

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO REOLÓGICA DA GALACTOMANANA EXTRAÍDA
DAS SEMENTES DE *Cassia grandis***

PRISCILLA BARBOSA SALES DE ALBUQUERQUE

**ORIENTADORA: Prof^a. Dra. MARIA DAS GRAÇAS CARNEIRO
DA CUNHA**

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ ANTÔNIO COUTO TEIXEIRA

Recife
2013

PRISCILLA BARBOSA SALES DE ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO REOLÓGICA DA GALACTOMANANA EXTRAÍDA
DAS SEMENTES DE *Cassia grandis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração de Biotecnologia

**ORIENTADORA: Prof^a. Dra. MARIA DAS GRAÇAS CARNEIRO
DA CUNHA**

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ ANTÔNIO COUTO TEIXEIRA

Recife
2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Albuquerque, Priscilla Barbosa Sales de

**Avaliação reológica da galactomanana extraída das sementes de
Cassia grandis/ Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque Recife: O Autor,
2013.**

90 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria das Graças Carneiro da Cunha

Coorientador: José António Couto Teixeira

**Dissertação (mestrado) ã Universidade Federal de Pernambuco, Centro
de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2013.**

Inclui bibliografia

- 1. Polissacarídeos 2. Reologia 3. Leguminosa I. Cunha, Maria das Graças
Carneiro da (orientadora) II. Teixeira, José António Couto
(coorientadora) III. Título**

572.566

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 172

AVALIAÇÃO REOLÓGICA DA GALACTOMANANA EXTRAÍDA DAS SEMENTES DE *Cassia grandis*

PRISCILLA BARBOSA SALES DE ALBUQUERQUE

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
(Orientadora) ã Departamento de Bioquímica ã UFPE

Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
(Membro Interno) ã Departamento de Biquímica ã UFPE

Prof. Dr. Wilson Barros Júnior
(Membro Externo) ã Departamento de Física ã UFPE

Dedico este trabalho à minha avó, Dona Nina, e ao meu pai, Misael Medeiros de Albuquerque. Por eles eu tenho o amor mais saudoso deste mundo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo Pai, amigo, Senhor e Salvador que é. Não tenho palavras para demonstrar o que Ele representa em minha vida; meu maior desejo é continuar seguindo Seu exemplo de humildade, sinceridade, servidão e compaixão.

À minha orientadora, professora Graça Cunha, pelo imenso apoio e carinho. Obrigada por ter acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava que seria capaz de conseguir. Tenho profunda admiração pelo exemplo de simpatia, respeito, profissionalismo, confiança e liderança que a senhora é!

Ao meu co-orientador, professor José Teixeira, por demonstrar tamanha atenção mesmo de tão longe. Muito obrigada pelas contribuições cedidas durante nossas reuniões, às quais foram fundamentais para a finalização deste trabalho.

Agradeço especialmente o fato do professor Teixeira e da professora Graça terem me aceitado como aluna mesmo sem me conhecerem. Espero ter correspondido com êxito a este voto de confiança.

Aos professores Wilson Barros e Tereza Correia, por terem trabalhado comigo de maneira tão próxima e paciente. O progresso da ciência se faz através de pessoas como vocês!

À minha mãe, Lindalva Maria Barbosa Sales de Albuquerque, pelo amor, carinho, esforço e empenho que sempre teve para me educar. Você é meu tesouro mãezinha, minha razão de viver. Devo tudo que sou a você!

À minha grande família, que mesmo sendo tão espalhada, representa meu porto seguro. O amor que sinto se mistura à saudade e ao orgulho que tenho por cada um de vocês! Obrigada por cuidarem de mim (seja de João Pessoa, Recife, Timbaúba, Rio de Janeiro, Boa Vista ou NY) e me apoiarem nos momentos mais decisivos! Espero que possamos seguir o exemplo de humildade, honestidade e respeito que vovó Nina e vovô Joaquim nos deixaram!

Ao lindo, Marco Antônio, pelos vários momentos singulares, eternos e engraçados que passamos juntos. Sem você eu não seria tão feliz! Estendo o agradecimento a toda sua família, por ter me acolhido de modo tão especial!

À Paty e Karol, pelo companheirismo do dia-a-dia e por completarem a minha felicidade, mesmo nas coisas mais simples! A vida é muito mais fácil de ser levada com vocês, suas lindas!

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, especialmente Bel, Paulinho e Thyna, por estarem comigo nos melhores e piores momentos durante esses dois anos de convivência. Não tenho palavras para demonstrar o quanto vocês foram essenciais na construção deste trabalho!

Aos amigos da faculdade, que se tornaram amigos da vida! Amo especialmente a cada um

de vocês. Obrigada por terem ajudado a me tornar a pessoa e profissional que sou hoje.

Aos amados amigos de João Pessoa, especialmente Aninha, Simoninha, Wany, Ianara e Ilana! Já nem conto mais há quantos anos nos conhecemos. Amo muito cada um de vocês e morro de saudade de tê-los mais próximo!

Aos amigos da turma 2011.1 do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas. Agradeço especialmente a duas pessoas que se tornaram mais que amigas e companheiras: Ana Felix e Silvany, amo vocês de coração!

Aos amigos da Cidade Viva, por representarem a família que eu escolhi para amar. Vocês são as melhores pessoas que conheço.

A Raquel e Christiano, Karlinha e Taciano, Ilceney e Débora, grandes amigos que se tornaram a minha família aqui em Recife.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, por compartilharem trabalhos, risadas, experimentos, lanches e alegrias, e por conseguirem superar as dificuldades encontradas no cotidiano com tanta boa vontade. Vocês são admiráveis!

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas e amigos que de alguma forma me apoiaram, incentivaram e contribuíram na realização e conclusão desse trabalho.

ÓTalvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o
que era antes.ô (Martin Luther King)

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
1. Introdução	14
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Revisão de Literatura.....	16
3.1 Galactomananas	16
3.1.1 Considerações Gerais.....	16
3.1.2 Aplicação Biotecnológica	19
3.1.3 Galactomananas de plantas do gênero Cassia	22
3.1.4 Cassia grandis	23
3.2 Extração de polissacarídeos.....	25
3.3 Processos de Caracterização de polissacarídeos.....	28
3.3.1 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier.....	28
3.3.2 Difração de Raios X.....	29
3.3.3 Reologia aplicada à análise de polissacarídeos	30
4. Referências Bibliográficas	34
CAPÍTULO 1	46
CONCLUSÕES	78
INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES DA REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS	79

RESUMO

Galactomananas são caracterizadas como o maior grupo de polissacarídeos com capacidade de reserva de energia do endosperma de sementes de plantas, especialmente aquelas pertencentes à família Leguminosae, como a espécie *Cassia grandis* da subfamília Caesalpinioideae, amplamente encontrada na zona da mata do Estado de Pernambuco, Brasil. As galactomananas têm grande aplicação industrial como espessantes, emulsionantes, gelificantes, flocculantes e formadores de película. O presente trabalho teve por objetivo a extração, caracterização e a avaliação das propriedades reológicas da galactomanana contida nas sementes da *Cassia grandis*. As sementes de *C. grandis* foram coletadas na cidade de Angelim, agreste do Estado de Pernambuco, e o processo de extração incluiu, primeiramente, remoção das vagens, seguido pela fervura em água destilada a 100°C para retirada de suas cascas e secagem até peso constante. Posteriormente, as sementes sem casca foram trituradas em solução de NaCl 0,1M [5% (p/v)], filtradas através de tecido vual e tela de serigrafia (tipo 90) e precipitadas com etanol 46% (1:3 v/v). O precipitado foi filtrado em tela de serigrafia (tipo 110), lavado consecutivamente com etanol 100% e acetona pura, filtrado entre cada lavagem e finalmente seco e pulverizado. O rendimento da extração foi calculado pela porcentagem de matéria seca final obtida em relação ao peso inicial das sementes. A caracterização do polissacarídeo extraído foi realizada por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) e por difração de raios X. As propriedades reológicas foram determinadas em soluções aquosas da galactomanana nas concentrações de 0,5, 0,8, 1,0, 1,5 e 2,0% (p/v), em regime rotacional e oscilatório. A viscosidade e os módulos de armazenamento e perda de energia foram determinados e analisados em função da tensão, da frequência, da taxa de cisalhamento e da temperatura. A galactomanana foi eficientemente extraída e apresentou rendimento de 35,77% $\pm$ 7,83. Os resultados dos espectros do FTIR e da difração de raios X confirmaram que o polissacarídeo extraído das sementes de *Cassia grandis* é um polissacarídeo constituído principalmente de galactose e manose, ou seja, trata-se de uma galactomanana. As soluções aquosas deste polissacarídeo apresentaram comportamento pseudoplástico, devido o decaimento da viscosidade com a taxa de cisalhamento, revelando um regime newtoniano para concentrações de até 1%. Os módulos de ganho e perda de energia aumentaram continuamente em função da frequência de oscilação, indicando a ausência de ligações permanentes características de um gel em concentrações mais baixas; a 2%, porém, o polímero transforma-se em um gel fraco. Os estudos de tensão e deformação permitiram uma avaliação mais precisa desta transição e indicaram que o ponto de gelificação ocorre a 1,6% (p/v). Em conclusão, os resultados obtidos sugerem um potencial de aplicação biotecnológica para a galactomanana extraída das sementes de *Cassia grandis*, principalmente no que se refere à utilização de suas suspensões em revestimentos e géis úteis para indústrias farmacêuticas e alimentícias.

Palavras-chave: Galactomanana; *Cassia grandis*; reologia.

ABSTRACT

Galactomannans are characterized as the largest group of polysaccharides with energy reserve capacity from the endosperm of seed plants, especially those belonging to the family Leguminosae, such as the specie *Cassia grandis* from the Caesalpinioideae subfamily, widely found in the forest region of Pernambuco State, Brazil. Galactomannans have great industrial applicability as thickeners, emulsifiers, gelling agents, flocculants and film formers. The present study aimed the extraction, characterization and evaluation of rheological properties of the galactomannan contained in the seeds of *Cassia grandis*. The *C. grandis* seeds were collected in the city of Angelim, on the wild of Pernambuco state, and the extraction process included, firstly, removal from the pods, followed by boiling in distilled water at 100°C for removal of its hulls and drying until constant weight. Subsequently, the seeds without hull were triturated with 0.1 M NaCl [5% (w/v)], filtered through Vual tissue and screen printing cloth (90 thread type) and precipitated with 46% ethanol (1:3 v/v). The precipitate was filtered on screen printing cloth (110 thread type), washed consecutively with 100% ethanol and acetone, filtered between each wash and finally dried and pulverized. The extraction yield was calculated as the percentage of final dry mass obtained related from the initial weight of the seeds. The characterization of the polysaccharide extracted was performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction. The rheological properties were determined on aqueous solutions of galactomannan concentrations of 0.5, 0.8, 1.0, 1.5 and 2.0% (w/v) in rotational and oscillatory regime. The viscosity and the storage and loss of energy modules were measured and analyzed as a function of stress, frequency, shear rate and temperature. The galactomannan was efficiently extracted and showed $35.77\% \pm 7.83$ of yield. The results of the FTIR spectra and X ray diffraction confirmed that the polysaccharide extracted from the seeds of *Cassia grandis* is a polysaccharide composed principally of galactose and mannose, i.e., it is a galactomannan. Aqueous solutions of its polysaccharide exhibited pseudoplastic behavior, due to the decay of viscosity with shear rate, revealing a Newtonian regime for concentrations up to 1%. The modules of storage and loss of energy continually increased as a function of oscillation frequency, indicating no permanent connections features of gels at lower concentrations; at 2%, however, the polymer becomes a weak gel. The stress-strain study allows a more accurate evaluation of this transition indicating 1.6% (w/v) as the value for the sol-gel transition. In conclusion, the results suggest a potential biotechnological application for the galactomannan extracted from the seeds of *Cassia grandis*, especially with regards to the use of their suspensions as coatings and gels useful for food and pharmaceutical industries.

Keywords: galactomannans; *Cassia grandis*; rheology.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	Segmento representativo de uma cadeia de galactomanana de origem vegetal.....	16
Figura 2	Corte longitudinal de semente da família Leguminosae contendo endosperma.....	17
Figura 3	Distribuição das substituições de galactose ao longo da cadeia principal de manana.....	18
Figura 4	Flores e Fruto com sementes de <i>Cassia grandis</i>	24

ARTIGO

Figure 1	FTIR spectra (A) and X ray patterns (B) of the galactomannan extracted from <i>C. grandis</i> seeds	70
Figure 2	Rotational steady flow experiments measuring apparent viscosity η as a function of shear-rate $\dot{\gamma}$ for several concentrations (% w/v) of galactomannans (gal.). The experimental data (open symbols) were adjusted utilizing the Cross model (solid lines) as described in the text. The inset in the top right shows the zero-shear viscosity, η_0 , extracted from the main graphic, as a function of gal. concentration. The two regimes depicted were adjusted assuming two regimes of power-law dependence: For the first regime (dilute regime), a black solid line $\eta_0 \propto C^{m_d}$ with $m_d = 2.7$ was utilized; and for the second regime (semi-dilute regime), a red solid line $\eta_0 \propto C^{m_d}$ with $m_d = 5.5$ was employed. Since the 2% (w/v) concentration did not show a steady value of η_0 , the maximum value of viscosity for that concentration was chosen	70
Figure 3	Oscillatory experiments measuring storage modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of an oscillatory stress frequency, ω , for several concentrations (% w/v) of galactomannans (gal.) solutions. We assume a power-law dependence for the storage, $G' \sim \omega^{n'}$, and loss modulus, $G'' \sim \omega^{n''}$, and adjust the data for frequencies below the cross-over with the best n' and n'' . The inset (bottom right) shows exponents n' (filled symbols) and n'' (open symbols) obtained from fitting the data as a function of galactomannan concentration	71
Figure 4	Stress-strain experiment measuring storage modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of applied shear stress, τ , for several concentrations (% w/v) of galactomannans (gal.) solutions. Storage	

modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of concentration (% w/v) of galactomannan (gal.) solutions. The values of the moduli were extracted from extrapolating the values of Fig.5 towards the zero shear stress limit. The solid lines are fittings considering a power law dependence $G' \sim C^{s'}$ and $G'' \sim C^{s''}$ with exponents $s' = 5.63$ and $s'' = 3.73$, respectively

72

Figure 5 Temperature stability experiment. The storage modulus, G' (filled symbols), and the loss modulus, G'' (open symbols), are measured as a function of temperature for several concentration (% w/v) of galactomannan (gal.) solutions

73

Figure 6 Complex viscosity versus oscillating frequency (open symbols) and apparent viscosity as a function of shear rate (solid symbols) for several concentrations of galactomannans. The solid lines are fittings for the highest concentration sample considering a power law dependence $\eta^* \sim \dot{\gamma}^{-p_s}$ with $p_s = 0.84$ as already described in Fig.1 and $\eta^* \sim \omega^{-p_o}$ with $p_o = 0.70$ for the complex viscosity

74

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1 Fitting parameters for flow curves of different galactomannan concentrations depicted in Fig. 1 75

1. Introdução

Galactomananas são polissacarídeos extraídos com elevado rendimento a partir de tecidos do endosperma de sementes de leguminosas, onde desempenham funções de reserva de energia e hidratação. Apresentam propriedades particulares como massa molar elevada, solubilidade em água e caráter não-iônico (GIDLEY; REID, 2006; POLLARD et al., 2010), além da grande capacidade de moldar filmes/membranas (CERQUEIRA et al., 2009a, 2009b; CERQUEIRA et al., 2011a; MIKKONEN et al., 2007) e atuar como agente gelificante (BRESOLIN et al., 1999; FERNANDES; GONÇALVES; DOUBLIER, 1991; PEREIRA-NETTO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2005).

Cassia grandis é uma planta de pequeno a médio porte, pertencente à família Leguminosae e à subfamília Caesalpinioideae, nativa das florestas tropicais da América Central e Antilhas, amplamente encontrada na zona da mata do Estado de Pernambuco, Brasil. O polissacarídeo extraído do endosperma das sementes de *C. grandis* introduzida na Índia foi caracterizado como uma galactomanana, constituída principalmente de galactose e manose e com grande potencial de reserva de nutrientes (JOSHI; KAPOOR, 2003).

A extensa utilização de galactomananas se deve principalmente às suas propriedades físicas e à ausência de toxicidade, as quais permitem sua aplicação nas indústrias têxtil, cosmética, alimentícia, farmacêutica, biomédica, de papel, mineração e refinaria de petróleo (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

A avaliação das características reológicas de soluções polissacarídicas possibilita determinar tanto a funcionalidade quanto a qualidade do polissacarídeo para a sua adequada aplicação como filme/membranas, géis, estabilizantes, entre outras.

No presente trabalho, a galactomanana contida nas sementes de *Cassia grandis* foi extraída, o seu rendimento de extração foi determinado e as suas propriedades reológicas foram avaliadas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo a extração, caracterização e avaliação das propriedades reológicas da galactomanana contida nas sementes da *Cassia grandis*.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair a galactomanana proveniente das sementes de *Cassia grandis*;
- Caracterizar a galactomanana obtida por Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier e Difração de Raios X;
- Analisar o comportamento de fluxo das soluções da galactomanana através de curvas de viscosidade;
- Analisar o comportamento viscoelástico das soluções da galactomanana através de varreduras de tensão e frequência em regime linear e modo oscilatório;
- Avaliar a termoestabilidade das soluções da galactomanana.

3. Revisão de Literatura

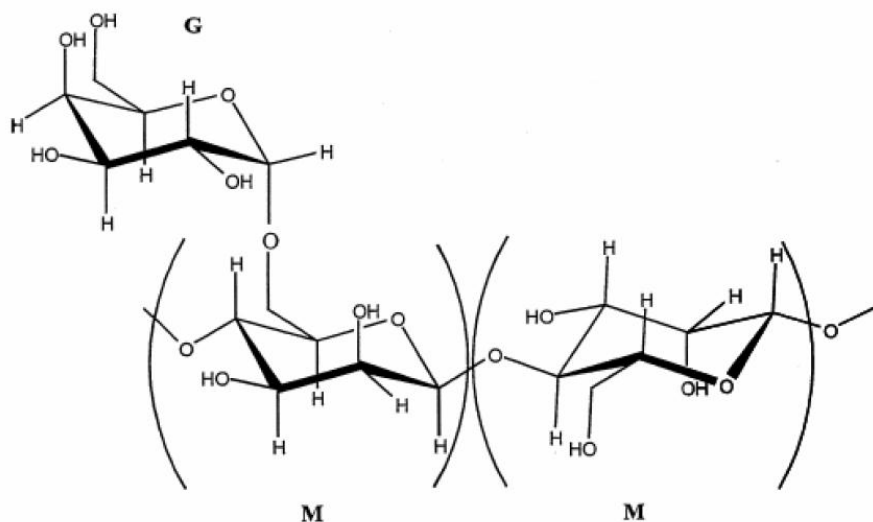
3.1 Galactomananas

3.1.1 Considerações Gerais

Diversos produtos utilizados pela sociedade têm como fonte a flora e a fauna brasileira; medicamentos, alimentos, fibras, óleos naturais e essenciais, cosméticos, produtos químicos e biocombustível são alguns bons exemplos. Inúmeras são as classes de compostos químicos que podem ser extraídos das nossas espécies vegetais. Uma delas é representada pelos polissacarídeos, que são polímeros naturais extraídos de plantas, algas, animais, fungos e via fermentação microbiológica, com uma ampla gama de aplicações, especialmente nas áreas alimentícia, biomédica, farmacêutica e de cosméticos (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009).

