

**GOMA DE CAJUEIRO (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.)
COMO BIOSSENSOR PARA LECTINAS VEGETAIS**

RAQUEL DA SILVEIRA NOGUEIRA LIMA

FORTALEZA – CEARÁ

2002

**GOMA DE CAJUEIRO (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.)
COMO BIOSSENSOR PARA LECTINAS VEGETAIS**

RAQUEL DA SILVEIRA NOGUEIRA LIMA

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA – CEARÁ

2002

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho dessa Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Raquel da Silveira Nogueira Lima

Tese APROVADA em 28 / 06 / 2002

Prof. Dr. RENATO DE AZEVEDO MOREIRA
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Prof.^a. Dr.^a. LUANA CASSANDRA
BREITENBACH BARROSO COELHO
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. ANDRÉ NEWTON DO MONTE
NEGREIROS
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte

Dr. JÚLIO CESAR GÓES FERREIRA
Departamento de Engenharia Mecânica
e Produção
Universidade Federal do Ceará

Prof.^a. Dr.^a. ANA CECÍLIA GÓES HORTA
Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular
Universidade Federal do Ceará

*“Minha vida é povoada por contos, sonhos e fábulas...
O que mais posso fazer, que não seja escrever e sonhar?”*
(Jorge Luís Borges)

A meus pais, Airton e Regina Céli

A meus irmãos, Ricardo e João Paulo

A todas as pessoas que, de alguma forma, tenho aprendido a amar

Este trabalho foi realizado graças às seguintes instituições:

Universidade de Fortaleza, UNIFOR, pelo incentivo à Pós-Graduação concedido à autora e por auxílios de pesquisa que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP), através de auxílios de pesquisa concedidos ao Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênios firmados com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de convênios firmados com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) através do projeto PROTEÍNAS VEGETAIS, financiado para o Grupo de Lectinas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foi executado este trabalho.

Departamento de Biologia, Laboratório de Tecnologia de Sementes, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica e Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará e Núcleo de Tecnologia (NUTEC), assim como Laboratório de Anatomia e Fisiologia Vegetal, do Centro de Pesquisa e Agroindústria Tropical (EMBRAPA/CNPAT), onde parte deste trabalho experimental foi executada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Energia criadora, essência que conduz as emoções e talentos, Deus.

A minha família, presença constante em todas as etapas de minha formação. Obrigada aos meus pais, por sempre estarem disponíveis a ajudar, mesmo quando a necessidade não se fazia presente.

Ao Professor Dr. Renato de Azevedo Moreira, pela orientação, paciência e apoio incontestáveis. Muito obrigada pela compreensão e amizade.

À Professora Dra. Ana Cecília Góes Horta, pelas sugestões, conselhos e bom-humor demonstrados ao longo deste período de doutorado.

Ao Dr. Júlio César Góes Ferreira (Departamento de Engenharia da Universidade Federal do Ceará), por toda orientação, sugestão e boa-vontade em ensinar o que às vezes, poderia parecer impossível.

Aos Professores Dra. Luana Breitenbach Coelho (Universidade Federal de Pernambuco) e Dr. André Newton do Monte Negreiros (Universidade Federal do Rio Grande do Norte), pela pronta gentileza em aceitar julgar e aconselhar este trabalho.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com os quais aprendi a amar a profissão.

Aos colegas da Universidade de Fortaleza, à Direção de Centro e a todos os coordenadores de curso do Centro de Ciências da Saúde. Em especial, ao colega de bancada e sala de aula, Ricardo de Oliveira Tavares, pelo apoio e estímulo irrestritos.

Aos colegas da Faculdade Integrada do Ceará, em especial aos professores Bruno de Andrade Cardi, Gérson Luis e Cristina Paiva.

Aos colegas professores e ex-alunos do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Ceará, em especial, à professora Dra. Arlete Aparecida Soares.

Ao corpo de pesquisadores da EMBRAPA Agroindústria Tropical, especialmente à Dalva Maria Bueno e Clódion Torres Bandeira.

Ao laboratório de Tecnologia de Sementes da Universidade Federal do Ceará.

Ao Núcleo de Tecnologia (NUTEC), pelo valioso auxílio.

À Jeanny Maciel, pelas análises espectroscópicas de infravermelho e pela nascente amizade.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, suporte durante os cursos de Mestrado e Doutorado.

Aos colegas estudantes de Pós-Graduação em Bioquímica, em especial à amiga Maria Gonçalves Pereira.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados, Alexsandra, Álvaro, Ana Angélica, André, Aparecida, Célio, Cláudia, Cristina, Ed Carlos, Eduardo, Enzo, Fábria, Gianny, Gilcenara, Ivone, Jacira, Keline, Kélton, Lia, Lisiane, Márcia Valéria, Maria Helena, Marcus, Ociléia, Renata Alves, Rogildo, Sônia, Vânia e Wagner. Obrigada pelo excelente convívio.

Em especial às amigas Daniele Alves Teixeira e Renata Chastinet Braga, pela paciência em ensinar como conviver harmoniosamente com uma coluna cromatográfica.

Agradeço à família Greene Miranda que, mesmo distante, oferece carinho desmedido.

Obrigada pelas amizades conquistadas durante esses anos, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

A todos sou extremamente grata.

RESUMO

O uso de gomas naturais, extraídas de exsudatos e extratos de plantas, tem recebido forte estímulo como sendo resultado de muitas e lucrativas possibilidades para o uso industrial. No presente trabalho foi estudada a goma exsudada de cajueiro, na sua forma bruta e após tratamento químico de reticulação. A goma exsudada do tronco de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) mostrou-se eficiente na identificação e isolamento de lectinas vegetais, independente da especificidade por açúcares apresentada por essas. Com relação à composição química mínima, a goma mostrou-se rica em açúcares, característica dos produtos de exsudação vegetal. A metodologia para reticulação da goma de cajueiro, utilizando-se como agente químico *epicloridrina* 12,5 N em meio alcalino, mostrou-se mais eficiente que o procedimento de reticulação com glutaraldeído. Frente à diálise contra solução salina, houve queda nos valores da viscosidade, sugerida com tendo sido causada pela presença de íons Na^+ no meio, o que força o aparecimento de sais de sódio nas ramificações do polissacarídeo (sais de ácido urônico). A submissão da solução de goma de cajueiro em meio aquoso ácido ou álcali tende a induzir diminuição nos valores de viscosidade. A análise preliminar da condutividade elétrica aponta a goma exsudada de cajueiro como sendo um bom condutor elétrico, o que a torna ferramenta interessante para a confecção futura de um biossensor, ou mesmo servir como filme de superfície para a adesão de proteínas. O espectro de infravermelho não indicou a formação de grupamento químico durante o processo de purificação do carboidrato com etanol. A goma exsudada de cajueiro mostrou-se capaz de reconhecer apenas lectinas vegetais, fato interessante para futuros experimentos de isolamento de lectinas de tecidos vegetais, hipótese reforçada pelo reconhecimento de lectinas retidas pela matriz cromatográfica de afinidade. A possível utilização da goma exsudada de cajueiro como biossensor protéico (gel cromatográfico ou matriz de biofilme) é sugerida frente a sua alta reprodutibilidade, característica primordial na escolha de um biopolímero para estudos biotecnológicos ou de aplicação.

ABSTRACT

The use of natural gums, taken from the exudates and extracts of plants, has been given a strong stimulus as a result of the many and lucrative possibilities for industrial use. In the present work, we studied the resin/gum secretor ducts that appear along the cashew tree bark, using histological procedures and microscopic observations. The gum was studied at its crude state and then chemically treated in order to obtain a kind of gel (microbiofilm). Besides the chemical composition (proteins, lipids, sugars, fibers and ashes), the gum's electric conductivity was studied to determine possible use as a biosensor/bioindicator for plant proteins. By natural exudation, or by means of incision, a gum or resin of a yellowish color soluble in water, and which presents a great biotechnological potential, appears on the trunk and branches of the cashew tree (*Anacardium occidentale* L.). Cashew gum extraction represents one more source of revenue for the producer, in addition to the cashew nut and the peduncle, as well as an alternative for the utilization of non-productive cashew trees in a phase of decline or senescence. Gum ducts biological origin was investigated through histological procedures, showing high similarity with other ducts from the same family *Anacardiaceae*. The potential of bioaffinity as a tool for the study of biological-recognition mechanisms is gaining increasing value. Its potential use as a chromatographic matrix and/or for bioaffinity ligand for lectins was investigated. Gum was cross-linked in order to obtain a kind of chromatographic matrix (gel). Cashew-gum hydrogels swell and shrink in presence or absence of water and if the water is completely removed, they collapse to form a xerogel. To evaluate the gum's ability to retain glycoproteins (lectins), affinity chromatography and bioindicative procedures were performed and, in addition some of the chemical, physical-chemical and biological characterizations were done, such as the secretory bark ducts origin and characterization. The results clearly indicate the possibility of using the exudates gum from cashew tree as a new and non expensive biotechnological tool for glycobiology and glycochemistry.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	lx
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xviii
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xx
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Generalidades	1
I.1.1. Biopolímeros	2
I.1.2. Biossensores	3
I.1.3. Biofilmes	5
I.1.4. Hidrogéis	8
I.1.5. Métodos de Bioafinidade: Cromatografia de Afinidade	9
I.1.5.1. Interação Proteínas x Polissacarídeos	12
I.2. Proteínas com Afinidade por Açúcares: Lectinas	12
I.2.1. Definições	12
I.2.2. Isolamento	14
I.2.3. Propriedades Gerais	15
I.2.4. Funções na Planta	18
I.3. Polissacarídeos Vegetais	19
I.3.1. Polissacarídeos de Sementes	24
I.3.1.1. Galactomananas	25
I.3.1.2. Xiloglucanas	27
I.3.1.3. Amido e Celulose	28
I.3.2. Polissacarídeos Exsudados	28
I.3.3. Mucilagens	30
I.3.4.1. Reação com Epicloridrina	32
I.4. O Cajueiro: Origem e Histórico de <i>Anacardium occidentale</i> L.	33
I.4.1. A cultura brasileira do cajueiro	35
I.4.2. Extração Racional e Isolamento da Goma Exsudada de Cajueiro	36

II. HIPÓTESE	37
III. ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS	38
IV. MATERIAIS	39
IV.1. Exsudato Vegetal	39
IV.1.2. Sementes	39
IV.2. Outros materiais	40
V. MÉTODOS	41
V.1. Localização histológica dos ductos goma/resina de <i>Anacardium occidentale</i> L.	41
V.2. Obtenção da goma	42
V.2.1. Obtenção do exsudato liofilizado	42
V.2.2. Precipitação do exsudato com álcool	
V.3. Análise elementar	43
V.3.1. Determinação de umidade	43
V.3.2. Determinação de cinzas	43
V.3.3. Determinação da composição catiônica das cinzas	45
V.3.3.1. Determinação de Ferro	45
V.3.3.2. Determinação de Cálcio	45
V.3.3.3. Determinação de Fósforo	46
V.3.3.4. Determinação de Magnésio	46
V.3.4. Determinação do teor de nitrogênio total	47
V.3.5. Determinação da fração hexânica	48
V.4. Determinação de carboidratos totais	48
V.4.1. Determinação de carboidratos solúveis	49
V.4.2. Determinação de carboidratos totais não-estruturais	49
V.5. Determinação de carboidratos redutores e não-redutores	50
V.6. Determinação de fibras totais	51
V.8. Determinação da energia bruta total	52
V.9. Determinação do teor de vitamina C (ácido ascórbico)	53
V.10. Análise viscosimétrica	53
V.11. Tratamento da goma com glutaraldeído	54
V.12. Tratamento da goma com epicloridrina	54
V.13. Determinação do espectro de infravermelho da goma	55

V.13. Avaliação da condutividade da solução de goma exsudada de cajueiro	55
V.14. Obtenção de extratos de sementes	57
V.14.1 Preparação das farinhas de sementes	57
V.14.2. Obtenção de extratos totais de sementes	57
V.14.3. Preparação dos extratos de algas	58
V.14.4. Obtenção das frações ricas em lectinas	58
V.15. Cromatografias de afinidade	59
V.16. Utilização da goma reticulada como biossensor para proteínas	59
V.17. Ensaio de atividade hemaglutinante	61
V.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida	61
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
VI.1. Caracterização biológica da exsudação de <i>Anacardium occidentale</i> L.:	
Localização histológica dos ductos secretores de goma	63
VI.2. Caracterização química do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> L.	66
VI.2.1. Análise Elementar	67
VI.2.2. Determinação de carboidratos totais não-estruturais e carboidratos solúveis (redutores e não-redutores)	69
VI.2.3. Avaliação de outros fatores nutricionais presentes no exsudato de cajueiro	69
VI.2.4. Avaliação da composição catiônica das cinzas do exsudato de <i>A.occidentale</i> : presença de Cálcio, Ferro, Fósforo e Magnésio	70
VI.3. Avaliação físico-química do exsudato de <i>Anacardium occidentale</i> L.	71
VI.3.1. Comportamento reológico	71
VI.3.1.1. Viscosidade intrínseca	71
VI.3.1.2. Comportamento de fluxo de dispersões da goma de cajueiro: Efeito da concentração da solução na viscosidade	72
VI.3.1.3. Efeito da presença de sal (NaCl 0,15M) na viscosidade de dispersões de goma de cajueiro	74
VI.3.1.4. Efeito da presença de ácido na viscosidade de dispersões de goma de cajueiro	76
VI.3.2. Avaliação da capacidade condutivimétrica	78
VI.3.3. Avaliação da influência do tratamento químico (reticulação) da goma de cajueiro	80
VI.4. Potencial de bioafinidade da goma exsudada de cajueiro	89

VI.4.1. Utilização da goma de cajueiro como biossensor protéico:	
Cromatografias de afinidade	90
VI.4.2. Perfil Eletroforético	99
VII. RESUMO DOS RESULTADOS	104
VIII. CONCLUSÃO	107
IX. PERSPECTIVAS	108
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXOS	126

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Reação de um polissacarídeo com epicloridrina.	33
Figura 2. Goma/resina exsudada de cajueiro.	39
Figura 3. Árvore de cajueiro: detalhe.	42
Figura 4. Purificação da goma exsudada de cajueiro.	44
Figura 5. Reticulação da goma exsudada de cajueiro com epicloridrina.	56
Figura 6. Modelos idealizados para identificação de proteínas em tecidos vegetais.	60
Figura 7. Cortes histológicos do caule de <i>Anacardium occidentale</i> L., indicando a localização dos ductos secretores de goma.	64
Figura 8. Goma exsudada de cajueiro. Exsudação do tronco após indução. Coleta.	67
Figura 9. Composição catiônica das cinzas.	71
Figura 10. Gráfico da viscosidade da goma em função da concentração de soluto.	74
Figura 11. Gráfico da viscosidade da goma em função da presença de sal.	75

Figura 12. Gráfico da viscosidade da goma em função da presença de ácido.	78
Figura 13. Variação da condutividade elétrica em função do aumento da concentração da goma.	79
Figura 14. Goma exsudada sem tratamento químico de reticulação (microscopia óptica).	81
Figura 15. Goma exsudada tratada com glutaraldeído (microscopia óptica).	81
Figura 16. Goma exsudada tratada com epicloridrina (microscopia óptica).	82
Figura 17. Espectro de absorção de infravermelho da goma sem tratamento de reticulação.	84
Figura 18. Espectro de absorção de infravermelho da goma com tratamento de reticulação.	84
Figura 19. Espectro de absorção de infravermelho da goma de cajueiro comparada à goma endospérmica de <i>Adenanthera pavonina</i> .	86
Figura 20. Espectro de absorção de infravermelho da goma de cajueiro comparada às gomas exsudadas Caraia e Tragacante.	88
Figura 21. Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epicloridrina. Aplicação de fração rica em lectinas de sementes de <i>Artocarpus incisa</i> e <i>A.integrifolia</i> .	90

- Figura 22.** Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epicloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Abrus precatorius* e *Ricinnus comunis*. 91
- Figura 23.** Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epicloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Luetzelburgia auriculata*. 92
- Figura 24.** Cromatografia de afinidade Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epicloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Cratylia floribunda*, *Canavalia ensiformis* e *Dioclea altissima*. 93
- Figura 25.** Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epicloridrina. Aplicação de extrato total de algas marinhas *Solieira filiformis* e *Gracilaria cornea*. 94
- Figura 26.** Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epicloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Pachira aquatica*. 95
- Figura 27.** Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Artocarpus incisa*. 99
- Figura 28.** Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Artocarpus integrifolia*. 100

- Figura 29.** Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Luetzelburgia auriculata*. 100
- Figura 30.** Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Canavalia ensiformis*. 101
- Figura 31.** Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Dioclea altissima*. 101
- Figura 32.** Fragmento estrutural da goma de cajueiro. 102

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Relação biológica entre substâncias com possibilidade de separação por cromatografia de afinidade.	11
Tabela 2. Unidades monossacarídicas constituintes de alimentos.	20
Tabela 3. Fontes e estruturas dos polissacarídeos como componentes principais ou aditivos de alimentos.	21
Tabela 4. Algumas funções e usos das gomas alimentícias.	30
Tabela 5. Comparação entre as composições químicas das gomas exsudadas de cajueiro e cajazeiro.	68
Tabela 6. Composição em carboidratos totais e não-estruturais e carboidratos solúveis (redutores e não-redutores).	69
Tabela 7. Fatores nutricionais encontrados na goma de cajueiro.	70
Tabela 8. Composição das cinzas.	71
Tabela 9. Viscosidade da goma exsudada de cajueiro frente a diferentes tratamentos.	77
Tabela 10. Principais camadas no espectro na região do Infravermelho.	84
Tabela 11. Lectinas retidas na coluna de goma exsudada de <i>Anacardium occidentale</i> L.	97

Tabela 12. Ensaio de identificação de lectinas galactose-ligantes, a partir de extratos totais de sementes. Procedimento de montagem de biossensor tipo “sachê”.

97

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

^{13}C-R.M.N.	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
SDS	Dodecil sulfato de sódio
GLC	Cromatografia líquido-gasosa
GA	Glutaraldeído
Man:Gal	Relação manose:galactose
DO	Densidade Óptica
TFA	Ácido trifluoracético
DMSO	Dimetil sulfóxido
UH	Unidade hemaglutinante
TCA	Ácido tricloracético
$[\eta]$	Viscosidade intrínseca
c	Concentração da solução
PBS	Solução de NaCl 0,15M tamponada em fosfato 0,01M
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
BSA	Albumina sérica bovina
P I	Pico I – pico cromatográfico não retido
P II	Pico II – pico cromatográfico retido na coluna

Introdução

I. Introdução

I.1. Generalidades

A elevada eficiência apresentada pelas macromoléculas biológicas na seleção de reagentes e na especificidade da interação com sítios de reação, tem promovido o crescente interesse de pesquisa envolvendo filmes finos de macromoléculas associadas a outros materiais. As proteínas, em especial, são macromoléculas biológicas de elevada importância e o estudo de suas interações com os diversos materiais e meios químicos é fundamental para o aprofundamento do conhecimento orgânico e funcional dos organismos vivos.

Os estudos envolvem, geralmente, a fixação ou imobilização de uma ou mais proteínas em superfícies, por meio de mecanismos diversos, tais como, ligação covalente, adsorção física, ligação cruzada, polarização e estereoquímica. Um ou mais desses mecanismos citados devem estar envolvidos no processo de fixação da proteína à superfície ligante. Os vários parâmetros do processo, tais como pH, temperatura, área superficial, íons, agentes quelantes, agentes complexantes e outros, certamente determinam os níveis de eficiência e o grau de seletividade das interações proteína-ligante (MANSUR *et al.*, 2000).

A partir da década de 60, moléculas orgânicas passaram a receber atenção especial, devido à possibilidade de seu emprego em dispositivos de identificação de materiais. O potencial tecnológico de materiais orgânicos foi reconhecido em função de sua variedade de propriedades químicas, elétricas, ópticas e magnéticas. É provável que, em um futuro próximo, materiais orgânicos como corantes, polímeros condutores e proteínas passem a competir com os materiais inorgânicos no setor eletrônico, principalmente pelo seu baixo custo de produção e/ou disponibilidade e pela variedade de propriedades e aplicações. Além disso, métodos de processamento de fabricação de filmes ultrafinos, sensores biológicos e bio-indicadores vêm sendo desenvolvidos paralelamente para que as propriedades destes materiais possam vir a ser exploradas futuramente em escala

comercial (PATERNO *et al.*, 2001). Outro aspecto interessante nesta área científica-tecnológica é a sua interdisciplinaridade, que envolve profissionais das áreas de física, química, biologia e engenharia de materiais, o que vem fortalecendo ainda mais o seu desenvolvimento. Metodologias de obtenção de sensores biológicos, filmes ultrafinos e hidrogéis, constituem uma área em contínuo avanço, sendo ponto de partida para o emprego de materiais orgânicos em setores até então inimagináveis.

I.1.1. Biopolímeros

Biopolímeros são macromoléculas extraídas a partir de uma matéria-prima biológica, sendo utilizadas com diversos propósitos, sejam esses clínicos ou industriais. Dentre as características consistentemente importantes para os biopolímeros aplicados como biomateriais, destaca-se o fato de serem não-tóxicos, não-irritantes, não apresentarem capacidade de despertar resposta antigênica, não-carcinogênicos, sendo adequadamente estéreis para larga utilização. Atualmente, a combinação de polímeros naturais e sintéticos tem encontrado larga aplicação no campo médico (LAWTON, 1996; SASTRY *et al.*, 1998).

No entanto, nenhum dos materiais naturais, isoladamente, pode apresentar todas as complexas características requeridas aos biomateriais. Uma interação significativa entre polímeros naturais e sintéticos foi reconhecida recentemente. Dentre as referidas interações, pode-se citar o aumento na capacidade de absorção de água, e nas propriedades mecânicas. Essa versatilidade estrutural pode ser conseguida na montagem de polímeros de polissacarídeos através da modificação de suas propriedades por co-polimerização (LAWTON, 1996; HYPOLITE *et al.*, 1997). Como ilustração, pode-se citar a aplicação na liberação controlada de drogas ou outras substâncias no organismo, assim como o uso de polissacarídeos vegetais como matrizes constituintes de cápsulas de liberação controlada de medicamentos, sendo para isso necessário ajustar a taxa de liberação da droga com a taxa de degradação do polímero, através de cuidadosa

manipulação da estereoquímica do monômero, taxa de co-monômero e peso molecular do polímero (MISRA *et al.*, 1997).

A imobilização de proteínas e peptídeos em superfícies é um método eficiente para o estudo da resposta celular a estas moléculas (LIMA *et al.*, 1997). Fatores de crescimento, moléculas de adesão celular e peptídeos têm sido imobilizados em superfícies com esse propósito. A interação entre proteínas e carboidratos é de primeira importância para uma série de processos biológicos, tais como infecções virais, infecções bacterianas ou micoplásmicas (BECKER *et al.*, 1998). De particular interesse é o reconhecimento de moléculas recém-descobertas de biopolímeros naturais, como uma boa escolha para o uso como materiais alternativos como coberturas biodegradáveis (LAWTON, 1996; GUILBERT *et al.*, 1997).

Algumas aplicações potenciais já podem ser sugeridas para complexos polissacarídicos biodegradáveis, tais como a proteção (envelopamento) de frutas e vegetais, controlando desta forma a maturação, proteção de carnes e derivados, preservação das propriedades organolépticas e mecânicas de determinados alimentos, através do controle da permeabilidade gasosa ou barreira a solutos. Outro exemplo é a constituição de biofilmes que atuem com alta afinidade na incorporação de drogas e controle da umidade da pele (HARRISON & HILLS, 1996; JORDAN *et al.*, 1996; CHAITALI *et al.*, 1997; CHARLWOOD *et al.*, 1998).

1.1.2. Biossensores

Um biossensor é uma ferramenta analítica contendo um material biologicamente sensível (enzima, anticorpo, antígeno, organelas, DNA, células, tecidos ou moléculas orgânicas) em contato com ou integrada a um *transdutor* (piezoelétrico, acústico, óptico, calorimétrico ou eletroquímico), o qual é capaz de converter um sinal biológico em um sinal elétrico quantitativamente mensurável. Um fator chave na construção de biossensores é o desenvolvimento de tecnologias de imobilização para a estabilidade das moléculas e adesão destas às superfícies. A técnica usual baseia-se na produção de um filme fino de material

imobilizado biologicamente ativo sobre ou próximo da superfície de um transdutor, o qual irá responder apenas na presença de um ou de um grupo de materiais ou de substâncias que apresentam a sua detecção requerida (COLLINGS & CARUSO, 1997).

Existe uma série de requerimentos que a técnica de imobilização deve satisfazer no caso dos biossensores virem a apresentar uma aplicação prática: (i) *o componente biológico deve reter substancialmente a atividade biológica, mesmo após ter sido adsorvido à superfície do sensor*; (ii) *o filme biológico deve permanecer associado à superfície do sensor, mantendo sua estrutura e função*; (iii) *o filme biológico imobilizado necessita possuir longa estabilidade e durabilidade* e (iv) *o material biológico necessita ter um alto grau de especificidade a um componente biológico em particular*. Os principais métodos de imobilização de enzimas e proteínas em superfícies são: a adsorção física ou química, a ligação covalente à superfície, a oclusão (*"entrapment"*) de uma matriz surfactante, polímero ou microcápsula e a formação de ligações cruzadas entre as moléculas. A adsorção de biomoléculas a partir de uma solução em superfícies sólidas pode ser procedida tanto através de interações físicas quanto químicas (CHAITALI *et al.*, 1997; CHARLWOOD *et al.*, 1998).

Polissacarídeos ativados e polímeros têm sido largamente utilizados em aplicações de biossensores. Um exemplo é a ativação da agarose usando um epóxido para criar uma ligação covalente e estável à matriz. Esse sistema tem uma vantagem adicional em alguns casos, pois cria um pequeno braço espaçador entre a matriz e a proteína. Polímeros sintéticos complexados com agentes de ativação (complexação com brometo de cianogênio, carbodiimida ou glutaraldeído), tais como o nylon, também podem ser usados para acoplar proteínas via complexação com carbodiimida ou ativação com glutaraldeído (COLLINGS & CARUSO, 1997).

Biossensores são sistemas instrumentais de pequenas dimensões para detecção/medição de bioespécies em que um transdutor está intimamente ligado a uma interface biológica específica. O material biológico é imobilizado num suporte físico apropriado, sendo freqüente a utilização de membranas, lamelas, guias de

onda. Quando os meios em análise são fluidos utilizam-se pequenas câmaras de fluxo para colocar o analito (amostra) em contacto com o suporte de imobilização. Os biossensores são tanto mais apelativos quanto menores, económicos e fáceis de utilizar, para além de todos os requisitos de detecção – especificidade e sensibilidade – que têm de cumprir.

I.1.3. Biofilmes

Biofilmes são filmes de natureza biológica, ou extraídos a partir de matéria-prima biológica. Existe um grande número de propostas de aplicação para os filmes automontados. Dentre as mais relevantes, pode-se citar aquelas que envolvem a utilização de filmes de polímeros condutores em diodos emissores de luz e sensores para gases, filmes de materiais biológicos como enzimas e outras proteínas na produção de biossensores e filmes de polímeros contendo corantes visando aplicações em óptica não-linear (PATERNO *et al.*, 2001). O contínuo interesse de consumidores na qualidade, conveniência e segurança de alimentos tem encorajado pesquisas a respeito da confecção de filmes de polissacarídeos (ARVANITTOYANNIS *et al.*, 1997).

