



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLOS PINHEIRO CHAGAS DE LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA GALACTOMANANA DE *Caesalpinia pulcherrima* SULFATADA NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM MANGAS

FORTALEZA

2015

CARLOS PINHEIRO CHAGAS DE LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA GALACTOMANANA DE *Caesalpinia pulcherrima*
SULFATADA NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM MANGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

Coorientadora: Profa. Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lima, Carlos Pinheiro Chagas de.

Avaliação do potencial da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* sulfatada no controle da antracnose em mangas / Carlos Pinheiro Chagas de Lima. – 2015.

54 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa.

Coorientação: Profa. Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha.

1. *Caesalpinia pulcherrima*. 2. Galactomanana. 3. Sulfatação. 4. Piridina . 5. Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDD 572

CARLOS PINHEIRO CHAGAS DE LIMA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA GALACTOMANANA DE *Caesalpinia pulcherrima*
SULFATADA NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM MANGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química.

Aprovada em: 12/08/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Judith Pessoa de Andrade Feitosa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Maria de Fátima Borges
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Prof. Dra. Durcilene Alves da Silva
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

A minha família por todo apoio.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento FUNCAP, CAPES, CNPQ e INOMAT pelo apoio financeiro.

A professora Judith Feitosa pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

A professora Pablyana Cunha pela co-orientação.

Aos professores participantes da banca examinadora Dra. Maria de Fátima Borges e Dra. Durcilene Alves da Silva pelo tempo, pelas valiosas colaborações.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A Elis e ao Edinilton pela realização das análises de absorção na região do infravermelho (FTIR).

A Tereza (Tetê) e ao professor Alejandro Ayala pela contribuição nas análises termogravimétricas (TGAs).

Ao Venícios pela ajuda com a cromatografia de permeação em gel (GPC)

A Natália pela colaboração nas análises de potencial Zeta.

Ao CENAUREN pelas análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e a Clara pelas aquisições.

A Dra. Maria de Fátima Borges, Bruna Santana e Elaine pela colaboração na realização das análises da atividade antimicrobiana.

A Laís e Ana Rosa pelo apoio na liofilização do material.

A todas as pessoas que de algum modo contribuíram para a realização deste estudo.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas, é quem faz as verdadeiras perguntas.”

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

O presente trabalho objetiva a sulfatação da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* (GCP). Foram utilizados dois métodos para sulfatação, um com o uso de piridina (Py), gerando os derivados GCPS-O, e o outro com o uso de N, N-dimetilformamida (DMF), gerando os derivados (GCPS-P). Foram empregados diferentes volumes de ácido clorossulfônico (7 e 13 mL) buscando um aumento do teor de grupos sulfato na estrutura do polissacarídeo. A sulfatação foi confirmada pelo aparecimento de uma banda intensa em 1250 cm^{-1} no espectro de absorção na região do infravermelho. A cromatografia de permeação em gel revelou que das gomas sulfatadas uma (GCPS-O7) preservou a mesma ordem de grandeza da massa molar de pico da GCP. As demais tiveram suas massas reduzidas em até 100 vezes. Após a sulfatação, o potencial zeta torna-se mais negativo indicando um aumento de grupos sulfato. Os espectros de RMN de ^1H mostram que a razão manose:galactose aumentou para os derivados sulfatados, indicando que durante a reação de sulfatação ocorreu a saída de unidades de galactose da estrutura do polissacarídeo. A sulfatação realizada com Py resultou em grau de sulfatação 1,7 vezes maior do que a ocorrida em DMF. Porém é razoável a busca por melhorar a reação com DMF, já que a piridina além de ser mais tóxica possui odor muito desagradável. Os testes antimicrobianos mostraram que a galactomanana sulfatada não apresentou atividade antifúngica, porém a galactomanana não modificada manifestou efeito fungistático contra *Colletotrichum sp.* Em vista desses resultados se faz necessária uma investigação mais detalhada da atividade antifúngica da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*, pois esse efeito foi inusitado.

Palavras-chave: *Caesalpinia pulcherrima*. Galactomanana. Sulfatação. Piridina. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The present work aims at the sulfation of *Caesalpinia pulcherrima* galactomannan (GCP). Two methods were used for sulfation, one with the use of pyridine (Py), generating GCPS-O derivatives, and the another with use of N,N-dimethylformamide (DMF), generating derivatives (GCPS- P). Different amounts of chlorosulfonic acid (7 and 13 mL) were used seeking for an increase in the content of sulfate groups on the polysaccharide structure. The sulfation was confirmed by the appearance of an intense band at 1250 cm^{-1} in the absorption spectrum in the infrared region. The gel permeation chromatography revealed that GCPS-O7 preserved the same order magnitude of peak molar mass of the GCP. The others had masses reduced up to 100 times. After sulfation, zeta potential becomes more negative, indicating an increase of sulfate groups. The ^1H NMR spectra show that the ratio mannose: galactose increased to sulfated derivatives, indicating that during sulfation reaction occurred output galactose units of polysaccharide structure. The sulphation performed with Py resulted in a degree of sulfation greater than 1.7 times that occurred in DMF. However it is reasonable to search for improving the reaction with DMF, because pyridine as well as being more toxic has very unpleasant odor. Antimicrobial tests showed that the sulfated galactomannan presented no antifungal activity, but the unmodified galactomannan expressed fungistatic effect against *Colletotrichum sp.* In view of these results a more detailed investigation of the antifungal activity of galactomannan *Caesalpinia pulcherrima* is necessary, because this effect was unusual.

Keywords: *Caesalpinia pulcherrima*. Galactomannan. Sulfation. Pyridine. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura genérica de um segmento de galactomanana	12
Figura 2	– Corte longitudinal de semente de leguminosa.....	13
Figura 3	– Fotografia das vagens (a) e das sementes (b) de <i>C. Pulcherrima</i>	15
Figura 4	– Representação da reação de sulfatação de monossacarídeo com ácido clorossulfônico (agente sulfatante) e piridina (base).....	18
Figura 5	– FTIR da GCP, GCPS-P7 e GCPS-P13.....	30
Figura 6	– FTIR da GCP, GCPS-O7 e GCPS-O13.....	31
Figura 7	– Termogramas das gomas GCP, GCPS-P7, GCPS-O7 e GCPS-O 13.....	32
Figura 8	– Curvas de DTG das gomas GCP, GCPS-P7, GCPS-O7 e GCPS-O 13.....	33
Figura 9	– Cromatogramas para GCP, GCPS-O7 e GCPS-O13.....	34
Figura 10	– Cromatogramas para GCP, GCPS-P7 e GCPS-P13.....	35
Figura 11	– Espectro de RMN ¹ H para GCP.....	37
Figura 12	– Espectro de RMN ¹ H da GCPS-P7.....	37
Figura 13	– Espectro de RMN ¹ H da GCPS-O13.....	38
Figura 14	– Espectro de RMN bidimensional da GCP (a) e seus derivados GCPS-P7 (b) e GCPS-O 13 (c).....	38
Figura 15	– Placa de <i>Colletotrichum sp.</i> após 5 dias de incubação.....	40
Figura 16	– Placa de <i>S. aureus</i> mostrada de frente (a) e de verso (b) após 3 dias da semeadura da bactéria.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Aplicações da galactomanana de <i>C. pulcherrima</i>	17
Tabela 2	– Atividade antifúngica e elicitora de polissacarídeos Sulfatados.....	20
Tabela 3	– Condições experimentais da reação de sulfatação.....	24
Tabela 4	– Parâmetros operacionais do ICP OES.....	27
Tabela 5	– Relação entre HClSO ₃ /UGCP, grau de sulfatação e rendimento reacional.....	29
Tabela 6	– Atribuições das bandas no FTIR.....	31
Tabela 7	– Parâmetros de estabilidade térmica das gomas.....	33
Tabela 8	– Massas molares de pico para GCP e derivados sulfatado GCPS-O.....	34
Tabela 9	– Massas molares de pico para GCP e seus derivados sulfatados GCPS-P.....	35
Tabela 10	– Potencial Zeta para soluções 0,1 % de GCP e derivados sulfatados (GCPS-P e GCPS-O).....	36
Tabela 11	– Correlações de sinais para o carbono 6 da galactose (MELO et al., 2002).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido fórmico
CP	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTG	derivada da curva de TGA
<i>et al</i>	e colaboradores
FA	Formamida
FTIR	Espectros de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier
G	Galactose
GCP	Galactomanana de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>
GCPS-O7	Galactomanana de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> sulfatada pelo método Ono et al., 2003 com 7 mL de ácido clorossulfônico
GCPS-O13	Galactomanana de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> sulfatada pelo método Ono et al., 2003 com 13 mL de ácido clorossulfônico
GCPS-P7	Galactomanana de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> sulfatada pelo método Pires et al., 2013 com 7 mL de ácido clorossulfônico
GCPS-P13	Galactomanana de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> sulfatada pelo método Pires et al., 2013 com 13 mL de ácido clorossulfônico
GPC	Cromatografia de permeação em gel
GS	Grau de sulfatação
HC1-Gal	hidrogênio do carbono 1 da galactose
HCISO ₃	ácido monoclorossulfônico
HC1-Man	hidrogênio do carbono 1 da manose
ma	massa da galactomanana antes da sulfatação
MC	massa atômica do carbono
md	massa da galactomanana depois da sulfatação
M	Manose
MS	massa atômica do enxofre
Py	Piridina
PZ	potencial zeta

RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN	Ressonância magnética nuclear
TGA	Análise termogravimétrica
Ti	temperatura inicial de degradação
TMax	temperatura máxima
UGCP	Unidade glicosídica de GCP

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
°C/min	graus Celsius por minuto
%C	porcentagem de carbono
%S	porcentagem de enxofre
mg/L	miligramas por litro
dL/g	decilitro por grama
g/mol	gramas por mol
M/G	razão manose galactose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Galactomananas.....	12
1.2	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	14
1.3	Galactomanana da <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	15
1.4	Polissacarídeos sulfatados e suas aplicações.....	17
1.5	Doenças fúngicas em plantas e polissacarídeos sulfatados.....	19
1.6	Antifúngicos para controle da antracnose.....	21
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Materiais.....	23
3.2	Extração da galactomanana	23
3.3	Sulfatação da galactomanana.....	24
3.4	Caracterização da galactomanana e seus derivados sulfatados.....	25
3.4.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	25
3.4.2	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	25
3.4.3	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	25
3.4.4	<i>Potencial Zeta (PZ)</i>	26
3.4.5	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	26
3.4.6	<i>Análise elementar</i>	26
3.4.7	<i>Atividade antimicrobiana</i>	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1	Extração da galactomanana.....	28
4.2	Sulfatação da galactomanana.....	28
4.3	Caracterização da galactomanana sulfatada.....	29
4.3.1	<i>Cálculo do grau de sulfatação e rendimento</i>	29
4.3.2	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)</i>	30
4.3.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	32
4.3.4	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	33
4.3.5	<i>Potencial Zeta (PZ)</i>	35

4.3.6	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	36
4.3.7	<i>Atividade antimicrobiana</i>	39
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE	53

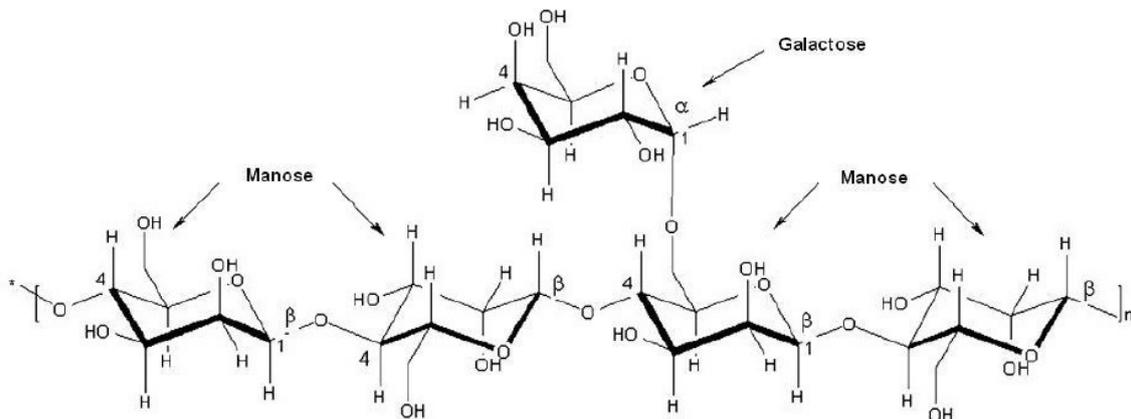
1 INTRODUÇÃO

1.1 Galactomananas

Galactomananas podem ser definidas como polissacarídeos neutros obtidos, geralmente, do endosperma da semente de várias plantas pertencentes à família das leguminosas. A estrutura polimérica de uma galactomanana clássica pode ser entendida como uma sequência de unidades de β -D-manose unidas por ligações do tipo éter 1 \rightarrow 4, formando uma cadeia principal. As ramificações laterais são constituídas por uma unidade de α -D-galactose que se encontra ligada a cadeia principal por meio de uma ligação do tipo 1 \rightarrow 6 (CERQUEIRA et al, 2009).

A representação de um segmento de galactomanana pode ser observada na Figura 1. A quantidade de resíduos de galactose em relação à quantidade de resíduos de manose tem papel fundamental nas propriedades físico-químicas do polímero, principalmente a solubilidade, pois à medida que a razão M/G diminui, a solubilidade aumenta (AZERO e ANDRADE, 1999; SIERAKOWSKI et al., 2000).