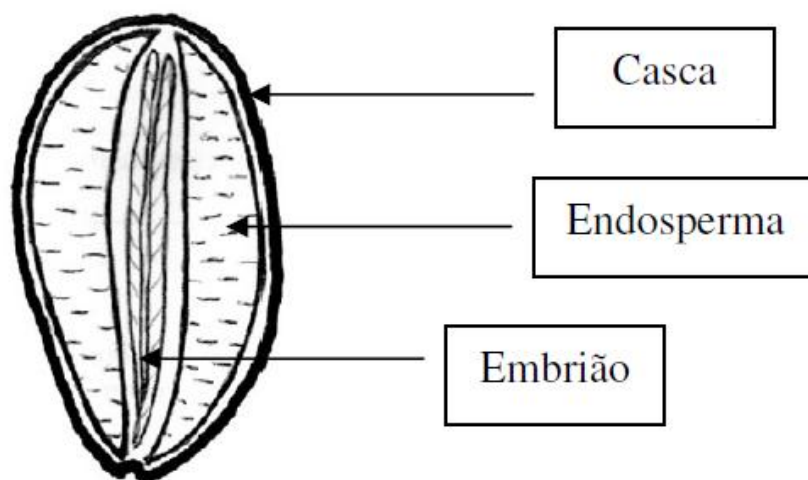
Os polissacarídeos do tipo galactomanana (Figura 1) são polímeros formados por uma cadeia linear com unidades α -1,4-D-manopiranosose substituídas por unidades ligantes β -1,6-D-galactopiranosose, obtidos a partir de fontes microbianas, e principalmente de plantas, onde desempenham função de reserva e cuja principal fonte é o endosperma das sementes (Figura 2), com destaque para os membros da família Leguminosae (DEA; MORRINSON, 1975). Esta família possui espécies espalhadas por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais, que variam de árvores emergentes até ervas diminutas e efêmeras (LEWIS et al., 2005).

Figura 1 Segmento representativo de uma cadeia de galactomanana de origem vegetal



FONTE: SIERAKOWSKI et al. (2000). M: representação das unidades de manose da cadeia principal em ligação α (1 $\rightarrow$ 4). G: representação da substituição por unidade de galactose em β (1 $\rightarrow$ 6)

Figura 2 ã Corte longitudinal de semente da família Leguminosae contendo endosperma



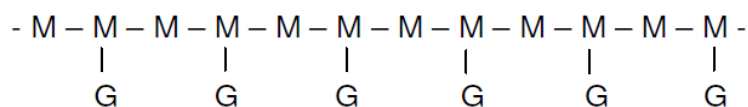
FONTE: DAKIA et al. (2008)

Os polissacarídeos de sementes são exemplos de classes de compostos naturais que têm contribuído na classificação da família Leguminosae, mas especial ênfase tem sido dada às galactomananas (HEGNAUER; GRAYER-BARKMEIJER, 1993). Segundo a classificação de Engler (1964), a família Leguminosae é dividida nas subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae. A utilização de galactomananas como caráter taxonômico tem sido proposta por muitos autores, levando em consideração o rendimento em galactomanana extraída do endosperma das sementes desta família, assim como a proporção entre os resíduos de manose e galactose na molécula e os teores destes compostos nas sementes (DEA; MORRISON, 1975; BUCKERIDGE et al., 1995; ROSA et al., 2009). Em geral, baixos graus de substituição de galactose são característicos de espécies pertencendo à subfamília Caesalpinioideae, que é a mais primitiva das três subfamílias, enquanto galactomananas com percentuais médios a alto de galactose pertenceriam às subfamílias Faboideae e Mimosoideae, que são mais recentes. Altos rendimentos em galactomanana são encontrados em sementes de Caesalpinioideae (REID; EDWARDS, 1995).

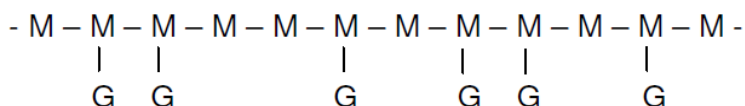
A utilidade das galactomananas como indicador taxonômico torna-se importante quando se leva em consideração que a família Leguminosae é a segunda família dentro da classe das dicotiledôneas e a primeira em importância econômica. Dea e Morrison (1975) propuseram três possibilidades para a distribuição das substituições de galactose ao longo da cadeia principal de manana (Figura 3), ou seja, para a estrutura fina da molécula:

Figura 3 ã Distribuição das substituições de galactose ao longo da cadeia principal de manana

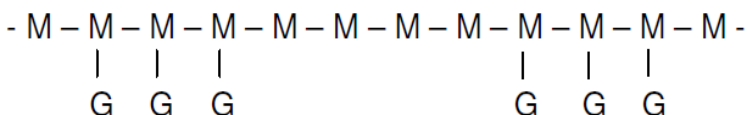
1) Arranjo regular



2) Arranjo irregular



3) Arranjo em blocos



FONTE: DEA e MORRISON (1975). M: representação das unidades de manose da cadeia principal em ligação • (1→4). G: representação da substituição por unidade de galactose em Ũ(1→6)

Além de proporcionar diferenças na densidade e na viscosidade das soluções, a proporção e distribuição das unidades de galactose tem papel fundamental na solubilidade das galactomananas, visto que, à medida que a razão manose/galactose diminui, a solubilidade aumenta. Caso não existam ramificações com o monossacarídeo galactose, tem-se uma manana pura ou verdadeira, ou seja, um polissacarídeo constituído de pelo menos 85 a 95% de unidades de manose, cuja distribuição das cadeias irá proporcionar interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio entre as hidroxilas *cis* da manose, levando à formação de agregados completamente insolúveis em água (ASPINALL, 1959; GOYCOOLEA; MORRIS; GIDLEY, 1995; STEPHEN, 1983).

A presença de unidades de galactose produz cadeias ramificadas e realiza o impedimento estérico entre as ligações de hidrogênio intermoleculares, minimizando a formação de agregados. Por outro lado, galactomananas com poucas cadeias laterais (maior razão manose/galactose) podem interagir melhor com outros polissacarídeos devido às longas regiões não substituídas (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). Em geral, as galactomananas menos substituídas são obtidas de sementes de espécies com mais características plesiomórficas (Caesalpinioideae), enquanto as moderada ou altamente substituídas, daquelas com mais caracteres apomórficos (Faboideae e Mimosoideae) (DOYLE, 1997).

3.1.2 Aplicação Biotecnológica

As soluções aquosas de galactomanana são altamente viscosas, característica que permite sua utilização como agente espessante, floculante, gelificante, estabilizante, emulsificante e formador de película. A variedade de propriedades físico-químicas torna esse polissacarídeo um material bastante versátil, utilizado pelo homem de inúmeras formas, entre elas na indústria farmacêutica, cosmética, de papel, alimentícia, na biomedicina, entre outras (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005; VIEIRA et al, 2007).

As três principais galactomananas utilizadas comercialmente em indústrias de alimentos e não-alimentos são goma guar (*Cyamopsis tetragonobus*, razão manose/galactose 1,6), goma tara (*Caesalpineia spinosa*, razão manose/galactose 3,3) e goma de feijão alfarroba (*Ceratonia siliqua*, razão manose/galactose 3,75) (DAKIA et al., 2008; DEA; MORRISON, 1975; GIDLEY; REID, 2006). Outras galactomananas comercialmente conhecidas são a goma extraída de *Cassia tora*, com relação manose/galactose de aproximadamente 3,0 (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005) e a galactomanana de feno-grego *Trigonella foenum-graecum* (razão manose/galactose 1,1), comercializadas em menor escala, assim como aquela extraída das sementes de *Prosopis juliflora* (razão manose/galactose 4,2) (FIGUEIREDO, 1983).

A maioria das galactomananas utilizadas na tecnologia de fármacos e cosméticos geralmente são gomas impuras. Em muitos casos, as galactomananas têm sido usadas em misturas binárias com outros polissacarídeos, com a finalidade de avaliar as novas características e propriedades dos géis formados (BRESOLIN et al., 1999; FERNANDES; GONÇALVES; DOUBLIER, 1999). Bresolin et al. (1997), por exemplo, observaram o efeito sinérgico entre a galactomanana de *M. scabrella* e a xantana, enquanto que as propriedades reológicas de gelificação foram estudadas por Amaral (1998). McCleary et al. (1981) realizaram análises reológicas de xantana e galactomanana, demonstrando que essa interação diminui com o aumento do grau de substituição das galactomananas. Lucyszyn et al. (2006), por sua vez, aplicaram géis de misturas de galactomananas e ágar para cultivo de células vegetais. Outro gel binário amplamente estudado é constituído por k-carragenana e galactomanana. Gonçalves et al. (1997) observaram que a adição de galactomanana melhorou a qualidade do gel quando comparado ao obtido pela k-carragenana isolada. Em combinação com galactomanana, os géis tornaram-se menos quebradiços, mais resistentes e com menor tendência à sinerese.

Na indústria de cosméticos, as galactomananas são utilizadas como espessantes e estabilizantes em cremes e loções (STEPHEN, 1983). Géis mistos com dois ou mais biopolímeros também vêm sendo amplamente investigados, com ênfase para os que utilizam galactomananas com a finalidade de melhorar propriedades como coesão, aparência, estabilidade e durabilidade

(MENEGUIN, 2012).

As galactomananas têm sido usadas como matriz na liberação controlada de drogas, a exemplo da formulação galactomanana/xantana, que já foi utilizada como veículo de liberação controlada de fármacos como diclofenato de sódio e teofilina. As galactomananas são adicionadas a comprimidos efervescentes, pois, como são agentes espessantes, formam uma suspensão estável, impedindo o assentamento das partículas, além de promover uma agradável sensação na boca (SCHIERMEIER; SCHMIDT, 2002; UGHINI et al., 2003; VENDRUSCOLO et al., 2005). Estudos envolvendo a utilização de galactomananas em géis para incorporação de biomoléculas também já foram desenvolvidos, por exemplo, com a importante finalidade de avaliar a liberação controlada de suspensões contidas em estruturas nanométricas (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001; COMBA e SETHI, 2009).

Galactomananas, em combinação com pectinas, têm sido usadas como revestimento de cápsulas e comprimidos com a finalidade de liberação controlada de drogas no intestino grosso. Isoladamente, esses polissacarídeos não podem ser utilizados como carreadores de drogas ao cólon devido a sua solubilidade em água. Entretanto, quando o revestimento produzido pela combinação de galactomanana e pectina possui pH 7, ele torna-se elástico e insolúvel em fluidos gástricos e intestinais, e consegue atravessar o trato gastrointestinal superior, não ocorrendo liberação da droga no estômago e intestino delgado, havendo a liberação somente no intestino grosso (YANG; CHU; FIX, 2002; WU et al., 2009).

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

Em relação à aplicação biotecnológica de galactomananas na indústria alimentícia, a goma guar e a alfarroba são as espécies mais utilizadas (DOYLE et al., 2006), enquanto a galactomanana de tara tem sido aceita como uma alternativa àquelas já utilizadas (AZERO; ANDRADE, 2002). As principais utilizações são como espessantes e substitutos de gordura, além de também melhorarem a textura e aparência dos alimentos e aumentarem a sua resistência a variações de temperatura. Em particular, as galactomananas podem ser usadas em produtos derivados do leite, sobremesas (especialmente sorvetes), geléias, produtos em pó, misturas para bolo e glacê, temperos, molhos, sopas e alimentos enlatados e congelados (SANFORD; BAIRD, 1983; REID; EDWARDS, 1995).

As galactomananas também podem entrar na composição de alimentos dietéticos, uma vez que não são digeridas pelo organismo. A adição da goma guar em refeições ricas em carboidratos reduz o aumento pós-prandial de glicose e de insulina no sangue. Além disso, melhorias no

metabolismo de carboidratos e lipídeos em pacientes insulino-dependentes e insulino-independentes foram conseguidas usando preparações farmacêuticas de goma guar e alimentos adicionados da mesma goma. A ação fisiológica da goma guar parece depender principalmente da sua capacidade de hidratação rápida, conseguindo, assim, aumentar a viscosidade do bolo alimentar no estômago e no intestino delgado. A alta viscosidade no intestino delgado diminui a digestão e absorção de carboidratos, o que tende a reduzir a hiperglicemia pós prandial. Também existem estudos de que a goma guar é capaz de diminuir o LDL sanguíneo (ELLIS et al., 1991; BEHR et al., 1998).

Estudos relacionados às propriedades mecânicas e térmicas de filmes a base de galactomananas também vem sendo amplamente explorados para a aplicação biotecnológica deste polissacarídeo na indústria alimentícia, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de revestimentos comestíveis (CERQUEIRA et al., 2009a, 2009b; CERQUEIRA et al., 2011a; MIKKONEN et al., 2007).

Diversas pesquisas já foram desenvolvidas a cerca da purificação, descrição das propriedades físicas, químicas e biológicas, e utilização de galactomananas obtidas de distintas e variadas fontes. Galactomananas de diferentes espécies vegetais já foram caracterizadas, como *Mimosa scabrella* (GANTER, 1988; GANTER et al., 1992; GANTER; REICHER, 1999), *Senna multijuga* (RECHIA-VARGAS, 1995), *Apuleia leiocarpa* (LUCYSZYN, 1994), *Dimorphandra gardneriana tul.* (CUNHA et al., 2009), *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* (SOUZA et al., 2010), *Stryphnodendron barbatiman* (REICHER et al., 1991) e *Caesalpinia pulcherrima*, *Gleditsia triacanthos* e *Adenanthera pavonina* (CERQUEIRA et al., 2011). Petkowicz et al. (1998) estudou a galactomanana de *Schizolobium amazonicum*, enquanto a de *Schizolobium parahybae* foi relatada por Ganter et al. (1993). A hidrólise enzimática destas galactomananas, além daquelas obtidas de sementes de *Mimosa scabrella* e *Stryphnodendron barbatiman* foi analisada por Ganter et al. (1995).

Alguns estudos relacionados à aplicação biomédica deste polissacarídeo também já foram desenvolvidos, como Ono et al. (2003), que verificaram possíveis propriedades antivirais da galactomanana sulfatada de sementes de *M. scabrella* e *L. leucocephala*. Lima et al. (1996), por sua vez, descreveram o comportamento de galactomananas sulfatadas de *Caesalpinia leiostachya*. Propriedades biológicas foram analisadas por Pires et al. (2001), com a sulfatação da galactomanana extraída de *Senna macranthera* a fim de se obter um ativo heparinóico.

Tavares et al. (2005) adicionaram galactomananas com diferentes relações manose/galactose a proteínas do soro do leite e perceberam que a diminuição da temperatura de gelificação e aumento na força do gel foram mais evidentes quando galactomananas menos substituídas foram utilizadas, confirmando a indicação de que o grau de substituição é um caráter importante na interação das

galactomananas com outros polímeros.

Assim, pode-se perceber que existe uma tendência mundial relacionada às pesquisas desenvolvidas sobre a purificação, a caracterização e a utilização de galactomananas, indicando a grande necessidade de encontrar sementes que constituam novas fontes alternativas para extração deste polissacarídeo, especialmente para produção industrial. Em especial na América Latina, as possíveis fontes de extração de galactomananas são pouco conhecidas, apesar da rica biodiversidade da flora local (AZERO; ANDRADE, 2002; CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009).

Em 2008, o Brasil apresentou um déficit em relação à demanda de galactomananas necessários à indústria, sendo que o país importou dos Estados Unidos US\$ 142.000 e exportou somente US\$68.000. Entre os anos de 2003 e 2007 foram importados mais de 10.000 toneladas de goma guar e alfarroba, o equivalente a valores superiores a 20 milhões de dólares (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009). Logo, observa-se uma deficiência na suplementação de galactomananas que possam atender a demanda do mercado brasileiro (MENEGUIN, 2012).

O Brasil apresenta fontes de espécies diversificadas para a extração de galactomananas a partir de sementes que poderiam suprir a demanda de importação deste polissacarídeo, além de incluir a melhoria do valor agregado pela utilização de sementes sem capacidade germinativa (VALENGA, 2007).

3.1.3 Galactomananas de plantas do gênero *Cassia*

O gênero *Cassia* apresenta o maior número de representantes na subfamília Caesalpinioideae, a qual corresponde à cerca de 200 gêneros e mais de 2250 espécies (LEWIS et al., 2005). As espécies desta subfamília são plantas leguminosas arbustivas, arbóreas ou trepadeiras das matas, raramente são ervas. Apresentam folhas compostas e frutos leguminosos e estão muito bem representadas no Brasil (JOLY, 1998).

Diversos estudos desenvolvidos com espécies do gênero *Cassia* confirmaram atividades larvicida (DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU; GABRIEL PAULRAJ, 2011), antimicrobiana (DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2007), antidiabética (DAISY et al., 2010; JALALPURE et al., 2004; LODHA et al., 2010), antifertilizante (CHAUHAN; AGARWAL, 2010), anticâncer (DURAIPANDIYAN et al., 2012), antioxidante (MANONMANI et al., 2005; VADIVEL; KUNYANGA; BIESALSKI, 2011; VADIVEL; NANDETY; BIESALSKI, 2011), laxativa (ABO et al., 2000; ELUOJOBA et al., 1999) entre outras, para extratos obtidos das suas flores, folhas, vagens e do caule.

As galactomananas obtidas por espécies de plantas deste gênero merecem importante

destaque devido às diversas aplicações às quais se destinam, tanto de forma isolada ou associadas a demais produtos, inclusive outras galactomananas. Por exemplo, o enorme interesse médico a cerca destes polissacarídeos está relacionado ao seu bom valor terapêutico na medicina popular (LODHA et al., 2010).