A re-invenção de “filmes de cobertura” deve-se a numerosas aplicações, tais como a proteção para alimentos embutidos, chocolates e derivados, frutas e vegetais, conservantes para alimentos e, ocasionalmente, coberturas para ceras. Apesar do uso de filmes de cobertura apresentar-se como uma múltipla proposta, algumas restrições devem ser consideradas, tais como a restrição à mistura dos constituintes, o controle da permeabilidade gasosa, controle da atividade microbiana, preservação da integridade estrutural do produto (PATERNO *et al.*, 2001).

Um dos exemplos é a sugerida utilização de quitosana (biopolímero derivado de quitina), objeto de pesquisas substanciais para aplicação em biotecnologia e indústria, devido a sua solubilidade e habilidade de formar membranas, além da sua habilidade em ser degradada por microrganismos do solo (ILLARINOVA *et al.*, 1995; TSURUTANI *et al.*, 1995).

Um dos exemplos de utilização de biofilmes biodegradáveis está no inseticida patenteado *FFAST* (Tecnologia Spray de Filme Aquoso), que foi utilizado para desenvolver um produto baseado em água - *Aquapy*, cujas propriedades sinérgicas das piretrinas constituintes são úteis no controle de pestes e na prevenção à saúde pública. Uma das maiores vantagens do referido composto é o baixíssimo teor de hidrocarbonetos minerais existentes, o que o transforma num mecanismo de uso regular em áreas de cultura agrícola. Quando aplicado em áreas fechadas, sua formulação mostrou-se de eficácia superior aos nocivos inseticidas organo-solúveis (LUCAS *et al.*, 1996).

A produção de filmes insolúveis em água, a partir de ácido hialurônico modificado quimicamente através de reações cruzadas com carbodiimida hidrossolúvel, tende a prolongar a degradação *in vivo* do filme de ácido hialurônico (TOMIHATA & IKADA, 1997).

Vários métodos para detectar a aderência bacteriana têm sido avaliados, porém a detecção da aderência a materiais não transparentes apresenta certa dificuldade. Estudos acerca da capacidade de polissacarídeos bacterianos em aderir a superfícies, assim como a fixação desses com formalina, estabilização e inibição da aderência por proteína, são exemplos de trabalhos recentes sobre a possibilidade de confecção de polímeros biomédicos. A técnica proposta envolve a fixação do filme com formalina, marcando-o com cristal violeta, e a eluição realizada com etanol. A densidade óptica da solução seria determinada por ensaio enzimático imunossolvente (filtro em 540 nm). A referida técnica mostra-se capaz de distinguir um organismo aderente de um organismo não-aderente, demonstrando que a presença de proteína poderia inibir a aderência. Outro ponto a ser destacado é o fato de que a aderência de diferentes microrganismos a distintos polímeros de importância biomédica pode ser avaliada (JORDAN *et al.*, 1996).

O uso de biofilmes também se mostra relevante sob o aspecto da pesquisa imunocitoquímica. A combinação de polissacarídeos com proteínas, na constituição de um filme biológico, como se observa em algumas células bacterianas e se tem tentado reproduzir em laboratório, tende a tornar o biofilme

mais resistente à degradação em solução aquosa, característica interessante para os propósitos de uso de filmes biológicos (SHIH, 1996).

A propriedade de adesão tecidual de hidrogéis modificados através de ligações cruzadas com carbodiimida hidrossolúvel, sendo biodegradáveis, apresentam características de cola biológica. O uso de biofilmes como “colas biológicas” tem sido amplamente pesquisado (KIM *et al.*, 1999). A propriedade de um hidrogel modificado com carbodiimida em aderir a tecidos também tem sido investigada e comparada à cola convencional de fibrina, exibindo o biogel de gelatina e poli-L-ácido-glutâmico (PLGA) uma característica adesiva superior e maior segurança que as colas biológicas tradicionais (OTANI *et al.*, 1996).

Atualmente também se tem registro de aplicação de géis de polissacarídeos aniônicos de origem natural na constituição de formulações cosméticas, devido à alta viscosidade e elasticidade do filme construído (SHIH, 1996). O efeito combinado da difusão e biodegradação do gel e a taxa de permeabilidade a macromoléculas, mostrou-se dependente do grau e densidade de ligações cruzadas. Esse sistema é conhecido atualmente como sistema de liberação controlada, sendo utilizado, principalmente, com o objetivo de administrar drogas ao organismo através de liberação contínua. O uso de filmes polissacarídeos biodegradáveis na constituição de microesferas de liberação controlada de drogas, também é um mecanismo útil no tratamento de doenças periodontais (TOMIHATA & IKADA, 1997).

Com o objetivo de se ter maior especificidade de alcance na liberação controlada de droga, em células ou órgãos específicos, microesferas de gel de quitosana, modificadas por reticulação com glutaraldeído, foram utilizadas no tratamento de hepatomas humanos, demonstrando uma maior inibição do crescimento de SK-Hep-1 (células de hepatoma humano) *in vitro*, quando comparados com formas tradicionais de administração de drogas (CHARLWOOD *et al.*, 1998). A liberação controlada de agentes aromatizantes em alimentos, principalmente doces industrializados, utilizando-se géis de gelatina contendo sacarose, é outro exemplo de aplicação (HARRISON & HILLS, 1996).

A difusão de macromoléculas protéicas através de um hidrogel é função do grau de ligações cruzadas e da presença de agentes co-monoméricos não-ionizáveis (AM-ENDE & PEPPAS, 1997). Nos últimos anos tem-se renovado o interesse em plásticos biodegradáveis ou mesmo sobre aqueles feitos de polímeros naturais, como o amido, em filmes contendo alto teor de amilose, que tendem a apresentar uma boa elongação, tensão, resistência e estabilidade. Alguns fenômenos observados nos hidrogéis dependem do desenvolvimento de uma rede tridimensional na fase líquida (LAWTON, 1996).

Agregados intermoleculares e micro-áreas cristalinas podem atuar como pontos de ligação cruzada ("cross-linking") em cadeias macromoleculares (BIANCHI *et al.*, 1997). A imobilização de enzimas tem sido estabelecida no campo da tecnologia devido ao seu alto grau de especificidade na seleção de vias e reações de conversão. A porosidade do gel é fator importante para permitir a penetração das moléculas do substrato no gel e desta forma, reagir com a enzima, contribuindo para proteger a enzima contra possíveis alterações físicas do polissacarídeo (CHAITALI *et al.*, 1997).

I.1.4. Hidrogéis

Hidrogéis referem-se a uma rede tridimensional polimérica, capaz de interagir com grande quantidade de solvente, cujas propriedades dependem da rede de polímero construída e do seu conteúdo de água. O comportamento dinâmico da água em hidrogéis montados a partir de polissacarídeos pode ser descrito através de dois processos: **i)** o movimento físico ao longo das cavidades livres da rede e **ii)** a formação de ligações da água com grupos hidrofílicos do gel. A dominância de um ou outro processo dependerá da estrutura e da composição química do hidrogel em questão. A água ligada tende a impedir a mobilidade da cadeia polimérica principal, especialmente no caso de hidrogéis com baixo teor aquoso (CHENG *et al.*, 1998; POVEDA & BARBERO, 1998).

Hidrogéis obtidos através da polimerização de derivados de dextrana, podem ser degradados por hidrólise química dos grupos ésteres lábeis presentes

nas ligações cruzadas, sob condições fisiológicas, assumindo, desta forma, boa biocompatibilidade nos processos de degradação e absorção de compostos endógenos como o lactato, sugerindo-se sua aplicação para produtos biomédicos ou farmacêuticos (DALLA-RIVA-TOMA & KARL, 1997).

Um dos grandes desafios que confronta a ciência de materiais atualmente é o desenvolvimento de uma nova geração de biomateriais para reparo do organismo humano, estabelecendo uma base científica para o uso corrente de biomateriais para aplicações clínicas. A permeabilidade de proteínas de diferentes pesos moleculares em um hidrogel biodegradável (um sistema-modelo para a liberação controlada de macromoléculas biologicamente ativas), tem sido largamente investigada.

Estudos envolvendo a preparação de hidrogéis através da co-polimerização com polipeptídeos sintéticos biodegradáveis (SKARDA & RYPACEK, 1997), têm demonstrado que géis, com diferentes densidades da malha constituinte controlam a difusão de peptídeos e proteínas com pesos moleculares entre 6.000 e 60.000.

I.1.5. Métodos de Bioafinidade: Cromatografia de Afinidade

A cromatografia de afinidade ocupa um lugar único na tecnologia de separação, desde que se apresenta como uma técnica singular que permite a purificação de quase todas as biomoléculas com base em suas funções biológicas (LOWE, 2001) ou nas suas estruturas químicas individuais. Apesar do fato desta técnica ter-se tornado rotina há 50 anos, a sua aplicação tem se desenvolvido tão rapidamente que atualmente é utilizada em praticamente todos os laboratórios envolvidos com a purificação de substâncias biológicas. A cromatografia de afinidade é um tipo de cromatografia de adsorção, na qual a molécula a ser purificada é específica e reversivelmente adsorvida por uma substância ligante complementar imobilizada em um suporte insolúvel (matriz). Em 1967, AXEN e colaboradores relataram que moléculas contendo grupos amina primários poderiam ser complexadas a matrizes polissacarídicas ativadas por brometo de cianogênio. Isto representou o começo da cromatografia de afinidade como

técnica rotineira. A seleção de um ligante para a cromatografia de afinidade é regida por dois fatores. Primeiro, o ligante deve exibir afinidade específica e reversível pela substância a ser purificada. Em segundo, este deve ter grupos quimicamente modificáveis, que possam ser anexados à matriz, sem, no entanto, destruir sua atividade ligante (ARICA *et al.*, 2001).

A purificação é frequentemente, da ordem de milhares de vezes e a recuperação do material ativo é normalmente alta. Muitas separações têm sido realizadas em apenas um procedimento, tendo por vantagem principal a economia de tempo. A correta escolha do gel cromatográfico (ou sua montagem) é ditada tanto pelo tipo de grupos existentes na molécula ligante, quanto pela natureza da reação de ligação.

A especificidade dessa reação indica quais grupos, no ligante, são essenciais para a interação com a substância ligante, e quais são menos importantes. Cromatografias de afinidade têm sido usadas para diversas aplicações (**TABELA 1**), além da purificação de moléculas biológicas:

- i. purificação de uma substância a partir de misturas biológicas complexas
- ii. concentração de soluções diluídas;
- iii. separação de formas desnaturadas ou modificadas, de substâncias ativas;
- iv. armazenagem de proteínas instáveis, em ligantes imobilizados;
- v. remoção de contaminantes residuais de moléculas parcialmente purificadas;
- vi. preparação de padrões de diagnóstico sérico;
- vii. confecção de reatores enzimáticos imobilizados;
- viii. re-utilização e estabilização de cofatores;
- ix. estudos analíticos e estruturais, estudos cinéticos e avaliação de constantes de dissociação e estudos de caracterização.

A cromatografia de afinidade tem efeito concentrador, permitindo que grandes volumes sejam convenientemente processados. A alta seletividade das separações é derivada das especificidades naturais das moléculas interagentes.

TABELA 1. Relação biológica entre substâncias com possibilidade de separação por cromatografia de bioafinidade

Substância	Possibilidade de Ligação
Enzimas	Substratos, cofatores, inibidores competitivos
Ácidos Nucléicos	Bases complementares, enzimas específicas
Hormônios e Vitaminas	Proteínas transportadoras, receptores
Anticorpos	Antígenos, células
Lectinas	Glicoproteínas, polissacarídeos
Células	Lectinas, proteínas específicas da superfície celular

Desde 1965, o uso da cromatografia por afinidade tem resolvido muitos problemas na ciência, como o isolamento e purificação de enzimas e lectinas, que está diretamente ligado à especificidade das mesmas (NAIR *et al.*, 2000; LOWE, 2001). Muitas matrizes, criadas para filtração em gel, disponíveis comercialmente, têm mostrado bons desempenhos como matrizes para cromatografia de afinidade. Este é o caso da Sephadex, que é uma dextrana e da Sepharose, que é uma agarose (MOREIRA *et al.* 1983). Mais recentemente tem-se desenvolvido bastante o uso de glicoconjugados naturais como quitinas e gomas vegetais reticuladas por tratamento com epicloridrina (MOREIRA, 1998). Muitos glicoconjugados naturais, insolúveis, são adsorventes sensíveis para o isolamento de lectinas.

Vale ressaltar que o uso de gomas naturais para a purificação de proteínas é muito restrito (FUGITA *et al.*, 1975; APPUKUTTAN *et al.*, 1977, TAVARES, 1998). O fato das lectinas interagirem especificamente com açúcares abre a possibilidade da utilização de colunas de afinidade com matrizes contendo o carboidrato pelo qual a lectina apresenta especificidade. Assim, pode-se ter uma série de colunas com características próprias devido às diferenças estruturais apresentadas pelos oligossacarídeos presentes em diversas fontes vegetais para o isolamento de diferentes lectinas (MOREIRA, 1998; GARROS-ROSA, 2000; MATOS, 2000; BRAGA, 2001; TEIXEIRA, 2001).

I.1.5.1. Interação Proteínas x Polissacarídeos

A aplicação de géis, como por exemplo, gelatina e agarose, carragenana ou ácidos poliurônicos ou compostos proteína-polissacarídeos que apresentem ligações covalentes (KATO & MATSUDOMI, 1998) é importante no entendimento do comportamento de difusão de macromoléculas protéicas em soluções aquosas de polissacarídeos. O tamanho, a forma e valência de manosídeos multivalentes são cruciais na determinação das propriedades de ligação a lectinas (ROY *et al.*, 1998).

Em células vegetais, a deposição e formação de ligações cruzadas com glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGP's) na parede celular, contribuem para a formação de uma barreira resistente à infecção fitopatogênica. Essas glicoproteínas recebem o nome de "extensinas", sendo as mais comuns as extensinas de batata (*Solanum tuberosum* L. cv *Desirre*), que atuam tanto na arquitetura da parede celular, quanto na resistência/defesa vegetal a doenças (ROY *et al.*, 1998).

I.2. Proteínas com Afinidade por Açúcares: Lectinas

I.2.1. Definições

A mais recente e apropriada definição para as lectinas foi dada por PEUMANS & VAN DAMME (1995), como "*proteínas de origem não imune que possuem um ou mais sítios ligantes de carboidratos os quais, no caso de enzimas, não são requeridos para a atividade catalítica*". A especificidade por açúcar é, portanto, a principal característica das lectinas. Com base na sua estrutura global, os mesmos autores, posteriormente, os mesmos autores criaram uma subdivisão de lectinas em quatro classes: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. Mais recentemente, MONTEIRO-MOREIRA (2002) sugeriu um novo grupo, as multilectinas.

As *merolectinas* são proteínas pequenas que possuem exclusivamente um único domínio ligante a carboidrato, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As *hololectinas* compreendem todas as lectinas com sítios ligantes múltiplos, sendo capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. As *quimerolectinas*, além de possuírem um ou mais domínios ligantes a carboidratos, possuem também outros domínios com atividade catalítica bem definida ou outra atividade biológica. As *superlectinas* consistem de proteínas que têm pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos, que reconhecem açúcares estruturalmente diferentes. As *multilectinas* consistem de proteínas com sítios idênticos de ligação a distintos carboidratos.

Dependendo do número de sítios ligantes a carboidratos, as quimerolectinas se comportam como merolectinas ou hololectinas. A interação das lectinas com células é, dependente da presença dos carboidratos apropriados na sua superfície. Assim, as lectinas ao interagirem com os carboidratos da superfície dos eritrócitos induzem ligações cruzadas entre as células, que resultam na aglutinação, denominada tecnicamente de aglutinação celular ou hemaglutinação (LIS & SHARON, 1998).

A especificidade lectínica foi inicialmente estudada por MAKELA (1957), que dividiu os monossacarídeos inibidores em quatro grupos conforme a configuração em C₃ e C₄ da cadeia piranosídica. Assim lectinas que ligam L-fucose (*Lotus tetragonolobus* e *Ulex europaeus*) pertenceriam ao grupo I, lectinas que ligam galactose e N-acetil-galactosamina (*Artocarpus incisa*, *Glycine max* e *Phaseolus lunatus*) pertenceriam ao grupo II e lectinas ligantes de manose e glucose (*Canavalia ensiformis*, *Cratylia floribunda*, *Dioclea grandiflora*, *Lens culinaris* e *Pisum sativum*) pertenceriam ao grupo III.

Segundo SHARON & LIS (1989), com base na sua especificidade, as lectinas são classificadas em cinco grupos de acordo como os monossacarídeos pelos quais elas exibem grande afinidade: manose, galactose/N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, fucose, e ácido N-acetil-neuramínico (todos os açúcares de configuração D com exceção da L-fucose). As lectinas podem ainda ser classificadas considerando os oligossacarídeos, neste caso

freqüentemente se ligam a di, tri e tetrassacarídeos. Nestes grupos encontram-se lectinas que possuem a mesma especificidade, mas podem diferir em suas afinidades por diferentes oligossacarídeos.

1.2.2. Isolamento

O estudo das lectinas foi iniciado por STILLMARK (1888), quando verificou que extratos de sementes de algumas plantas aglutinavam hemácias e eram tóxicas para animais, demonstrando que a ricina aglutinava células epiteliais, hepáticas e leucocitárias. Na mesma ocasião, o autor encontrou propriedades semelhantes em extrato de outra semente, *Croton tiglium*, que apresentava, no entanto, especificidade diferente da ricina. ELFSTRAND (1898) mostrou que uma fração de *Croton tiglium* (crotina) apresentava atividade diferente, conforme a origem da hemácia. Apesar da habilidade em ligar-se a carboidratos seja comum a todos os grupos de lectinas, muitas lectinas vegetais possuem sítios adicionais de ligação que não são diretamente vinculados a carboidratos (GEYER & GEYER, 1998; RUDIGER, 1998).

Muitos trabalhos foram publicados com lectinas não purificadas, até que AGRAWALL & GOLDSTEIN (1965), isolaram a lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) por cromatografia de afinidade. Originalmente, acreditou-se que a especificidade das lectinas por açúcares poderia ser expressa em termo dos monossacarídeos que melhor inibissem a reação de aglutinação. Atualmente sabe-se que a especificidade pode ser bem mais fina; na realidade as lectinas interagem na natureza com oligossacarídeos e não com açúcares simples (OLSEN *et al.*, 1997; OCHIENG *et al.*, 1998; LIS & SHARON, 1998). A maneira mais usada para o isolamento de lectinas é a cromatografia de afinidade que depende da especificidade da lectina por açúcares (MOREIRA, 1998). Assim sendo, é possível preparar colunas de afinidade como matriz cromatográfica com polissacarídeos advindos de diversas fontes vegetais para o isolamento de diferentes lectinas (ROY *et al.*, 1998).

O isolamento de lectinas envolve vários métodos de separação, inclusive o descarte de muitas substâncias consideradas contaminantes. O trabalho se inicia pela fragmentação física do material de modo a liberar as proteínas do interior das células. Dependendo do material de partida, diversos métodos podem ser empregados de modo a eliminar contaminantes não protéicos. Em seguida, o material é submetido à extração com uma solução tampão ou salina. O sucesso do isolamento de lectinas depende da escolha do processo cromatográfico a ser utilizado. Até a década de 1970, o isolamento de lectinas seguia a metodologia padrão para o fracionamento convencional de proteínas, com cromatografia de troca iônica e filtração em gel.

Após a descoberta da cromatografia de afinidade por AGRAWAL e GOLIDSTEIN (1965), quando isolaram a Con A em coluna de Sephadex, praticamente todo o processo de isolamento de lectinas depende da cromatografia de afinidade e ocasionalmente de outro método convencional auxiliar. O esquema de fracionamento a ser seguido depende da especificidade da lectina por açúcares. Polissacarídeos naturais, insolúveis, são adsorventes sensíveis e utilizados para o isolamento das lectinas. Eles são geralmente baratos e nem sequer precisam ser quimicamente homogêneos, embora precisem estar completamente livres de substâncias que possam ser liberadas por lixiviação, durante a cromatografia.

Assim diversos glicoconjugados naturais têm sido usados, entre eles: estromas de células vegetais, estromas humanos glutarizados, quitina, oligossacarídeos solúveis, tratados com agentes formadores de ligação cruzadas, como a epiclorigrina ou divinilsulfona (MOREIRA, 1998), mono e oligossacarídeos, ou glicoconjugados imobilizados em matrizes gelatinosas hidrofílicas.

I.2.3. Propriedades Gerais

As lectinas formam um grupo de proteínas heterogêneas, do ponto de vista estrutural, pois variam muito quanto ao tamanho, estrutura e organização molecular, contudo, apresentam em comum a capacidade de reconhecer e

interagir com sítios contendo glicoconjugados (SIMANEK *et al.*, 1998). Assim a característica mais importante das lectinas é que elas se ligam a mono e oligossacarídeos de uma maneira reversível e com alta especificidade (LIS & SHARON, 1998; POVEDA & BARBEIRO, 1998; SHARON, 1998).

A seletividade de ligação de uma lectina ao grupo açúcar é produto da combinação entre ligações tipo pontes de Hidrogênio aos grupos hidroxila do açúcar, com forças tipo Van der Waals, freqüentemente incluindo o empacotamento da face hidrofóbica do açúcar contra as cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos. A geometria estrutural dos oligossacarídeos, ligantes à proteína, ajuda a estabilizar a lectina, aumentando a habilidade desta em distinguir superfícies de polissacarídeos e a formar ligações cruzadas de uns glicoconjugados em outros. A afinidade das lectinas por oligossacarídeos pode ser influenciada pela forma dos compostos, que possuem moléculas flexíveis com liberdade de rotação em torno de ligações glicosídicas, inerentes à molécula (SHARON & LIS, 1998; TROMBETTA & HELENIUS, 1998).

Na determinação da especificidade por carboidratos, faz-se uso de um ensaio de inibição por haptenos. A especificidade da lectina é determinada através da reação de diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos e/ou glicopeptídeos com esta proteína, inibindo a hemaglutinação ou a precipitação de polissacarídeos ou (glicoconjugados) pela lectina. A interação específica das lectinas com monossacarídeos, explica a especificidade das mesmas por hemácias, quando sabemos que os determinantes de grupos sangüíneos são oligossacarídeos que apresentam terminais glicanos diferentes.

Segundo WU e colaboradores (1988), a associação que ocorre entre a lectina e seu açúcar específico, é o resultado de uma perfeita complementariedade configuracional e estrutural dessas moléculas.

A aglutinação de eritrócito ou hemaglutinação é o principal atributo para determinar a atividade destas proteínas e é usado rotineiramente para sua detecção e caracterização. As reações de aglutinação e precipitação de lectinas são inibidas por açúcares específicos ligantes para cada lectina (CARVER, 1997; WEIS, 1997; DANGUY *et al.*, 1998; LIS & SHARON, 1998).

Muitas lectinas são tolerantes a variações no carbono 2 do monossacarídeo ao qual se ligam. Por exemplo, lectinas manose específicas, usualmente reagem embora em menor proporção, com o N-Acetil-glicosamina, como ocorre com algumas lectinas do grupo III (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986, SHARON & LIS, 1989, SHARON & LIS, 1990). Contrariamente VAN DAMME e colaboradores (1991), observaram que as lectinas isoladas dos bulbos de *Amaryllidaceae* e *Alliaceae* possuem especificidade exclusiva por manose.

A facilidade com que as lectinas vegetais têm sido isoladas tem levado a diversas aplicações práticas nas glicociências e a um grande número de estudos sobre sua caracterização química, físico-química e biológica. Elas também têm servido como ferramentas laboratoriais em virtude de sua capacidade em transmitir sinais entre glicoligantes na superfície de células responsivas (RUDIGER, 1998). Lectinas mostram-se ser ferramentas inestimáveis na investigação funcional e estrutural de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas (VICENTE *et al.*, 2001), e para o exame de mudanças que ocorrem na superfície celular durante processos patológicos e fisiológicos, de diferenciação celular para câncer (LIS & SHARON, 1998).

Durante a última década, obteve-se um progresso extraordinário na elucidação das características da lectina que são importantes para a ligação a carboidrato. Na atualidade, talvez por causa da infinidade de aplicações biotecnológicas que esta proteína potencializa, verifica-se que existe um grande interesse do meio científico em estudá-las amplamente na natureza, abrangendo tanto o reino vegetal quanto o animal. Além destas matrizes encontradas comercialmente, têm sido muito utilizadas as preparadas a partir de polissacarídeos naturais, entre os quais se destacam as gomas de sementes de leguminosas (APPUKUTAN, *et al.*, 1977, MOREIRA *et al.*, 1997, TAVARES, 1998).

Desde que as lectinas foram descobertas, um vasto espectro de possíveis aplicações vem sendo sugerido para essas moléculas, tanto na bioquímica como na imunologia e áreas afins (LIENER, *et al.*, 1986; MARBAN-MENDONZA *et al.*, 1987; GRANGEIRO, 1996; MOREIRA, 1998; BACHHAWAT-SIKDER *et al.*, 2001).

As lectinas podem ser utilizadas em métodos de separação, utilizando-se a propriedade da bioespecificidade na cromatografia de afinidade (LOWE, 2001), para purificar e isolar moléculas biológicas como receptores hormonais, fatores de crescimento, neurotransmissores e imunoglobulinas (HEDO *et al.*, 1981; HELM & FROESSE, 1981). Com relação aos possíveis papéis biológicos apresentados pelas lectinas, pode-se ressaltar, ainda, o reconhecimento de carboidratos de superfície celular, atividade característica de lectinas de animais e de vírus (WEIS, 1997, SIMANEK *et al.*, 1998). As chamadas “selectinas” são proteínas integrais de membrana que servem de intermediários à adesão de leucócitos às células endoteliais durante a migração leucocitária (WEIS, 1997). Ainda no campo biomédico, as lectinas podem servir como chave de interseção entre estudos de glicobiologia e imunologia, como no caso das “galectinas” (SINOWATZ *et al.*, 1998; BACHHAWAT-SIKDER *et al.*, 2001), uma família de lectinas animais conservadas ao longo da evolução. As galectinas participam em diferentes processos biológicos que requeiram o reconhecimento de carboidratos, tais como a adesão celular, a regulação do crescimento celular, inflamação, imunomodulação, apoptose e metástase (RABINOVICH *et al.*, 1999).

A habilidade de células em aderirem às outras ou a constituintes da matriz extracelular é fundamental para os organismos metazoários, e é evidente o papel funcional das galectinas e selectinas na mediação do contato adesivo entre células animais (DANGUY *et al.*, 1998; KALTER & STIERSTORFER, 1998).

Há fortes evidências que as lectinas estejam distribuídas nos tecidos mamíferos (NAIR *et al.*, 2000), incluindo o tecido nervoso. Muitas lectinas isoladas do tecido nervoso parecem ter papel crucial durante os processos ontogênicos, principalmente no que diz respeito ao crescimento e reconhecimento axonal, migração neuronal, sinaptogênese e mielinização (ZANETTA, 1998).

