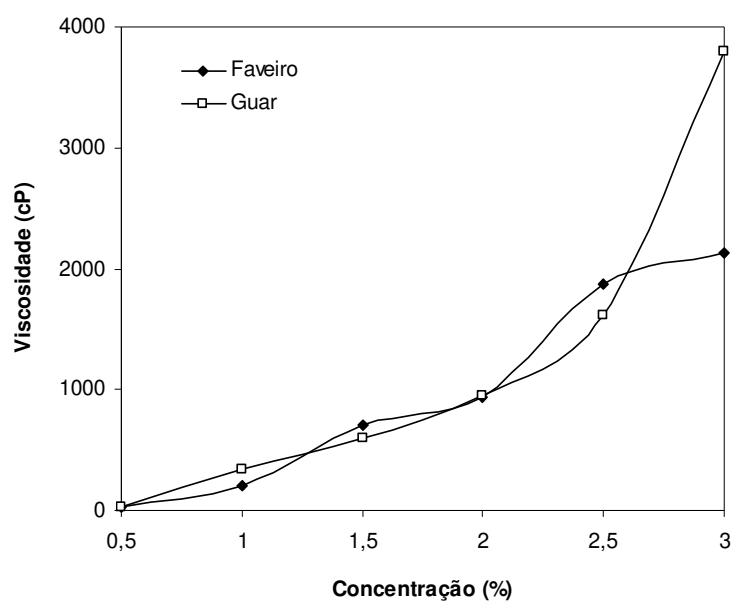


Figura 3

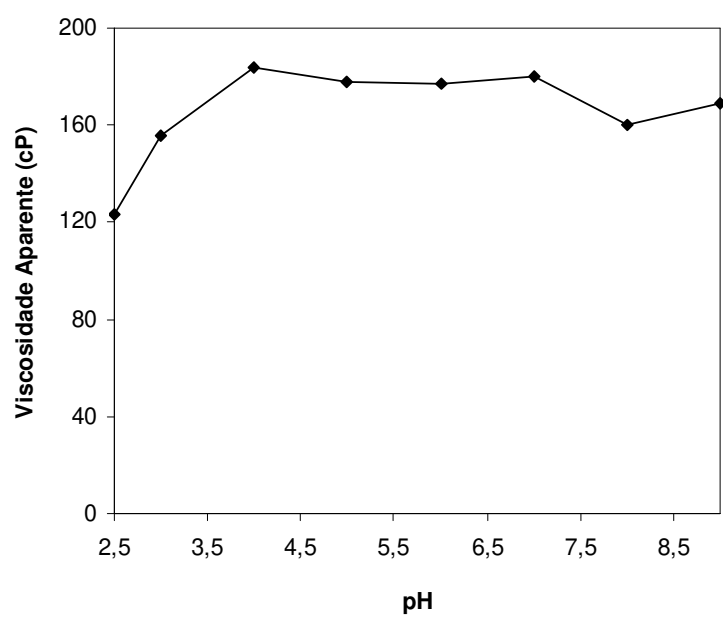


Figura 4

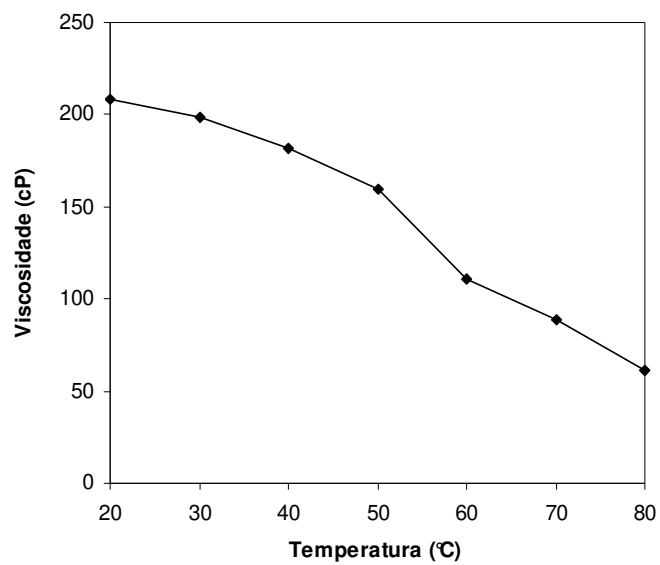


Figura 5

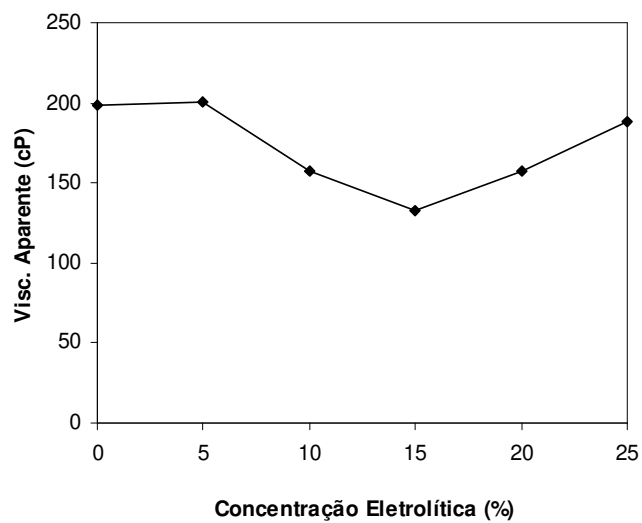


Tabela 1:

galactomanano:xantana	fracturabilidade	dureza	adesividade
100:0	19,5 d	18,9 e	nd
75:25	89,2 b	79,7 b	-27,7
50:50	118 a	98,5 a	-10,1
25:75	69,2 c	58,9 c	nd
0:100	27,4 d	26 d	nd
coef. variação (%)	7,3	5,9	nd

Teste Duncan (95% de confiabilidade): letras iguais em colunas indicam valores estatisticamente idênticos.
nd: não detectado.

Tabela 2:

amostra	fracturabilidade	dureza	adesividade
faveiro:xantana	118 b	98,5 b	-10,1 b
locusta:xantana	197,5 a	175,2 a	-68,9 a
guar:xantana	44,06 c	38,3 c	-7,3 b
coef. variação(%)	5,6	3,2	5,8

Teste Duncan (95% de confiabilidade): letras iguais em colunas indicam valores estatisticamente idênticos.

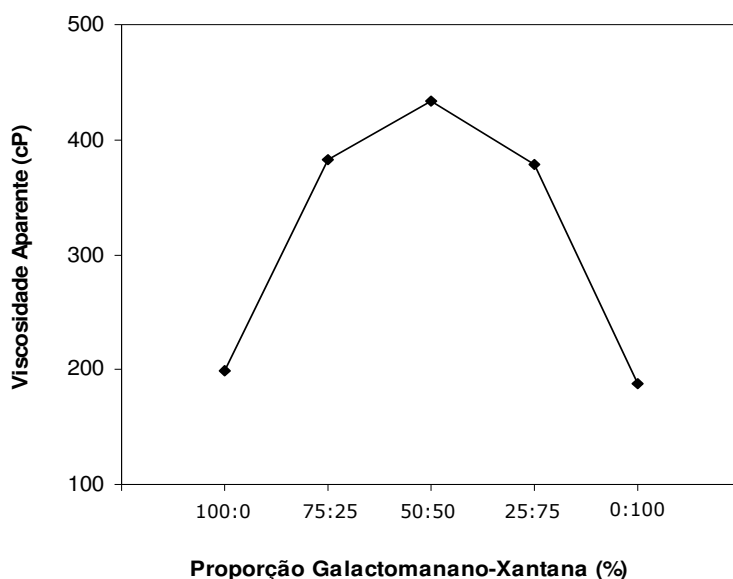
Figura 6

Figura 7

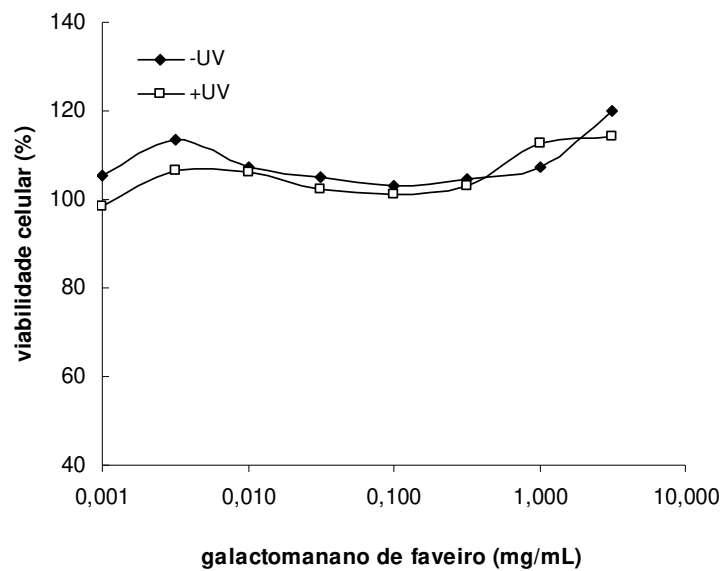
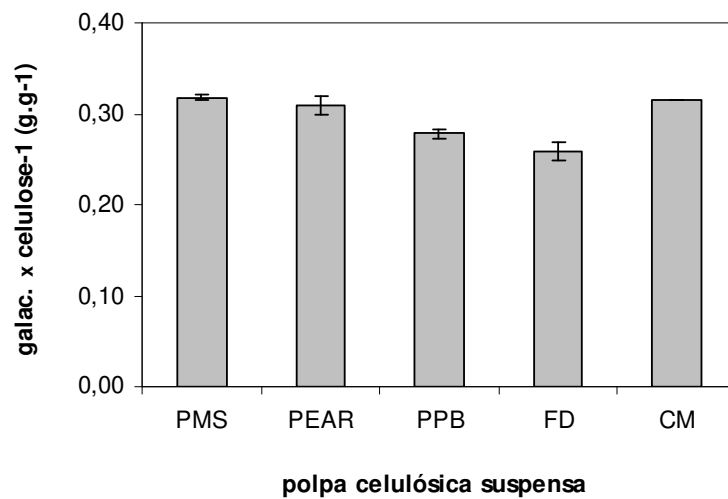


Figura 8



Patente 1

"INPI – Institut National de La Propriété Industrielle"

*Vos références **144962 SDE***

(A tradução do presente documento encontra-se ao final da tese – Anexo I)

PROCEDE D'OBTENTION DE POLYSACHARIDES A PARTIR DE SEMENCES DE JATOBA, COMPOSITION COSMETIQUE COMPRENANT LESDITS POLYSACHARIDES

Domaine de l'invention

La présente invention concerne un procédé pour obtenir des polysaccharides, de préférence des xyloglucanes, à partir de semences de *jatoba* (*Hymenaea courbaril* L., *Hymenaea stilbocarpa*, entre autres espèces), pour les appliquer à des compositions cosmétiques, de préférence des compositions anti-âge.

Description de l'art antérieur

Hymenaea courbaril L., connu sous le nom de *jatoba*, est un arbre que l'on trouve à l'origine du Mexique à une grande partie de l'Amérique du Sud, y compris le Brésil (du nord au sud-est), le Venezuela, la Colombie, le Pérou et la Bolivie. On le trouve normalement à des altitudes allant jusqu'à 900 mètres au-dessus du niveau de la mer.

Son bois est utilisé dans le génie civil, le travail du bois, le lattage, les instruments de musique et les stratifiés, entre autres. La pulpe est comestible et est utilisée dans la préparation de produits alimentaires, tels que les farines, les sucreries et les boissons, ou dans les aliments. L'écorce et la sève du tronc servent à la préparation de thés.

Les xyloglucanes sont des polysaccharides présents sur la paroi cellulaire des plantes supérieures. Le xyloglucane structurel a le polysaccharide de paroi cellulaire primaire, et le xyloglucane obtenu à partir de semences est principalement un polysaccharide de réserve. Les constituants principaux du xyloglucane sont le galactose, le glucose et le xylose. Au Brésil, les semences de *jatoba* (*Hymenaea courbaril*)

constituent une source abondante de xyloglucanes. Les xyloglucanes agissent comme des ingrédients actifs quand ils sont appliqués à la peau humaine, en favorisant des bénéfices à l'aspect général de la peau et à sa "santé", en stimulant la synthèse de collagène et d'élastine par les cellules du tissu conjonctif.

Le brevet US 5 488 105 décrit des polysaccharides extraits à partir de semences de *Hymenaea* qui sont utilisés en tant qu'épaississants, gélifiants et stabilisants dans la formulation de produits alimentaires, chimiques et pharmaceutiques. Il décrit aussi un procédé pour l'extraction des semences de *Hymenaea*, comprenant les étapes consistant à laisser les semences tremper et à retirer les téguments ; à broyer et sécher les semences pour former une poudre de polysaccharide brute ; à mettre en suspension et filtrer le polysaccharide brut dans une solution alcaline-alcoolique et former un polysaccharide purifié ; le polysaccharide purifié est ensuite séché et broyé pour former une poudre de polysaccharide purifiée.

Le document JP 10236943 décrit l'ingrédient actif d'un cosmétique qui est dissout dans un extrait de *jatoba*. Le procédé d'extraction est mis en œuvre avec un solvant non aqueux et un fractionnement.

D'après la description de la présente invention ci-dessous, on en conclut que les documents de la technique antérieure ne proposent pas d'avantages au sens d'un procédé plus simple et plus propre, en d'autres termes d'un procédé écologiquement respectueux ayant un coût inférieur à ceux des procédés de la technique antérieure.

Résumé de l'invention

La présente invention concerne un procédé pour obtenir des polysaccharides à partir de semences de *jatoba*, comprenant les étapes suivantes :

- a) traitement des semences (procédé à sec) ;
- b) extraction aqueuse à 1 % à 5 % en masse de poudre par volume, de préférence 2 % en masse de poudre par volume ;
- c) précipitation à l'éthanol à 96°GL utilisant 1 à 3 fois le volume d'extrait aqueux ;
- d) filtration à la presse du précipité obtenu en (c) ;
- e) solubilisation des polysaccharides obtenus dans l'étape (d) avec de l'eau ; et
- f) séchage des polysaccharides obtenus dans l'étape (e).

Description des dessins

La Figure 1 montre des semences de *Hymenaea courbaril* avec leurs téguments.

La Figure 2 illustre un xyloglucane purifié.

La Figure 3 montre un graphique avec les résultats de l'activité épaississante des polysaccharides obtenus conformément à la présente invention.

Description détaillée de l'invention

L'objet de la présente invention est un procédé pour obtenir des polysaccharides à partir de semences de *jatoba* (*Hymenaea courbaril*).

L'un des avantages de la présente invention est que le procédé utilise une voie simple et propre, n'impliquant pas la purification du polysaccharide brut avec une solution alcaline-alcoolique (NaOH).

Un autre aspect important du procédé de la présente invention est l'étape initiale de traitement des semences. On a noté que l'utilisation d'eau pour laver les semences a un effet négatif sur le résultat du procédé, puisqu'elle provoque la migration de certains composants des téguments dans la partie intérieure des semences, ce qui a donc pour résultat une modification de la couleur du produit final, en plus d'une contamination et de la présence d'impuretés.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé pour obtenir des polysaccharides, de préférence des xyloglucanes, à partir de semences de *jatoba* (*Hymenaea courbaril*), comprenant les étapes suivantes : traitement des semences, extraction aqueuse à 1 % à 5 %, de préférence à 2 % ; précipitation avec 1 à 3 volumes d'éthanol à 96°GL par rapport au volume de l'extrait aqueux ; solubilisation des polysaccharides obtenus avec de l'eau, et séchage subséquent de ceux-ci.

Le procédé commence avec le traitement des semences. Dans cette étape, les téguments des semences sont retirés, ce retrait pouvant être effectué de deux façons :

- 1) Les semences intactes sont broyées et tamisées pour être séparées des téguments. Dans un mode de réalisation préféré de la présente invention, le broyage est effectué dans un broyeur à marteau durant une période de temps importante et les semences broyées sont passées sur des tamis de 9 mm pour être séparées des téguments. Les semences débarrassées des téguments sont ensuite séparées par granulométrie en passant sur des tamis ayant différentes ouvertures de mailles, de préférence des tamis de 3,35 mm, 2,36 mm, 1,18 mm et 600 µm, respectivement.

Les fractions obtenues après le tamis de 9 mm sont retenues dans les tamis de 3,35 mm et 2,36 mm, en représentant au total 54 % de la masse de semences complètement débarrassée des téguments.

2) Conformément à un mode de réalisation préféré, le retrait des téguments des semences est effectué par utilisation de micro-ondes.

Après le traitement des semences, la poudre résultante est lentement ajoutée à de l'eau à l'aide d'un tamis. Puis une extraction aqueuse est effectuée à 1 % à 5 %, de préférence à 2 % en masse de poudre par volume. L'extraction est de préférence réalisée avec de l'eau préchauffée à une température variant de 60 à 80°C, mieux encore de 70°C. Après le préchauffage, une agitation est réalisée durant une période d'environ 1 heure. Ensuite, un refroidissement a lieu, de préférence jusqu'à 40°C.

Eventuellement, le procédé peut en outre comprendre une étape de séparation qui est de préférence réalisée par centrifugation. La centrifugation est de préférence effectuée à 4100 t/min pendant 15 minutes.

Après extraction et, si cela est applicable, centrifugation, le matériau est soumis à une précipitation avec 1 à 3 volumes, de préférence 3 volumes, d'éthanol à 96°GL. Les inventeurs ont découvert que ladite précipitation avec de l'éthanol à 96°GL permet d'obtenir deux polysaccharides différents : GEL (un précipité plus dense et plus gélifié) et SOB (un polysaccharide moins dense et plus fibreux). Ces polysaccharides ont la même constitution de saccharides (monomères – galactose, xylose et glycose), mais des masses moléculaires différentes.

Eventuellement, le procédé peut en outre comprendre, après la précipitation à l'alcool, une étape de séparation qui est de préférence une filtration à la presse, pour compresser la masse résultante.

Puis les polysaccharides résultants sont mis en suspension dans de l'eau jusqu'à solubilisation à une concentration de 2 % en poids/volume. Normalement, pour atteindre cette solubilisation, il faut 10 minutes dans un mélangeur industriel. Elle peut aussi être effectuée dans un broyeur à vitesse de cisaillement élevée, jusqu'à dispersion complète des matières solides.

Après solubilisation, une séparation est effectuée de préférence par centrifugation, laquelle est de préférence réalisée à 4100 t/min pendant 15 minutes.

Après séparation, le surnageant est déshydraté par séchage par pulvérisation ou congélation et lyophilisation subséquente. Dans le cas d'une lyophilisation, il est nécessaire également d'effectuer une étape de broyage.

Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention concerne un procédé pour obtenir des xyloglucanes à partir de semences de *jatoba* (*Hymenaea courbaril*), comprenant les étapes suivantes :

- a) traitement des semences par séchage des semences dans un four à micro-ondes ;
- b) extraction aqueuse à 2 % à une température située dans la plage allant de 60 à 80°C pendant 1 heure ;
- c) centrifugation à 4100 t/min pendant 15 minutes ;
- d) filtration (avec granulométrie de la taille du micromètre) dans un bol avec une feuille ;
- e) précipitation avec 1 à 3 volumes d'éthanol à 96°GL ;
- f) solubilisation des polysaccharides obtenus dans de l'eau ;
- g) séchage au moyen d'un séchage par pulvérisation ou d'une congélation et d'une lyophilisation.

Dans un autre mode de réalisation de la présente invention, on met à disposition des compositions comprenant les polysaccharides obtenus conformément au procédé de l'invention en combinaison avec des excipients acceptables en cosmétique. Ces polysaccharides peuvent être avantageusement utilisés, par exemple, pour la préparation de compositions anti-rides ou anti-âge, et aussi en tant qu'agents épaississants dans des formulations cosmétiques.

Le tableau ci-dessous illustre certaines compositions cosmétiques comprenant des xyloglucanes obtenus conformément au procédé de la présente invention:

Phase du procédé	Composants	Exemple 1 (%)	Exemple 2 (%)	Exemple 3 (%)
1	Eau déminéralisée	76,580	83,070	83,500
2	EDTA disodique	0,100	0,100	0,100
3	Glycérine bidistillée BXR végétale	5,000	5,000	5,000
4	Gomme xanthane	–	0,100	0,100
5	Carbopol ETD 2020	0,250	0,180	–
6	Alcool cétylique	1,000	3,000	2,000
6	Alcool stéarylique	1,000	1,000	2,000
7	Copolymère d'acryloyl-diméthyltaurate de sodium et d'acrylate d'hydroxyéthyle, squalane, et polysorbate 60	2,000	2,000	2,000
8	Hydroxyde de sodium	0,070	0,050	0,050
9	Eau déminéralisée	10,000	5,000	5,000
9	Xyloglucane de <i>Jatoba</i>	4,000	0,500	0,250
		23,420	16,930	16,500

Phase du procédé	Composants	Exemple 4 (%)	Exemple 5 (%)	Exemple 6 (%)	Exemple 7 (%)
1	Eau déminéralisée	80,481	83,671	82,455	80,852
2	EDTA disodique	0,100	0,100	0,100	0,100
3	Glycérine bidistillée BXR végétale	5,000	5,000	5,000	5,000
4	Gomme xanthane	0,150	0,120	0,100	0,100
5	Carbopol ETD 2020	0,210	0,250	0,300	0,100
6	Alcool cétylique	0,500	2,300	1,500	4,000
6	Alcool stéarylique	2,500	1,200	1,500	2,000
7	Copolymère d'acryloyl-diméthyltaurate de sodium et d'acrylate d'hydroxyéthyle, squalane, et polysorbate 60	2,000	2,000	2,000	2,000
8	Hydroxyde de sodium	0,059	0,059	0,045	0,048
9	Eau déminéralisée	8,000	5,000	5,000	5,000
9	Xyloglucane de <i>Jatoba</i>	1,000	0,300	2,000	0,800
		19,519	16,329	17,545	19,148

Procédé pour préparer les compositions décrites dans le tableau ci-dessus

- Verser de l'eau dans un récipient et la peser (phase 1) ;
- Ajouter les composants indiqués pour la phase 2 et agiter jusqu'à solubilisation complète ;
- Ajouter les composants indiqués pour la phase 3 et agiter ;
- Ajouter progressivement les composants indiqués pour la phase 4 jusqu'à solubilisation complète ; agiter fortement (environ 1000 à 2000 t/min) ;
- Ajouter progressivement les ingrédients de la phase 5 en agitant fortement jusqu'à dispersion complète. Il ne doit pas se former de grumeaux.
- Chauffer cette phase jusqu'à 70–80°C.
- En parallèle, chauffer les composants décrits pour la phase 6 à la même température.

- Avec les composants de la phase 6 fondus et à la même température que la phase aqueuse, ajouter la "phase 6" dans la phase aqueuse et agiter à environ 1000–2000 t/min.
- Ajouter les composants de la phase 7 et agiter fortement jusqu'à la formation d'une émulsion lisse et brillante, pendant environ 10–15 minutes.
- En parallèle au début du procédé, disperser les polysaccharides dans de l'eau, en l'ajoutant lentement jusqu'à solubilisation complète.

Il s'agit d'une phase de refroidissement, et les polysaccharides, lorsqu'ils sont mis au contact d'autres gommes, vont favoriser une synergie, avec la formation de ponts hydrogène et un changement des propriétés viscoélastiques/rhéologiques de l'émulsion.

Application cosmétique

On a mis en œuvre certains dosages montrant les caractéristiques amplifiées et avantageuses des polysaccharides obtenus conformément au procédé de la présente invention pour une utilisation dans des compositions cosmétiques.

1) Activité de prolifération cellulaire

On a mis en œuvre des dosages pour déterminer le potentiel des polysaccharides obtenus conformément à la présente invention pour favoriser la prolifération cellulaire (augmentation du nombre de cellules par rapport à un groupe témoin non traité avec l'ingrédient actif), en analysant la viabilité cellulaire par coloration au rouge neutre. Un autre objectif du dosage était de déterminer le potentiel de pro-collagène d'ingrédients actifs (collagène en excès produit par les cellules traitées avec l'ingrédient actif, par rapport à des cellules témoins non traitées) par

détection du collagène dans le surnageant de culture par coloration au rouge sirius.

Ce dosage permet de déterminer ce qui suit.

a) Le fait que la présence d'un ingrédient actif spécifique dans la culture cellulaire, pendant une ou plusieurs périodes, a ou non pour résultat une augmentation du nombre de cellules par rapport au groupe témoin (cellules non traitées avec le même ingrédient actif). Le nombre de cellules est estimé en fonction du taux de viabilité cellulaire, lequel est surveillé par incubation de fibroblastes avec le colorant vital rouge neutre à la fin de la période de dosage (72 heures). Ce colorant est incorporé dans les cellules vivantes, si bien que le taux de viabilité cellulaire est indiqué par l'intensité du colorant absorbé par les cellules en un rapport directement proportionnel. La lecture colorimétrique est effectuée dans un spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 540 nm.

b) Le fait que la présence de l'ingrédient actif induit ou non la production par les cellules de davantage de collagène. A cette fin, des fibroblastes humains dérivant du derme sont incubés avec le facteur de croissance tumoral $-\beta$ TGF- β , connu pour induire la synthèse et la sécrétion de collagène (témoin positif). Simultanément, d'autres fibroblastes sont incubés dans les mêmes conditions avec l'ingrédient actif qui est testé. Le collagène est identifié par le colorant rouge sirius (solution de picrosirius), qui a une affinité pour les molécules de procollagène et de collagène. Le potentiel de procollagène de chaque ingrédient actif est identifié par l'augmentation de densité optique (absorbance : filtre à 540 nm) mesurée après la dissolution des pigments préalablement absorbés par le collagène présent dans les surnageants de culture.

Résultats

Les résultats obtenus avec les polysaccharides produits conformément au procédé de la présente invention montrent ce qui suit :

- Le potentiel de prolifération/viabilité des cellules incubées avec les différentes concentrations de l'échantillon de xyloglucane ;
- Le potentiel de procollagène de l'ingrédient actif, normalisé en fonction de la viabilité cellulaire ;
- La production totale de collagène, décrite dans le Tableau 1.

Tableau I : Prolifération cellulaire (%), densité optique (Abs) +/- écart type, obtenues à partir de la lecture de la synthèse de collagène total et de collagène après normalisation par l'indice de viabilité ($\mu\text{g/ml}$ et %), pour des fibroblastes de peau humaine en culture primaire, après 96 heures d'incubation.

Traitement	Prolifération cellulaire	Collagène total $\pm$ écart-type	Collagène normalisé ($\mu\text{g/ml}$)	Collagène normalisé (%)
Témoin	100	0,152 $\pm$ 0,008	100,00	0,00
TGF	136,00	0,224 $\pm$ 0,009	198,10	98,10
Lot 16 Xylo 0,01%	108,57	0,236 $\pm$ 0,031	274,15	174,15
Lot 16 Xylo 0,025%	113,14	0,207 $\pm$ 0,001	202,76	102,76
Lot 16 Xylo 0,05%	113,14	0,21 $\pm$ 0,036	209,00	109,00
Lot 16 Xylo 0,075%	114,86	0,196 $\pm$ 0,025	177,20	77,20
Lot 16 Xylo 0,1%	115,43	0,173 $\pm$ 0,031	129,44	29,44

Concernant la prolifération cellulaire

L'incubation des fibroblastes avec les échantillons de xyloglucane aux concentrations indiquées ci-dessus et dans les conditions testées (96 heures) a pour résultat une augmentation de la quantité de cellules du dosage à toutes les concentrations de xyloglucane. L'indice de prolifération cellulaire le plus faible est de 8,6 % à la plus faible concentration testée

(0,01 %), tandis que l'indice de prolifération le plus élevé est de 15,4 %, avec un échantillon de xyloglucane à 0,1 %. Aux autres concentrations testées, l'augmentation de la quantité de cellules reste comprise entre 13 et 14 %, cette valeur ne différant pas de la valeur maximale obtenue (15,4 %).

Concernant la synthèse de collagène

Quand on l'applique à 0,01 % pendant une période de 96 heures, l'échantillon conduit à une augmentation de 174,15 % de la synthèse de collagène. Aux concentrations de polysaccharide de 0,025 et 0,05 %, l'augmentation de la synthèse de collagène est de 102 et 109 %, respectivement. Ces résultats sont similaires à celui trouvé pour le témoin positif du dosage (TGF- α , 98,1 %) et significativement supérieurs à celui pour le témoin de base du dosage (cellules incubées uniquement avec du milieu de culture).

Aux deux concentrations de dosage les plus élevées (0,075 et 0,1 %), les taux d'augmentation de collagène sont inférieurs à ceux observés pour les autres concentrations de l'échantillon (77,2 et 29,4 %, respectivement), mais toujours significativement supérieurs à celui pour le témoin négatif du dosage.

2) Sénescence cellulaire in vitro

Le but de cette étude était de déterminer le potentiel des ingrédients actifs pour protéger les cellules vis-à-vis du vieillissement cellulaire provoqué par une exposition successive à un rayonnement UVB, en utilisant le paramètre de réduction de marqueur de sénescence, la β -galactosidase (enzyme de liposome). On peut utiliser ce test pour déterminer si la présence d'ingrédients actifs dans les fibroblastes de derme humain peut ou non retarder l'augmentation de l'expression de

l'enzyme alpha-galactosidase, qui est associée aux cellules dans un état de sénescence cellulaire (vieillesse). Après décongélation du lot de cellules, les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 10 % de SFB, dans une atmosphère avec 5 % de CO₂, et à une température de 37°C. Après placage, les cellules sont cultivées dans les mêmes conditions pendant au moins 48 heures.

Après cette période, l'une des plaques de cellules va être exposée à un rayonnement UVB pendant 6 minutes, durant 5 jours (1 exposition par jour), et l'autre va uniquement être incubée avec la solution tampon (PBS) pendant les mêmes périodes. Les cellules du groupe témoin sont traitées uniquement avec de la PBS et du milieu de culture ; le groupe de traitement est incubé avec l'ingrédient actif qui est testé, dilué dans de la PBS (au moment de l'exposition au rayonnement) ou du milieu de culture (intervalles entre les expositions au rayonnement). Une fois que l'exposition est terminée, les cellules restent au repos pendant 48 à 72 heures (pour consolider l'effet chronique résultant de l'exposition au rayonnement), incubées dans du milieu (témoin) ou avec l'ingrédient actif dilué dans du milieu (groupe de test). Après cette période, les cellules sont exposées au substrat provenant de l'enzyme b-galactosidase, qui est converti en chromogène bleu après 12 heures d'incubation. Les cellules témoins négatives ont jusqu'à 10 % de cellules positives à la b-galactosidase ; les cellules témoins positives (exposées aux UVB sans la protection des ingrédients actifs) ont de 45 à 65 % de cellules positives à la beta-galactosidase.