Algumas possíveis fontes de galactomananas foram identificadas em *Cassia alata*, *C. angustifolia*, *C. didymobotrya*, *C. grandis*, *C. nodosa*, *C. occidentalis*, *C. saemaea*, *C. hirsuta* e *C. spectabilis*, cujas sementes, geralmente de tamanho médio e contendo mais de 40% de endosperma, são consideradas, portanto, preferíveis para a exploração comercial (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

Mercê et al. (1998) avaliaram a estabilidade das galactomananas de *Cassia fastuosa* e *Leucaena leucocephala* complexadas com íons Cu^{2+} e verificaram que tais complexos são provavelmente extensamente afetados por variações de pH. Lucyszyn (2004), por sua vez, testou uma substituição parcial de ágar por galactomananas extraídas de *L. leucocephala* e *C. fastuosa*. Derivados oxidados e anfifílicos foram obtidos para galactomananas de sementes de *L. leucocephala* e então, juntamente com os derivados oxidados da galactomanana de *C. fastuosa*, foram aplicados para obtenção de filmes como suporte para adesão de albumina (SIERAKOWSKI et al., 2000). Germano (1996), por sua vez, analisou a atividade anticoagulante da galactomanana sulfatada de *C. fastuosa*.

Considerando os resultados acima mencionados nota-se que na maioria das pesquisas desenvolvidas com o gênero *Cassia*, a espécie *C. grandis* ainda é pouco explorada.

3.1.4 *Cassia grandis*

Cassia grandis é a maior espécie brasileira do gênero *Cassia*. O nome do gênero *Cassia* é hebraico ou grego e *grandis* significa grande, visto que sua vagem pode atingir 60 cm de comprimento. Pertence à Divisão Magnoliophyta (Angiospermae), à Classe Magnoliopsida (Dicotyledonae), à Ordem Fabales e à Família Caesalpiniaceae (Leguminosae: Caesalpinioideae). Trata-se de uma árvore caducifólia com 10 a 15 m de altura e podendo atingir dimensões próximas a 30m de altura na idade adulta. Apresenta fruto (legume) lenhoso indeiscente, cilíndrico, irregular, geralmente com 11 a 60 cm de comprimento e 36 a 50 mm de diâmetro, de duas suturas longitudinais e nervuras salientes e grossas, que ligam as suturas. Quebrando o pericarpo de seus frutos, aparecem os septos circulares que separam as sementes, e uma massa preta, pegajosa e adocicada. O fruto maduro é marrom-escuro externamente e contém muitas sementes com aspecto oval e bastante duras, aplainada de um lado e carinada do outro, brilhante, castanho-amarelo-claro,

com excisão no hilo de até 1 cm de comprimento (CARVALHO, 2003).

Figura 4 ã Flores e Fruto com sementes de *Cassia grandis*



FONTE: http://www.tramil.net/fototeca/imageDisplay.php?id_elem=112. Acessado em 12 de jan. 2013

Além do Brasil, *C. grandis* ocorre de forma natural no sul do México, Costa Rica, Honduras, Panamá, Porto Rico, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e na Venezuela (CARVALHO, 2003). Outros países e localidades em que pode ser encontrada são Trinidad e Tobago, Havaí, Jamaica e Cuba (CORREA; BERNAL, 1990), assim como na Índia, onde foi introduzida como uma árvore ornamental em jardins e avenidas, devido a sua sombra (JOSHI; KAPOOR, 2003). Segundo Carvalho (2003), *C. grandis* ocorre nos seguintes estados brasileiros: Amazonas, Amapá, Bahia, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Roraima, Sergipe e Tocantins.

Cassia grandis pode ser empregada na alimentação humana e animal, bem como para fins medicinais, ornamentais, veterinários, entre outros. Os frutos da *C. grandis*, por exemplo, geralmente são deixados no pasto (CARVALHO, 2003) e usados na forragem (BODOWSKI, 1984). Em relação ao consumo humano, o fruto não é totalmente aceito devido à polpa amarga e adstringente com cheiro forte de sarro (VIEIRA, 1992), porém, ainda assim, apresenta ampla distribuição na forma silvestre e em áreas campestres, além da possibilidade de comércio da espécie (BODOWSKI, 1984; CORREA; BERNAL, 1990; MUTCHNICK; MCCARTHY, 1997).

Segundo Santana et al. (2002), as sementes de *C. grandis* possuem um alto potencial de uso na elaboração de colares, brincos e cortinas, e Duarte (1978) sugere seu emprego na arborização urbana, em parques e estradas, indicando seu potencial agroflorestal principalmente recomendado para as zonas secas. Devido ao seu grande porte e ao peso e tamanho de seus frutos, no entanto, Brandão et al. (2002) sugerem que ela seja utilizada apenas em parques e grandes jardins.

A aplicação medicinal de *C. grandis* é sugerida contra vermes e parasitas intestinais (LENTZ et al., 1998), doenças gástricas (BHAMARAPRAVATI et al., 2003), sanguíneas (PARRA e SADIÑAS, 2000), respiratórias (FREI et al., 1998; HEINRICH, 1998), de pele (CÁCERES et al., 1991; SALINAS e GRIJALVA, 1994), dentre outras.

Joshi e Kapoor (2003) citam que as sementes contêm aproximadamente 50% de endosperma gomoso e possuem as características de se tornarem uma fonte em potencial de galactomanana, que é utilizada em larga escala para o consumo internacional. Algumas indústrias, tais como farmacêuticas, de minas e refinarias de petróleo, têxtil, de papel e cosmética utilizam essa matéria-prima por ser uma fonte barata, ecológica, não-tóxica e considerada GRAS (Geralmente Reconhecida como Segura).

3.2 Extração de polissacarídeos

Diferentes metodologias têm sido propostas para extração de galactomananas de sementes, principalmente no que se refere ao material extraído, ao solvente utilizado e ao tempo, à temperatura e o processo de inativação enzimática aplicados.

No entanto, Srivastava e Kapoor (2005) observaram que, para a produção comercial de galactomanana, a extração deste polissacarídeo a partir de arbustos e ervas perenes e anuais é preferível quando comparada com sementes de plantas da família Leguminosae, principalmente devido à facilidade de obtenção das galactomananas contidas em ervas e arbustos. A separação mecânica do endosperma das sementes é dificultada por parâmetros como forma e tamanho das sementes, os quais variam bastante entre as distintas espécies desta família e representam, portanto, um fator importante na exploração comercial de novas fontes do polissacarídeo.

O procedimento geral para obtenção de galactomananas provenientes de sementes combina processos de extração e purificação, os quais, na maioria dos estudos, não são especificados em detalhes ou mesmo citados. Resumidamente, a casca das sementes é removida e o germe é separado do endosperma através de procedimentos de separação, tais como: filtração, peneiração e, em alguns casos (em escala laboratorial, por exemplo), separação manual. O endosperma é dissolvido em água a uma faixa de temperatura que pode variar entre 20 e 120°C e, em seguida, precipitado com álcool numa proporção de água:álcool que pode variar entre 1:1 e 1:3. Não foram relatados efeitos do álcool sobre a estrutura das galactomananas (CERQUEIRA et al., 2009c; CERQUEIRA et al., 2011a; DAKIA et al., 2007; DAKIA et al., 2008; POLLARD et al., 2008).

Em relação à extração em escala industrial, a exemplo das extrações das galactomananas comerciais de sementes de alfarroba e goma guar, geralmente realiza-se a remoção da casca por

moagem da semente (DEA; MORRISON, 1975). Os polissacarídeos podem ser obtidos puros mediante extração aquosa após o endosperma ser separado do embrião. Esse processo pode ser realizado pela fervura das sementes em água ou álcool até que a separação manual dos componentes da semente seja possível (BUCKERIDGE; DIETRICH; LIMA, 2000).

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

Rayment et al. (1995) avaliaram propriedades reológicas da galactomanana de guar, obtida por extração aquosa a 34°C, sob agitação durante a noite, e obtiveram parâmetros físico-químicos de massa molecular e viscosidade semelhantes aos anteriormente relatados pela literatura. Cunha et al. (2007), por sua vez, purificaram a mesma galactomanana para aplicação biológica, utilizando quatro métodos: 1) tratamento com enzima proteolítica; 2) etapas sucessivas de dissolução, centrifugação e precipitação; 3) precipitação com solução de Fehling; 4) métodos 2 e 3, respectivamente. Os parâmetros avaliados foram rendimento, proteínas, contaminação por mono, oligo e polissacarídeos, cobre, turbidez, e parâmetros reológicos como energia de ativação do fluxo e temperatura inicial. Levando em conta a pureza, estabilidade térmica, propriedades reológicas da galactomanana e o custo e a simplicidade do procedimento, o método 2 pareceu ser o mais vantajoso para a aplicação proposta.

Em sementes como de fenogrego, o método de separação manual dos componentes da semente apresenta vantagem, pois nas células do endosperma há pouca quantidade de citoplasma após a maturação da semente e separá-lo do embrião é um importante passo de purificação (BUCKERIDGE; DIETRICH; LIMA, 2000). Brummer, Cui e Wang (2003) realizaram análises físico-químicas da extração aquosa fervente, por aproximadamente 2h, desta galactomanana, além de galactomananas de guar e alfarroba.

Smirnova et al. (2004) extraíram galactomanana de sementes de *Styphnolobium japonicum* (Sófora-do-Japão) a 25°C, purificada com complexo de Cu^{2+} , e a 70°C, e verificaram diferentes relações manose/galactose e distintos valores de massa molecular entre as extrações a quente e a frio.

Cerqueira et al. (2009c) descreveram a metodologia de extração com etanol e água e calcularam o rendimento de extração e purificação das galactomananas de *Adenantha pavonina*,

Caesalpinia pulcherrima, *Gleditsia triacanthos* e *Sophora japonica*, em 3 estágios: o primeiro rendimento expressa a massa do endosperma em relação à massa de sementes inteiras, o segundo, a massa do endosperma em relação à massa da extração etanólica do polissacarídeo após filtração e centrifugação do material e, por último, o rendimento total da extração e purificação. O melhor rendimento total foi obtido para *G. triacanthos* e *C. pulcherrima*, que apresentaram valores próximos a 25% e relações manose/galactose condizentes com a literatura (ANDRADE et al., 1999; SCIARINI et al., 2008) e semelhantes as galactomananas comerciais como alfarroba, indicando que a metodologia empregada pode ser extrapolada a outras galactomananas. Os resultados também mostraram que o processo de extração e purificação das galactomananas permitiram valores de pureza entre 80 e 98%, avaliados a partir do conteúdo total de monossacarídeos das amostras.

Pollard et al. (2010) avaliaram as condições necessárias para extrair polissacarídeos de endosperma de sementes de guar, fenogrego, alfarroba e tara em água; para isso, monitoraram as sementes durante 3 dias, ou durante imersão em água em ebulição ao longo de várias horas. Como as sementes diferiram com relação ao grau de inchaço, 3 métodos de extração foram utilizados: 1) inchaço à temperatura ambiente, 2) aquecimento a 95°C por 5min, seguido por inchaço à temperatura ambiente e 3) aquecimento a 95°C por longos períodos e retirada das sementes inchadas a cada 1 hora. Após separação mecânica dos endospermas, realizou-se tratamento com etanol e obtenção das galactomananas purificadas com rendimentos entre 23 e 60%. De maneira semelhante, Dakia et al. (2008) realizaram extração por 1 hora a 100°C de galactomananas de alfarroba e obtiveram rendimento de 56% a partir das sementes inteiras.

Bresolin et al. (1997) realizaram extrações aquosas de guapuruvu e bracinga por 4 horas a 25°C. Vianna-Filho (2009) e Ganter e Reicher (1999) realizaram extrações aquosas das mesmas galactomananas, por 1 hora a 25°C, incluindo um pré-tratamento de inativação enzimática com água fervente por 10 minutos. Noleto et al. (2009) realizaram extrações de galactomananas de sementes de bracinga por dois procedimentos diferentes: A) extração aquosa por 1 hora com inativação enzimática através de água fervente por 10 minutos e B) extração aquosa por 5 horas sem inativação enzimática. Os autores verificaram que os diferentes processos resultaram em variações de massa molecular ponderal média e índice de polidispersão.

Extrações aquosas a 4, 25 e 60°C de galactomananas de barbatimão foram realizadas por Ganter et al. (1995) e Reicher et al. (1992). As metodologias de extração variando a temperatura resultaram em diferentes relações manose/galactose, valores de massa molecular e viscosidade intrínseca para os polissacarídeos analisados. Resultados diversificados de rendimento empregando um mesmo método de extração são consequência da análise de diferentes espécies, mesmo que apresentem relações manose/galactose semelhantes (DA SILVA; GONÇALVES, 1990;

FERNANDES, 1994).

A maior parte dos estudos envolvendo extração de galactomananas inclui, além do cálculo dos rendimentos de extração e de galactomanana solúvel em água, a caracterização de suas propriedades físico-químicas. Os parâmetros mais importantes que são utilizados na definição da natureza de uma galactomanana são: razão manose/galactose, peso molecular médio, estrutura fina e viscosidade intrínseca (CERQUEIRA et al., 2011a). O teor de monossacarídeos e a razão manose/galactose geralmente são determinados por cromatografia gasosa ou por cromatografia de troca iônica de alta pressão, após hidrólise ácida total ou parcial da galactomanana. O peso molecular pode ser determinado por cromatografia de exclusão por tamanho. A distribuição de galactose ao longo da cadeia de manana pode ser caracterizada por espectroscopia RMN ^{13}C ou por métodos enzimáticos capazes de degradar as regiões não substituídas de galactomanana (CERQUEIRA et al., 2009c; CUNHA et al., 2009; DAKIA et al., 2008; VENDRUSCOLO et al., 2009). A viscosidade intrínseca, por sua vez, pode ser determinada usando um viscosímetro capilar, aplicando as equações de Huggins e Kramer (CERQUEIRA et al., 2009c; SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005).

Quando tais parâmetros já foram relatados na literatura para determinada galactomanana, a confirmação da estrutura polissacarídica, associada a análises reológicas, desponta com importância na caracterização de soluções de galactomanana, uma vez que estas são frequentemente usadas para modificar atributos de textura (MARCOTTE et al., 2001; CERQUEIRA et al., 2011a). Tal caracterização reológica pode ser realizada através de cisalhamento (em condições estáveis e dinâmicas) e por reologia extensional (BOURBON et al., 2010).

3.3 Processos de Caracterização de polissacarídeos

3.3.1 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier

Uma das técnicas mais úteis para a identificação de estruturas polissacarídicas é a espectroscopia de infravermelho, que se baseia na análise de picos de absorção de determinados comprimentos de onda, expressos em cm^{-1} (GÓMEZ-ORDÓÑEZ e RUPÉREZ, 2011). Apresenta duas vantagens principais: requer pequenas quantidades de amostra (miligramas) e é um método não-agressivo com exatidão confiável (PEREIRA et al., 2003), no entanto, a técnica convencional necessita de procedimentos técnicos laboriosos para obter espectros com uma boa relação sinal/ruído (CHOPIN; WHALEN, 1993). Esta limitação foi superada com o desenvolvimento de técnicas de infravermelho interferométricas, associadas ao algoritmo transformado de Fourier,

dando origem à espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (PEREIRA et al., 2009).

Na análise estrutural de polissacarídeos (MATHLOUTHI E KOENIG, 1987), cinco regiões podem ser distinguidas no espectro normal (entre 4000 e 650 cm^{-1}):

- (1) Região de estiramentos OH e CH, entre 3600 e 2800 cm^{-1} ;
- (2) Região de simetria local, entre 1500 e 1200 cm^{-1} ;
- (3) Região de estiramentos CO, entre 1200 e 950 cm^{-1} ;
- (4) Impressão digital ou região anomérica, entre 950 e 700 cm^{-1} ;
- (5) Região esquelética, abaixo de 700 cm^{-1} .

Dessa forma, informações sobre composição e estrutura podem ser obtidos a partir do FTIR, para caracterização de polissacarídeos. As bandas de absorção da espectroscopia de infravermelho a aproximadamente 3400, 2900, 1250, 1200, 1190, 1150, 1130, 1100, 980, 870, 850, 840, 815 e 800 cm^{-1} são utilizadas para obter informações sobre a estrutura de polissacarídeos do tipo galactomanana (FIGUEIRÓ et al, 2004; PRASHANTH et al, 2006; YUEN et al., 2009; SMITH; KENNEDY; HIGGINBOTHAM, 2010; CERQUEIRA et al., 2011b; PENG et al., 2012).

3.3.2 Difração de Raios X

A técnica de difração de raios-X (DRX) é um método preciso e eficiente, largamente empregado em pesquisa científica e tecnológica, particularmente, para ensaios não-destrutivos em aplicações industriais. Na atualidade, é a única técnica para a caracterização microestrutural precisa de estruturas cristalinas e amorfas, mesmo para o caso de estruturas inorgânicas complexas, como é o caso de proteínas e vírus, e em outras áreas, tais como, na visualização direta de imperfeições de planos atômicos, na quantificação em tempo real da dinâmica de fenômenos de transformações de fases, crescimento de cristais, geração de defeitos, processos e mecanismos de precipitação e difusão, entre outros. O princípio do método baseia-se no espalhamento elástico dos raios X ao atingirem um material, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo, o que quer dizer que após a colisão com o elétron, o fóton de raios X muda sua trajetória mantendo, porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Se os átomos que geram este espalhamento estiverem arrançados de maneira simétrica, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas a do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que os efeitos de difração dos raios X podem ser observados em vários ângulos (KAHN, 2012).

A medida da direção de espalhamento dos feixes difratados permite a determinação de propriedades fundamentais de materiais no estado cristalino, bem como das propriedades da

unidade celular do cristal e sua simetria (CULLITY, 1967).

Atualmente, a principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de estruturas cristalinas poliméricas, a exemplo dos polissacarídeos, capazes de interagir naturalmente com a água e induzir transições estruturais, relacionadas a transições amorfo-cristalinas (MARTINS et al., 2012). O índice de cristalinidade do polissacarídeo, por sua vez, é medido como a porcentagem de cristalinidade do polímero e está relacionado ao alinhamento das moléculas na estrutura da partícula (MUDGIL et al., 2012).

3.3.3 Reologia aplicada à análise de polissacarídeos

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões (BARNES et al., 1989). Dentro deste contexto, os materiais podem ser definidos como sólidos ou líquidos. SCHRAMM (2006) define como sólidos ideais aqueles que se deformam elasticamente, ou seja, a energia necessária para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida. Conforme o mesmo autor, fluidos ideais são aqueles que se deformam irreversivelmente, pois fluem sob ação de uma tensão. A energia requerida neste processo é dissipada em forma de calor e não é recuperada quando a tensão é retirada.

O tipo mais comum de deformação dos fluidos é por cisalhamento simples, que gera um escoamento caracterizado pelo movimento relativo das moléculas do fluido devido à ação de uma força externa. Uma das principais propriedades medidas na deformação de fluidos é a viscosidade, que assim como o módulo elástico (para sólidos) é um fator determinante para o uso e aplicações dos materiais fluidos. Além de ser uma medida direta da qualidade do fluido em serviço, a viscosidade pode fornecer importantes informações sobre variações estruturais que ocorrem durante a aplicação de uma deformação ou tensão. A viscosidade, portanto, pode ser definida como a resistência ao movimento do fluir de um material (BARRA, 2012).