1.2.4. Funções na Planta

Hipóteses sobre as funções biológicas das lectinas vegetais podem ser divididas em dois grupos: (a) aquele no qual se assume que as lectinas sejam designadas para reagir com parceiros externos (papel extrínseco) e (b) aquelas

que apresentam interação com parceiros ligantes dentro da planta (papel intrínseco) (RUDIGER, 1998). A primeira função fisiológica proposta para lectina seria a de proteína de reserva, desde que lectinas de leguminosas são sempre encontradas nos corpos protéicos ou como proteínas de transporte por interagirem com açúcares (LIENER *et al.* 1986). Outra função proposta para lectinas seria a de estar envolvida no empacotamento das proteínas de reserva, visto que várias lectinas de leguminosas testadas mostraram-se hábeis em interagir com proteínas de reserva de suas respectivas plantas (RAMOS, 1996).

Durante a maturação de sementes demonstrou-se que a lectina é detectada somente depois do aparecimento das proteínas de alto peso molecular. Neste estudo, um precursor da lectina, o qual interage com povidextransa, foi detectado previamente na semente imatura. Este precursor mostrou propriedades similares àqueles da lectina, porém apresentava atividade hemaglutinante extremamente baixa (MOREIRA, 1998). Entretanto, duas possíveis funções estão em maior evidência como mediadores da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de leguminosas e como agentes de defesa de plantas contra patógenos e predadores, principalmente insetos e fungos (INBAR & CHET, 1997; LI *et al.*, 2001). O papel de molécula de reconhecimento, proposta para as lectinas de leguminosas nos eventos iniciais da simbiose legume-*Rhizobium*, surgiu da observação da especificidade pronunciada expressa entre a planta e o microrganismo específico para o estabelecimento de nódulos e detecção de lectinas nos pelos capilares de raízes de várias leguminosas (DIAZ *et al.*, 1989).

1.3. Polissacarídeos Vegetais

Carboidratos apresentam larga diversidade estrutural e funcional, tendo papéis como fontes energéticas e elementos para o reconhecimento, controle da estrutura, função e dinâmica das proteínas (SIMANEK *et al.*, 1998). Os mistérios das funções de glicoconjugados complexos têm encantado cientistas por décadas. Considerações teóricas têm atribuído aos oligossacarídeos de superfície celular uma enorme capacidade em armazenar informação (VON DER LIETH *et al.*, 1998).

Carboidratos estão presentes em vegetais freqüentemente como polissacarídeos, produtos de policondensação de monossacarídeos ou seus derivados (ácidos urônicos, açúcares aminados, etc), ligados glicosidicamente (TABELAS 2 e 3) através da eliminação de água entre duas moléculas adjacentes.

TABELA 2. Unidades Monossacarídicas Constituintes em Oligossacarídeos de Alimentos

Unidade ^b	Polissacarídeo
α -D-Glcp	Amido; hidrolizados de amido e amidos modificados
β -D-Glcp	Celulose; celulosas modificadas, xiloglucanas
β -D-GlcpA	β -D-glucanas de ligações mistas, xantanas e glucomanas
β -D-Galp	Acacia e outras gomas; pectinas
α -D-Galp	Gomas vegetais; ágars, carragenanas, xiloglucanas e pectinas
α -D-GalpA	Galactomananas
β -D-Manp	Pectinas e algumas gomas vegetais
α -L-Rhap	Galactomananas, glucomanas e xantanas
α -L-GulpA	Pectinas, gomas vegetais
3,6-Anhydro- α -D-Gal	Alginatos
3,6-Anhydro- α -L-Gal	Carragenanas
α -L-Fucp	Ágars
β -D-Fruf	Xiloglucanas, pectinas
	Inulinas

^a Átomos de oxigênio envolvidos em ligações inter-açúcar, dentro dos polissacarídeos, designados O-O indicam hidroxil livre

^b Nomes completos são dados na TABELA 3

Fonte: STEPHEN & CHURMS, 1995

TABELA 3. Fontes e Estruturas dos Polissacarídeos como Componentes Principais ou Aditivos de Alimentos

Polissacarídeo	Principais Fontes	Estrutura Molecular ^a
Amido (amilose)	Grãos cereais, tubérculos	Essencialmente linear (1→4)- α-D-glucana
Amido (amilopectina)	Grãos cereais, tubérculos	Cadeias curtas de (1→4)- α-D-Glc unidas por ligações 0-6 de outras cadeias
Amidos modificados	Grãos de milho	Moléculas de amido modificadas com ligações cruzadas; alguns C-6 oxidizados; acetatos
Maltodextrinas	Amidos de milho e batata	Hidrolisados ácidos e catalisados por enzimas, de massa molecular inferior a 4000
Carboximetilcelulose	Celulose de algodão	Grupos HO ₂ CCH ₂ ligados a grupos 0-6 de cadeias lineares de (1→4)- β-D-glucana
Carragenanas	Sementes de Guar, locust bean, tara	D-galactanas sulfatadas, unidades de cadeias (1→3)-β-D-mananas
Ágars	Algas vermelhas (Gracilaria, Eucheuma spp., Gelidium spp.)	Assim como para as carragenanas, L-unidades de anidro-açúcares
Goma arábica	Exsudato do caule de Acacia Senegal	Galactomanana modificada
Goma de Tragacanth	Astragalus spp.	Arabinogalactana modificada, ácida, pectina modificada
Alginatos	Algas pardas (<i>Macrocystis</i> , <i>Ascophyllum</i> , <i>Laminaria</i> , <i>Ecklonia</i> spp.)	Linear (1→4)- β-D -manuronana e α-L-guluronana
Goma Xantana	<i>Xantomonas campestris</i>	Estrutura celulósica, D-Manp (duas) e cadeias laterais contendo GlcA, acetiladas em Manose

^a Abreviaturas para formas usuais de unidades de açúcar: D-glucopiranoose, D-Glcp; D-galactopiranoose, D-Galp; Ácido D-glucorônico, D-GlcA; Ácido D-galacturônico, D-GalA; D-manopiranoose, D-Manp; Ácido D-manurônico, D-ManA; L-arabinofuranose, L-Araf; D-xilopiranoose, D-Xylp; L-rhamanopyranose, L-Rhap; L-fucopiranoose, L-Fucp; D-frutofuranose, D-Fruf; Ácido L-gulurônico, L-GulA. **Fonte:** STEPHEN & CHURMS, 1995

Os polissacarídeos possuem elevada massa molar contendo, em alguns casos, milhares de unidades monossacarídicas (HEGNAUER, 1986; ARIFKHODZHAEV, 1997; LOYD *et al.*, 1998; POVEDA & BARBERO, 1998).

Os principais polissacarídeos de parede celular, em vegetais, são a celulose, hemicelulose e substâncias pécticas (pectinas). Polissacarídeos vegetais são extremamente distintos e apresentam-se possuidores de funções biológicas típicas, dependendo das espécies nas quais são encontrados, assim como, do local da planta onde são acumulados ou venham a se apresentar biologicamente ativos (GARCIA *et al.*, 1998). As glucanas, por exemplo, têm sido isoladas de órgãos epígeos ou hipógeos da planta (CASTRO-DIEZ *et al.*, 1998; VON DER LIETH *et al.*, 1998).

O processo de dissolução de polissacarídeos pode envolver a disrupção de uma estrutura organizada, como no caso do amido granular (GREUB & WDIN, 1969; STEPHEN & CHURMS, 1995), ou o uso de enzimas, as quais liberam o polissacarídeo do material encrustante, podendo causar despolimerização deste. A solubilidade é afetada pelo pH e por cátions ou agentes complexantes presentes (ISOBE *et al.*, 1996). As soluções são normalmente de alta viscosidade, propriedade esta, influenciada por, entre outros fatores, o peso molecular, forma, conformação e arranjo de outros políssacarídeos no gel. As propriedades reológicas dos polissacarídeos são criticamente importantes (HOTLZ & ASHER, 1997; JAGUR-CRODZINSKI, 1999). Essas são fortemente influenciadas pela presença de eletrólitos (SCHORSCH *et al.*, 1997).

A identificação de polissacarídeos quase invariavelmente requer a hidrólise ácida e análise quantitativa dos monossacarídeos e ácidos urônicos através de combinações de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GCMS), HPLC, eletroforeses de zona capilar e métodos quirópticos. Estudos de microscopia de transmissão eletrônica sobre glucanos extracelulares de origem fúngica observados na constituição das hifas, revela que estes parecem estar envolvidos tanto na adesão micelial à parede, quanto na imobilização das superfícies das hifas, durante os processos de degradação. A decodificação da informação existente nas estruturas oligossacarídicas envolve o reconhecimento

destas por outras biomoléculas (IQBAL *et al.*, 2000), principalmente proteínas (lectinas) (POVEDA & BARBERO, 1998; SIMANEK *et al.*, 1998; TROMBETTA & HELENIUS, 1998; VON DER LIETH *et al.*, 1998). Esse reconhecimento específico (MOREIRA & OLIVEIRA, 1983a,b; SINOWATZ *et al.*, 1998) pode vir a mediar uma resposta biológica particular, tal como interações hospedeiro-patógeno (WEISS, 1997), fertilização, alterações auto-imunes e diferenciação celular (POVEDA & BARBERO, 1998).

Devido ao fato de possuírem referida atividade de ligação, lectinas têm sido usadas como ferramentas na detecção de glicoconjugados em estudos bioquímicos e histológicos (ANTONYUK & ANTONYUK, 1993), tanto em secções de tecidos quanto em superfícies celulares. É, no entanto, o papel dos carboidratos nos processos de adesão celular (MCLEAN *et al.*, 1993), especificamente entre as selectinas (proteínas seletivas de ligação a carboidratos) que tem levado ao rápido crescimento da glicobiologia molecular (MURAMATSU *et al.*, 1987; WEIS & DRICKAMER, 1996; SIMANEK *et al.*, 1998).

Gomas têm sido definidas como polissacarídeos ou seus derivados, que hidratam em água fria ou quente, formando soluções viscosas ou dispersões (CORDEMOY, 1911). Estas são classificadas industrialmente em gomas naturais, modificadas e sintéticas. As gomas naturais ainda podem ser subdivididas em exsudadas e endospermica (REICHER, *et al.* 1991).

As gomas industriais, que compõem a maior parte dos polissacarídeos hidrossolúveis, apresentam larga aplicação na indústria, seja essa alimentícia ou não. Todas as aplicações dependem das propriedades moleculares e dos vários estágios de hidratação, porém, principalmente são dependentes do comportamento molecular em soluções e géis. Em termos práticos, gomas são definidas como arranjos moleculares hidrofílicos ou hidrofóbicos, de alto peso molecular, usualmente com propriedades coloidais, que, em um apropriado solvente produzem géis ou suspensões de alta viscosidade ou soluções de baixo conteúdo de substância seca. Substâncias hidrofóbicas freqüentemente chamadas de gomas seriam hidrocarbonetos de alto peso molecular e outros produtos do

petróleo, borrachas, alguns polímeros sintéticos, bálsamos ou resinas (DE PAULA, 1995).

Recentemente, o termo “goma” como tecnicamente empregado em indústria, passou a referir-se a polissacarídeos vegetais ou microbianos e seus derivativos, hábeis em formar dispersões em água fria ou quente, produzindo misturas viscosas ou soluções. As últimas referências ao termo goma equivalem a derivados hidrossolúveis de celulose e aos derivados e modificações de outros polissacarídeos que, em sua forma original (natural) seriam insolúveis. Desta forma, a definição de gomas pode incluir polissacarídeos mucilaginosos. A modificação de gomas e a adição dessas em uma solução pode conferir um aumento na viscosidade da dispersão, mesmo em baixas concentrações (TAGER, 1978a,b; STEPHEN, 1995).

Gomas do velho mundo seriam as que apenas fossem de origem exsudada vegetal. Muitas famílias vegetais incluem espécies que exsudam gomas em algum grau (TAVARES, 1995). Gomas podem ser exsudadas apenas em pequenas quantidades, em teores não discerníveis, ou mesmo em grandes quantidades, gerando as chamadas incrustações. As gomas vegetais correspondem à cerca de 10 a 15 % do total de gomas comercializadas atualmente (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Plantas que produzem gomas são, geralmente, arbustos ou árvores de pequeno porte (CORDOMOY, 1911).

As sementes mostram-se como fontes primárias de fornecimento de carboidratos. Muitas sementes contêm amido como principal polissacarídeo de reserva e provimento energético, usado pela planta embriônica no seu crescimento inicial. Quase todas as plantas utilizadas pelo homem produzem sementes com amido como carboidrato de reserva (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

I.3.1. Polissacarídeos de Sementes

Algumas sementes, principalmente de leguminosas, contêm um endosperma gomoso, cuja principal função seria de absorver água, em quantidade. As

galactomananas formam soluções altamente viscosas em contato com a água. A dispersão molecular, é dependente do peso molecular, sua relação proporcional e distribuição man:gal e da distribuição da substituição.

I.3.1.1. Galactomananas

Nos vegetais, as galactomananas são encontradas principalmente no endosperma das sementes de plantas da família *Leguminosae*. Elas também são encontradas em menor quantidade, no endosperma de sementes das famílias *Palmae*, *Annonaceae*, *Convulvolaceae* e *Loganiaceae* (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Podem ainda ser provenientes de líquens, leveduras e fungos, entretanto, estes grupos de galactomananas são estruturalmente diferentes, apresentando uma variação de ligação, além de apresentarem conformações diferentes para as unidades de galactose e manose (BRAGA & DIETRICH, 1999).

A extração de galactomananas em escala comercial começa pela eliminação do tegumento, a semente livre então é moída em finas partículas e então se procede a extração da galactomananas com água fria ou quente, com soluções de hidróxido de sódio, e ácido acético diluído. A porção solúvel da goma é separada por centrifugação ou filtração e o polissacarídeo precipitado por etanol ou complexação com cobre ou bário.

As galactomananas podem ser usadas nas indústrias: de alimentos (estabilizantes, espessantes, e dietéticos), farmacêuticas (como material condutor e retardatário do efeito de alguma droga), de cosméticos, químicas (como floculantes e auxiliares de filtração), na mineração (como material separador) e outras (SOGA & HEIGER, 1998). Na indústria de papel, substituem as hemiceluloses naturais da madeira que se dissolvem no licor da polpa e são removidos no processo. As galactomananas são rapidamente absorvidas pelas fibras de celulose, formando pontes de hidrogênio e aumentando a resistência do produto.

As galactomananas que formam a goma de guar são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, como estabilizante e espessante, assim como

em processos de separação molecular (cromatografias), do tipo de afinidade, para isolamento de lectinas (SALES, *et al.*, 1989, MORAES, 1992; MOREIRA, 1998). Diversas sementes tiveram suas gomas endospermicas investigadas estruturalmente e todas mostraram ser basicamente constituídas de galactose e manose com diferentes proporções das duas unidades monossacarídicas, podem ser citadas: *Caesalpinia spinosa*, *Cyamopsis tetragonolobus*, *Mimosa escabrela*, *Schizolobium parahybum*, *Schizolobium amazonicum*, *Stryphnodendron barbatiman* (REICHER *et al.*, 1991; TAVARES, 1998).

Nos vegetais elas ocorrem como uma cadeia linear de unidades de β -manopiranoose, unidas por ligações (1 \rightarrow 4), com ramificações de α -galactopiranoose unidas por ligações (1 \rightarrow 6) ao longo da cadeia principal. Tem-se como exemplo desta estrutura, as galactomananas das sementes de *Stryphnodendron barbatiman* e *Schizolobium amazonicum* (REICHER *et al.*, 1992). Essa última, inclusive, pode ser citada como exemplo da estrutura convencional de galactomanana de leguminosas (DIETRICH *et al.*, 1998).

Segundo ASPINALL (1982), galactomananas verdadeiras possuem mais de 5% de galactose, entretanto, reservas polissacarídicas das sementes maduras de espécies da família *Palmae* apresentam proporções pequenas de D-galactose, e mesmo assim são consideradas galactomananas. A forma assumida pela molécula de galactomanana depende de vários fatores, entre eles o tipo de ligação entre as unidades monossacarídicas, os substituintes e as interações com moléculas vizinhas. As galactomananas, como outros hidrocolóides, são altamente hidrofílicas, sendo capazes de embeber água em quantidades que excedem em muitas vezes sua própria massa, resultando na formação de pseudogéis homogêneos (MOREIRA, 1998).

O endosperma é a principal fonte de galactomananas nas sementes. A quantidade de endosperma, na semente, é muito variável, podendo atingir valores superiores a 50% do seu peso. Em leguminosas, o teor de galactomananas também é variado, atingindo 38% nas sementes de *Ceratonia siliqua* e estando ausente em outras espécies. A maioria dos estudos sobre galactomananas visa principalmente o interesse comercial que envolve estes polissacarídeos, com aplicações nas

diferentes áreas da indústria. Estas aplicações são decorrentes das propriedades reológicas das soluções aquosas, formando soluções de alta viscosidade em baixas concentrações, levemente afetadas por variações de pH e ciclos de aquecimento e resfriamento (SCHORSCH *et al.*, 1997).

Embora muitas galactomananas tenham sido isoladas nos últimos anos, somente as galactomananas de guar (*Cyanopsis tetragonolobus*), de alfarrobo ou "locust bean" (*Ceratonía siliqua*) e de tara (*Caesalpinia spinosa*) são utilizadas comercialmente (WHISTLER & BETMILLER, 1993). A goma de alfarrobo (*Ceratonía siliqua*) é a mais conhecida e uma das mais antigas gomas extraídas de sementes. A espécie é nativa dos países mediterrâneos, e hoje está sendo cultivada em muitas outras partes do mundo, incluindo Austrália e Estados Unidos, sendo comercializada em quatro principais classes, que variam no grau de pureza e na malha utilizada na sua produção.

A goma de guar surgiu como substituto da goma de alfarrobo apresentando uma série de vantagens. Está disponível comercialmente também em distintos graus de pureza, e a relação manose:galactose de 1,4:1 permite que esse polissacarídeo seja completamente solúvel em água fria (WHISTLER & BETMILLER, 1993). A grande variação no grau de substituição de galactose, como também a quantidade de galactomanana presente no endosperma de leguminosas pode ter importância quimiotaxonômica. A relação manose:galactose varia dentro das sub-famílias e mesmo dentro de gêneros. Deve-se levar em conta, no entanto, que o rendimento desses polissacarídeos pode variar conforme o método de extração (BUCKERIDGE *et al.*, 1995; WESTFALL *et al.*, 1998).

1.3.1.2. Xiloglucanas

As xiloglucanas constituem o principal polissacarídeo hemicelulósico de parede celular primária de dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas e estão também presentes como polissacarídeo de reserva nas sementes de muitas dicotiledôneas. A heterogeneidade de xiloglucanas resulta de diferenças nas massas molares, distribuição e níveis de unidades xilosil substituída por unidades

galactosil e fucosil. Xiloglucanas de sementes podem ser extraídas de muitas espécies tais como *Annona muricata*, *Brassica campestris*, *Copaifera langsdorffii* (BUCKERIDGE *et al.*, 1992), *Vigna radiata*, e *Hymenaea coubaril*. Este polímero consiste de uma cadeia principal semelhante à celulose com unidades simples de α -D-xilopiranosil substituídas em O-6. Em xiloglucanas de sementes, algumas unidades de xilose são posteriormente substituídas em O-2 por unidades de β -D-galactopiranosil (BUCKERIDGE *et al.*, 1995; TEIXEIRA, 2001).

I.3.1.3. Amido e Celulose

No amido nativo, moléculas de amilose, amilopectina e limitadas quantidades de água estão organizadas em micelas, em uma estrutura durável, morfologicamente identificável, ou "grânulo". As vias bioquímicas que levam à formação dos grânulos nas espécies vegetais estão sob controle genético/termodinâmico de vários estágios. Um primeiro estágio é a seleção da unidade de açúcar, a taxa deste e o modo de incorporação no polissacarídeo amido, e o processo de associação, que leva a uma estrutura amorfa, parcialmente cristalina.

Celulose é a substância orgânica mais abundante e naturalmente ocorrente, contestada apenas pela quitina, estimando-se que a natureza sintetize aproximadamente 100 bilhões de toneladas de celulose por ano. Não é de estranhar, portanto, que a humanidade tenha feito uso da celulose em tão larga escala, tanto na produção de papel e derivados, como nas indústrias de construção e como fonte de bioenergia (HEGNAUER, 1986; ANDREW & LITTLE, 1997).

I.3.2. Polissacarídeos Exsudados

As primeiras gomas conhecidas foram as gomas exsudadas, devido ao fato de estarem mais próximas do alcance manual. Elas podiam ser recolhidas das árvores e facilmente secas e transportadas. Exsudados requerem muito trabalho

para a remoção de partículas de impurezas e em alguns casos, para purificação futura e pulverização. Entre os exemplos desse tipo de polissacarídeos estão as gomas arábica, caraia, tragacante, ghatti (WHISTLER & BETMILLER, 1993) e as do cajueiro e angico (DE PAULA, 1995).

A produção de uma goma exsudada é um mecanismo de defesa natural, principalmente das plantas de regiões áridas e semi-áridas (WHISTLER & BETMILLER, 1993; DIXON & HARRISON, 1994). As gomas, que são formadas em um grupo considerável de plantas, possuem uma dupla origem biológica. Em alguns casos, originam-se de produtos de secreção ou são produzidas em condições fisiológicas normais. No entanto, as que possuem melhor solubilidade são exsudadas abundantemente em situações peculiares e são manifestas como produtos patológicos. Em contato com a água elas comportam-se de muitas maneiras diferentes; umas são insolúveis, outras dissolvem-se parcialmente e um terceiro grupo dissolve-se completamente formando soluções viscosas e algumas vezes adesivas (CORDEMOY, 1911).

A goma arábica extraída da espécie *Acacia senegal* é também conhecida como Acácia, goma da Turquia ou goma do Senegal (ANDERSON & BELL, 1977; ANDERSON & CREE, 1968). A goma arábica natural é neutra ou levemente ácida (pH 4,5–5,0), contendo cálcio, magnésio, potássio e, algumas vezes, outros cátions. Apesar de muitas gomas industriais serem de difícil dissolução em água, esta goma, devido à sua baixa viscosidade, pode facilmente ser dissolvida em água, mesmo a uma concentração de até 50%.

A goma arábica é um sal de ácido carboxílico que pode atingir um grau de reticulação mesmo a altas temperaturas (170 °C). O pH entre 4,5 a 6,0 permite a ocorrência da reação, tendo como consequência a produção de soluções mais viscosas (DE PAULA, 1995). FUGITA *et al.* (1975) tratou a goma arábica com epicloridrina e produziu uma matriz cromatográfica de afinidade com reconhecida eficiência para isolar lectinas galactose específicas, a partir de um filtrado de *Streptomyces* sp. A goma arábica é exsudada como resposta à agressão física, ataque de predadores (insetos e microrganismos) e condições climáticas adversas (BLUNT, 1926; OXLEY & WILSON, 1988). Na indústria de alimentos, é utilizada

como estabilizante e na farmacêutica, como estabilizante de emulsões e adesivos na produção de comprimidos. A utilização das gomas exsudadas na indústria de alimentos já se encontra bem estabelecida, como se pode observar na **TABELA 4**.

TABELA 4. Algumas funções e usos das gomas alimentícias

Função Biológica do Polissacarídeo	Utilização
Adesão	Glacês
Ligação entre grupos	Carnes, embutidos
Preenchimento	Alimentos dietéticos
Ação estabilizante de suspensões	Sucos de frutas
Inibição de cristalização	Sorvetes
Ação clarificante	Vinhos, cervejas
Revestimento	Balas, bombons
Encapsulação	Aromas sólidos
Confecção de filmes protetores	Salsichas
Estabilização de espumas	Cervejas, chantilly
Ação geleificante	Pudins, mousses
Inibição de sinerise e espessante	Alimentos congelados

Fonte: BOBBIO & BOBBIO, 1984.

1.3.3. Mucilagens

As mucilagens são substâncias macromoleculares de natureza glicídica que em presença de água entumescem e tomam um aspecto particular de soluções viscosas, também chamadas de géis. Distingue-se das pectinas por não formarem geléias, característica particular deste outro agrupamento (CEBRIAN & DUARTE, 2001). A propriedade de originar, respectivamente, soluções coloidais ou soluções mucilaginosas e geléias, não basta para distinguir as gomas, as mucilagens e as substâncias pécticas.

As mucilagens são consideradas produtos normais do metabolismo das plantas (ROBBINS, 2001). Diversas funções são atribuídas às mucilagens: fonte

útil, como se verifica particularmente nos bulbos e em raízes de várias espécies, nas plantas xerofíticas e até depois, na germinação das sementes e proteção contra certos microrganismos, quando se localizam externamente (MCGARVIE & PAROLIS, 1981). A mucilagem apresenta resíduos de ácido galactosilurônico estável e lábil. A razão de ácido galacturônico/ramnose no polissacarídeo degradado é 1:2. A mucilagem extraída de haste modificada de *Opuntia ficus-indica* contém resíduos de β -L-ramnopiranosil, β -D-galactopiranosil, ácido α -D-galactopiranosilurônico e α -L-arabinosil principalmente na forma furanosídica (MCGARVIE & PAROLIS, 1981).

I.3.4. Polissacarídeos Modificados

Os polissacarídeos que ocorrem na natureza são altamente hidroxilados, normalmente contém três grupos hidroxilados para cada unidade de açúcar na cadeia. Estes grupos em conexão com o anel e átomos de oxigênio glicosílicos produz cinco *loci* para ligações de hidrogênio na cadeia polissacarídica. Em consequência disto, a celulose e o amido foram bastante usados para produzir polissacarídeos derivatizados. Isso facilita o uso de agentes de formação de ligações cruzadas como a epícloridrina, vinilsulfona, o diisotiocianato e alguns diepóxidos e diolefinas. Modificações químicas nos polissacarídeos neutros são usadas para alterar as propriedades químicas e físicas, possibilitando novas aplicações (BOVIN, 1998). Alguns exemplos de modificações introduzidas com fins comerciais são as metilhidroxipropilceluloses (comercialmente importantes) e os diéster fosfatos de amido. Modificações químicas nos polissacarídeos neutros resultam em uma molécula com alterações nas suas propriedades químicas e físicas (WHISTLER & BETMILLER, 1993).

I.3.4.1. Reação com Epícloridrina

No que diz respeito à modificação de um polissacarídeo para transformá-lo em uma matriz para ser usada em cromatografia é necessário preparar-se uma

malha, tipo gel com propriedades especiais para o seu emprego específico. Desta forma, na sua preparação se faz necessário utilizar um agente reticulante que estabilizará a molécula, com a formação de ligações cruzadas. Uma ilustração desse efeito é o do gel Sephadex (nome comercial de uma dextrana reticulada por reação com epícloridrina) um excelente gel com propriedades de resistência, estabilidade e insolubilidade, material bastante eficaz no isolamento de substâncias, também em técnicas cromatográficas (FLODIN, 1962).