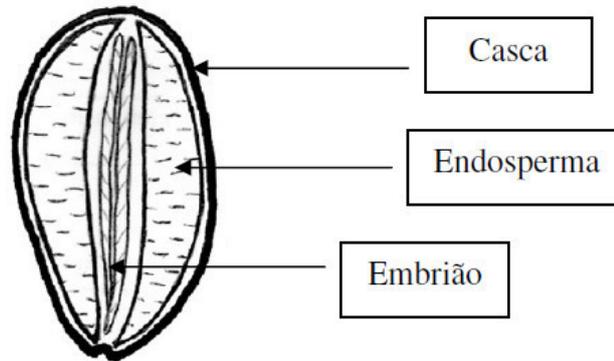
Figura 1 - Estrutura genérica de um segmento de galactomanana



Fonte: adaptado de DAKIA; WATHELET; PAQUOT (2007)

Nas sementes das plantas, além de serem substrato de reserva, as galactomananas também são osmoprotetoras, pois ajustam o potencial osmótico das sementes durante a germinação em resposta a adversidades do meio. A galactomanana regula a hidratação do embrião no intervalo em que a semente não recebe água (MEIR, 1981). As sementes das leguminosas são compostas basicamente por casca, endosperma e cotilédono, como pode ser observado na Figura 2.

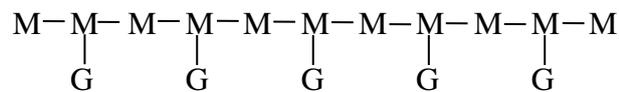
Figura 2 – Corte longitudinal de semente de leguminosa contendo endosperma



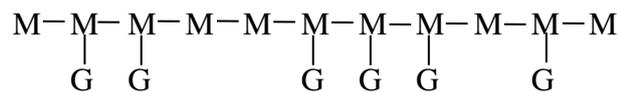
Fonte: adaptado de SECOUARD, GRISEL, MALHIAC (2007)

Para melhor apreciar-se a estrutura das galactomananas tem-se que levar em consideração como os resíduos de galactose (G) se distribuem ao longo da cadeia principal de manose (M). A proposição de Dea e Morrison (1975) de três modos de distribuição dos resíduos galactose ajuda a compreender melhor a estrutura desses polissacarídeos:

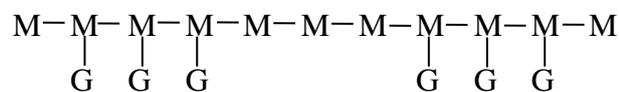
a) Arranjo regular



b) Arranjo irregular



c) Arranjo em blocos



As galactomananas mais utilizadas na indústria de alimentos são: a goma guar de *Cyamopsis tetragonolobus* com razão manose:galactose 1,7:1 e a goma alfarroba de *Ceratonia siliqua* com razão manose:galactose 3:1 (CUNHA, PAULA, FEITOSA, 2009). Na indústria alimentícia, galactomananas podem ser utilizadas como espessante, estabilizante, emulsificante, agente firmador (PRADO et al., 2005). Contudo, o consumo de alimentos que contenham galactomananas pode dificultar o diagnóstico de aspergilose, doença que afeta o trato respiratório e é causada por fungos do gênero *Aspergillus*. O paciente suspeito deve

interromper o consumo de galactomananas, pois os sinais clínicos e radiológicos para detecção da aspergilose podem ser muito inespecíficos e a galactomanana torna positivo o teste (ACETI, CORVAGLIA e FALDELLA, 2008).

Na indústria de cosméticos, as galactomananas são utilizadas em fixadores de cabelo, cremes e outros produtos de beleza e na farmacêutica em emulsões, pastilhas e outros preparos (MANTELL, 1990). Há também constatações de galactomananas modificadas com atividade contra os vírus da febre amarela (ONO et al., 2003) e da herpes (CHRESTANI et al., 2009).

1.2 *Caesalpinia pulcherrima*

A *Caesalpinia pulcherrima* (CP) é uma planta ornamental de pequeno porte que pode atingir de 3 a 4 metros de altura na fase adulta. Pertence a família *Leguminosae* e é conhecida popularmente como flamboyanzinho, flor-de-pavão, orgulho-de-barbados, flor-do-paraíso, chagueira, barba de barata ou brio de estudante (EUFRÁSIO et al., 2009). No Brasil, a CP encontra as condições necessárias ao desenvolvimento de seus frutos e sementes, que são produzidos em grande quantidade e durante o ano inteiro (LORENZI et al., 2003). Suas sementes apresentam altas porcentagens de germinação em uma larga faixa de temperatura (15 a 40°C). A faixa ótima encontra-se entre 20 e 40°C e a temperatura ótima é 35°C (FONSECA, JACOBI, 2011).

Índios da floresta amazônica conhecem essa planta e a denominam de ayoowiri. O suco das folhas é usado para combater a febre. O suco das flores é utilizado para tratar feridas. E o das sementes para o tratamento de tosse, dificuldades respiratórias e dores torácicas. As raízes dessa árvore apresentam propriedades abortivas (PATEL et al., 2010). Yodsoue et al. (2011) isolaram das raízes dessa planta quinze novos diterpenos do tipo cassane e oito compostos já conhecidos. Dos vinte e três compostos isolados, quatorze apresentaram potente atividade anti-inflamatória. Da parte aérea da CP extraíram-se flavonóides que apresentaram de moderada a boa atividade bactericida e moderada atividade antifúngica (SRINIVAS et al., 2003). Sudhakar et al. (2006) verificaram que o extrato etanólico de frutos (Figura 3a) de CP possui atividade antibacteriana e antifúngica. As fotografias das vagens e das sementes dessa planta podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Fotografia das vagens (a) e das sementes (b) de *C. Pulcherrima*



Fonte: O próprio autor

Das sementes (Figura 3b) é possível extrair uma mucilagem que pode servir para a indústria farmacêutica como excipiente em mucoadesivo oral para liberação controlada de fármacos (SUDARSHAN, et al. 2010).

1.3 Galactomanana da *Caesalpinia pulcherrima*

Azero e Andrade (1999) extraíram e caracterizaram galactomanana das sementes de CP coletadas no estado do Rio de Janeiro. A galactomanana apresentou razão manose/galactose igual a 3,1, massa molar viscosimétrica média com valor de $1,7 \times 10^6$ g/mol e viscosidade intrínseca de 11,2 dL/g (em água a 25 °C). A composição da goma depois de purificada foi a seguinte: 90% de galactomanana, 9,1% de umidade, 0,6% de proteína e 0,3% de cinzas. Os autores destacaram que a viscosidade intrínseca calculada (11,2 dL/g) foi superior a maior dentre aquelas indicadas para amostras comerciais de goma guar (10,0 dL/g), a galactomanana comercial mais utilizada (Apud. DOUBLIER; LAUNAY, 1981).

Alves (2013) analisou a viscosidade intrínseca da galactomanana de CP (9,20 dL/g), *Adenanthera pavonina* (6,58 dL/g), *Delonix regia* (8,11 dL/g), *Tamarindus indica* (5,32 dL/g), *Mucuna sloanei* (7,28 dL/g) e *Hymenae courbaril* (6,74 dL/g), e constatou que a galactomanana de CP apresentou maior viscosidade entre as seis espécies de plantas avaliadas.

Azero e Andrade (2002) observaram que métodos de purificação que utilizam filtração reduzem a viscosidade intrínseca das soluções de galactomananas (0,5 g/L) de *Cassia javanica* e de goma alfarroba quando comparados com os métodos que utilizam centrifugação. Porém, a galactomanana de CP não tem sua viscosidade intrínseca reduzida durante a filtração, mesmo as três galactomananas possuindo semelhantes razões

manose/galactose (M/G). A redução da viscosidade intrínseca indica diminuição do volume hidrodinâmico.

Reduções de volumes hidrodinâmicos de macromoléculas de polissacarídeos causadas pela filtração devem ser consideradas em caracterizações por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), pois antes de serem injetadas as soluções são filtradas. Azero e Andrade (2002) sugeriram que esse comportamento das galactomananas se deve as suas estruturas finas. A estrutura fina da galactomanana de CP revela distribuição de ramificações de galactose, em grande parte estatisticamente aleatória (DEA, CLARK, MCCLEARY, 1986).

Cerqueira et al. (2009) constataram que a galactomanana de CP possui a seguinte composição monossacarídica: 69,1% de manose, 24,0% de galactose, 0,8% de ramnose, 0,8% de fucose, 3,0% de arabinose, 1,2% de xilose e 1,2% de glucose. Seu grau de polimerização de manose e seu grau de ramificação de galactose, encontrados por Cerqueira et al. (2011), foram, respectivamente, 252 e 0,60.

Andrade et al. (1999) verificaram que a galactomanana de CP (GCP) possui viscosidade em solução aquosa semelhante à da galactomanana de *Ceratonia siliqua* que é, ao lado da goma guar, extensamente isolada para fins comerciais. Cerqueira et al. (2009) combinaram GCP com glicerol para formulação de cobertura comestível de seriguela. Franca et al. (2012) adicionaram a mesma em suco de caju e não verificaram alterações significativas no conteúdo de vitamina C, no pH e nas características microbiológicas. Houve mudança apenas na aparência e na viscosidade do suco, que se tornou mais espesso. Essa galactomanana, quando hidrolisada parcialmente, pode ser utilizada para melhorar a qualidade nutricional e sensorial de bebidas probióticas fermentadas à base de leite de cabra e soro de queijo (BURITI et al., 2014). Também pode ser utilizada como modificadora de viscosidade e agente espessante, tanto na indústria de alimentos como na indústria farmacêutica devido as suas características reológicas (THOMBRE, GIDE, 2013). O uso da GCP como espessante e estabilizante foi patenteado por Renato de A. Moreira (2011).

Soluções de GCP, preparadas em água à temperatura ambiente, foram expostas em ambiente contaminado por fungo por 30 minutos. Após 72 horas não se constatou a presença de colônias de fungos visíveis a olho nu. A solução de galactomanana de *Parkinsonia aculeata*, que também foi exposta ao mesmo ambiente apresentou muitas colônias do fungo (MESQUITA et al., 2002).

Na Tabela 1 podem-se observar as aplicações da GCP em diversas áreas.

TABELA 1 – Aplicações da galactomanana de *C. pulcherrima*

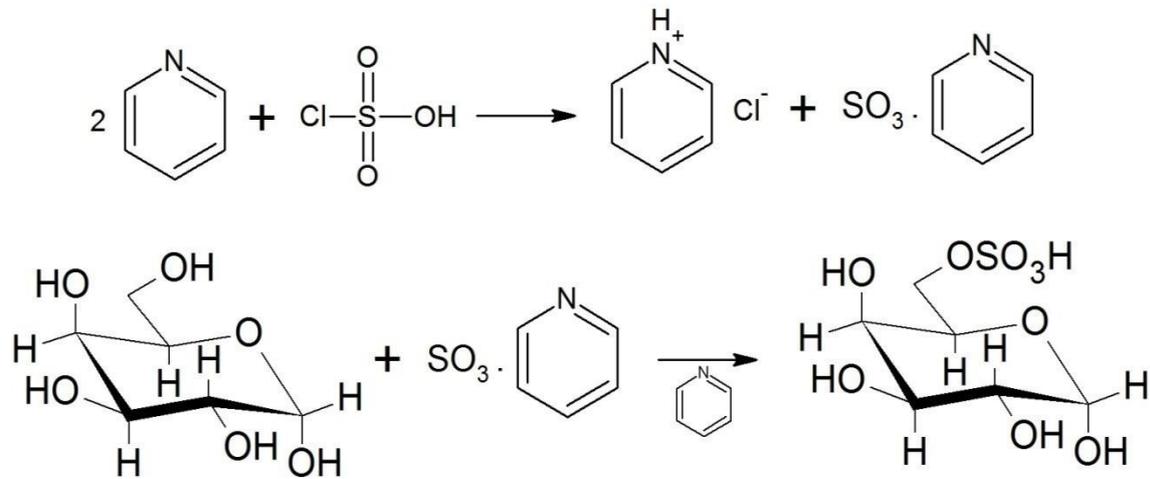
Aplicação da GCP	Referência
Coberturas para frutas	CERQUEIRA et al., 2009, LIMA et al., 2010
Espessante em suco de caju	FRANCA et al., 2012
Qualidade sensorial em bebidas probióticas	BURITI et al., 2014
Revestimento de queijo coalho	TEIXEIRA et al., 2010
Substituto a gordura em alimento	AZEVEDO et al., 2012
Matriz cromatográfica	GARROS-ROSA, SILVA, SANTANA, 2002

1.4 Polissacarídeos sulfatados e suas aplicações

Polissacarídeos sulfatados podem ser encontrados em algas e animais. Estão presentes na parede celular de algas, como *fucoïdan* e carragenanas, e em animais, na matriz extracelular de tecidos, como fluido sinovial, ligamento e cartilagem (APUD RASHID et al., 1990). Devido às propriedades biológicas dos polissacarídeos sulfatados, é válido realizar a sulfatação química desses biopolímeros para estudo das potenciais aplicações dos derivados (CUNHA, 2006).