- Le procédé pour réaliser le vieillissement de fibroblastes de derme humain in vitro a été développé et validé par le projet Galápagos (Funil de Tecnologia / Natura). Toutefois, l'utilisation de ces cellules dans des applications expérimentales potentielles (par exemple une

détermination de l'activité métabolique de cellules sénescents, une réduction de la sénescence) n'a pas encore été complètement validée en présence de substances témoins.

Résultats

Le Tableau II indique le pourcentage de cellules positives à la b-galactosidase +/- l'écart-type du pourcentage après traitement avec les échantillons contenant des xyloglucanes obtenus conformément à la présente invention.

	Traitement	β-gal positives
UVB -	Témoin C	10,96 +/- 1,77
UVB +		49,72 +/- 1,80
UVB -	Xylo 12B	11,25 +/- 0,2
UVB +		39,55 +/- 2,06

Les résultats du dosage démontrent que la présence de 0,01 % de xyloglucane a pour résultat une réduction de 10 % de la population de cellules vieilles, déterminée par le pourcentage de cellules positives à b-gal, après la période d'exposition fractionnée aux UVB. La présence de l'ingrédient actif protège les cellules contre des dommages provoqués par le photovieillissement.

Conclusion

En résumé, on observe que le xyloglucane est capable d'augmenter la synthèse de collagène, d'augmenter l'expression du gène de collagène de type I, d'augmenter la synthèse de tropoélastine, et d'augmenter la prolifération cellulaire. De plus, il protège les cellules vis-à-vis du vieillissement cellulaire induit par une exposition prolongée à un rayonnement UVB dans le modèle de sénescence cellulaire. Tous ces dosages ont été réalisés en culture cellulaire, utilisant des fibroblastes de derme humain.

Bénéfice	Concentration testée	% d'augmentation	Rapport in vitro
Prolifération cellulaire	0,05 %	15	24/08
Collagène	0,01 % – 0,1 %	40–80	24/08
Expression du gène de collagène de type I	0,05 %	75 %	–
Production de tropoélastine	0,01 %	68 %	–
Sénescence cellulaire	0,01 %	10 %	55/08

En plus des avantages décrits ci-dessus, il est vérifié que les polysaccharides de la présente invention peuvent être utilisés en tant qu'agents épaississants dans des compositions cosmétiques. La Figure 3 contient un graphique qui montre l'activité épaississante améliorée du polysaccharide de la présente invention par comparaison avec la gomme xanthane.

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation ci-dessus décrits et représentés, à partir desquels on pourra prévoir d'autres modes et d'autres formes de réalisation, sans pour autant sortir du cadre de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour obtenir des polysaccharides à partir de semences de *jatoba* caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) traitement des semences ;
- b) extraction aqueuse à 1 % à 5 % en masse de poudre par volume, de préférence 2 % en masse de poudre par volume ;
- c) précipitation à l'éthanol à 96°GL utilisant 1 à 3 fois le volume d'extrait aqueux ;
- d) filtration à la presse du précipité obtenu en c) ;

- e) solubilisation des polysaccharides obtenus dans l'étape (d) avec de l'eau ; et
- f) séchage des polysaccharides obtenus dans l'étape (e).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de séparation des polysaccharides après l'étape d'extraction aqueuse.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'étape de séparation est une centrifugation.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la centrifugation est effectuée à 4100 t/min pendant 15 minutes.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape d'extraction aqueuse est mise en œuvre à une température de 70°C pendant 4 heures.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la déshydratation du surnageant est réalisée par séchage par pulvérisation.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la déshydratation du surnageant est réalisée par lyophilisation.

8. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend le polysaccharide obtenu par le procédé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. Utilisation de polysaccharides provenant de semences de *jatoba*, caractérisée en ce qu'elle réside dans la préparation d'une composition cosmétique anti-rides ou anti-âge.

10. Utilisation de polysaccharides provenant de semences de *jatoba*, caractérisée en ce qu'elle réside dans un agent épaississant dans des compositions cosmétiques.

ABREGE DESCRIPTIF

PROCEDE D'OBTENTION DE POLYSACCHARIDES A PARTIR DE SEMENCES DE *JATоба*, COMPOSITION COSMETIQUE COMPRENANT LESDITS POLYSACCHARIDES

La présente invention concerne un procédé pour obtenir des polysaccharides à partir de semences de *jatoba*, comprenant les étapes suivantes :

- a) traitement des semences (procédé à sec) ;
- b) extraction aqueuse à 1 % à 5 % en masse de poudre par volume, de préférence 2 % en masse de poudre par volume ;
- c) précipitation à l'éthanol à 96°GL utilisant 1 à 3 fois le volume d'extrait aqueux ;
- d) filtration à la presse du précipité obtenu en c) ;
- e) solubilisation des polysaccharides obtenus dans l'étape (d) avec de l'eau ; et
- f) séchage des polysaccharides obtenus dans l'étape (e).

Dans un autre mode de réalisation, la présente invention concerne une composition cosmétique contenant des polysaccharides obtenus conformément au procédé défini ci-dessus, et l'utilisation desdits polysaccharides.

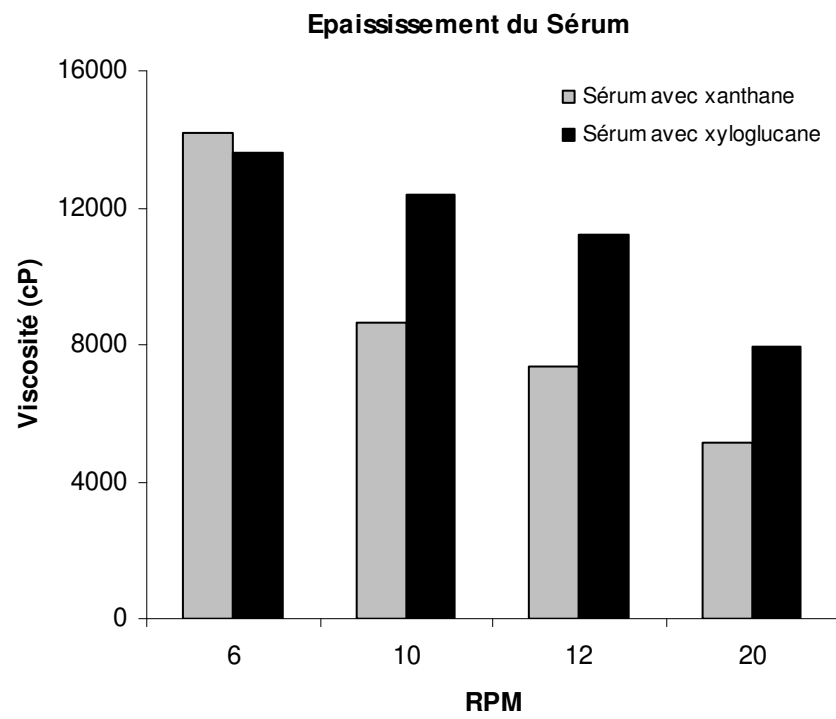
FIGURE 1



FIGURE 2



FIGURE 3



Patente 2

"Processo INPI: PI-P035055-9 na pasta NPI120"

PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE E USO DE HEMICELULOSE COMO ADITIVO DE RESISTÊNCIA PARA APERFEIÇOAMENTO DE MATERIAL CELULÓSICO

Campo da Invenção

A invenção refere-se à utilização de polissacarídeos de parede celular como aditivo para o aperfeiçoamento das propriedades mecânicas de materiais celulósicos.

Fundamentos da Invenção

A resistência é uma propriedade estrutural da folha de papel, que é derivada principalmente da formação de ligações entre fibras, à medida que a estrutura fibrosa é formada e seca. A resistência de um papel depende da resistência das fibras individuais e das ligações entre as fibras, do número de ligações e da distribuição das ligações e das fibras (formação). Inúmeras forças atuam na formação de ligações entre fibras. A mais importante é a ponte de hidrogênio, embora outras forças como ligações covalentes, iônicas e de van der Waals estejam presentes. Embora as pontes de hidrogênio sejam fracas, especialmente em água, elas aumentam a resistência do papel devido ao seu grande número. As pontes de hidrogênio são formadas a uma distância pequena e as superfícies de ligação devem estar em contato molecular.

O tipo de fibra, o processo de polpação, branqueamento e refinação apresentam uma importância fundamental nas propriedades da pasta, e que se refletem na característica de resistência do papel.

A tabela abaixo apresenta as principais diferenças entre as pastas químicas e mecânicas, que influenciam nas características físicas do papel.

PROPRIEDADES	PASTAS MECÂNICAS	PASTAS QUÍMICAS
Quantidade de lignina	Elevada	Baixa
Quantidade de hemiceluloses	Elevada	Baixa
Grau de polimerização	Elevado na celulose	Elevado
Carga em suspensão aquosa	Mais aniônica	Menos aniônica
Afinidade com água	Mais hidrofóbica	Mais hidrofílica
Fibras longas por unidade de massa	Poucas	Muitas
Área superficial específica	Grande	Pequena
Teor de finos	Alto	Baixo
Formato das fibras	Curtas e espessas	Longas e finas
Grau de colapsabilidade das fibras	Menos colapsadas	Mais colapsadas
Rigidez das fibras	Alta	Baixa

O baixo teor de lignina das pastas químicas confere às fibras maior flexibilidade, colapsabilidade e habilidade e inchamento em meio aquoso, do que às fibras de pastas mecânicas.

A estrutura da trama do papel depende da colapsabilidade, conformabilidade e flexibilidade das fibras em meio aquoso. Estes fatores e o inchamento das fibras determinam a densificação da estrutura do papel na prensagem a úmido e na secagem.

A conformabilidade das fibras caracteriza o comportamento das mesmas no processo de consolidação da folha. Fibras com maior conformabilidade podem curvar e se ajustar ao formato de outra fibra, formando assim uma trama mais densa e mais bem ligada. A conformabilidade das fibras depende das dimensões de sua seção transversal, da fibrilação interna (refinação) e da composição química e morfológica da parede celular. Existe uma dependência linear entre a colapsabilidade e a espessura da parede das fibras. Por isso, o colapso de fibras de pastas químicas é mais comum do que em fibras de pasta mecânica. Fibras colapsadas são mais flexíveis e podem apresentar uma maior área de ligação do que fibras tubulares não colapsadas, o que melhora as propriedades de resistência do papel.

O grau de inchamento das fibras depende da sua composição química e da fibrilação interna. As hemiceluloses promovem o inchamento das fibras, enquanto que a lignina o inibe. Por isso as pastas químicas sofrem maior inchamento do que as pastas mecânicas.

As pastas mecânicas em comparação às pastas químicas apresentam folhas com maior corpo e com elevado espalhamento de luz. Usando pastas mecânicas é possível produzir um papel com rigidez aceitável a uma gramatura consideravelmente menor, do que usando pastas químicas. Quando comparadas ao mesmo nível de drenabilidade, as pastas termomecânicas apresentam maior corpo e melhores propriedades de resistência do que as pastas mecânicas, enquanto que estas últimas apresentam uma maior permeabilidade ao ar.

A resistência de uma trama fibrosa pode ser aumentada mecanicamente, através de refinação, que com o aumento da quantidade de microfibrilas, através da fibrilação interna e externa, promove a formação de ligações entre as fibras.

Uma outra forma de aumentar a resistência do papel é pela adição de aditivos de resistência, que aumentam uma ou mais das seguintes características: resistência da ligação entre fibras, número de ligações e distribuição das ligações, sem, entretanto, alterar a resistência das fibras. Os aditivos de resistência são geralmente polímeros hidrofílicos solúveis em água, podendo ser naturais ou sintéticos. Entre os produtos comerciais mais comumente empregados na indústria de papel encontram-se: amido, gomas vegetais, CMC e polímeros sintéticos.

Baseado neste conhecimento procurou-se alterar as características superficiais das fibras de pastas mecânicas, através da adição de hemiceluloses (polissacarídeos vegetais), visando aumentar a resistência do papel confeccionado com pastas mecânicas.

As hemiceluloses são polissacarídeos encontrados na parede celular de plantas, e estão intimamente associadas à celulose. A celulose é formada somente de monômeros de β - D - glucose ligados por carbonos 1 e 4, formando uma estrutura linear, enquanto as hemiceluloses são polímeros ramificados, cujas unidades são constituídas por hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), pentoses (D-xilose, L-arabinose e D-arabinose), ou deoxyhexoses (L-ramnose ou 6-deoxi-L-manose e raramente L-fucose ou 6-deoxi-L-galactose). Pequenas quantidades de certos ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-D-glucorônico, ácido D-galacturônico, e ácido D-glucorônico) também estão presentes.

Estas unidades existem principalmente como estruturas de seis membros (piranose), tanto na forma alfa, como na forma beta.

Xiloglucanos e galactomananos são as principais hemiceluloses encontradas na parede primária e secundária das células de plantas dicotiledôneas, aonde a sua interação com a celulose tem um papel importante nas propriedades da parede celular. Na parede secundária (em sementes), estas hemiceluloses servem como polissacarídeos de reserva. Os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRCR) podem ser classificados, de acordo com as suas estruturas químicas em mananos, xiloglucanos e galactomananos. Apesar das diferenças marcantes nas estruturas químicas, os polímeros dos três grupos apresentam propriedades físico-química semelhantes. Eles possuem em comum a função reserva, uma vez que são completamente degradados após a germinação da semente e seus produtos são utilizados como fonte de carbono e energia para o crescimento inicial das plântulas. Eles também apresentam funções secundárias, como controle da embebição e distribuição de água nos tecidos das sementes e o controle da expansão celular dos cotilédones.

Os galactomananos são compostos por monômeros de β -manose ligados por carbonos 1 e 4, formando uma estrutura linear, com ramificação de unidade de resíduos de galactosil. Este polissacarídeo ocorre, em grande parte, como composto de reserva em sementes de espécies leguminosas.

Alguns exemplos de sementes que produzem mananos são: *Dimorphandra mollis*, *Cyamopsis tetragonolobus*, *Ceratonia siliqua*, *Sesbania virgata*, *Schizolobium parahyba* e *Trigonella foenum-graecum*. A proporção entre mananose e galactose (M/G) difere de acordo com a origem das sementes.

Os xiloglucanos têm estrutura de glucanos similar à da celulose, com ramificação de unidades de xilose e xilose-galactose.

Alguns exemplos de sementes produtoras de xiloglucanos são: *Hymenaea courbaril*, *Copaifera langsdorffi*, *Eucalyptus grandis* e *Tropaeolum majus*.

O acúmulo de hemiceluloses nas sementes pode alcançar cerca de 40% da massa seca das sementes.

As hemiceluloses de sementes são muito diferentes das hemiceluloses encontradas em madeira. Em coníferas as hemiceluloses encontradas em maior proporção são glucomananos e galactomananos, enquanto que glucoronoxilanos são as principais hemiceluloses das folhosas.

Com base nestas experiências e no uso de polissacarídeos de reserva de sementes ("goma" guar e "goma" caroba - locust bean gum) como aditivos para aumento da resistência do papel, desenvolveu-se a presente invenção.

De uma maneira geral, boa parte dos tipos de materiais celulósicos (papel, papelão etc.) é produzido a partir de uma suspensão de fibras

celulósicas (ou de polpa celulósica). Tipicamente as fibras celulósicas são hidratadas e misturadas à água para a formação dessa suspensão. Em seguida, aditivos são adicionados a esta polpa hidratada que, conseqüentemente, após agitação controlada, é despejada em equipamentos específicos onde os materiais celulósicos (papel, papelão etc.) são formados, prensados e secos.

No processo descrito acima, utilizando-se polpas produzidas de fibras celulósicas (recicladas ou não) obtidas, tanto pelo processo mecânico, semi-químico ou químico, é necessária a adição de agentes químicos à polpa (aditivos), a fim de que se obtenha um produto final com propriedades ideais e adequadas para a sua finalidade de utilização.

Os diferentes processos de obtenção de fibras celulósicas fornecem polpas com características de resistência diferentes, dependendo das características superficiais das fibras. Para melhorar as características de resistência das fibras deve-se aplicar energia de modo a modificar a estrutura da fibra ou adicionar produtos químicos que ao se depositar na superfície das fibras aumente o seu potencial de ligação.

É nesse contexto de suprir a necessidade na indústria de encontrar processos ambientalmente compatíveis para aperfeiçoar as propriedades de resistência de materiais celulósicos que os autores da presente invenção sugerem a utilização de polissacarídeos de parede celular (PPC) como alternativa para esses aditivos.

Hemiceluloses de parede celular são polímeros (polissacarídeos) que, na composição da parede celular, se associam às fibras e às microfibrilas de celulose, permitindo que as mesmas se arranjem, formando um complexo dinâmico e tridimensional. Alguns desses polissacarídeos, cuja função primária seria promover a formação do arranjo das fibras e microfibrilas citadas a fim de contribuir na formação da estrutura da

parede celular, ao longo da evolução, adquiriram propriedades secundárias. Tais propriedades secundárias passaram a ser as grandes responsáveis por muitas estratégias fisiológicas que favoreceram a sobrevivência dos organismos.

A fim de se beneficiarem com as funções secundárias dessas hemiceluloses como, por exemplo, a reserva, a dureza (proteção) e o controle de relações hídricas, de crescimento celular e de embebição; os organismos, evolutivamente, passaram a acumular esses polímeros na própria estrutura da parede em maior quantidade, de modo que, extraí-los em considerável escala para funções comerciais, tornou-se plausível.

Com base em tais fundamentos, é proposta a utilização de hemiceluloses que adquiriram funções secundárias como os polissacarídeos de parede celular, como aditivos a compostos celulósicos de utilização industrial, como, por exemplo, o papel e seus derivados.

Os polissacarídeos de parede celular correspondem a quaisquer compostos de peso molecular entre 1000 e 2 milhões de Dalton resultantes da condensação de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses, bem como múltiplas hidroxilas que, podem ser encontrados na parede celular e que estejam associados direta ou indiretamente às fibras de celulose no arranjo dessa estrutura.

Para a realização de maneira preferencial da invenção foram extraídos polissacarídeos de parede celular usando os seguintes passos:

- a) Extração de hemicelulose da parede secundária de sementes de espécies vegetais;
- b) Embebição de sementes escarificadas mecanicamente ou de sementes intactas;
- c) Separação ou não de cotilédones ou endosperma da casca e eixo embrionário das sementes;

- d) Secagem dos tecidos separados ou semente intacta embebida;
- e) Moagem dos tecidos ou semente intacta secos;
- f) Extração aquosa de 1% das sementes e tecidos separados obtidos na etapa "e", nas seguintes condições:
 - Temperatura entre 55°C e 80°C;
 - Tempo entre 6 e 10 horas; e
 - Sob agitação constante.
- g) Filtração do insolúvel;
- h) Precipitação com etanol de 2 a 6 vezes o volume inicial;
- i) Repouso nas seguintes condições:
 - Temperatura entre 3°C e 7°C; e
 - Tempo entre 10 e 15 horas.
- j) Re-suspensão do precipitado seco de 1% em água, nas seguintes condições:
 - Temperatura de 40°C a 80°C;
 - Tempo de 5 a 10 horas; e
 - Sob agitação constante.
- k) Nova filtragem do insolúvel; e
- l) Secagem da suspensão.

A presente invenção partiu do fato de que os polissacarídeos de parede celular, presentes nas paredes celulares dos organismos, são capazes de interagir com as fibras e microfibrilas de celulose presentes na polpa celulósica. Esse polímero interage com a celulose através de pontes de hidrogênio e essa interação no processo, trata-se de uma estratégia ambientalmente correta para incrementar as propriedades de resistência e/ou retenção de forma de materiais celulósicos, como alternativa de substituição de outros aditivos químicos ainda utilizados para os mesmos fins.

Assim, subte-se que o tratamento da polpa celulósica com polissacarídeos de parede celular favorece as propriedades citadas porque esses polímeros têm a capacidade de se arranjar e de se ligarem as fibras celulósicas cobrindo-as total ou parcialmente como acontece *in vivo*.

A invenção é ainda mais ilustrada nos exemplos a seguir:

EXEMPLO 1:

Para ilustrar e demonstrar que os polissacarídeos de parede celular interagem com as fibras de celulose em derivados celulósicos, utilizou-se micrografias obtidas com microscopia de varredura a fim de localizar as regiões de interação das moléculas a que se refere.

As fotos da figura 1 se referem a um derivado celulósico (no caso, o papel), formado após adição de polissacarídeos de parede celular à polpa celulósica em suspensão antes da formação do mesmo. Para melhor destaque das regiões de interação, fotos controle no mesmo aumento foram colocadas em paralelo para destaque.

As Micrografias eletrônicas de varredura de derivados celulósicos ilustram a interação dos polissacarídeos de parede celular com as fibras de celulose. As duas imagens superiores foram realizadas com aumento de 80 vezes e as duas inferiores foram realizadas com um aumento de 2800 vezes. Sendo as duas imagens do lado esquerdo (1A e 1C), imagens controle, onde não possui polissacarídeo de parede celular.

EXEMPLO 2:

O Exemplo 2 de incremento dos parâmetros mecânicos obtidos após adição de polissacarídeos de parede celular (PPC) pode ser observado na Tabela 1. Na tabela o PPC utilizado foi o xiloglucano.

O xiloglucano é formado por uma cadeia principal de celulose à qual

unidades de glicose aparecem ligadas entre si por ligações glicosídicas tipo β ,1-4, podendo conter nas ramificações laterais, unidades de xilose, xilosil- β ,1-2-galactose e xilosil- β ,1-2-galactosil- α ,1-2-fucose). No caso de xiloglucano de reserva de sementes, não ocorre a fucose terminal. Todos estes tipos substituintes ligam-se às glicoses da cadeia principal através de ligações α ,1-6. Em relação a sua ocorrência, sabe-se que o xiloglucano está presente na parede celular de muitas plantas, especialmente nas sementes de leguminosas, cuja localização é predominantemente cotiledonar.

De acordo com os dados mostrados na Tabela 1, os valores obtidos nos parâmetros mecânicos, à exceção da espessura, de uma maneira geral, aumentaram. Em relação ao incremento dos valores, estes, tenderam a ser mais significativos quando houve adição de 0,5% de xiloglucano na polpa suspensa antes da formação das folhas. Entre parênteses, estão expressas as porcentagens desse incremento em cada parâmetro. Em relação à espessura, a diminuição da mesma pode significar uma maior adesão entre as fibras de celulose arranjadas para formar a folha e um reforço generalizado à resistência.

TABELA 1: Determinação dos incrementos nos parâmetros mecânicos conhecidos da arte após a adição de três concentrações distintas de xiloglucano à polpa celulósica em suspensão para a formação de derivados celulósicos. Os valores obtidos estão numericamente descritos em cada campo. Os valores entre parênteses correspondem à porcentagem de melhoria (incremento) para cada parâmetro em relação ao controle.

Parâmetros Mecânicos	Controle	0,5% de PPC	1,0% de PPC	1,5% de PPC
Espessura (um)	270	234,7 (13,07)	249,85 (7,46)	226 (16,3)
Porosidade (s/100ml)	7,6	11,38 (49,74)	10,07 (32,5)	12,83 (68,82)
Estouro (kPa)	43,68	58,58 (34,11)	56,71 (29,83)	55,26 (26,51)
Tração (Nm/g)	13,46	16,92 (25,71)	15,86 (17,83)	15,71 (16,72)
Rigidez (gf.cm)	4,72	5,7 (20,76)	4,96 (5,08)	5,12 (8,48)
Rasgo (mN)	211,75	334,8 (58,11)	292 (37,9)	291,4 (37,62)
Delaminação (kg.f/pol2)	10,79	19,18 (75,96)	16,32 (49,72)	16,25 (49,08)

EXEMPLO 3:

O Exemplo 3 de incremento dos parâmetros mecânicos obtidos após adição de polissacarídeos de parede celular (PPC) pode ser observado na Tabela 2. Na tabela o PPC utilizado foi o galactomanano.

Estruturalmente esses polímeros são formados por uma cadeia linear de unidades de manose unidas por ligações glicosídicas β ,1-4, à qual unidades de galactose estão unidas por ligações do tipo α ,1-6. Os galactomananos ocorrem tipicamente em endospermas de sementes de leguminosas, mas eles também estão presentes em sementes de espécies

de outras famílias como Asteraceae e Convolvulaceae.

Conforme mostrado na Tabela 2, os valores obtidos nos parâmetros mecânicos, à exceção da espessura, de uma maneira geral, aumentaram. Em relação ao incremento dos valores, estes, tenderam a ser mais significativos quando houve adição de 1,5% (após leve aumento na adição de 0,5% de PPC) de galactomanano na polpa suspensa antes da formação das folhas. Entre parênteses, estão expressas as porcentagens desse incremento em cada parâmetro. Em relação à espessura, da mesma forma que no Exemplo 1, sua diminuição pode significar uma maior adesão entre as fibras de celulose arranjadas para formar a folha e um reforço generalizado à resistência.

TABELA 2: Determinação dos incrementos nos parâmetros mecânicos conhecidos da arte após a adição de três concentrações distintas de galactomanano à polpa celulósica em suspensão para a formação de derivados celulósicos. Os valores obtidos estão numericamente descritos em cada campo. Os valores entre parênteses correspondem à porcentagem de melhoria (incremento ou decréscimo) para cada parâmetro em relação ao controle.

Parâmetros Mecânicos	Controle	0,5% de PPC	1,0% de PPC	1,5% de PPC
Espessura (um)	270	252,38 (-6,53)	246 (-8,89)	246,33 (-8,77)
Porosidade (s/100ml)	7,6	9,68 (27,37)	9,57 (25,92)	9,69 (27,5)
Estouro (kPa)	43,68	53,76 (23,08)	58,73 (34,46)	62,66 (43,45)
Tração (Nm/g)	13,46	13,67 (1,56)	14,22 (5,65)	14,74 (9,51)
Rigidez (gf.cm)	4,72	4,85 (2,75)	5,02 (6,36)	6,44 (36,44)
Rasgo (mN)	211,75	258,5 (22,08)	266,75 (25,97)	341,33 (61,19)
Delaminação (kg.f/pol2)	10,79	15,28 (40,18)	17,78 (63,12)	19,49 (78,81)

A abrangência da presente patente de invenção, portanto, não deve ser limitada aos exemplos ilustrados, mas sim, apenas aos termos definidos nas reivindicações e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, caracterizado pelo fato de que a hemicelulose é obtida através das seguintes etapas:

- a) Extração da hemicelulose da parede secundária de sementes de espécies vegetais;
- b) Embebição de sementes escarificadas mecanicamente;
- c) Separação de cotilédones e eixo embrionário das sementes;
- d) Secagem dos tecidos separados embebidos;
- e) Moagem dos tecidos secos;
- f) Extração aquosa de 1% dos tecidos separados obtidos na etapa "e", nas seguintes condições:
 - Temperatura entre 55°C e 80°C;
 - Tempo entre 6 e 10 horas; e
 - Sob agitação constante.
- g) Filtração do insolúvel;
- h) Precipitação com etanol de 2 a 6 vezes o volume inicial;
- i) Repouso nas seguintes condições:
 - Temperatura entre 3°C a 7°C; e
 - Tempo entre 10 e 15 horas.
- j) Re-suspensão do precipitado seco de 1% em água, nas seguintes condições:
 - Temperatura de 40°C a 80°C;

- Tempo de 5 a 10 horas; e
- Sob agitação constante.

k) Nova filtragem do insolúvel; e

l) Secagem da suspensão.

2. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com as reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que as espécies vegetais são do grupo das Leguminosas.

3. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) a embebição pode ser de sementes intactas.

4. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) ao invés de separar os cotilédones das sementes, pode haver a separação do endosperma da casca.

5. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com as reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) ao invés de separar os cotilédones ou endosperma da casca, pode-se manter a semente intacta.

6. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (d) ao invés de realizar a secagem dos tecidos separados, pode-se realizar a secagem da semente intacta.

7. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (e) ao invés de realizar a moagem de tecidos, pode-se realizar a moagem da semente intacta.

8. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (f) a

extração aquosa de 1% pode ser das sementes.

9. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com as reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (f) a extração aquosa de 1% pode ser das sementes intactas juntamente com os tecidos.

10. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com as reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (f) a extração aquosa de 1% será realizada mais preferivelmente em temperatura entre 65° e 75°C.

11. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com as reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (f) a extração aquosa de 1% será realizada preferencialmente no tempo de 7 a 9 horas.

12. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (h) a precipitação com etanol será preferencialmente de 3 a 5 vezes o volume inicial.

13. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (i) o repouso será realizado preferencialmente na temperatura entre 4° e 6°C.

14. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com as reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (i) o repouso será realizado preferencialmente no tempo de 11 a 13 horas.

15. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (j) a re-suspensão do precipitado será realizada preferencialmente a temperatura de 50° a 70°C.

16. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE, de acordo

com as reivindicações 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (j) a re-suspensão do precipitado será realizada preferencialmente no tempo de 7 a 9 horas.

17. USO DE HEMICELULOSE COMO ADITIVO DE RESISTÊNCIA PARA APERFEIÇOAMENTO DE MATERIAL CELULÓSICO, caracterizado pelo fato de que a hemicelulose é adicionada a pasta celulósica para alterar as características superficiais das fibras proporcionando aperfeiçoamento das propriedades de resistência dos materiais celulósicos.

18. USO DE HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que as hemiceluloses se associam às fibras e às microfibrilas de celulose, permitindo que se arranjem, formando um complexo dinâmico e tridimensional.

19. USO DE HEMICELULOSE, de acordo com as reivindicações 17 e 18, caracterizado pelo fato de que tais associações às fibras e às microfibrilas de celulose beneficiam os parâmetros mecânicos de resistência dos materiais celulósicos.

20. USO DE HEMICELULOSE, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que tais parâmetros mecânicos são: Espessura, porosidade, estouro, tração, rigidez, rasgo e delaminação.

RESUMO

PROCESSO DE OBTENÇÃO DA HEMICELULOSE E USO DE HEMICELULOSE COMO ADITIVO DE RESISTÊNCIA PARA APERFEIÇOAMENTO DE MATERIAL CELULÓSICO

Através da extração de polissacarídeos de parede celular retirados de parede celular de algumas espécies vegetais foi verificado que é possível utilizá-los para aperfeiçoar as propriedades de resistência e rigidez de materiais celulósicos, de modo que, correspondentemente, a presente invenção refere-se a um processo para proporcionar um material celulósico com maior resistência ao estouro, à tração, à delaminação, ao rasgo e mais rígido.