A reticulação da dextrana ocorre pela reação (endotérmica) com a epícloridrina, na qual a epícloridrina reage com dois grupos hidroxilas de duas cadeias diferentes, resultando em cadeias polissacarídicas ligadas por pontes glicerol 1-3 éter (FIGURA 1); resultando em um gel alcalino que, após neutralização com HCl e eliminação das partículas finas com água destilada, pode ser utilizado como matriz. A aplicação de géis, como por exemplo, gelatina e agarose, carragenana ou ácidos poliurônicos ou compostos proteína-polissacarídeos, que apresentem ligações covalentes (DEY *et al.*, 1978; KATO & MATSUDOMI, 1998; ROY *et al.*, 1998) é importante no entendimento do comportamento de difusão de macromoléculas protéicas em soluções aquosas de polissacarídeos. Para aplicação de gomas naturais em colunas cromatográficas é indispensável à formação de uma malha, obtendo-se um gel com resistência.

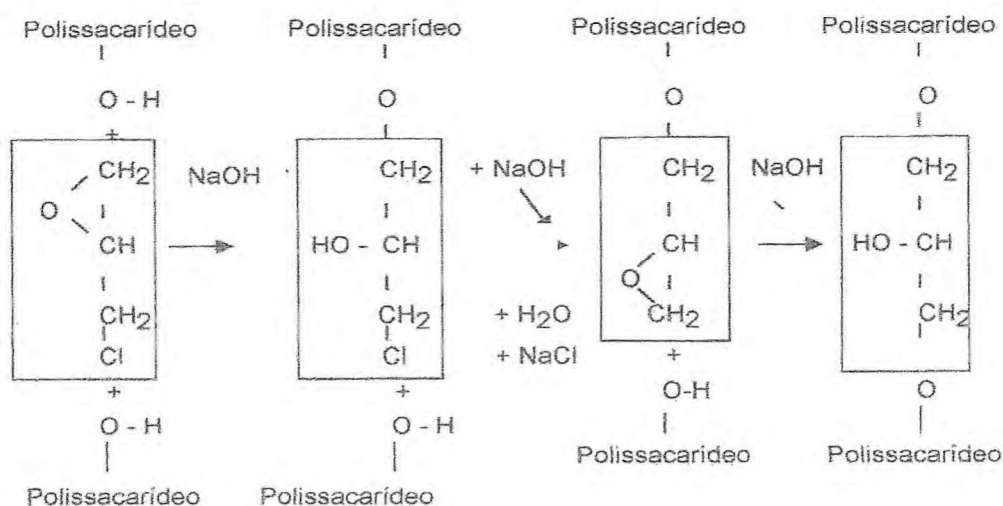


FIGURA 1. Reação de um polissacarídeo com epícloridrina

1.4. O Cajueiro

Três famílias botânicas, principalmente, incluem espécies que produzem gomas na forma de exsudado: as *Leguminosas*, as *Combretáceas* e as *Anacardiáceas*. Estes exsudados são principalmente produzidos em galhos e no caule das plantas (ZAKARIA & RAHMAN, 1996; DE PINTO *et al.*, 1995). Ainda não existem estudos específicos sobre a biossíntese das gomas; no entanto, acredita-se que a produção das gomas nas plantas seja resultante de um mecanismo de defesa de natureza física, ao ataque de fungos e bactérias (MARTINEZ *et al.*, 1992; 1996).

Na região Nordeste do Brasil, especialmente no Estado do Ceará, a família *Anacardiaceae*, nativa da América Tropical, é representada por 14 gêneros sendo eles: *Anacardium*, *Apterotheca*, *Astronium*, *Duguetia*, *Lithraea*, *Mangifera*, *Myracrodruon*, *Pterocarpus*, *Rollinia*, *Schinopsis*, *Schinus*, *Spondias*, *Tapirira*, *Thyrsodium*, somando cerca de 26 espécies distintas.

Dentre as espécies estão relacionados o cajueiro, cajuí, aroeira-mole, gonçalo-alves, mangueira, braúna, cajarana, ciriguela, cajazeira, umbuzeiro e cajueiro-bravo.

A família *Anacardiaceae* é composta por 60 a 80 gêneros e 600 espécies, de distribuição predominantemente pantropical, com alguns gêneros ocorrendo nas regiões temperadas, da Ásia, Europa e América do Norte. Essa família tem sua importância econômica ressaltada desde a alimentação até a utilização em paisagismo, como plantas ornamentais na arborização urbana, principalmente *Schinus molle* L. (aroeira) (STREET & ANDERSON, 1983; LEÓN DE PINTO *et al.*, 1991; 1993a,b; 1994; 1995a,b; DE PINTO *et al.*, 1995).

A composição química das gomas exsudadas de *Anacardium occidentale*, *Spondias purpurea* e *Spondias mombim* revela uma mesma composição de açúcares neutros, exceto a xilose, que está ausente na goma exsudada de *S.mombim*. A goma indiana contém galactose, arabinose, ramnose, glucose, ácido glucurônico, além de pequenas quantidades de manose, xilose e ácido metilglucurônico. A composição catiônica das cinzas demonstra que as gomas de

Anacardiaceae referidas possuem altos teores em cálcio, potássio, sódio e magnésio (DE PINTO *et al.*, 1995). Estudos comparativos entre espécimes de gomas obtidas de diferentes regiões geográficas têm sido realizados. Os resultados indicam que existem variações significativas de propriedades associadas às condições climáticas, tais como a rotação específica e composição.

Estudos de gomas exsudadas de espécies pertencentes à família *Anacardiaceae* têm sido realizados principalmente para representantes dos gêneros *Anacardium* e *Spondias* (ZAKARIA & RAHMAN, 1996). *Spondias mombim* e *S.purpurea* apresentam viscosidades intrínsecas semelhantes, sendo ambas as gomas dextrorrotatórias, no entanto, *S.purpurea* apresenta uma mais alta rotação específica.

A goma exsudada de *A.occidentale* L. tem sido objeto de análises recentes, como a composição parcial obtida através de cromatografia gás-líquida e ^{13}C ressonância magnética nuclear. Os resultados têm revelado 72% de β -D-galactopiranosose, 14% de α -D-glucopiranosose, 4,6% de α -L-arabinofuranose, 3,2% de α -L-rhamnopiranosose e 4,5% de β -D-ácido glucurônico (DE PAULA *et al.*, 1998).

Datam da metade do século XVI as primeiras descrições da árvore do caju, dos cajuais do litoral americano e de seus frutos e usos, feitas pelos viajantes europeus (BARROS, 1983). Foi a partir de então que o caju iniciou sua viagem pelo mundo: embarcado nas naus portuguesas, aportou em Moçambique, Angola, Quênia e Madagascar, na África, e em Goa, na Índia (BARROS *et al.*, 1984). Por muitos anos as possibilidades de exploração econômica rentável do caju foram desconsideradas nas terras brasileiras (BARROS *et al.*, 1993; BARROS *et al.*, 1984; LEITE, 1994; PAULA PESSOA *et al.*, 1995).

O cajueiro pertence à família *Anacardiaceae*, *Dicotyledoneae*, gênero *Anacardium*, espécie *Anacardium occidentale*, L. (cajueiro comum) e – supostamente – *Anacardium occidentale*, L. var, *nanum* (cajueiro precoce). *Anacardium occidentale* L. é encontrado em áreas secas, especialmente em regiões litorâneas no nordeste do Brasil e no Caribe, foi levado do Brasil para Índia e o Arquipélago malaio durante o 16º século, mas não chegou à Europa antes de 1699. Entre suas diversas denominações, podem ser destacadas: Cashu, Casho,

Acajuiba, Caju, Acajou, Acaju, Acajaiba, Alcayoiba, Anacarde, Anacardier, Anacardo, Cacajuil, Cajou, Gajus, Jocote Maranon, Maranon, Merey, Noix D'Acajou, Pomme Cajou, Pomme, Jambu, Jambu golok, Jambu mete, Jambu monyet e Jambu terong. A Amazônia parece ter sido a origem de onde diferentes espécies do gênero *Anacardium* irradiaram.

Os indígenas de fala tupi, habitantes autóctones do nordeste do Brasil, já conheciam muito bem o caju e faziam dele um de seus mais completos e importantes alimentos (AKINPELU, 2001). Deve-se, inclusive, aos indígenas o seu nome: a palavra acaiu, de origem tupi, quer dizer "noz que se produz". Ficaram conhecidas como as "guerras do caju" as lutas pelo domínio temporário dos cajuais, travadas entre as tribos indígenas que desciam do interior na época da frutificação do caju e aquelas que viviam no litoral. Supõe-se que foi assim, através das castanhas levadas pelas mãos dos indígenas que iam e vinham pelas terras do Brasil, que a fruta se espalhou por vastas regiões do interior seco e árido nordestino. Pouco exigente quanto a solos, com o tempo, o cajueiro se adaptou às terras para onde foi levado. São desde árvores com porte majestoso, amazônico, atingindo até a altura de 40 metros e apresentando os pseudofrutos carnosos pouco desenvolvidos (*Anacardium giganteum*), até formas arbóreas de porte médio, não ultrapassando os 3 ou 4 metros de altura (*Anacardium othonianum*) ou herbáceo, com até 80 cm (*Anacardium humile*) (EMBRAPA, 1990).

Ainda não existem estudos específicos sobre a biossíntese das gomas exsudadas, no entanto, acredita-se que a sua produção, nas plantas, seja resultante de um mecanismo de defesa de natureza física, ao ataque de fungos e bactérias. Fatores naturais que diminuem a vitalidade da planta, tais como solos pobres em nutrientes e condições climáticas desfavoráveis, também estimulam a produção de gomas (LIMA, 1992). A formação de exsudatos pode ser induzida, também, por incisão deliberada nas plantas, bem como por introdução no tronco de agentes químicos, como o óxido de etileno e derivados do ácido benzóico.

O isolamento da goma consiste na separação do polissacarídeo das impurezas presentes no material bruto. A etapa de purificação consiste na transformação dos grupamentos ácido do material isolado para a forma de

carboxilato, em geral, sódico (LEÓN DE PINTO *et al.*, 1993_{a,b}; DE PAULA *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2001; 2002). Dentre os fatores que mais afetam essas características, destacam-se o pH da etapa de dissolução e a proporção etanol/água. Outro fator importante que deve ser considerado é o alto rendimento da goma durante o processo de isolamento e purificação (GHOSAL & THAKUR, 1981).

Hipótese

II. Hipótese

A estrutura dos polissacarídeos de gomas exsudadas pertencentes à família *Anacardiaceae*, em especial a goma de cajueiro, apresenta em sua constituição distintas unidades de monossacarídeos (ramificações), o que aumentaria bastante, a possibilidade de utilização desta goma na interação com lectinas vegetais. Como hipótese deste trabalho objetiva-se a estabilização dos polissacarídeos da goma exsudada de uma das espécies pertencentes à família *Anacardiaceae* (*Anacardium occidentale* L.) e sua possível utilização na confecção de matrizes polissacarídicas a serem usadas como suportes cromatográficos e/ou bioligantes protéicos, na montagem de colunas de isolamento de lectinas.

Essa característica é valiosa no que diz respeito à gama de lectinas (com diferentes especificidades por açúcar) que podem vir a ser ligadas à matriz polissacarídica. Este trabalho busca uma possível utilização da goma exsudada de cajueiro como biossensor protéico (gel cromatográfico ou matriz de biofilme); sugestão feita em função da exsudação do cajueiro (uma resposta de defesa ambiental), ser constituída por uma mistura de carboidratos extremamente ramificados.

Tal fato será de grande valia, uma vez que haveria a substituição de suportes comerciais por uma matéria-prima de mais baixo custo de produção. A possível utilização da goma exsudada de cajueiro como biossensor protéico (gel cromatográfico ou matriz de biofilme) é apontada frente a sua alta reprodutibilidade, característica primordial na escolha de um biopolímero para estudos biotecnológicos ou de aplicação.

Estratégias Experimentais

III. Estratégias Experimentais

Em busca de se testar a hipótese proposta, as seguintes estratégias experimentais foram seguidas:

1. Isolar os polissacarídeos das gomas exsudadas vegetais.
2. Caracterizar físico-quimicamente as gomas exsudadas de *Anacardium occidentale* L.
3. Testar a possibilidade de utilização das gomas exsudadas vegetais como suportes mecânicos para a confecção de hidrogéis.
4. Testar a possibilidade de utilização biotecnológica das gomas exsudadas vegetais como possíveis matrizes para cromatografia de afinidade e avaliar a capacidade de interação entre polissacarídeos exsudados de cajueiro e proteínas.
5. Testar a viabilidade de utilização biotecnológica das referidas gomas exsudadas na confecção de sachês de bioidentificação para lectinas vegetais.

Materials

IV. Materiais

IV.1. Material vegetal

Exsudato de *Anacardium occidentale* L. foi coletado no Município de Pacajus no Estado do Ceará (Figura 2).



Figura 2. Goma/resina exsudada de cajueiro no seu estado bruto, após coleta das árvores do local de injúria

IV.2. Sementes: *Artocarpus integrifolia*, *Artocarpus incisa*, *Abrus precatorius*, *Erythrina velutina*, *Stryphnodendron coriaceum*, *Moringa oleifera*, *Ricinus communis*, *Dioclea altissima*, *Canavalia ensiformis*, *Cratylia floribunda*, *Pachira aquática* e *Luetzelburgia auriculata*, coletadas em diversos municípios do Estado do Ceará, foram obtidas pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Lectinas

e Glicoconjugados (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

IV.3. Algas Marinhas: *Solieria filiformis* e *Gracilaria cornea*, coletadas ao longo da costa do Estado do Ceará, foram obtidas pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

IV.4. Outros materiais

IV.4.1. Hemácias. Hemácias de coelho foram obtidas de animais mantidas no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

IV.4.3. Reagentes. Coomassie Brilliant Blue G-250, epicloridrina, TEMED, acrilamida, N,N' metilenobisacrilamida, clarase 900 e albumina sérica bovina (BSA), glutaraldeído 25% e epicloridrina 12,5N foram obtidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA), Dodecil sulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol de E. Merck, (Dormstadt, Alemanha). Os demais reagentes e solventes utilizados apresentavam características P. A.

IV.4.3. Corantes histológicos. Azul de tolueno e fucsina ácida obtidos do Laboratório de Histologia da Universidade de Fortaleza. Material de fixação e preparo histológico obtido do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Vegetal do Centro de Pesquisa e Agroindústria Tropical EMBRAPA/CNPAT).

Métodos

V. Métodos

V.1. Localização histológica dos ductos goma/resina de *Anacardium occidentale* L.

O material vegetal (amostras de tronco/caule adulto, pecíolo, meristema e caule jovem) coletado de árvores sadias da Estação Experimental em Pacajus, Ceará, foi limpo de resíduos orgânicos e submetido a procedimentos de microscopia óptica de contraste. Os cortes de tecido vegetal foram fixados em glutaraldeído 2%, em solução-tampão fosfato 0,1M pH 6,8, conforme metodologia sugerida por O'BRIEN & McCULLY (1981).

O material foi desidratado em série etílica ascendente a partir do etanol 10% até etanol 70%. Todo o processo de fixação e desidratação foi realizado à temperatura ambiente. Em todas as etapas foi utilizado vácuo, para a retirada de ar das peças vegetais.

Os materiais fixados foram incluídos em hidroximetilmetacrilato (Historesina–Jung). Para os cortes dos materiais incluídos em resina plástica, utilizou-se micrótomo de rotação, marca Leica, modelo Supercut 2065, com navalha de aço perfil “d” e navalhas descartáveis. As secções com 3 a 5 μm foram distendidas em água, à temperatura ambiente, e aderidas e secas em lâmina de vidro sobre placa aquecedora a 60 °C.

Os cortes foram corados com azul de tolueno, por 3 a 4 minutos, e com fucsina ácida, por 1 minuto (O'BRIEN & McCULLY, 1981). Todo o procedimento de microscopia foi realizado no Setor de Fisiologia Vegetal do Centro Nacional de Pesquisa do Caju (CNPc/EMBRAPA), em Fortaleza, Ceará.

V.2. Obtenção da Goma

V.2.1. Obtenção do exsudato liofilizado

A goma exsudada do tronco (caule adulto) de *Anacardium occidentale* L. (FIGURA 3) foi coletada em campo na cidade de Pacajus, Ceará e, depois de livres de casca e outros resíduos foram dissolvidas em água, filtradas e liofilizadas.

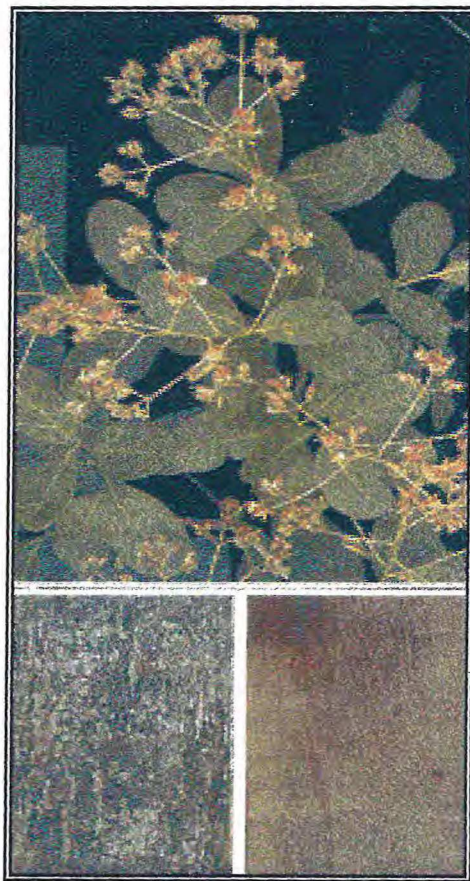


Figura 3. Detalhe da copa e do tronco da árvore do cajueiro.

com álcool, novamente dissolvido em água e só então liofilizado (FIGURA 4). Esta preparação foi denominada de “goma purificada”.

V.3. Análise elementar

V.3.1. Determinação de umidade

Para determinação de umidade, pesa-filtros previamente tarados contendo amostras de goma e mucilagens foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas. Em seguida, foram deixados em um dessecador, sobre sílica, até atingir o equilíbrio com a temperatura ambiente, sendo então pesados, repetindo-se o procedimento, até que os pesos permanecessem constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final da amostra, sendo este valor expresso em percentagem.

V.3.2. Determinação de cinzas

Foram pesados 2 g de goma de cajueiro seca em cadinhos de porcelana, previamente tarados, e submetidos à incineração em mufla a 550°C por 6 horas. As amostras foram deixadas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesadas. A operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até obtenção de peso constante das amostras incineradas. O teor de cinzas foi calculado por diferença entre os pesos inicial e residual e expresso em porcentagem. Às cinzas obtidas foram adicionados 3 mL de ácido clorídrico 6 M, foram filtradas em papel de filtro e transferidas para um balão volumétrico, completando o volume para 100 mL com água destilada. A solução clorídrica foi reservada para as determinações de cálcio, magnésio, fósforo e ferro (A.O.A.C., 1970).

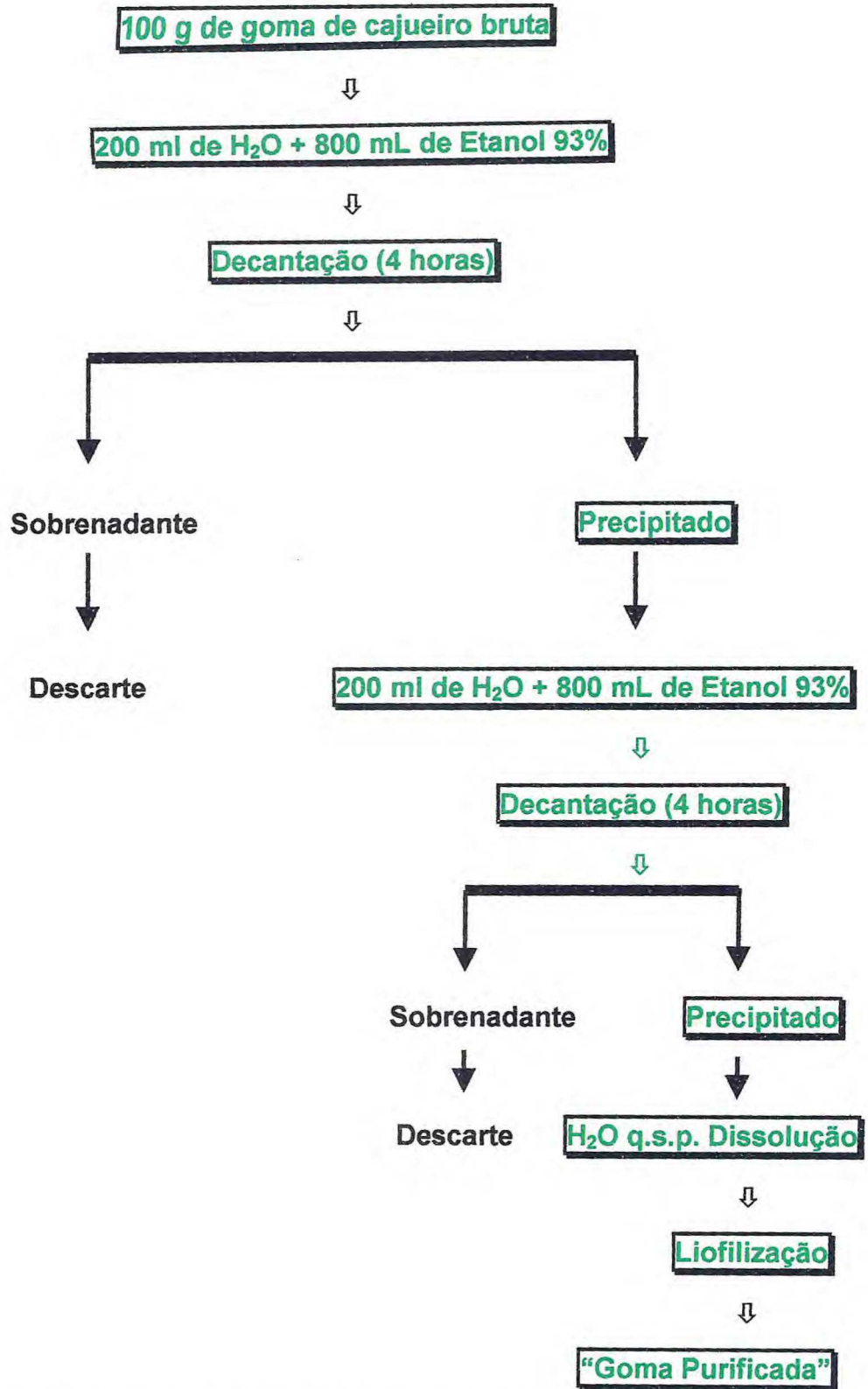


FIGURA 4. Esquema de purificação da goma de cajueiro (*A. occidentale* L.).

V.3.3. Determinação da composição catiônica das cinzas

A determinação dos cátions presentes nas cinzas da goma/resina de cajueiro foi realizada no laboratório de tecnologia e qualidade de alimentos, do Núcleo de Tecnologia (NUTEC), no Campus do Pici, empresa incubada na Universidade Federal do Ceará.

V.3.3.1. Determinação de Ferro

O método utilizado foi segundo Associação Oficial de Química Agrícola (AOAC) (1970). A determinação foi feita tomando-se 10 mL de solução de HCl 6M para um balão volumétrico de 50 mL, sendo adicionados 1 mL de HCl concentrado, 1 mL de cloridrato de hidroxilamina 10%, 5 mL de acetato de amônio 3 M e 2 mL da solução de fenantrolina 0,1%. O volume foi completado com água destilada para 50 mL e a leitura de absorbância feita em espectrofotômetro a 510 nm (FEMTO 432), sendo o resultado comparado a uma curva padrão obtida a partir da solução padrão de ferro.

V.3.3.2. Determinação de Cálcio

Para determinação de cálcio (A. O. A. C., 1970), foram tomados 25 mL da solução A em um erlenmeyer e à esta foram adicionados 20 mL da solução de molibdato de amônio 6% e 5 mL de ácido clorídrico 10%. Em seguida, a mistura foi levada para uma chapa aquecedora a 60°C para completa precipitação do cálcio, deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul. Ao filtrado recolhido em erlenmeyer, adicionou-se 20 mL de solução tampão pH 10,0 para elevar o pH da solução que passou de uma coloração levemente amarela para incolor. Foram acrescentados 20 mL de NaOH 4 M, 5 mL de KCN 0,1M e 5 mL de trietanolamina 20%. O volume da solução foi elevado até aproximadamente 300 mL com água destilada e, em seguida, foi adicionado pequena porção de indicador Calcon, sendo a titulação realizada com

adicionado pequena porção de indicador Calcon, sendo a titulação realizada com EDTA 0,02 M até a passagem da cor vermelha para azul intenso. O cálculo para a determinação em equivalentes-grama do cálcio foi realizado usando-se a fórmula:

$$\% \text{ Ca} = \frac{V \cdot F \cdot M \cdot 40 \cdot 100}{P}$$

Onde:

F = fator da solução de EDTA

V = volume de EDTA gasto na titulação

P = peso referente à alíquota

M = 0,02 (Molaridade EDTA)

40 = Massa Molar do Cálcio

V.3.3.3. Determinação de Fósforo

A metodologia utilizada foi segundo A.O.A.C. (1970), consistindo na transferência para um balão volumétrico (50 mL) de 5 mL ou mais (dependendo da amostra) da solução clorídrica (determinação de cinzas.). A esta solução foram adicionados 1 mL de hidróxido de amônio (1:1, p/v), 2 mL de ácido nítrico (1:2) e 20 mL de solução de molibdato de vanadato de amônio (molibdato de amônio 2% e vanadato de amônio 0,1%). Para a solução de referência foram adicionados os reagentes mencionados acima, com exceção da amostra. A leitura foi feita após 30 minutos em espectrofotômetro (FEMTO 432) a 470 nm e os resultados comparados a uma curva-padrão obtida a partir de soluções padrões de fósforo.

V.3.3.4. Determinação de Magnésio

Para determinação de magnésio (A. O. A. C., 1975), foram pipetados 20 mL da solução clorídrica (determinação de cinzas) e a esta adicionados 20 mL da solução de molibdato de amônio 6%, 5 mL de ácido clorídrico 10%, sendo a mistura levada para uma chapa aquecedora a 60°C para completa precipitação do

fósforo. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e filtrada em papel de filtro faixa azul.

Ao filtrado foram adicionados 20 mL de uma solução tampão constituída de hidróxido de amônio (NH₄OH) 11,4 M e cloreto de amônio (NH₄Cl) 1,2 M, pH 10, para elevar o pH da solução, cuja coloração passou de levemente amarela para incolor. Foram, então, adicionados 5 mL de KCN 0,1 M, 5 mL de trietanolamina 20% e 5 gotas de eriocromo negro T como indicador. A titulação foi realizada com EDTA 0,02 M até viragem de cor vermelha para azul. O cálculo foi realizado segundo fórmula abaixo:

$$\% \text{ Mg} = \frac{(V' - V) \cdot F \cdot M \cdot 24 \cdot 100}{P}$$

Onde:

F = fator da solução de EDTA

V' = volume de EDTA gasto na titulação

V = volume de EDTA gasto na titulação de cálcio

P = peso referente à alíquota

M = 0,02 (Molaridade EDTA)

V.3.4. Determinação do teor de nitrogênio total

A determinação do teor de nitrogênio das amostras foi feita pelo método de Kjeldahl (BAETHGEN & ALLEY, 1989). A uma amostra de 100mg foram adicionados 1,1 g de catalisador (100 g de KH₂SO₄, 10 g de CuSO₄. 5H₂O e 1 g de selênio) e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

A mistura foi levada a um mineralizador deixada por pelo menos 30 minutos ou até que uma solução límpida seja obtida, sendo em seguida diluída para 25 mL com água destilada. A 100 µL da amostra diluída foram adicionados 0,9 mL de diluente, 5,5 mL de tampão (contendo NaHPO₄ 0,1 M, tartarato de sódio e potássio 5% e NaOH 5,4%), 4 mL de solução de salicilato de sódio (15%), nitroprussiato de sódio (0,03%) e 2 mL de hipoclorito de sódio a 6%. As amostras

foram colocadas em *banho-maria* a 37 °C por 15 minutos e a leitura das absorbâncias foi realizada a 650 nm. O teor de nitrogênio da amostra foi calculado em relação a uma curva-padrão obtida com sulfato de amônio e o teor de proteína bruta calculado multiplicando-se o valor de nitrogênio total por 6,25.