Nesse contexto, a discussão dos conceitos de tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento torna-se importante para o entendimento dos conceitos físico e matemático da viscosidade. A tensão de cisalhamento é caracterizada como a força aplicada por unidade de área cisalhante, necessária para manter o escoamento do fluido (Equação 1), enquanto a taxa de cisalhamento está relacionada ao deslocamento relativo das moléculas do fluido (Equação 2).

$$\tau = F/A \quad (1)$$

Onde: τ é a tensão de cisalhamento; F é a força necessária para o fluido escoar e A, a área exposta ao cisalhamento.

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{y} = \frac{\Delta y}{\Delta t} \quad (2)$$

Onde: $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento; v é a variação da velocidade entre as moléculas do fluido; y é a distância entre as moléculas e Δy , a variação da deformação em função do tempo.

A Lei de Newton para a viscosidade se restringe para um determinado número de fluidos, entretanto, existem materiais que, sob escoamento dirigido por cisalhamento, apresentam comportamento distinto do previsto por Newton. Em alguns fluidos, a viscosidade depende do cisalhamento aplicado ou do tempo de sua aplicação, ocasião em que deixa de ser uma propriedade constante para se tornar dependente das condições em que o fluido é deformado e quando, então, passa a ser denominada viscosidade aparente (BARRA, 2012).

Fluidos com esse comportamento são denominados de não newtonianos e podem ser classificados em pseudoplásticos, dilatantes e plásticos (SCHRAMM, 2006), isto é:

1- Fluidos pseudoplásticos: apresentam uma diminuição na viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta. Isso ocorre porque, no repouso, as partículas e/ou as cadeias poliméricas que compõem o líquido encontram-se desorientadas, entrelaçadas ou enoveladas, mantendo uma ordem interna irregular que gera uma alta viscosidade. Com o aumento das taxas de cisalhamento, as partículas se orientam em direção ao fluxo e as moléculas poliméricas se desenovelam ou se desagregam e se alinham em direção ao fluxo, isso permite uma maior facilidade de escoamento, apresentando, assim, uma diminuição da viscosidade (SCHRAMM, 2006). Este tipo de comportamento é observado na maioria das soluções concentradas de polissacarídeos.

2- Fluidos dilatantes: apresentam comportamento inverso aos pseudoplásticos, ou seja, apresentam aumento de viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta (SCHRAMM, 2006).

3- Fluidos plásticos: neste tipo de fluido é necessária a aplicação de uma tensão inicial mínima, que provoque uma ruptura na sua estrutura, para que o material comece a fluir e perder a viscosidade de maneira dependente da taxa de cisalhamento. O sistema apresenta ligações intermoleculares que formam uma rede e o caracterizam como sólido até que a força externa aplicada seja superior àquela que mantém esta rede, quando se observa um ponto de ruptura do gel (SCHRAMM, 2006).

Os fluidos não-newtonianos mencionados acima podem apresentar comportamento reológico dependente do tempo, sendo caracterizados como tixotrópicos ou reopéticos. Quando aplica-se uma tensão aos fluidos tixotrópicos, ocorre um decréscimo na viscosidade aparente, que tende a retornar à condição inicial apenas após um tempo de repouso. Em contrapartida, os fluidos reopéticos apresentam um acréscimo na viscosidade aparente com o tempo de aplicação da tensão e

a viscosidade inicial tende a ser recuperada apenas após o repouso (TONELI; MURR; PARK, 2005).

Ostwald observou que fluidos não-newtonianos apresentavam uma relação não linear entre a tensão de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$). e, desta maneira, propôs um modelo que pode ser descrito matematicamente (Equação 3) e que caracteriza os fluidos dentro da Lei das Potências (BARRA, 2012).

$$\dot{\gamma} = \tau_a^n \quad (3)$$

Onde: τ_a é a viscosidade aparente e n é o índice da Lei das Potências. Para $n > 1$, o fluido é dilatante, para $n = 1$ o fluido é Newtoniano e para $n < 1$ o fluido é pseudoplástico

Portanto, na reologia de sólidos, a propriedade de maior interesse é a elasticidade, enquanto que em líquidos a viscosidade é a propriedade mais importante (TONELI; MURR; PARK, 2005). Entre os dois comportamentos extremos existem os materiais que se comportam ora como líquidos ora como sólidos, dependendo da tensão, da frequência ou da temperatura a que são expostos. Estes materiais são denominados de viscoelásticos (BARNES et al., 1989).

Os experimentos reológicos dinâmicos se utilizam de tensões oscilatórias para analisar a viscosidade e a elasticidade das amostras, permitindo a avaliação do comportamento sólido ou líquido dos fluidos através dos valores de G' (módulo de armazenamento ou elástico) e G'' (módulo de perda ou viscoso). Ambos são expressos em Pascal (Pa) e compõem o módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total à deformação (NAÉ, 1993). A maioria dos polissacarídeos não podem ser considerados puramente elásticos ($G'' = 0$ e $G' = G^*$) ou puramente viscosos ($G' = 0$ e $G'' = G^*$), pois geralmente apresentam ambos os componentes G' e G'' (SCHRAMM, 2006).

Nesse contexto, é importante identificar a região de comportamento viscoelástico linear, isto é, as condições nas quais existe uma relação linear entre a deformação sofrida e a tensão imposta ao material. A região de viscoelasticidade linear é limitada para a faixa de amplitude para qual G^* é constante, garantindo que a amostra não seja deformada para o ponto em que a ligação interna temporária da molécula ou dos agregados seja destruída, e a maior parte da energia introduzida é irreversivelmente perdida como calor (FERRY, 1980).

Polímeros que apresentam características de materiais viscoelásticos são importante objeto de estudo no campo da reologia, uma vez que estes podem ser aplicados em diferentes ramos da indústria, como a farmacêutica, alimentícia, cosmética, de adesivos, tintas, entre outras (LAPASIL; PRICL, 1995; MARTIN, 2003). A manifestação de suas diversas propriedades envolve diferentes

mecanismos de associação entre cadeias, as quais dependem das características individuais de cada polímero, sendo assim, géis e soluções de diferentes polímeros apresentarão formas e texturas diferentes, podendo ser aplicados em diferentes tipos de indústrias (TONELI; MURR; PARK, 2005; TOSIN, 2008).

Dentre os polímeros industrialmente mais utilizados, destacam-se os polissacarídeos, a exemplo dos comercialmente comuns amido, pectina, carragenana, agar e alginato, além dos polissacarídeos microbianos (como a goma xantana) e das gomas de origem vegetal (mucilagens de sementes e gomas de exsudatos). Os estudos reológicos de gomas polissacarídicas em soluções aquosas são úteis para compreender tanto a estrutura quanto a funcionalidade do polissacarídeo (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005). As soluções de galactomanana geralmente exibem um comportamento não-newtoniano, em que a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (GARTI et al., 1997). O interesse neste trabalho está na reologia de soluções aquosas de galactomanana, obtida a partir das sementes de *Cassia grandis*.

4. Referências Bibliográficas

- ABO, K.A.; ADEYEMI, A.A.; JEGEDE, I.A. Spectrophotometric estimation of anthraquinone content and antimicrobial potential of extracts of some *Cassia* species used in herbal medicine in Ibadan. **Science Forum**, 3:57-63, 2000.
- ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 52, 191-195, 2001.
- AMARAL, J. **Estudo reológico da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa***. 1998. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998.
- ANDRADE, C. T., AZERO, E. G., LUCIANO, L., & GONCALVES, M. P. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: Comparison with locust bean gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, 26, 181-185, 1999.
- ASPINALL, G.O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, 14, 429-468, 1959.
- AZERO, E. G.; ANDRADE, C. T. Testing produces for galactomannan purification. **Polymer testing**, 21, 551-556, 2002.
- BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- BARRA, G. **Fundamentos da Reologia de Materiais Poliméricos**. Apostila de processos 4. EMC 5744. Disponível em: <<http://emc5744.barra.prof.ufsc.br/Reologia%20parte%201.pdf>>. Acesso em 01 de fevereiro de 2012.
- BARRET, B. Medicinal plants of Nicaragua's Atlantic Coast. **Economic Botany**, 48(1), 8-20, 1994.
- BEHR, S.H.; MUSTAD, V.A.; WALTER, D.; BLOCH, T.D. Cholesterol-lowering effect of food bars containing guar gum in healthy women and men. **Journal of the American Dietetic Association**. Poster Section: Medical Nutrition Therapy, 1998.
- BHAMARAPRAVATI, S.; PENDLAND, S.L.; MAHADY, G.B. Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. **In Vivo**, 17(6), 541-544, 2003.
- BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; MAIA, J.M.; TEIXEIRA,

- J.A., et al. Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: comparison with guar gum and locust bean gum. **Food Hydrocolloids**, 24(2-3), 184-192, 2010.
- BRANDÃO, M.; LACA-BUENDIA, J.P.; MACEDO, J.F. **Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2002. 528p.
- BRESOLIN, T. M. B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, 33, 131-138, 1997.
- BRESOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, 26, 225-231, 1999.
- BRUMMER, Y; CUI, W.; WANG, Q. Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. **Food hydrocolloids**, 17, 229-236, 2003.
- BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C.; LIMA, D.U. Galactomannans as the reserve carbohydrate in legume seeds. In: GUPTA, A.K.; NAUR, N. **Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation**, São Paulo: Elsevier Science B. V., 283-316, 2000.
- BUCKERIDGE, M.S.; PANEGASSI, V.R.; ROCHA, D.C.; DIETRICH, S.M.C. Seed galactomannan in the classification and evolution of the leguminosae. **Phytochemistry**, 38(4), 871-875, 1995.
- BUDOWSKI, G.; KASS, D.C.L.; RUSSO, R.O. Leguminous trees for shade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 19, 205-222, 1984.
- CÁCERES, A.; LÓPEZ, B.; JUÁREZ, X.; AGUILA J. del.; GARCÍA, S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 40, 207-213, 1993.
- CANO, J.H.; VOLPATO, G. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. **Journal of Ethnopharmacology**, 90, 293-316, 2004.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1. 1039p.
- CERQUEIRA, M.A.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; MARTINS, J.T.; SOUZA, B.W.S.; TEIXEIRA, J.A.; VICENTE, A.A.. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, 22, 662-671, 2011a.
- CERQUEIRA, M.A.; LIMA, A.M.; SOUZA, B.W.S.; TEIXEIRA, J.A.; MOREIRA, R.A.; VICENTE, A.A. Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of**

- Agricultural and Food Chemistry**, 57(4), 1456-1462, 2009a.
- CERQUEIRA, M.A.; LIMA, A.M.; TEIXEIRA, J.A.; MOREIRA, R.A.; VICENTE, A.A. Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. **Journal of Food Engineering**, 94, 372-378, 2009b.
- CERQUEIRA, M.A.; PINHEIRO, A.C.; SOUZA, B.W.S.; LIMA, A.M.P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J.A.; MOREIRA, R.A.; COIMBRA, M.A.; GONÇALVES, M.P.; VICENTE, A.A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, 75, 408-414, 2009c.
- CERQUEIRA, M.A.; SOUZA, B.W.S.; SIMÕES, J.; TEIXEIRA, J.A.; ROSÁRIO, M.; DOMINGUES, M.; COIMBRA, M.A.; VICENTE, A.A. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, 83, 179-185, 2011b.
- CHAUHAN, A.; AGARWAL, M. Evaluating the antifertility potential of an aqueous extract from Cassia fistula seeds in male rats. **Fertility and Sterility**, 93(5), 1706-1710, 2010.
- CHOPIN, T.; WHALEN, E. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydrate Research**, 246, 51-59, 1993.
- COMBA, S.; SETHI, R. Stabilization of highly concentrated suspensions of iron nanoparticles using shear-thinning gels of xanthan gum. **Water Research**, 43(15), 3717-3726, 2009.
- CORREA, J.E.; BERNAL, H.Y. **Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello**. Bogotá: Guadalupe, 1990. 485p.
- CULLITY, B.D. **Elements of X-ray diffraction**. 2 ed. Addison-Wesley Publishing Company, INC., 1978, 555p.
- CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A.; Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quim. Nova**, 32(3), 649-660, 2009.
- CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M. de.; FEITOSA, J.P.A. Purification of guar gum for biological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 41, 324-331, 2007.
- CUNHA, P.L.R.; VIEIRA, I.G.P.; ARRIAGA, A.M.C.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, 23(2), 880-885, 2009.
- DA SILVA, J.A.L.; GONÇALVES, M.P. Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. **Food Hydrocolloids**, 4, 277-287, 1990.
- DAISY, P.; BALASUBRAMANIAN, K.; RAJALAKSHMI, M.; ELIZA, J.; SELVARAJ, J. Insulin

- mimetic impact of Catechin isolated from *Cassia fistula* on the glucose oxidation and molecular mechanisms of glucose uptake on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats Original Research Article. **Phytomedicine**, 17(1), 28-36, 2010.
- DAKIA, P.A.; BLECKER, C.; ROBERTA, C.; WATHELETA, B.; PAQUOTA, M. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. **Food Hydrocolloids**, 22, 807-818, 2008.
- DAKIA, P.A.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. **Food chemistry**, 102, 1368-1374, 2007.
- DEA, I.C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry**, 31, 241-312. 1975.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; BALLENGER, J.A.; DICKSON, E.E.; KAJITA T. A. Phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. **American Journal of Botany**, 84, 541-554, 1997.
- DOYLE, J.P.; GIANNOULI, P.; MARTIN, E.J.; BROOKS, M.; MORRIS, E.R. Effect of sugars, galactose content and chainlength on freeze-thaw gelation of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, 64, 391-401, 2006.
- DUARTE, A.P. Contribuição ao conhecimento da germinação de algumas essências florestais. **Rodriguésia**, 30, 56, 1979.
- DURAIPANDIYAN, V.; ALBERT BASKAR, A.; IGNACIMUTHU, S.; MUTHUKUMAR, C.; AL-HARBI, N.A. Anticancer activity of Rhein isolated from *Cassia fistula* L. flower. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 2(1), 2012.
- DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, 112(3), 590-594, 2007.
- DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S.; GABRIEL PAULRAJ, M. Antifeedant and larvicidal activities of Rhein isolated from the flowers of *Cassia fistula* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 18(2), 129-133, 2011.
- ELLIS, P.R.; DAWOUD, F.M.; MORRIS, E.R.; Blood glucose, plasma insulin and sensory responses to guar containing wheat breads: effects of molecular weight and particle size of guar gum. **British Journal of Nutrition**, 66, 363-379, 1991.
- ELUOJOBA, A.A.; ABERE, A.T.; ADELUSI, S.A. Laxative activities of Cassia pods sourced from Nigeria. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, 3, 51-53, 1999.
- ENGLER, A. **Syllabus der Pflanzenfamilien**. Berlin: Gerbruder Borntraeger, 1964, 193p.
- FERNANDES, P.B. Determination of the physical functionality of galactomannans in xanthan gum/galactomannan mixed systems by periodate oxidation. **Food Control**, 5, 244-248, 1994.

- FERNANDES, P.B.; GONCALVES, M.P.; DOUBLIER, J.L. A rheological characterization of Kappa-carrageenan/galactomannan mixed gels: A comparison of locust bean gum samples. **Carbohydrate Polymers**, 16, 253-274, 1991.
- FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. New York: John Wiley and Sons Inc., 1980.
- FIGUEIREDO, A. A. Extração, identificação e características do polissacarídeo da semente de algaroba (*Prosopis juliflora* DC). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 3(1), 82-89, 1983.
- FIGUEIRÓ, S.D.; GÓES, J.C.; MOREIRA, R.A.; SOMBRA, A.S.B. On the physicochemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan-collagen films. **Carbohydrate Polymers**, 56, 313-320, 2004.
- FREI, B.; BALTISBERGER, M.; STICHER, O.; HEINRICH, M. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous uses. **Journal of Ethnopharmacology**, 62, 149-165, 1998.
- FUNAMI, T.; KATAOKA, Y.; NODA, S.; HIROE, M.; ISHIHARA, S.; ASAI, I.; TAKAHASHI, R.; NISHINARI, K. Functions of fenugreek gum with various molecular weights on the gelatinization and retrogradation behaviors of corn starch: 1: Characterizations of fenugreek gum and investigations of corn starch/fenugreek gum composite system at a relatively high starch concentration; 15 w/v%. **Food Hydrocolloids**, 22, 763, 2008.
- GANTER, J.L.M.S. **Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga)**. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1988.
- GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C. L. O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 17, 13-19, 1995.
- GANTER, J.L.M.S.; MILAS, M.; CORRÊA, J.B.C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydrate Polymers**, 17, 171-175, 1992.
- GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Mimosaceae* spp. **Bioresearch Technology**, 68(1), 55-62, 1999.
- GARTI, N.; MADAR, Z.; ASERIN, A.; STERNHEIM, B. Fenugreek Galactomannans as Food Emulsifiers. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol**, 30, 305-311, 1997.
- GANTER, J.L.M.S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; REICHER, F. Structural studies on galactomannans from brazilian seeds. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, 12(6), 753-767, 1993.