O esquema da reação de sulfatação de polissacarídeos está representado na Figura 4. Nela observa-se primeiramente a formação do complexo piridina-trióxido de enxofre, que na etapa seguinte reage com a hidroxila do carbono 6 da unidade monossacarídica para finalizar a sulfatação. Se a base utilizada na reação for dimetilformamida, a mesma substitui a piridina no esquema e o complexo dimetilformamida-trióxido de enxofre é formado.

Figura 4 – Representação da reação de sulfatação de unidade monossacarídica com ácido clorossulfônico (agente sulfatante) e piridina (base)



Fonte: o próprio autor

Os reagentes que geralmente são utilizados para sulfatar polissacarídeos são: ácido monoclorossulfônico em piridina (GERESH, MAMONTOV, WEINSTEIN, 2002), ácido *N*-sulfônico em piperidina (YOSHIDA, NAKASHIMA, YAMAMOTO, URYU, 1993), ou complexo de piridina-trióxido de enxofre (WU et al., 1998). Os solventes usados frequentemente são: formamida (FA), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO) e piridina (YANG et al., 2003).

Polissacarídeos sulfatados possuem várias aplicações, dentre as quais: anticoagulante (ALBAN et al., 2000), antitrombótico (BUCHANAN, BRISTER, 2000), antiviral (AMORNRUT et al., 1999), antiinflamatório (WINKELHAKE, 1991), inibidores de angiogênese (PAPER, VOGL, FRANZ, HOFFMAN, 1995), antiproliferativo de células cancerosas (HOFFMAN, PAPER, 1993).

Alguns autores realizam a sulfatação de galactomananas com o objetivo de verificar suas propriedades biológicas. Pires et al. (2001) verificaram que a galactomanana de *Senna macranthera* sulfatada possui atividade anticoagulante. Monteiro (2014) observou que a GCP quando sulfatada apresenta propriedade anticoagulante semelhante à da heparina. Gemim (2008) e Chrestani et al. (2009) demonstraram que a goma guar sulfatada manifesta atividade contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Ono et al. (2003) concluíram que as galactomananas sulfatadas de *Mimosa scabrella* e *Leucaena leucocephala* têm atividade contra os vírus da febre amarela e da dengue. Hussein, Helmy e Salem (1998) mostraram que

galactomananas de *Leucaena sp.*, *Medicago sativa*, *Glycine Max* e *Phoenix dactylifera* têm as suas atividades fibrinolíticas melhoradas quando sulfatadas. Wang et al. (2012) demonstraram que a galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus* possui grande poder antioxidante quando sulfatada em alto grau e com baixas massas molares.

1.5 Doenças fúngicas em plantas e polissacarídeos sulfatados

A seca da mangueira, oídio, morte descendente ou seca de ponteiros, malformação floral e vegetativa e antracnose, são as principais doenças fúngicas que afetam mangueiras na região do Submédio São Francisco (Bahia). A seca da mangueira é causada pelo fungo *Ceratocystis fimbriata* e pode ser letal para a planta. O fungo *Oidium mangiferae* é o causador do oídio, doença que causa sérios abortamentos de flores. A morte descendente causa queima de inflorescência, abortamentos de frutos e podridão penduncular. O fungo causador é *Lasiodiplodia theobromae*. Malformação floral e vegetativa pode ocasionar perdas de produção de até 86%. *Fusarium subglutinans* é o fungo causador (BATISTA, 2010). A antracnose causa a formação de manchas negras irregulares na casca da manga que podem crescer e cobrir toda superfície do fruto. A infecção ocorre no campo. Entretanto, os fungos podem permanecer em quiescência até que haja condições ideais para seu desenvolvimento (PLOETZ, 2003). Os fungos causadores são espécies do gênero *Colletotrichum*, dentre as quais encontram-se *C. asianum*, *C. dianesei*, *C. fructicola*, *C. karstii* e *C. tropicale*.

Na literatura consta referência a dois modos de ação de polissacarídeos sulfatados contra agentes causadores de doenças fúngicas em plantas. Um é por meio da ação elicitora, aumentando a resistência da planta ao patógeno. E o outro, pela ação antifúngica diminuindo ou eliminando a população de patógenos na planta.

O polissacarídeo sulfatado obtido de *Ulva fasciata* apresentou atividade elicitora contra antracnose de feijão, reduzindo a severidade da doença em 38% (PAULERT et al. 2009). Galactanas sulfatadas denominadas carragenanas extraídas de *Gigartina acicularis* e *Gigartina pistilla* (algas vermelhas) manifestaram atividade elicitoras em folhas de fumo 24 horas após a aplicação (MERCIER et al., 2001). Mercier et al. (2001) levantaram a hipótese da relação entre o elevado teor de grupos sulfato na λ -carragenana com sua atividade elicitora. Borsato (2009) observou redução do diâmetro das pústulas de *Uromyces appendiculatus* em plantas de feijão após a pulverização das mesmas com polissacarídeo sulfatado extraído de

Ulva fasciata. Este também foi capaz de reduzir o crescimento de lesões de antracnose em feijoeiro (FERNANDES, 2007).

Polissacarídeos sulfatados extraídos da pele dos peixes *gray triggerfish* (PSGT) e *smoothhound* (PSSH) manifestaram atividade antifúngica. Tanto PSGT como PSSH exibiram boa atividade contra *Alternaria solani* (KRICHEN et al., 2015). Este fungo causa pintas pretas em tomateiros e Abreu (2006) sugere seu controle por meio de óleos essenciais. PSGT apresentou atividade moderada contra *Fusarium solani* (KRICHEN et al., 2015) que causa podridão vermelha da raiz em cultivo de soja e é estudado por Guimarães (2010) com foco na soja brasileira. Polissacarídeos sulfatados obtidos a partir da pele de *Loligo vulgaris* (uma espécie de lula) revelaram atividade fungicida moderada contra *Fusarium solani* e *Botrytis cinerea* e boa contra *Alternaria solani* (ABDELMALEK, 2015). *Botrytis cinerea* causa doença do mofo cinzento em diversos alimentos de origem vegetal como repolho, alface, brócolis, feijão, uva, morango e framboesa (WILLIAMSON, 2007). Na Tabela 2 constam alguns polissacarídeos sulfatados e suas atuações no controle de doenças de plantas.

Tabela 2 – Atividade antifúngica e elicitora de polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeo	Atividade	Patógeno	Planta	Referência
Carragenana		<i>Phytophthora parasitica var.</i>	Tabaco	MERCIER et al., 2001
Ulvana	Elicitora	<i>Colletotrichum</i>	Feijoeiro (Antracnose)	PAULERT et al., 2009, FERNANDES, 2007
		<i>Uromyces appendiculatus</i>	Feijoeiro	BORSATO, 2009
Gray triggerfish			Tomateiro	KRICHEN et al., 2015
Smoothhound		<i>Alternaria solani</i>		KRICHEN et al., 2015
Gray triggerfish	Fungicida	<i>Fusarium solani</i>	Soja	KRICHEN et al., 2015
Loligo vulgaris		<i>Botrytis cinérea</i>	Videira	ABDELMALEK, 2015

1.6 Antifúngicos para controle da antracnose

No controle da antracnose são utilizados os seguintes fungicidas: Tiofanato-metílico, Azoxistrobina, Difeconazol, Hidróxido de cobre, Imazalil, Mancozeb, Mancozeb + oxiclreto de cobre, Oxiclreto de cobre, Óxido Cuproso, Piraclostrobina, Procloraz, Trifloxistrobina, Tebuconazol, Tetraconazol Tiabendazol e Tiofanato metílico (AGROFIT, 2009).

Dinamarca, Estônia, Finlândia, Noruega e Suécia desenvolveram um projeto (A Nordic Project) que visava analisar amostras de frutas e vegetais importados da América do Sul. Foram detectados nesses alimentos 37 pesticidas com frequência maior que 1%. Tiabendazol, Imazalil e Procloraz, fungicidas usados em pós-colheita, foram encontrados em frutas e oleráceas, indicando a necessidade de monitoramento contínuo de resíduos de pesticidas (HJORTH, 2011).

Sopeña e Bending (2013) estudaram o uso de biocarvão como sequestrante de Azoxistrobina, que é geralmente degradado lentamente no solo (GOSH e SINGH, 2009). Lucini, Magistrati, Molinari (2009) relataram que difeconazol não se acumula no solo e Mohapatra (2015) constatou o mesmo a respeito de outros fungicidas como trifloxistrobina e tebuconazol. Contudo é conveniente monitorar o destino dos fungicidas aplicados, pois o tebuconazol apareceu na concentração em média de 0,035 mg/L em águas superficiais da Argentina. Esse fungicida foi detectado em 72% das amostras de água analisadas (GERONIMO, 2014). Nos países da América do Sul há escassez de recursos e a legislação é pouco rigorosa. Além disso, programas de formação de técnicos e equipamentos muitas vezes não existem (HJORTH, 2011). Echeverría-Sáenz et al. (2012) demonstraram os efeitos fisiológicos prejudiciais de fungicidas triazois (como piraclostrobina e Tiabendazol) em peixes do rio Jiménez (Costa Rica) que se localiza nas proximidades de uma plantação de abacaxi que é tratada com agroquímicos. Aos fungicidas presentes nas águas foram atribuídos os elevados níveis de peroxidação lipídica nos peixes. Clorofenil é um fungicida capaz de matar anfíbios e sua ação está associada ao aumento dos níveis de corticosterona e abaixamento da imunidade (MCMAHON et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Síntese e caracterização de galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* sulfatada e avaliação da sua atividade antifúngica.

2.2 Objetivos específicos

- Extrair e caracterizar a galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*.
- Sulfatar a galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* por dois métodos.
- Caracterizar a galactomanana sulfatada.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da galactomanana antes e após a sulfatação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A galactomanana foi isolada de sementes de CP colhidas no distrito de Flores em Russas-CE, em agosto de 2013. Para isolamento da galactomanana utilizou-se água destilada, etanol e acetona (Synth). Os reagentes usados na sulfatação segundo Pires et al. (2013) são os que seguem: N,N-dimetilformamida (DMFA) (Dinâmica, Química Contemporânea LTDA), ácido fórmico (Synth), ácido monoclossulfônico (Vetec química fina LTDA), etanol e hidróxido de sódio (Vetec química fina LTDA). Os reagentes usados na sulfatação segundo Ono et al. (2003) são os seguintes: piridina (Vetec), formamida (Vetec), ácido monoclossulfônico e bicarbonato de sódio (Vetec química fina LTDA). Para diálise foi utilizada membrana com limite de massa molar de aproximadamente 12400 g/mol (Sigma-Aldrich).

3.2 Extração da Galactomanana

As sementes de CP (100 g) foram lavadas e colocadas em uma placa de Petri forrada com algodão umedecido em água destilada e sobrepostas por outra camada de algodão umedecido. A placa foi colocada em autoclave durante 30 minutos sob pressão de trabalho (1,0 a 1,5 kgf/cm²) para o intumescimento das sementes. As mesmas tiveram suas partes (tegumento, endosperma e cotilédone) separadas manualmente. O endosperma foi triturado em água destilada, a mistura foi centrifugada a 6000 rpm por 30 minutos a 25°C e o sobrenadante foi coletado e precipitado em dois volumes de etanol. O precipitado foi retido em funil de placa sinterizada n° 3, lavado quatro vezes com álcool e duas vezes com acetona. A galactomanana foi macerada e seca em almofariz com ar quente, e armazenada à temperatura ambiente (LIMA, 2012).

A Tabela 3 mostra as condições das reações de sulfatação.

Tabela 3 – Condições experimentais da reação de sulfatação

Amostra*	Base	Solvente	Vol. de HClSO ₃ (mL)
GCPS-P7	DMF	DMF/AF	7
GCPS-P13	DMF	DMF/AF	13
GCPS-O7	Py	Py/FA	7
GCPS-O13	Py	Py/FA	13

*A massa da amostra de GCP foi mantida em 1,0 g

3.3 Sulfatação da galactomanana

A reação de sulfatação da GCP foi realizada por meio de dois métodos:

- a) Pires et al. (2013) – Adicionaram-se 30 mL de N, N – dimetilformamida (DMF) a 1,00 g de galactomanana de GCP e manteve-se o sistema sob agitação por doze horas. Filtrou-se a suspensão em funil de placa sinterizada n° 3 para retirar o excesso de solvente. Preparou-se o complexo colocando-se 50 mL de DMF em um erlenmeyer (125 mL). O sistema foi posto em banho de gelo. Quando o DMF atingiu a temperatura de 4°C adicionou-se 7 mL de ácido monoclossulfônico (HClSO₃) gota a gota. Retirou-se o sistema do banho-de-gelo para que o mesmo atingisse a temperatura ambiente. Colocou-se o polissacarídeo solvatado em 50 mL de DMF mais 2 mL de ácido fórmico (AF) e adicionou-se o complexo sulfatante. Deixou-se a reação ocorrer por 3 horas com agitação. Precipitou-se a mistura em 700 mL de etanol, o polissacarídeo sulfatado foi retido sob vácuo em funil de placa sinterizada n° 3 para ser lavado em etanol. Retirou-se o excesso de etanol do material ainda no funil. Dissolveu-se o mesmo em 200 mL de água destilada e ajustou-se o pH para 7,0 com hidróxido de sódio (NaOH 20 % m/v). Filtrou-se a mistura para retirar o material que não se dissolveu. Dialisou-se a solução filtrada contra água destilada com trocas diárias por três dias, tempo necessário para a condutividade da água de diálise se igualar à condutividade da água destilada. A solução dialisada foi liofilizada, obtendo-se a galactomanana sulfatada que foi denominada GCPS-P 7. O procedimento foi repetido para outra amostra de galactomanana, modificando somente o volume de ácido monoclossulfônico para 13 mL, obtendo-se o derivado GCPS-P 13.

b) Ono et al. (2003) - Uma mistura de 160 mL de piridina e 30 mL de formamida foi adicionada a 1,00 g de GCP e mantida sob agitação a 25° C por 12 horas até obter-se uma suspensão finamente dispersa. Resfriou-se a solução a 4°C e adicionou-se lentamente 7 mL de HClSO₃. Deixou-se a mistura sob agitação por vinte e quatro horas a 4°C. A solução resultante foi neutralizada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e dialisada contra água destilada com trocas de dois em dois dias por 10 dias, tempo necessário para que a condutividade da água de diálise se igualasse à da água destilada. A galactomanana sulfatada foi liofilizada e obteve-se a GCPS-O7. Depois se repetiu o mesmo procedimento usando-se 13 mL, obtendo-se a GCPS-O13.