V.3.5. Determinação da fração hexânica

Esta fração compreende principalmente as gorduras embora estejam nela incluídas outras substâncias solúveis em hexano, tais como ceras, resinas, fração cetônica e alguns pigmentos (TRIBOLD, 1946).

A extração foi feita com 1g de amostra em extrator contínuo de Soxhlet, usando como solvente o hexano anidro. Após 8 horas de refluxo, o balão foi colocado em *banho-maria* para que o solvente fosse evaporado, o balão, previamente pesado e tarado, com o extrato lipídico foi pesado novamente, e calculado a quantidade de lipídio contido na amostra, por diferença entre os pesos final e inicial do balão.

V.4. Determinação de carboidratos totais

O teor de carboidratos foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico, usando-se como padrão de referência uma solução de D-manose na concentração de 100 µL/mL (DUBOIS, *et al.*, 1956). Para 1 mL da amostra, adicionou-se 1 mL de fenol a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação, a amostra permaneceu em repouso por 15 minutos e as leituras feitas a 490 nm (espectrofotômetro Spectronic 20).

A concentração de carboidratos foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com manose.

V.4.1. Determinação de carboidratos solúveis

Neste grupo de carboidratos incluem-se os solúveis em água: frutanas, oligossacarídeos e parte do amido (amilose). A determinação foi feita baseando-se na extração dos carboidratos solúveis e na determinação colorimétrica, comparando-a com uma solução-padrão de glicose (AOAC, 1970).

Para o início da digestão, foi pesado, aproximadamente, 1 g de amostra seca ao ar, previamente triturada em peneira de 30-40 mesh e transferido para um copo de 600 mL, próprio do aparelho digestor. Foram adicionados 150 mL de oxalato de amônia a 0,5% e 2 gotas de tributil fosfato (antiespumante). O copo do digestor foi deixado em fervura durante 2 horas, retirado do aparelho, resfriado e o material (amostra), centrifugado a 1800 rpm, durante 10 minutos.

O sobrenadante foi coletado, transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, tendo o volume do balão sido completo com água destilada. O balão foi agitado e o material filtrado usando papel de filtro "Whatman" número 42. A partir do filtrado, foi tomada uma alíquota de cerca de 2 mL para um tubo de ensaio, ao qual foram adicionados cuidadosamente, 10 mL de solução de antrona (composto fenólico usado para desenvolvimento da cor). O tubo de ensaio foi então deixado em banho-maria (37 °C) por 20 minutos. A leitura da amostra foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm e os valores comparados com curva-padrão de glicose.

V.4.2. Determinação de carboidratos totais não-estruturais

A determinação quantitativa dos carboidratos não-estruturais requer a extração de polissacarídios, de sacarose, de glicose e de frutose e a conversão de polissacarídeos e da sacarose em unidades monoméricas redutoras, com um mínimo de extração e hidrólise de carboidratos estruturais. O desdobramento do amido e da sacarose foi realizado pela enzima comercial clarase 900, uma alfa-amilase cuja preparação contém pequenas quantidades de maltase, peptidase, fosfatase, celulase, sulfatase e invertase (HARRIS, 1970). As unidades redutoras

obtidas foram utilizadas na redução de Cu^{++} , sendo feita, a seguir, a determinação iodométrica do excesso. O percentual de carboidratos totais não estruturais foi expresso pela relação:

$$(\text{mg de glicose} \times \text{fator de diluição}) \times 100 / \text{peso da amostra (mg)}$$

V.5. Determinação de carboidratos redutores e não-redutores

Para a determinação de açúcares redutores foi pesada uma quantidade suficiente de amostra (5g) e dissolvida em 100mL de água destilada. Essa suspensão foi aquecida por 15 minutos a 70 °C, em banho-maria, resfriada e levada à centrífuga de bancada, para facilitar a filtração em funil. O filtrado foi transferido para um balão de 250 mL, adicionado 1mL de acetato de chumbo e completado o volume com água destilada. Ao material assim obtido, e re-filtrado, foram adicionados 0,5g de sulfato de sódio. Uma nova filtração foi feita e esta solução foi utilizada para titular uma solução já preparada de reagente de Fehling. A alteração do indicador foi observada quando a solução passou de azul a vermelho tijolo, tendo usado como indicador 1 mL de azul de metileno 1%.

O cálculo do teor de açúcares redutores foi realizado com base na fórmula a seguir (AOAC, 1970):

$$\frac{100 \times f \times v}{\text{vg}} = \% \text{ AR (em glicose)}$$

onde:

v = volume do balão

f = fator da solução de Fehling (peso da glicose correspondente a 10 mL da solução de Fehling)

vg = volume gasto na titulação

%AR = percentual de açúcares redutores na amostra

A solução obtida para a determinação de açúcares redutores (amostra dissolvida, adicionada de acetato de chumbo) foi utilizada na determinação de açúcares não-redutores. Uma alíquota de 25 mL foi retirada e transferida para um balão de 250 mL. Foram adicionados então, 2 mL de HCl concentrado. Após aquecimento a 70-80 °C. em banho-maria por 30 minutos, a solução foi resfriada e neutralizada com solução saturada de carbonato de sódio. O volume foi completado para 250 mL e titulado com reagente de Fehling, sob aquecimento até a viragem da cor azul para vermelho tijolo. O cálculo do teor de açúcares não-redutores foi realizado com base na fórmula a seguir (AOAC, 1970):

$$\frac{[(100 \times f \times v) - \%AR] \times 0,95}{S \times vg} = \% ANR \text{ (em sacarose)}$$

onde:

v = volume do balão

f = fator da solução de Fehling (peso da glicose correspondente a 10 mL da solução de Fehling)

S = peso da amostra correspondente ao volume usado para a inversão da sacarose em glicose

vg = volume gasto na titulação

%AR = percentual de açúcares redutores na amostra

%ANR = percentual de açúcares não-redutores na amostra

V.6. Determinação de fibras totais

Sob o termo "*fibras totais*" encontram-se as frações de celulose e de lignina insolúvel (HARRIS, 1970). O teor de fibras foi determinado segundo a metodologia da A. O. A. C. (1970), consistindo na pesagem de aproximadamente 1 g da amostra previamente delipidada com hexano.

O resíduo obtido foi transferido diretamente para um erlenmeyer de 500 mL com auxílio de 200 mL de ácido sulfúrico (1,25%) previamente aquecido. Esse material foi fervido em refluxo por 30 minutos, efetuando-se após este tempo uma

filtração em papel de filtro qualitativo. O filtrado foi lavado com água quente, até não haver mais reação ácida (testando com papel indicador de pH). O resíduo contido no papel foi transferido para o mesmo erlenmeyer de 500 mL, com auxílio de 200 mL de hidróxido de sódio (1,25%) quente e submetido a refluxo por 30 minutos.

Em seguida, foi realizada uma segunda filtração em papel de filtro quantitativo (faixa preta), previamente aquecido em estufa a 105°C por 1 hora e pesado. A seguir, o material foi lavado com água quente até não haver reação básica (testando com o papel indicador de pH), e lavado por 3 vezes com álcool etílico e 2 vezes com éter etílico. O solvente foi deixado evaporar e o papel contendo o resíduo levado para a estufa a 105°C para secagem total, até obtenção de peso constante. O mesmo (papel e resíduo) foi colocado em um cadinho de porcelana, previamente tarado, em mufla a 550°C, queimado em bico de Bunsen e incinerado em mufla a 550°C, efetuando-se pesagens até a obtenção de peso constante. O teor de fibras foi determinado pela fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{F \times 100}{P_A}$$

Onde:

$$F = \{(P+F+C) - P\} - C$$

P = peso do papel

F = fibra

C = cinza, conforme determinado em item anterior

P_A = peso da amostra

V.7. Determinação da energia bruta total

A energia bruta refere-se à quantidade de calor liberado (kcal/kg ou kcal/g) de determinada amostra, quando esta é completamente oxidada em ambiente rico de oxigênio (25 a 30 atmosferas de oxigênio). As amostras de goma (0,5 a 1,0 g) foram acondicionadas em cápsulas metálicas, flambadas e esfriadas em dessecador. Foi utilizada bomba calorimétrica tipo "Parr" e acessórios. A titulação

foi realizada utilizando-se carbonato de cálcio padronizado e alaranjado de metila como indicador para determinar a quantidade de ácido formado pela oxidação durante o tratamento calorimétrico. Cada mL da solução de Na_2CO_3 gasto na titulação corresponde a uma caloria (HARRIS, 1970). O valor calórico total da goma exsudada foi expresso em kcal/100 g de goma.

V.8. Determinação do teor de vitamina C (ácido ascórbico)

O procedimento foi realizado tomando-se uma quantidade conhecida da amostra, onde foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M, 1 mL de iodeto de potássio (KI) 10%, 1 mL de amido 1% e 50 mL de água destilada. A titulação foi feita com iodato de potássio (KIO_3) 0,1 M. Os cálculos para determinação do teor de vitamina C na amostra foram realizados usando-se a fórmula:

$$\% \text{ Vit. C (mg/100)} = \frac{V \cdot 8,8 \cdot 100}{P_A}$$

Onde:

V = volume de KIO_3 0,1M gasto na titulação

8,8 = mg de ácido ascórbico que reage com 1 mL KIO_3 0,1M

P_A = peso da amostra utilizada na determinação

V.9. Análise viscosimétrica

Para as análises viscosimétricas, as soluções de goma exsudada de cajueiro variando de 0,25 a 2,0 g/L foram preparadas em água destilada, à temperatura ambiente (25 °C), sob agitação em agitador magnético por 16 horas. Soluções, a diferentes concentrações, foram preparadas para que fosse possível a obtenção das viscosidades relativas, tendo boa acurácia e linearidade de extrapolação para concentração zero. As soluções foram centrifugadas e o

sobrenadante foi utilizado para determinação da viscosidade intrínseca, seguindo-se de perto o procedimento sugerido por MOTHÉ & RAO (1999). As medidas de viscosidade para a amostra de goma de cajueiro foram realizadas em reômetro BROOKFIELD, modelo LVDV-III, cilindro coaxial, utilizando os rotores SC4-18, CP40 e o adaptador ULA. Para medidas no sistema capilar foi utilizado o viscosímetro do tipo UBBERLOHDE (capilar 0,5 mm).

O controle da temperatura foi realizado com um banho de água circulante termostatisado da marca BROOKFIELD, modelo TC-500. A viscosidade relativa (η_{rel}) corresponde à relação entre a viscosidade da solução (η) e a viscosidade do solvente (η_0) (HUGGINS, 1942).

Nas análises realizadas a 25 °C, obteve-se os valores de viscosidade absoluta das soluções e dos solventes, a partir das quais pôde-se obter o valor de viscosidade reduzida e por determinação gráfica, o valor de viscosidade intrínseca.

Outros dois parâmetros avaliados foram as viscosidades da solução de polissacarídeos exsudados de cajueiro, em função da presença de sal e em presença de soluções ácidas diluídas (ácidos acético 10% v/v, clorídrico 10% v/v e sulfúrico 10% v/v). Para tanto, uma solução a 20% (m/v) de goma de cajueiro em água foi dialisada contra solução salina (NaCl 0,15M) durante 24 horas, e outra solução de goma foi submetida às 3 soluções ácidas apresentadas, seguindo-se os procedimentos de análise viscosimétrica anteriormente descritos.

V.10. Tratamento da goma com glutaraldeído

A goma exsudada de *Anacardium occidentale* L. foi submetida a tratamento de reticulação com glutaraldeído, segundo procedimento sugerido para a reticulação de goma de guar, proposto por GLIKO-KABIR e colaboradores (1999), com o objetivo de se obter um hidrogel resistente e com alguma propriedade elástica.

Na metodologia sugerida, 6 g de goma de cajueiro foi solubilizada em ácido sulfúrico e tratada com distintos volumes (0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,5 mL e 3,0 mL) de glutaraldeído 25% (v/v), e os supostos filmes (soluções aquosas) foram observados através de microscopia óptica.

V.11. Tratamento da goma com epícloridrina

O polissacarídeo exsudado de *A. occidentale* L. foi reticulado com epícloridrina 12,5 N (FIGURA 5) seguindo-se de perto o procedimento proposto por FUGITA (1975). Para cada 6 g da goma de cajueiro foram adicionados 1 mL de epícloridrina e 8,0 mL de NaOH 5 M. A mistura foi agitada manualmente, mantida em estufa por 24 horas a 40 °C e por 12 horas a 70 °C. Após este período, o material foi lavado exaustivamente com água destilada, até que todas as partículas finas em suspensão fossem retiradas.

O material foi homogeneizado e passado em peneira de 30 mesh, tendo as partículas finas sido retiradas por lavagem exaustiva com água destilada. Com o objetivo de verificar a formação de “malhas” (reticulação eficiente) no gel polissacarídico formado, tanto as soluções aquosas com goma de cajueiro tratadas ou não com epícloridrina, foram observadas através de microscopia óptica.

V.12. Determinação do espectro de infravermelho da goma

O espectro na região do infravermelho corresponde àquele obtido por alterações no comportamento vibracional, deve-se considerar que os átomos em uma molécula sejam esferas rígidas unidas por pequenas *mol*as que obedecem à *lei de Hooke*. A força de restauração à posição de equilíbrio de um sistema oscilante é diretamente proporcional ao deslocamento do ponto de equilíbrio. A constante *k* é uma medida da resistência ao movimento oscilatório. Um sistema que se comporta desta maneira é chamado de oscilador harmônico. Os espectros

de absorção no infravermelho foram registrados em espectrofotômetro 1320, com material pastilhado com KBr.

V.13. Avaliação da condutividade da solução de goma exsudada de cajueiro

A condutividade da solução aquosa de goma exsudada de cajueiro foi medida através de condutivímetro e a variação de pH das soluções acompanhadas através de potenciômetro, sendo o procedimento realizado em colaboração com o Laboratório de Tecnologia de Sementes, Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará.

A referida análise foi realizada através da montagem de um sistema de titulação, no qual, além da avaliação do comportamento de condutividade elétrica, foi feito o acompanhamento da alteração de pH da solução. A solução aquosa (20% m/v) de goma exsudada de cajueiro foi titulada com solução salina (NaCl 0,15M); utilizando placa agitadora durante toda a titulação. O volume da solução de goma utilizado foi de 25 ml e o volume de NaCl utilizado (bureta) também foi de 25 mL, acompanhando-se a alteração da condutividade elétrica da solução de goma a cada 0,5 mL de NaCl adicionado. O condutivímetro utilizado foi de modelo TecnoPan CA 150 Marconi, tendo sido calibrado com solução-padrão de 14,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$, em temperatura ambiente (25 °C). Todas as medições foram realizadas a 25° C.

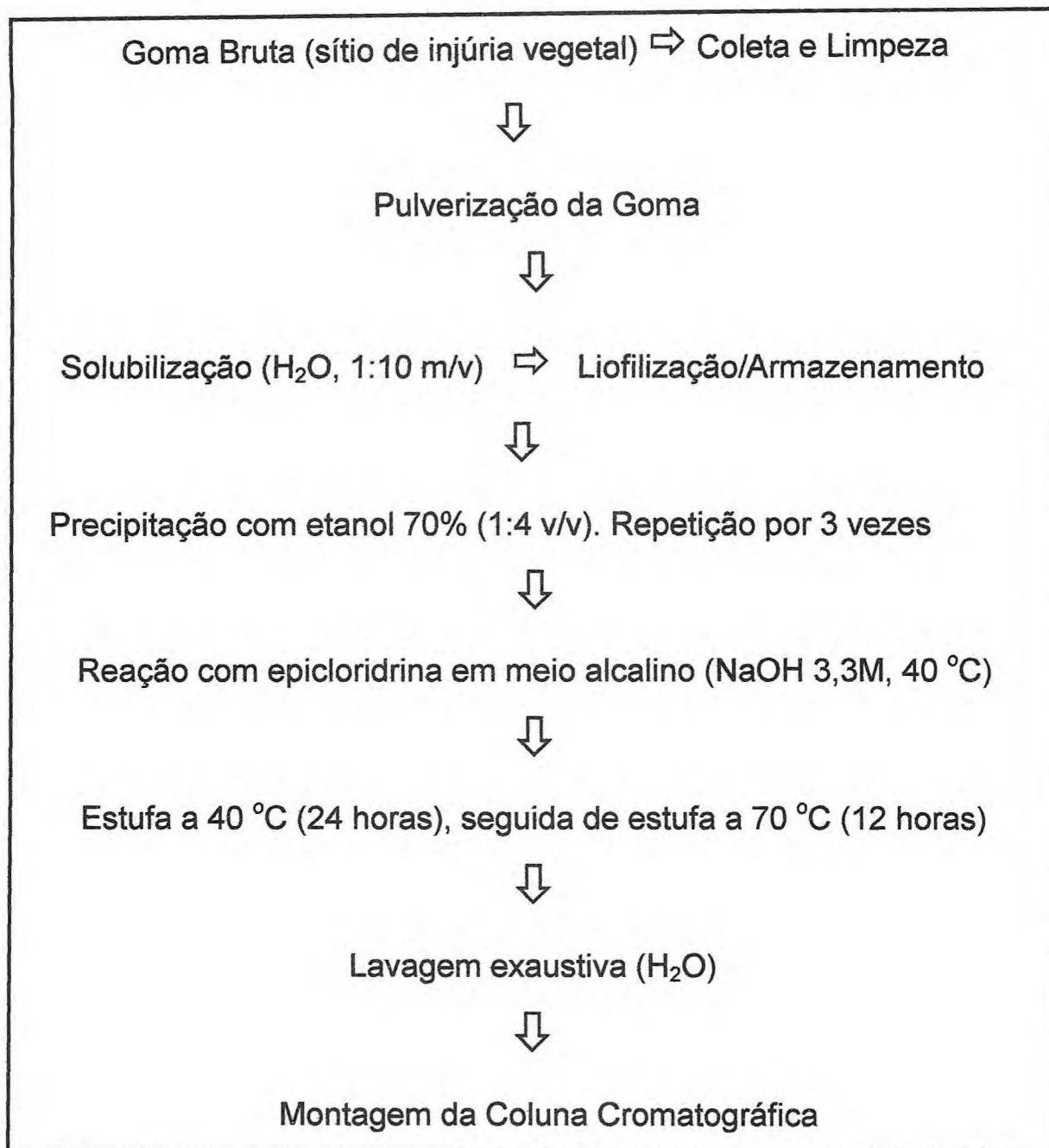


FIGURA 5. Reticulação da goma exsudada de cajueiro, com epicloridrina, conforme proposto por FUGITA (1975) com modificações.

V.14. Obtenção de extratos de sementes

V.14.1. Preparação das farinhas de sementes

As farinhas de sementes de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa* foram obtidas por trituração das sementes em moinho de lâminas, após a eliminação do tegumento e secagem com acetona. As sementes de *Abrus precatorius*, *Ricinus comunis*, *Arachis hipogea*, *Erythrina velutina*, *Luetzelburgia auriculata*, *Pachira aquatica*, *Stryphnodendron coriaceaum*, *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda*, *Canavalia ensiformis*. *P.aquatica* e *D.altissima* foram submetidas a um processo de destegumentação e depois trituração em moinho de lâminas. A farinha de sementes de *A.hipogea*, antes da extração, foi submetida a processo de delipidação com hexano.

As farinhas finas resultantes foram acondicionadas em frascos herméticos e guardados em temperatura ambiente.

V.14.2. Obtenção de extratos totais de sementes

Os extratos brutos de sementes de *A.precatorius*, *A.integrifolia*, *A.incisa*, *R.comunis*, *A.hipogea*, *E.velutina*, *P.aquatica*, *S.coriaceaum* e *D.altissima* foram obtidos a partir de extração com solução salina (NaCl 0,15M) na proporção de 1:10, p/v) em agitação contínua, durante 4 horas à temperatura ambiente.

O extrato bruto de sementes de *L.auriculata* foi obtido a partir de extração com tampão acetato de sódio pH 6,8 na proporção de 1:10, p/v) em agitação contínua, durante 4 horas à temperatura ambiente. As suspensões resultantes foram centrifugadas a 9000 x g por 20 min, em centrífuga refrigerada SORVALL RC-5B a 4 °C. Todos os sobrenadantes, após filtração com papel de filtro, foram guardados em congelador, até uso posterior.

V.14.3. Preparação dos extratos de algas

Os exemplares de algas marinhas utilizados (*Solieria filiformis* e *Gracilaria cornea*) foram coletados e após identificados, foram transportados em recipiente isotérmico. Após lavagem com água destilada e remoção de epífitas, o material foi estocado em sacos plásticos a -20°C para posterior utilização. As algas frescas foram maceradas em presença de nitrogênio líquido. O material triturado foi deixado em contato com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 na proporção de 1:3 (m/v, massa de alga: meio de extração), sob agitação por 4 horas a 4°C . O homogenato foi filtrado em tecido de *nylon* e, em seguida, centrifugado a $10.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C . O precipitado foi desprezado e o sobrenadante obtido, denominado de extrato bruto, submetido aos ensaio cromatográficos.

V.14.4. Obtenção das frações ricas em lectinas

Com a finalidade de se obter uma fração mais concentrada e livre de impurezas de baixo peso molecular, os extratos totais foram precipitados por adição de sulfato de amônio até 80% de saturação.

Após 4 horas de repouso, o material foi centrifugado a $9.000 \times g$ por 30 minutos em centrífuga refrigerada SORVALL RC-5B e o precipitado resultante dissolvido em salina, dialisado exaustivamente contra água deionizada, e liofilizado.

O extrato total das algas utilizadas foi submetido à precipitação com sulfato de amônio até 80% de saturação durante quatro horas a temperatura ambiente. Após esse período foi feita uma centrifugação a $10.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, dialisado exaustivamente contra o tampão de extração, sob agitação constante. As frações obtidas foram, desta forma, acondicionadas em frascos herméticos guardados em congelador até uso posterior.

V.15. Cromatografias de afinidade

As cromatografias foram realizadas em colunas montadas com seringas hipodérmicas (FIGURA 6). As colunas foram montadas deixando-se o gel (0,3 g de goma) sedimentar por gravidade e equilibradas com NaCl 0,15 M. Amostras ricas em lectinas foram aplicadas e deixadas em contato por 30 minutos. A eluição inicialmente foi feita com a mesma solução de equilíbrio, seguida de eluição com β -alanina 0,1M em NaCl 0,15M pH 2,6. A eluição foi realizada a fluxo constante e as frações obtidas tiveram as absorbâncias determinadas (280 nm).

V.16. Utilização da goma reticulada como biossensor para proteínas

Com o objetivo de avaliar a capacidade do polissacarídeo exsudado de cajueiro em ligar-se a proteínas, foi montado um sistema denominado "biossensor" (IQBAL *et al.*, 2000), através do qual a goma polissacarídica reticulada com epiclorigrina (3g) foi acondicionada em saquinhos (5cm x 2cm x 1,5 cm) de material inerte (*nylon*) e mantida em contato com solução de extrato de sementes ou extrato de algas, sob agitação constante. Após 12 horas de contato com a solução protéica, o saquinho fechado foi removido e acondicionado em seringas hipodérmicas de 20 mL, seguindo-se o mesmo procedimento cromatográfico descrito no item V.15. As colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M.

A eluição inicialmente foi feita com a mesma solução de equilíbrio, seguida de eluição com β -alanina 0,1M em NaCl 0,15M pH 2,6. A eluição foi realizada a um fluxo constante e as frações obtidas tiveram as absorbâncias determinadas a 280 nm. A área referente aos picos retidos (Picos II) foi calculada através do somatório das absorbâncias obtidas para cada pico e depois tabuladas.

Para comprovar a presença lectínica nos picos de eluição, procedeu-se ensaio de hemaglutinação, assim como a avaliação através de corrida eletroforética.

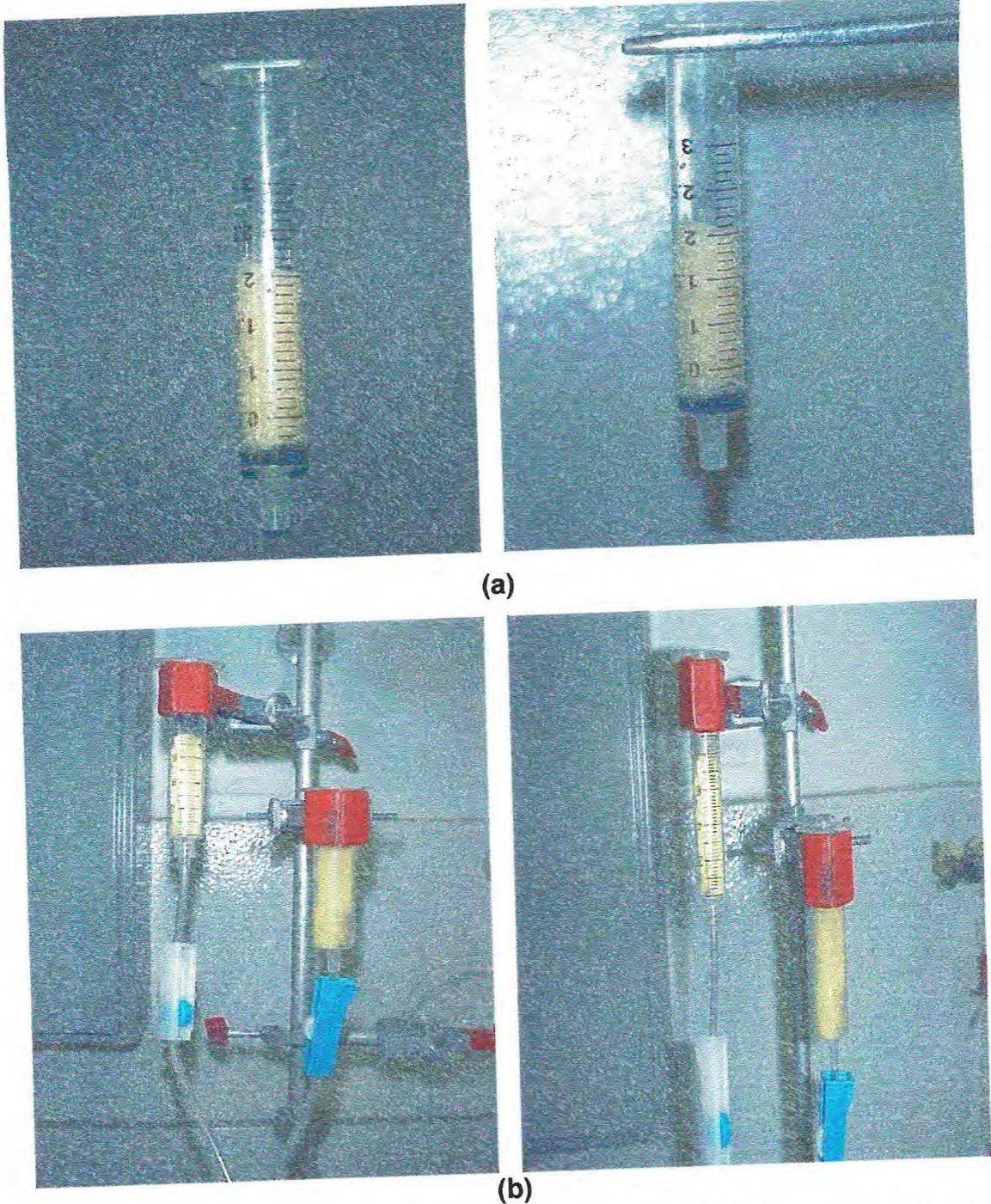


FIGURA 6. Estratégias de cromatografia de afinidade para identificação de lectinas vegetais: (a) seringa hipodérmica contendo o gel cromatográfico reticulado de goma de cajueiro; (b) sistema de biossensor idealizado (sachê contendo gel reticulado de goma de cajueiro, contato com extrato total) para retenção de proteínas de extratos de sementes.