FOTO 1A

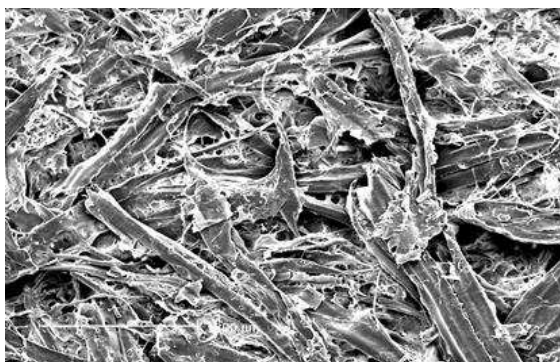


FOTO 1B

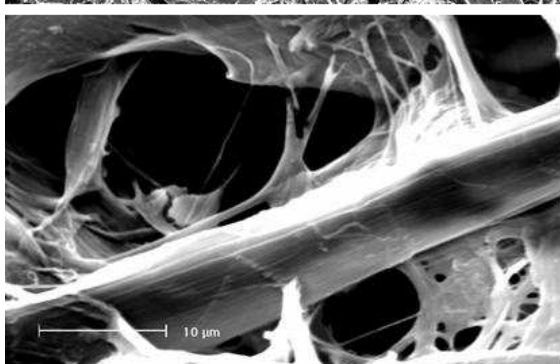
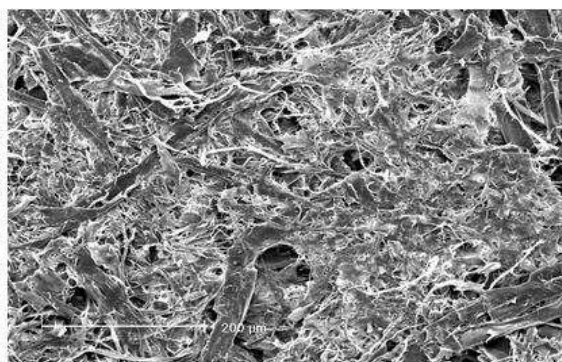


FOTO 1C

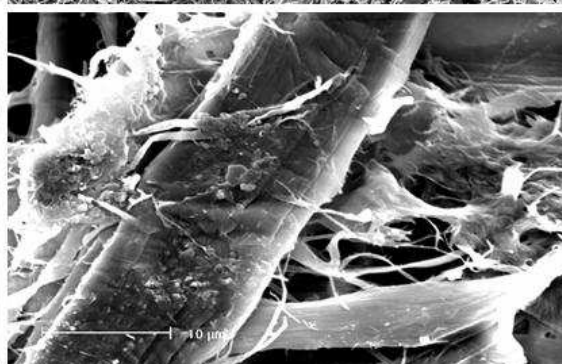


FOTO 1D

FIGURA 1

Patente 3

"Patente na sua versão definitiva em procedimento jurídico para depósito"

Depositante: Suzano Papel e Celulose

Inventores: César Gustavo Serafim Lisboa, Silvia Bugajer e Marcos Silveira Buckeridge.

PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMARIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO

Campo da invenção

A invenção refere-se à utilização de hemiceluloses de parede celular primária que necessitam de componentes alcalinos e ácidos para sua obtenção como aditivos para o aperfeiçoamento das propriedades mecânicas de materiais celulósicos.

Fundamentos da invenção

De uma maneira geral, boa parte dos tipos de materiais celulósicos (papel, papelão etc.) é produzida a partir de uma suspensão de fibras celulósicas (ou de polpa celulósica). Tipicamente as fibras celulósicas são hidratadas e misturadas à água para a formação dessa suspensão. Em seguida, aditivos são adicionados a esta polpa hidratada que, conseqüentemente, após agitação controlada, é despejada em equipamentos específicos onde os materiais celulósicos (papel, papelão, papelcartão etc.) são formados, prensados e secos.

No processo descrito acima, utilizando-se polpas produzidas de fibras celulósicas (recicladas ou não) obtidas, tanto pelo processo mecânico, semi-químico ou químico, é necessária a adição de agentes químicos à polpa (aditivos), a fim de que se obtenha um produto final com propriedades ideais e adequadas para a sua finalidade de utilização.

Os diferentes processos de obtenção de fibras celulósicas fornecem polpas com características de resistência diferentes,

dependendo das características superficiais das fibras. Para melhorar as características de resistência das fibras deve-se aplicar energia de modo a modificar a estrutura da fibra ou adicionar produtos químicos que ao se depositarem na superfície das fibras aumentem o seu potencial de ligação.

É nesse contexto de suprir a necessidade na indústria de encontrar processos ambientalmente compatíveis para aperfeiçoar as propriedades de resistência de materiais celulósicos que os autores da presente invenção sugerem a utilização de hemiceluloses de parede celular primária como alternativa para esses aditivos.

Hemiceluloses de parede celular são polímeros (polissacarídeos ou carboidratos) que, na composição da parede celular, se associam às fibras de celulose, permitindo que as mesmas se arranjam, formando um complexo dinâmico e tridimensional. Assim, dos três domínios que constituem as paredes celulares dos organismos, o primeiro, aqui descrito, é formado, portanto, por microfibrilas de celulose entrelaçadas por tais hemiceluloses, que, nesse ponto, conferem basicamente resistência mecânica a parede celular dos organismos. Assume-se que as hemiceluloses de parede celular ligam-se às microfibrilas de celulose através de pontes de hidrogênio, sendo que, a remoção das mesmas causa colapso entre as microfibrilas, fazendo com que elas percam o espaçamento e a orientação, o que resulta na formação de agregados sobrepostos.

As hemiceluloses agrupam vários polissacarídeos e, alguns desses, cuja função primária seria promover a formação do arranjo das microfibrilas citadas a fim de contribuir na formação da estrutura da parede celular, ao longo da evolução, adquiriram propriedades secundárias na chamada parede celular secundária. Tais propriedades secundárias passaram a ser as grandes responsáveis por muitas estratégias fisiológicas que favoreceram a sobrevivência dos

organismos, assim como a parede secundária que, estruturalmente se sobrepõe sobre a parede primária que contem apenas as hemiceluloses que não adquiriram funções secundárias.

A fim de se beneficiarem com as funções secundárias dessas hemiceluloses como, por exemplo, a reserva, a dureza (proteção) e o controle de relações hídricas, de crescimento celular e de embebição; os organismos, evolutivamente, passaram a acumular esses polímeros na própria estrutura da parede em maior quantidade. Tal característica associada a propriedades de solubilidade permitiu a extração dos mesmos, através da simples pulverização dos tecidos e sucessiva extração aquosa (e em quantidades significativamente elevadas). Diferente desse mecanismo de extração, a presente invenção sugere a utilização das hemiceluloses que através desse mecanismo de transferência de funções (previamente descrito), não tenham adquirido propriedades secundárias nas paredes celulares dos organismos (localizando-se nas paredes primárias das células dos organismos) e, que conseqüentemente, não possam ser extraídas de maneira aquosa, sendo, portanto, necessário, para sua obtenção, fazer uso de uma base ou ácido que altere o pH durante o processo. Admite-se que extraí-las é mais difícil, porém, em virtude de estarem mais intimamente ligadas com as fibras de celulose na parede primária dos organismos, também se assume que suas propriedades de adesão e ligação às fibras celulósicas sejam mais significativas.

Com base nos fundamentos acima, os autores propõem a utilização de hemiceluloses de parede celular primária que possam ser extraídas fazendo-se uso de base ou ácido, como aditivos a compostos celulósicos de utilização industrial, como, por exemplo, o papel e seus derivados. Para a comprovação do caráter inventivo da presente defesa de interesse, fez-se uso de hemiceluloses de parede celular primária de

sementes e plântulas (crescidas na presença e ausência de luz) de eucalipto (*Eucalyptos grandis*).

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes (A) e de plântulas (B) de eucalipto na diminuição da porosidade de folhas de papel de pasta mecânica representada pelo aumento da resistência à passagem de uma coluna de ar de velocidade igual a 100 ml por segundo; de acordo com normas e parâmetros internacionais para a detecção de tal propriedade mecânica.

Figura 2: Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes (A) e de plântulas (B) de eucalipto no aumento da capacidade de resistência da folha ao estouro, representado pelo incremento da resistência a uma pressão aplicada constante e de acordo com normas e parâmetros internacionais para a detecção de tal propriedade mecânica.

Figura 3: Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes (A) e de plântulas (B) de eucalipto no aumento da capacidade de resistência da folha à tração, representado pelo incremento dessa resistência a uma tração constante, aplicada e calibrada, de acordo com normas e parâmetros internacionais para a detecção de tal propriedade mecânica.

Figura 4: Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes (A) e de plântulas (B) de eucalipto no aumento da rigidez da folha de papel, representado pelo incremento da rigidez

detectada em aparelho Taber, de acordo com normas e parâmetros internacionais para a detecção de tal propriedade mecânica.

Figura 5: Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes (A) e de plântulas (B) de eucalipto no aumento da resistência da folha de papel ao rasgo, representado pelo incremento da resistência detectado de acordo com normas e parâmetros internacionais para a detecção de tal propriedade mecânica.

Figura 6: Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes (A) e de plântulas (B) de eucalipto no aumento da resistência da folha de papel à delaminação, representado pelo incremento da resistência detectado de acordo com normas e parâmetros internacionais para a detecção de tal propriedade mecânica.

Descrição detalhada da invenção

Materiais celulósicos

De acordo com a presente invenção, um material celulósico constitui-se de qualquer material constituído totalmente ou parcialmente por celulose. Constituem exemplos desses materiais, o papel e produtos de polpa.

No contexto da presente invenção, um produto de papel ou de polpa pode constituir-se de qualquer material celulósico contendo lignina, em particular placas de fibras e papel.

Hemiceluloses de Parede Celular Primária (HPCP)

De acordo com a presente invenção, entende-se que hemiceluloses de parede celular primária correspondem a quaisquer compostos de peso molecular entre 1000 e 2 milhões de Dalton resultantes da condensação de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses, bem como múltiplas hidroxilas. E que, possam ser encontradas na parede celular primária dos organismos, e que estejam associados direta ou indiretamente às fibras de celulose no arranjo dessa estrutura, sendo que, devido a forte adesão das mesmas ao componente citado, torna-se necessário, para sua obtenção, fazer uso de componente básico e ácido que altere o pH de extração.

Obtenção das diferentes plântulas de eucalipto

Sementes de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) coletadas em campo foram hidratadas e colocadas para germinar com temperatura de 30° C e por 15 dias. Para a obtenção das plântulas estioladas (crescidas na ausência de luz), privou-se metade do lote desse componente através da cobertura com tecido preto das placas germinadoras. Depois do tempo descrito acima (15 dias), os dois lotes (plântulas crescidas na presença e na ausência de luz) foram retirados ao mesmo tempo para a posterior secagem e extração de suas respectivas hemiceluloses de parede celular primária segundo a metodologia descrita abaixo.

Com a estiolagem das plântulas crescidas sobre a privação de luz, as hemiceluloses extraídas tiveram um maior rendimento e os extratos apresentaram-se mais límpidos, em virtude da ausência do pigmento clorofila. Após os resultados de um teste prévio comparativo entre a extração das HPCP de plântulas normais e estioladas (não comunicado no presente documento), decidiu-se utilizar apenas os extratos

provenientes das plântulas estioladas para a verificação do potencial da presente inventividade. Por esse motivo, os resultados comparativos (sementes *versus* plântulas) aqui expressos, referem-se apenas às HPCP obtidas das plântulas privadas de iluminação durante 15 dias de desenvolvimento.

Obtenção das Hemiceluloses de Parede Celular Primária (HPCP)

Os presentes inventores extraíram os polissacarídeos de parede celular (Hemiceluloses de Parede Celular Primária – HPCP) usando os seguintes passos:

- 1) Secagem e pulverização dos materiais (sementes e plântulas crescidas na ausência de luz);
- 2) Remoção dos açúcares solúveis através de extração etanólica sob agitação;
 - a) Pesou-se os recipientes de utilização para esses procedimentos ainda vazios
 - b) Adicionou-se cerca de 500 mg de material vegetal seco e pulverizado
 - c) Extraíu-se em etanol 80% (v/v) à 80° C durante 20 minutos (sob agitação eventual) o material vegetal adicionado no item acima
 - d) Essa extração foi repetida por mais três vezes
 - e) Armazenou-se (para futura conferencia) o sobrenadante etanólico
 - f) O material restante foi seco em estufa a 60° C por 2 dias
 - g) Adicionou-se cerca de 10 ml de água destilada, congelando em seguida para a posterior liofilização até secagem completa
 - h) Pesou-se os tubos novamente com o material já seco
- 3) Remoção do amido;

- a) Adicionou-se aos tubos, 35 ml de DMSO 90% (v/v) para cada 500 mg de amostra pulverizada
- b) Manteve-se a solução DMSO e amostra sob agitação exaustiva (24 horas)
- c) Centrifugou-se (8000 G) por 10 minutos a 4° C
- d) Descartou-se o sobrenadante
- e) Adicionou-se água ao precipitado, centrifugou-se nas mesmas condições, descartando o sobrenadante;
- f) O passo acima foi repetido por três vezes acompanhando-se a variação de pH até igualar ao pH da água;
- g) Drenou-se os tubos
- h) Secou-se o precipitado em estufa a 60° C por 24 horas
- i) Pesou-se novamente os tubos

4) Remoção das pectinas

- a) Adicionou-se aos tubos, 20 ml de Oxalato de Amônio 0,5% (p/v) para cada 100-200 mg de amostra
- b) Agitou-se
- c) Agitou-se, em seguida, por 1 hora a 80° C
- d) Submeteu-se a amostra ao repouso para resfriamento;
- e) Centrifugou-se por 10 minutos a 8000 G a 4° C
- f) Os passos "a" ao "e" foram repetidos por mais três vezes reunindo, ao final, os sobrenadantes
- g) Lavou-se três vezes em água destilada

5) Extração das Pectinas Esterificadas

- a) Adicionou-se 20 ml de solução NaOH 0,1M, NaBH₄ (3mg/ml) para cada 500 mg de material
- b) Agitou-se por 1 hora a temperatura ambiente
- c) Centrifugou-se levemente para separar o sobrenadante

- d) Neutralizou-se o sobrenadante com ácido acético glacial até que parasse de espumar
- e) Houve a repetição dos passos “a” ao “d” por mais duas vezes
- f) Reuniram-se os sobrenadantes neutralizados e armazenou-se para posterior análise;

6) Obtenção das Hemiceluloses (HPCP)

- a) Lavou-se o precipitado (material vegetal) com água destilada
- b) Adicionou-se 20 ml de solução NaOH 8M, NaBH₄ (3mg/ml) para cada 500 mg de material
- b) Agitou-se por 1 hora a temperatura ambiente
- c) Centrifugou-se levemente para separar o sobrenadante
- d) Neutralizou-se o sobrenadante com ácido acético glacial até que parasse de espumar
- e) Houve a repetição dos passos “a” ao “d” por mais duas vezes;
- f) Reuniu-se os sobrenadantes neutralizados, armazenando e congelando-os
- g) Liofilizou-se a reunião dos sobrenadantes para a obtenção definitiva das HPCP.

Aplicações industriais

Conforme a presente invenção partiu-se do fato de que, as hemicelulares de parede celular primária (HPCP) que necessitam de componentes alcalinos e ácidos para sua obtenção, presentes nas paredes celulares dos organismos, são capazes de interagir com as fibras e microfibrilas de celulose presentes na polpa celulósica. Esse polímero interage com a celulose através de pontes de hidrogênio e essa interação no processo, trata-se de uma estratégia para incrementar as propriedades de resistência e/ou retenção de forma de materiais

celulósicos, como alternativa de substituição de outros aditivos químicos ainda utilizados para os mesmos fins.

Assim, subentende-se que o tratamento da polpa celulósica com hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) que necessitam de componentes alcalinos e ácidos para sua obtenção, favorece as propriedades citadas porque esses polímeros têm a capacidade de arranjar e de se ligarem às fibras celulósicas cobrindo-as total ou parcialmente como acontece *in vivo*.

Na presente reivindicação fica estabelecido que o incremento ou melhoria das propriedades citadas acima podem ser medidos por todo e qualquer processo conhecido na arte (exemplo os processos determinados nos exemplos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 da presente invenção realizados no Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Suzano Papel e Celulose S/A de acordo com normas e padrões internacionais).

A invenção é ainda mais ilustrada pelos detalhes dos exemplos a seguir, os quais não se pretendem que venham a limitar, de qualquer forma, o escopo ou campo da invenção aqui reivindicada.

EXEMPLO 1:

Porosidade

A porosidade de derivados secos de celulose pode ser definida como a quantidade de espaçamentos de ordem microscópica que pode estar presente na composição dos mesmos e que possam ser relacionados ao afastamento das fibras celulósicas constituintes do material. Esse afastamento, por sua vez, pode ser traduzido por um eventual afrouxamento de interação entre as fibras que podem estar

aderidas de forma menos compacta para formar a folha de papel propriamente dita.

A diminuição da porosidade, portanto, e conseqüente aumento de resistência à passagem de uma coluna de ar de velocidade controlada, representa uma maior aproximação das fibras celulósicas constituintes da folha o que, por sua vez, pode vir a significar uma maior adesão das hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) com as fibras celulósicas, diminuindo assim, o espaçamento entre elas.

Na Figura 1A se observa um aumento da resistência a essa coluna de ar aplicada à folha, proporcionado por todas as concentrações de HPCP provenientes de sementes de eucalipto adicionadas a polpa celulósica em suspensão antes da formação das folhas utilizadas para a detecção do incremento desse parâmetro mecânico. Pela Figura 1A se observa que a adição de apenas 0,25% das HPCP foi suficiente para aumentar a resistência em relação à corrente de ar aplicada.

O mesmo aumento de resistência em relação a todas as concentrações observado na Figura 1A, porém pouco mais significativo, ocorreu com a adição das mesmas concentrações de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de plântulas de eucalipto, conforme se observa nos resultados expressos na Figura 1B. Nesta, todas as outras concentrações analisadas, apesar de inferiores ao observado em relação à concentração de 0,25%, forneceram diminuição de porosidade (caracterizada pelos aumentos de resistência à coluna de ar, detectados na Figura 1B) superiores às proporcionadas pelas concentrações de adição correspondentes para HPCP oriundas das sementes de eucalipto (Figura 1A).

As barras de variações registradas na Figura 1, que representam o desvio padrão de 4 a 6 repetições de dosagens na formação das folhas para esse parâmetro, não comprometem as conclusões aqui veiculadas.

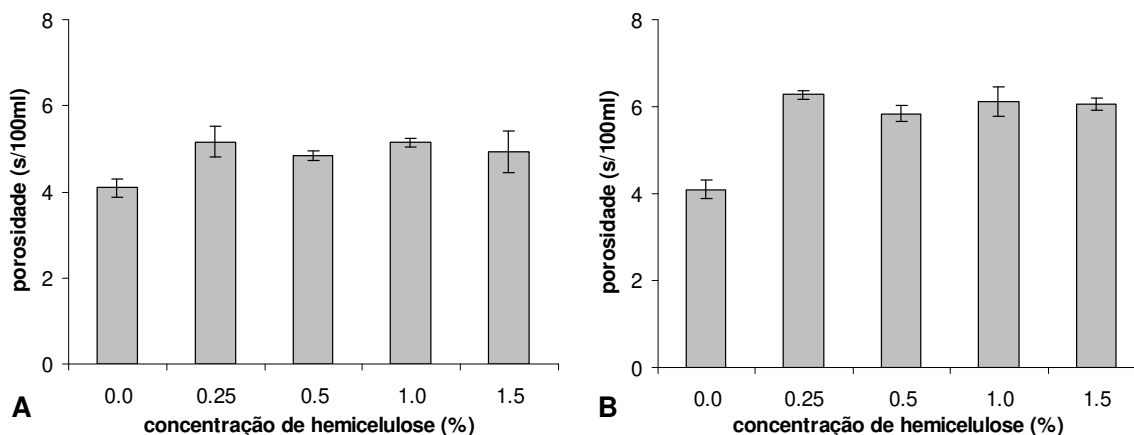


Figura 1 Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes **(A)** e de plântulas **(B)** de eucalipto na diminuição da porosidade de folhas de papel de pasta mecânica representada pelo aumento da resistência à passagem de uma coluna de ar de velocidade igual a 100 ml por segundo; de acordo com normas e parâmetros internacionais para a determinação de tal propriedade.

EXEMPLO 2:

Resistência ao estouro

Outro parâmetro mecânico que pode sugerir uma aproximação entre as fibras de celulose ou um aumento da força de ligação entre elas é a resistência ao estouro. Tal característica pode ser verificada através da resistência ao estouro de uma folha de papel após ser submetida a uma pressão previamente determinada para a verificação de quanto de força se faz necessário aplicar para que a mesma se rompa.

Segundo a Figura 2, houve incremento desse parâmetro físico, após a adição à polpa celulósica em suspensão (antes da formação da folha de papel propriamente dita) de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) em todas as concentrações testadas. Sendo que, nesse experimento, a Figura 2A mostra que o aumento de resistência ao estouro mais significativo foi detectado na concentração de 1% para as hemiceluloses de parede celular primária, extraídas de sementes de eucalipto enquanto que, o pico de maior aumento de resistência ao

estouro para as HPCP de plântulas foi o correspondente à adição de 0,5% (Figura 2B).

Esses resultados sugerem que, optar pela adição de HPCP extraídas de plântulas de eucalipto pode vir a constituir uma melhor estratégia para a melhoria desse parâmetro, uma vez que a adição de 0,5% de concentração à polpa celulósica em suspensão fornece um aumento de resistência ao estouro semelhante ao detectado para 1% de adição das HPLC extraídas de sementes da mesma espécie.

As barras de variação registradas na Figura 2, que representam o desvio padrão de 4 a 6 registros de doseamentos das folhas para esse parâmetro, não comprometem as conclusões aqui veiculadas.

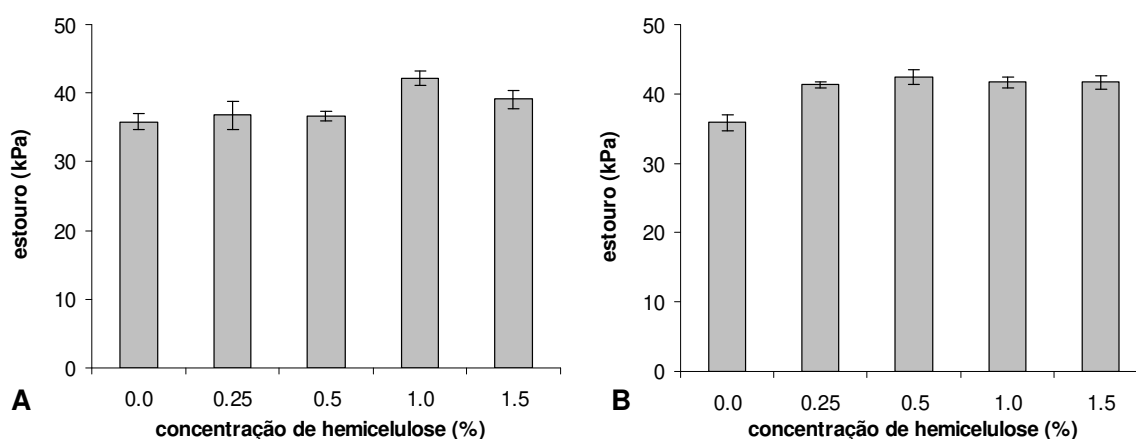


Figura 2 Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes **(A)** e de plântulas **(B)** de eucalipto no aumento da capacidade de resistência da folha ao estouro, representado pelo incremento da resistência a uma pressão aplicada constante e de acordo com normas e parâmetros internacionais para a determinação de tal propriedade.

EXEMPLO 3:

Resistência à tração

Outra característica física que comumente é analisada para a verificação de alterações em parâmetros mecânicos, é a resistência à

tração. Uma maior ligação ou adesão entre as fibras celulósicas confere aumento de resistência à tração, o que, pode ser determinado através de um corpo de prova, de largura e comprimento especificados, submetido a um esforço de tração uniformemente crescente até a sua ruptura. O aparelho usado nesta determinação é o dinamômetro, e os valores obtidos são usualmente reportados em kN.m/kg. Na Figura 3A, a exceção da concentração aplicada de 0,25% de hemiceluloses de parede celular primária extraídas de sementes, todas as outras concentrações adicionadas resultaram em aumento de resistência à tração. O mesmo aconteceu para as concentrações adicionadas à polpa suspensa de HPCP obtidas de plântulas de eucalipto (Figura 3B), porém com valores mais expressivos nas concentrações de 1,0 e 1,5%.

As barras de erros registradas na Figura 3, que representam o desvio padrão de 4 a 6 registros de doseamentos das folhas para esse parâmetro, não comprometem as conclusões aqui veiculadas.

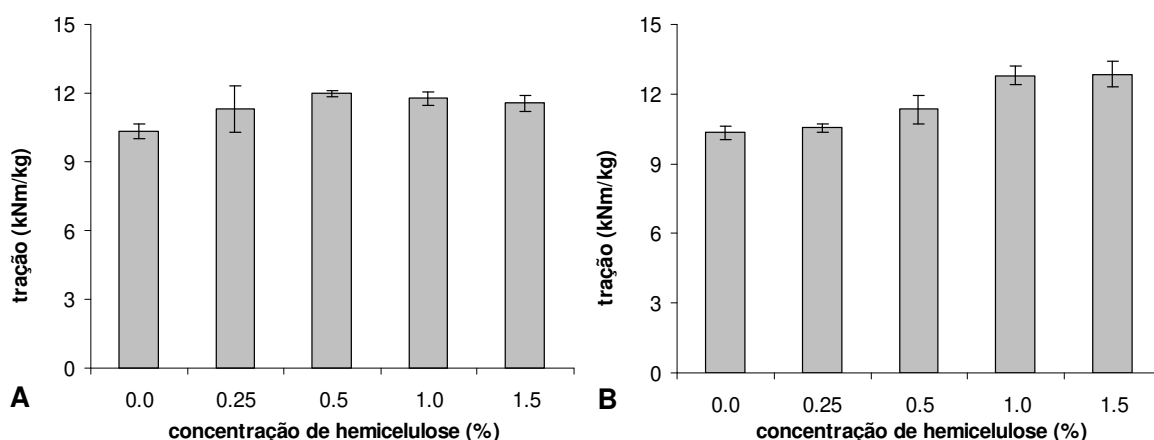


Figura 3 Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes **(A)** e de plântulas **(B)** de eucalipto no aumento da capacidade de resistência da folha a tração, representado pelo incremento dessa resistência a uma tração constante, aplicada e calibrada, de acordo com normas e parâmetros internacionais para a determinação de tal propriedade

EXEMPLO 4:

Rigidez

Uma maior ligação ou adesão entre as fibras celulósicas proporcionadas pela retenção total ou parcial das hemiceluloses de parede celular primárias (HPCP), extraídas das sementes ou plântulas, adicionadas à polpa em suspensão antes da formação da folha, não deveriam resultar em alteração significativa da rigidez dessa folha. Pelo menos com a adição das HPCP oriundas de sementes, isso não aconteceu (figura 4A).

A rigidez da folha, medida pela força necessária para fletir o papel, aumentou apenas quando as HPCP de plântulas de eucalipto são adicionadas a polpa (Figura 4B). Sendo que os valores mais expressivos correspondem às concentrações de 0,25, 1,0 e 1,5%.

As barras de erros registradas na Figura 4, que representam o desvio padrão de 4 a 6 registros de doseamentos das folhas para esse parâmetro, não comprometem as conclusões aqui veiculadas.

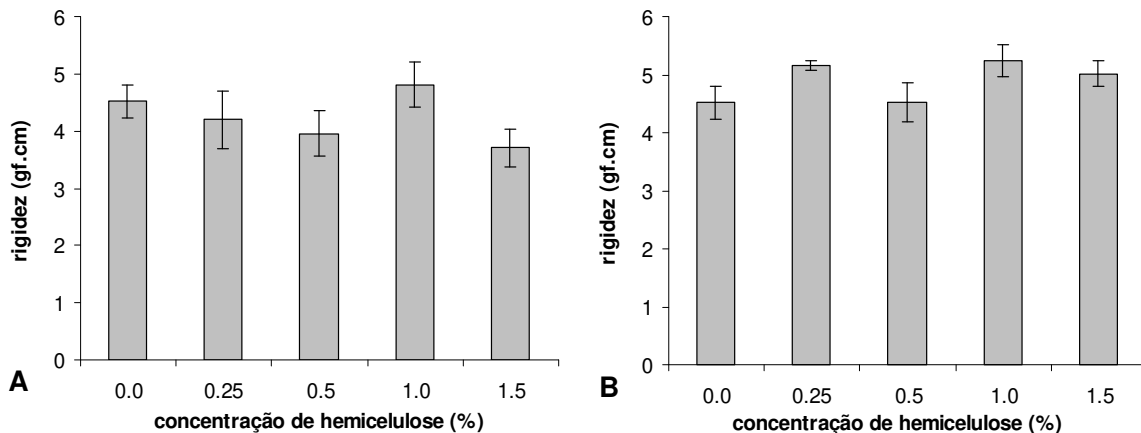


Figura 4 Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes **(A)** e de plântulas **(B)** de eucalipto no aumento da rigidez da folha de papel, representado pela variação da rigidez medida em aparelho Taber, de acordo com normas e parâmetros internacionais para a determinação de tal propriedade.

EXEMPLO 5:

Resistência ao rasgo

A resistência ao rasgo é a medida da resistência à força de rasgo imputada ao papel após um corte inicial. Dois fatores influenciam a resistência ao rasgo: a resistência da fibra e a resistência entre as ligações interfibras.

Tanto na Figura 5A como na Figura 5B, todas as concentrações de HPCP de sementes e plântulas de eucalipto aplicadas à polpa em suspensão forneceram aumento de resistência ao rasgo. Conforme se observa na Figura 5B, as HPCP extraídas de plântulas de eucalipto resultaram em aumentos lineares dessa resistência em função da quantidade adicionada.

Estes resultados indicam que as hemiceluloses adicionadas ficam retidas na parede das fibras e contribuem para aumento do número de ligação entre as mesmas.

Mais uma vez, as barras de erros registradas na Figura 5, que representam o desvio padrão de 4 a 6 registros de doseamentos das folhas para esse parâmetro, não comprometem as conclusões aqui veiculadas.

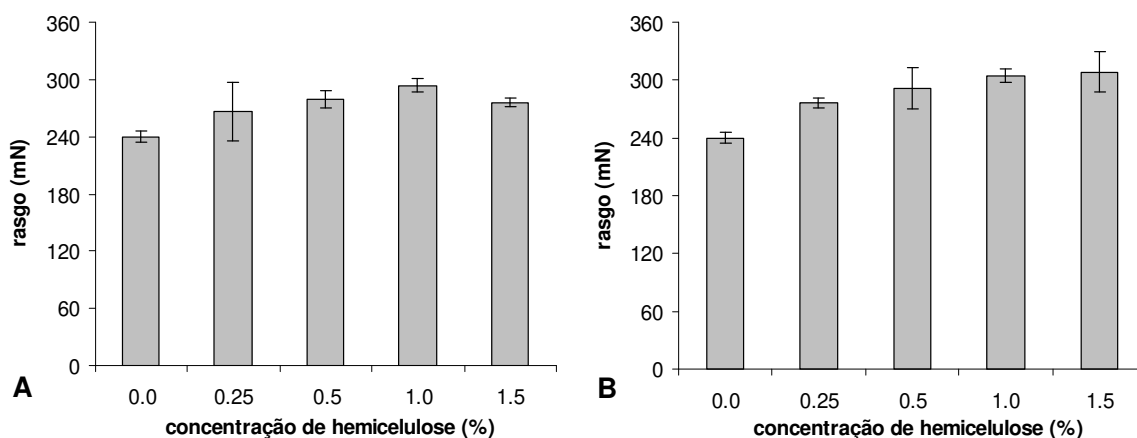


Figura 5 Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes **(A)** e de plântulas **(B)** de eucalipto na variação da resistência ao rasgo da folha de papel, representado pelo incremento da resistência detectado de acordo com normas e parâmetros internacionais para a determinação de tal propriedade.