- GERMANO, S. **Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* Willd e *Mimosa scabrella* Bethan.** 1996. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1996.
- GIDLEY, M.J.; REID, J.S.G. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. **Food polysaccharides and their applications.** 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- GÓMEZ-ORDÓÑEZ, EV.; RUPÉREZ, P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, 25, 1514-1520, 2011.
- GONÇALVES, M.P.; GOMES, C.; LANGDON, M.J.; VIEBKE, C.; WILLIAMS, P.A. Studies on k-carrageenan/locust bean gum mixtures in the presence of sodium chloride and sodium iodide. **Biopolymers**, 41(6), 657-671, 1997.
- GOYCOOLEA, F.M.; MORRIS, E.R.; GIDLEY, M.J. Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of hyperentanglement in solution. **Carbohydrate Polymers**, 27, 69-71, 1995.
- HEGNAUER, R.; GRAYER-BARKMEUER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**, 34(1), 3-16, 1993.
- HEINRICH, M.; ANKLI, A.; FREI, B.; WEIMANN, C.; STICHER, O. Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. **Social Science & Medicine**, 47(11), 1859-1871, 1998.
- JALALPURE, S.S.; PATIL, M.B.; ARUNA, P.; SHAH, B.N.; SALAHUDDIN, M.D. Antidiabetic activity of *Cassia auriculata* seeds in alloxan induced diabetic rats. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, 8, 22-23, 2004.
- JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal.** São Paulo: Companhia Editorial nacional, 1998, 777p.
- JOSHI, H.; KAPOOR, V.P. *Cassia grandis* Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. **Carbohydrate Research**, 338, 1907-1912, 2003.
- KAHN, H. **Difração de Raios X.** Disponível em: <http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_2_DIFRACAO.pdf>. Acesso em 19 dez. 2012.
- LAPASIN, R.; TONELI, J. T. C. de L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 7, 181-204, 2005.
- LENTZ, D.L.; CLARK, A.M.; HUFFORD, C.D.; MEURER-GRIMES, B.; PASSREITER, C.M.; CORDERO, J.; IBRAHIMI, O.; OKUNADE, A.L. Antimicrobial properties of Honduran

- medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 63, 253-256, 1998.
- LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. **The Royal Botanic Gardens**. Kew, p. 577, 2005.
- LIMA, D.U.; OLIVEIRA, R.C.; BUCKERIDGE, M.S. Seed storage hemicelluloses as wet-end additives in paper making. **Carbohydrate Polymers**, 52, 367-373, 2003.
- LIMA, M.M.S.; ONO, L.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. Natural and sulphated polysaccharides from *Caesalpinaceae* seeds. **Latin American Applied Research**, 26, 1-3, 1996.
- LODHA, S.R.; JOSHI, S.V.; VYAS, B.A.; UPADHYE, M.C.; KIRVE, M.S.; SALUNKE, S.S.; KADU, S.K.; ROGYE, M.V. Assessment of the antidiabetic potential of *Cassia grandis* using an *in vivo* model. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, 1(3), 330-333, 2010.
- LUCYSZYN, N.; HOMMA, M.M.; QUORIN, M.; SIERAKOWSKI, M-R. Blend agar/galactomannan ñ gelled medium in shoot proliferation of the pear. In: **XXXIII 69 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Programa e Resumos. Caxambu: 2004. CD-ROM.
- LUCYSZYN, N.; QUORIN, M.; RIBAS, L. F.; KOEHLER, H. S.; REICHER, F., SIERAKOWSKI, M-R. Micropropagation of *Durondeau* pear in modified ñ gelled medium. **In Vitro Cellular & Developmental Biology ñ Plant**, 42, 287-290. 2006.
- MANONMANI, G.; BHAVAPRIYAA, V.; KALPANAA, S.; GOVINDASAMYA, S.; APPARANANTHAMB, T. Antioxidant activity of *Cassia fistula* (Linn.) flowers in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 97, 39-42, 2005.
- MARCOTTE, M.; TAHERIAN, A.R.; TRIGUI, M.; RAMASWAMY, H.S. Evaluation of rheological characteristics of salt-enriched hydrocolloids in the context of ohmic heating. **Journal of Food Engineering**, 48(2), 157-167, 2001.
- MARTIN, S. **Galactoxiloglucana de sementes de *Hymenaea courbaril*: Estrutura e Propriedades**. Tese (Doutorado em Ciências ñ Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- MARTINS, J.T.; CERQUEIRA, M.A.; BOURBON, A.I.; PINHEIRO, A.C.; SOUZA B.W.S.; VICENTE, A.A. Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. **Food Hydrocolloids**, 29, 280-289, 2012.
- MATHLOUTHI, M.; KOENIG, J.L. Vibrational spectra of carbohydrates. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, 44, 82-89, 1987.

- MCCLEARY, B.V.; AMADO, R.; WAIBEL, R.; NEUKOM, H. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydrate Research**, 92, 269-285, 1981.
- MENEGUIN, R.G. **Géis de ágar /galactomanana de *schizolobium parahybae* ((vell.) blake) (guapuruvu): análises reológicas e por microscopia eletrônica de varredura**. 2012. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciências ã Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- MERCÊ, A. L.R.; LOMBARDI, S.C.; MANGRICH,A.S.; REICHER, F.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M-R. Equilibrium studies of galactomannan of *Cássia fastuosa* and *Leucaena leucocephala* and Cu²⁺ using potentiometry and EPR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, 35, 13-20, 1998.
- MIKKONEN, K.S.; RITA, H.; HELEN, H.; TALJA, R.A., HYVÖNEN, L.; TENKANEN, M. Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based ýlms. **Biomacromolecules**, 8, 3198-3205, 2007.
- MOLLEA, C.; CHIAMPO, F.; CONTI, R. Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. **Food Chemistry**, 107(3), 1353ñ1356, 2008.
- MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B.S. (2011). Effect of enzymatic depolymerization on physicochemical and rheological properties of guar gum. **Carbohydrate Polymers**, 90, 224ñ228, 2012.
- MUTCHNICK, P.A.; MCCARTHY, B.C. An ethnobotanical analysis of the three species commom to the subtropical moist forests of the Petén, Guatemala. **Economic Botany**, 51(2), 158-183, 1997.
- NAÉ, H. N. Indroction of rheology. In: **Rheological properties of cosmetics and toiletries**. Ed: LABA, D. New York: Maecel Dekker, 9-33,1993.
- NEWMAN, R.H.; HEMMINGSON, J.A. Interactions between locust bean gum and cellulose characterized by ¹³C n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, 36, 167-172, 1998.
- NOLETO, G.R.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÊ, A.L.R.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S.C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): complexation with oxovanadium(IV/V) and cytotoxicity on HeLa Cells. **Journal of Inorganic Biochemistr**, 103(5), 749-757, 2009.
- ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I.M.; COIMBRA, T.L.M.; GORIN, P.A.J.; SIERAKOWSKI, M.R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, 60, 201-208, 2003.

- PARRA, A.L.; SARDIÑAS, M.I.G. Toxicidad aguda oral de 3 formas farmacéuticas a partir de *Cassia grandis* L. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Departamento de Investigaciones Biológicas. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, 5(2), 68-70, 2000.
- PENG, Z.; LIU, M.; FANG, Z.; WU, J.; ZHANG, Q. Composition and cytotoxicity of a novel polysaccharide from brown alga (*Laminaria japonica*). **Carbohydrate Polymers**, 89, 1022ñ1026, 2012.
- PEREIRA, L.; AMADO, A.M.; CRITCHLEY, A.T.; VAN DE VELDE, F.; RIBEIRO-CLARO, P.J.A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). **Food Hydrocolloids**, 23(7), 1903-1909, 2009.
- PEREIRA, L.; SOUSA, A.; COELHO, H.; AMADO, A.M.; RIBEIRO-CLARO, P.J.A. Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, 20(4 e 6), 223-228, 2003.
- PEREIRA-NETTO, A. B.; MENEGUIN, R. G.; BIZ, A.; SILVEIRA, J. L. M. A galactomannan driven enhancement of the in vitro multiplication rate for the maubakaido apple rootstock (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh) is not related to the polysaccharide degradation. **Applied Biochemistry Biotechnology**, 2012.
- PETKOWICZ, C.L.O.; REICHER, F.; MAZEAU, K. Conformational analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. **Carbohydrate Polymers**, 37, 25ñ39, 1998.
- PINHEIRO, A.C.; BOURBON, A.I.; ROCHA, C.; RIBEIRO, C.; MAIA, J.M.; GONÇALVES, M.P., et al. Rheological characterization of [kappa]-carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, 83(2), 392-399, 2011.
- PIRES, L.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. An active heparinoid obtained by sulphation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**, 46, 165-169, 2001.
- POLLARD, M.A.; EDER, B.; FISCHER, P.; WINDHAB, E.J. Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinioideae and Faboideae subfamilies by multidetection aqueous SEC. **Carbohydrate Polymers**. 79, 70-84, 2010.
- POLLARD, M.A.; KELLY, R.; FISCHER, P.A.; WINDHAB, E.J.; EDER, B.; AMADÒ, R. Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples. **Food Hydrocolloids**, 22, 1596-1606, 2008.
- PRASHANTH, M.R.S.; PARVATHY, K.S.; SUSHEELAMMA, N.S.; PRASHANTH, K.V.H.;

- THARANATHAN, R.N.; CHA, A.; ANILKUMAR, G. Galactomannan esters: A simple, cost-effective method of preparation and characterization. **Food Hydrocolloids**, 20(8), 1198-1205, 2006.
- RAYMENT, P.; ROSS-MURPHY, S.B.; ELLIS, P.R. Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures. I. Steady shear measurements. **Carbohydrate Polymers**, 28(2), 121-130, 1995.
- RECHIA-VARGAS, C. G. Polysaccharides from the seed of *Senna multijuga*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 17(6), 409-412, 1995.
- REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.-R.; FONTANA, J.D.; CORREA, J.B. Properties of the seed gum of *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 34/35, 342-357, 1992.
- REICHER, F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; FONTANA, J.D.; CORRÊA, J.B.C. Seed gum of *Stryphnodendron barbatiman*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 28, 353-361, 1991.
- REID, J.S.G.; EDWARDS, M.E. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: STEPHEN, A.M. **Food Polysaccharides and Their Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 155-186.
- ROSA, I.G.; SOUZA, N.S.; SANTANA, A.A.; LIMA, H.S. Extração e caracterização físico-química dos polissacarídeos de *Leucaena leucocephala* (Lam.) DE Wit. **Pesquisa em Foco**, 17(1), 22-30, 2009.
- SALINAS, B.E.; GRIJALVA, A. Diagnóstico de Nicarágua. In: Ocampo, R.A. (ed.). **Domesticación de plantas medicinales em Centroamérica**. Turrialba: CATIE/OEA, 1994. 135p.
- SALVALAGGIO, M.O. **galactomananas de sementes de espécies brasileiras: otimização da extração, caracterização físico-química e por espalhamento de luz**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.
- SANFORD, P.A.; BAIRD, J.; Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. **The polysaccharides vol. 1**, New York: Academic Press, 1983. p. 411-490.
- SANTANA, R.; MONTAGNINI, F.; LOUMAN, B.; VILLALOBOS, R.; GOMEZ, M. Secondary forest products from Southern Nicarágua with potential for their use in Masaya crafts. **Revista Florestal Centroamericana**, 38, 85-90, 2002.
- SCHIERMEIER, S.; SCHMIDT, P.C. Fast dispersible ibuprofen tablets. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 15, 295-305, 2002.

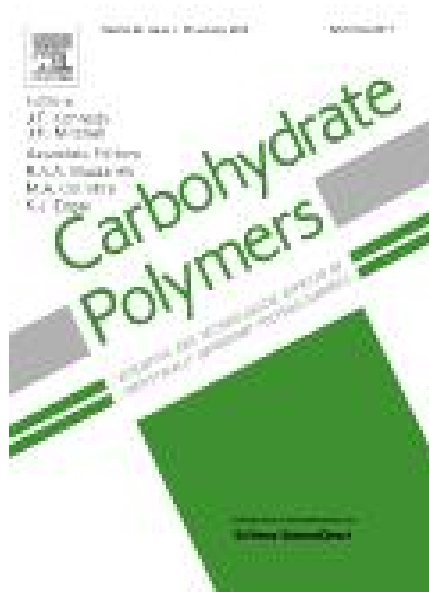
- SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.
- SCIARINI, L.S.; MALDONADO, F.; RIBOTTA, P.D.; PÉREZ, G.T.; LEÓN, A.E. Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. **Food hydrocolloids**, 23, 306-313, 2009.
- SIERAKOWSKI et al. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, 42, 51-57, 2000.
- SIERAKOWSKI, M-R.; MILAS, M.; DESBRIÉRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, 42, 51-57, 2000.
- SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, 59(3), 339-350, 2005.
- SMIRNOVA, N.I.; MESTECHKINA, N.M.; SHERBUKHIN, V.D. Fractional Isolation and Study of the Structure of Galactomannan from Sophora (*Styphnolobium japonicum*) Seeds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, 40(5), 517-521, 2004.
- SMITH, T.J.; KENNEDY, J.E.; HIGGINBOTHAM, C.L. Rheological and thermal characteristics of a two phase hydrogel system for potential wound healing applications. **Journal of Material Science**, 45, 2884-2891, 2010.
- SOUZA, C.F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F.A.; SIERAKOWSKI, M.R. *Caesalpinia ferrea* var. *ferrea* seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, 82, 641-647, 2010.
- SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seed galactomannans: An overview. **Chemistry & Biodiversity**, 2, 295-317. 2005.
- STEPHEN, A.M. (1983). Other plant polysaccharides. In G. O. Aspinall (Ed.), **The polysaccharides**, 97-180. London: Academic Press.
- TAVARES, C.; MONTEIRO, S. R.; MORENO, N.; LOPES DA SILVA, J.A. Does the branching degree of galactomannans influence their effect on whey protein gelation? **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 270, 213-219, 2005.
- TONELI, J. T. C.L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 7, 181-204, 2005.
- UGHINI, F.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; BRESOLIN, T.M.B. Evaluation of xanthan and highly substituted galactomannan from *M. scabrella* as a sustained release matrix. **International Journal of Pharmaceutics**, 271, 197-205, 2004.
- VADIVEL, V.; KUNYANGA, C.N.; BIESALSKI, H.K. Antioxidant Potential and Type II

- Diabetes-Related Enzyme Inhibition of *Cassia obtusifolia* L.: Effect of Indigenous Processing Methods. **Food Bioprocess Technology**, 2011.
- VADIVEL, V.; NANDETY, A.; BIESALSKI, H.K. Antioxidant Potential and Health Relevant Functionality of Traditionally Processed *Cassia hirsuta* L. Seeds: An Indian Underutilized Food Legume. **Plant Foods for Human Nutrition**, 66, 245–253, 2011.
- VALENGA, F. **Estudos de interação entre galactomanana e alginato e possíveis aplicações**. 2007. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.
- VENDRUSCOLO, C.W.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, 296, 1–11, 2005.
- VENDRUSCOLO, C.W.; FERRERO, C.; PINEDA, E.A.G.; SILVEIRA, J.L.M.; FREITAS, R.A.; JIMENEZ-CASTELLANOS, M.R., et al. Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: effect of drying method. **Carbohydrate Polymers**, 76(1), 86–93, 2009.
- VIANNA-FILHO, R.P. **Aplicação de polissacarídeos em emulsão cosmética: Análises reológicas**. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.
- VIEIRA, I. G. P.; MENDES, F. N. P.; GALLÃO, M. I.; BRITO, E. S. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Food Chemistry**, 101, 70–73, 2007.
- VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais (A Farmácia de Deus)**. 2ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. 347p.
- WU, T.H.; YEN, F.L.; LIN, L.T.; TSAI, T.R.; LIN, C.C.; CHAMD, T.M. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, 346, 160–168, 2008.
- YANG, L.; CHU, J.S.; FIX, J.A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, 235, 1–15, 2002.
- YUEN, S.N.; CHOI, S.M.; PHILLIPS, D.L.; MA, C.Y. Raman and FTIR spectroscopy study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. **Food Chemistry**, 114, 1091–1098, 2009.

CAPÍTULO 1

Rheological characterization of the galactomannan from *Cassia grandis* seeds

Artigo a ser submetido à revista Carbohydrate Polymers



Fator de Impacto: 3.628

Rheological characterization of the galactomannan from *Cassia grandis* seeds

Albuquerque, P.B.S.¹, Correia, M.T.S.¹; Barros Jr., W.², Teixeira, J.A.³; Carneiro-da-Cunha, M.G.¹

¹Department of Biochemistry/ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária CEP: 50.670-420 ã Recife, PE ã Brazil.

²Department of Physics, Universidade Federal de Pernambuco, Av. prof. Luiz Freire s/n, CEP 50670-901

³IBB ã Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal.

* Corresponding author. Fax: +55-81-2126.8576; Tel.: +55-81-2126.8540

E-mail address: mgcc@ufpe.br (M. G. Carneiro-da-Cunha)

Abstract

We have evaluated the rheological properties of a galactomannan polysaccharide obtained from *Cassia grandis* (from Pernambuco, Brazil) seeds by NaCl extraction followed by ethanol precipitation, with a yield efficiency of $(36 \pm 8) \%$. The extracted polymer amorphous nature and constituents monosaccharide signature was first confirmed as being that of a galactomannan by X ray diffraction and Fourier Transform Infrared methods, respectively. We have then conducted an extensive rheological characterization combining flow and oscillatory shear experiments. Regarding the flow experiments, the galactomannan studied, as a function of its concentration in water, exhibited Newtonian plateaus followed by shear-thinning zones characteristic of polymer solutions up to 1.5% (w/v). Above 1.5% (w/v) the system exhibited yield stress. The oscillatory results also corroborated the presence of a yield stress associated with a weak gel formation for concentrations above 1.5% (w/v). Adjusting stress-strain curves confirmed a 1.6% (w/v) as the galactomannan concentration value for the sol-gel transition. These results indicate that the galactomannan extracted from *Cassia grandis* seeds presents rheological characteristics suitable for applications in pharmaceutical, biomedical, cosmetic and food industries, making it an alternative to conventional galactomannans.

1. Introduction

Galactomannans are heteropolysaccharides widespread in the nature. Their basic structure is formed by $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -linked D-mannopyranose (Man) main chains to which $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -linked D-galactopyranosyl (Gal) units are attached. These polysaccharides are commonly extracted from the endosperm of numerous seed plants (particularly the Leguminosae) where they develop energy-reserve and hydration functions. Due to its specific physicochemical properties such as high molecular weight, water solubility, non-ionic character, and absence of toxicity (Gidley & Reid, 2006; Pollard, Eder, Fischer, & Windhab, 2010), this polysaccharide can be used in food,

pharmaceutical, biomedical, cosmetic, textile and paper industries (Srivastava & Kapoor, 2005), especially as an emulsion stabilizer, in the preparation of films (Cerqueira, Lima, Souza, Teixeira, Moreira, & Vicente, 2009; Cerqueira, Bourbon, Pinheiro, Martins, Souza, Teixeira, & Vicente, 2011; Mikkonen, Rita, Helen, Talja, Hyvönen, & Tenkanen, 2007) and as a gelling agent (Pinheiro, Bourbon, Rocha, Ribeiro, Maia, Gonçalves, Teixeira, & Vicente, 2011; Vendruscolo, Andrezza, Ganter, Ferrero, & Bresolin, 2005).

Galactomannans have found application in various pharmaceutical forms, such as tablets or capsules, hydrogels and films. Besides the simple use as an inert excipient, this polysaccharide plays a role in controlled drug delivery studies, especially in colonic environment, being used as a matrix or coating material (Silveira & Bresolin, 2011). In the food industry, galactomannans from non-traditional sources are being evaluated as films or coatings to prolong the shelf life of various foods such as tropical fruits (Cerqueira, Lima, Teixeira, Moreira, & Vicente, 2009) and ricotta cheese (Martins, Cerqueira, Souza, Avides, & Vicente, 2010).

Galactomannans extracted from seeds of four different species of Leguminosae, *Adenanthera pavonina*, *Caesalpinia pulcherrima*, *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica*, showed adequate characteristics for food and biomedical industries applications (Cerqueira, Pinheiro, Souza, Lima, Cândida Miranda, Teixeira, Moreira, Coimbra, Gonçalves, & Vicente, 2009). The synergistic interactions of two non-conventional galactomannans (*G. triacanthos* and *S. Japonica*) with carrageenan and xanthan represent alternatives to the traditional galactomannans guar gum and locust bean gum with the same polysaccharides, and can be used to provide different rheological characteristics of food products (Pinheiro, Bourbon, Rocha, Ribeiro, Maia, Gonçalves, Teixeira, & Vicente, 2011). The content of water soluble gum (32-34%) found in the seeds of *Cassia grandis* from India, was reported by Joshi and Kapoor (2003) as having characteristics to become a potential source of this polysaccharide. New sources of seed gums are demanded worldwide and searching for renewable sources of these polysaccharides is justified. In spite of the

rich biodiversity of the local flora and of the favorable climate for their production, Latin American sources of galactomannans are not yet well known.