V.17. Ensaio de atividade hemaglutinante

Na determinação da atividade hemaglutinante das frações lectínicas foi utilizado o método de MOREIRA & PERRONE (1977), segundo o qual hemácias diluídas a 2% foram adicionadas a diluições da amostra. O ensaio foi feito em placas, cada um poço recebendo 100 μ L de NaCl 0,15M. No primeiro poço foram adicionados 50 μ L da amostra e diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8...) foram feitas, homogeneizando-se antes de cada transferência. Em seguida foram adicionados em todos os poços 50 μ L de suspensão de eritrócitos a 2%. As placas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e, posteriormente deixados em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados expressos como atividade específica (UH/mgP), onde uma UH representa o inverso da maior diluição ainda capaz de aglutinar eritrócitos.

V.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol foram realizadas segundo a técnica de LAEMMLI (1970), usando-se um gel de aplicação de 3,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 e um gel de separação contendo 12,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8, adaptada para placas medindo 10 x 8 cm. (Sistema Hoefer SE250 - Pharmacia Biotech). Amostras liofilizadas (10mg/mL) foram dissolvidas em tampão tris-HCl 3M, pH 8,3, contendo SDS 10%, β -mercaptoetanol 1%, sacarose (10%) e incubadas a 110 °C por 10 minutos. Alíquotas de 10 μ L das amostras tratadas foram aplicadas no gel, e submetidas à corrente de 40mA durante cerca de uma hora e trinta minutos. Marcadores de peso molecular foram utilizados: lactoalbumina, 14,4 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa, tripsinogênio, 24,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, 36,0 kDa; ovalbumina, 43,0 kDa e BSA, 66,0 kDa. Visualização das bandas feita com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05% em metanol, ácido acético e água (1,0; 3,5; 8,0, v/v/v) e o descoramento, com ácido acético 10% (v/v).

Resultados e Discussão

VI. Resultados e Discussão

VI.1. Caracterização biológica da exsudação de *Anacardium occidentale* L.:

Localização histológica dos ductos secretores de goma

Os ductos responsáveis pela origem e secreção resino-gomosa de *Anacardium occidentale* são indicados na FIGURA 7. A síntese é realizada através de células especializadas do tecido epitelial, sendo resposta adaptativa a pressões ambientais.

Conforme postulado por VENNING (1948) em um trabalho pioneiro sobre a ontogenia dos canais secretores em espécies anacardiáceas, a característica mais típica desta família é a presença de um sistema de longos canais ramificados nos ramos e caules, com diversos ductos resiníferos.

Embora os anatomistas difiram com relação à origem destas estruturas dentro da família, sugere-se que sejam de natureza esquizógena, sendo a cavidade do canal formada como resultado de divisões e expansão de um grupo de células. As referidas divisões ocorrem em quase todas as partes da planta em planos radiais. As células são expandidas tangencialmente e as forças de espessamento fazem com que as células recém-formadas sejam afastadas do centro de origem.

Constatou-se que o processo de formação de ductos secretores em caule de cajueiro assemelha-se bastante ao mesmo processo observado para outros tecidos da planta, e está de acordo com o sugerido para outras espécies da família Anacardiaceae.

Assim, como o processo de formação de cavidades secretoras e outros tecidos vegetais de cajueiro, como no pericarpo, as cavidades primeiro são formadas na região mais alargada, de origem inicialmente esquizógena e maturação lisígena (BUENO, 1997). A diferenciação das cavidades secretoras está sempre associada à presença de feixes vasculares e à existência de um parênquima fundamental contornando a estrutura secretora. A cavidade apresenta

um epitélio secretor interno, com células de conteúdo citoplasmático progressivamente adensado, como pode ser observado nas **FIGURAS 7a e 7e**, até a sua lise e a liberação de conteúdo para o interior da mesma (**FIGURAS 7d e 7g**). Desta forma, a cavidade é expandida a ponto inclusive, de se fundir com outras nas mesmas condições. O parênquima fundamental dessa região é sugerido apresentar várias inclusões sólidas do tipo drusa de oxalato de cálcio (BUENO, 1997).

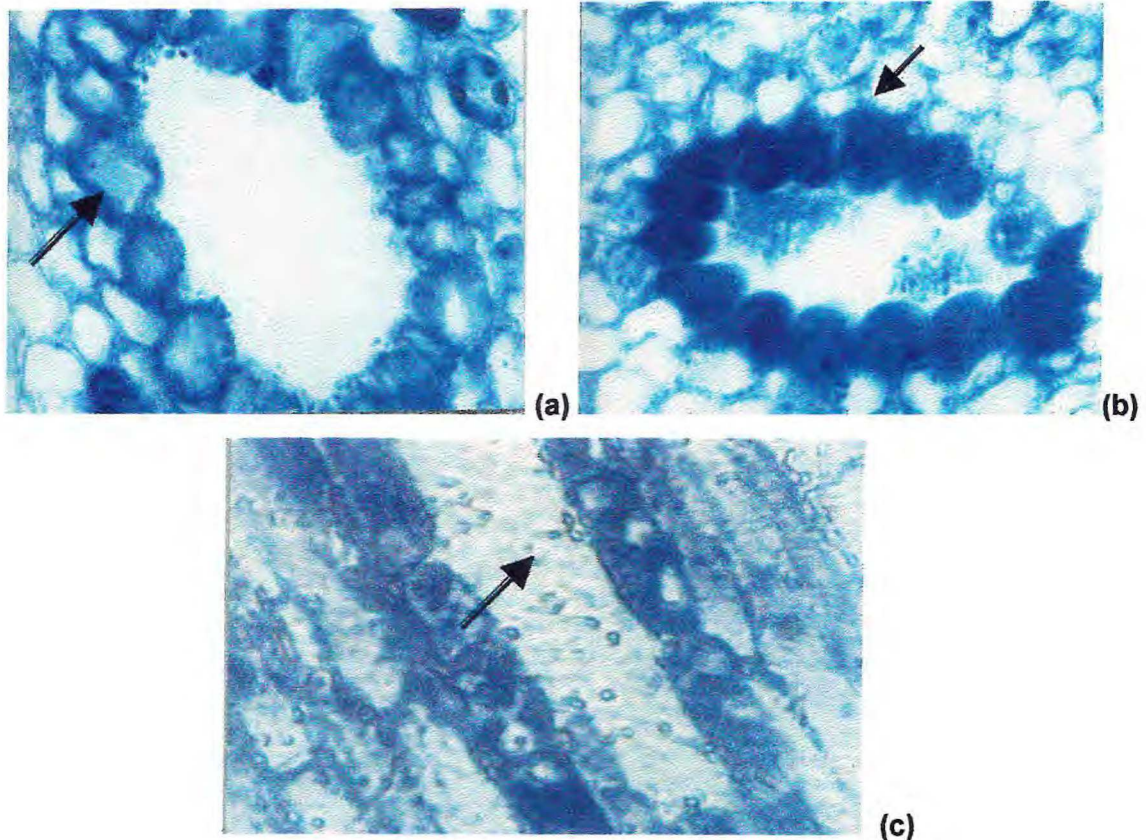


FIGURA 7. Cortes histológicos do caule de *Anacardium occidentale* L., localizando os ductos secretores de goma (coloração com azul de tolueno):

- (a) Formação dos ductos exsudativos em plantas jovens (15-20 dias). Aumento de 400x
- (b) Detalhe do ducto exsudativo em caule jovem de cajueiro, células epiteliais em processo de diferenciação (espessamento da parede celular). Aumento de 400x.
- (c) Detalhe do ducto exsudativo em caule de planta adulta. Observação do espessamento de parede celular das células epiteliais diferenciadas e processo de secreção carboidrática no interior do ducto. Aumento de 1000x.

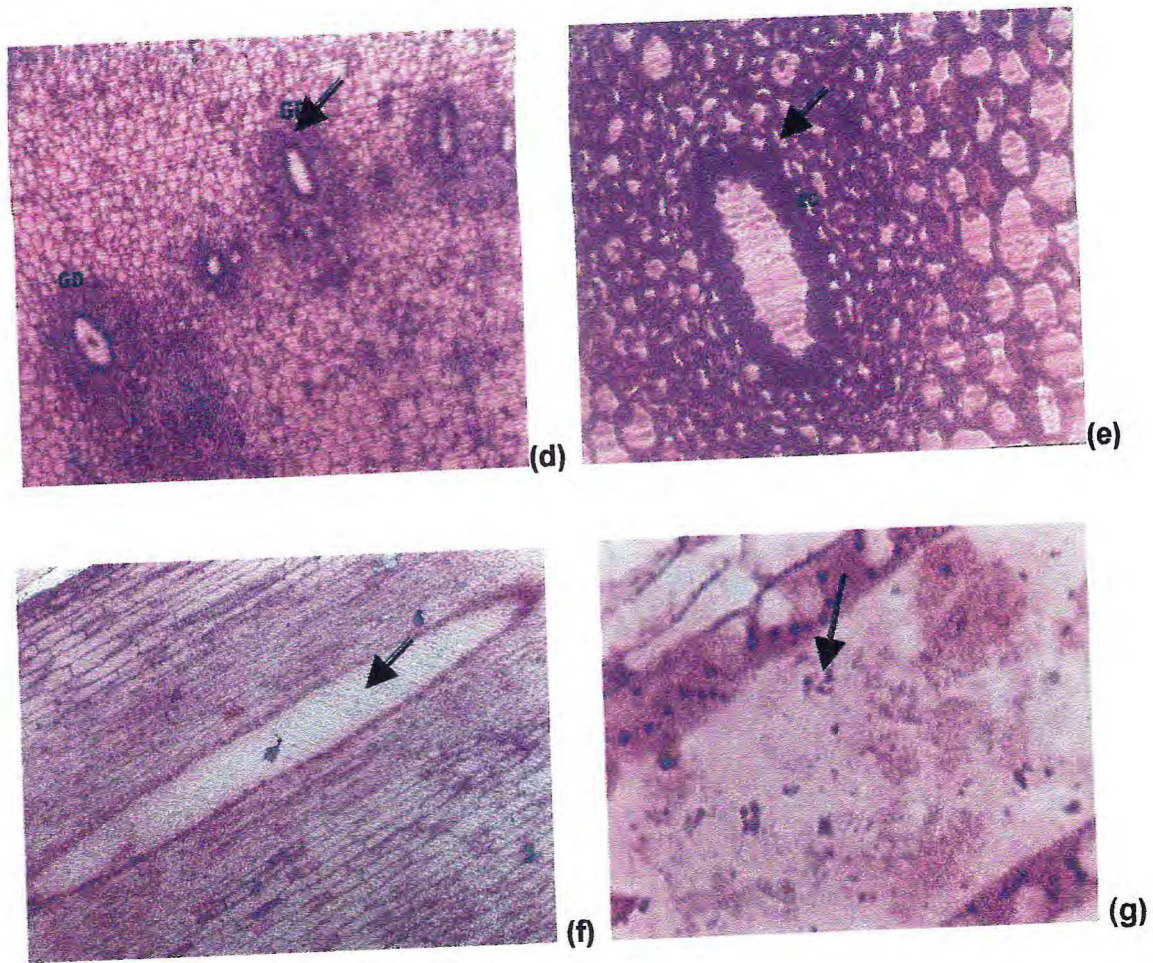


FIGURA 7. Cortes histológicos do caule de *Anacardium occidentale* L., indicando a localização dos ductos secretores (coloração com azul de metileno, seguida por fucsina ácida 1%):

- (d) Início da formação dos ductos exsudativos de goma em plantas jovens de cajueiro, corte de caule. Aumento de 100x (secção transversal).
- (e) Detalhe do ducto exsudativo em caule jovem de cajueiro, observação das células epiteliais em processo de diferenciação: espessamento da parede celular. Aumento de 400x (secção transversal).
- (f) Corte transversal de caule adulto de plantas de cajueiro. Localização do ducto exsudativo. Aumento de 400x (corte longitudinal).
- (g) Corte transversal de caule adulto de plantas de cajueiro. Localização do ducto exsudativo e detalhe da secreção exsudativa e observação das células epiteliais bastante diferenciadas (paredes celulares espessas), servindo essas de estrutura de revestimento do ducto. Secreção carboidrática no interior do ducto. Aumento de 1000x (corte longitudinal).

Assim como sugerido por VENNING (1948), primeiro trabalho referente à ontogenia de canais/ductos resiníferos para anacardiáceas, os ductos de goma/resina observados para caule de cajueiro nesse trabalho guardam alta similaridade com os processos sugeridos para outras espécies tais como *Mangifera indica* e *Spondias dulcis*. O presente trabalho sugere uma contestação à observação pioneira, uma vez que o referido autor, ainda nos primórdios dos estudos a respeito de ductos exsudativos vegetais, denomina todos os ductos de anacardiáceas como ductos resino-laticíferos, o que na realidade são ductos gomosos, já que a secreção por esses produzidos, pelo seu caráter químico, seria mais bem enquadrada na definição de “goma” e não látex ou resina.

VI.2. Caracterização química do exsudato de *Anacardium occidentale* L.

Com relação à metodologia de extração da goma de cajueiro (FIGURA 8), deve-se mencionar que até 1963 os trabalhos de resinagem com etileno apresentavam-se ineficientes, em face das dificuldades de utilização de um produto gasoso em campo. No que se refere à microssangria, um novo método concebido em 1973, consistia em puncturas feitas com estilete na casca, ao longo de uma faixa vertical, com o objetivo de evitar o efeito do anelamento parcial verificado nos métodos tradicionais (LIMA, 1992).

BANDEIRA (1991), tendo sido o primeiro a usar estimulantes químicos na extração da goma de cajueiro, lançou mão de substâncias que induzem a planta a produzir etileno.

O incremento da produção de goma, observado principalmente aos meses de agosto a setembro, é relacionado às fases fenológicas da cultura. Nos meses de junho a agosto, segundo LIMA (1992), verifica-se o pico do fluxo foliar na planta de cajueiro, sendo isso um indicativo da mudança da taxa fotossintética e mobilização de reservas que são intensificadas nos meses de setembro a outubro para a formação de frutos (EMBRAPA, 1990).

Uma vez que a operação de extração de goma consiste essencialmente na interceptação e captação do fluxo de seiva, condições fisiológicas de alto “status”

nutricional e elevada translocação de foto-assimilados configuram-se como os principais fatores determinantes do aumento da produção de goma.

A reincidência de cortes pode, no entanto vir a determinar uma predisposição das plantas ao aumento da produção, em função da formação de um maior número de canais resiníferos traumáticos (FERNANDES *et al.*, 1988).



FIGURA 8. Goma exsudada de cajueiro. (a) Exsudação do tronco após processo de indução da exsudação, através de injúria mecânica (cortes transversos ao longo do caule); o material exsudado é coletado em sacos plásticos presos à árvore e (b) Formação de cristais após oxidação (limpos de insetos e/ou resíduos)

VI.2.1. Análise Elementar:

Os resultados referentes à composição química mínima do exsudato gomoso de *A. occidentale* é apresentado na **TABELA 5**.

Foi possível observar que a metodologia sugerida para a purificação da goma exsudada de cajueiro mostra-se bastante eficiente, uma vez que, de acordo com a análise elementar da goma exsudada (AOAC, 1970), tem-se um alto teor de

carboidratos (98,4%). No entanto, no tocante à composição mínima da goma de cajazeira, aqui exposta a título de comparação. Quando as duas amostras são comparadas, tem-se que os teores de carboidratos, proteínas totais e lipídeos totais são bastante semelhantes, já que são espécies pertencentes à mesma família *Anacardiaceae*. No entanto, vale ressaltar a diferença observada quanto aos teores de cinzas da goma.

Tabela 5. Comparação entre as composições químicas mínimas das gomas exsudadas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e de cajazeiro (*Spondias mombim*)^Δ

Amostra	Umidade	Cinzas	Nitrogênio Total	Fração Hexânica	Carboidratos*
<i>Anacardium occidentale</i>	7,4%	1,03%	0,5%	0,07%	98,4%
<i>Spondias mombim</i>	2,4%	5,89%	0,7%	0,05%	93,3%

^Δ ambas as determinações realizadas no Núcleo de Tecnologia de Alimentos (NUTEC), Fortaleza, Ceará

* obtidos por diferença, considerando que todo o Nitrogênio tem origem em proteína
Valores referentes ao peso seco

No cálculo da composição mínima, os valores referentes à fração hexânica, cinzas, proteínas totais e carboidratos totais são feitos sobre o valor de matéria seca, ou seja, retirando-se o teor referente à umidade. A amostra de goma exsudada de cajueiro mostrou-se possuidora de um mais alto teor de umidade, o que talvez venha a ser reflexo da complexa rede de vascularização da planta (feixes floemáticos). Contudo, seria necessário um estudo aprofundado sobre a anatomia interna dos feixes vasculares das duas espécies para que tal hipótese viesse a ser confirmada.

Para a amostra de goma de cajazeira, os altos teores de cinzas encontrados na goma podem estar relacionados com a composição distinta do solo onde as árvores são encontradas, o que não invalida a qualidade do trabalho de análise elementar. Vale ressaltar, no entanto, que os teores de cinzas são função direta da presença de *agentes físicos* de contaminação, uma vez que a goma é exsudada ao longo do tronco da árvore e permanece aderida à superfície desta, durante o período de oxidação e solidificação.

Esses resultados estão em acordo com trabalhos prévios realizados com espécies de anacardiáceas encontradas na Venezuela, Papua e Nova Guiné, nos quais também se avaliou a composição mínima do exsudado das árvores (MARTINEZ *et al.*, 1992; LEON DE PINTO *et al.*, 1996).

VI.2.2. Determinação de carboidratos totais não-estruturais e carboidratos solúveis (redutores e não-redutores)

O teor de carboidratos totais, obtido através do método fenol-sulfúrico, assim como os teores de carboidratos solúveis (redutores e não-redutores) são apresentados na TABELA 6.

Tabela 6. Composição em carboidratos totais não-estruturais e carboidratos solúveis (redutores e não-redutores)

Carboidratos Totais Não-Estruturais	Carboidratos Solúveis	
	Redutores	Não-Redutores
1,9%	1,9%	zero

Não foram detectados carboidratos solúveis não-redutores, conforme já relatado na literatura para outras espécies de anacardiáceas, especialmente as do gênero *Spondias* (MARTINEZ *et al.*, 1992; LEON DE PINTO *et al.*, 1996; DE PAULA *et al.*, 1996; PINTO *et al.*, 2000).

VI.2.3. Avaliação de outros fatores nutricionais presentes no exsudato de cajueiro

Os resultados referentes ao conteúdo total em fibras, energia bruta (valor calórico) total e teor em vitamina C (ácido ascórbico) são apresentados na **TABELA 7**. Os baixos teores de fibras totais e de ácido ascórbico (vitamina C) não sugerem a utilização da goma exsudada de cajueiro como fonte de provimento nutricional, fato contrário ao observado para os mesmos parâmetros no pseudofruto do cajueiro (BARROS *et al.*, 1984; 1993). A energia bruta dos alimentos, por si, tem pouca aplicação, porém é o ponto de partida para se determinar outras medidas energéticas de alimentos, tais como a energia digestível ou metabolizável. Como o presente trabalho apenas busca caracterizar bioquimicamente a goma exsudada de cajueiro, para uso como matriz cromatográfica de afinidade, não foi dada ênfase à detalhada avaliação da capacidade nutriente e/ou tóxica da goma.

Tabela 7. Fatores nutricionais encontrados na goma exsudada de cajueiro

Fibras Totais (%)	Energia Bruta Total (kcal/100 g de goma)	Ácido Ascórbico (mg/100g goma)
0,95	284,60	8,40

VI.2.4. Avaliação composição catiônica das cinzas do exsudato de

A.occidentale: presença de Cálcio, Ferro, Fósforo e Magnésio

O principal cátion encontrado nas cinzas da farinha de goma purificada de *A.occidentale* L. foi o Ferro. Em valores mais baixos, foram detectados Cálcio e Magnésio, como pode ser observado na **TABELA 8** e **FIGURA 9**; ao contrário do que é observado para a também exsudada goma gathi (altos teores de íons Cálcio e Magnésio e teor de Ferro em torno de 0,02%), o que talvez, venha a promover

uma diminuição na viscosidade da goma gathi quando comparada à goma de cajueiro (JEFFERIES et al, 1978).

Já para o exsudado de cajueiro, conforme encontrado por ZAKARIA & RAHMAN (1996), tanto a goma total, quanto suas frações solúveis, possuem viscosidades semelhantes. Esse fato pode ter sua causa sugerida pelos baixos teores de cálcio e magnésio encontrados. Também se pode sugerir que, no caso da goma exsudada de cajueiro, o alto teor de Ferro não tenha influência marcante sobre as variações de viscosidade.

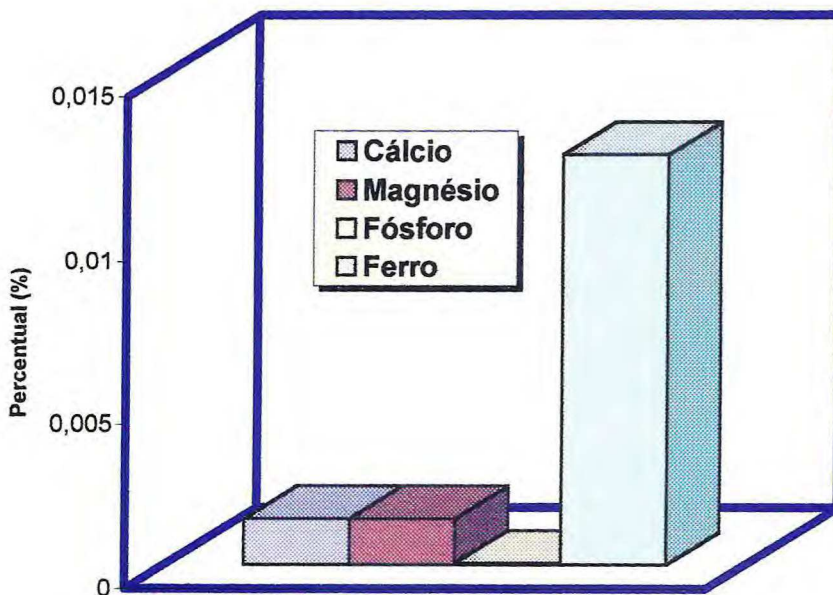


Tabela 8. Composição das cinzas

Cátion	%
Cálcio	0,14
Magnésio	0,14
Fósforo	0,005
Ferro	1,25

(com relação ao peso seco)

FIGURA 9. Composição catiônica percentual das cinzas obtidas a partir da goma exsudada de cajueiro.

VI.3. Avaliação físico-química do exsudato de *Anacardium occidentale* L.

VI.3.1. Comportamento reológico

VI.3.1.1. Viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca é determinada a partir da viscosidade relativa da solução aquosa no limite da concentração da solução nula, isto é, sem interferência de outras cadeias e ou do solvente.

A viscosidade intrínseca é um parâmetro de avaliação indireta da estrutura da macromolécula (ou biopolímero) em solução, uma vez que diz respeito ao volume específico da macromolécula no fluido; conseqüentemente, a resistência do fluido ao movimento pode ser avaliada.

A viscosidade intrínseca da solução de goma de cajueiro foi de $[\eta]$ de 2250 mL/g) (**FIGURA 10**). Devido à existência de interações entre os componentes da solução de goma de cajueiro diluída, e essas interações serem percebidas como dependentes da velocidade de deformação causada por forças externas, a solução de goma exsudada de cajueiro apresenta-se possuidora de um comportamento não-newtoniano.

Para sistemas de fluidos como este, o efeito da temperatura sobre a viscosidade varia com a natureza muito ou pouco hidrofóbica dos dispersóides. A solução de goma exsudada de cajueiro apresenta uma viscosidade intrínseca mais alta que a maioria das gomas comuns, tais como a goma arábica e goma tragacante (ZAKARIA & RAHMAN, 1996). A goma arábica é conhecida pela sua alta solubilidade, porém baixa viscosidade.

VI.3.1.2. Comportamento de fluxo de dispersões da goma de cajueiro:

Efeito da concentração da solução na viscosidade

Em concentrações superiores a 40%, soluções de goma arábica ainda exibem um comportamento newtoniano, ao contrário da goma de cajueiro.

A goma exsudada de cajueiro, em contraste à goma arábica, exibe um comportamento não newtoniano mesmo em concentrações inferiores a 1% (ZAKARIA & RAHMAN, 1996).

Quanto mais enovelada for a estrutura da molécula, tanto menor será o volume específico da molécula no fluido. Desta forma, será menor a área de contato entre as superfícies da molécula e o solvente, havendo diminuição nas chamadas camadas de solvatação que circundam a estrutura da molécula. Como resultado, tem-se uma diminuição na viscosidade da amostra ($[\eta]$).

A mistura polissacarídica do exsudado de cajueiro quando em soluções concentradas tende a apresentar baixa viscosidade, devido à sua estrutura da cadeia altamente ramificada, resultado de acordo com o proposto por MENESTRINA e colaboradores (1998) para a goma exsudada de cajueiro.

Em soluções diluídas do polímero, onde as moléculas estão bastante separadas, a viscosidade apresenta leve dependência do gradiente de cisalhamento.

Com o aumento da concentração do polímero, alcança-se um estado no qual as cadeias do polímero se interpenetram e o contato físico altera o comportamento de fluxo.

Em soluções de concentração intermediária, a viscosidade é controlada primariamente pela extensão na qual a cadeia polimérica interpenetra, indicando o volume ocupado pela molécula de polímero na solução. Tais resultados estão em conformidade com estudos prévios sobre comportamento reológico da resina de cajueiro (MOTHÉ & RAO, 1999).