EXEMPLO 6:

Resistência à delaminação

Determinar a resistência à delaminação significa determinar a resistência à separação da folha no sentido transversal à espessura da folhal. Como os demais parâmetros, uma maior adesão entre as fibras celulósicas proporciona também um aumento de resistência à delaminação.

Tanto na Figura 6A (para a adição de HPCP de sementes de eucalipto) como na Figura 6B (para a adição de HPCP de plântulas de eucalipto) apenas a adição das HPCP na proporção de 1,5% nas polpas

suspensas antes da formação das folhas, forneceu um aumento significativo de resistência à delaminação.

Conforme sinalizado para os demais parâmetros aqui analisados, as barras de erros registradas na Figura 5, que representam o desvio padrão de 4 a 6 registros de doseamentos das folhas para esse parâmetro, não comprometem as conclusões aqui veiculadas.

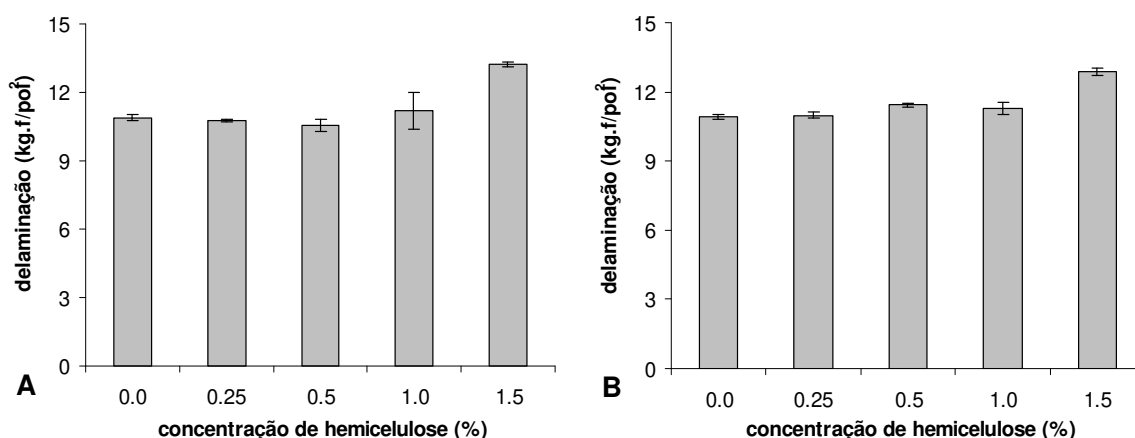


Figura 6 Efeito da adição de hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) de sementes **(A)** e de plântulas **(B)** de eucalipto variação da resistência à delaminação da folha de papel, determinada de acordo com normas e parâmetros internacionais.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMARIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, caracterizado pelos polissacarídeos de parede celular serem extraídos através dos seguintes passos:

- Secagem e pulverização dos materiais (sementes e plântulas crescidas na ausência de luz);
- Remoção dos açúcares solúveis através de extração alcoólica sob agitação;

- Pesar os recipientes de utilização ainda vazios para os procedimentos;
- Adicionar a quantidade de 400 a 600 mg de material vegetal seco e pulverizado;
- Extrair em álcool de 70% a 80% (v/v) a uma temperatura que pode variar entre 50° e 110°C durante o tempo de 10 a 30 minutos (sob agitação eventual) o material vegetal adicionado no item acima;
- Repetir a extração por mais três vezes;
- Armazenar (para futura conferência) o sobrenadante alcoólico;
- Secar o material restante em estufa na temperatura entre 30° e 90 °C pelo tempo de 2 dias;
- Adicionar a quantidade de 5 a 15 ml de água destilada, congelando em seguida para a posterior liofilização até secagem completa; e
- Pesar os tubos novamente com o material já seco.

c) Remoção do amido:

- Adicionar aos tubos a quantidade de 20 a 50 ml de DMSO a 85% a 95% (v/v) para cada 500 mg de amostra pulverizada;
- Manter a solução DMSO e amostra sob agitação exaustiva por um tempo de 24 horas;
- Centrifugar por um tempo de 5 a 15 minutos a 8000 G na temperatura de 2° a 6°C;
- Descartar o sobrenadante;
- Adicionar água ao precipitado, centrifugando nas mesmas condições, descartando o sobrenadante;
- Repetir a adição de água ao precipitado e a centrifugação descartando o sobrenadante por mais três vezes, acompanhando-se a variação de pH até igualar ao pH da água;

- Drenar os tubos;
- Secar o precipitado em estufa na temperatura de 30 a 90 °C por um tempo de 24 horas; e
- Pesar novamente os tubos.

d) Remoção das pectinas:

- Adicionar aos tubos, de 10 a 30 ml de Oxalato de Amônio 0,5% (p/v) para cada 100-200 mg de amostra;
- Agitar;
- Agitar, em seguida, por um tempo de 45 minutos à 1 hora e 15 minutos na temperatura de 70° a 90° C;
- Submeter a amostra ao repouso para resfriamento;
- Centrifugar por um tempo de 5 a 15 minutos a 8000 G na temperatura de 2° a 6° C;
- repetir os passos de adição de Oxalato de Amônio aos tubos, agitações, submissão da amostra ao repouso e centrifugação, por mais três vezes reunindo, ao final, os sobrenadantes; e
- Lavar três vezes em água destilada.

e) Extração das Pectinas Esterificadas:

- Adicionar de 10 a 30 ml de solução NaOH 0,1M, NaBH₄ (3mg/ml) para cada 500 mg de material;
- Agitar por um tempo de 45 minutos a 1 hora e 15 minutos na temperatura ambiente;
- Centrifugar levemente para separar o sobrenadante;
- Neutralizar o sobrenadante com ácido acético glacial até que pare de espumar;
- Repetir os passos de adição de solução, agitação, centrifugação e neutralização do sobrenadante, por mais duas vezes; e
- Reunir os sobrenadantes neutralizados e armazenar para posterior análise.

- f) Obtenção das Hemiceluloses (HPCP):
- Lavar o precipitado (material vegetal) com água destilada;
 - Adicionar de 10 a 30 ml de solução NaOH 8M, NaBH₄ (3mg/ml) para cada 500 mg de material;
 - Agitar por um tempo de 45 minutos a 1 hora e 15 minutos na temperatura ambiente;
 - Centrifugar levemente para separar o sobrenadante;
 - Neutralizar o sobrenadante com ácido acético glacial até que pare de espumar;
 - Repetir os passos de adição de solução, agitação, centrifugação e neutralização do sobrenadante, por mais duas vezes;
 - Reunir os sobrenadantes neutralizados, armazenando e congelando-os; e
 - Liofilizar a reunião dos sobrenadantes para a obtenção definitiva das HPCP.

2. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as hemiceluloses de parede primária que necessitam de componentes alcalinos e ácidos para sua obtenção podem ser obtidas de qualquer fonte ou organismo como plantas, fungos e bactérias.

3. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado

pelo fato dos polissacarídeos de parede celular serem extraídos preferencialmente de sementes de eucalipto (*Eucalyptus grandis*) coletadas em campo.

4. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o meio aquoso da polpa em suspensão poderá conter associado, outros polissacarídeos ou aditivos.

5. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que as sementes de eucalipto são hidratadas e colocadas para germinar com temperatura variando entre 15 e 45 °C e por um período entre 5 e 25 dias.

6. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) a remoção dos açúcares solúveis será realizada por extração alcoólica, mais preferencialmente por metanol, etanol e butanol.

7. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) a quantidade da adição de material vegetal seco e pulverizado será preferencialmente de 450 a 550 mg.

8. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) a concentração de álcool será preferencialmente de 80%.

9. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) a temperatura do álcool para realizar a extração terá preferencialmente a temperatura de 60 a 100°C.

10. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) a secagem em estufa do restante de

material será realizada preferencialmente na temperatura entre 40° e 80°C por 2 dias.

11. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (b) a quantidade de água destilada adicionada será preferencialmente de 8 a 12 ml, congelando em seguida para a posterior liofilização até a secagem completa.

12. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) a quantidade de DMSO adicionada aos tubos será preferencialmente de 30 a 40 ml para cada 500mg de amostra pulverizada.

13. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) a concentração de DMSO adicionada aos tubos será preferencialmente de 90% para cada 500mg de amostra pulverizada.

14. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) o tempo da centrifugação a 8000G será preferencialmente de 8 a 12 minutos.

15. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) a temperatura da centrifugação a 8000G será preferencialmente de 3º a 5ºC.

16. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (c) a temperatura da secagem do precipitado será preferencialmente de 40º a 80ºC por 24 horas.

17. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que na etapa (d) a quantidade de Oxalato de Amônio 0,5% (p/v) será de 15 a 25ml para cada 100-200mg de amostra.

18. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (d) o tempo da agitação do precipitado será preferencialmente de 1 hora.

19. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (d) a temperatura da agitação do precipitado será preferencialmente de 80°C.

20. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (d) o tempo da centrifugação a 8000G será preferencialmente de 8 a 12 horas.

21. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA

(HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (d) a temperatura da centrifugação a 8000G será preferencialmente de 3° a 5°C.

22. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (e) a quantidade de solução NaOH 0,1M, NaBH₄ (3mg/ml) será preferencialmente de 15 a 25ml para cada 500 mg de material.

23. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (e) o tempo de agitação na temperatura ambiente será preferencialmente de 1 hora.

24. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (f) a quantidade de NaOH 8M, NaBH₄ (3mg/ml) para cada 500 mg de material

25. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (f) o tempo de agitação na temperatura ambiente será preferencialmente de 1 hora.

RESUMO

PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE HEMICELULOSES DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA (HPCP) QUE NECESSITAM DE COMPONENTES ALCALINOS E ÁCIDOS PARA SUA OBTENÇÃO

Verificou-se que é possível utilizar hemiceluloses de parede celular extraídas da parede celular primária (HPCP), com componentes alcalinos e ácidos, que alterem o pH de extração, para aperfeiçoar as propriedades de resistência e rigidez de materiais celulósicos, de modo que, correspondentemente, a presente invenção se refere a um processo para proporcionar um material celulósico com maior resistência ao estouro, à tração, à delaminação, ao rasgo e um pouco mais rígido.

Patente 4

"Patente na sua versão definitiva em procedimento jurídico para depósito"

Depositante: Suzano Papel e Celulose

Inventores: César Gustavo Serafim Lisboa, Silvia Bugajer e Marcos Silveira Buckeridge.

PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXSUDADOS DE CULTURA DE CÉLULAS (PECC)

Campo da invenção

A invenção refere-se à utilização de polissacarídeos exsudados de culturas de células como aditivos para o aperfeiçoamento das propriedades mecânicas de materiais celulósicos.

Fundamentos da invenção

De uma maneira geral, boa parte dos tipos de materiais celulósicos (papel, papelão etc.) é produzida a partir de uma suspensão de fibras celulósicas (ou de polpa celulósica). Tipicamente as fibras celulósicas são hidratadas e misturadas à água para a formação dessa suspensão. Em seguida, aditivos são adicionados a esta polpa hidratada que, conseqüentemente, após agitação controlada, é despejada em equipamentos específicos onde os materiais celulósicos (papel, papelcartão, etc.) são formados, prensados e secos.

No processo descrito acima, utilizando-se polpas produzidas de fibras celulósicas (recicladas ou não) obtidas, tanto pelo processo mecânico, semi-químico ou químico, é necessária a adição de agentes químicos à polpa (aditivos), a fim de que se obtenha um produto final com propriedades ideais e adequadas para a sua finalidade de utilização.

Os diferentes processos de obtenção de fibras celulósicas fornecem polpas com características de resistência diferentes, dependendo das características superficiais das fibras. Para melhorar as características de resistência das fibras deve-se aplicar energia de modo

a modificar a estrutura da fibra ou adicionar produtos químicos que ao se depositarem na superfície das fibras aumentem o seu potencial de ligação.

É nesse contexto de suprir a necessidade na indústria de encontrar processos ambientalmente compatíveis para aperfeiçoar as propriedades de resistência de materiais celulósicos que os autores da presente invenção sugerem a utilização de polissacarídeos exsudados de cultura de células (PECC) como alternativa para esses aditivos.

Polissacarídeos de parede celular são polímeros (carboidratos) que, na composição da parede celular, se associam às fibras e às microfibrilas de celulose, permitindo que as mesmas se arranjem, formando um complexo dinâmico e tridimensional. Dos três domínios da parede celular dos organismos, o primeiro deles, que é formado por microfibrilas de celulose entrelaçadas por polissacarídeos de parede celular, confere resistência mecânica as células. Os polímeros pertencentes a essa categoria ligam-se às microfibrilas de celulose através de pontes de hidrogênio, mantendo o espaçamento entre as mesmas e impedindo que estas se juntem e formem feixes muito espessos. A remoção desses polissacarídeos *in vivo* causa colapso nas microfibrilas, fazendo com que estas percam a orientação. Isso parece demonstrar claramente o seu potencial para a exploração industrial como aditivo não-químico que venha a promover uma melhor adesão entre as fibras celulósicas em derivados celulósicos (papel, papelcartão, etc) fabricados para diferentes fins.

Tais polissacarídeos citados agrupam vários polissacarídeos da parede (conforme citado nas duas defesas de interesses anteriores, exsudados em culturas celulares ou não), sendo que, no presente documento, propõe-se o uso como substituinte ou complemento de aditivos químicos que permitem melhor adesão entre as fibras celulósicas de derivados celulósicos; todos os pertencentes a essa

categoria, que possam vir a ser exsudados através de cultura celular em suspensão de diferentes espécies sendo, contudo, aqui denominados polissacarídeos exsudados de culturas de células (PECC).

Uma vez que a metodologia de obtenção de polissacarídeos exsudados de células ou calos de diferentes espécies consiste em manter calos ou suspensão celulares das mesmas em meio líquido salino modificado, contendo tiamina, cisteína, ácido nicotínico, piridoxina, água de coco, sacarose, picloram sob agitação constante, extraí-los em considerável escala para funções comerciais, tornou-se plausível. Isto porque, basta que as células, calos ou pedaços de tecidos das diferentes espécies fiquem em meio apropriado sob agitação exsudando seus respectivos polissacarídeos para, após término da fase de crescimento exponencial dos mesmos, filtrá-los e submeter o meio filtrado à precipitação etanólica para a coleta dos polissacarídeos por precipitação. Uma vez obtido os polissacarídeos precipitados, basta ressuspendê-los em água e, após nova filtragem, secá-los.

Com base nos fundamentos acima, os autores propõem a utilização de polissacarídeos que possam ser obtidas através de cultura de células, tecidos ou calos, como aditivos a compostos celulósicos de utilização industrial, como, por exemplo, o papel.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 representa as micrografias eletrônicas de varredura de derivados celulósicos ilustrando a interação de polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) com as fibras de celulose. As duas fotos superiores foram realizadas com aumento de 80 vezes e as duas fotos inferiores foram realizadas com um aumento de 2800 vezes.

A figura 2 representa a absorção de polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) de *Phaseolus vulgaris* (a) e de *Rudgea jasminoides* (b) por fibras de celulose de diferentes polpas celulósicas.

Descrição detalhada da invenção

Materiais celulósicos

De acordo com a presente invenção, um material celulósico constitui-se de qualquer material constituído totalmente ou parcialmente por celulose. Constituem exemplos desses materiais o papel e produtos de polpa.

No contexto da presente invenção, um produto de papel ou de polpa pode constituir-se de qualquer material celulósico contendo lignina, em particular placas de fibras e papel.

Polissacarídeos exsudados de cultura

De acordo com a presente invenção, entende-se que polissacarídeos exsudados de cultura de células correspondem a quaisquer compostos de peso molecular entre 1000 e 2 milhões de Dalton resultantes da condensação de um grande número de moléculas de aldoses e cetoses, bem como múltiplas hidroxilas que, podem ser encontrados na parede celular e que estejam associados direta ou indiretamente às fibras de celulose no arranjo dessa estrutura. Entende-se nessa presente inventividade que esses compostos podem ser obtidos (extraídos) exclusivamente de meios de culturas de quaisquer suspensões de células, calos ou pedaços de tecidos suspensos em

qualquer meio vitamínico ou salino apropriado para sua preservação e manutenção de sua integridade.

Obtenção dos polissacarídeos exsudados de cultura de células (PECC)

Os presentes inventores extraem os polissacarídeos exsudados de cultura celular (PECC) usando os seguintes passos:

1) Preparação do meio de cultura solidificado para desenvolvimento dos calos de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg (Rubiaceae) e de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioquinha

a) Para o preparo da parte salina do meio de cultura solidificado para desenvolvimento dos calos, adiciona-se à 500ml de água deionizada autoclavada, os seguintes ingredientes (em ordem):

- 10ml de solução estoque de NH_4NO_3 (82,5g/l)
- 20ml de solução estoque de KNO_3 (95g/l)
- 5ml de solução estoque de H_3BO_3 (1,24g/l)
- 5ml de solução estoque de KH_2PO_4 (34g/l)
- 5ml de solução estoque de KI (0,166g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,005g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (88g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (74g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3,38g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,72g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,005g/l)
- 10ml de solução estoque de Na_2 EDTA (3,72g/l)
- 10ml de solução estoque de FeSO_4 (2,78g/l)
- 5ml de solução estoque de Tiamina HCl (0,08g/l)

b) Completa-se a solução salina (detalhadamente descrita acima) para 1 litro com água deionizada e autoclavada e, em seguida, adiciona-se os seguintes ingredientes em suas respectivas quantidades:

- 100mg de Mioinositol
- 30g de sacarose comercial
- 50ml de água de coco comercial
- 100mg de Cisteína
- 1mg de Ácido Nicotínico
- 1mg de Piridoxina
- 10mg de Tiamina
- 2mg de Picloran
- Adição de 6g de agar para autoclavar

2) Separar com um bisturi os tecidos meristemáticos das espécies e colocar no mesmo meio solidificado até formação de aglomerados de células indiferenciadas (calos). Os calos das espécies são mantidos no meio solidificado acima com fotoperíodo de 12 horas e sob temperatura de 30° C até desenvolvimento significativo da massa celular, por cerca de 20 dias.

3) Separar os pedaços friáveis obtidos dos calos usando pinça e bisturi em condições acéticas

4) Depositar os pedaços friáveis das espécies em meio salino líquido e vitaminado (conforme descrito no item 1, porém sem a adição do agar para a solidificação)

- 5) Manter os pedaços friáveis nesse meio líquido sob agitação constante, fotoperíodo de 12 horas e a uma temperatura de 30° C por cerca de 30 dias.
- 6) Filtrar o meio com os exsudados após fase exponencial de crescimento das células e pedaços friáveis em suspensão no meio líquido em tecido nylon
- 7) Precipitar o meio filtrado com álcool 3 vezes o volume
- 8) Ressuspender o precipitado em água com agitação constante, a uma temperatura de 60° C por 4 horas.
- 9) Repouso a frio
- 10) Filtrar novamente o material insolúvel com tecido nylon
- 11) Secar da suspensão filtrada para a obtenção definitiva dos PECC

Aplicações industriais

Conforme a presente invenção partiu-se do fato de que, os polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC), são capazes de interagir com as fibras e microfibrilas de celulose presentes na polpa celulósica. Esses polímeros interagem com a celulose através de pontes de hidrogênio (como *in vivo* nas paredes celulares) e essa interação no processo, trata-se de uma estratégia ambientalmente correta para incrementar as propriedades de resistência e/ou retenção de forma de materiais celulósicos, como

alternativa de substituição de outros aditivos químicos ainda utilizados para os mesmos fins.

Assim, subentende-se que o tratamento da polpa celulósica com polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células), favorece as propriedades citadas porque esses polímeros têm a capacidade de se arranjar e de se ligarem as fibras celulósicas cobrindo-as total ou parcialmente como acontece *in vivo*, alinhando-as, mantendo o espaçamento entre elas e impedindo a formação de feixes muito espessos ou agregados.

Na presente reivindicação fica estabelecido que o incremento ou melhoria das propriedades citadas acima podem ser medidos por todo e qualquer processo conhecido na arte (exemplo os processos determinados no Exemplos 3 da presente invenção realizados no Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Suzano Papel e Celulose SA de acordo com normas e padrões internacionais para determinação de características mecânicas e a estratégia descrita no Exemplo 2 para verificar a afinidade e/ou capacidade de interação com a celulose em suspensão).

A invenção é ainda mais ilustrada nos exemplos a seguir, os quais não se pretendem que venham a limitar, de qualquer forma, o escopo ou campo da invenção aqui reivindicada.

EXEMPLO 1:

Para ilustrar e demonstrar que os polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) interagem com as fibras de celulose em derivados celulósicos, utilizou-se micrografias obtidas com microscopia de varredura a fim de localizar as regiões de interação das moléculas a que se refere.

As fotos abaixo se referem a um derivado celulósico (no caso, o papel), formado após adição de polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) à polpa celulósica em suspensão antes da formação do mesmo. Para melhor destaque das regiões de interação, uma foto controle no mesmo aumento foi colocada em paralelo para destaque.

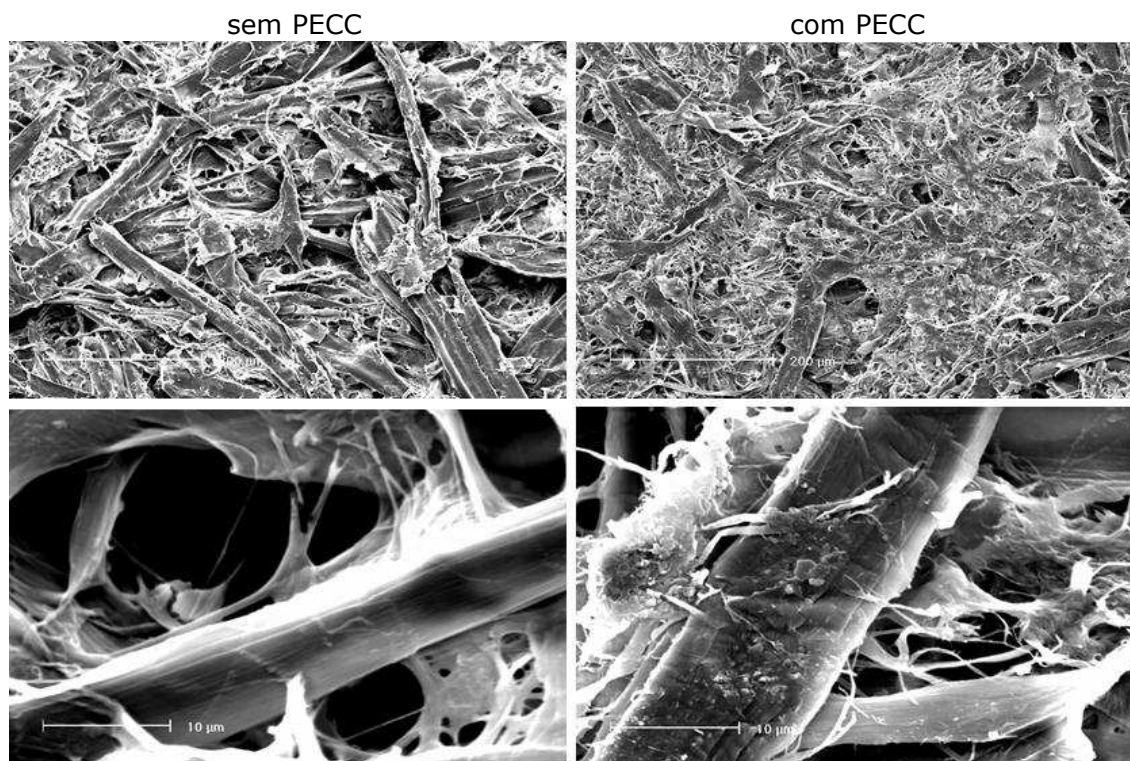


Figura 1 Micrografias eletrônicas de varredura de derivados celulósicos ilustrando a interação de polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) com as fibras de celulose. As duas fotos superiores foram realizadas com aumento de 80 vezes e as duas fotos inferiores foram realizadas com um aumento de 2800 vezes.

EXEMPLO 2:

Para demonstrar que os polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) interagem com as

fibras de celulose em derivados celulósicos, utilizou-se quatro diferentes pastas celulósicas derivadas de diferentes fornecedores:

- a) Pasta Celulósica Branqueada Seca (FD): pasta química
- b) Pasta Celulósica Pré-branqueada (PPB): pasta química
- c) Pasta Mecânica Seca (PMS): pasta mecânica
- d) Pasta Escura de Alta Rendimento (PEAR): pasta mecânica
- e) Celulose Microcristalina (CM): celulose pura

Os polissacarídeos exsudados de cultura de células utilizados para comprovar o potencial de adesão com fibras celulósicas em suspensão foram os exsudados de suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg (Rubiaceae) e de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioquinha.

Na preparação das pastas, cada uma delas foi seca em estufa em temperatura e tempo controlados para posterior pulverização. O pó de cada uma das pastas foi suspenso em água sem a adição de nenhum aditivo. A solução foi centrifugada com descarte do sobrenadante. Em seguida, o precipitado foi novamente suspenso em água sem a adição de nenhum aditivo e a solução centrifugada em seqüência. Tal procedimento foi repetido até lavagem exaustiva dos finos de cada uma das pastas.

Para as análises de interação dos polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) com fibras celulósicas de diferentes pastas, soluções de PECC de *Phaseolus vulgaris* (Figura 2a) e de *Rudgea jasminoides* (Figura 2b) em concentração e tampão específicos foram adicionadas a soluções aquosas das diferentes pastas. Em seguida o material foi exaustivamente agitado, deixado por tempo determinado e em temperatura controlada e centrifugado. Com o auxílio de uma pipeta

Pasteur o sobrenadante foi coletado e submetido à dosagem de açúcar total (Dubois et al., 1956) e, por diferença sobre o valor inicial, efetuou-se a quantificação de açúcar adsorvido pelas fibras celulósicas das diferentes pastas.

Na Figura 2a, claramente se observa uma afinidade semelhante dos PECC de *P. vulgaris* por todas as pastas utilizadas, sendo que não houve diferença significativa de adsorção dos mesmos pelas cinco suspensões celulósicas utilizadas. Na Figura 2b, observa-se que os PECC de *R. jasminoides*, demonstraram maior afinidade pelas fibras celulósicas de pastas mecânicas (PMS: pasta mecânica seca e PEAR: pasta escura de alto rendimento, cujos resultados de adsorção se mostraram inferiores apenas à suspensão de CM: celulose microcristalina purificada), isto é, pastas que poderão ou não sofrer tratamento químico em seu refino, a depender de sua utilização.

A Figura 2b, como descrito, confirma a afinidade dos polissacarídeos exsudados de cultura de células de *R. jasminoides* pela celulose de polpas sem aditivos químicos (que acabam carregando eletroliticamente o sistema) demonstrando maior afinidade com pastas mecânicas, que apresenta concentrações elevadas de finos, material particulado e lignina. Os autores da presente invenção, portanto, sugerem tais PECC como aditivos para este tipo de pastas e, assumem que, particularmente, estes poderão vir a constituir um atrativo comercial no setor.

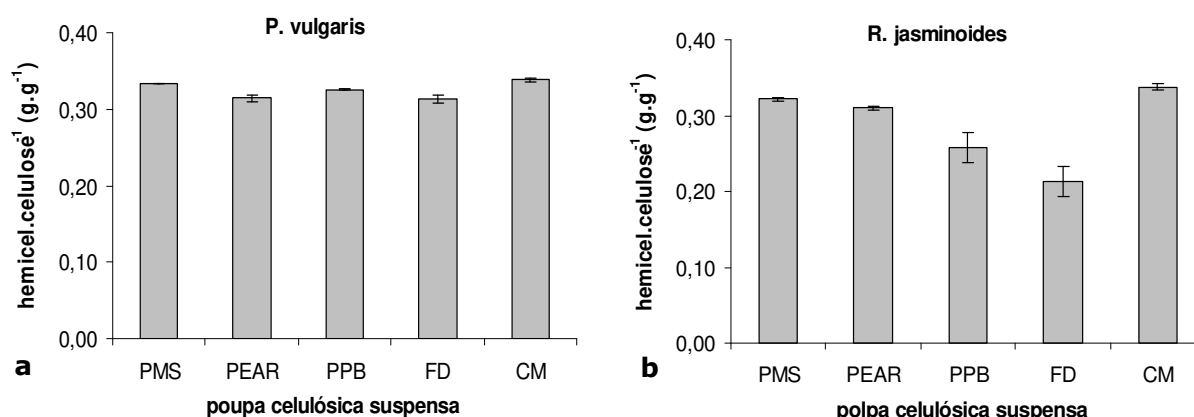


Figura 2: Adsorção de polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) de *Phaseolus vulgaris* (a) e de *Rudgea jasminoides* (b) por fibras de celulose de diferentes polpas celulósicas.

EXEMPLO 3:

O Exemplo 3 trata-se de um exemplo de incremento dos parâmetros mecânicos obtidos após adição de polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC). Este resultado pode ser observado na Tabela 1. Na tabela, os PECC utilizados foram os de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg (Rubiaceae).

Através de análise de literatura, pode-se afirmar que 2% dos polissacarídeos de suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg (Rubiaceae) corresponde ao polissacarídeo xiloglucano, porém os arabinosilanos constituem os polissacarídeos predominantemente detectados nas condições descritas. Porém, entende-se, na presente invenção, que, embora o polissacarídeo minoritário constituinte dos exsudados de cultura de células, aqui exemplificado, seja o xiloglucano, este, em conjunto com outros detectados no mesmo meio (arabinosilanos, por exemplo), não representa quaisquer conflitos de interesses com o depósito dos mesmos inventores para esse polímero

(extraído da parede celular dos organismos) por que o mesmo é exsudado de cultura de células e, conseqüentemente, sua metodologia de obtenção é diferente da tecnologia registrada pelos mesmos na defesa anterior.