3.4 Caracterização da galactomanana e seus derivados sulfatados

3.4.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho das galactomananas bruta e sulfatadas foram obtidos em pastilhas de KBr em equipamento FTIR Shimadzu 8300, na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹.

3.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica dos polissacarídeos foi realizada em equipamento modelo Q50 da TA Instruments em atmosfera de ar sintético com um fluxo de 40 mL/min em cadinho de alumina. Foi usada uma taxa de aquecimento de 10°C/min em uma faixa de 25 a 800 °C.

3.4.3 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A distribuição de massa molar foi determinada por GPC em equipamento Shimadzu LC-20AD acoplado a um detector de índice de refração (RID-10A) e coluna PolyS-GFC-P Linear com dimensões 300x7,8 mm. A fase móvel utilizada foi NaNO_{3(aq)} 0,1 mol/L, à temperatura ambiente e fluxo de 1 mL/min. Para o preparo das soluções de polissacarídeos a 0,1% (m/v), foram colocados 2 mg de goma em 2 mL de NaNO_{3(aq)} 0,1 mol/L e deixou-se sob agitação por 24 horas. As soluções foram filtradas em membrana de celulose. O volume

injetado das amostras foi 50 µL. A massa molar de pico (Mp) da goma não sulfatada foi obtida por meio da equação gerada pela regressão linear utilizando padrões de pululana ($\log Mp = 14,68 - 1,07Ve$). A massa molar de pico dos derivados sulfatados foi obtida por meio da equação gerada pela regressão linear utilizando padrões de Poliestirenosulfonato de sódio ($\log Mp = 13,92 - 0,99Ve$), onde Ve é o volume de eluição em mL.

3.4.4 Potencial Zeta (PZ)

As medidas de potencial zeta foram realizadas em equipamento Zeta Sizer Nano ZS da Malvern, com comprimento de onda do laser de 633 nm e ângulo de detecção de 17°. As soluções com concentração de 0,1 % (m/v) foram preparadas em água deionizada e em seguida filtradas em membrana de celulose. As medições foram feitas à temperatura ambiente.

3.4.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^{13}C e 1H das soluções dos polissacarídeos 0,1 % (m/v) em D₂O foram feitos a 70°C em um espectrômetro com Transformada de Fourier da Bruker Avance DRX 500. Com gradiente multinuclear inverso equipado com uma sonda principal com bobinas de gradiente blindado. 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) foi usado como padrão interno (0.00 ppm for 1H).

3.4.6 Análise elementar

O conteúdo de enxofre das amostras foi determinado por análise elementar através de um Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial) da marca Spectro, modelo Arcos. Os parâmetros operacionais do equipamento constam na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros operacionais do ICP OES

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
	Potência aplicada		1400 W
	Radiofrequência do gerador de RF		27,12 MHz
	Vazão do gás do plasma		12 L min ⁻¹
	Vazão do gás auxiliar		1 L min ⁻¹
	Vazão do gás de nebulização		0,85 L min ⁻¹
	Vazão de introdução de amostra		0,85 L min ⁻¹
	Velocidade da bomba		30 rpm
	Nebulizador		Crossflow

3.4.7 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos polissacarídeos e seus derivados sulfatados foi avaliada pelo método de difusão em ágar conforme a Norma de Desempenho para Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, sugerida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). O meio para o crescimento de *Collototrichum sp.* (25°C/48-72h) foi caldo batata dextrose (Becton Dickinson, USA). A superfície do ágar Mueller-Hinton (Becton Dickinson) foi inoculada com as suspensões de *Collototrichum sp.* Na mesma foram feitos poços com diâmetros internos de 5 mm com o auxílio de um perfurador estéril. Adicionou-se em cada poço 25 µL das soluções de cada amostra do polissacarídeo e dos seus derivados sulfatados (GCP, GCPS-P7, GCPS-P13, GCPS-O7 e GCPS-O13) e na placa de *Collototrichum sp.* colocou-se 25 µL de nistatina (100 000 UI/mL, Laboratório Teuto, BR) em um furo central para servir como controle positivo. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com base na dimensão dos halos de inibição que se formaram ao redor dos poços.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração da galactomanana

O rendimento de extração de galactomanana foi de 17,75%. Alves (2013) obteve rendimento de 18,22%, porém o mesmo ressolubilizou o resíduo do endosperma várias vezes e isso não foi feito neste trabalho. Azero e Andrade (1999) constataram rendimento de 25%, contudo utilizando método diferente no qual as sementes são submetidas à trituração (ao invés de intumescimento) e extração de lipídeos. Com método semelhante a este último Cerqueira et al. (2009) e Sousa (2014) obtiveram rendimento de 25,70 e de 27%, respectivamente.

4.2 Sulfatação da galactomanana

Avaliou-se o efeito da razão molar de ácido monoclorossulfônico/unidade monossacarídica da galactomanana ($\text{HClSO}_3/\text{UGCP}$) no rendimento da reação de sulfatação. Na Tabela 5 pode-se observar que quando se aumenta $\text{HClSO}_3/\text{UGCP}$, o rendimento da reação de sulfatação diminui. Esse comportamento pode ser explicado considerando-se que quanto maior a concentração de ácido monoclorossulfônico na reação, maior a degradação do polissacarídeo em cadeias poliméricas menores. Muitas destas são perdidas durante a diálise que é feita em membrana com limite de massa molar da ordem de $1,24 \times 10^4$ g/mol. Essa perda de massa superaria o ganho proporcionado pela aquisição dos grupos sulfato. Neto (2008) observou também o mesmo comportamento para a goma do cajueiro submetida à sulfatação.

Os rendimentos acima de 100% mostrados na Tabela 2 podem ser atribuídos aos grupos sulfato que entraram na cadeia da galactomanana. Cada mol de grupos de $-\text{SO}_3\text{Na}$ que se liga à estrutura do polissacarídeo contribui com o aumento de aproximadamente 102 gramas na massa da macromolécula, pois para cada mol de $-\text{SO}_3\text{Na}$ (103 g/mol) que se une a galactomanana um mol de H (hidrogênio) (1,00 g/mol) da hidroxila é retirado.

Tabela 5 – Relação entre $\text{HClSO}_3/\text{UGCP}$, grau de sulfatação e rendimento reacional

Amostra*	[Goma]	Reagentes sulfatação	Razão molar		y
	(% m/v)		($\text{HClSO}_3/\text{UGCP}$)	GS	
GCPS-P7	2	DMF/ HClSO_3	17,0	0,51	101
GCPS-P13			31,6	0,31	94
GCPS-O7	0,5	Py/ HClSO_3 ;	17,0	0,82	148
GCPS-O13			31,6	0,87	98

*A massa das amostras foi 1,0 g, y = rendimento

4.3 Caracterização da galactomanana sulfatada

4.3.1 Cálculo do grau de sulfatação e rendimento

O grau de sulfatação dos derivados sulfatados foi calculado com base na quantidade percentual de enxofre e de carbono presentes nas amostras. Essa quantificação foi conseguida por análise elementar em Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES). A equação abaixo descreve as operações para o cálculo do grau de sulfatação.

$$\text{GS} = (\%S/\text{MS})/(\%C/6\text{MC}) \quad \text{onde: GS} = \text{grau de sulfatação}$$

%S= porcentagem de enxofre

MS = massa atômica do enxofre

%C = porcentagem de carbono

MC = massa atômica do carbono

O GS pode ser compreendido como o número de mols de enxofre, que reflete o número de mols de sulfatos, para cada seis mols de carbono, que reflete um mol de unidade monossacarídica da galactomanana. Assim o GS representa a quantidade de mols de grupos sulfatos que está contida em um mol de monossacarídeo (galactose ou manose). Os valores obtidos constam na Tabela 5. Na mesma também se pode observar os rendimentos reacionais que foram calculados por meio da seguinte equação:

$$y = (ma/md) \times 100 \quad \text{onde: } y = \text{rendimento}$$

ma = massa da galactomanana antes da sulfatação

md = massa da galactomanana depois da sulfatação

4.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* (GCP) e dos derivados sulfatados pelo método de Pires et al. (2013) (GCPS-P7 e GCPS-P13) estão mostrados na Figura 5. Bandas características de polissacarídeos, como 3380 cm^{-1} de O-H, 2915 de C-H (RAKHMANBERDYEVA, FILIPPOV, 2011), 1150-950 cm^{-1} de C-O-C de ligação glicosídica e de C-O de álcool primário de estrutura glicosídica (RAZAVI et al., 2014) estão presentes no espectro. A banda em 1640 cm^{-1} pode ser atribuída à água presente na galactomanana na forma de umidade (DODI, HRITCU, POPA, 2011) (Tabela 6).

Figura 5 - FTIR da GCP, GCPS-P 7 e GCPS-P 13

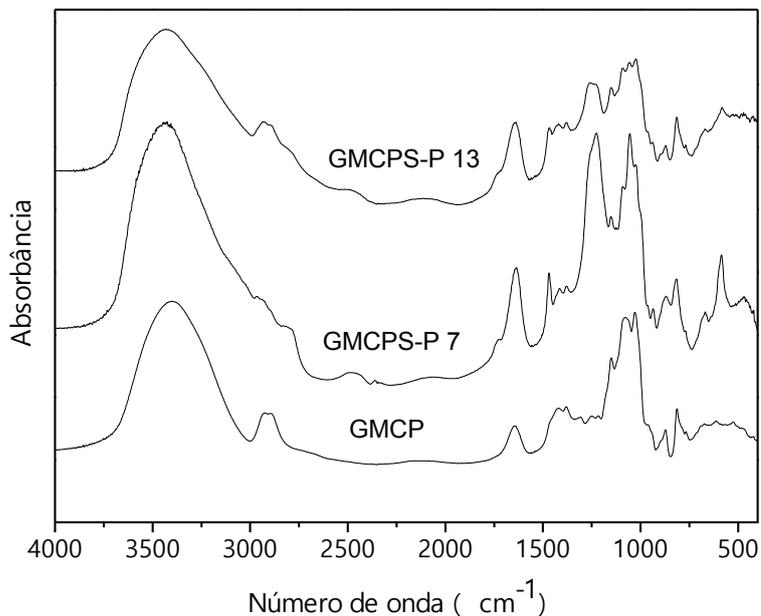
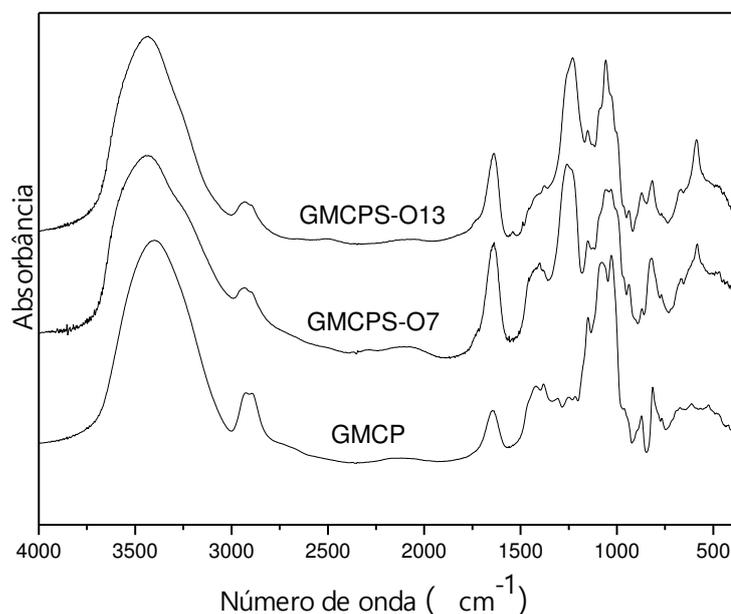


Tabela 6 – Atribuições das bandas no FTIR

Nº de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referência
3433	O-H	(RAKHMANBERDYEVA, FILIPPOV, 2011)
2923	C-H	(RAKHMANBERDYEVA, FILIPPOV, 2011)
1022	C-O de álcool	RAZAVI et al., 2014
1157	C-O-C	RAZAVI et al., 2014
1642	O-H de H_2O	DODI, HRITCU, POPA, 2011
1250	S=O de sulfato	PEYMAN et al., 2011

Nos espectros da Figura 5 pode-se verificar a modificação estrutural ocorrida na GCP após a sulfatação pelo método de Pires et al. (2013). Nota-se que a galactomanana sulfatada apresenta absorção em 1250 cm^{-1} que é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação S=O do grupo sulfato. As bandas contidas no intervalo de 700 cm^{-1} a 400 cm^{-1} são resultantes do alto acoplamento de bandas fracas atribuídas a vibrações de moléculas de água absorvida pelo polissacarídeo (RAKHMANBERDYEVA, FILIPPOV, 2011). Essas bandas aumentam de intensidade no espectro das gomas modificadas devido ao grupo sulfato tornarem a goma mais higroscópica.