Pode ser sugerido que a aplicação de calor durante a dissolução da goma de cajueiro, apesar de aumentar a quantidade de goma dispersa, pode vir a diminuir a viscosidade. O calor que venha a ser aplicado à solução da goma de cajueiro, pode promover aumento na degradação de moléculas através de hidrólise, ou simplesmente promover a disrupção física das interações naturais na goma, assim como observado para a goma arábica (WHISTLER & BETMILLER, 1993; ZAKARIA & RAHMAN, 1996). OLIVEIRA e colaboradores (2001), em trabalho referente a alterações observadas no comportamento reológico de resina

exsudada de *Enterolobium contortisiliquum*, uma leguminosa, sugerem explicação semelhante para a alteração de viscosidade.

A partir da análise do gráfico apresentado (FIGURA 10), pode-se também constatar a dependência dos valores de viscosidade específica com relação à concentração da solução. Outro ponto que vale ressaltar é que esses resultados estão de acordo com ZAKARIA & RAHMAN (1996), já que a goma exsudada de cajueiro (fração solúvel) apresenta viscosidade mais alta que a observada para goma ghatti, pois essa última possui mais alto conteúdo de íons cálcio e magnésio (JEFFERIES et al., 1978; ZAKARIA & RAHMAN, 1996).

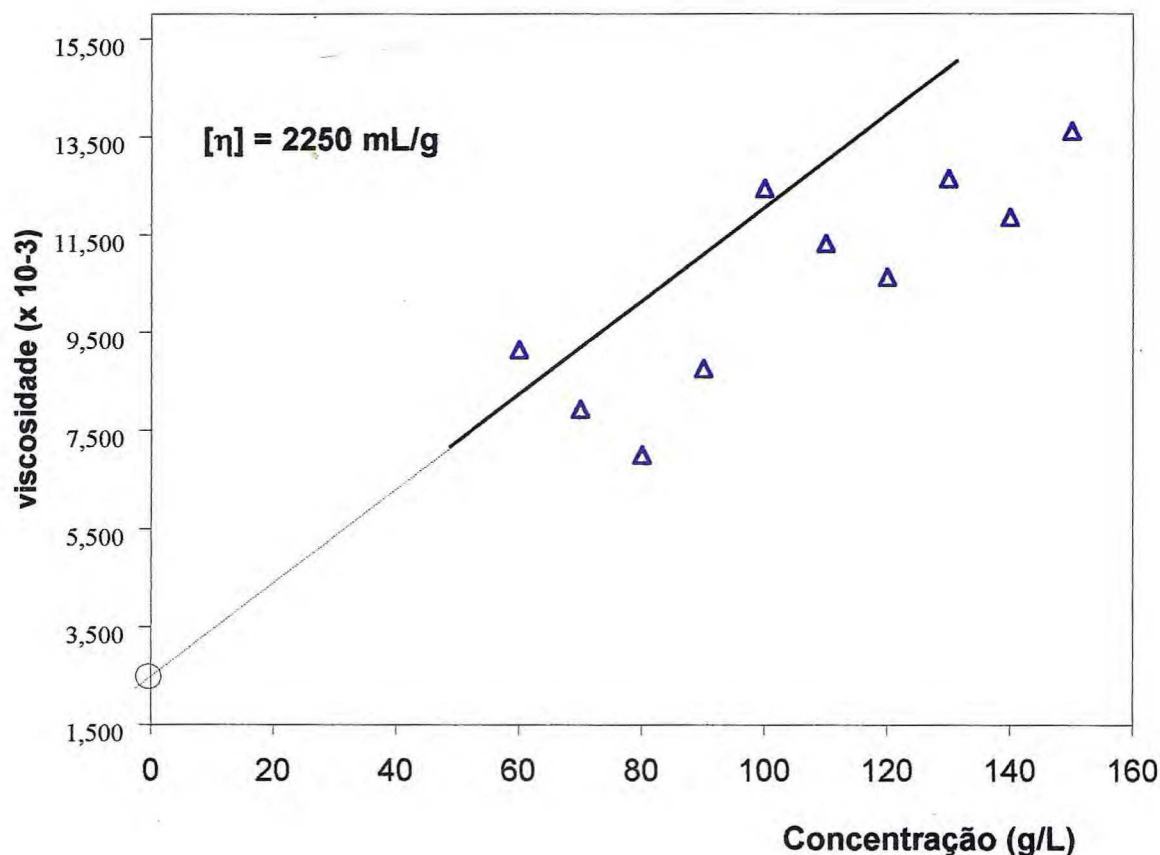


FIGURA 10. Gráfico da viscosidade em função da concentração de soluto. Goma exsudada de cajueiro purificada, precipitada com etanol e solubilizada em água destilada (50% m/v).

VI.3.1.3. Efeito da presença de sal (NaCl 0,15M) na viscosidade de dispersões de goma de cajueiro

A diálise prévia da solução de goma exsudada contra solução salina (NaCl 0,15M), tende a promover significativa diminuição da viscosidade apresentada (**FIGURA 11**), fato devido à formação de sais de sódio nas ramificações da cadeia polissacarídica, conforme será discutido posteriormente. Assim como a sugerida aplicação de calor, a adição de ácido ou álcali também tende a reduzir a viscosidade (JEFFERIES et al., 1978).

Pode-se, portanto discutir que a dimensão molecular e a conformação causada pela ação de várias interações têm um papel dominante nas propriedades de solubilidade e viscosidade das soluções aquosas de goma de cajueiro.

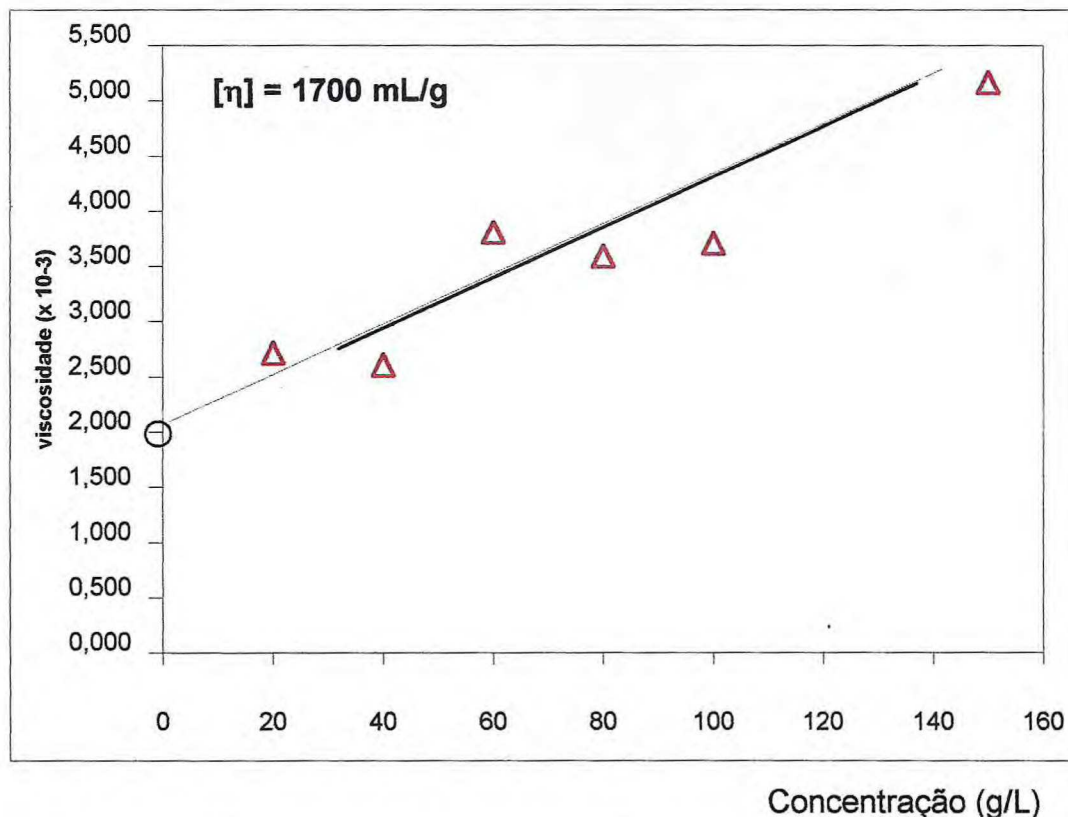


FIGURA 11. Gráfico da viscosidade em função da presença de sal. Goma de cajueiro purificada, precipitada com etanol e solubilizada em água destilada (50% m/v), dialisada contra solução salina (NaCl 0,15 M).

Em geral a viscosidade das soluções de gomas aniônicas tende a diminuir com a presença de eletrólitos, minimizando a repulsão entre os grupamentos eletricamente carregados da cadeia.

Como pode ser observado na **FIGURA 11**, a diálise por 24 horas da solução aquosa de goma exsudada de cajueiro contra solução salina 0,15M, promoveu uma leve diminuição na viscosidade intrínseca. Tal fato, conforme sugerido anteriormente, é devido à formação de sais de sódio nas ramificações de ácido urônico presentes na estrutura complexa deste polissacarídeo de cajueiro.

A formação desses sais nos braços de ramificação viria a diminuir a repulsão eletrostática (forças coulômbicas), alterando desta forma, o comportamento de viscosidade em solução, da cadeia polissacarídica. O valor da viscosidade intrínseca encontrado para a solução de goma dialisada contra solução salina ($[\eta]$ de 1700 mL/g) foi bastante inferior ao observado para a solução de goma de cajueiro ($[\eta] = 2250$ mL/g), considerando que polissacarídeos de cadeias mais curtas são mais solúveis, apresentando mais baixos valores de viscosidade intrínseca.

VI.3.1.4. Efeito da presença de ácido na viscosidade de dispersões de goma de cajueiro

Em baixos valores de pH, a cadeia do polímero de polissacarídeo é presumida estar enovelada ('acid-free'). Com a elevação do pH, os componentes começam a ser desprotonados, a cadeia é expandida devido à repulsão de cargas, causando um aumento na viscosidade (ZAKARIA & RAHMAN, 1996). Os resultados relativos ao comportamento da viscosidade relativa da solução aquosa de goma de cajueiro frente à presença de soluções (10% v/v) de ácidos acético, clorídrico e sulfúrico são apresentados na **FIGURA 12**.

Pode-se observar que a goma exsudada de cajueiro mostrou-se pouco solúvel na solução de ácido acético ($[\eta]$ de 2200 mL/g), tendo havido pouca diminuição do seu valor inicial, com relação à viscosidade intrínseca ($[\eta]$ de 2250 mL/g). Já a submissão da solução de goma à presença de ácido sulfúrico

possibilitou à goma exsudada de cajueiro apresentar um comportamento de viscosidade intrínseca semelhante ao observado quando da diálise contra solução salina (NaCl 0,15M), exibindo um valor de viscosidade intrínseca de $[\eta]$ de 1800 mL/g).

Dentre as três soluções ácidas às quais a goma de cajueiro foi submetida, àquela que apresentou um melhor meio de solubilidade para a goma foi a solução de ácido clorídrico, na qual a solução de goma exsudada de cajueiro apresentou um valor para a viscosidade intrínseca em torno de $[\eta] = 1650$ mL/g, inferior, inclusive, ao valor observado frente à diálise contra solução salina. Isso sugere que a estrutura da macromolécula (polissacarídeo) apresenta uma conformação mais enovelada (de mais baixo volume específico, portanto) em solução diluída (10%) de ácido clorídrico, do que em soluções diluídas de ácido acético ou sulfúrico.

A TABELA 9 evidencia a alteração no comportamento reológico da goma exsudada de cajueiro, em função da presença de agentes de modificação, tais como a diálise contra solução salina (NaCl 0,15M) e a solubilização ácida.

Tabela 9. Viscosidade da goma exsudada de cajueiro frente a diferentes tratamentos

Tratamento da Goma	η (mL/g)
Sem tratamento	2250
Diálise contra NaCl 0,15M	1700
Solubilização em Ácido Clorídrico	1600
Solubilização em Ácido Acético	2200
Solubilização em Ácido Sulfúrico	1800

Nota-se que o tratamento da goma exsudada de cajueiro com ácido clorídrico 10% (m/v) foi capaz de reduzir bastante a viscosidade da solução em um tempo bastante inferior ao necessário para que o a diálise da goma contra solução salina (NaCl 0,15M) fosse capaz de apresentar resultado semelhante; demonstrando uma queda na viscosidade em função da retirada da água de solvatação circundante à molécula de polímero (hetropolissacarídeo), através de suposta alteração na conformação da molécula de polímero.

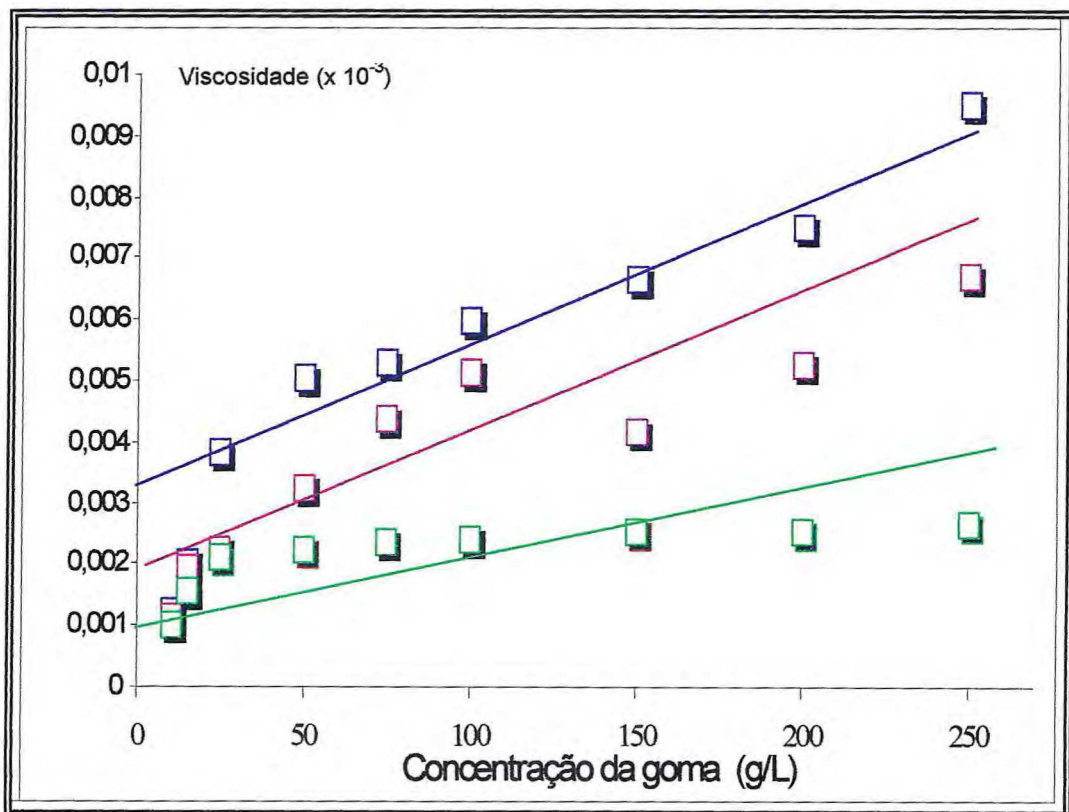


FIGURA 12. Variação da viscosidade em função da presença de soluções ácidas. Goma exsudada de cajueiro purificada, precipitada com etanol e solubilizada em ácido acético 10% m/v (■—■), ácido sulfúrico 10% m/v (■—■) e ácido clorídrico 10% m/v (■—■).

VI.3.2. Avaliação da capacidade condutivimétrica

A condutividade elétrica expressa a quantidade de eletricidade transferida através de uma área unitária em um gradiente de potencial definido, durante um intervalo de tempo definido. A condutividade elétrica de uma solução é um fenômeno acumulativo, sendo o resultado da somatória das condutividades dos íons presentes. Os resultados referentes à avaliação de condutividade das soluções de goma exsudada de cajueiro são expostos na **FIGURA 13**.

Os resultados prévios mostram que a capacidade condutiva da goma é diretamente associada com a massa de goma solubilizada. Para soluções mais concentradas (20%), foi possível a observação de uma alta condutividade elétrica, reforçando o uso potencial da goma exsudada de cajueiro como um futuro biossensor industrial.

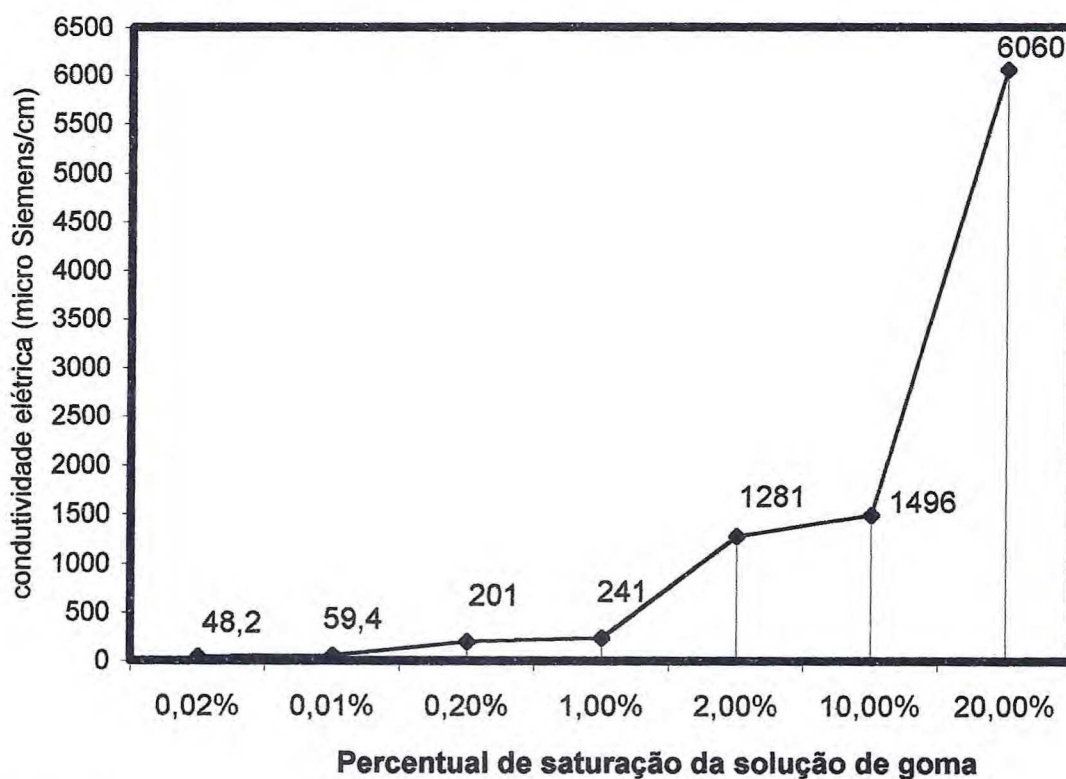


FIGURA 13. Variação da condutividade elétrica observada para uma solução aquosa de goma exsudada de cajueiro, em função do aumento da concentração de goma

VI.3.3. Avaliação da influência do tratamento químico (reticulação com epícloridrina) da goma de cajueiro

Quando são comparados os tratamentos químicos de reticulação, o procedimento realizado com epícloridrina 12,5N, em condições alcalinas e seguindo-se de perto a metodologias propostas por FUGITA (1975) e APPUKUNTAN (1977), com pequenas modificações, observa-se que foi o melhor tratamento para insolubilização da goma exsudada de cajueiro. A tentativa de reticulação realizada com glutaraldeído 10% (v/v) não se mostrou eficiente para a insolubilização da goma.

A tentativa de se construir um biofilme elástico usando para tal a reticulação com glutaraldeído não se mostrou bem sucedida. Embora a metodologia proposta para o tratamento químico de reticulação da goma de guar com glutaraldeído, com a conseqüente confecção de um hidrogel funcional (GLIKO-KABIR *et al.*, 1999), e termo-resistente, quando da repetição da referida metodologia para a goma exsudada de cajueiro o resultado obtido foi não satisfatório.

Como pode ser conferido pela observação das **FIGURAS 14 e 15**, o tratamento químico com glutaraldeído foi incapaz de formar ligações cruzadas na estrutura complexa do polissacarídeo exsudado de cajueiro.

Ao contrário, após o tratamento químico com epícloridrina 12,5N, em meio alcalino, foi possível a obtenção de um gel insolúvel, constituído de micro-partículas que se assemelham a uma espécie de filme (**FIGURAS 16a e 16b**), de natureza um pouco elástica e resistente à degradação quando submetido a meio aquoso.

VI.3.3.1. Espectro de infravermelho da goma purificada e da goma reticulada

Uma técnica utilizada para caracterizar as amostras de polissacarídeos foi a espectroscopia na região do infravermelho. É uma técnica simples e rápida para a identificação qualitativa destes polímeros.

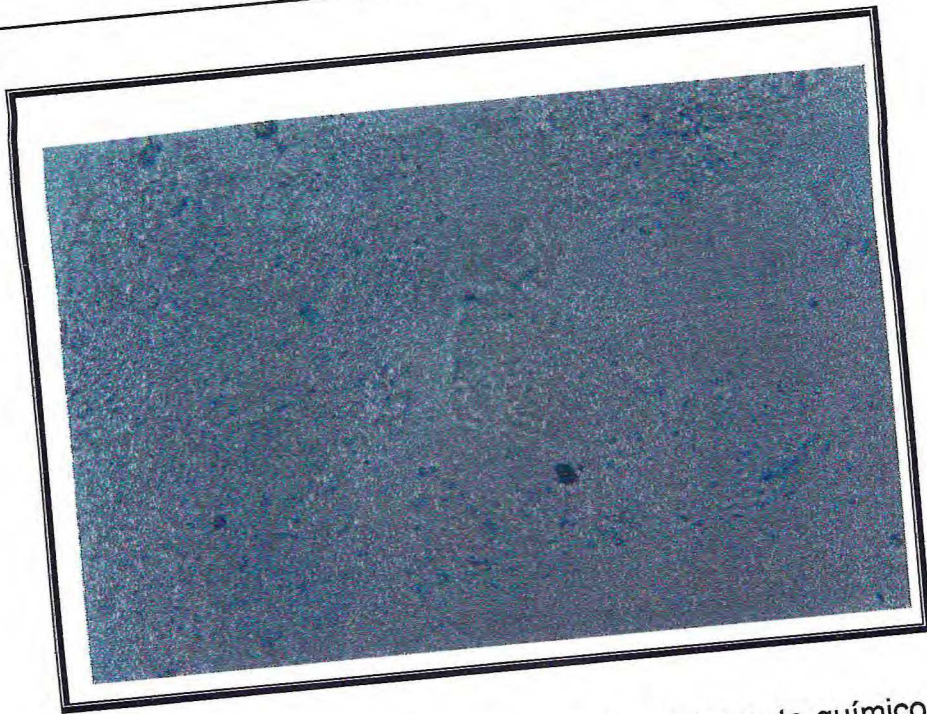


FIGURA 14. Goma exsudada de cajueiro sem tratamento químico. Observação em microscopia óptica (meio aquoso): aumento de 800X.

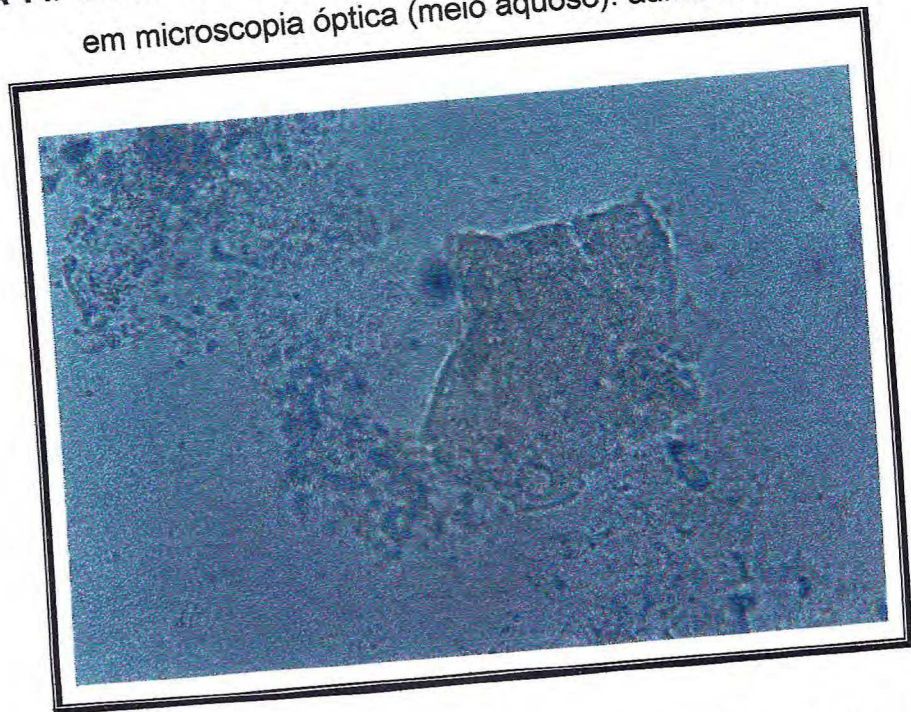


FIGURA 15. Goma exsudada de cajueiro com tratamento químico de reticulação. Tratamento com glutaraldeído (solução aquosa a 10%), Observação em microscopia óptica (meio aquoso): aumento de 800X.

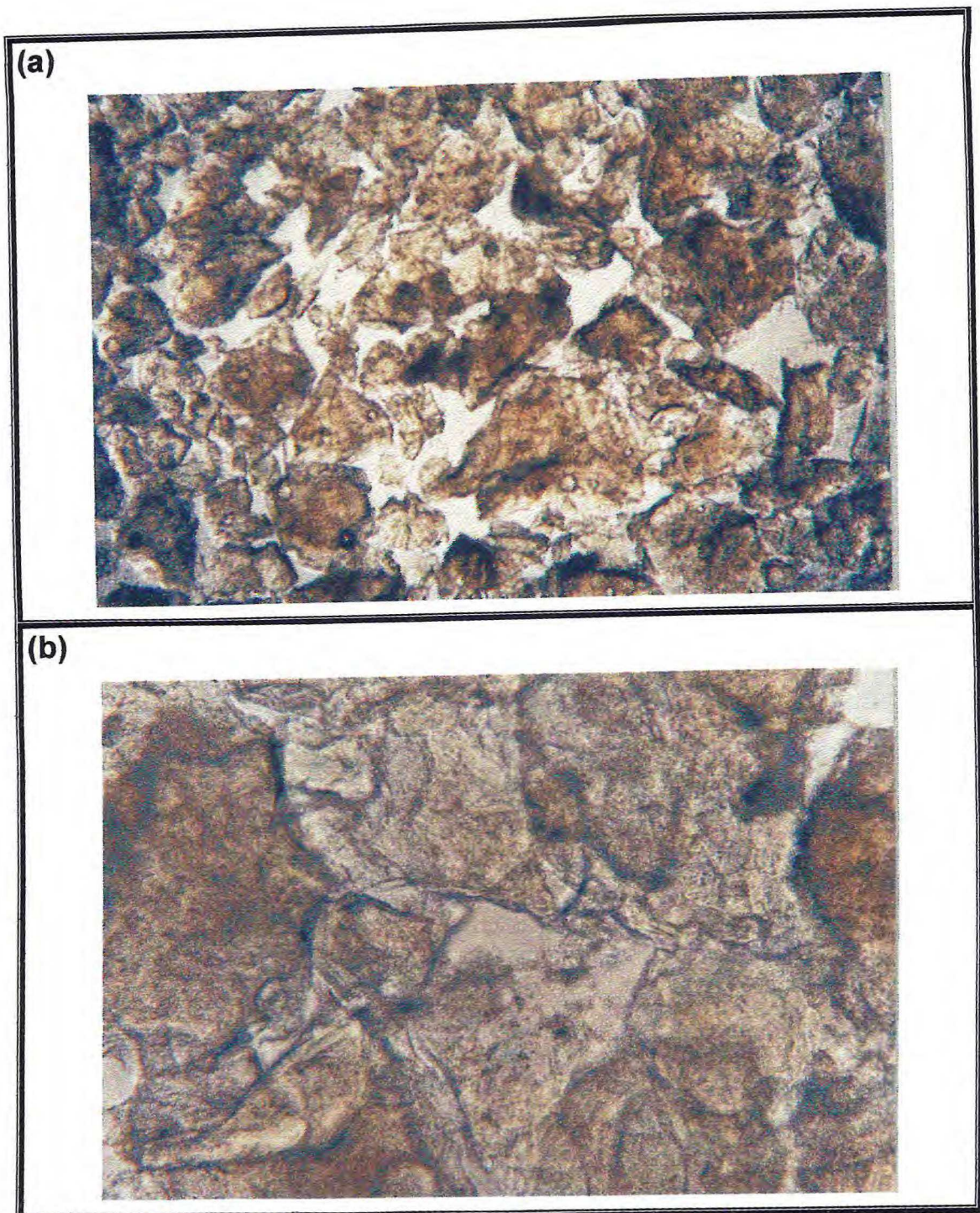


FIGURA 16. Goma de cajueiro reticulada com epiclorigrina 12,5N. Observação em microscopia óptica (meio aquoso): (a) aumento de 200X; (b) aumento de 800X.