De acordo com os dados mostrados na Tabela 1, os valores obtidos nos parâmetros mecânicos, à exceção da espessura (como era de se esperar uma vez que as microfibrilas de celulose se aproximam na presença desses polissacarídeos porque os mesmos fornecem melhor adesão entre elas), de uma maneira geral, aumentaram. Com a adição de 0,5 % de PECC na polpa suspensa antes da formação das folhas, já foi possível observar incremento dos valores. Essa característica direcionará estudos posteriores para a obtenção dos polissacarídeos exsudados de cultura em escala industrial. Entre parênteses, estão expressas as porcentagens do incremento detectadas para cada parâmetro.

Ainda em relação à espessura, a diminuição da mesma, conforme previamente citado, pode significar uma maior adesão entre as fibras de celulose arranjadas para formar a folha e um reforço generalizado à resistência.

O Exemplo 3 de incremento dos parâmetros mecânicos através da cobertura parcial, total ou aproximação das fibras de celulosas constituintes das polpas, obtidos após adição de PECC, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: comprovação da melhoria nas determinações dos parâmetros mecânicos conhecidos da arte após a adição de três concentrações de distintas de hemiceluloses ou polissacarídeos de parede celular exsudados por células em suspensão de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg (Rubiaceae) à polpa celulósica em suspensão para a formação de derivados celulósicos (papel). Os valores obtidos estão numericamente descritos em cada campo. Os valores entre parênteses correspondem à porcentagem de melhoria (incremento) para cada parâmetro em relação ao controle.

Parâmetros Mecânicos	Controle	0,5% de PECC	1,0% de PECC	1,5% de PECC
Espessura (um)	270,00	250,17 (7,34)	255,00 (5,56)	259,57 (3,86)
Porosidade (s/100ml)	7,60	8,72 (14,74)	8,73 (14,87)	9,60 (26,32)
Estouro (kPa)	43,68	47,97 (9,82)	49,63 (13,62)	53,73 (23)
Tração (kNm/kg)	13,46	13,89 (3,19)	13,80 (2,53)	14,23 (5,72)
Rigidez (gf.cm)	4,72	4,78 (1,27)	4,69 (0)	4,95 (4,87)
Rasgo (mN)	211,75	271,25 (28,1)	276,0 (30,34)	343,25 (62,1)
Delaminação (kg.f/pol2)	10,79	13,65 (25,23)	17,77 (63,03)	18,34 (72,2)

A abrangência da presente patente de invenção, portanto, não deve ser limitada aos exemplos ilustrados, mas sim, apenas aos termos definidos nas reivindicações e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXSUDADOS DE CULTURA DE

CÉLULAS (PECC), caracterizado pelos polissacarídeos exudados de cultura celular (PECC) serem extraídos usando os seguintes passos:

1) Preparação do meio de cultura solidificado para desenvolvimento dos calos de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg (Rubiaceae) e de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioquinha

a) Para o preparo da parte salina do meio de cultura solidificado para desenvolvimento dos calos, adiciona-se à 500ml de água deionizada autoclavada, os seguintes ingredientes:

- 10ml de solução estoque de NH_4NO_3 (82,5g/l)
- 20ml de solução estoque de KNO_3 (95g/l)
- 5ml de solução estoque de H_3BO_3 (1,24g/l)
- 5ml de solução estoque de KH_2PO_4 (34g/l)
- 5ml de solução estoque de KI (0,166g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.05g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,005g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (88g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (74g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3,38g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,72g/l)
- 5ml de solução estoque de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,005g/l)
- 10ml de solução estoque de Na_2 EDTA (3,72g/l)
- 10ml de solução estoque de FeSO_4 (2,78g/l)
- 5ml de solução estoque de Tiamina HCl (0,08g/l)

b) Completa-se a solução salina para 1 litro com água deionizada e autoclavada e, em seguida, adiciona-se as seguintes vitaminas em suas respectivas quantidades:

- 100mg de Mioinositol
- 30g de sacarose comercial
- 50ml de água de coco comercial
- 100mg de Cisteína

- 1mg de Ácido Nicotínico
- 1mg de Piridoxina
- 10mg de Tiamina
- 2mg de Picloran
- Adição de 6g de ágar para autoclavar

- 2) Os calos das espécies são mantidos no meio solidificado com fotoperíodo de 12 horas e sob temperatura entre 15° e 25°C até ocorrer o desenvolvimento significativo da massa celular;
- 3) Separar os pedaços friáveis obtidos dos calos, usando pinça e bisturi em condições assépticas;
- 4) Depositar os pedaços friáveis das espécies em meio salino líquido e vitaminado;
- 5) Manter os pedaços friáveis no meio líquido sob agitação constante, fotoperíodo de 12 horas e a uma temperatura entre 25° e 35°C por cerca de 25 a 35 dias;
- 6) Filtrar o meio com os exsudados após a fase exponencial de crescimento das células e pedaços friáveis em suspensão no meio líquido;
- 7) Precipitar o meio filtrado com álcool 3 vezes o volume;
- 8) Re-suspender o precipitado em água com agitação constante, a uma temperatura entre 50° e 70°C pelo tempo de 3 a 5 horas;
- 9) Repouso a frio;
- 10) Filtrar novamente o material insolúvel;
- 11) Secar a suspensão filtrada para a obtenção definitiva dos PECC.

2. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (1a) a adição dos ingredientes à 500ml de água deionizada autoclavada ocorre preferencialmente na exata ordem expressa.

3. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (2) os calos das espécies sejam mantidos no meio solidificado sob a temperatura preferencialmente de 20°C.

4. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (4) a deposição dos pedaços friáveis da espécie em meio salino líquido e vitaminado ocorrerá conforme descrito na etapa (1), porém sem a adição do agar para a solidificação.

5. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (5) os pedaços friáveis devem ser mantidos no meio líquido sob agitação constante na temperatura preferencialmente de 30°C.

6. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (5) os pedaços friáveis devem ser mantidos no meio líquido sob agitação constante pelo período preferencialmente de 28 a 32 dias.

7. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que nas etapas (6 e 10) a filtragem do material insolúvel será realizada preferencialmente pelo tecido nylon.

8. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (8) a re-suspensão do precipitado em água com agitação constante será realizado a temperatura preferencialmente de 60°C.

9. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que na etapa (8) a re-suspensão do precipitado em água com agitação constante será realizado pelo tempo preferencialmente de 4 horas.

10. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o processo compreende suspender, em meio aquoso, a polpa celulósica com polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC).

11. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com as reivindicações 1 e 10, caracterizado pelo fato de que os polissacarídeos que podem ser exsudados por células em suspensão (PECC) podem ser obtidos de células de qualquer fonte ou organismo como plantas, fungos e bactérias.

12. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com as reivindicações 1 e 10, caracterizado pelo fato de que a concentração de polissacarídeos

que podem ser exsudados por células em suspensão (cultura de células - PECC) corresponde a qualquer uma desejada.

13. PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS, de acordo com as reivindicações 1 e 10, caracterizado pelo fato de que o meio aquoso da polpa em suspensão poderá conter associado, outros polissacarídeos, aditivos ou materiais conhecidos da arte.

RESUMO

PROCESSO PARA PROPORCIONAR UM MATERIAL CELULÓSICO COM PROPRIEDADES APERFEIÇOADAS DE RESISTÊNCIA E RIGIDEZ ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS EXSUDADOS DE CULTURA DE CÉLULAS (PECC)

Verificou-se que é possível utilizar polissacarídeos (PECC) extraídos de cultura de células em suspensão para aperfeiçoar as propriedades de resistência e rigidez de materiais celulósicos, de modo que, correspondentemente, a presente invenção refere-se a um processo para proporcionar um material celulósico com maior resistência ao estouro, à tração, à delaminação, ao rasgo e mais rígido. Tal comprovação e potencial para interação com a celulose de suspensões celulósicas foram fornecidos através da utilização de suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg (Rubiaceae) e de *Phaseolus vulgaris* L. cv. carioquinha (respectivamente).

DISCUSSÃO

Desenvolvimento Sustentável

O surgimento de problemas socioambientais como ameaçadores à sobrevivência da vida no planeta é um fenômeno relativamente recente para a humanidade, mas extremamente preocupante. O ser humano é uma espécie, entre milhares, que depende do todo para sua sobrevivência no planeta. Sendo assim, como qualquer outro ser, ele também faz parte do ecossistema. No entanto, o homem é a única espécie que tem essa consciência e a facilidade para interferir benéfica ou maleficamente no ambiente e, portanto, sua responsabilidade é inigualável. Sabe-se que é difícil, mas certamente possível, resolver a aparente dicotomia entre produzir os bens destinados às necessidades humanas e confrontar com os malefícios da exploração dos recursos naturais. Essa idéia, adaptada de Silva (2007), visa estimular a reflexão de todos os setores nesta inevitável busca por um desempenho ambiental cada vez mais sustentável. Mas o que vem a ser desenvolvimento sustentável?

A percepção de uma necessidade de um equilíbrio global de desenvolvimento sem, contudo, impedir o desenvolvimento dos países subdesenvolvidos é bem recente. Desenvolvidas ou não, as diferentes nações passaram a identificar desníveis entre o acelerado desenvolvimento humano e o impacto desse desenvolvimento no meio ambiente.

Consequentemente, tal conscientização, planos específicos de diminuição de impacto ambiental e alguns incidentes ambientais oriundos desse impacto, resultaram no surgimento da expressão (termo) “desenvolvimento sustentável”³. Esta expressão estabelece as bases da relação entre o desenvolvimento econômico e a conservação do meio ambiente (Viola, 1996; Vecchiatti, 2004). Em linhas gerais, o termo resulta de uma visão crítica sobre o modelo de desenvolvimento dos países industrializados, ressaltando a incompatibilidade entre produção e consumo e, também sinaliza o uso racional dos recursos naturais, obedecendo à capacidade suporte dos ecossistemas⁴. Tecnicamente, nesse contexto, o conceito de sustentabilidade estaria relacionado à capacidade de um sistema em propiciar meios de subsistência à determinada população em intervalos espaço/temporais definidos (Castro & Morrot, 1996).

A expressão “desenvolvimento sustentável” então, passa a se tornar um marco reflexivo entre a década de 70, onde o homem se preocupava com o “controle da poluição”; e a década de 80-90, quando, em seu pensamento, passa a existir reflexões sobre “planejamento ambiental e processos de produção sustentáveis”. Estes últimos serão o centro da discussão no avançar deste capítulo

³ Esse termo surge especificamente em 1987, em plena Comissão Mundial sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (estabelecida pela ONU: Organização Mundial das Nações Unidas) no lançamento do relatório *Our common future* – “Nosso futuro comum” (mais conhecido com Relatório de Brundtland), emitido pela primeira-ministra da Noruega, Gro Harlem Brundtland que, na época, presidia a comissão criada pela ONU (Camargo *et al.*, 2002).

⁴ Reflexivamente a mensagem desse relatório passou a ser conhecida pela seguinte frase: “Garantir as necessidades da geração presente sem, contudo, comprometer o suprimento das necessidades das gerações futuras”.

conclusivo do presente trabalho; onde se pretende, além de discutir os resultados obtidos nas diferentes áreas, formular algumas sugestões sustentáveis para a produção em larga escala das matérias-primas, cujos benefícios foram aqui estudados e/ou prospectados.

Posturas industriais atuais

Como se pôde observar no item acima, a crise ecológica global tem-se tornado, nas últimas três décadas, um dos maiores desafios da humanidade (Frey, 2001). Refletindo sobre esse aspecto, segundo Gerhardt e Almeida (2005), Ponting (1995) descreve como populações humanas, enquanto grupo social produtor de bens e insumos, teriam atuado, em diferentes épocas e lugares, sobre o meio ambiente de modo a modificá-lo de uma maneira que hoje seria classificada como “insustentável” no que se refere à manutenção dos padrões de produção e consumo existentes. Com essa ameaça, atualmente, busca-se alternativas para que o desenvolvimento sócio-econômico seja sustentável (Mattos & Ferreti-Filho, 2000).

Sustentando essa idéia, que também pode ser encontrada nos trabalhos de Miranda e colaboradores (1997); Mattos e Ferreti-Filho (2000), sugerem que “a pressão crescente, em nível mundial, que existe sobre as organizações industriais para adotarem medidas de proteção ao meio ambiente, faz com que as empresas, dependendo

do contexto em que atuam, reformulem suas estratégias competitivas incluindo a variável ambiental”.

Em relação a essa variável ambiental, temas como certificação e licenciamento vêm ocupando posição de destaque no meio industrial e de outras atividades que, de alguma forma, possam causar algum impacto ao meio ambiente. A literatura recente (Viana *et al.*, 2003), vem detectando uma interface entre estes dois instrumentos (certificação e licenciamento), e sinaliza preocupações praticamente inéditas do Poder Público em relação a esses aspectos. O Poder Público, nesse sentido, vem valorizando iniciativas de natureza ambiental ao conferir o licenciamento ou a certificação. É o que ocorre, por exemplo, com o fomento de pesquisas e investimentos nas chamadas “tecnologias limpas” ou “tecnologias verdes” (*Green Technologies*). Em linhas gerais, essa postura produtiva que vem, muito recentemente sendo adotada, envolve a priorização de extrações de matérias primas que não envolvam, por exemplo, solventes muito agressivos ou tóxicos, extrações a seco e etc.

Um outro fator recente e predominante nas empresas quando as variáveis ambientais são consideradas na postura corporativa das mesmas para o gerenciamento ambiental, é a obtenção de certificados normativos da série ISO 14000 que, por sua vez, só podem ser emitidos pelas chamadas Instituições Normatizadoras. Segundo Souza (2000), essas certificações, além de tentarem garantir a proteção ambiental, também podem vir a apresentar oportunidades empresariais. É por isso que é possível afirmar que tais

sistemas, que surgiram a partir da década de 90, também surgiram para cumprir demandas como a ética nos negócios e responsabilidade social. Além de, evidentemente, atender metas do desenvolvimento sustentável (Nardelli, 2001). Porém, para tanto, os sistemas de certificação ambiental envolvem as chamadas "auditorias ambientais" e a concessão de "selos ambientais" (Viana *et al.*, 2003).

Nesse aspecto, a substituição de matérias primas de origem petroquímica ou não sustentável, a certificação de fornecedores quanto a selos ambientais e compromisso com a não utilização de mão de obra infantil, tecnologia limpa, tentativa de neutralizar emissões de carbono e gases estufa (e isso é muito mais do que comprar "créditos de carbono"); somados às certificações normativas (meio ambiente e qualidade), parecem, de uma forma muito positiva, constituir os principais coadjuvantes das estratégias econômico-mercadológicas das principais indústrias atuais. Essas posturas ambientalmente corretas parecem conduzir os principais caminhos que vem sendo utilizados rumo ao desenvolvimento sustentável.

Sinalizações sustentáveis para a produção em larga escala das matérias primas prospectadas na tese

Citando discretamente o histórico que levou às aparentes tendências posturais do setor produtivo industrial nos dias de hoje e, percorrendo brevemente sobre tais posturas corporativas para a questão da gestão ambiental propriamente dita, os próximos passos dessa discussão são a sugestão e/ou definição de possíveis

estratégias sustentáveis (ou ambientalmente corretas) para a produção em larga escala das matérias primas aqui estudadas para os diferentes setores aqui apontados.

Portanto, mais do que apontar a aplicabilidade industrial das matérias-primas aqui relatadas, cujas propriedades físico-químicas foram estudadas em detalhe (ver discussão dos resultados nos capítulos referentes ao: artigo 1 e às patentes 1, 2, 3, 4 da presente tese), pretende-se agora, refletir sobre uma possibilidade sustentável de produzi-las em demanda, caso as mesmas venham a se tornar futuramente, um produto e/ou insumo vegetal comercial. Cabe inicialmente sinalizar que, a discussão sobre as possibilidades de produção sustentável das matérias primas aqui prospectadas, não serão apresentadas em mesma ordem em que foram expostos os resultados do presente trabalho.

Hemicelulose de sementes e plântulas de eucalipto (Patente 3)

De acordo com os resultados expressos na patente 3, pode-se afirmar que o tratamento da polpa celulósica com hemiceluloses de parede celular primária (HPCP) oriundas de sementes e plântulas de eucalipto, favorece as propriedades mecânicas de resistência e retenção de forma de materiais celulósicos; como, por exemplo, o papel. Acredita-se que, o favorecimento das propriedades citadas se deve à capacidade das hemiceluloses de se ligarem às fibras celulósicas cobrindo-as total ou parcialmente, como acontece *in vivo* (Lima *et al*, 2003 e 2004).

O benefício, descrito acima, pôde ser comprovado pelos incrementos fornecido pelas hemiceluloses em 6 parâmetros mecânicos analisados na patente 3: porosidade (as HPCP aumentaram a resistência das folhas de papel à passagem de uma coluna de ar aplicada nas 4 concentrações utilizadas, tanto para sementes quanto para plântulas); estouro (as HPCP aumentaram à resistência ao estouro em duas concentrações analisadas para sementes e as 4 concentrações definidas para plântulas); tração (as HPCP de plântulas, mais expressivamente, aumentaram à resistência à tração nas concentrações adicionadas de 1 e 1,5%); rigidez (só houve aumento discreto detectado para esse parâmetros com as HPCP de plântulas); rasgo (tais polímeros aumentaram a resistência da folha quanto a esse parâmetro em todas as concentrações analisadas, tanto para sementes quanto para plântulas) e delaminação (apenas as maiores concentrações testadas forneceram incremento de resistência, tanto para sementes quanto para plântulas).

Em relação ao eucalipto (fonte de obtenção dessa matéria prima), conforme definido por Anesi (2007) - objeto "de ataque e idolatria" – trata-se de uma árvore nativa da Austrália que possui mais de 600 espécies naturais e que podem ser produzidas para se adaptar às diversas condições de solo e clima (Anesi, 2007). Constituindo a floresta arbórea mais importante do Brasil (do ponto de vista empreendedor), o eucalipto cobre uma área superior a 4 milhões de hectares (em território nacional), destinado exclusivamente à atividade comercial (Cid *et al.*, 1999). Nesse ponto, tal árvore tornou-se o centro da discussão promovida pela indústria

de papel e celulose e ambientalistas. Os primeiros, defendendo o interesse no desenvolvimento da atividade e, esses últimos (ambientalistas), sinalizando o receio de possibilidades do plantio excessivo da planta, causar danos ambientais irreversíveis.

Ainda segundo Anesi (2007), “a disseminação de sementes de eucalipto no mundo começou no início do século XIX. Na América do Sul, o primeiro país a introduzir o eucalipto foi o Chile em 1823 e, posteriormente, a Argentina e o Uruguai. No Brasil, segundo Mora e Garcia (2000), o eucalipto foi introduzido nessa mesma época visando à produção de lenha para locomotivas e, em seqüência, de dormentes para ferrovias e de postes para eletrificação”.

De acordo com o mesmo autor, porém desta vez citando Dean (1996), nesse começo de interesses na produção, o eucalipto destinava-se, especialmente, a fins medicinais e sanitários. Isto porque, medicinalmente, dentre outras características, tal espécie pode entrar na constituição de fármacos que, por sua vez, fazem uso da essência ou capacidade farmacodinâmica de seu princípio ativo característico, o eucaliptol. Do ponto de vista sanitário, sua importância se deve ao fato de suas raízes absorverem grande quantidade de águas paradas e, com isso, contribuírem para a diminuição da proliferação de mosquitos, por exemplo. Esses dois aspectos, que estão na origem da introdução do eucalipto (Anesi, 2007), tanto no Brasil como em outros países, para os ambientalistas, foram os detonadores dos impactos negativos futuros que acabaram surgindo após o plantio dessa espécie, em larga escala.

De acordo com Leão (2000), num primeiro momento dessa produção em demanda, houve desatenção para questões ambientais, isto porque, nessa primeira etapa, os estudos florestais sobre eucalipto concentraram-se apenas no aumento da produção para atender a demanda industrial que remanesceu. Ou seja, ainda estavam distantes de considerar as variáveis ambientais de tal plantio em nível industrial.

Assim, nos anos 1990, paralelamente às descobertas das qualidades que o gênero *Eucalyptus* apresenta (possibilidade de utilização para diversos setores) e a tecnologia de produção dominada, começaram a surgir às necessidades de busca de harmonia com o ecossistema de entorno, preservando, assim, o meio ambiente. Ao lado da expansão da eucaliptocultura, no Brasil, começam a surgir críticas ambientais e, pela primeira vez, no Brasil, surge o termo “deserto verde”.

Por outro lado, curiosamente não se detectavam críticas tão declaradas à maioria das grandes monoculturas agrícolas do mundo (quase sempre exóticas); tais como, milho, trigo, arroz, batata etc., ou mesmo no Brasil, no caso do café e da cana-de-açúcar (Anesi, 2007). Dean (1996), comentando esse fato, usa a expressão “curiosa xenofobia em relação a essa planta australiana”, pois a rejeição ao eucalipto por ser uma espécie invasora (também estrangeira) por parte de ambientalistas, parece não ter sido aplicada, de acordo com Anesi (2007) ao café, aos cítricos e até mesmo ao pinheiro.

Mesmo assim, os problemas com o eucalipto, conforme Dean (1996) ocorrem em qualquer monocultura, tais como a retirada de

nutrientes em alta rotatividade, emissão de terpenos e fenólicos que inibem o crescimento de espécies concorrentes (“deserto verde”) e, conseqüentemente, o prejuízo de fauna.

Outra grande contradição se forma quando o assunto envolve os empregos gerados pela cadeia produtiva da silvicultura, no nosso caso, o eucalipto. Também segundo Anesi (2007), em reportagem no jornal Zero Hora do dia 13/11/2006, a Aracruz Celulose, por exemplo, apresenta dados comparativos entre sua unidade produtiva no Espírito Santo e a sua unidade de Guaíba-RS, divulgando uma estratégia interna para ampliação, com o início da atividade programado para 2011. Tal expansão, segundo a empresa, permitiu projetar a geração de 1.250 empregos. Em complemento, a Votorantin Celulose, em informe publicitário⁵, comparativamente, divulga seus investimentos na ordem de U\$ 1,3 bilhões de dólares com geração de 3,4 mil empregos diretos e indiretos e 34 mil na cadeia econômica da região que ocupa.

Outro exemplo do âmbito social envolve o Estado do Rio Grande do Sul, que, em 2004, deu início a uma campanha de incentivo à silvicultura com o programa Proflora (Programa de incentivo ao florestamento), financiando inclusive, através dos órgãos públicos como BNDS, projetos de plantio de florestas. Com isso, houve incentivo à criação e organização de uma cadeia produtiva no setor de madeiras. Para se ter uma idéia, esse estado pretendia, com essa idéia, aumentar de 200 mil para 400 mil empregos, diretos e indiretos, no setor, envolvendo o manejo das florestas, a indústria de

celulose e moveleira e toda cadeia com origem na silvicultura (Anesi, 2007).

Com isso, ao que tudo indica, parece existir uma significativa polêmica em relação às questões sócio-ambientais que envolvem o cultivo em larga escala do eucalipto. Por um lado, ambientalistas divulgam a possibilidade de danos irreparáveis ao meio ambiente e por, outro, o ambiente corporativo incentiva e patrocina programas sustentáveis que podem defender seus interesses sem, contudo, resultar num desvio de perfil sustentável que as corporações atuais estão, naturalmente, assumindo.

Por esse motivo, não se pretende aqui, chamar atenção para qualquer forma de manejo ambientalmente correto (sustentável) que envolva essa espécie australiana tão importante para a economia nacional. O que se pretende, é tentar sinalizar algum benefício ou agregação de valor a cadeia da espécie que, evidentemente já existe, e de forma muito bem definida. Para isso, partimos do pré-suposto de que, a planta, ainda que sua produção e expansão não aumentem, conforme citado, já é plantada em elevadíssima escala. Sendo assim, como a utilização de sementes e plântulas da espécie poderia agregar valor ao setor produtivo de papel?

Nesse ponto, ainda que a metodologia de extração dessas hemiceluloses não seja considerada tecnologia limpa (pois envolve o uso de solventes agressivos ver patente 3), não significa que não possa haver possibilidade de agregar valor para o setor produtivo em questão. Isto porque, toneladas de sementes se acumulam e são

⁵ <http://www.vcp.com.br/losango/ptb/home>

deixadas em campo após a retirada dos eucaliptos do local de plantio comercial para a produção de papel. Sendo assim, essa imensa quantidade de biomassa, que, até o presente momento, não possui nenhuma finalidade expressiva, poderiam vir a constituir excelente matéria prima para a extração de hemiceluloses que, conforme comprovado o benefício, incrementam propriedades de resistência do papel (Patente 3).

Chama-se atenção para o uso de plântulas da espécie também como matéria prima de extração de hemiceluloses de parede primária (Patente 3). Sob esse aspecto, sabe-se que a tecnologia do setor de papel e celulose para o trabalho com viveiros de plantas de eucalipto é extremamente avançada. Nesse ponto, tecnologias que envolvem, inclusive, técnicas de seleção e melhoramento genético de plântulas (Cid *et al.*, 1999), permitiram um aumento expressivo tanto na produtividade de madeira por unidade de área de plantio, por exemplo, como também possibilitaram a obtenção de povoamentos florestais mais homogêneos (Gonçalves *et al.*, 2001).

Outros aspectos que também evidenciam a tecnologia no trabalho com plântulas da espécie surgiram da necessidade de produzir as mudas para o plantio licenciado em áreas normalmente muito bem definidas. Estas áreas, com características específicas, com o passar do tempo, vão perdendo a produtividade o que resulta em planos de manejos especiais das mesmas (Carvalho, 1992). Paralelamente ao manejo dessas áreas que envolvem, inclusive, melhoria de solo, as companhias do setor investem em seleção gênica e melhoramento da espécie (através de suas plântulas) objetivando

tornar a planta mais resistente, uniforme e com maior velocidade de estabelecimento e crescimento (Gomes *et al.*, 2002).

Sendo assim, para finalizar, nesse contexto de investimento e produtividade de plântulas de eucalipto, parece ser razoável sugerir que o aproveitamento das mesmas, visando outro foco, ou seja, o de obtenção de hemiceluloses. Neste contexto, as plântulas poderiam ser submetidas à privação de luz (objetivando sua estiolagem) e, após dado tempo de crescimento, serem aproveitadas para a produção de hemiceluloses capazes de interagir com a celulose em folha, melhorando assim, as características mecânicas do papel.

Ainda assim, cabe salientar que, mesmo que o processo de estiolagem promova a exclusão de solventes agressivos para a eliminação do pigmento clorofila do insumo final (hemicelulose); tais sugestões de fontes para obtenção de hemicelulose necessitam de melhores análises, tanto de viabilidade de processo (tecnologia não limpa de obtenção das mesmas), quanto de custo benefício. Por esse motivo, o que se pretendeu nessa parte da discussão, foi apenas sinalizar um campo de estudos interessante para futuras análises da viabilidade produtiva dessa matéria prima.

Polissacarídeos exsudados de cultura de células (Patente 4)

Conforme descrito anteriormente (Patente 4), também foi investigado no presente trabalho, a possibilidade de utilização de polissacarídeos exsudados de culturas de células (ilustrados pelas espécies *Rudgea jasminoides* e *Phaseolus vulgaris*) como aditivos à

polpa celulósica em suspensão para formação de papel e/ou derivados celulósicos mais resistentes.

Assim, a cultura de células, cultura de tecidos ou cultura vegetal *in vitro*, trata-se de um modelo biotecnológico bem conhecido e amplamente dominado na atualidade. Seu aperfeiçoamento e desenvolvimento tiveram importância crucial no melhoramento de muitas espécies vegetais frente a inúmeros fatores bióticos e, também abióticos (Zenk *et al.*, 1996 e 1998). Estes dois últimos fatores englobam características desejáveis em espécies de interesse, como a resistência a pragas e/ou condições de estresse, aumento de produtividade e/ou velocidade de crescimento e incremento na produção de substâncias ativas (como metabólitos, por exemplo) por parte da planta (Buffa-Filho *et al.*, 2002).

Assim, a cultura *in vitro*, compreende a cultura de células, tecidos ou órgãos, em condições assépticas e meios artificiais que venham a conter, pelo menos, compostos como vitaminas, nutrientes, sais minerais, fonte de carbono e reguladores do crescimento (Andrade, 2002). Nesse ponto, algumas das áreas de aplicação da cultura de tecidos incluem, entre outras, a micropropagação, a cultura de meristemas, a embriogênese somática, a variação somaclonal, a seleção *in vitro*, a cultura de protoplastos e a hibridação somática (Sahai e Knuth, 1985).

Ainda que essa ciência tenha considerável importância para a melhoria da seleção e, consecutivamente, da propagação de espécies de interesse econômico, sua prática não se resume a esse campo. Desta forma, um outro interesse do desenvolvimento biotecnológico

da prática de cultura de células, envolve não apenas o setor químico, mas também, o farmacêutico. Isto porque, quando se pretende, por exemplo, extrair um ativo ou fármaco de uma espécie de importância farmacológica, inúmeros fatores devem ser considerados. Dentre estes, não apenas a cadeia de fornecimento, mas também, dependendo da importância da produção do mesmo, o incentivo a monocultura da espécie. Como resultado deste fator, processos de derrubada de mata nativa para ceder lugar ao cultivo, desgaste de solo e displicência no rodízio de plantio, são só algumas, das conseqüências negativas que podem vir a surgir.

Assim, objetivando esboçar uma espécie de reação a este tipo de conseqüência, a cultura de tecido passou a constituir excelente ferramenta biotecnológica para a produção em larga escala de supostos compostos de interesse sem, contudo, ter que obter os mesmos por extração convencional, através de processos ambientalmente incompatíveis como a monocultura, seguida de derrubada ou poda, por exemplo. Ou seja, quando se utiliza cultura de células para obter substâncias bioativas em considerável concentração, segundo Sahai e Knuth (1985), basta que se compreenda a cinética de formação do produto (no caso, o metabólito bioativo) versus o estágio da proliferação celular da cultura selecionada.

Como se não bastasse, o uso da cultura *in vitro* para a obtenção de substâncias de interesse, qualquer que for o setor, pode vir a constituir, inclusive, uma forma de substituição à produção sintética de insumos em laboratório, sejam eles compostos secundários ou

primários (como os compostos em questão – ver patente 4). Para reforçar essa posição, cita-se o fato de que, muitos compostos sintetizados em laboratório são freqüentemente obtidos através de metodologias muito complexas e, com rendimento constantemente baixo, o que também parece vir a sinalizar uma estratégia de produção economicamente inviável (Holton *et al.* e Nicolau *et al.*, 1994). Em complemento, quando a estratégia de produção é química ou sintética, normalmente na planta fabril, os solventes envolvidos, tanto nos processos de síntese, como nos processos de extração de compostos de interesse comercial, são demasiadamente agressivos e, do ponto de vista corporativo atual, não corroboram com as chamadas metas tecnológicas “limpas e ambientalmente amigáveis” de produção de insumos.