Figura 6 - FTIR da GCP, GCPS-O 7 e GCPS-O 13



Os espectros de FTIR da galactomanana não modificada e de seus derivados sulfatados, segundo Ono et al. (2003), são mostrados na Figura 6. As mesmas bandas dos espectros dos derivados sulfatados segundo Pires et al. (2013) constam no espectro dos derivados sulfatados segundo Ono et al. (2003) (Tabela 6). A diferença está na intensidade de bandas referentes aos grupos sulfato e à umidade. A GCPS-P7 e as GCPS-O7 e GCPS-O13 possuem semelhante intensidade da banda em 1250 cm^{-1} .

4.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

O comportamento da massa como uma função da temperatura difere entre um polissacarídeo sem e com grupos sulfato. Por isso foi realizada a análise termogravimétrica da GCP e de seus derivados. Observou-se que os resíduos dos derivados sulfatados são maiores (em porcentagem de massa) que o resíduo da GCP (Figura 7 e Tabela 7). Fazendo-se uma relação com os espectros de absorção na região do infravermelho (Figuras 5 e 6), nota-se que as gomas que apresentaram bandas mais intensas de S=O de sulfato (GCPS-P7, GCPS-O 7 e GCPS-O 13) também apresentaram maiores porcentagens em massa de resíduo (Figura 7 e Tabela 7). E também se observam que as mesmas possuem maiores graus de sulfatação (Tabela 5).

Figura 7 – Termogramas das gomas GCP, GCPS-P7, GCPS-O7 e GCPS-O13

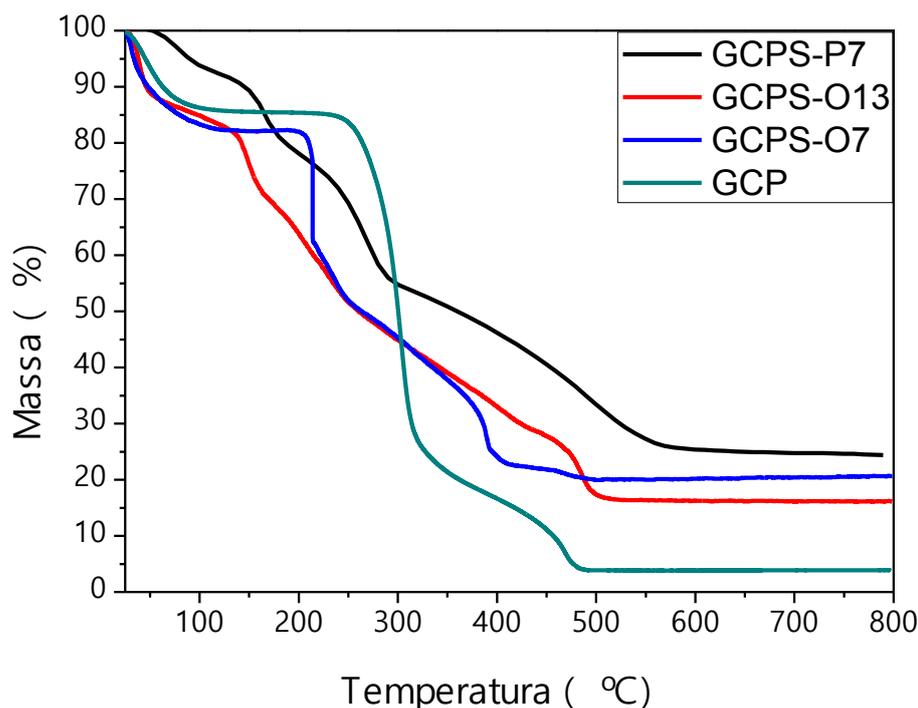
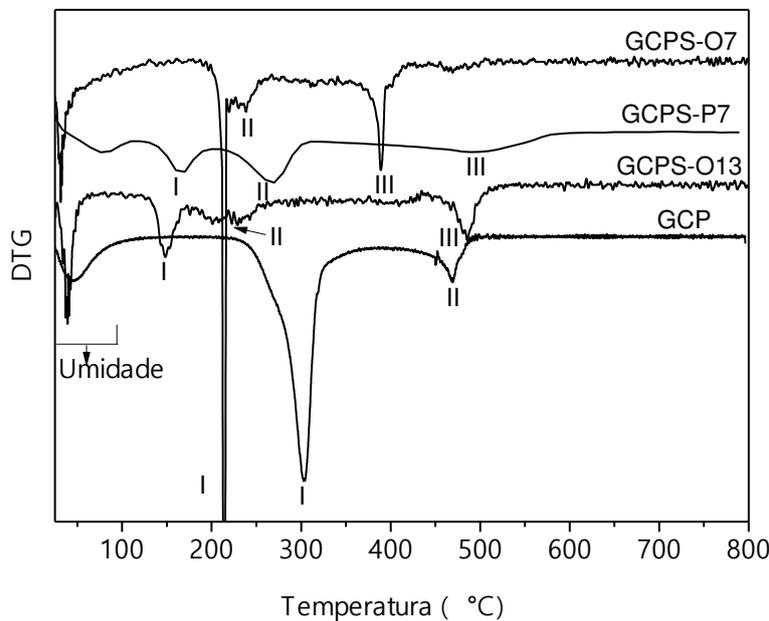


Tabela 7– Parâmetros de estabilidade térmica das gomas

Amostras	Ti (°C)	Tmax (°C)			Resíduo em 800 °C (%)	Umidade (%)
		I	II	III		
GCP	225	303	469	---	3,9	14,3
GCPS-P7	138	166	267	490	24,5	9,9
GCPS-O7	193	213	238	389	20,8	17,8
GCPS-O13	133	147	215	485	16,0	17,0

Na Figura 8 podem-se observar os gráficos de DTG (derivada da curva de TGA) que mostram as temperaturas nas quais ocorrem os eventos de perda de massa dos polissacarídeos. Nela e na Tabela 7 observa-se que as galactomananas sulfatadas possuem mais eventos de transição de massa do que a GCP. E também que os eventos de degradação dos derivados sulfatados ocorrem em temperaturas menores em relação aos da galactomanana não modificada. Esse comportamento que indica diminuição da estabilidade térmica é observado também por Pires et al. (2013).

Figura 8– Curvas de DTG das GCP, GCPS-P7, GCPS-O7 e GCPS-O13



4.3.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As posições dos picos cromatográficos apresentados na Figura 9 mostram que a GCPS-O13 apresenta maior volume de eluição em relação à GCP e a GCPS-O7, que apresentam volumes que eluição muito próximos. Constata-se que na goma sulfatada com 13

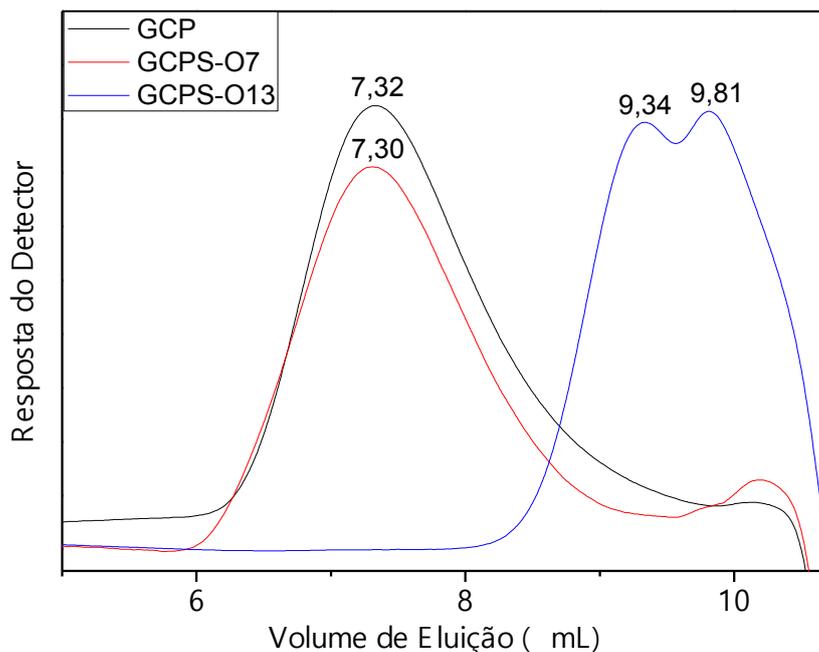
mL de ácido monoclossulfônico ocorreu considerável degradação da cadeia polimérica. A distribuição bimodal observada é indício da degradação, que tem sua magnitude confirmada por meio do cálculo das massas molares de pico apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8: Massas molares de pico para GCP e derivados sulfatados GCPS-O

Amostra	Ve (mL)	Mp (g/mol)
GCP	7,32	$7,0 \times 10^6$
GCPS-O 7	7,30	$4,9 \times 10^6$
GCPS-O 13	9,34	$4,7 \times 10^4$
	9,81	$1,6 \times 10^4$

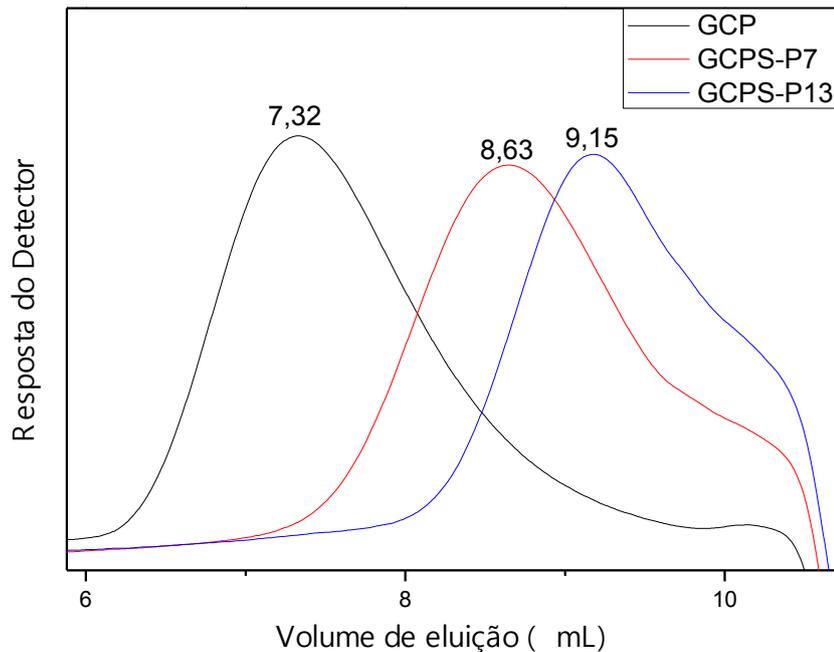
A Tabela 8 também mostra que o derivado sulfatado com 7 mL de ácido monoclossulfônico (GCPS-O 7) possui massa molar de pico com a mesma ordem de grandeza da massa molar de pico da galactomanana não modificada, indicando que houve pouca variação do volume hidrodinâmico depois da sulfatação. Isso significa que o fator que gera diminuição do volume hidrodinâmico (degradação da cadeia polimérica) foi compensado pelo fator que gera aumento do volume hidrodinâmico (entrada dos grupos sulfato).

Figura 9 – Cromatogramas para GCP, GCPS-O 7 e GCPS-O 13



Na Figura 10 pode-se observar que o volume de eluição aumenta com a adição do ácido clorossulfônico, indicando que também ocorreu degradação na goma submetida à sulfatação segundo Pires et al. (2013). Essa degradação foi maior quando se utilizou 13 mL de HClSO_3 .

Figura 10 – Cromatogramas para GCP, GCPS-P7 e GCPS-P13



A degradação da galactomanana pode ser apreciada por meio das massas molares de pico que constam na Tabela 9.

Tabela 9 – Massas molares de pico para a goma e seus derivados sulfatados GCPS-P

Amostra	Ve (mL)	Mp (g/mol)
GCP	7,32	$7,0 \times 10^6$
GCPS-P7	8,63	$2,4 \times 10^5$
GCPS-P13	9,18	$6,8 \times 10^4$

4.3.5 Potencial Zeta (PZ)

A análise do Potencial Zeta foi realizada para ter-se o parâmetro da variação das cargas da galactomanana em solução após passar pelos processos de sulfatação pela metodologia de Pires et al. (2013) e pela metodologia de Ono et al. (2003) (Tabela 10).