C. grandis is a small to medium size tree, belonging to the Leguminosae family and subfamily of Caesalpinioideae, native of tropical and Central America and the West Indies and widely distributed in Brazil, a tropical country. As *C. grandis* seeds contain large amounts of galactomannan, this work aimed at the extraction and rheological characterization of this galactomannan for future biotechnological applications.

2. Material and methods

2.1 Material

The pods of *C. grandis* were collected at the rural zone of Pernambuco State, in the city of Angelim (Brazil), in July, 2011. Ethanol 99.8 %, acetone PA, sodium chloride and phenol were obtained from Vetec Fine Chemicals Ltda (Brazil). All other chemicals were of analytical grade.

2.2 Extraction of the galactomannan from *C. grandis* seeds

The pods of *C. grandis* were immersed in distilled water at 25°C for 18 h and then separated in a half part, the seeds remaining trapped in a black and stick mass. The seeds were removed and placed in an oven at 100°C until reaching a constant weight. The dry seeds (M_i) were boiled in distilled water [1:5 (w/v)] at 100°C for 1 h for enzyme inactivation and maintained in water by 18 h at 25°C to facilitate removal of the hull. After this period, the hull was removed and the seeds without hull, endosperm plus germ, were triturated in a blender with 0.1M NaCl [5% (w/v)] at 25°C, filtered through a vual tissue, that was followed by a new filtration using screen printing cloth (90 thread type) and precipitated with 46 % ethanol [1:3 (v/v)] for 18 h. The white precipitate obtained was filtered on screen printing cloth (110 thread type), washed with 100 % ethanol [1:3 (w/v)] for 30 min and two times with acetone PA [1:3 (w/v)] for 30 min, filtered on screen printing

cloth (110 thread type) between each washing. The precipitated galactomannan obtained was placed in an oven at 100°C until constant weight (M_f) and finally pulverized and kept in a dry place until further use.

The yield of extraction was calculated by dividing the final mass of galactomannan (M_f) by the initial mass of the dry seeds (M_i) and express as % w/w. The experiment was carried out in triplicate and the results expressed as mean $\pm$ standard deviation.

2.3 Structural characterization

2.3.1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy and X ray patterns

The polysaccharide extracted from *C. grandis* seeds was characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy on a VERTEX 70 (Bruker Optics, USA) spectrometer under dry air at room temperature (25°C) using KBr pellets. The polysaccharide was mixed with KBr then compressed into 1 mm tablets and spectra were scanned between 4000 and 500 cm^{-1} with 4 cm^{-1} of resolution.

The crystal structure of the polysaccharide was analyzed by X ray diffraction using a Bruker D8 Advance (Germany) diffractometer (30 kV, 30 mA) equipped with $\text{CuK}\alpha$ radiation at wavelength of 0.154 nm. The measurements were carried out for an angular interval varying from 5-60° (2 θ range), scanning rate of 5°/min, step of 0.02° and 2 s per step. To determine the polysaccharide crystallinity, the total diffracted area and the area under the crystallinity peaks were evaluated by integration after correcting the data for absorption. The ratio of the crystalline area to the total area was taken as the relative crystallinity.

2.4 Rheological measurements

The experiments were conducted in a stress controlled rheometer (Anton Paar MCR 301) equipped with a temperature controller.

The less viscous samples [0.5 to 1.0 % (w/v)] were inserted into a two concentric cylinder geometry cell with outer diameter (o.d.) = 28 mm and internal diameter (i.d.) = 24 mm. For the more viscous samples [1.5 and 2 % (w/v)] a circular parallel plate cell with internal diameter (i.d.) = 25 mm and a height (h) = 1 mm gap between plates was employed. Unless when explicitly stated, all rheology experiments were conducted at 25°C.

2.4.1 Rotational flow studies

The flow studies were conducted in continuous steady state shear rotational mode. The shear-rate, $\dot{\gamma}$, externally applied in the sample varied from 1 to 1000 s⁻¹ and 50 points were acquired. The apparent viscosity, η , response was recorded.

2.4.2 Oscillatory flow studies

The dynamic oscillatory mode studies were conducted varying the applied torque/deformation angular frequency, ω , from 1 to 500 rad.s⁻¹. The storage (G') and loss (G'') module sample responses were recorded during the frequency sweep at a rate of one acquisition every 5 s. The strain deformation amplitude, γ , was fixed at 0.2 % amplitude and 50 points were acquired.

2.4.3 Temperature stability studies

For the temperature stability study, the rheometer was operated in oscillatory mode. For a fixed frequency $\omega = 2\pi$ rad.s⁻¹ and an externally fixed applied shear stress, $\tau = 2$ Pa, the temperature was ramped up continuously at a rate of 5°C per min and the storage (G') and loss (G'') module sample responses were recorded. The temperature interval was from 0°C to 70°C. Data was recorded every 6 s and 241 points were collected.

2.4.4 Stress-strain studies

For the stress-strain study, the rheometer was operated in oscillatory mode. For a fixed frequency $\omega = 2\pi$ - rad.s⁻¹ an externally applied shear stress, τ , was varied from 1 to 300 Pa and the storage (G') and loss (G'') module sample responses were recorded. One acquisition was performed every 5 s and 50 points were obtained.

3. Results and discussion

3.1 Extraction and yield

In most of the studies involving extraction of galactomannans from legumes endosperm, milling and extraction procedures are not specified in detail or even mentioned. In general, the seed treatment includes sequential milling of the whole seeds and aqueous extraction of the galactomannans by several agitation steps and subsequent precipitation in alcoholic medium (Dakia Wathelet, & Paquot, 2007; Pollard, Kelly, Fischer, Windhab, Eder, & Amadò, 2008).

The yield of polysaccharide extraction from seeds is generally expressed as a percentage of dry mass obtained after extraction in relation with the dry weight of seeds (Buckeridge, Panegassi, Rocha, & Dietrich, 1995; Pollard, Eder, Fischer, & Windhab, 2010). Many of the seed gums marketed are constituted of endosperm plus germ obtained only with hull removal (Perduca, Spotti, Santiago, Judis, Rubiolo, & Carrara, 2013).

Considering the importance of the purity of the final product as well as the need to reduce the number of unit operations involved in the steps of extraction and purification, specially at industrial level, the samples containing the endosperm plus germ were selected for extraction of galactomannan from *C. grandis* seeds.

The obtained extraction yield was of (36 ± 8) %, similar to 32-34 % found for the seeds of *C. grandis* from India (Joshi & Kapoor, 2003) and higher than the 26 % found in the seeds of *C.*

javanica (Andrade, Azero, Luciano, & Gonçalves, 1999). Regarding the extraction yield of the galactomannans of the subfamily Caesalpinioideae, several studies report values between 8 and 40 % of the seed weight, values that are higher than for other species of brazilian legumes (Dea & Morrison, 1975; Buckeridge, Panegassi, Rocha, & Dietrich, 1994).

Based on these values, it may be concluded that an efficient technology was used in this work for the extraction of the galactomannans of the seeds of *C. grandis*.

3.2 Structural characterization by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and X ray diffraction

The obtained spectral profile and relative intensities of the bands are shown in Figure 1(A). The spectrum confirms that the extracted material is a galactomannan. Absorption at 3389 cm^{-1} between the regions $3500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ is characteristic of a carbohydrate ring (Kim, Park, Nam, Lee, & Lee, 2003; Peng, Zhang, Zeng, & Xu, 2003) and represents hydroxyl stretching vibration of polysaccharides and water involved in hydrogen bonding (Fringant, Tvaroska, Mazeau, Rinaudo, & Desbrieres, 1995). The absorption at 2928 cm^{-1} between the regions $3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ was assigned to the stretching vibration of the methylene group ($\text{C}\text{--}\text{H}$). In the anomeric region ($950\text{--}700\text{ cm}^{-1}$), the polysaccharide exhibited the obvious characteristic absorption at 874 and 814 cm^{-1} , assigned to β -D-galactopyranose and α -D-mannopyranose, respectively (Figueiró, Góes, Moreira, & Sombra, 2004; Yuen, Choi, Phillips, & Ma, 2009), revealing the coexistence of β and α glycosidic bonds (Kim, Park, Nam, Lee, & Lee, 2003; Peng, Zhang, Zeng, & Xu, 2003).

X ray diffraction profile of the galactomannan obtained from *C. grandis* seeds is shown in Figure 1(B). It is known that polysaccharides naturally interact with water, leading to structural transitions related to amorphous-crystalline transitions, with a great impact on their molecular mobility and functional properties (Yakimets, Paes, Wellner, Smith, Wilson, & Mitchell, 2007). X ray diffraction confirmed the amorphous nature of *C. grandis* galactomannan presenting a broad

peak around $2\theta = 20^\circ$, characteristic of amorphous structures (Martins, Cerqueira, Bourbon, Pinheiro, Souza, & Vicente, 2012).

The crystallinity index, denoted by the alignment of molecules in a particle structure (Mudgil, Barak, & Khatkar, 2012), was calculated and obtained value of 0.334 that was higher than those obtained from other seed galactomannans, such as *G. sinensis* (0.297), *G. melanacantha* (0.278) and *G. microphylla* (0.285) (Jiang, Jian, Cristhian, Zhanga, & Sun, 2010), as well as for native guar gum (0.240) (Shobha, Vishukumar, Tharanathan, & Randgaonkar, 2005). The results indicate that the drying process might have improved the organization of the chain thereby increasing the crystallinity of the material (Vendruscolo, Ferrero, Pineda, Silveira, Freitas, Jimenez-Castellanos, & Bresolin, 2009).

Please insert Figure 1

3.3 Rheological characterization

3.3.1 Flow results

Figure 2 depicts flow experiments (see materials and methods section) where the apparent viscosity of galactomannan (gal.) water solutions is measured as a function of shear-rate for different polysaccharide concentrations (w/v). Viscosity shear-thinning was observed for all concentrations tested. However, at small shear-rates and concentrations $< 1.0\%$, the apparent viscosity exhibits a Newtonian plateau. This plateau decreases as the concentration increases and disappears completely for 2.0% concentration.

For concentrations $< 1.0\%$, the Newtonian plateau is followed by a power-law decrease in viscosity as a function of shear rate (shear-thinning regime). Within this region, the degree of shear-thinning is quantified by the slope of the viscosity/shear-rate curve in a log-log plot.

The observed shear thinning behavior is in agreement with what has been reported for others

galactomannans, such as those extracted from *Leucaena leucocephala* seeds (Nwokocha & Williams, 2012) and the most commercially used galactomannan, guar gum (Mudgil, Barak, & Khatkar, 2012).

The experimental curves depicted in Figure 2 are a typical example of a polymer solution behavior described by the Cross Model (Cross, 1965). This model, initially devised for dispersion aggregates solutions, has been very successful in describing the shear-thinning behavior of diluted polymer solutions.

Please insert Figure 2

The apparent viscosity in a rotational shear flow experiment as a function of shear-rate is given by:

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^p} \quad (1)$$

where $\dot{\gamma}$ is the shear-rate, η_0 is the extrapolated value for the viscosity at zero shear rate, $\eta_0 = \eta(\dot{\gamma} \rightarrow 0)$, and η_{∞} is the viscosity obtained at infinite shear rate, $\eta_{\infty} = \eta(\dot{\gamma} \rightarrow \infty)$. The latter is expected to be dependent only upon the polymer density, given that contributions from interactions within its microstructure to the viscosity become negligible when compared to the shear energy externally applied in this regime. The parameter $\dot{\gamma}_c$ is associated with the rupture of structural linkages; it is the critical shear-rate above which shear-thinning behavior sets in. The exponent p describes the degree of shear-thinning and is a value between 0 and 1. Depending on the values obtained for p an associated theoretical model becomes available.

Please insert Table 1

The parameters utilized for fitting the data shown in Figure 2 (solid lines) are presented on Table 1. It is clearly shown that the degree of shear-thinning (represented by the p value) rises abruptly above 0.8 % concentration. The evaluated shear-rate interval was not sufficient to reach the η_{∞} value. Therefore, in Equation 1, we have simply used a $\eta_{\infty} = 0.001$ Pa.s for all concentrations.

In a dilute regime, the degree of shear-thinning, described by the exponent p , should be the same for all samples, with the shear-thinning curves parallel to each other. Clearly, this is not what happens with our data. Actually, for concentrations up to 0.8 % there is a set of parallel curves ($p \sim 0.6$) and for concentrations above 0.8 % there is another set of parallel curves ($p \sim 0.8$). This might indicate a transition between a dilute polymer solution in a separate segments regime (dilute regime) into a more interacting (entangled) arrangement (semi-dilute regime). The value $p = 0.84$ is compatible with chain entangling in monodisperse polymers theory (Graessley, 1967), that assumes a control of viscosity by intermolecular chain entanglements and therefore the decrease in viscosity with shear rate is caused by shear-induced changes in the network of entanglements.

At low shear rates, the entanglement reconstruction characteristic time is governed by brownian diffusion effects whereas at higher shear rates the disentangling rate is higher and the system viscosity lowers (Castelain, Doublier, & Lefebvre, 1987). The change on the degree of shear thinning seems to indicate a concentration dependent phase transition where for concentrations below a threshold the system behaves as individual non interacting strands of polymer (dilute regime) that are stretched along the flow for high shear rates. Above the threshold concentration (semi-dilute regime), the strands interact topologically and the shear thinning results of the strand stretching and strands disentangling effects, the latter occurring only at higher concentrations. A similar abrupt transition was observed at the same 0.8 % concentration when examining the values

of η_0 , as a function of concentration (See top right inset in Fig. 2).

From the critical shear-rate data, $\dot{\gamma}_c$, the shear thinning regime interval is reduced as concentrations decreases. For 0.5 % concentration, the system behaves as a Newtonian fluid for most part of the shear-rate interval. However, at 2.0 % concentration no evidence of a Newtonian plateau is observed indicating that, for the same shear-rate interval, a gel transition might have occurred.

3.3.2 Oscillatory results

Figure 3 shows an oscillatory shear-stress experiment (see materials and methods section) where the storage, G' , and loss, G'' , moduli are measured as a function of the oscillatory shear angular frequency, ω , for a small fixed strain amplitude. The system is kept in the so called linear viscoelastic regime (LVR) where the structure is deformed but not destroyed, offering the opportunity to probe the microstructure of the galactomannan.

Please insert Figure 3

Both G' and G'' continuously increase as a function of oscillating frequency with their slopes levelling off as the concentration increases, in agreement with the oscillatory behavior observed for other galactomannans (Nwokocha & Williams, 2012; Perduca, Spotti, Santiago, Judis, Rubiolo, & Carrara, 2013).

For concentrations up to 1.5 % there is an observable cross-over between G'' and G' . Initially, the galactomannan behaves as a liquid dissipating most of the energy externally applied ($G'' > G'$). Above the cross-over, an elastic behavior sets in ($G' > G''$). The cross-over frequency $\omega(G' = G'')$ marks the time scale at which the transition from liquid-like to solid-like behavior

occurs. The inverse of this frequency can be regarded as a measure of an effective junction lifetime. This lifetime increases as the concentration increases as expected. The ability to provide both behaviors between liquid and solid states suggest the use of concentrations up to 1.5 % as films/coatings widely useful in pharmaceutical, biomedical and food industries, such as one biodegradable source that can be used to improve the cicatrization process or the existent packaging technology. For a concentration of 2.0 % the crossover disappears. At this concentration, where the two moduli evolve almost parallel with frequency increase, there is an evidence that the system has reached a gel-like state (Winter & Chambon, 1986), such as has been observed for xanthan gum (Williams & Philips, 2000) where there is a tendency to undergo a weak intermolecular chain association for the formation of a three-dimensional structured network behavior (Williams & Philips, 2000). Although $G' > G''$, their difference is not sufficient to consider the system as a strong gel. It must also be pointed out that this concentration is the same where the Newtonian plateau disappears (Fig. 2).

The Maxwell model is the simplest model for describing viscoelastic liquid systems. The model considers the behavior of a structured fluid as having a spring (elastic part) and a dash pot (dissipative part) components arranged in series. The equations describing the visco-elastic response of a system as a function of an oscillating stress frequency or strain are:

$$G'(\omega) = \left(\frac{\eta_0}{\omega_c} \right) \frac{\omega^2}{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c} \right)^2} \quad (2)$$

$$G''(\omega) = \frac{\eta_0 \omega}{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c} \right)^2} \quad (3)$$

where η_0 is the zero stress viscosity, ω is the oscillatory stress/strain angular frequency, and ω_c is the frequency where G'' and G' cross, $\omega(G' = G'')$.

Examining both expressions in Equations 2 and 3 one derives that at low frequencies,

$\omega \ll \omega_c$, the storage and loss moduli behave as $G' \sim \omega^2$ and $G'' \sim \omega^1$, respectively. This behavior is observed for samples at concentrations below 1.0 %. For concentrations above 1.0 % the frequency exponents decrease considerably approaching a common value (see inset in Fig. 3). In the latter regime, the Maxwell model is not sufficient to explain the viscoelastic behavior. This transition occurs around the same concentration values as in the dilute to semi-dilute transition in the flow experiments depicted in Figure 2. The high-frequency regime $\omega \gg \omega_c$ was not accessible within the experimental frequency interval utilized.

The exponents n' , for $G' \sim \omega^{n'}$; and n'' , for $G'' \sim \omega^{n''}$, are depicted in Fig. 3 (inset) as a function of galactomannan concentration. The exponents were obtained by fitting the data in the main graphic considering the frequency interval below each respective cross-over.

These exponents decrease linearly with the increase in concentration, with $n' = n''$, for high concentrations as expected for gel systems. At lower concentrations, the exponents approach the values predicted by the simple Maxwell model, $n' = 2$ and $n'' = 1$. At this regime the galactomannan behaves as viscoelastic Maxwell liquids.

3.3.3 Stress strain curves

Figure 4 shows a stress-strain experiment (see materials and methods section) where the storage, G' , and loss, G'' , moduli are measured as a function of an externally applied shear-stress, τ , for several concentrations of galactomannan solutions. Both moduli increase as a function of concentration with $G'' > G'$ up to 1.5 % for the entire externally applied stress interval. Similar behavior has been observed for the oscillatory data (see Fig. 3).

For concentrations of 0.5 % and 0.8 %, the samples behave as a viscoelastic liquid where the G'' contribution has a constant value (Newtonian behavior) for a finite stress interval whereas the G' contribution decreases as a function of stress with $G'' \gg G'$ for the entire stress interval. The system

is essentially a Newtonian liquid for moderate applied stresses and cannot sustain elastic linear deformations.

For concentrations of 1.0 % and 1.5 %, the samples behave again as viscoelastic liquids but now the system can sustain a linear viscoelastic region (LVR) where both G' and G'' are independent of the externally applied stress with $G'' > G'$. This LVR increases as the concentration increases.