Quando os especialistas (biotecnólogos) detectaram estas vantagens, muitos trabalhos de análise comparativa de produção de substâncias exsudadas em cultura de cultivos vegetais *in vitro* versus cultivos vegetais *ex vitro* passaram a ser desenvolvidos. Apenas como ilustração, cita-se os resultados de Buffa-Filho e colaboradores (2001 e 2002) que detectaram, por exemplo, que, a cultura de células de *Maytenus ilicifolia in vitro*, produziu 100 vezes mais o composto hidroximaitenina do que as raízes da mesma planta, cultivadas *ex vitro*.

Ainda assim, as vantagens de obtenção de produtos exsudados em cultura não se aplicam apenas a compostos secundários, mas também, a compostos primários, como polissacarídeos. Oliveira Júnior e colaboradores (2004 e 2006), por exemplo, analisando suspensões

celulares de *Rudgea jasminoides*, verificaram a presença de, pelo menos três polissacarídeos de parede celular: o xiloglucano (correspondente a 2% do material exsudado), arabinoxilanos e hemiceluloses. Sendo que estes dois últimos foram encontrados em quantidades predominantes. Nesses trabalhos, os autores ainda utilizaram o produto da hidrólise enzimática desses polissacarídeos exsudados a fim de verificarem seus respectivos efeitos biológicos sobre o metabolismo extracelular da espécie em questão.

Assim, ainda que os resultados dos trabalhos de Oliveira Júnior e colaboradores (2004 e 2006) não possam ser diretamente relacionados à presente estratégia utilizada (Patente 4) para obter um aditivo natural para incremento das propriedades mecânicas de derivados celulósicos, eles serviram para despertar nossa atenção para um modelo sustentável de produção de polissacarídeos com capacidade de interagir com a celulose de polpas celulósicas (afinal, se são de parede celular, evidentemente, pelo menos *in vivo*, são indiscutivelmente capazes de interagir com tal polímero).

Para finalizar, conforme previamente citado, uma vez que a metodologia de obtenção de polissacarídeos exsudados de células das espécies prospectadas consiste em manter calos ou suspensões celulares das mesmas em meio líquido salino modificado, contendo tiamina, cisteína, ácido nicotínico, piridoxina, água de coco, sacarose, picloram sob agitação constante (Oliveira Júnior *et al.*, 2006), podemos inferir que, extraí-los em considerável escala para finalidades comerciais, tornou-se plausível. Isto porque, basta que as células, calos ou pedaços de tecidos das espécies fiquem em meio

apropriado sob agitação exsudando seus respectivos polissacarídeos para, após término da fase de crescimento exponencial, filtrá-los e submeter o meio filtrado à precipitação etanólica para a coleta dos polissacarídeos por precipitação. Uma vez obtido os polissacarídeos precipitados, basta ressuspendê-los em água e, após nova filtragem, secá-los. Depois disso, o insumo com benefício para o setor papelheiro estaria pronto para ser diretamente adicionado em polpa.

E, no setor em questão, através dos resultados expressos na patente 4, pode-se afirmar que os polissacarídeos extraídos de suspensões celulares de *Phaseolus vulgaris* e *Rudgea jasminoides*, apresentaram considerável capacidade de interação com fibras e microfibrilas de celulosas (em suspensão e em folha) de diferentes polpas celulósicas analisadas. Esse potencial foi ilustrado nessa patente através da verificação do potencial de adsorção dos polissacarídeos exsudados de cultura de células de *P. vulgares* e *R. jasminoides* em suspensões celulósicas de pastas mecânicas e químicas e através da análise de diferentes parâmetros de verificação de resistência em folhas de papel formadas a partir da adição dos polissacarídeos exsudados de cultura de células de *R. jasminoides* (em 3 diferentes concentrações). Desses parâmetros, chama-se atenção para os incrementos fornecidos por essa adição para a diminuição de porosidade da folha e o aumento da resistência ao estouro, rasgo e delaminação. Em todos esses parâmetros o incremento mais significativo correspondeu a adições desses polissacarídeos exsudados em concentração igual a 1,5%.

O xiloglucano de jatobá (Patentes 1 e 2)

A primeira defesa de interesse aqui constatada (Patente 1) se refere à utilização do polissacarídeo xiloglucano das sementes de jatobá como matéria prima para o setor cosmético. Nessa patente, o benefício encontrado para esse setor pôde ser ilustrado, por exemplo, pela preparação de composições cosméticas anti-rugas e anti-idade usando o xiloglucano como principal ativo para essa finalidade. Tais formulações demonstraram efetivo potencial de promoção de proliferação/viabilidade celular (definida por um aumento do número de células frente a um grupo controle não tratado com xiloglucano), efetivo potencial pró-colagênico (definido pela quantidade excedente de colágeno produzido por células tratadas com xiloglucano em relação a um grupo de células não tratadas com o polímero) e de produção total de colágeno (ver patente 1). Esse potencial é ainda mais expressivo quando comparado aos resultados de promoção de proliferação celular e síntese de colágeno pelo fator de crescimento tumoral TGF-beta (fármaco). Isto porque algumas concentrações de xiloglucano analisadas mostraram desempenho semelhante ou, até mesmo, superior.

Ainda em relação ao potencial biotecnológico do xiloglucano, pode-se perceber que tal polímero também apresenta capacidade de interação com fibras e microfibrilas celulósicas (ver patente 2), sinalizando uma possibilidade de utilização também no setor de papel e celulose. Isto porque, quando adicionado à polpa celulósica antes da formação da folha de papel, esse polissacarídeo tem a capacidade de

aumentar a resistência da folha formada em relação a todos os parâmetros mecânicos analisados nessa patente: estouro, tração, rigidez, rasgo e delaminação. Convém complementar que todos esses parâmetros são significativamente melhorados com a adição de uma concentração mínima de 0,5% (m/m) do mesmo.

Verificados os potenciais de aplicação do xiloglucano nos dois setores citados, a *Hymenaea courbaril* (jatobá), da Família Leguminosae – Caesalpinioideae, conforme citado, é uma das fontes brasileiras mais conhecidas para a obtenção do mesmo, podendo apresentar, segundo Buckeridge e Dietrich (1990) um rendimento de mais de 50% na extração bruta para esse polímero vegetal. Rendimento este que, posteriormente foi confirmado por Vargas-Rechia e colaboradores (1998). Tal espécie pode ser conhecida por diversos nomes vulgares: jatobá, jutaí, jutaí-açu, jutaí-bravo, jutaí-grande, jataí, jataí-açu, jataí-grande, jataí-peba, jataí-uba, jataí-uva, jataíba, jataúba, jatioba, jatiúba, jupati, copal, dentre outros. E possui como sinonímias, *Hymenaea animifera* Stokes, *H. candolleana* Kunth, *H. courbaril* var. *obtusifolia* Ducke, *H. courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Y. T. Lee & Lang., *H. multiflora* Kleinhoonte, *H. resinifera* Salisb., *H. retusa* Willd. ex Hayne, *H. stilbocarpa* Hayne e *Inga megacarpa* M. E. Jones (Ferreira & Sampaio, 2000; Lorenzi, 2002).

Assim, sob um primeiro aspecto, chama-se atenção para o fato de que, a *Hymenaea courbaril* é uma árvore originalmente encontrada desde o México até grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil (norte até o sudeste), Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia. (Ferreira

& Sampaio, 1999). Isto quer dizer que, se tal árvore, viesse a ser definitivamente explorada no setor cosmético (Patente 1) e também no papelero (ver Patente 2), para a produção industrial de xiloglucano, poderia ser encontrada em diversos locais; o que nos faz acreditar, na possibilidade otimista de diferentes logísticas para um suposto fornecimento de suas sementes.

Um segundo aspecto, envolve a possibilidade de aproveitamento de cadeias de fornecimento da espécie já definidas. Nesse aspecto, sabe-se que sua madeira, por apresentar alta densidade básica, cerne vermelho a castanho-avermelhado, alburno branco-acinzentado e textura média a grossa, é empregada em construção civil, marcenaria, peças torneadas, instrumentos musicais e laminados (Rizzini, 1971).

O seu caule, pelo fato de exsudar uma resina, rica em terpenos (Martin *et al.*, 1972, Abdel-Kader, 2002) conhecida como “jutaicaica” ou “copal-da-américa” (utilizada na fabricação de vernizes) também é explorado e o produto das extrações de seu cerne (resina), já comercializado. Pensando ainda no aproveitamento de cadeias pré-definidas para essa espécie, como se não bastasse, a casca e a seiva do tronco são usadas ainda na fitoterapia popular, principalmente no tratamento de dermatites e outras doenças de pele, devido ao fato de que, a resina (também presente na casca), de origem diterpênica, possui atividade antifúngica (Arrhenium & Langenheim, 1983).

Em complemento, o endocarpo do seu fruto é comestível, podendo ser consumido *in natura* (Silva *et al.*, 2005). Nesse caso, é usado na preparação de farinhas, doces e bebidas, ou utilizado na

alimentação de animais domésticos, sendo também, já comercializado (especialmente no norte do país). Nota-se que, uma vez que parte do fruto, no caso, a popular “farinha de jatobá” é utilizada na alimentação humana e por outros animais na forma de ração; pode-se sugerir também, o aproveitamento da mesma cadeia de fornecimento para a obtenção das sementes. Estudos recentes, inclusive, têm prospectado a utilização da farinha de jatobá na elaboração de biscoitos do tipo *cookie*, a fim de aproveitar suas características reológicas e nutricionais (Silva *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2001). Além disso, as sementes desses frutos são empregadas na fabricação de jóias e outros objetos artesanais (comunicação pessoal).

Além de todas essas qualidades e possibilidade para exploração e utilização, tanto da espécie, como de suas respectivas cadeias de fornecimento já definidas, suas sementes também constituem uma fonte abundante de xiloglucanos (Buckeridge & Dietrich, 1990), o que, torna a utilização do jatobá, em nível industrial, uma alternativa muito interessante para a obtenção desse polissacarídeo. Isto porque, uma árvore adulta produz, em média, cerca de 800 frutos, mas pode alcançar até 2000 frutos em produção anual. Pelo menos para *Hymenaea stilbocarpa* (popularmente conhecido como jatobá de cerrado), estudos revelaram que o número de sementes por fruto pode passar de dez unidades (Botelho *et al.*, 2000), sendo que, o número de sementes por quilograma é de cerca de 290 e o peso de mil sementes, corresponderia a quase 5 kg. Para *Hymenaea courbaril*, a possibilidade de um rendimento industrial interessante é ainda mais otimista, uma vez que a média do peso das sementes dessa espécie é

quase duas vezes superior ao peso das sementes de outras espécies do gênero *Hymenaea* (Carpanezzi & Marques, 1981).

Assim, num cálculo aproximado, se considerarmos uma média de 1500 frutos/árvore, de uma única árvore de *Hymenaea corbaril*, pode-se obter, em virtude do elevado rendimento de extração, cerca de 65 kg de xiloglucano puro (Tabela 1).

Segundo Flores e Benavides (1990), para a obtenção das sementes, a coleta pode ser feita no chão ou diretamente na árvore, quando os frutos apresentarem coloração marrom e iniciarem a queda espontânea. Porém, pensando em níveis distintos de maturação das sementes ainda na árvore, para uma questão de padronização da posterior matéria prima (xiloglucano) extraída, pode-se estipular que a coleta deverá ser feita exclusivamente no chão. Como ilustração da efetividade desse sistema de coleta característico como ferramenta extrativista, pode-se citar, por exemplo, a coleta de grãos de café para a produção de café solúvel. Informações pessoais revelam que, a coleta em campo por comunidades extrativistas treinadas não é inviável, pois para a produção de pó de café solúvel que atente para exigências internacionais de qualidade, muitas vezes são necessárias inúmeras visitas a campo para coletar os grãos no estágio de maturidade ideal para a produção do produto padronizado.

O transporte dos frutos pode ser feito em sacos de ráfia para evitar o excesso de umidade, aquecimento e proliferação de microorganismos (Ferreira & Sampaio, 1999). Após beneficiamento dos frutos para a obtenção das sementes, estas podem ser armazenadas em temperatura ambiente por, no mínimo, dois anos;

sendo que não existem informações sobre o armazenamento de sementes com graus de umidade inferiores a 9% e sob temperatura sub-zero (Flores & Benavides 1990).

Um terceiro aspecto que pode vir a reforçar ou defender a sugestão de uma possibilidade sustentável de utilização dessa espécie para a obtenção da matéria prima aqui prospectada (xiloglucano) é o fato de que a árvore também pode ser plantada em sistemas agroflorestais, com potencial de uso na recuperação de áreas degradadas (Langhenheim *et al.*, 1973). Esse último aspecto, então, nos faz refletir sobre um comum interesse comercial e, ao mesmo tempo, ecológico. Assim, plantar para reflorestar, com a possibilidade de lucro futuro com a exploração das sementes, pode vir a constituir uma nova forma motivadora para o início da utilização do jatobá.

Além de tudo isto, recentemente se descobriu que o jatobá irá responder às mudanças climáticas globais aumentando a produtividade de biomassa (Buckeridge *et al.*, 2007). Isto quer dizer que, pelo menos nos próximos 20-30 anos, período em que o aumento na concentração atmosférica de CO₂ irá aumentar consideravelmente, espera-se um efeito “positivo” sobre o jatobá. Mesmo assim, isto não quer dizer que as mudanças climáticas sejam boas, mas que podemos aproveitar esta característica da planta para melhorar ainda mais a sustentabilidade ambiental neste período.

Resumindo, a utilização do jatobá como fonte de obtenção industrial de xiloglucano (para o setor cosmético e/ou papeleiro) pode ser interessante, não apenas devido ao elevado rendimento de

extração do mesmo e o suposto “extrativismo sustentável”⁶ (mera coleta ao chão dos frutos), mas também, pelo fato de existir uma cadeia de fornecimento pré-estabelecida (para a farinha dos frutos, especialmente). Nesse ponto, adquirir as sementes utilizando-se da mesma logística de fornecimento, pode ser uma vantagem.

Além dessas características, que envolvem o aproveitamento da cadeia de fornecimento propriamente dita, nas quais, até mesmo possibilidades de partição de benefício (que é um dos pilares adotados como *drive* das corporações atuais⁷) em que comunidades extrativistas também estariam envolvidas, nossos estudos sugerem que a tecnologia de extração do mesmo é limpa. Isto quer dizer que, do ponto de vista atual, a extração de polissacarídeos de reserva de sementes parece ser otimista do ponto de vista ecológico (ver item Descrição do Estado da Técnica - Patente 1 ou Anexo 1 e Patente 2 do presente trabalho). Sendo assim, o processo que envolve, além do beneficiamento dos frutos e pulverização das sementes, uma extração aquosa, posterior precipitação etanólica e re-suspensão aquosa para secagem, pode ser efetivamente considerado ambientalmente “amigável”.

⁶ Para a utilização da afirmação “extrativismo sustentável”; novos, melhores e mais específicos estudos deveriam ser efetuados. Mesmo assim, convém reforçar que o objetivo dessa discussão é chamar atenção para tais estudos e sinalizar um processo de exploração aparentemente “amigável” (do ponto de vista ambiental).

⁷ A palavra *drive* aqui utilizada se refere a uma das três diretrizes ou filosofias de compromisso de boa parte das companhias atuais, cujos sistemas de gestão, permanecem atrelados. Sobre essa ótica, tais corporações adotam os três pilares do compromisso sócio-ambiental: o economicamente viável, o socialmente justo e o ambientalmente correto.

O galactomanano de faveiro (Artigo 1)

A primeira parte do presente trabalho (Artigo 1) se refere a uma prospecção da utilização do polissacarídeo galactomanano das sementes de *Dimorphandra mollis* como possível matéria prima para o setor alimentício e cosmético, tendo em vista a ocorrida utilização do mesmo (porém de outras fontes), como é o caso, conforme citado, do guar, tara e locusta, nestes e em outros setores.

Conforme discutido no artigo 1 da presente tese, nos estudos físico-químicos, caracteristicamente, o galactomanano comportou-se de maneira muito semelhante aos galactomananos já utilizados industrialmente. Ele demonstrou aumento considerável na viscosidade (com seu acréscimo) em dispersões aquosas (sendo que sua dispersão é facilitada com pH variando de 4 a 7), demonstrou um comportamento não-newtoniano com características pseudoplásticas. Além disso, demonstrou capacidade de formação de gel e aumento ainda maior de viscosidade quando associado (1:1) com a xantana e evidencias concretas de ausência de potencial cito e fototóxico; o que, por sua vez, sinaliza de maneira muito positiva a necessidade de um maior detalhamento relacionado a prospecções de uso no setor alimentício, farmacêutico e cosmético.

Num estudo prévio de interação com celulose de polpas químicas e mecânicas o galactomanano de faveiro demonstrou potencial de adsorção e interação. Conforme discutido no capítulo relacionado, isto também pode indicar potencial de aplicação para o

setor papelero. Evidentemente, maiores estudos (inclusive que envolvam análise de incremento em parâmetros mecânicos em folha – conforme patentes 2, 3 e 4) são necessários.

Assim, a *D. mollis*, da Família Leguminosae – Caesalpinioideae, (conforme o artigo 1) é uma das fontes brasileiras mais conhecidas para a obtenção de galactomanano, podendo apresentar um rendimento de mais de 70% na extração bruta para esse polímero vegetal (Panegassi *et al.*, 2000). Tal espécie pode ser reconhecida por diversos nomes populares: faveiro, faveira, favela, fava, fava-d'anta, barbatimão-de-folha-miúda, falso-barbatimão e canafístula (Lorenzi, 1992). Além disso, chama-se atenção para o fato de que, a *D. mollis* é uma espécie arbórea que atinge entre 8-14 metros de altura e pode ser encontrada em diversos biomas brasileiros como o cerrado e a caatinga (Lorenzi, 1992 e 2002, Panegassi *et al.*, 2000).

Assim, sob um segundo aspecto dessa discussão, cita-se o fato de que, a planta cresce no cerrado dos estados do Amazonas, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal (Almeida, 1998). Isto quer dizer que, se tal árvore viesse a ser definitivamente explorada no setor cosmético e/ou alimentício (artigo 1, conforme citado) e também no papelero (ver patente 2), para a produção em larga escala de galactomanano, poderia ser encontrada em diversos locais; o que nos faz acreditar, na possibilidade otimista (como sinalizado para o xiloglucano de jatobá) de diferentes logísticas para um suposto fornecimento de suas sementes e também, ao se considerar alguns

dos estados citados, a possibilidade social de partição de benefício com cooperativas de agricultores e coletores (extrativistas) de muitos locais, neste caso, mais empobrecidos que no estado de São Paulo.

Da mesma forma que anteriormente descrito para as sementes de jatobá, o terceiro aspecto dessa discussão, também envolve a possibilidade de aproveitamento de cadeias de fornecimento dessa espécie que, naturalmente, já estão bem definidas. Isto porque, sua madeira vem sendo utilizada como tabulado, confecção de caixas, compensados, forros, painéis, brinquedos, lenha e carvão (Lorenzi, 1992). Cabe reforçar que, antes da utilização de sua madeira propriamente dita, a casca do caule é retirada para a extração de taninos (Brandão, 1992). Dentre outras funções, os taninos são utilizados como aditivos de pastas para tratamento dentário, por impedirem a formação de placa bacteriana na dentição (Santos & Mello, 2004) e, no tratamento do couro (Brandão, 1992), sua utilização mais comum.

Ainda assim, sabe-se que, atualmente, a exploração comercial mais expressiva para a fava envolve a utilização de seus frutos, que são vagens deiscentes (Ferri, 1969; Barroso *et al.*, 1999), achatadas, de coloração marrom, medindo até 15 cm de comprimento, com mesocarpo farináceo adocicado, porém de sabor desagradável e forte odor (Ferreira *et al.*, 2001; Lorenzi, 2002). Tais frutos consistem em matéria prima extrativa de flavonóides glicosilados (ou glicosídeos flavônicos), especialmente a rutina, cujo rendimento de extração pode variar de 6 a 12% (Tomassini & Mors, 1966, Sousa *et al.*, 1991), destinados às indústrias farmacêutica e cosmética (Ferreira *et al.*,

2001). Entre outras funções, o bioflavonóide rutina, portador da vitamina P que, quando associada à vitamina C, normaliza a resistência e permeabilidade dos vasos sanguíneos, pode diminuir a permeabilidade de hemácias e proteger a vitamina C contra oxidação, sendo empregado, portanto, como fármaco anti-hemorrágico (Tomassini & Mors, 1966; Sousa *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 2001).

Ainda chamando atenção para a cadeia de fornecimento da rutina, que, até meados de 2005, no Brasil, era a responsável por uma produção de cerca de 100 toneladas/ano (Ribeiro *et al.*, 2005), sendo que a maior parte da mesma é destinada à exportação, entende-se que a mesma, ao que tudo indica, só tenderá a aumentar. Em resposta técnica, em 2006, por exemplo, o Ministério de Ciência e Tecnologia (através do sistema RETEC – Sistema Brasileiro de Respostas Técnicas) sinalizou para um investidor agropecuário que a “árvore corriqueira (*D. mollis*), aparentemente sem nada de especial, está provocando a cobiça da indústria farmacêutica mundial”.

Nesse contexto de aumento do plantio da espécie com possibilidade de lucro, é evidente que existe uma possibilidade indiscutível de agregação de valor a essa cadeia de fornecimento. Isto porque, uma vez que, os frutos (vagens) são utilizados para a extração desse fármaco (a rutina), entende-se que as sementes, constituem praticamente o descarte ou a sobra desse processo extrativo (Panegassi *et al.*, 2000). E se, um mero rendimento máximo de 12% na extração da mesma (Sousa *et al.*, 1991), resulta numa produção de 100 toneladas/ano (conforme citado), parece existir uma oportunidade interessante de investimento para a produção de

galactomanano (utilizando tal espécie) que, segundo Panegassi e co-autores (2000) a extração do mesmo, pode significar um rendimento extrativo bruto de mais de 40% sobre a massa seca de sementes. Cabe salientar que, esta idéia é apenas uma tentativa de reforçar ou chamar atenção para uma possibilidade de exploração futura da espécie a fim de agregar valor a sua cadeia de fornecimento. Cálculos comparativos sobre o peso bruto do fruto em relação às sementes, bem como o percentual de adição de tais insumos em um suposto produto, não foram considerados.

Num quarto aspecto desse item de discussão, quando se considera a semente dessa espécie, sabe-se que sua morfologia, representada pelo aspecto reniforme (Ferreira *et al.*, 2001) cujo endosperma circunda o embrião, é característica de cerca de 30% das leguminosas (Gunn, 1981). E isto permite comparar tais sementes, com espécies da mesma família (Leguminosae) que, por sua vez, já são exploradas industrialmente para a obtenção de galactomanano. Assim, sob o ponto de vista de uma possibilidade de aumento no rendimento de extração desse polímero em comparação com espécies já utilizadas industrialmente; chama-se atenção para o endosperma e quanto o seu peso seco representa em relação ao peso total da semente, afinal, é nesse tecido de reserva que o galactomanano é acumulado e, consecutivamente, é de tal tecido que ele vem a ser extraído. Nesse ponto, em termos comparativos, o potencial de uso da *D. mollis*, pode ser ainda mais evidenciado através da tabela comparativa abaixo:

Tabela 1: Comparação do percentual correspondente ao peso do endosperma em relação à massa seca de sementes de *D. mollis* e outras três sementes de uso industrial para obtenção do galactomanano: a *C. tetragonolobus*, produtora do guar; a *C. siliqua*, locusta ou caroba e a *C. spinosa*, produtora da “goma” tara.

Espécie	Endosperma (%)	Referência
<i>D. mollis</i> (caatinga)	~66	Panegassi <i>et al.</i> , 2000
<i>D. mollis</i> (cerrado)	~64	Panegassi <i>et al.</i> , 2000
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	35-42	Whistler & Hymowitz, 1979
<i>Ceratonia siliqua</i>	42-46	Glicksman, 1962
<i>Caesalpinia spinosa</i>	~20	Neukom, 1989

Conforme a tabela percebe-se então que, o percentual representativo do peso seco do endosperma das sementes de faveiro, tanto da caatinga, quanto do cerrado, é consideravelmente maior do que o das espécies já utilizadas industrialmente. Se considerarmos um rendimento característico de extrações hidro-alcóolicas para galactomananos de cerca de 80% sobre o peso seco do endosperma (comunicação pessoal), conclui-se que, da espécie em questão, seria possível extrair muito mais polímero por quilograma de semente.

Um quinto aspecto que se pretende chamar atenção no presente desfecho desse trabalho, seria a questão da viabilidade industrial sobre o aspecto produtivo-tecnológico e ambientalmente compatível da extração de galactomanano utilizando sementes de *D. mollis*. Assim, estudando a metodologia de obtenção desse polímero (com rendimento superior a 70%) descrita por Panegassi e colaboradores (2000), entende-se que sua adaptação para atender uma grande demanda na atualidade, ao que tudo indica, mostra-se extremamente plausível. Isto porque a metodologia consiste apenas em uma parte mecânica muito significativa para o processo e uma parte química

que, sob o ponto de vista ambiental, assim como a parte mecânica, também é considerada tecnologia limpa.

Dessa forma, a parte mecânica envolve uma moagem das sementes em moinho de bolas. Em seguida, o produto dessa moagem é submetido a uma separação granulométrica através de uma batelada de peneiras de diferentes *meshs*, sendo que, nesse ponto, baseado em diferenças de dureza dos tecidos, há separação de casca e eixo embrionário (que representariam contaminação na extração). Após essa separação granulométrica, o material retido na peneira de interesse (420 μ m), pode ser novamente moído até total pulverização e submetido à parte química do processo, ou seja, uma extração hidroalcóolica clássica para polissacarídeos de plantas superiores (ver Patentes 1 e 2). Conforme citado, tal metodologia (parte química) pode ser considerada limpa, uma vez que o único solvente envolvido (fora a água) é de produção sustentável e considerado não agressivo sob o ponto de vista ambiental (etanol).

Conforme descrito acima, da parte tecnológica, conclui-se que a possível produção em larga escala de galactomanano de *D. mollis*, seria, além de economicamente viável (processo simples e barato), também parece ambientalmente adequada (“amigável”). Apenas para termos comparativos, tal metodologia de extração, sob o ponto de vista ambiental, seria muito diferente da metodologia de produção da locusta ou caroba, por exemplo. Na produção deste hidrocolóide de uso industrial, o endosperma da semente é separado do restante da mesma, através de um processo que engloba um tratamento drástico com ácidos minerais (Wielinga, 1982).

Para finalizar esse aspecto, a única parte que não se pode afirmar com certeza sobre a adoção de diretivas ambientais no processo de extração, seria o beneficiamento dos frutos para extração da rutina, cujas sobras, conforme discutido, seriam as sementes. Mesmo assim, sabe-se que, além da extração de tal fármaco ser hidroalcolica (como a maioria dos glicoflavonóides), ele vem sendo muito explorado por grandes empresas nacionais e estrangeiras. E estas últimas, ao que tudo indica, parecem considerar as variáveis sócio-ambientais em seus processos de gestão. A Merck, por exemplo, multinacional farmacêutica que, aqui no Brasil, comercializa os frutos e, consecutivamente as sementes de fava, tendo em vista as corporações que estabelece relação comercial (Natura S/A, por exemplo), trata-se de um fornecedor ambientalmente certificado (inclusive sob o ponto de vista normativo). Do ponto de vista social, sabe-se que ela comercializa essa espécie em parceria com o Banco Noroeste (BNB). Tais instituições, inclusive, criaram o projeto Pró-Fava, que incentiva o plantio da espécie em áreas de pequenos proprietários desenvolvendo programas de orientação às famílias que se dedicam ao extrativismo certificado e sustentável nas áreas destinadas a essa atividade.

Finalmente, como se não bastasse, as características de tolerar solos de elevada acidez e altos teores de alumínio (Costa *et al.*, 2007), revela um potencial de utilização da fava na recuperação de áreas degradadas.

Isto porque, caracteristicamente, os solos dessas áreas, dentre outras características, são empobrecidos em nutrientes (Marschner,

1995) e, experimentos que envolveram estresseamento de solo através da restrição nutritiva, omissão de cálcio e aumento de acidez, revelaram que, dentre as plantas pioneiras brasileiras, a *D. Mollis* apresenta um dos mais eficientes mecanismos de absorção de nutrientes; o que faz com que seus aparatos fisiológicos consigam aproveitar o mínimo disponível no meio (Costa *et al.*, 2007) sem que sua fisiologia seja afetada (Epstein & Bloom, 2006).

Assim, plantar para reflorestar, com a possibilidade de lucro futuro com a exploração das sementes, além de todas as outras vantagens descritas, também pode vir a constituir (como sugerido para jatobá), uma nova forma motivadora para o início da utilização industrial da *Dimorphandra mollis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para finalizar o presente trabalho, assume-se que, num contexto atual, o conceito de desenvolvimento sustentável está bem mais amadurecido. Tal conceito não está mais exclusivamente restrito às discussões acadêmicas e políticas, mas parece ter se popularizado, passando também a fazer parte da vida cotidiana das pessoas. Trata-se de um conceito que está presente desde as pequenas atitudes diferenciadas de comportamento, como a separação e a reciclagem do lixo doméstico, até as grandes estratégias e empreitadas comerciais de algumas empresas de grande porte.

Nesse último ponto, inclusive, é possível sugerir que o setor corporativo, definitivamente assumiu essa postura sócio-ambiental

nesse milênio. No entanto, ainda não se saiba ao certo se tal comprometimento surgiu como consequência de uma preocupação com a escassez de recursos o que, inevitavelmente seria um fator limitante nos ganhos produtivos; ou se, tal mudança de gestão surgiu em virtude de uma mudança no perfil do consumidor. Este último, quando consome, certamente não mais atenta exclusivamente para o menor preço, mas também parece estar se preocupando com as diretivas ambientais da marca que estão consumindo. Selos ambientais, aproveitamento do ciclo do produto, utilização de insumos reciclados, tabela ambiental, origem geográfico-produtiva do mesmo, são apenas algumas das comunicações que o consumidor atual procura nos produtos que compra.

Hoje, as estratégias mercadológicas envolvem a comunicação de características particulares da flora nativa, principalmente para a exportação; envolvem o uso de *Green Technology* e compromisso com emissões de carbono. Ações predatórias por parte de microempresas em ascensão não mais resultam em lucro, pois, em suas relações comerciais, grandes corporações, para a compra de insumos (matérias primas) necessários a sua manufatura, exigem certificações ambientais e normativas. Relações internacionais são ainda mais exigentes, no início, certificações de qualidade (ISO 9000) eram suficientes, mas agora, dificilmente é possível conseguir mercado sem as certificações da série 14000 (meio ambiente). Assim, curiosamente e de forma muito otimista, a preservação ambiental e o compromisso social, nos dias de hoje, parecem ter virado atividades lucrativas.