Tabela 10 – Potencial Zeta para soluções 0,1 % de GCP e derivados sulfatados (GCPS-P e GCPS-O)

Amostra	PZ (mV)
GCP	-16,8
GCPS-P7	-47,6
GCPS-P13	-38,3
GCPS-O7	-83,1
GCPS-O13	-37,1

Observa-se na Tabela 10 que o potencial zeta das gomas é negativo e é maior para as amostras submetidas à sulfatação. As amostras que foram sulfatadas com maior volume de ácido clorossulfônico (13 mL) apresentaram menores intensidades de cargas que as amostras sulfatadas com (7 mL). Isso indica que as gomas sulfatadas tornam-se mais carregadas negativamente conforme se aumenta a quantidade de agente sulfatante, porém até um limite. Após esse limite, a quantidade de cargas negativas no polissacarídeo diminui. A hipótese para esse comportamento é que a partir de determinado volume de ácido clorossulfônico (HClSO_3) a macromolécula sofra considerável degradação e macromoléculas sulfatadas com massa molar menor que $1,24 \times 10^4$ g/mol (limite da membrana) sejam perdidas para a água de diálise. Essas cargas negativas perdidas refletem no potencial zeta.

4.3.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise por RMN foi utilizada para investigar a estrutura das galactomananas sem e com modificação. Os espectros de RMN ^1H para a amostra não modificada (GCP), sulfatada sem piridina (GCPS-P7), e sulfatada com piridina (GCPS-O13) são apresentados, respectivamente, nas Figuras 12, 13 e 14. A identificação dos picos dos espectros de RMN de ^1H foi conseguida com base nos dados da literatura para galactomananas (KAPOOR et al., 1998; GANTER E REICHER, 1999; RAMESH et al., 2001). A razão manose/galactose (M/G) foi obtida pela razão entre as áreas correspondentes aos hidrogênios anoméricos da manose (4,8 ppm) e da galactose (5,1 ppm). A M/G da galactomanana não modificada (2,19) foi menor que a encontrada por Andrade et al. (1999) (2,83), por Cequeira et al. (2009) (2,88) e por Azero e Andrade (1999) (3,1). Mas ficou muito próxima da razão encontrada por Alves (2013) (2,18). O derivado sulfatado (GCPS-O 13) apresentou M/G (2,76) maior do que a da

galactomanana sem modificação (2,19), sugerindo perda de galactose durante a reação de sulfatação. A amostra GCPS-P7 também apresentou M/G (3,13) superior a M/G da GCP, e superior à da GCPS-O13, indicando maior perda de ramificações de galactose na galactomanana menos sulfatada (GCPS-P7, DS = 0,51) do que na galactomanana mais sulfatada (GCPS-O 13, DS = 0,87).

Figura 11 – Espectro de RMN ^1H para GCP

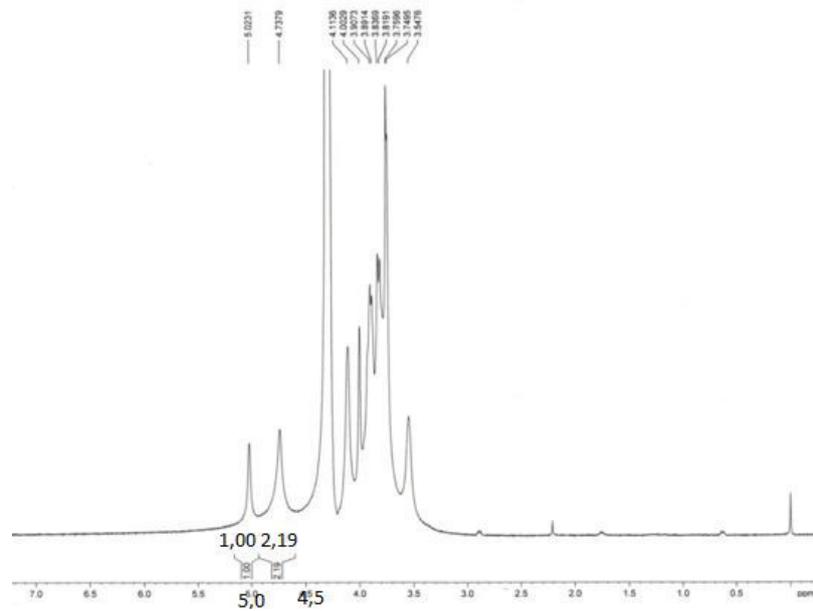


Figura 12 – Espectro de RMN da GCPS-P7

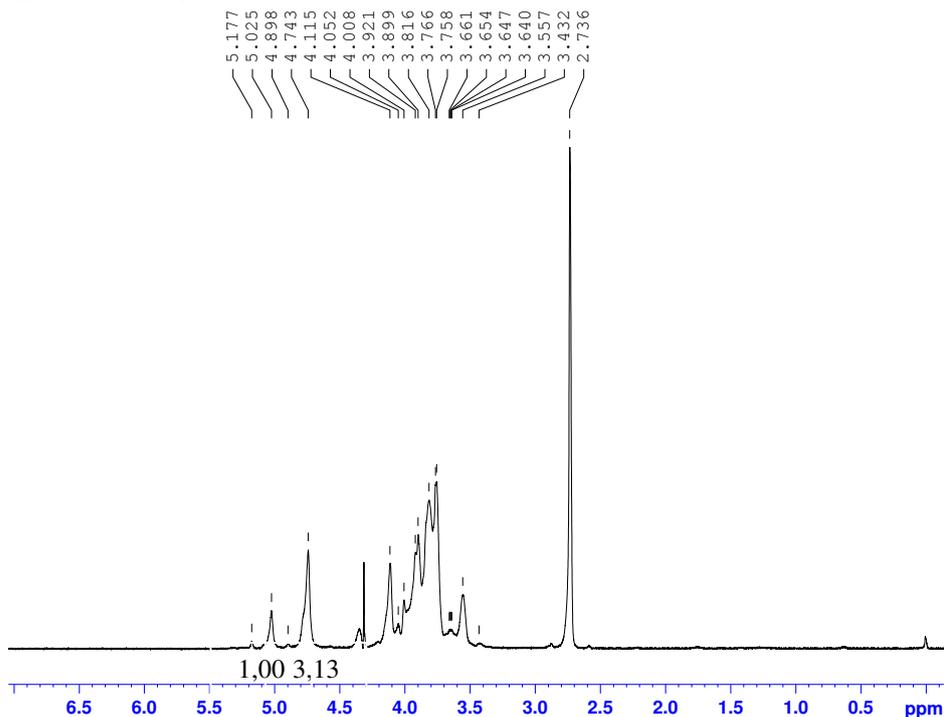
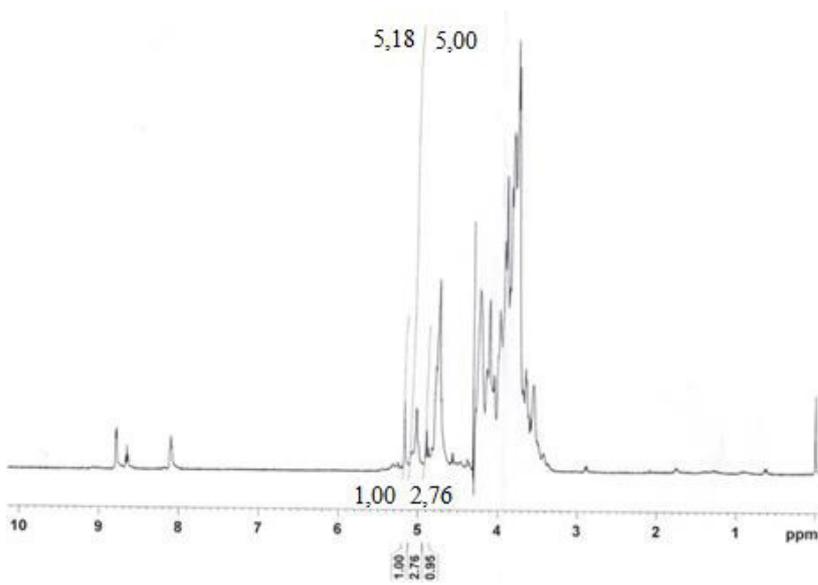
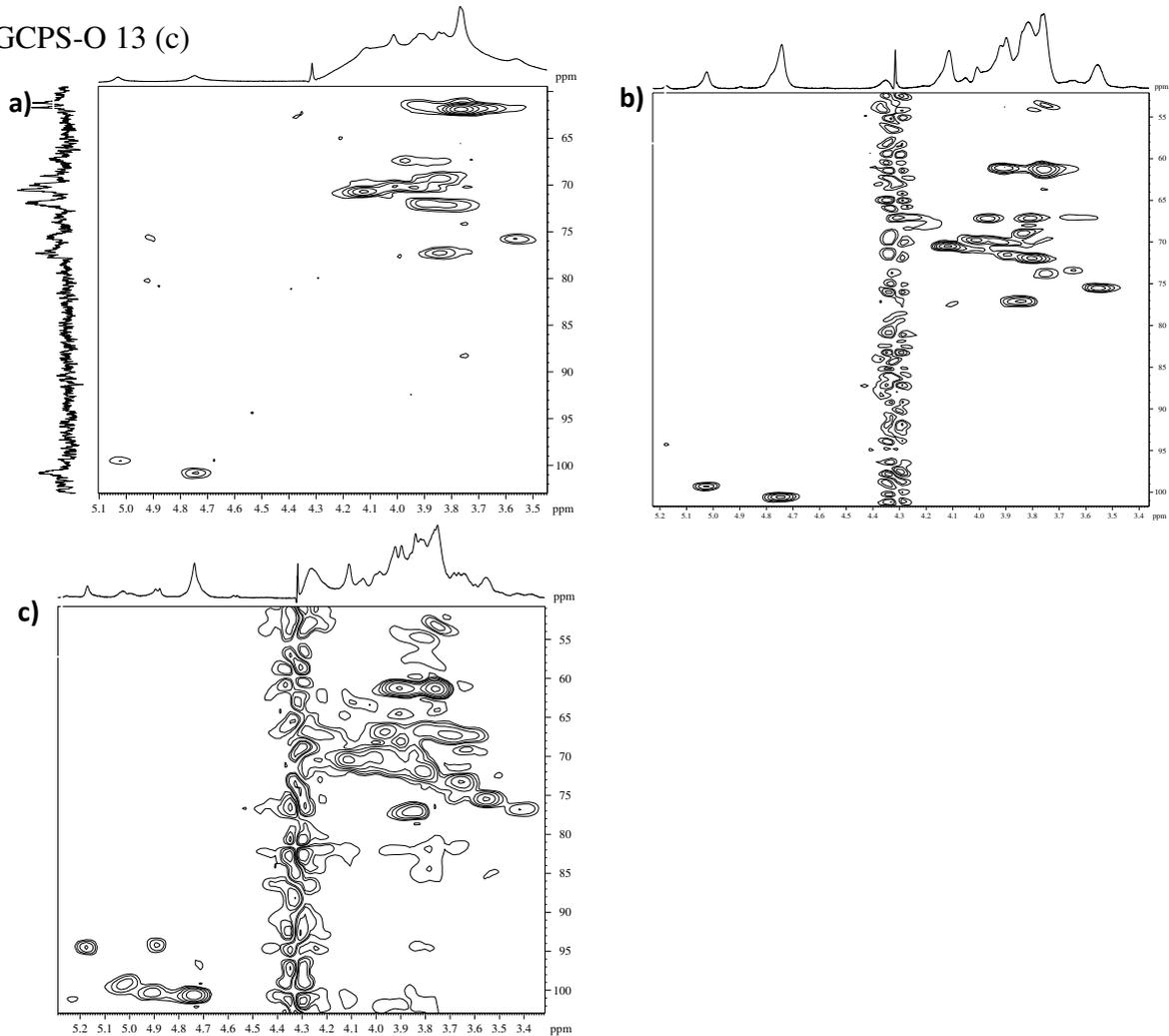


Figura 13 – Espectro de RMN- H^1 da GCPS-O13



A Figura 14 mostra os espectros de RMN bidimensional para a galactomanana e seus derivados sulfatados.

Figura 14 - Espectro de RMN bidimensional da GCP (a) e seus derivados GCPS-P7 (b) e GCPS-O 13 (c)



Na Figura 14 pode se observar que no espectro de RMN bidimensional das galactomananas sulfatadas surge um novo sinal de resíduo substituído, além do sinal do resíduo de manose substituída no carbono 6 por resíduo de galactose (‘Gal 6). O novo sinal foi oriundo da sulfatação da galactose no carbono 6 (“Gal 6) que provocou na GCPS-P7 e na GCPS-O7, respectivamente, um deslocamento de 5,2 e de 5,4 ppm no sinal do carbono 6 da galactose (MELO et al., 2002). Na Tabela 11 observa-se a mudança da correlação para o carbono 6 da galactose.