For the 2.0 % concentration, the system also exhibits a LVR and, furthermore, $G' > G''$ over almost the entire shear-stress interval evaluated. The low sensitivity to applied shear stress indicates the high stability of the sample at this concentration, behaving as a gel. This characteristic suggests a promising use of this polymer since, according to other studies, obtaining gels requires mixing different types of galactomannan (Da-Lozzo, Moledo, Faraco, Ortolani-Machado, Bresolin, & Silveira, 2012; Pinheiro, Bourbon, Rocha, Ribeiro, Maia, Gonçalves, Teixeira, & Vicente, 2011; Rinaudo & Moroni, 2009; Sandolo, Bulone, Mangione, Margheritelli, Di Meo, Alhaique, Matricardi, & Coviello, 2010). Again, this is the same concentration where evidences for gel transition are shown in Figures 2 and 3. For larger shear-stress values, there is an observable crossing between the viscoelastic moduli ($G' = G''$). This point is identified as the yield stress of the gel, the point where it starts flowing.

The inset (top left) is a log-log plot constructed by collecting the values of G' and G'' moduli, obtained by extrapolating the points in the LVR ($\dot{\gamma} \rightarrow 0$) of the main graphic in Figure 4, as a function of the respective galactomannan solution concentration. The change in G'' within the concentration interval is about 2 orders of magnitude, very similar to the interval of viscosity presented in Figure 2 for the same concentration interval.

Please insert Figure 4

The variation in G' is 3 orders of magnitude within the same interval showing that the elastic properties are more sensitive to galactomannan concentration than its viscosity. One can identify in the inset figure a transition from a viscoelastic liquid ($G'' > G'$) into a viscoelastic solid ($G' > G''$). This transition occurs at 1.6 % of galactomannan solution concentration and is considered as the point where the polymer solution turns into a gel. Both moduli exhibit a power-law dependence with polymer concentration. The solid lines are fitting functions obtained assuming power-law dependence (see figure caption) of G' and G'' with galactomannan concentration $\tilde{n}$ obtained exponents were $s' = 5.63$ for G' and $s'' = 3.73$ for G'' dependence.

3.3.4 Temperature stability

Figure 5 shows a standard temperature stability experiment (see materials and methods section) where the storage and loss moduli are measured as a function of temperature for several concentrations of galactomannan solutions. As in previous experiments, the storage modulus is smaller than the loss modulus up to 1.5 % concentration. Both moduli remain constant (stable) up to 10°C for all concentrations. Above 10°C the moduli starts to change. The variation is larger for smaller concentrations of the galactomannan. For concentrations above 1.5 % and, more important, for 2.0 % concentration where $G' > G''$, the moduli variations are considerably small as compared to lower values of concentration for the same temperature interval (from 10 to 70°C).

Please insert Figure 5

Many neutral polysaccharides which are rich in hydroxyl groups are able to form tridimensional networks stabilized by H-bonds established between molecules; these interactions, in mixtures or suspensions of single polysaccharides, are disrupted when temperature increases. The results presented in Figure 5 are in agreement with temperature stability experiments reported for

galactomannans, that describe with temperature increase, a decrease in G_0 attributed to heat induced intra- and inter-chain H-bonds breakage (Bourbon, Pinheiro, Ribeiro, Miranda, Maia, Teixeira, & Vicente, 2010; Rinaudo & Moroni, 2009; Shobba & Tharanathan, 2009).

3.3.5 Cox-Merz rule

The Cox-Merz rule is an empirical observation for some systems where $\eta(\dot{\gamma}) = \eta^*(\omega)$, at least for low oscillating frequencies or shear rates.

Figure 6 repeats the results of Figure 2 superposed with the results from a complex viscosity measurement in an oscillatory experiment in the linear deformation regime (see materials and methods section). The open symbols indicate results from complex viscosity versus oscillating frequency. The filled symbols are the flow experiment of viscosity versus shear rate already presented in Figure 2. At low frequencies, the Cox-Merz rule for concentrations up to 1.0 % is observed.

Above this value, the viscosities behave differently and do not superpose anymore. This coincides with the transition to gel behavior.

Please insert Figure 6

The rule also breaks apart at higher frequencies particularly at the regime where the shear-thinning behavior sets in the flow experiment. The point where the curves depart from each other is interpreted from two different perspectives: i) From the flow experiment it occurs at the shear rate $\dot{\gamma}_c$ (see Eq.1) where shear thinning sets in and the structure starts to disentangle and align with flow direction; ii) From the complex viscosity point of view, the departure occurs at frequencies ω_c (see Eq.2) where the system starts showing solid gel like behavior ($G_0 > G''$) (Fig. 3). In both cases there is a natural relaxation regime for the system that cannot be achieved at high rate energy input

cycles.

It is also important to mention that our analysis is not amenable for the 2 % concentration sample where the Cox-Merz rule breaks apart completely.

4. Conclusions

The extraction methodology used in this work was efficient for obtaining galactomannan from *C. grandis* seeds, presenting a yield of $36 \pm 8\%$. The extensive experimental rheological characterization showed that the galactomannan has a behavior correlated with the Cross model, exhibiting Newtonian plateaus followed by shear-thinning zones up to 1.5 % (w/v); above this concentration it can be considered as a polymer solution of entangled strands. At 2.0 % concentration, the low sensitivity to parameters variation and the evolve almost parallel of G' and G'' evidence that the system has reached a gel-like state. The stress-strain study allows a more accurate evaluation of this transition indicating 1.6 % as the value for the sol-gel transition. The results show that this galactomannan has adequate characteristics to be used in biotechnological applications such as coating or as gel in food and pharmaceutical industries.

5. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. References

Andrade, C. T., Azero, E. G., Luciano, L. & Gonçalves, M. P. (1999). Solution properties of the galactomannas extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26,

181-185.

- Bresolin, T.M.B., Milas, M., Rinaudo, M., Reicher, F. & Ganter, J.L.M.S. (1999). Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 225-231.
- Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Ribeiro, C., Miranda, C., Maia, J.M., Teixeira, J.A. & Vicente, A.A. (2010). Characterization of galactomannans extracted from seeds of *Gleditsia triacanthos* and *Sophora japonica* through shear and extensional rheology: Comparison with guar gum and locust bean gum. *Food Hydrocolloids*, 24, 184-192.
- Buckeridge, M.S., Panegassi, V.R., Rocha, D.C. & Dietrich, S.M.C. (1995). Seed galactomannan in the classification and evolution of the leguminosae. *Phytochemistry*, 38 (4), 871-875.
- Castelain, C., Doublier, J. L., & Lefebvre, J. (1987). A Study of the Viscosity of Cellulose Derivatives in Aqueous Solutions. *Carbohydrate Polymers*, 7, 1 - 16.
- Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A. & Vicente, A.A. (2011). Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 662-671.
- Cerqueira, M.A., Lima, A.M., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Moreira, R.A. & Vicente, A.A. (2009a). Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1456-1462.
- Cerqueira, M.A., Lima, A.M., Teixeira, J.A., Moreira, R.A. & Vicente, A.A. (2009b). Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. *Journal of Food Engineering*, 94, 372-378.
- Cross, M. M. (1965). Rheology of non-newtonian fluids: a new flow equation for pseudoplastic systems. *Journal of colloid science*, 20, 417.
- Dakia, P.A., Wathelet, B. & Paquot, M. (2007). Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food chemistry*, 102, 1368-1374.

- Da-Lozzo, E.J., Moledo, R.C.A., Faraco, C.D., Ortolani-Machado, C.F., Bresolin, T.M.B. & Silveira, J.L.M. (2012). Curcumin/xanthan-galactomannan hydrogels: Rheological analysis and biocompatibility. *Carbohydrate polymers*, doi:10.1016/j.carbpol.2012.02.036.
- Dea, I. C. M., & Morrison, A. (1975). Chemistry and interactions of seed galactomannans. In R. S. Tipson, & H. Derek (Eds.), *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (pp. 241–312). Academic Press.
- Fernandes, P.B., Gonçalves, M.P. & Doublier, J.L. (1991). A rheological characterization of Kappa-carrageenan/galactomannan mixed gels: A comparison of locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers*, 16, 253–274.
- Figueiró, S.D., Góes, J.C., Moreira, R.A. & Sombra, A.S.B. (2004). On the physicochemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan–collagen films. *Carbohydrate Polymers*, 56, 313–320.
- Fringant, C., Tvaroska, I., Mazeau, K., Rinaudo, M. & Desbrieres, J. (1995). Hydration of α -maltose and amylose: molecular modelling and thermodynamics study. *Carbohydrate Research*, 278, 27–41.
- Gidley, M.J. & Reid, J.S.G. *Food polysaccharides and their applications*. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- Jiang, J., Jian, H., Cristhian, C., Zhanga, W. & Sun, R. (2011). Structural and thermal characterization of galactomannans from genus *Gleditsia* seeds as potential food gum substitutes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 732–737.
- Joshi, H. & Kapoor, V.P. (2003). *Cassia grandis* Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. *Carbohydrate Research*, 338, 1907–1912.
- Kim, G.Y., Park, H.S., Nam, B.H., Lee, S.J., & Lee, J.D. (2003). Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk & M.A. Curtis) Teng. *Bioresource Technology*, 89, 81–87.

- Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Avides, M.C., & Vicente, A.A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1884-1891.
- Martins, J.T., Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Souza, B.W.S. & Vicente, A.A. (2012). Synergistic effects between k-carrageenan and locust bean gum on physicochemical properties of edible films made thereof. *Food Hydrocolloids*, 29, 280-289.
- Mikkonen, K.S., Rita, H., Helen, H., Talja, R.A., Hyvönen, L. & Tenkanen, M. (2007). Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films. *Biomacromolecules*, 8, 3198-3205.
- Mudgil, D., Barak, S. & Khatkar, B.S. (2011). Effect of enzymatic depolymerization on physicochemical and rheological properties of guar gum. *Carbohydrate Polymers*, 90, 224-228.
- Nwokocha, L.M. & Williams, P.A. (2012). Rheological characterization of the galactomannan from *Leucaena leucocephala* seed. *Carbohydrate polymers*, 90, 833-838.
- Peng, Y., Zhang, L., Zeng, F., & Xu, Y. (2003). Structure and antitumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. *Carbohydrate Polymers*, 54, 297-303.
- Perduca, M. J., Spotti, M. J., Santiago, L.G., Judis, M.A., Rubiolo, A.C. & Carrara, C.R. (2013). Rheological characterization of the hydrocolloid from *Gleditsia amorphoides* seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 51, 143-147.
- Pereira-Netto, A. B., Meneguim, R. G., Biz, A. & Silveira, J. L. M. (2012). A galactomannan driven enhancement of the in vitro multiplication rate for the maubakaido apple rootstock (*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh) is not related to the polysaccharide degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Pinheiro, A.C., Bourbon, A.I., Rocha, C., Ribeiro, C., Maia, J.M., Gonçalves, M.P., Teixeira, J.A.

- & Vicente, A.A. (2011). Rheological characterization of [kappa]-carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 392-399.
- Pollard, M.A., Eder, B., Fischer, P. & Windhab, E.J. (2010). Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinioideae and Faboideae subfamilies by multidetection aqueous SEC. *Carbohydrate Polymers*, 79, 70-84.
- Pollard, M.A., Kelly, R., Fischer, P.A., Windhab, E.J., Eder, B. & Amadò, R. (2008). Investigation of molecular weight distribution of LBG galactomannan for flours prepared from individual seeds, mixtures, and commercial samples. *Food Hydrocolloids*, 22, 1596-1606.
- Rinaudo, M. & Moroni, A. (2009). Rheological behavior of binary and ternary mixtures of polysaccharides in aqueous medium. *Food Hydrocolloids*, 23, 1720-1728.
- Sandolo, C., Bulone, D., Mangione, M.R., Margheritelli, S., Di Meo, C., Alhaique, F., Matricardi, P., & Coviello, T. (2010). Synergistic interaction of Locust Bean Gum and Xanthan investigated by rheology and light scattering. *Carbohydrate Polymers*, 82, 733-741.
- Shobha, M.S. & Tharanathan, R.N. (2009). Rheological behaviour of pullulanase-treated guar galactomannan on co-gelation with xanthan. *Food Hydrocolloids*, 23, 749-754.
- Shobha, M.S., Vishukumar, A.B., Tharanathan, R.N. & Randgaonkar, A.K. (2005). Modification of guar galactomannan with the aid of *Aspergillus niger* pectinase. *Carbohydrate Polymers*, 62, 267-273.
- Silveira, J.L.M. & Bresolin, T.M.B. (2011). Pharmaceutical use of galactomannans. **Química Nova**, 34(2).
- Srivastava, M. & Kapoor, V. P. (2005). Seed galactomannans: An overview. *Chemistry & Biodiversity*, 2, 295-317.
- Vendruscolo, C.W., Andreazza, I.F., Ganter, J.L.M.S., Ferrero, C. & Bresolin, T.M.B. (2005). Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of

theophylline. *International Journal of Pharmaceutics*, 296, 111.

- Vendruscolo, C.W., Ferrero, C., Pineda, E.A.G., Silveira, J.L.M., Freitas, R.A., Jimenez-Castellanos, M.R. & Bresolin, T.M.B. (2009). Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: effect of drying method. *Carbohydrate Polymers*, 76(1), 86-93.
- Williams, P. A., & Philips, G. O. (2000). Introduction to food hydrocolloids. In G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of hydrocolloids* (pp. 1e19). New York: CRC Press.
- Winter, H.H. & Chambon, F. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a cross-linking polymer at the gel point. *Journal of Rheology*, 30, 367.
- Yakimets, I., Paes, S. S., Wellner, N., Smith, A. C., Wilson, R. H., & Mitchell, J. R. (2007). Effect of water content on the structural reorganization and elastic properties of biopolymer films: a comparative study. *Biomacromolecules*, 8, 1710-1722.
- Yuen, S.N., Choi, S.M., Phillips, D.L. & Ma, C.Y. (2009). Raman and FTIR spectroscopy study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. *Food Chemistry*, 114, 1091-1098.

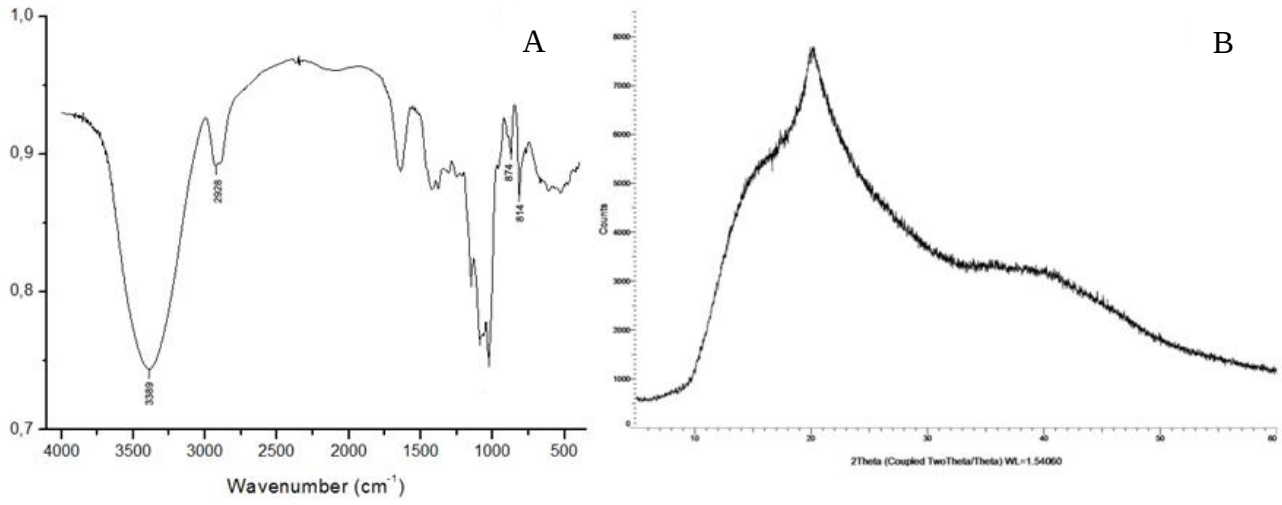


Fig. 1. FTIR spectra (A) and X ray patterns (B) of the galactomannan extracted from *C. grandis* seeds

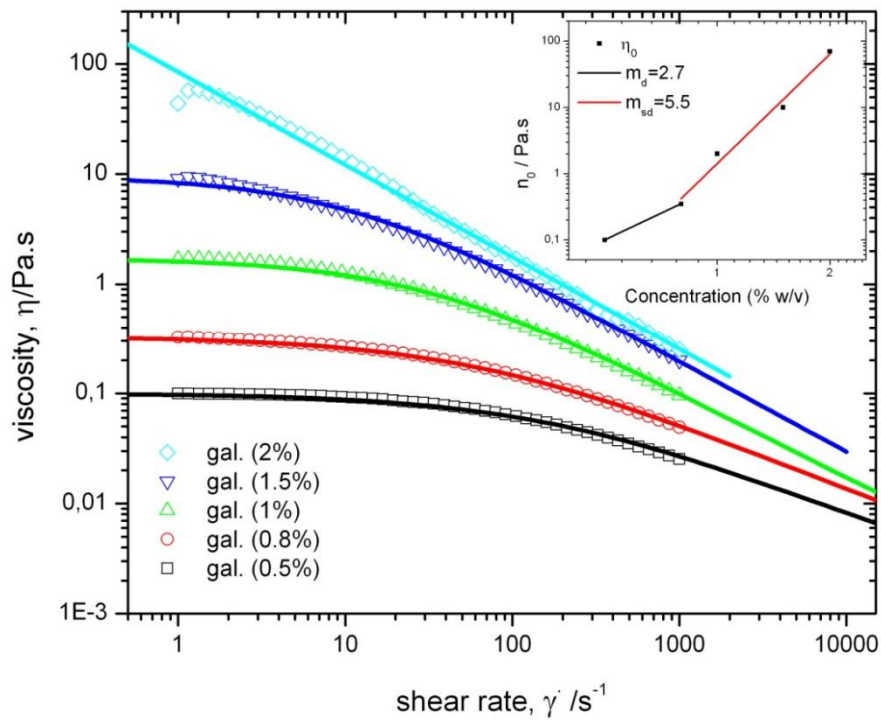


Fig. 2. Rotational steady flow experiments measurements of apparent viscosity η as a function of

shear-rate $\dot{\gamma}$ for several galactomannan (gal.) concentrations (% w/v) . The experimental data (open symbols) were adjusted utilizing the Cross model (solid lines) as described in the text. The inset in the top right shows the zero-shear viscosity, η_0 , extracted from the main graphic, as a function of galactomannan concentration. The two regimes depicted were adjusted assuming two regimes of power-law dependence: For the first regime (dilute regime), represented by the black solid line, $\eta_0 \propto C^{m_d}$ with $m_d = 2.7$; for the second regime (semi-dilute regime), shown by the red solid line $\eta_0 \propto C^{m_{sd}}$ with $m_{sd} = 5.5$. Since the 2 % concentration did not show a steady value for η_0 , the maximum value of viscosity for that concentration was chosen.