E nesse ponto, as matérias primas, cujas aplicações industriais e possibilidades de produção em demanda foram no presente trabalho, claramente apontadas, parecem estar inseridas nessa nova postura sócio-ambiental das grandes corporações. E, como se não bastasse, o processo sustentável da produção de polissacarídeos em cultura, o aproveitamento de cadeia para a extração de hemiceluloses de eucalipto de suas sementes e/ou plântulas, a estratégia de utilização de sementes para a obtenção de polissacarídeos, que permite mais que a permanência das árvores “em pé”, mas também o aproveitamento de sobras de processo (*D. mollis*); tais materiais, possivelmente também podem ser utilizados na produção de biodiesel.

Nesse último aspecto, a biomassa desses materiais, principalmente das sementes, representaria uma possibilidade de servir como fonte para a produção de biocombustível; especialmente em virtude do acúmulo de lipídios nesses órgãos.

Além disso, o Brasil é um país que tem um expressivo potencial para desenvolver biotecnologia sustentável, inclusive, com elevado nível tecnológico-agrícola, sem, contudo, evidentemente, esquecer da importância dos biomas naturais. Assim, explorar tais biomas com alta tecnologia ambiental, que vai da capacidade de extrair substâncias com alto valor agregado (como flavonoides e polissacarídeos, por exemplo) a partir de espécies importantes em seus respectivos nichos, pode constituir, inclusive, uma estratégia para regenerá-los. Isto, evidentemente se se manter o foco sustentável e ambientalmente comprometido usando a própria

tecnologia brasileira (desenvolvida no âmbito de programas como Biota-FAPESP, por exemplo) para recuperação de áreas degradadas. Portanto, com esse tipo de estratégia (é o caso da exploração das sementes que, uma vez que fosse adotada, obrigatoriamente seria necessário conservar as árvores), finalmente estaríamos explorando o potencial de nossos biomas sem, contudo, degradá-los irreversivelmente.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Kader, M., Berger, J.M., Slebodnick, C., Hock, J., Malone, S., Wisse, J.H., Werkhoven, M.C., Mamber, S., Kingston, D.G. *Isolation and absolute configuration of ent-halimane diterpenoids from Hymenaea courbaril from the Suriname rain forest*. Jour. Nat. Prod. 65 (2002) 5-11.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. *Biologia molecular da célula*. 3ed. Porto Alegre, Artes Médicas. 1997.
- Albuquerque, I.R.L., Queiroz, K.C.S., Alves, L.G., Santos, E.A., Leite, E.L., Rocha, H.O.A. *Heterofucans from Dictyota menstrualis have a anticoagulant activity*. Braz. J. Med. Biol. Research 37 (2004) 167-171.
- Almeida, S.P. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina – SP: Embrapa. 1998. 462p.
- Andrade, S.R.M. *Princípios da cultura de tecidos vegetais*. Planaltina: EMBRAPA Cerrados. 2002. 16p.
- Anesi, S.A. *O "Nó" do eucalipto: a sustentabilidade da cultura na metade sul*. Anais I seminário de Recursos Hídricos da bacia Hidrográfica do Paraíba do Sul: O Eucalipto e o Ciclo Hidrológico. Taubaté – SP. (2007) 351-358.
- Arrhenium, S., Langenheim, J.H. *Inhibitory effects of Hymenaea courbaril and copaifera leaf resins on the leaf fungus Pestalotia subcuticulari*. Biochem. Sys. Eco. 4 (1983) 361-366.

- Bacon, E. *Role of dietary fibre*. Canad. Pharmaceut. J. 112 (1979) 307-310.
- Balmaceda, E., Rha, C., Huan, G.F. *Rheological properties of hydrocolloids*. J. Food Sci. 38 (1973) 1169-1179.
- Barroso, G.M., Morim, M.P., Peixoto, A.L., Ichaso, C.L.F. *Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas*. Universidade federal de Viçosa. Viçosa. 1999.
- Bieleski, R.L. *Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower*. Plant Physiol. 203 (1993) 213-219.
- Bobbio, F.O., Bobbio, P.A. *Introdução à química de alimentos*. São Paulo, Varela. 1989. 223pp.
- Bobbio, F.O., Bobbio, P.A. *Química do processamento de alimentos*. 2ed. São Paulo, Vareka. 1992. 151pp.
- Botelho, S.A., Ferreira, R.A., Malavasi, M.M., Davide, A.C. *Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de jatobá de cerrado (Hymenaea stigonocarpa) – Fabaceae*. Rev. Bras. Sem. 22 (2000) 144-152.
- Brandão, M. *Plantas produtoras de tanino nos cerrados mineiros*. Inform. Agropec. 16 (1992) 33-35.
- Brown, R.C., Kelleher, J., Losowsky, M.S. *The effect of pectin on the structure and function of the rat small intestine*. Brit. J. Nutrit. 42 (1979) 357-364.
- Bruneton, J. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes medicinales*. Paris: Lavoisier (1993).
- Buckeridge M.S., Dietrich S.M.C., Lima, D.U. *Galactomannans as the reserve carbohydrate of legume seeds*. In GUPTA, A.K. and

- KAUR, N., ed. *Carbohydrate reserve in plants: synthesis and regulations*. Amsterdam Elsevier. (2000a) 283-316
- Buckeridge M.S., Santos H.P., Tiné M.A. *Mobilisation of storage cell wall polyssaccharides in seeds*. Plant Physiol. Biochem. 38 (2000b) 141-156.
- Buckeridge, M.S. Cavalari, A.A., Silva, G.B.. Parede Celular. In: Fisiologia Vegetal, Gilberto B. Kerbauy (Ed.). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro Cap. 9: (2008) (no prelo).
- Buckeridge, M.S., Dietrich, S.M.C. *Galactomannan from brazilian legume seeds*. Rev. Brasil. Bot. 13 (1990) 109-112.
- Buckeridge, M.S., Dietrich, S.M.C. *Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of Sesbania marginata Benth (Leguminosae-Faboideae)*. Plant Science 117 (1996b) 33-43.
- Buckeridge, M.S., Mortari, L.C., Machado, M.R. *Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono das plantas podem afetar o ecossistema?* In: Rego, G.M., Negrelle, R.R.N., Morellato, L.P.C. (orgs.). *Fenologia: ferramenta para a conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos*. Ed. Colombo. PR: EMBRAPA (2007) 1-13.
- Buckeridge, M.S., Reid, J.S.G. *Major cell wall storage polyssaccharide in legume seeds: structure, catabolism and biological functions*. Ciência e Cultura 48 (1996a) 153-162.
- Buckeridge, M.S., Reid, J.S.G. *Purification and properties of a novel β -galactosidase or exo- β -(1 4)-galactanase from the cotyledons of*

- germinated* *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 192 (1994) 502-511
- Buckeridge, M.S., Rocha, D.C., Reid, J.S.G., Dietrich, S.M.C. *Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of* *Copaifera langsdorfii* *from savana and forest populations*. *Plant Physiol.* 86 (1992) 145-151.
- Buckeridge, M.S., Tiné M.A., Santos H.P., LIMA, D.U. *Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos*. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12 (2000c) 137-162.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S. *Composição polissacarídica: estrutura da parede celular e fibra alimentar*. In: Lajolo, F.M., Saura-Calixto, F., Penna, E.W., Menezes, E.W. Eds. *Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicacación en alimentos*. São Paulo: Varela (2001) 472pp.
- Buffa Filho, W., Corsino, J., Bolzani, V.S., Furlan, F., Pereira, A.M.S., França, S.C. *Quantitative determination of cytotoxi firedp-nor-oleanane derivatives from five morphological types of* *Maytenus ilicifolia* *(Celastraceae) by reverse phase hight performance liquid chromatography*. *Phytochem. Anal.* 12 (2001) 1-4.
- Buffa Filho, W., Pereira, A.M.S., França, S.C., Furlan, M. *Indução de metabólitos bioativos em cultura de células de* *Maytenus ilicifolia*. *Eclet. Quim.* 27 (2002) 403-416.
- Cairns, P., Miles, M.J., Morris, V.J. *Intermolecular binding of xanthan gum and carob gum*. *Nature* 322 (1986) 89-91.

- Camargo, A., Capobianco, J.P.R., Oliveira, J.A.P. *Meio ambiente Brasil: avanços e obstáculos pós-Rio-92*. São Paulo: Instituto Sócio Ambiental. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas. 2002. 460p.
- Campbell, J.M., Fahey Jr, G.C., Wolf, B.W. *Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats*. J. Nutr. 127 (1997) 130-136.
- Carpanezzi, A.A., Marques, L.C.T. *Germinação de sementes de jutaí-açú (Hymenaea courbaril L.) e de jutaí-mirim (Hymenaea parvifolia Huber) escarificadas com ácido sulfúrico comercial*. Circular Técnica 19 (1981). EMBRAPA-CPATU, Belém.
- Carvalho, C.M. *Produção de mudas de espécies florestais de rápido crescimento*. In: Novaes, A.B. *Reflorestamento no Brasil*. UESB – Bahia (1992) 93-103.
- Castro, A.G., Morrot, S. *Perspectivas de desenvolvimento sustentável para o setor florestal da América Latina*. Estud. Av. 10 (1996) 321-347.
- Chourasia, M.K., Jain, S.K. *Polysaccharides for colon targeted drug delivery*. Drug Delivery 11 (2004) 129-148.
- Cid, L.P.B., Machado, A.C.M.G., Cavalheira, B.R.C., Brasileiro, A.C.M. *Plant regeneration from seedling explants of Eucalypto grandis x E. urophylla*. Plant Cell. Tiss. Org. Cul. 56 (1999) 17-23.
- Collic, S., Boisson-Vidal, C., Jozefonvicz, J. *A low molecular weight fucoidan fraction from the brown seaweed Pelvetia canaliculata*. Phytochemistry 35 (1994) 697-700.

- Costa, C.A., Alves, D.S., Fernandes, L.A., Martins, E.R., Souza, I.G.B., Sampaio, R.A., Lopes, P.S.N. *Nutrição mineral da fava d´danta*. Hortic. Bras. 25 (2007) 24-28.
- Cui, N., Friend, D.R., Fedorak, R.N. *A budesonide prodrug accelerates treatment of colitis in rats*. Gut 35 (1994) 1439-1446.
- Cummings, J.H., Branch, W., Jenkins, D.J., Southgate, D.A., Houston, H., James, W.P. *Colonic response to dietary fibre from carrot, cabbage, apple, bran*. Lancet 1 (1978) 5-9.
- De Paula, A. C. C. F. F, Sousa, R. V., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. & Buckeridge, M.S. Hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing β -glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., Poaceae Brazilian Journal of Medical and Biological Research 38 (2005) 885-893.
- Dea I.C.M., Morrison A. *Chemistry and interactions of seed galactomannans*. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 31 (1975) 241-312.
- Dea, I.C.M., Morris, E.R., Ress, D.A., Welsh, E.J., Barnes, H.A., Price, J. *Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides and related systems*. Carbohydr. Res. 57 (1977) 249-272.
- Dean, W. *A ferro e fogo: a história da devastação da Mata Atlântica brasileira*. São Paulo: Companhia das Letras. 1996.
- Dietrich, S.M.C., Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S., Young, M.C.M., Bolzani, V.S., Marques, M. R. *Plant cell wall research related to*

evolution and chemical defenses. Anais da Acad. Brasil. De Cienc. 70 (1998) 727-731.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28 (1956) 350-356.

Dziezak, J.D. *A focus on gums*. Food Tech. 45 (1991) 117-132.

Edwards, M.E., Marshall, E., Gidley, M.J., Reid, J.S.G. *Transfer specificity of detergent-solubilized fenugreek galactomannan galactosyltransferase*. Plant Physiol. 129 (2002) 1-7.

Epstein, E., Bloom, A.J. *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. 2ed. Londrina: ed. Planta. 2006. 403p.

Fernandes, P.B., Gonçalves, M.P., Doublier, J.L. *Effect of galactomannan addition on the thermal behavior of carrageenan*. Carbohydr. Polym. 19 (1992) 261-269.

Ferreira, C.A.C., Sampaio, P.T.B. *Jatobá Hymenaea courbaril*. In: Clay, J.W.; Sampaio, P.T.B.; Clement, C.R. *Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização*. Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico. Manaus, Amazonas (1999) 409 p.

Ferreira, R.A., Botelho, S.A., Davide, A.C., Malavase, M.M. *Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de Dimorphandra mollis Benth. – faveira (Leguminosae – Caesalpinioideae)*. Rev. Bras. Bot. 24 (2001) 303-309.

Ferri, M.G. *Plantas do Brasil: espécies do cerrado*. Edgard Blucher. São Paulo. 1969. 462p.

- Fizman, S.M., Costell, E., Durán, L. *Caracterización reológica de geles de agar*. Rev. Agroquim. Tenol. Aliment. 22 (1982) 245-256.
- Fitzpatrick, J., Mellor, A. *emulsion comprising a gelled anionic hydrocolloid aqueous outer phase, a non-aqueous intermediate phase and an aqueous inner phase*. U.S. Patent (1997) 6,110,473
- Flores, E.M., Benavides, C.E. *Germination and morphology of the seedling of Hymenaea courbaril L. Caesalpiniaceae*. Rev. Biol. Trop. 38 (1990) 91-98.
- Frey, K. *A dimensão político-democrata nas teorias de desenvolvimento sustentável e suas implicações para gestão local*. Ambient. Soc. 9 (2001) 115-148.
- Furtado, S.M.T. *Estabilizantes empregados em leites fermentados e bebidas lácteas*. Leite & Derivados 34 (1997) 62-71.
- Gellan gum for pharmaceutical applications*. Comercial Literature (1999) Kelco Biopolymers, San Diego.
- Gerhardt, C.H., Almeida, J. *A dialética dos campos sociais na intervenção da problemática ambiental*. Amb. Soc. 2 (2005) 1-28.
- Glicksman, M. *Food Hydrocolloids*. Boca Raton, CRC Press 1 (1982) 219pp.
- Glicksman, M. *Food Hydrocolloids*. Boca Raton, CRC Press 2 (1983) 199pp.
- Glicksman, M. *Food Hydrocolloids*. Boca Raton, CRC Press 3 (1986) 247pp.

- Glicksman, M. *Utilization of natural polysaccharide gums in the food industry*. Adv. Food Res. 11 (1962) 109-200.
- Glicksman, M. *Utilization of natural polysaccharides gums in the food industry*. Adv. Food Resear. 11 (1962) 109-200.
- Gomes, J.M., Couto, L., Leite, H.G., Xavier, A., Garcia, S.L.R. *Parâmetros morfológicos na avaliação da qualidade de mudas de Eucalipto grandis*. Rev. Arv. 26 (2002) 655-664.
- Gonçalves, F.M.A., Rezende, G.D.S.P., Bertolucci, F.L.G., Ramalho, M.A.P. *Progresso genético por meio de seleção de clones de eucalipto em plantios comerciais*. Rev. Arv. 25 (2001) 295-301.
- Gordon, M.Y., Fry, S.C., Ridley, G.P., Goldman, J.M., Greaves, M.F. *Altered(e) adhesive interactions with marrow stroma of haemopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukemia*. Nature 328 (1987) 342-344.
- Gray, D.F., Fry, S.C., Eastwood, M.A. *Uniformly 14C-labelled plant cell walls: prodution, analysis and behaviour in rat gastrointestinal tract*. Br. J. Nutr. 69 (1993) 177-188.
- Groot, S.P.C., Karssen, C.M. *Gibberellins regulate seed-germination in tomato by endosperm weakening – a study with gibberellin-deficient mutants*. Planta 171 (1987) 525-531.
- Groot, S.P.C., Kieliszewskarokicka, B., Vermeer, E., Karssen, C.M. *Gibberellin-induced hydrolysis of endorperm cell walls and gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion*. Planta 174 (1988) 500-504.
- Gunn, C.R. *Seed topography in the Fabaceae*. Seed Scien. Technol. 9 (1981) 737-757.

- Hada, S., kakiuchi, N., Hattori, M., Mamba, T. *Identification of antibacterial principles against Streptococcus mutans and inhibitory principles against glucosyltransferase from the seed of Area catechu L.* Phytother. Res. 3 (1989) 140-144.
- Hamada, S., Slade, H.D. *Biology, immunology and cariogenicity of Streptococcus mutans.* Microbiol. Rev. 44 (1980) 331-384.
- Hänsel, R., Sticher, O., Steinegger, E. *Pharmakognosie – Phytopharmazie.* Aufl. Berlin: Springer (1999).
- Hansen, P.M.T. *Stabilization of a-casein by carrageenan.* J. Dairy Sci. 51 (1968) 192-196.
- Harboe, E., Larsen, C., Johansen, M., Olesen, H.P. *Macromolecular prodrugs. XV. Colon target delivery and bioavailability of naproxen from orally administered dextran-naproxen ester prodrugs varying in molecular size in the pig.* Pharm. Res. 6 (1989) 919-923.
- Heijnem, M.L.A., Van Amelsvoort, J.M.M., Weststrate, J.A. *Interaction between physical structure and amylose: amylopectin ratio of foods on postprandial glucose and insulin responses in healthy subjects.* Europ. J. Clin. Nutr. 49 (1995) 446-457.
- Herald, C.T. *Locust/Carob Bean Gum.* In: Glicksman, M. Food Hydrocol.. Flórida: CRC Press, cap 5 (3) 1986 161-170.
- Hoepfner, E.M., Reng, A., Schmidt, P.C. *Fiedler encyclopedia of excipients.* Aulendorf: Cantor (2002).
- Holton, R., Somoza, C., Kim, H.B., Liang, F., Biediger, R.J., Boatman, P.D., Shindo, M., Smith, C.C., Kim, S.C., Nadizadeh, H., Suzuki, Y., Tao, C.L., Vu, P., Tangs, S.H., Zhang, P.S., Murthi, K.K.,

- Gentile, L.N., Liu, J.N. *First total synthesis of taxol. 1. Functionalization of the B Ring*. J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 1597-1598.
- Hospers, J.J., Van Amelsvoort, J.M., Weststrate, J.A. *Amylose-to-amylopectin ration in pastas affects postprandial glucose and insulin responses and satiety in males*. J. Food Sci. 59 (1994) 1144-1149.
- Ioan, C.E., Aberle, T., Burchard, W. *Structure properties dextran*. Macromolec. 33 (2000) 5730-5739.
- James, W.P.T., Branch, W.J., Southgate, D.A.T. *Calcium binding by dietary fiber*. Lancet 1 (1978) 638-639.
- Jannsson, P.E., Lindberg, B., Sandford, P.A. *Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharides elaborated by Pseudomonas elodea*. Carbohydr. Res. 124 (1983) 135-138.
- Jeanes, A.R., Pittsley, J.E., Senti, F.R. *Polysaccharide B-1459: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation*. J. Appl. Polymer Sci. 5 (1961) 519-526.
- Joseleau, J.P., Ullmann, G. *Biochemical evidence for the site of formation of gum arabic in Acacia senegal*. Phytochm. 29 (1990) 3401-3405.
- Kang, K.S., Colegrave, G.T., Veeder, G.T. *Deacetylated polysaccharide S-60*, U.S. Patent 4326052, 1982.
- Kasaoka, S., Ikai, M., Oh-Hashi, A., Morita, T., Kiriyaama, S. *Hight amylose corn starch retarded and, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumor development in female rats*. Nutrit. Res. 17 (1997) 1035-1046.

- Katzbauer, B. *Properties and applications of xanthan gum*. Polymer Degrad. Stabil. 59 (1988) 80-84.
- Kenne, L., Lindberg, B. *Bacterial polysaccharides*. In: *The polysaccharides*. Aspinall, G.O. Ed. Academic Press 2 (1983) p346.
- Kiyoung, L., Kun, N., Yueim, K. *Polysaccharides as a drug coating polymer*. Polym. Prep. 40 (1999) 359-360.
- Koga, T., Okahashi, N., Asakawa, H., Hamada, S. 1986. *Adherence of Streptococcus mutans to tooth surfaces*, p. 111-120. In Hamada, S., Michalek, S.M., Kiyono, H., Menaker, L., McGhee, J.R. (ed.), *Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Kooiman, P. *The constitution of tamarindus amyloid*. Rev. Trav. Chim. 80 (1961) 849-865.
- Kovacs. P. *Useful incompatibility of xanthan gum with galactomannans*. Food Tech. 27 (1973) 26-28.
- Kritchevsky, D., Story, J.A. *Binding of bile salts in vitro by nonnutritive fiber*. J. Nutr. 104 (1979) 458-462.
- Langenheim, J. H.; Lee, Y. T.; Martin, S. S. *An evolutionary and ecological perspective of Amazonian Hylea species of Hymenaea (Leguminosae: Caesalpinioidea)*. Acta Amaz. Manaus, Amazonas 3 (1973) 5-38.
- Larsen, C., Jensen, B.H., Olesen, H.P. *Stability of ketoprofendextran ester prodrugs in homogenates of various segments of the pig GI tract*. Acta Pharm. Nord. 3 (1991) 41-44.

- Leão, R.M. *A floresta e o homem*. São Paulo: Universidade estadual de São Paulo. 2000.
- Lehninger, A.L. *Princípios da Bioquímica*, trad. W. R. Lodi, A. A. Simões. Ed. Savier. São Paulo. 1989.
- Lima Neto, S.A., Petrovick, P.R. *A celulose na farmácia*. Cad. Farm. 13 (1997) 19-23.
- Lima, D.U., Chaves, R.O., Buckeridge, M.S. *Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in papermaking*. Carbohydr. Polym. 52 (2003) 367-373.
- Lima, D.U., Loh, W., Buckeridge, M.S. *Xyloglucan-cellulose interaction depends on the sidechains and molecular weight of xyloglucan*. Plant Physiol. 42 (2004) 389-394.
- Lisboa, C.G.S., Tonini, P.P., Tiné, M.A.S., Buckeridge, M.S. *Endo-beta-mannanase from the endosperm of seeds of Sesbania virgata (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterization and its dual role in germination and early seedling growth*. Braz. Jour. Plant Physiol. 18 (2006) 269-280.
- Lopes, L., Andrade, C.T., Mano, E.B. *O valor das gomas para a indústrias*. Ciência Hoje 12 (1991) 65-67.
- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum Ltda. 1992. 352p.
- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4 ed. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum. 2002. 368p.

- Maccann, M.C., Roberts, K. *Architecture of the primary cell wall*. In: Lloyd, C. W., *The cytoskeletal basis of plant growth and form*. London, Academic Press: (1991)109-129.
- Mandal, G., Das, A. *Structure of the D-galactan isolated from Aloe barbadensis Miller*. Carbohydr. Res. 86 (1980) 247-257.
- Manrique, G.D., Lajolo, F.M. *Maduración, almacenamiento y procesamiento de frutas y vegetales: modificaciones en los componentes de la fibra soluble*. In: Lajolo, F.M., Saura-Calixto, F., Penna, E.W., Menezes, E.W. Eds. *Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos*. São Paulo: Varela (2001) 472pp.
- Manzi, A.E, Cerezo, A.S., *The galactomannan-like oligossacharides from the endosperm of seed of Gleditsia triacanthos*. Carbohydrate Research 134 (1984) 115-131.
- Marques, F. *Vias para avançar como líder do etanol*. Rev. Pesq. FAPESP 149 (2008) 20-25.
- Marschner, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2 ed. New York: Academic Press, 1995. 889-901p.
- Martin, S.S., Langenheim, J.H. Zavarin, E. *Sesquiterpenes in leaf pocket resin of Hymenaea courbaril*. Phytochem. 11 (1972) 3049-3059.
- Martins, M.C.M., Vieira, C.J., Silva, C.O. & Buckeridge, M.S. *Análise de carboidratos na bebida do café preparada sob diferentes processos de extração*. Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos 25(2): (2005) 382-386.

- Mattos, K.M.C., Ferreti-Filho, N.J. *Desenvolvimento econômico versus desenvolvimento sustentável*. In: 3º Encontro de Energia do Meio Rural, Campinas. 2000.
- McLeod, A.D., Fedorak, R.N., Friend, D.R., Tozer, T.N., Cui, N. *A glucocorticoid prodrug facilitates normal mucosal function in rat colitis without adrenal suppression*. *Gastroenterol.* 106 (1994) 405-413.
- Miranda, N.G.M., Samudio, E.M.M., Dourado, F.F.M. *Estratégia de operações e a variável ambiental*. *Rev. Adm.* 1997.
- Mjeti, N.V.R.K., Ravi Kumar, M.N. *Nano and microparticles as controlled drug delivery devices*. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2000) 234-258.
- Moe, O.A.; Miller, S.E., Iwen, M.H. *Investigaton of the reserve carbohydrate of leguminous seeds. I. Periodate oxidation*. *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 2621-2825.
- Mora, A., Garcia, C.H. *A cultura do eucalipto no Brasil*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura. 2000.
- Morris, V.J. *Bacterial polysaccharides: gellan*. In: *Food Polysaccharides and their applications*. M. Dekker Inc., New York (1995) ISBN 0-8247-9353-6.
- Nakahara, K., kawabata, S., Ono, H., Ogura, K., Tanaka, T., Ooshima, T., Hamada, S. *Inhibitor effect of Oolong Tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans etreptococci*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (4) (1993) 968-973.

- Nardelli, A.M.B. *Sistemas de certificação e visão de sustentabilidade no setor florestal brasileiro*. Viçosa: UFV. Tese de doutorado em Ciência Florestal. 2001. 212p.
- Neukom, H. *Galactomannans: properties and applications*. Lebensm. Wissens. Technol. 22 (1989) 41-45.
- Neukon, H. *Galactomannans: Properties and Application*. Lebensm. Wissens. Tech. 22 (1989) 41-45.
- Ni, Y., Turner, D. Yates, K.M., Tizard, I. *Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp*. Internat. Immunopharm. 4 (2004) 1745-1755.
- Nicolau, K.C., Yang, Z., Liu, J.J., Ueno, H., Nantermet, P.G., Guy, R.K., Claiborne, C.F., Renaud, J., Couladouros, E.A., Paulvannan, K., Sorensen, E.J. *Total synthesis of taxol*. Nature 367 (1994) 630-634.
- Oliveira Junior, C.J.F. *Carboidratos de parede celular e efeitos de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o crescimento celular de Rudgea jasminoides (Cham.) Mull. Arg. cultivada em suspensão*. Tese de Doutorado. USP: São Paulo. 2004.
- Oliveira Junior, C.J.F., Braga, M.R., Buckeridge, M.S. *Efeito de oligossacarídeos de xiloglucano sobre o metabolismo extracelular de Rudgea jasminoides durante o crescimento*. Hoehnea 33 (2006) 239-246.
- Panda, H. *The complete technology book on natural products*. Asia Pacific Business Press. Kamla Nagar, Delhi, Índia. 2001. 792pp.

- Panegassi, V. R.; Serra, G. E.; Buckeridge, M. S. *Seeds of faveiro (Dimorphandra mollis) as a potential source of galactomannan for the food industry*. Cien. Tecnol. Alim. 20 (2000) 406-415.
- Paulsen, B. S., *Plant polysaccharides with immunostimulatory activities*. Current Organic Chemistry. 5 (2001) 939-950.
- Pauly, M., Freis, O., Pauly, G. *Galactomannan and xyloglucan: bio-active polysaccharides*. Cosmetics & Toiletries 114 (1999) 65-78
- Penna, A.L.B. *Hidrocolóides: usos em alimentos*. Food Ingredients 17 (2002) 58-64.
- Pollock, T., Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Yamamoto, H. *Proposals of Sphingomonas paucimobilis gen. nov. and com. nov., Sphingomonas parapaucimobilis sp. nov., Sphingomonas yanoikuyae sp. nov., Sphingomonas adhaesiva sp. nov., Sphingomonas capsulate comb. nov. and two genospecies of the genus Sphingomonas*. Microbiol. Immunol. 34 (1990) 99-119.
- Ponting, C. *Uma história verde do mundo*. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira. 1995.
- Potomati, A., Buckeridge, M.S. *Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of Sesbania virgata (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae)*. Rev. Brasil. Bot., 25 (2002) 303-310.
- Rees, D.A. *Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharides gels and networkes*. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 24 (1969) 267-332.

- Reid, J.S.G., Edwards, M. *Galactomannans and other cell wall storage polyssacharides in seeds*. In: AM Stephen, ed, *Food polysaccharides and their applications*. Marcel Dekker, Inc, New York (1995) 155-186.
- Ribeiro, A.Q., Leite, J.P., Dantas-Barros, A.M. *Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob influência da legislação nacional*. Ver. Bras. Farmacog. 15 (2005) 65-70.
- Richau, J.A., Choquenot, D., Fialho, A.M., Moreira, L.M., Correia, I.S. *The biosynthesis of the exopolysaccharide gellan results in the decrease of Sphingomonas paucimobilis tolerance to copper*. Enzyme Microb. Technol. 20 (1997) 510-515.
- Rizzini, C. T. *Árvores e madeiras úteis do Brasil*. Manual de Dendrologia Brasileira. Ed. Edgard Blücher, São Paulo. (1971) 294p.
- Robberts, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Willians e Wilkins (1996).
- Robertson, J., Brydon, W.G., Tadesse, K., Wenham, P., Walls, A., Eastwood, M.A. *The effect of raw carrot on serum lipids and colon function*. Am. J. Clin. Nutr. 32 (1979) 1889-1892.
- Rocha, H.A.O., Farias, E.H.C., Bezerra, L.C.L.M., Albuquerque, I.R.L., Medeiros, V.P., Queiroz, K.C.S., Leite, E.L. *Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas com atividade anticoagulante*. Infarma 16 (2004) 82-87.
- Rombi, M. *100 Plantes medicinales*. Paris: Romart (1991).

- Rubinstein, A., Pathak, S. Friendman, M. Rokem, J.S.R. *In vitro method for drug release analysis for microbially controlled drug delivery*. Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 17 (1990) 466-467.
- Rubinstein, A., Radai, R. *Pectin salt as a colonic drug delivery system*. Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 18 (1991) 221-222.
- Sabarinath, C., Soccol, C.R., Pandey, A. *Emerging biopotential of gellan gum*. Biomat. 16 (2002) 32-37.
- Sahai, O.P., Knuth, M. *The technology of phytoproduction in plant tissue culture and process economics*. Biotechnol. Prog. 1 (1985) 1-9.
- Sanderson, G.R. *Gums and their use in food systems*. Food Technol. 50 (1996) 81-84.
- Sanderson, G.R. *Polysaccharides in foods*. Food Technol. 35 (1981) 50-57.
- Sandford, P.A., Baird, J. *Industrial utilization of polysaccharides*. In: *The polysaccharides*. Aspinall, G.O. Ed. Academic Press 2 (1983) p474.
- Santos, S. C., Mello, J.C.P. *Taninos*. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS. (2004) 497-517.
- Schneeman, B.O. *Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects*. Food Tech. (1986) 104-110.