Tabela 11 - Correlações de sinais para o carbono 6 da galactose (MELO et al., 2002)

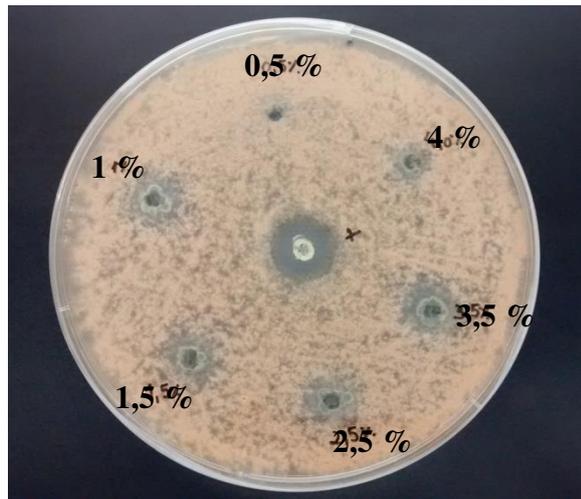
Amostra	Sinal do ^{13}C	Sinal do ^1H
GCP	61,9	3,8
GCPS-P7	67,1	3,8
GCPS-O13	67,3	3,7

A galactomanana após receber grupos sulfato ou aumentar a quantidade dos mesmos passa a apresentar espectro mais complexo (Figura 14) devido aos carbonos diretamente ligados aos sulfatos, que são retiradores de elétrons, terem mudado para posições de campo inferior e aos carbonos ligados indiretamente, terem mudado para mais altas posições de campo (LIU et al., 2009). Na galactomanana mais sulfatada (GCPS-O7) surgiram novos sinais nas vizinhanças dos carbonos anoméricos indicando funcionalização (sulfatação) no carbono 2 (WANG et al., 2013). A nova correlação ($^1\text{H} = 4.9 \text{ ppm}$; $^{13}\text{C} = 100.3 \text{ ppm}$) na GCPS-O7 pode ser atribuída ao carbono 1 da galactose substituída no carbono 2 (“Gal 1), denotando que a proximidade do grupo sulfato está aumentando a blindagem do carbono anomérico da galactose que tem seu sinal (^{13}C RMN) reduzido em 1,1 ppm.

4.3.7 Atividade antimicrobiana

As galactomananas sulfatadas não manifestaram atividade antimicrobiana contra *Colletotrichum sp.*. Porém, a galactomanana não modificada apresentou efeito fungistático que pode ser observado na Figura 15.

Figura 15 – Placa de *Colletotrichum sp.* após 5 dias de incubação.



No centro da placa pode-se observar o efeito do controle positivo (nistatina) para fungicida. Ao redor do qual os poços foram preenchidos com soluções da galactomanana com as seguintes concentrações: 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2,5 %, 3,5 % e 4 %. Observa-se que a solução menos concentrada (0,5%) não apresentou efeito fungistático e que a mais concentrada (4,0%) apresentou a menor atividade. A solução a 3,5 % parece possuir o maior efeito, enquanto as soluções a 1,0%, 1,5% e 2,5% parecem possuir atividade fungistática semelhante.

Devido à composição básica desses polissacarídeos (manose e galactose) seria normal esperar que a galactomanana *in natura*, ao invés de inibir, favorecesse a proliferação de fungos. Mesquita et al. (2002) analisaram a possibilidade da utilização das galactomananas de *C. pulcherrima* e *Parkinsonia aculeata* como meio de crescimento de fungos. Enquanto uma solução da galactomanana de *P. aculeata*, exposta a meio contaminado por fungos (30 min.), apresentou, após 72 horas, uma grande quantidade de colônias de pigmentação verde e salmon, uma solução da galactomanana de *C. pulcherrima*, nas mesmas condições, não apresentou colônias visíveis. O experimento de Mesquita et al. (2002) parece dá suporte ao resultado obtido nesse trabalho. Porém somente este trabalho foi encontrado.

5 CONCLUSÕES

Foram obtidas galactomananas sulfatadas de *Caesalpinia pulcherrima* a partir de dois métodos, um utilizando piridina e outro, dimetilformamida como base. O grau de sulfatação para a galactomanana sulfatada com piridina ainda é maior, porém é válido tentar fazer ajustes no método que utiliza N,N-dimetilformamida como base, para evitar-se o uso da piridina, reagente tóxico e de odor muito desagradável. Um reajuste possível seria evitar formar o complexo N,N-dimetilformamida com trióxido de enxofre e adicionar o ácido monoclossulfônico diretamente na mistura polissacarídeo/ácido fórmico/N,N-dimetilformamida.

Esta dissertação tinha o intento de propor a galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* sulfatada como antifúngico (ou fungistático) para o controle da antracnose em mangas por meio do controle do *Colletotrichum* sp. Porém os resultados mostram, de modo inusitado, que somente a galactomanana *in natura* apresentou alguma atividade (efeito fungistático) contra tal patógeno.

O presente trabalho e o experimento de Mesquita et al. (2002) sinalizam a necessidade de uma melhor compreensão do efeito fungistático da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* que por pertencerem a um grupo de polissacarídeos formados por manose e galactose, deveria funcionar como meio de cultura e não como fungistático.

REFERÊNCIAS

- ABDELMALEKA, B. E., SILAA, A., KRICHENA, F., KAROUDA, W., MARTINEZ-ALVAREZC, O., ELLOUZ-CHAABOUNIA, S., AYADIB, M. A., BOUGATEFA A. Sulfated polysaccharides from *Loligo vulgaris* skin: Potential biological activities and partial purification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, 1143, 2015.
- ABREU, C. L. M. **Controle de Alternaria solani em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com óleos essenciais**. Botucatu: UEP, 2006.
- ACETI, A., CORVAGLIA, L., FALDELLA, G. Infant formulas thickened with carob bean gum causing false-positive galactomannan test reactivity. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, 769, 2008.
- ALBAN, S., FRANZ, G. Characterization of the anticoagulant actions of a semi synthetic curdlan sulfate. **Thrombosis Research**, v.99, 377, 2000.
- ALVES, C. R. **Caracterização de gomas extraídas de seis tipos de sementes de leguminosas**. Dissertação, Florianópolis: UFSC, 2013.
- AMORNRUT, C., TOIDA, T., IMANARI, T., WOO, E. R., PARK, H., LINHARDT, R., WU, S. J., & KIM, Y. S. A new sulfated b-galactan from clams with anti-HIV activity. **Carbohydrate Research**, v. 321, 121, 1999.
- ANDRADE, C.T., AZERO, E.G., LUCIANO, L., GONÇALVES, 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**, v. 26, 181, 1999.
- AZEVEDO, A. R., SILVA, S. R., PASSOS, A. A. C., SIQUEIRA, R. F., ANDRADE, F. J. E. T., TEIXEIRA-SÁ, D. M. A. **Elaboração de bolos tipo inglês com adição de galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* como substituto de gordura, uma avaliação sensorial**. In: VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação, 2012.
- AZERO, E. G., ANDRADE, C. T. Extração e caracterização da galactomanana de sementes de *Caesalpinia pulcherrima*. **Polímeros**, v. 9, 54, 1999.
- AZERO, E. G., ANDRADE, C. T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, v. 21, 551, 2002.
- BALABAN, N., GOLDKORN, T., NHAN, R. T., DANG, L. B., SCOTT, S., RIDGLEY, R. M., RASOOLY, A., WRIGHT, S. C., LARRICK, J. W., RASOOLY, R., CARLSON, J. R. Auto inducer of virulence as a target for vaccine and therapy against *S. aureus*. **Science**, v. 280, 438, 1998.
- BATISTA, D. C., **Cultivo da Mangueira**. http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira_2ed/doencas.htm. agosto de 2010. acessado em 21 de abril de 2015.

BORSATO, L. C. **Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à ferrugem e mecanismos de defesa elicitados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus***: Florianópolis, UFSC, 2009.

BUCHANAN, M. R., BRISTER, S. J. Anticoagulant and antithrombin effects of intimatan, a heparin cofactor II agonist. **Thrombosis Research**, v. 99, 603, 2000.

BURITI, F. C. A., DOS SANTOS, K. M. O., SOMBRA, V. G., MACIEL, J. S., TEIXEIRA SÁ, D. M. A., SALLES, H. O., OLIVEIRA, G., DE PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A., MOREIRA, A. C. O. M., MOREIRA, R. A., EGITO, A. S. Characterisation of partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds as a potential dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, 35, 512, 2014.

CAVALCANTI, S. M., FRANÇA, E. R., CABRAL, C., VILELA, M., MONTENEGRO, F., MENEZES, D. Prevalence of *S. aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, 56, 2005.

CERQUEIRA, M. A., BARTOLOMEU, W. S. S., SIMÕES, J., TEIXEIRA, J. A., DOMINGUES, M. R. M., COIMBRA, M. A., VICENTE, A. A. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 1, 179, 2011.

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**, v. 75, 408, 2009.

CHRESTANI, F., SIERAKOWSKI, M. R., UCHOA, D. A. E., NOZAWA, C., SASSAKI, G. L., GORIN, P. A. J., ONO, L. *In vitro* antiherpetic and antirrotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, 453, 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo. Pennsylvania, 2005. (Document, M100-S15). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/clinica/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2014.

CUNHA, P. L. R. Desenvolvimento de polissacarídeos com ação terapêutica em osteoartrite. Tese, Fortaleza, UFC, 2006.

CUNHA, P. L. R., PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, 649, 2009.

DAKIA, P. A., WATHELET, B., PAQUOT, M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. **Food Chemistry**, v. 102, 1368, 2007.

DEA, I.C.M., CLARK, A.H., MCCLEARY, B. V. Effect of galactose-substitution-patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**, v.147, 275, 1986.
DEA, I.C.M., MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 31, 241, 1975.

DODI, G., HRITCU, D., POPA, M. I. Carboxymethylation of Guar Gum: Synthesis and Characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45 (3-4), p. 171, 2011.

DOUBLIER, J. L., LAUNAY, B. Rheology of galactomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. **Journal of Texture Studies**, v.12, 151, 1981.

ECHEVERRÍA-SÁENZ, S., MENA, F., PINNOCKA, M., RUEPERTA, C., SOLANO, K., CRUZA, E., CAMPOSB, B., SÁNCHEZ-AVILAB, J., LACORTEB, S., BARATAB, C. Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jiménez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica). **Science of The Total Environment**, v. 440, 106, 2012.

EUFRÁSIO, F. C. A., BARROS, V. D. C., RIOS, A. R. N., FREIRE, J. E., MATA, M. F. **Caracterização morfológica do fruto e semente de flamboyant mirim (*Caesalpinia pulcherrima* (L.) S. W.)**. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas/UVA, Campus da Betânia, Sobral – CE, 2009.

FERNANDES, W. S. **Respostas de defesa e resistência induzida por ulvana à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**: Dissertação, Florianópolis: UFSC p. 85, 2007.

FONSECA, N. G., JACOBI, C. M. Desempenho germinativo da invasora *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. e comparação com *Caesalpinia férrea* Mart. exTul. e *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. (Fabaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v 25, 191, 2011.

FRANCA, L. G., CHAVES, M.J. L., SILVA, F. A. K., SOUZA, G.C., MAIA, M. O., BRAGA, R. C. **Avaliação físico-química e microbiológica de suco tropical de caju adicionado de espessante natural**. In: VII CONNEPI, 2012, Palmas. Ciência, Tecnologia e Inovação: Ações Sustentáveis para o desenvolvimento regional, 2012.

GANTER, J.L.M.S., REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of Mimosaceae spp. **Bioresource Technology**, v. 68, 55, 1999.

GARROS-ROSA, I., SILVA, A. M., SANTANA, A. A. **Produção de matrizes cromatográfica de afinidade a partir de polissacarídeos de semente de *Caesalpinia pulcherrima***. In: I Congresso Internacional de Medicamentos, 2002, João Pessoa, 2002.

GEMIN, E. **Determinação da atividade antiviral de galactomananas sulfatadas contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1)**. Dissertação de mestrado em Patologia Básica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2008.

GERESH, S., MAMONTOV, A., WEINSTEIN, J. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: Preparation, characterization and properties. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 50, 179, 2002.

GERÓNIMO, E., APARICIO, V.C., BÁRBARO, S., PORTOCARRERO, R., JAIME, S., COSTA, J.L. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. **Chemosphere**, v. 107, 423, 2014.

GHOSH, R. K., SINGH, N. Effect of organic manure on sorption and degradation of azoxystrobin in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, 632, 2009.

GUIMARÃES, S. S. C. ***Fusarium solani* associado à soja no Brasil: morfologia, filogenia molecular e patogenicidade**. Tese, Lavras: UFL, 2010.

HOFFMAN, R., PAPER, D. H. Carrageenans: Novel, selective growth factor antagonists with anti-proliferative activity. **British Journal of Cancer**, v. 68, 442, 1993.

HJORTH, K., JOHANSEN, K., HOLEN, B., ANDERSSON, A., CHRISTENSEN, H.B., SIIVINEN, K., TOOME, M. Pesticide residues in fruits and vegetables from South America - A Nordic project. **Food Control**, v. 22, 1701, 2011.

HUSSEIN, M.M.D., HELMY, W. A., SALEM, H. M. Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivates. **Phytochemistry**, v. 48, 479, 1998.

KAPOOR, V.P.; TARAVEL, F. R.; JOSELAU, J-P; MILAS, M.; CHANZY, H., RINAUDO. M. *Cassia spectabilis* DC seed galactomannan: Structural, crystallographical and rheological studies. **Carbohydrate Research**, v.306, p.231– 241, 1998.

KRICHEN, F., KAROUD, W., SILA, A., ABDELMALEK, B. E., GHORBEL, R., ELLOUZ-CHAABOUNI, S., BOUGATEF, A. Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, 283, 2015.

LIMA, Á. M., CERQUEIRA, M. A., SOUZA, B. W. S., SANTOS, E. C. M., TEIXEIRA, J. A., MOREIRA, R. A., VICENTE, A. A. New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits – Influence on fruits gas transfer rate. **Journal of Food Engineering**, v. 97, 101, 2010.