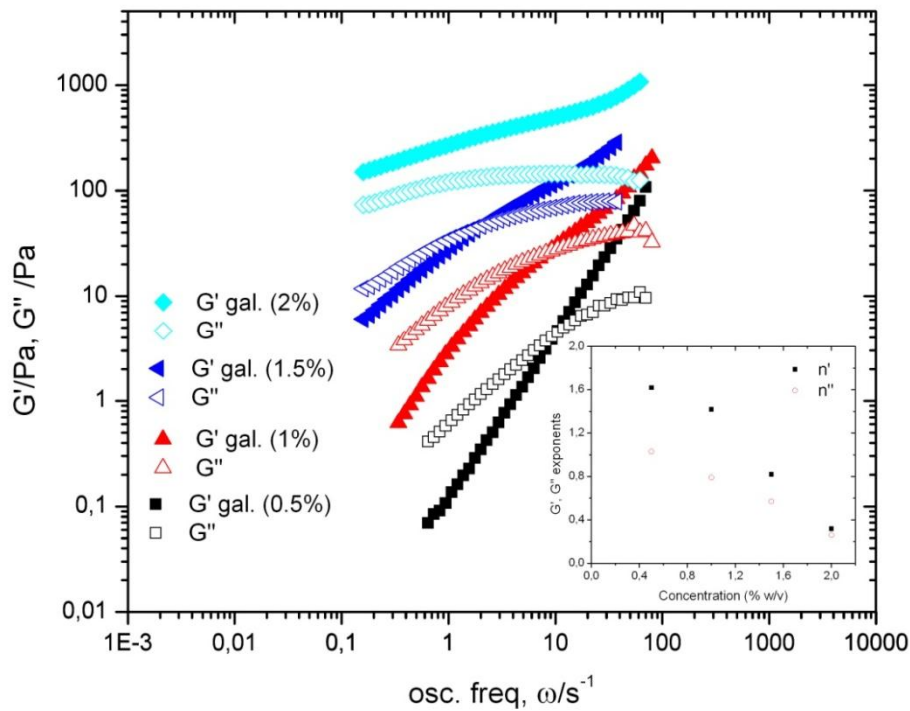


Fig. 3. Oscillatory experiments measuring storage modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of an oscillatory stress frequency, ω , for several concentrations (% w/v) of galactomannan (gal.) solutions. We assume a power-law dependence for the storage,

$G' \sim \omega^{s'}$, and loss modulus, $G'' \sim \omega^{s''}$, and adjust the data for frequencies below the cross-over with the best n' and n'' . The inset (bottom right) shows exponents n' (filled symbols) and n'' (open symbols) obtained from fitting the data as a function of galactomannan concentration.

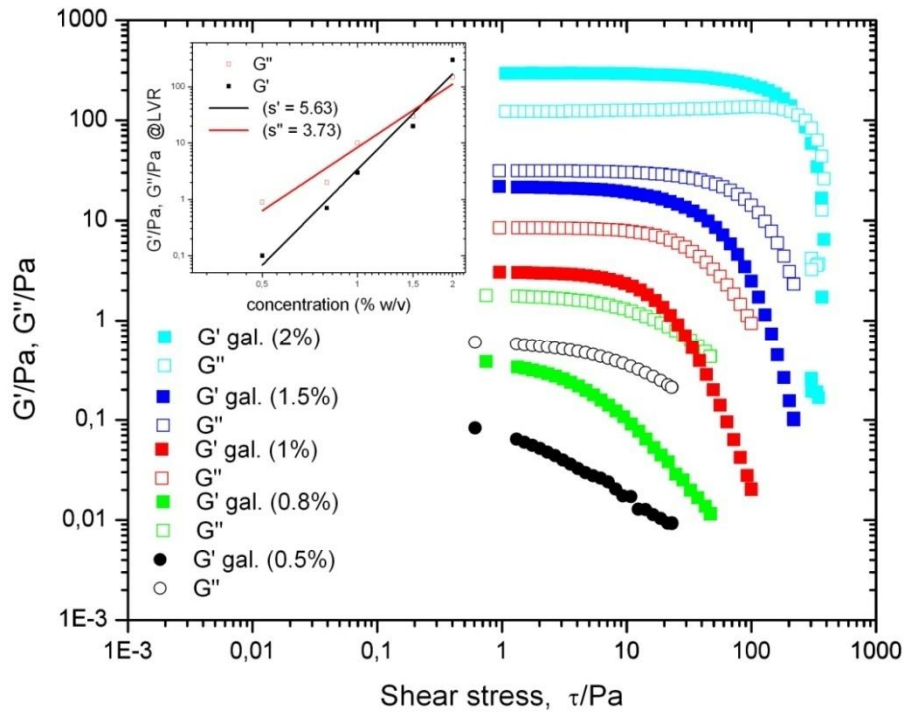


Fig. 4. Stress-strain experiment measuring storage modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of applied shear stress, τ , for several concentrations (% w/v) of galactomannan (gal.) solutions. Storage modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of concentration (% w/v) of galactomannan (gal.) solutions. The values of the moduli were extracted from extrapolating the values of Figure 4 towards the zero shear stress limit. The solid lines are fittings considering a power law dependence $G' \sim C^{s'}$ and $G'' \sim C^{s''}$ with exponents $s' = 5.63$ and $s'' = 3.73$, respectively.

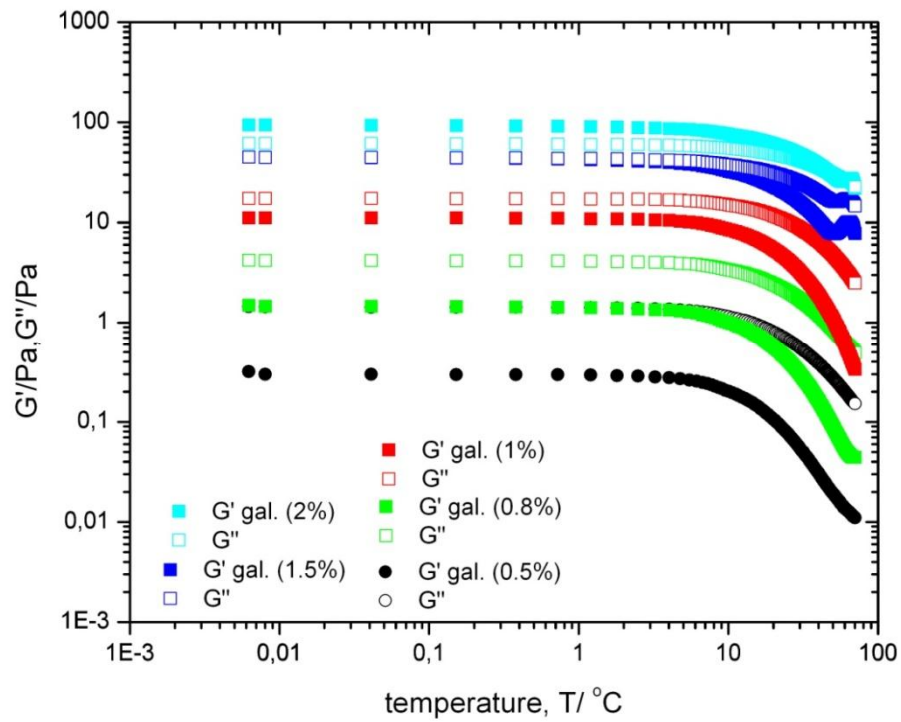


Fig. 5. Temperature stability experiment. The storage modulus, G' (filled symbols), and the loss modulus, G'' (open symbols), are measured as a function of temperature for several concentrations (% w/v) of galactomannan (gal.) solutions.

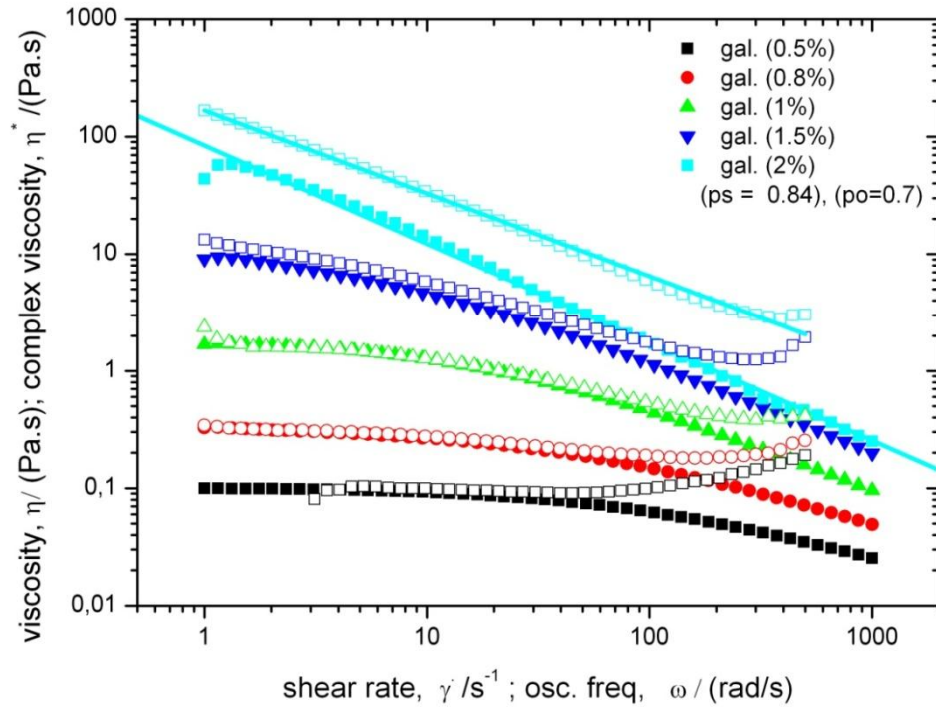


Fig. 6. Complex viscosity versus oscillating frequency (open symbols) and apparent viscosity as a function of shear rate (solid symbols) for several concentrations of galactomannan. The solid lines are fittings for the highest concentration sample considering a power law dependence $\eta \sim \dot{\gamma}^{-p_s}$ with $p_s = 0.84$ as already described in Fig.1 and $\eta^* \sim \omega^{-p_o}$ with $p_o = 0.70$ for the complex viscosity.

Table 1

Fitting parameters for flow curves of the different galactomannan concentrations depicted in Fig. 1.

Galactomannan concentration [% (w/v)]	η_0 (Pa.s)	$\dot{\gamma}_c$ (s ⁻¹)	p	η_∞ (Pa.s)
0.5	0.10	200	0.65	0.001
0.8	0.33	70	0.65	0.001
1.0	1.71	30	0.80	0.001
1.5	9.43	10	0.80	0.001
2.0	70*	-	0.84	-

*This value was an extrapolation to the maximum viscosity value at this concentration.

Highlights

- The galactomannan from *Cassia grandis* seeds was extracted.
- X ray and FTIR were performed to confirm the amorphous structure of the galactomannan.
- Steady shear and dynamic viscoelastic properties were studied.
- Polymer entanglement depends on polymer concentration.
- The galactomannan exhibits shear thinning non Newtonian behavior.
- The galactomannan showed viscosity modifier properties.

- Figure 1** FTIR spectra (A) and X ray patterns (B) of the galactomannan extracted from *Cassia grandis* seeds
- Figure 2** Rotational steady flow experiments measuring apparent viscosity η as a function of shear-rate $\dot{\gamma}$ for several concentrations (% w/v) of galactomannans (gal.). The experimental data (open symbols) were adjusted utilizing the Cross model (solid lines) as described in the text. The inset in the top right shows the zero-shear viscosity, η_0 , extracted from the main graphic, as a function of gal. concentration. The two regimes depicted were adjusted assuming two regimes of power-law dependence: For the first regime (dilute regime), a black solid line $\eta_0 \propto C^{m_d}$ with $m_d = 2.7$ was utilized; and for the second regime (semi-dilute regime), a red solid line $\eta_0 \propto C^{m_{sd}}$ with $m_{sd} = 5.5$ was employed. Since the 2% (w/v) concentration did not show a steady value of η_0 , the maximum value of viscosity for that concentration was chosen
- Figure 3** Oscillatory experiments measuring storage modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of an oscillatory stress frequency, ω , for several concentrations (% w/v) of galactomannans (gal.) solutions. We assume a power-law dependence for the storage, $G' \sim \omega^{n'}$, and loss modulus, $G'' \sim \omega^{n''}$, and adjust the data for frequencies below the cross-over with the best n' and n'' . The inset (bottom right) shows exponents n' (filled symbols) and n'' (open symbols) obtained from fitting the data as a function of galactomannan concentration
- Figure 4** Stress-strain experiment measuring storage modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of applied shear stress, τ , for several concentrations (% w/v) of galactomannans (gal.) solutions. Storage modulus, G' (filled symbols), and loss modulus, G'' (open symbols), as a function of concentration (% w/v) of galactomannan (gal.) solutions. The values of the moduli were extracted from extrapolating the values of Fig.5 towards the zero shear stress limit. The solid lines are fittings considering a power law dependence $G' \sim C^{s'}$ and $G'' \sim C^{s''}$ with exponents $s' = 5.63$ and $s'' = 3.73$, respectively
- Figure 5** Temperature stability experiment. The storage modulus, G' (filled symbols), and the loss modulus, G'' (open symbols), are measured as a function of temperature for several concentration (% w/v) of galactomannan (gal.) solutions
- Figure 6** Complex viscosity versus oscillating frequency (open symbols) and apparent viscosity as a function of shear rate (solid symbols) for several concentrations of galactomannans. The solid lines are fittings for the highest concentration sample considering a power law dependence $\eta \sim \dot{\gamma}^{-p_s}$ with $p_s = 0.84$ as already described in Fig.1 and $\eta^* \sim \omega^{-p_o}$ with $p_o = 0.70$ for the complex viscosity

CONCLUSÕES

O polissacarídeo contido nas sementes de *Cassia grandis* foi eficientemente extraído pela metodologia de extração utilizada neste trabalho, apresentando rendimento de $36\% \pm 8$. A confirmação da estrutura química da galactomanana foi confirmada por FTIR e Difração de Raios X. O estudo das propriedades reológicas da galactomanana demonstrou que o comportamento de fluxo deste polissacarídeo pode ser considerado uma solução polimérica de filamentos emaranhados até uma concentração de 1,6% (p/v). Os experimentos oscilatórios demonstraram que, até a concentração de 0,8% (p/v), a galactomanana comporta-se como uma solução polimérica diluída. Este regime é, então, seguido por um comportamento de solução semi-diluída para concentrações entre 1% e 2%, quando o grau de emaranhamento dos filamentos se potencializa e as amostras aumentam o seu grau de pseudoplasticidade. A capacidade de estruturação das soluções mais concentradas da galactomanana pode ser atribuída, portanto, à forte tendência de associação molecular do polímero, possibilitando à concentração de 2% (p/v) despontar como um gel fraco. Em conclusão, os resultados obtidos sugerem um potencial de aplicação biotecnológica da galactomanana extraída das sementes de *C. grandis* tanto para soluções diluídas quanto para géis, cujas suspensões podem ser formuladas como revestimentos e hidrogéis úteis para as indústrias alimentícia e farmacêutica.

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES DA REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS



Introduction

Carbohydrate Polymers covers the study and exploitation of carbohydrate polymers which have current or potential industrial application in areas such as food, textiles, paper, wood, adhesives, biodegradables, biorefining, pharmaceuticals, and oil recovery.

Topics include:

- studies of structure and properties
- biological and industrial development
- analytical methods
- chemical and microbiological modifications
- interactions with other materials

The role of the carbohydrate polymer must be central to the work reported, not peripheral. At least one named carbohydrate polymer must be mentioned in the paper. Research must be innovative and advance scientific knowledge.

Examples of papers which are not appropriate for *Carbohydrate Polymers* include:

- papers which major in biological, physiological and pharmacological aspects of non-carbohydrate molecules attached to, or mixed with, carbohydrate polymers
- papers on the materials science of biocomposites where there is no mention of any specific carbohydrate polymer, or the role of the carbohydrate polymer is not central to the study.
- papers majoring on polylactic acid or lignins
- routine studies of extraction yields without characterisation of the extracted polysaccharide

Types of paper

Original full-length research papers should contain material that has not been previously published elsewhere, except in a preliminary form. These papers should not exceed 6000 words of text and generally not more than eight figures/tables.

Review papers will be accepted in areas of topical interest and will normally emphasise literature published over the previous five years. They should not exceed 12,000 words plus figures, tables and references.

Short Communications are research papers constituting a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to literature, and description of the experimental

procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 2,000 words plus figures, tables and references. They will be reviewed in the same way as research papers.

Letters to the Editor are published from time to time on subjects of topical interest.

Book reviews are commissioned by the Editors as warranted.

Contact details for submission

Contributors must submit their articles electronically via the Elsevier Editorial System <http://ees.elsevier.com/carbpol> This is the only method of submission, and facilitates processing of your article.

Review Process

A peer review system is used to ensure high quality of papers accepted for publication. The Editors will reject papers without formal review when it is deemed that the paper is 1) on a topic outside the scope of the Journal, 2) lacking technical merit, 3) of narrow regional scope and significance, 4) does not advance scientific knowledge, or 5) is poorly written.

Any revised papers returned later than three months after being sent the referees' comments will be treated as a new submission. When submitting a revised paper authors must list all of the reviewer's comments and indicate how they have responded to the comment, and where in the paper they have made appropriate revisions.

Page charges

This journal has no page charges.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check'

functions of your wordprocessor.

Pages must be numbered, and lines must be numbered consecutively throughout the manuscript.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

ÇTitle. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

ÇAuthor names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately

after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Ç**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

Ç**Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Essential title page information

Ç**Title.** Concise and informative. The title must not exceed 100 characters (including spaces). Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Ç**Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

Ç**Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

Ç**Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts should be 100-150 words in length.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that

convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any

equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- ÇMake sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- ÇEmbed the used fonts if the application provides that option.
- ÇAim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- ÇNumber the illustrations according to their sequence in the text.
- ÇUse a logical naming convention for your artwork files.
- ÇProvide captions to illustrations separately.
- ÇSize the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- ÇSubmit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000

dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

ÇSupply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

ÇSupply files that are too low in resolution;

ÇSubmit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Do not exceed a total of 8 figures in your research paper.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010).

The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book: Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and

descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

☐ E-mail address

☐ Full postal address

☐ Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

☐ Keywords

☐ All figure captions

☐ All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

☐ Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

☐ References are in the correct format for this journal

☐ All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

☐ Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

☐ Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

☐ If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format;

here an article in the journal *Physics Letters B*:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately ñ please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Do not contact the editors - they do not have access to this information and will not be able to help you.