- Shannon, J.C., Garwood, D.L. *Starch: Chemistry and Technology*. In: Whistler, R.L., BeMiller, J.M., Paschall, E.D. 3 ed. Academic Press, Inc, New York. 1984.
- Silva, C.O., Minhoto, M.J., Buckeridge, M.S. *Biodiversidade, mudanças climáticas e a tabela brasileira de composição de alimentos*. In: NEPA – UNICAMP. *Composição de alimentos: uma abordagem multidisciplinar*. (2005) 25-63.
- Silva, J.C.B. *Guia técnico ambiental da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos – por uma produção mais limpa*. CETESB. 2007. 65p.
- Silva, M.R., Silva M.S., Martins, K.A., Borges, S. *Utilização tecnológica de frutos de jatobá-de-cerrado e de jatobá-de-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibras alimentar e isentos de açúcares*. Cien. Technol. Alim. 21 (2001) 176-182.
- Silva, M.R., Silva, M.A.A.P., Chang, Y.K. *Utilização da farinha de jatobá (Hymenaea stigonocarpa Mart.) na elaboração de biscoitos do tipo cookie e avaliação de aceitação por testes sensoriais afetivos univariados e multivariados*. Cien. Technol. Alim. v.18, n.1, 1998.
- Sloneker, J.H., Orentas, D.G., Jeanes, A. *Exocellular bacterial polysaccharide from xanthomonas campestris NRRL B-1459. III. Structure*. Can. J. Chem. 42 (1964) 1261-1269.
- Smiley, K.L. *Microbial polysaccharides – a review*. Food Technol. 20 (1966) 112-116.

- Smith, U., Holm, G. *Effect of the modified guar gum preparation on glucose and lipid levels in diabetics and healthy volunteers.* Atherosc. 45 (1982) 1-10.
- Somme, R. *The structure of a galactomannan from Medicago lupulina.* L. Acta. Chem. Scand 22 (1968) 537-545.
- Sousa, M.P., Matos, M.E.O., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L., Cravetro, A.A. *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras.* Universidade Federal do Ceará. 1991. 295-298.
- Souza, R.S. *Entendendo a questão ambiental – temas de economia, política e gestão de meio ambiente.* Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 2000. 461p.
- Spiller, R.C. *Pharmacology of dietary fiber.* Pharmac. Therapy 62 (1994) 407-427.
- Sprenger, M. *New stabilizing systems using galactomannans.* Dairy Ind. Int. 55 (1990) 1-19.
- Stagey, M. *Bacterial polysaccharides.* Endeav. (1953) 38-42.
- Stryer, L., *Bioquímica.* Ed. Guanabara Koogan S. A. R.J (1995) 1000pp.
- Sutherland, I.W. *Novel and established applications of the microbial polysaccharides.* Tibtech Reviews 16 (1998) 41-46.
- Tharanathan, R.N. *Food-derived carbohydrate – structural complexity and function diversity.* Critic. Rev. Biotech. 22 (2002) 65-84.
- Tharanathan, R.N., Muralikrishna, G., Salimath, P.V., Raghavendra Rao, M.R. *Plant carbohydrate – an overview.* Plant Sci. 97 (1987) 81-155.

- Tomassini, E., Mors, W.B. *Dimorphandra mollis Benth.* e *D. gardneriana Tul.*, *novas e excepcionais fontes de rutina*. Anais Acad. Brasil. Cienc. 38 (1966) 321-323.
- Tomlin, J., Read, N.W. *The effect of resistant starch on colon function in humans*. Brit. J. Nutrit. 64 (1990) 589-595.
- Tonini, P.P., Lisboa, C.G.S., Freschi, L., Mercier, H., Mazzoni-Viveiros, S.C, Buckeridge, M.S. *Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo-beta-mannanase activity in seeds of Sesbania virgata (Cav.) Pers. (Leguminosae)*. Trees 20 (2006) 669-678.
- Tonini, P.P., Lisboa, C.G.S., Silva, C.O., Mazzoni-Viveiros, S.C, Buckeridge, M. S. *Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of Sesbania virgata, a tropical legume tree from of the Atlantic Forest*. Trees 21 (2007) 13-21.
- Topping, D.L. *Soluble fiber polysaccharides: effects on plasma cholesterol and colonic fermentation*. Nutrit. Review 49 (1991) 195-203.
- Towle, G.A., Christensen, O. *Pectin*. In: *Industrial gums and their derivaties*. Eds. Whistler, R.L. & BeMiller, J.N.. New York: Academic Press (1973) 429-461.
- Trowell, H. Southgate, D.A.T., Wolever, T.M.S., Leeds, A.R., Grassul, M.A., Jenkins, D.J.A. *Dietary fibre redefined*. Lancet 1 (1976) 960-967.
- Ucko, D.A. *Química para as ciências da saúde: uma introdução à química geral, orgânica e biológica*. São Paulo, Manole (1992) 646pp.

- Unrau, A.M. *The constitution of a galactomannan from seeds of Leucaena leucocephala*. J. Org. Chem. 26 (1961) 3097-3101.
- Valdeão, R.G., Janson, J.A. *Propriedades dos amidos e suas aplicações básicas na indústria papeleira*. O Papel (1996) 50-61.
- Vargas-Rechia, C., Reicher, F., Sierakowski, M.R., Heyraud, A., Driguez, H., Liénart, Y. *Xyloglucan octasaccharide XXLGol derived from the seeds of Hymenaea courbaril acts as a signaling molecule*. Plant Physiol. 116 (1998) 1013-1021.
- Vecchiatti, K. *Três fases rumo ao desenvolvimento sustentável: do reducionismo à valorização da cultura*. São Paulo Perspec. 18 (2004) 90-95.
- Viana, E.C., Carvalho, R.M.M.A., Oliveira, P.R.S. *Technician-judicial analysis of the environmental licensing and its interface with the environmental certification*. Rev. Arv. 27 (2003) 587-595.
- Viola, E. *A multidimensionalidade da globalização, as novas forças sociais transnacionais e seu impacto na política ambiental do Brasil, 1989-1995*. In: Ferreira, L.C., Viola, E. (orgs.) *Incertezas de sustentabilidade na globalização*. Campinas – SP. Ed. UNICAMP (1996) 15-65.
- von Poser, G.L. *Polissacarídeos*. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS. (2004) 497-517.
- Waitzberg, D.L., Coppini, L.Z., Habr-Gama, A. *Fibras*. In: Waitzberg, D.L. *Nutrição enteral e parenteral na prática clínica*. Rio de Janeiro: Atheneu (1990) 75-80.

- Whistler, R.L., Hymowitz, T. *Guar: agronomy, production, industrial use and nutrition*. Indiana: Purdue University Press. 1979. 124p.
- Whitney, S.E.C., Brigham, J.E., Darke, A.H., Reid, J.S.G., Gidley, M.J. *Structural aspects of the interaction of mannan-based polysaccharides with bacterial cellulose*. Carbohydr. Res. 307 (1998) 299-309.
- Wielinga, W.C. *Application of gum-based stabilization systems in ice-cream and fruit ices*. In: Phillips, G.O., Wedlock, D.J., Williams, P.A. eds. *Gums and stabilizers for the food industry – application of hydrocolloids*. Pergamon Press. 2 (1982) 251-276.
- Williams, P.A., Day, D.H., Langdon, M.J., Phillips, G.O., Nishinari, K. *Synergistic interaction of xanthan gum with glucomannans and galactomannans*. Food Hydrocol. 4 (1991) 489-493.
- Yabuuchi, E.I., Yano, H., Oyaizu, E., Hashimoto, E., Yamamoto, H. *Proposals of Sphingomonas paucimobilis Gen. Nov. and Comb Nov., Sphingomonas parapaucimobilis SP. Nov., Sphingomonas yanoikuyae SP. Nov., Sphingomonas adhaesiva SP. Nov., Sphingomonas capsulate Comb. Nov., and two genospecies of the genus Sphingomonas*. Microbiol. Immunol. 34 (1990) 99-119.
- York, W.S., Van Halbeek, H., Darvill, A.G., Albersheim, P. *Structural analysis of xyloglucan oligosaccharides by 1-H-n.m.r. spectroscopy and fast-atom-bombardment mass spectrometry*. Carbohydr. Res. 200 (1990) 9-31.
- Zenk, M.H., Menhard, B., Eisenreich, W., Hylands, P.J., Bacher, A. *Toxoids from cell cultures of Taxus chinensis*. Phytochem. 49 (1998) 113-125.

Zenk, M.H., Menhard, B., Eisenreich, W., Hylands, P.J., Bacher, A.
*Studies on the biosynthesis o taxol: the taxane carbon skeleton is
not of mevalonoid origin.* Proc. Nat. Acad. Sci. 93 (1996) 6431-
6436.

Anexo 1

"INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial"

*Referência **144962 SDE***

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS A PARTIR DE SEMENTES DE JATOBÁ (*HYMENEAE COURBARIL L.*), COMPOSICAO COSMETICA COMPREENDENDO OS DITOS POLISSACARÍDEOS E USO DOS MESMOS"**.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de polissacarídeos, preferencialmente xiloglucanos, a partir de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril L.*, *Hymenaea stilbocarpa* entre outras espécies) para aplicação em composições cosméticas, preferencialmente em composições antiidade.

Descrição do Estado da Técnica

A *Hymenaea courbaril L.*, conhecida como jatobá, é uma árvore originalmente encontrada desde o México até grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil (norte até o sudeste), Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia. É normalmente encontrada em altitudes de até 900 metros acima do nível do mar.

A sua madeira empregada na construção civil, marcenaria, peças torneadas, instrumentos musicais e laminados, dentre outros. A polpa é comestível e é usada na preparação de alimentos tais como farinhas, doces e bebidas, ou na alimentação de animais. A casca e a seiva do tronco são utilizadas para

preparações de chás.

Os xiloglucanos são polissacarídeos presentes na parede celular dos vegetais superiores. O xiloglucano estrutural apresenta o polissacarídeo de parede celular primária, e o xiloglucano obtido de sementes é predominantemente um polissacarídeo de reserva. As unidades constituintes principais do xiloglucano são galactose, glucose e xilose. No Brasil, uma fonte abundante de xiloglucanos são as sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*). Os xiloglucanos atuam como ingredientes ativos quando aplicados à pele humana, promovendo benefícios quanto à aparência e “saúde” da pele, estimulando a síntese de colágeno e elastina por células conjuntivas.

A patente US 5.488.105 descreve polissacarídeos extraídos de sementes de *Hymenaea* que são utilizados como espessantes, geleificantes e estabilizadores nas formulações alimentícias, químicas e medicamentos. Descreve ainda um processo de extração de sementes de *Hymenaea* incluindo as etapas de colocar as sementes de molho e remover as cascas; amassar e secar as sementes para formar pó de polissacarídeo bruto; suspender o polissacarídeo bruto em uma solução alcalina-alcoólica e formar um polissacarídeo purificado; o polissacarídeo purificado é em seguida seco e esmagado para formar um pó de polissacarídeo purificado.

O documento JP 10236943 revela um ingrediente ativo de um cosmético que está dissolvido em um extrato de jatobá. O processo de extração é feito com solvente não-aquoso e

fracionamento.

A partir da descrição da presente invenção a seguir, pode-se concluir os documentos do estado da técnica não propõem vantagens referentes a um processo mais simples e limpo, isto é, um processo ecologicamente correto e que possui um custo menor em relação aos processos do estado da técnica.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo para obtenção de polissacarídeos a partir de sementes de jatobá que compreende as etapas de:

- a) beneficiamento das sementes (processo a seco);
- b) extração aquosa de 1% a 5% de massa de pó por volume, preferencialmente a 2% de massa de pó por volume;
- c) precipitação com etanol 96°GL de 1 a 3 vezes o volume do extrato aquoso;
- d) filtração por prensa do precipitado obtido em (c);
- e) solubilização dos polissacarídeos obtidos na etapa (d) com água; e
- f) secagem dos polissacarídeos obtidos na etapa (e).

Descrição das Figuras

Figura 1 ilustra sementes de *Hymenaea courbaril* com casca.

Figura 2 ilustra um xiloglucano purificado.

Figura 3 ilustra um gráfico com resultados da atividade espessante dos polissacarídeos obtidos de acordo com a presente invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção tem como objetivo um processo para obtenção de polissacarídeos a partir de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*).

Uma das vantagens da presente invenção é que o processo utiliza uma rota simples e limpa, não envolvendo a purificação do polissacarídeo bruto com solução alcoólica-alcálica (NaOH).

Outro aspecto importante do processo da presente invenção é a etapa inicial de beneficiamento das sementes. Percebeu-se que o uso de água para lavagem das sementes prejudica o resultado final do processo, pois causa a migração de determinados componentes da casca para o interior da semente, resultando, assim, em uma alteração da coloração do produto final além de contaminação e presença de impurezas.

Mais particularmente, a presente invenção refere-se a um processo para obtenção de polissacarídeos, preferencialmente xiloglucanos, a partir de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*) que compreende as etapas de: beneficiamento das sementes; extração aquosa de 1% a 5%, preferivelmente 2%; precipitação com etanol 96° GL de 1 a 3 vezes o volume do

extrato aquoso; solubilização dos polissacarídeos obtidos com água e subsequente e secagem dos mesmos.

O processo inicia com o beneficiamento das sementes. Nesta etapa há a retirada da casca das sementes que pode ser executada de duas formas:

1) as sementes intactas são moídas e peneiradas para a separação da casca. Em uma modalidade preferencial da presente invenção, a moagem é feita em moinho martelo por tempo exaustivo e as sementes moídas são passadas em peneiras de 9 mm para a separação da casca. As sementes sem cascas são então separadas granulometricamente através da passagem em peneiras de diferentes meshs, preferencialmente, peneiras de 3,35 mm, 2,36 mm, 1,18mm e 600 μ m, respectivamente.

As frações oriundas da peneira de 9 mm são retidas na peneira de 3,35 mm e 2,36 mm, totalizando 54% da massa da semente completamente livre da casca.

2) de acordo com uma modalidade preferencial, retirada da casca das sementes através do uso de microondas.

Após o beneficiamento das sementes, adiciona-se lentamente o pó resultante à água, com auxílio de uma peneira. Então, é realizada uma extração aquosa a 1% a 5%, preferivelmente 2%, de massa de pó por volume. A extração é preferencialmente realizada com o pré-aquecimento da água a

uma temperatura que varia de 60° a 80° C, mais preferencialmente 70°C. Após o pré-aquecimento é realizada agitação por um tempo em torno de 1 hora. Em seguida realiza-se o resfriamento até 40° C.

Opcionalmente, o processo pode compreender ainda uma etapa de separação realizada, preferencialmente, através de centrifugação. A centrifugação é preferencialmente realizada a 4100 RPM por 15 minutos.

Após a extração e, se for o caso, da centrifugação, o material é submetido à precipitação com etanol 96° GL, de 1 a 3 vezes o volume, preferencialmente 3 vezes o volume. Foi verificado que a dita precipitação com etanol 96° GL permite a obtenção de dois polissacarídeos distintos: GEL (precipitado mais denso e mais geleificado) e SOB (polissacarídeo menos denso e mais fibroso). Tais polissacarídeos possuem a mesma constituição sacarídica (monômeros – galactose, xilose e glicose), mas possuem pesos moleculares distintos.

Opcionalmente o processo pode compreender ainda, após a precipitação alcóolica, uma etapa de separação, que será realizada, preferencialmente, através de filtração com prensa para compressão da massa resultante.

Em seguida os polissacarídeos resultantes são suspensos em água até a solubilização na concentração de 2% Massa/volume. Normalmente, para alcançar essa solubilização, são necessários 10 minutos em um liquidificador industrial. Pode

também ser realizada em um triturador de alto cisalhamento até a dispersão total do material sólido.

Após a solubilização, é realizada uma separação, preferencialmente através de centrifugação, sendo a mesma realizada preferencialmente a 4100 RPM por 15 minutos.

Após a separação, ocorre a secagem do sobrenadante por *spray dryer* ou congelamento e posterior liofilização. No caso de liofilização, há a necessidade de uma etapa de moagem.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção refere-se a um processo de obtenção de xiloglucanos a partir de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril*) que compreende as etapas de:

- a) beneficiamento das sementes por secagem das sementes em microondas;
- b) extração aquosa a 2% a uma temperatura de 60° a 80° C por um tempo de 1 hora;
- c) centrifugação 4100 RPM por 15 minutos;
- d) filtração por micropeneiramento em tacho com lençol;
- e) precipitação com etanol 96 °GL 1 a 3 vezes o volume;
- f) solubilização dos polissacarídeos obtidos em água;
- g) secagem por *spray dryer* ou congelamento e liofilização.

Em outra modalidade da presente invenção são providas composições compreendendo os polissacarídeos obtidos de acordo com o processo da invenção em combinação com excipiente cosmeticamente aceitáveis. Estes polissacarídeos podem ser utilizados de forma vantajosa, por exemplo, para

preparação de composições anti-rugas ou antiidade e também como agente espessante em formulações cosméticas.

A tabela abaixo ilustra algumas composições cosméticas compreendendo xiloglucanos obtidos de acordo com o processo da presente invenção.

Fases Processo	Componentes	Exemplo 1 (%)	Exemplo 2 (%)	Exemplo 3 (%)
1	Água desmineralizada	76,580	83,070	83,500
2	EDTA Dissódico	0,100	0,100	0,100
3	Glicerina Bidestilada BXR Vegetal	5,000	5,000	5,000
4	Goma Xantana	-	0,100	0,100
5	Carbopol ETD 2020	0,250	0,180	-
6	Alcool cetílico	1,000	3,000	2,000
6	Alcool estearílico	1,000	1,000	2,000
7	Hidroximetil acrilato, copolímero de acrilóildimetil taurato de sódio e esqualano e polisorbato 60	2,000	2,000	2,000
8	Hidróxido de Sódio	0,070	0,050	0,050
9	Água desmineralizada	10,000	5,000	5,000
9	Xiloglucano de Jatobá	4,000	0,500	0,250
		23,420	16,930	16,500

Fases Processo	componentes	Exemplo 4 (%)	Exemplo 5 (%)	Exemplo 6 (%)	Exemplo 7 (%)
1	Água desmineralizada	80,481	83,671	82,455	80,852
2	EDTA Dissódico	0,100	0,100	0,100	0,100
3	Glicerina Bidestilada BXR Vegetal	5,000	5,000	5,000	5,000
4	Goma Xantana	0,150	0,120	0,100	0,100
5	Carbopol ETD 2020	0,210	0,250	0,300	0,100
6	Alcool cetílico	0,500	2,300	1,500	4,000
6	Alcool estearílico	2,500	1,200	1,500	2,000
7	Hidroximetil acrilato, copolímero de acrilóildimetil taurato de sódio e esqualano e polisorbato 60	2,000	2,000	2,000	2,000
8	Hidróxido de Sódio	0,059	0,059	0,045	0,048
9	Água desmineralizada	8,000	5,000	5,000	5,000
9	Xiloglucano de Jatobá	1,000	0,300	2,000	0,800
		19,519	16,329	17,545	19,148

Processo para preparação das composições descritas na tabela acima:

- Verter a água em um recipiente e pesar (fase 1);
- Adicionar os componentes indicados na fase 2 e agitar até completa solubilização;
- Adicionar os componentes indicados na fase 3 e agitar;
- Adicionar gradualmente os componentes indicados na fase 4 até completa solubilização; agitação forte (aprox. 1000 a 2000 rpm);

- Adicionar gradualmente os componentes indicados na fase 5 com agitação forte ate completa dispersão . Não pode formar grumos.
- Aquecer esta fase até 70-80 °C.
- Em paralelo, aquecer os componentes indicados na fase 6 na mesma temperatura.
- Com os componentes indicados na fase 6 fundidos e na mesma temperatura da fase aquosa, adicionar a fase 6 na fase aquosa e agitar entre aprox. 1000-2000 rpm.
- Adicionar os componentes indicados na fase 7 e agitar fortemente até formação de emulsão lisa e brilhante em aprox. 10-15 minutos.
- Em paralelo no início do processo, dispersar os polissacarídeos em água, adicionando lentamente até completa solubilização.

Esta fase entrará como fase de resfriamento e os polissacarídeos em contato com outras gomas promoverá uma sinergia, havendo formação de pontes de hidrogenio e alterando as propriedades viscoelásticas/reológicas da emulsão.

Testes

1) Atividade de Proliferação celular

Foram realizados ensaios para a avaliação do potencial dos polissacarídeos obtidos de acordo com a presente invenção na promoção de proliferação celular (aumento do número de células

frente a um grupo controle não tratado com o componente ativo) através da análise da viabilidade celular pelo corante vermelho neutro. Outro objetivo do ensaio é a avaliação do potencial pró-colagênico dos componentes ativos (quantidade excedente de colágeno produzido pelas células tratadas com o componente ativo em relação às células controles não tratadas), através da detecção de colágeno no sobrenadante de cultura, pelo corante sirius red.

O ensaio permite avaliar:

a) se a presença de determinado componente ativo na cultura celular, por um ou mais períodos, resulta em aumento do número de células em relação ao grupo controle (células não tratadas com o mesmo componente ativo). O número de células é estimado em função da taxa de viabilidade celular, a qual é monitorada por incubação dos fibroblastos com o corante vital Neutral Red (vermelho neutro), ao final do período do ensaio (72h). Este corante é incorporado pelas células que estão vivas, de modo que a taxa de viabilidade celular é dada pela intensidade de corante absorvida pelas células, em uma relação diretamente proporcional. A leitura colorimétrica é realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm.

b) se a presença do componente ativo induz as células a produzirem mais colágeno por se. Para tanto, fibroblastos humanos derivados da derme são incubados com o fator de crescimento de tumor-TGF-beta conhecido indutor da síntese e

secreção de colágeno (controle positivo). Simultaneamente, outros fibroblastos nas mesmas condições são incubados com o componente ativo em teste. O colágeno é identificado pelo corante sirius red (solução de picrossirus), o qual tem afinidade para moléculas de pró-colágeno e colágeno. O potencial pró-colagênico de cada componente é identificado pelo aumento da densidade ótica (absorbância . filtro de 540 nm) mensurada após dissolução dos pigmentos previamente absorvidos pelo colágeno presente nos sobrenadantes de cultura.

Resultados:

Os resultados obtidos com os polissacarídeos produzidos de acordo com o processo da presente invenção mostraram:

- Potencial de proliferação/viabilidade das células incubadas com as diferentes concentrações da amostra de xiloglucano;
- Potencial pró-colagênico do componente ativo, normalizado em função da viabilidade celular;
- Produção total de colágeno, descrito na Tabela 1.

Tabela I. Proliferação celular (%), densidade ótica (Abs) +/- desvio padrão obtido da leitura de colágeno total e síntese de colágeno após normalização pelo índice de viabilidade (μ g/ml e %), para fibroblastos humanos de pele em cultura primária, após 96 horas de incubação.

Tratamento	Prol. Celular (%)	DO Colágeno Total +/- desvio padrão	Colágeno normalizado (ug/ml)	Colágeno normalizado (%)
Controle	100	0,152 +/- 0,008	100,00	0,00
TGF	136,00	0,224 +/- 0,009	198,10	98,10
Lote 16 Xilo 0,01%	108,57	0,236 +/- 0,031	274,15	174,15
Lote 16 Xilo 0,025%	113,14	0,207 +/- 0,001	202,76	102,76
Lote 16 Xilo 0,05%	113,14	0,21 +/- 0,036	209,00	109,00
Lote 16 Xilo 0,075%	114,86	0,196 +/- 0,025	177,20	77,20
Lote 16 Xilo 0,1%	115,43	0,173 +/- 0,031	129,44	29,44

Em relação à proliferação celular:

A incubação dos fibroblastos com a amostras de xiloglucano nas concentrações indicadas acima e nas condições testadas (96 horas) resultou em aumento da quantidade de células do ensaio em todas as concentrações de xiloglucano. O menor índice de proliferação celular foi de 8,6% na menor concentração testada (0,01%), enquanto que o maior índice de proliferação foi de 15,4%, com a amostra de xiloglucano a 0,1%. Nas demais concentrações testadas, o aumento da quantidade de células permaneceu entre 13 e 14% - valor que não difere do valor máximo obtido (15,4%).

Em relação à síntese de colágeno:

Quando aplicada a 0,01% pelo período de 96 horas, a amostra proporcionou aumento de 174,15% na síntese de colágeno. Nas concentrações de 0,025 e 0,05% de polissacarídeos, o aumento da síntese de colágeno foi de 102 e 109%, respectivamente. Esses resultados são semelhantes ao

encontrado para o controle positivo do ensaio (TGF- β , 98,1%) e significativamente maiores que o controle basal do ensaio (células incubadas apenas com meio de cultura).

Nas duas maiores concentrações do ensaio (0,075 e 0,1%), os índices de aumento de colágeno foram menores que os observados para as outras concentrações da amostra (77,2 e 29,4 %, respectivamente), porém ainda significativamente superiores ao controle negativo do ensaio.

2) Senescência celular *in vitro*

O objetivo deste estudo é a avaliação do potencial dos componentes ativos em proteger a célula contra o envelhecimento celular causado por exposição seqüencial à irradiação UVB, pelo parâmetro de diminuição da quantidade do marcador de senescência b-galactosidase (enzima lisossomal). Este teste pode ser utilizado para avaliar se a presença de componentes ativos em culturas de fibroblastos humanos de derme pode retardar o aumento da expressão da enzima b-galactosidase, a qual está associada à células em estado de senescência (envelhecimento) celular. Após o descongelamento do lote celular, as células são cultivadas em meio DMEM contendo 10% de SFB, em atmosfera com 5% de CO₂ e à temperatura de 37°C. Após o plaqueamento, as células são cultivadas nas mesmas condições por no mínimo 48 horas.

Decorrido esse período, uma placa de células será submetida à exposição de UVB por 6 minutos, durante 5 dias (1 exposição

por dia), e a outra será apenas incubada com solução tampão (PBS) pelos mesmos períodos. O grupo de células controle é tratado somente com PBS e meio de cultura; o grupo de tratamento é incubado com o componente ativo em teste, diluído em PBS (momento da exposição à irradiação) ou meio de cultura (intervalos entre as exposições às irradiações). Após a finalização da exposição, as células permanecem em repouso por 48 a 72 horas (para consolidação do efeito crônico decorrente da exposição à irradiação), incubadas em meio (controle) ou com componente ativo diluído em meio (grupo teste). Após esse período, as células são expostas ao substrato da enzima b-galactosidase, que é convertido em cromógeno azul após 12 horas de incubação. Células controle negativo apresentam até 10% de células b-galactosidade positivas; células do grupo controle positivo (expostas à UVB sem proteção de componentes ativos) apresentam de 45 a 65% de células b-galactosidade positivas;

O método de obtenção do envelhecimento de fibroblastos humanos de derme in vitro foi desenvolvido e validado pelo projeto Galápagos (Funil de Tecnologia / Natura). Contudo, a utilização destas células em aplicações potenciais experimentais (ex, avaliação da atividade metabólica das células senescentes, redução da senescência) não foi ainda completamente validada na presença de substâncias controles.

Resultados

Tabela II indica a porcentagem de célula b-galactosidase positivas +/- o desvio padrão da porcentagem após cada tratamento com as amostras contendo xiloglucanos obtidos de acordo com a presente invenção.

	Tratamento	β -gal positiva
UVB -	Controle C	10,96 +/- 1,77
UVB +		49,72 +/- 1,80
UVB -	Xilo 12B	11,25 +/- 0,2
UVB +		39,55 +/- 2,06

Os resultados do ensaio demonstraram que a presença de 0,01% de xiloglucano resultou em redução de 10% na população de células envelhecidas, reconhecidas pela % de células b-gal positivas, após o período de exposição fracionada a UVB. A presença do componente ativo protegeu as células dos danos causados pelo foto-envelhecimento.

Conclusão:

Em suma, foi observado que o xiloglucano apresenta capacidade de aumentar a síntese de colágeno, aumentar a expressão gênica de colágeno tipo I, aumentar a síntese de tropo-elastina e aumentar proliferação celular. Além disso, protegeu as células do envelhecimento celular induzido pela exposição prolongada aos raios UVB no modelo de senescência

celular. Todos estes ensaios foram conduzidos em cultura celular, utilizando fibroblastos humanos da derme.

Benefício	Concentração testada	% aumento	Relatório <i>in vitro</i>
Proliferação celular	0,05%	15	24/08
Colágeno	0,01% - 0,1%	40-80	24/08
Expressão gênica de colágeno tipo I	0,05%	75%	-
Produção de tropo-elastina	0,01%	68%	-
Senescência celular	0,01%	10%	55/08

Adicionalmente às vantagens descritas acima, foi verificado que os polissacarídeos da presente invenção podem ser utilizados como agentes espessantes em composições cosméticas. A Figura 3 contém um gráfico que mostra a atividade espessante melhorada do polissacarídeo da presente invenção quando comparada á goma xantana.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para obtenção de polissacarídeos a partir de sementes de jatobá, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:
 - a) beneficiamento das sementes;
 - b) extração aquosa de 1% a 5% de massa de pó por volume, preferencialmente a 2% de massa de pó por volume;
 - c) precipitação com etanol 96°GL de 1 a 3 vezes o volume do extrato aquoso;

- d) filtração por prensa do precipitado obtido em (c);
- e) solubilização dos polissacarídeos obtidos na etapa (d) com água; e
- f) secagem dos polissacarídeos obtidos na etapa (e).

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa de separação dos polissacarídeos após a etapa de extração aquosa.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a etapa de separação é a centrifugação.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a centrifugação é realizada a 4100 RPM por 15 minutos.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de extração aquosa é realizada a uma temperatura de 70° C por 4 horas.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a desidratação do sobrenadante é feita por spray dryer.

7. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a desidratação do sobrenadante

é feita por liofilização.

8. Composição cosmética, caracterizada pelo fato de que compreende um polissacarídeo obtenível através do processo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

9. Uso dos polissacarídeos de semente de jatobá, caracterizado pelo fato de ser para preparação de uma composição cosmética anti-rugas ou antiidade.

10. Uso dos polissacarídeos de semente de jatobá, caracterizado pelo fato de ser como um agente espessante em composições cosméticas.

RESUMO

Patente de Invenção: **"PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS A PARTIR DE SEMENTES DE JATOBÁ (*HYMENEAE COURBARIL* L.), COMPOSIÇÃO COSMÉTICA COMPREENDENDO OS DITOS POLISSACARÍDEOS E USO DOS MESMOS".**

A presente invenção refere-se a um processo para obtenção de polissacarídeos a partir de sementes de jatobá que compreende as etapas de:

- a) beneficiamento das sementes (processo a seco);
- b) extração aquosa de 1% a 5% de massa de pó por volume, preferencialmente a 2% de massa de pó por volume;
- c) precipitação com etanol 96°GL de 1 a 3 vezes o volume do extrato aquoso;
- d) filtração por prensa do precipitado obtido em (c);
- e) solubilização dos polissacarídeos obtidos na etapa (d) com água; e
- f) secagem dos polissacarídeos obtidos na etapa (e).

Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a uma composição cosmética contendo polissacarídeos obtidos de acordo com o processo definido acima e o uso dos ditos polissacarídeos.

FIGURA 1



FIGURA 2



FIGURA 3