LIMA, C. P. C. **Hidrogel da Galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* como agente viscosuplementador em osteoartrite de joelhos**. 41 f. Monografia (Licenciatura Plena em Química), FAFIDAM, Universidade Estadual do Ceará, Limoeiro do Norte, 2012.

LIU, Y.H., LIU, C.H., TAN, H.N., ZHAO, T., CAO, J.C., Wang, F.S. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, 370, 2009.

LORENZI, H., SOUZA, H.M., TORRES, M.A.V., BACHER, L.B. **Árvores Exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. 1.ed. Nova Odessa: Platarum, 2003. 352p.

LOWY, F. D. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, 520, 1998.

- LUCINI, L., MAGISTRATI, P., MOLINARI, G. P. Residues of a triazole fungicide in soil after 4 years of application to sugar beet. **Water Air Soil Pollut**, v. 202, 13, 2009.
- MCMAHON, T. A., HALSTEAD, N. T., JOHNSON, S., RAFFEL, T. R., ROMANSIC, J. M., CRUMRINE, P. W., BOUGHTON, R. K., MARTIN, L. B., ROHR, J. R. The Fungicide Chlorothalonil is nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity, and mortality in amphibians. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 8, 2011.
- MANTELL, C. L., The Water - Soluble Gums, **Reinhold Publishing Corporation**, 1947. citado por PAULA, 1990.
- MEIR, H., REID, J. S. G., LOEWVS, F. A., TANNER, W. **Encyclopedia of Plant Physiology, New Series**, v. 13B, pp. 418, 1981.
- MELO, M. R. S., FEITOSA, J. P. A., FREITAS, A. L. P., PAULA, R. C. M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria córnea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, 491, 2002.
- MERCIER, L., LAFITTE, C., BORDERIES, G., BRIAND, X., ESQUERRE-TUGAYE, M., FOURNIER, J. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defense. **New Phytologist**, v. 149, 43, 2001.
- MESQUITA, J. C.; SANTANA, A. A.; REIS, M. C.; LIMA, H. S.; SILVA, A. M.; REIS, T. M.; SOARES, G. M.; MUNIZ, W. F.; GARROS-ROSA, I. Galactomananas de sementes: aplicação biotecnológica como meio de cultura microbiológica. **VI Reunião Regional Nordeste da Sociedade Brasileira de Bioquímica**, Fortaleza, Brasil, 2002.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT**. [2009]. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/grade%20de%20agroquimicos%20mangapdf. Acesso em 28 de abril de 2015.
- MOHAPATRA, S. Residue levels and dissipation behaviors for trifloxystrobin and tebuconazole in mango fruit and soil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.187, 95, 2015.
- MONTEIRO, L. R. **Desenvolvimento de anticoagulantes a partir de galactomananas quimicamente modificadas**. Monografia, Limoeiro do Norte: UECE, 2014.
- NETO, E. M. **Desenvolvimento de novos materiais à base de goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) derivados e microesferas com gelatina**. Dissertação, Fortaleza, UFC, 2008.
- ONO, L., WOLLINGER, W., ROCCO, I. M., COIMBRA, T. L.M., GORIN, P.A.J., SIERAKOWSKI, M.R. *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**, v. 60, 201, 2003.
- PAULERT, R., TALAMINI, V., CASSOLATO, J.E.F., DUARTE, M.E.R., NOSEDA, M.D., SMANIA JR, A., STADNIK, M.J. Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts

from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.116 , 263, 2009.

PAPER, D. H., VOGL, H., FRANZ, G., HOFFMAN, R. Defined carrageenan derivatives as angiogenesis inhibitors. **Macromolecules Symposium**, v. 99, 219, 1995.

PATEL, S. S., VERMA, N. K., CHATTERJEE, C., GAUTHAMAN, K. M., INTER. Screening of *Caesalpinia pulcherrima* Linn flowers for analgesic and antiinflammatory activities. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v 3, 1, 2010.

PEYMAN, S., YOUSEF, D., FATEMEH, M.T., FATEMEH, S., REZA, R. Structural and compositional characteristics of a sulfated galactan from the red alga *Gracilariopsis persica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, 1570, 2011.

PIRES, L., GORIN, P. A. J., REICHER, F., SIERAKOWSKI, M. R. An active heparinoid obtained by sulphation of galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**. v.46, 165, 2001.

PIRES, N. R., CUNHA, P. L. R., MACIEL, J. S., ANGELIM, A. L., MELO, V. M., PAULA, R. C. M., FEITOSA, J. P. A. Sulfated chitosan as tear substitute with no antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, 92, 2013.

PLOETZ, R. C. (2003). **Diseases of mango**. In R. C. Ploetz (Ed.), Diseases of tropical fruit crops (pp. 327–363). Wallingford: CAB International.

PRADO, B. M., KIM, S., OZEN, B. F., MAUER, L.J. Differentiation of carbohydrate gums and mixtures using fourier transform infrared spectroscopy and chemometric. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 2823, 2005.

RAKHMANBERDYEVA, R. K., FILIPPOV, M. P. Infrared Spectroscopy study of *Gleditsia macracantha* seeds. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, 179, 2011.

RAMESH, H.P., YAMAKI, K. ONO, H. TSUSHIDA, T. Two-dimensional NMR spectroscopic studies of fenugreek (*Trigonellafoenum-graecum* L.) galactomannan without chemical fragmentation. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, 69, 2001.

RASHID, A., MACKIE, W.2 9JT, COLQUHOUN I. J., LAMBA, D. Novel synthesis of monosulphated methyl a-D-galactopyranosides. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 68, 1122, 1990.

RAZAVI, S. M. A., CUI, S. W., GUO, Q., DING, H. Some physicochemical properties of sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 453, 2014.

RENATO DE AZEVEDO MOREIRA, STELLA REGINA SOBRAL ARCANJO, AMANDA MAZZA CRUZ DE OLIVEIRA, ANA CRISTINA DE O. MONTEIRO MOREIRA. Uso de galactomanana extraída da *Caesalpinia pulcherrima* como espessante e estabilizante em produtos lacteos, PI 1104185-4 A2, 31/08/2011, **Fundação Edson Queiroz (BR/CE), Universidade Federal do Piauí (BR/PI)**, E04F 13/24 (2006.01).

- SECOUARD, S; GRISEL, M; MALHIAC, C. Flavour release study as a way to explain xanthan–galactomannan interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 21,1237, 2007.
- SIERAKOWSKI, M. R.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M.; Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 51-57, 2000.
- SOPEÑA, F., BENDING, G.D. Impacts of biochar on bioavailability of the fungicide azoxystrobin: a comparison of the effect on biodegradation rate and toxicity to the fungal community. **Chemosphere**, v. 91,1525, 2013.
- SOUSA, F. D. **Propriedades físico-químicas de hemiceluloses vegetais**. Dissertação, Fortaleza, UFC, 2014.
- SRINIVAS, K.V.N.S., RAO, Y. K., MAHENDER, I., DAS, B., KRISHNA, K.V.S. R., KISHORE, K. H., MURTY, U.S.N. Flavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 63, 789, 2003.
- SUDARSHAN, S., SANGEETA, S., BOTHARA, S. B., ROSHAN, P. Pharmaceutical characterization of some natural excipient as potential mucoadhesives agent. **The Pharma Research**, v. 4, 91, 2010.
- SUDHAKAR, M.; RAO, C.V.; RAO, P.M.; RAJU, D.B.; VENKATESWARLU, Y. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. **Fitoterapia**, v. 77, 378, 2006.
- TEIXEIRA, D. M. A., SOUZA, G. C., BRAGA, R. C., CAVALCANTE, J. F. M., GADELHA, P. C., ALMEIDA, F. F., ALVES, R. C. Queijo coalho revestido com galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*, avaliação físico-química e microbiológica. In: XXVII Congresso Nacional de Laticínios, 2010.
- THOMBRE, N. A., GIDE, P. S. Rheological characterization of galactomannans extracted from seeds of *Caesalpinia pulcherrima*. **Carbohydrate Polymers**, v. 94 547, 2013.
- WANG, J., NIU, S., ZHAO, B., WANG, X., YAO, J., ZHANG, J., ZHAO, W., ZHAO, Y. Regioselective synthesis of sulfated guar gum: Comparative studies of structure and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, 734, 2013.
- WANG, J., ZHAO, B., WANG, X., YAO, J., ZHANG, J. Structure and antioxidant activities of sulfated guar gum: Homogeneous reaction using DMAP/DCC catalyst. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, 1201, 2012.
- WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, B., TUDZYNSKI, P., VAN KAN, J. A. L. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, 561, 2007.
- WINKELHAKE, J. L. Will complex carbohydrate ligands of vascular selectins be the next generation of non-steroidal anti-inflammatory drugs? **Glycoconjugate Journal**, v. 8, 381, 1991.
- WU, S. J., CHUN, M. W., SHIN, K. H., TOIDA, T., PARK, Y., LINHARDT, R. J., KIM, Y. S. Chemical sulfonation and anticoagulant activity of acharan sulfate. **Thrombosis Research**, v. 92, 273, 1998.

YANG, J., DU, Y., WEN, Y., LI, T., HU, L. Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, 397, 2003.

YODSAOUE, O., KARALAI, C., PONGLIMANONT, C., TEWTRAKUL, S.,
CHANTRAPROMMA, S. Pulcherrins D-R, potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia pulcherrima*. **Tetrahedron**, v. 67, 6838, 2011.

YOSHIDA, T., NAKASHIMA, H., YAMAMOTO, N., URYU, T. Anti-AIDS virus activity *in vitro* of dextran sulfates obtained by sulfation of synthetic and natural dextrans. **Polymer Journal**, v. 25, 1069, 1993.

APÊNDICE

As galactomananas sulfatadas, que não tiveram efeito sobre o *Coletotrichum sp.*, foram testadas como bactericida contra *Staphylococcus aureus*.

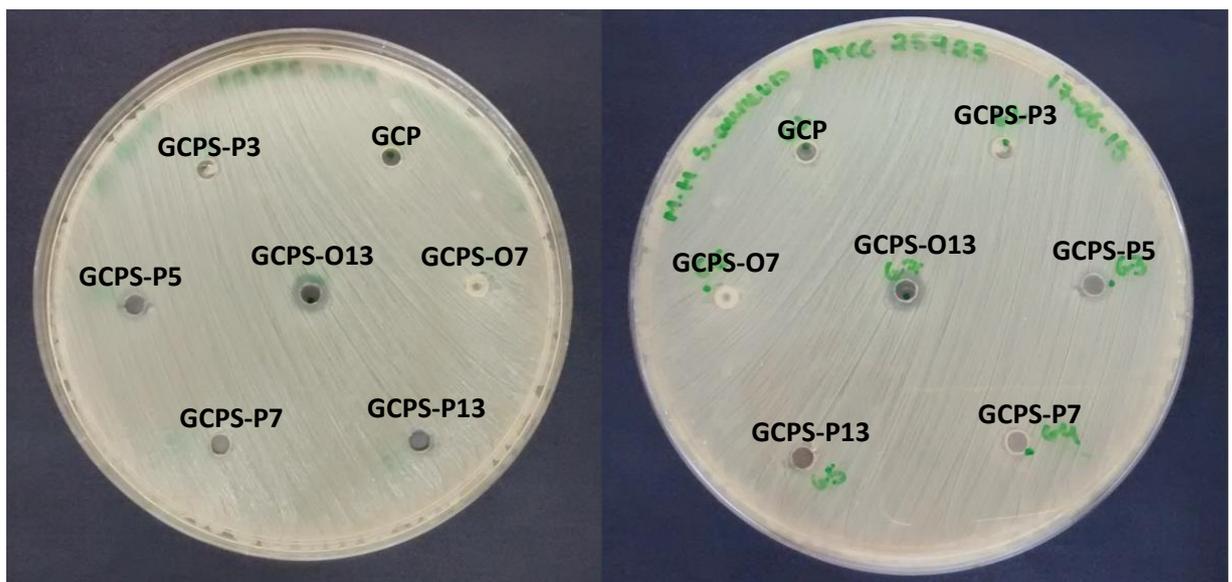
Patogenicidade da *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica capaz de causar infecções alimentares, porque produz toxinas enquanto cresce em alimentos contaminados (LOWY, 1998). Essa bactéria pode causar desde simples infecções na pele até maiores complicações à saúde como meningite e pneumonia (BALABAN et al., 1998).

Esse patógeno é um dos principais colonizadores do corpo humano, estando em maior concentração nas vias nasais. Sua presença no corpo só passa a ser um problema quando o mesmo está fragilizado. Pacientes hospitalizados podem desenvolver graves doenças por causa desses micro-organismos (CAVALCANTI et al., 2005).

Na Figura 16 pode-se observar um leve efeito bactericida da solução de GCPS-O13 1%. Os demais polissacarídeos que foram testados (GCP, GCPS-P3, GCPS-P5, GCPS-P7, GCPS-P13, GCPS-O7 e GCPS-O13) não apresentaram halo de inibição. Os derivados

Figura 16 – Placa de *S. aureus* mostrada de frente (a) e de verso (b) feita 3 dias após a incubação.



sulfatados GCPS-P3, GCPS-P5 que aparecem somente nos anexos, foram sulfatados, respectivamente, com 3 e 5 mL de ácido monoclorosulfônico. O polissacarídeo que apresentou a leve atividade bactericida também é o derivado mais sulfatado. Por isso pode-se relacionar a atividade contra *Staphylococcus aureus* com a quantidade de grupos sulfatos.