A faixa de 0,7 ou 0,75 μm até 2,5 ou 3 μm é chamada de infravermelho próximo (NIR – “Near Infrared”). A janela de 8 – 14 μm , também costuma ser designada por infravermelho termal, por compreender a região onde se encontra o pico de emissão de qualquer corpo na faixa de temperatura de -50°C à 50°C . É também comum na literatura a notação: SWIR – “Short Wavelength Infrared”, MWIR – “Middle Wavelength Infrared” e LWIR – “Long Wavelength Infrared” para as faixas acima.

O espectro vibracional característico de moléculas da maior parte das substâncias orgânicas situa-se na faixa de 2,5 – 25 μm , que é designada pelos espectroscopistas como infravermelho médio e acima de 25 μm como infravermelho distante. Alguns autores estabelecem 1000 μm como comprimento de onda limite do infravermelho, enquanto outros consideram este limite como sendo 100 μm e a faixa de 100 – 1000 μm como faixa sub-milimétrica (TABELA 10). A espectroscopia de absorção no infravermelho de polissacarídeos é utilizada para a determinação de grupamentos característicos (DE PAULA, 1995; BRAGA, 2001; TEIXEIRA, 2001).

Tabela 10. Atribuição das principais camadas no espectro na região do Infravermelho

Atribuição	Número de Onda, cm^{-1}
Estiramento CO do álcool primário	1028-1050
Estiramento CO do álcool secundário	1082-1090
Estiramento CO do éter da ligação glicosídica	1144-1150
Estiramento CO do éster do grupo acetil	1266
Estiramento $\text{C}\ddot{\text{O}}^-$	1419-1424
Estiramento assimétrico $\text{C}\ddot{\text{O}}^-$	1637-1641
Estiramento $\text{C}=\text{O}$ do grupamento acetil	1736
Estiramento C-H	2922-2938
Estiramento O-H	3398-3451

A análise das bandas no infravermelho é dificultada pela complexidade das moléculas. Tal dificuldade de interpretação deve-se ao grande número de

interações intramoleculares e intermoleculares existentes, como também ao elevado comprimento da cadeia. Comparando-se os espectros referentes à goma de cajueiro liofilizada (FIGURA 17) e à goma de cajueiro precipitada com etanol (1:5 v/v) (FIGURA 18), observa-se que o processo de dissolução e filtração não veio a modificar a estrutura da goma em questão.

De qualquer modo, esta faixa superior é uma região difícil, com poucas fontes confiáveis, poucos materiais com boa transparência, forte difração e absorção por vapor de água e poucos detectores disponíveis (BARR, 1961). A goma de cajueiro, com e sem tratamento prévio com o agente químico promotor de ligação cruzada (reticulação), teve seu espectro de infravermelho avaliado, conforme apresentado na FIGURA 19.

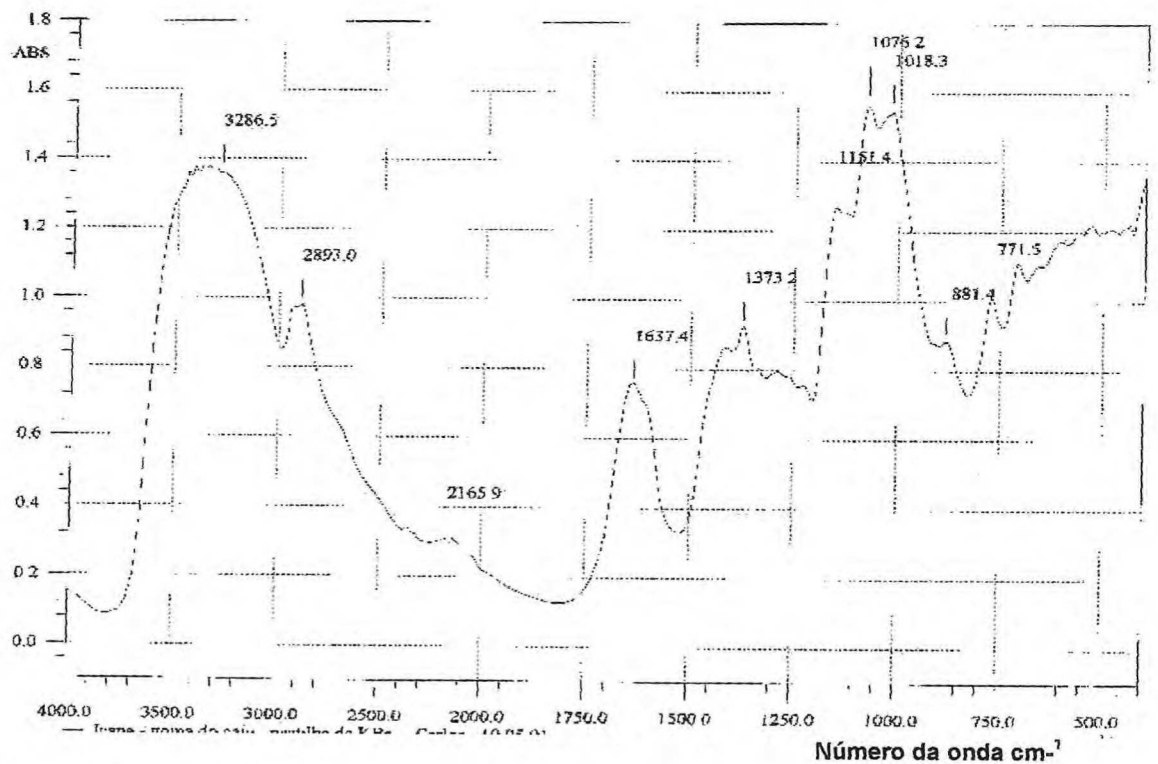


FIGURA 17. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de goma de cajueiro sem tratamento químico (purificada) liofilizada, em pastilha de KBr

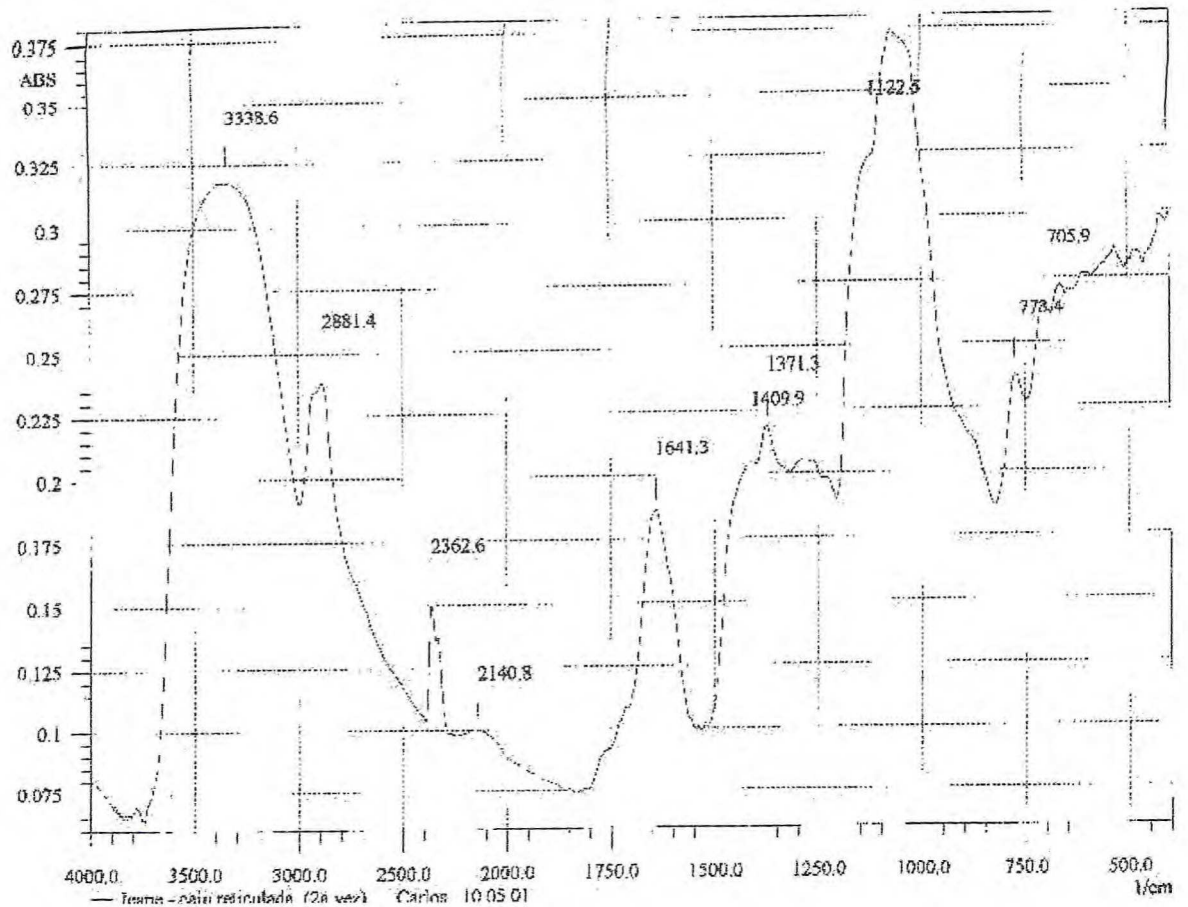


FIGURA 18. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de goma de cajueiro sem tratamento químico (purificada) precipitada com álcool etílico 1:5 (v/v), em pastilha de KBr

Da análise destes espectros, nota-se que as bandas de absorção estão em concordância com o esperado e são características de polissacarídeos exsudados. O espectro resultante apresenta as bandas características de polissacarídeos. As bandas correspondentes às hidroxilas ocorrem na faixa de comprimento de onda de 3000 e 3500 cm^{-1} .

A região de 2900 cm^{-1} refere-se à ligação C-H. Grupos carboxila apresentam pico em 2340, estiramento do ânion COO^- em 1640, 1610, 1419 e 1050, devido ao estiramento C-O. As bandas na região entre 900 a 1350 cm^{-1} são referentes às deformações angulares e axiais das ligações simples C-O, C-C-H e

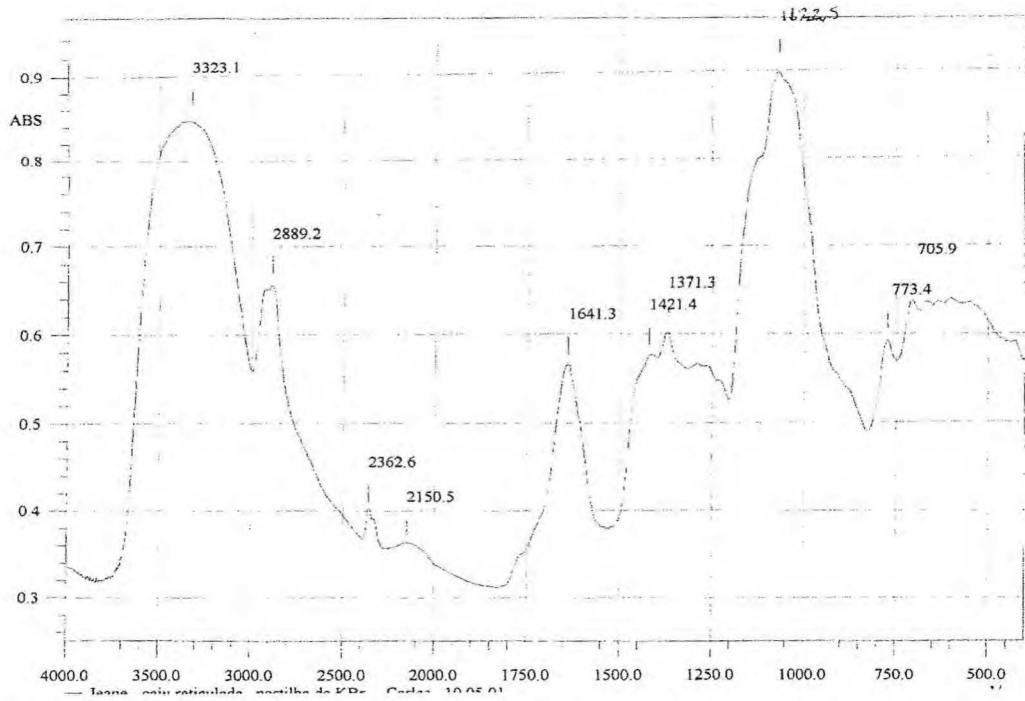


FIGURA 18. (b) Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de goma de cajueiro reticulada com epícloridrina, em pastilha de KBr.

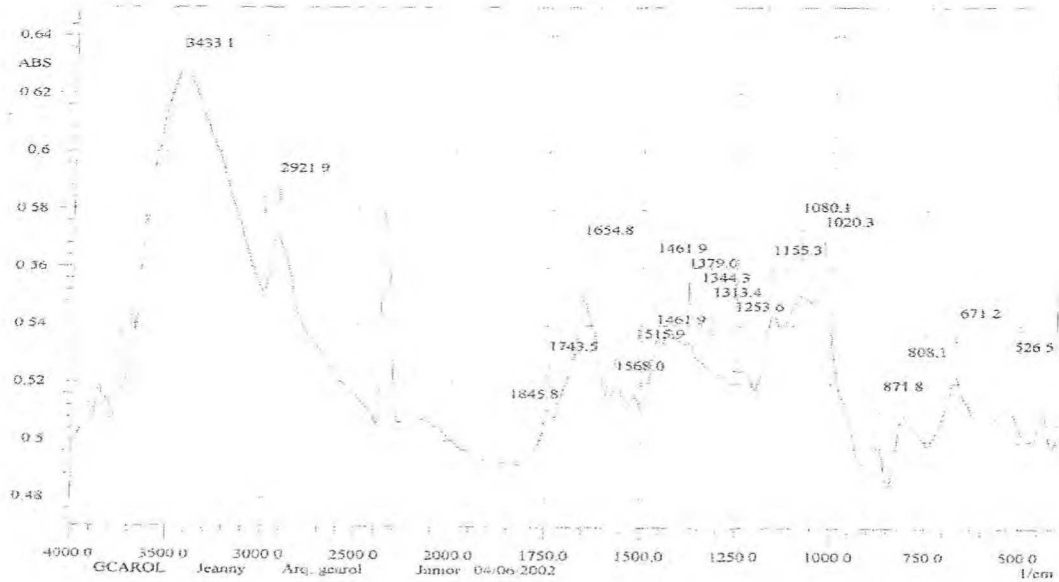


FIGURA 19. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de goma purificada de *Adenanthera pavonina* (goma endospérmica), em pastilha de KBr

C-O-H. Estas bandas são características de polímeros. O aumento observado na região O-H para a goma de cajueiro precipitada com etanol (quando comparada à goma purificada) pode ser devido à presença de álcool contaminante, provavelmente resquício do processo de purificação/precipitação com álcool.

A análise de espectro em infravermelho, sendo uma técnica simples e rápida, é bastante utilizada para identificação qualitativa de polímeros de carboidratos. Com o objetivo de se avaliar a formação de ligações cruzadas na estrutura da goma exsudada de cajueiro, o espectro de infravermelho foi determinado também com a goma reticulada com epícloridrina 12,5N. Foi possível a verificação da diminuição da intensidade do pico de hidroxila na amostra reticulada, causada pela formação de pontes éter entre a epícloridrina e as hidroxilas do açúcar (**FIGURA 18b**). Comparando-se os espectros das gomas antes e depois da reticulação, verifica-se aumento na banda referente à região O-H (3000 a 3500cm^{-1}) e aumento nas bandas referentes à região 1300 a 1500cm^{-1} , assim como o aparecimento de banda na região COO^- (entre 2350 a 2360cm^{-1}), relacionados com a ligação do agente reticulante (epícloridrina) com o polímero (GLAVCHEV *et al.*, 2000). Observa-se, também, diminuição na região referente aos álcoois primário e secundário (de 1000 a 1100cm^{-1}) entre a goma purificada e a reticulada. É possível também a observação de mudanças na região CH_2 , devido à inserção do glicerol-éter. Não foi observada diferença com relação às preparações de goma exsudada de cajueiro, tenha sido precipitada com álcool ou mesmo apenas solubilizada, comprovando que a purificação e precipitação com etanol 1:5 (m/v) não promoveu alteração na estrutura química da goma. A comparação entre as gomas purificadas de cajueiro e de *Adenantha pavonina* (endospérmica) expõe a diferença entre os perfis de absorção no infravermelho (**FIGURA 19**), fato já observado em função do baixo teor de ramificação das gomas endospérmicas (MOREIRA, 1998; TAVARES, 1998).

Quando são comparados os espectros de absorção no infravermelho entre as gomas de cajueiro, karaya e tragante (**FIGURA 20**), todas exsudadas vegetais, pode-se observar regiões constantes nas amostras, reforçando o fato que a

epicloridrina leva ao aparecimento dos mesmos grupamentos químicos para as três gomas.

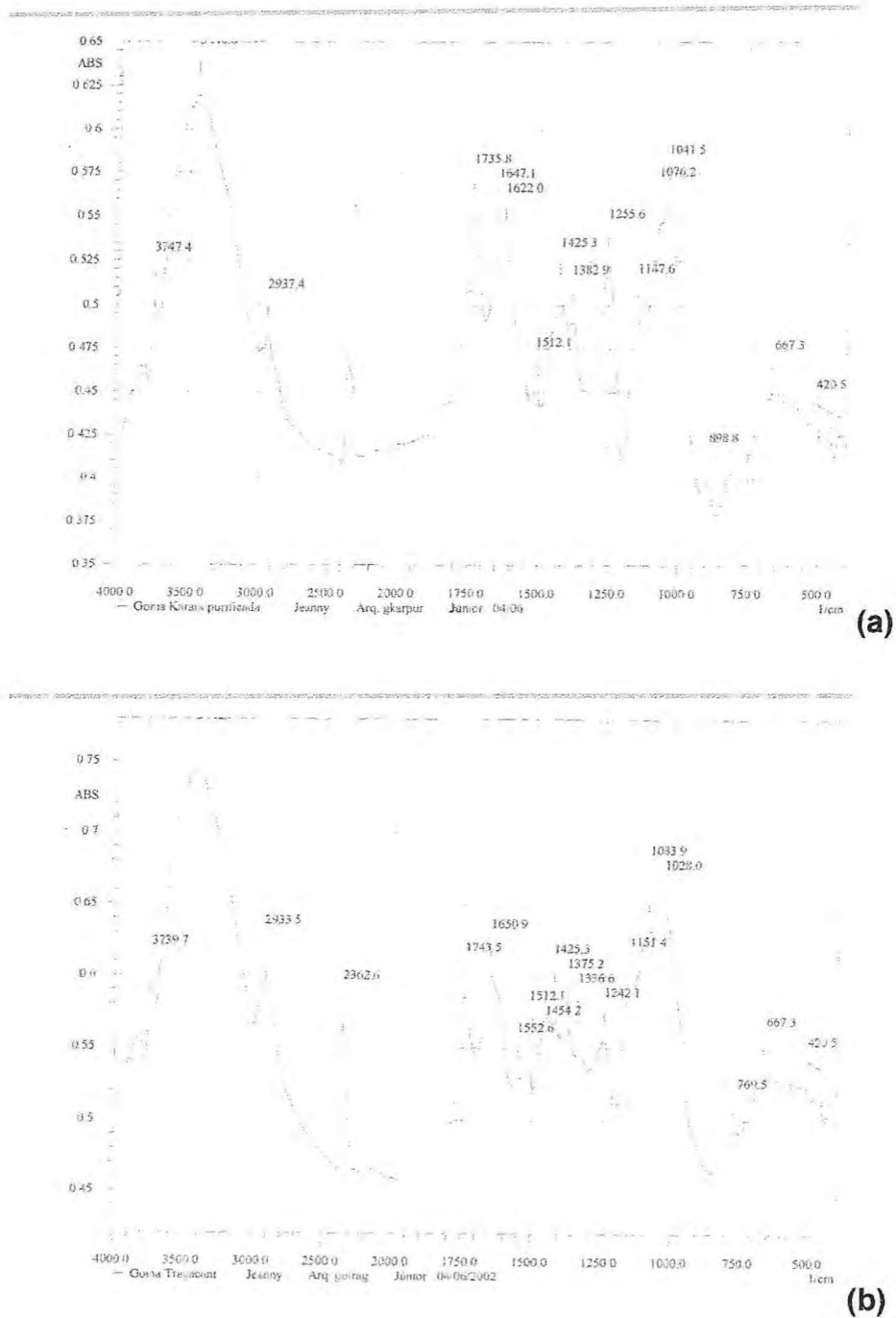


FIGURA 20. Espectro de absorção na região do infravermelho da amostra de (a) goma Karaia e (b) de goma Tragacante (gomas exsudadas), em pastilha de KBr.

VI.4. Potencial de bioafinidade da goma exsudada de cajueiro

A interação entre carboidratos e proteínas capazes de se ligar a glicoconjugados tem estimulado a caracterização de açúcares como mediadores da transmissão da informação biológica através da formação de códigos específicos de reconhecimento (IQBAL *et al.*, 2000). Devido ao progresso no entendimento da importância de glicoconjugados em muitas interações biológicas, o desenvolvimento de tecnologias baseadas em carboidratos (glicotecnologias) tem sido intensivamente procurado.

A abundância de lectinas de plantas e a solubilidade dessas proteínas têm ajudado a imobilizar lectinas vegetais em vários suportes, criando desta forma, a mais utilizada categoria de ferramentas para a purificação de glicoproteínas, glicopeptídeos e oligossacarídeos até o momento (VICENTE *et al.*, 2001).

Além disso, adsorventes de afinidade derivados dessas lectinas são úteis não apenas para cromatografia preparativa, mas também para outras propostas, tais como a análise e diagnóstico.

Em adição, polímeros glicosilados são usados como modelos de glicoproteínas e glicolipídeos, e como suportes de afinidade (LI *et al.*, 2001) para purificar e identificar proteínas complementares de tecidos vegetais (CARON *et al.*, 1998).

Adsorventes bioespecíficos obtidos através da imobilização de carboidratos ou lectinas são considerados modelos que podem ser usados de forma vantajosa para estudo dos mecanismos envolvidos na glicobiologia.

A conjugação de um carboidrato a um polímero e a sua subsequente apresentação é de fundamental importância. O entendimento do ligante em glicotecnologia torna-se importante, pois o número e a proximidade das estruturas carboidráticas podem significativamente modular a afinidade de ligação. O tipo de ligação pode também afetar a interação do polímero glicosilado com as proteínas que interagem com carboidratos, tanto em solução, quanto em fase sólida (LI *et al.*, 2001).

VI.4.1. Utilização da goma de cajueiro como biossensor protéico: Cromatografias de afinidade

Os resultados referentes aos ensaios cromatográficos realizados são apresentados nas FIGURAS 21 a 26.

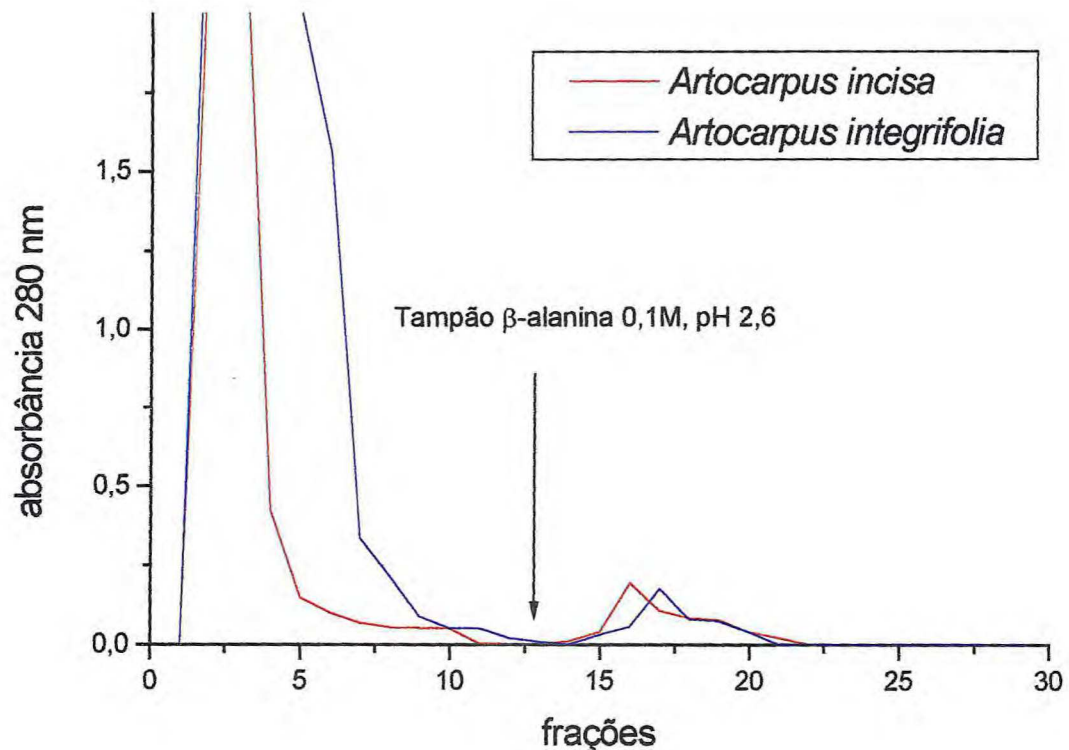


FIGURA 21. Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epícloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Artocarpus incisa* e *A.integrifolia*. Eluição dos picos não retidos (PI) com solução salina (NaCl 0,15M) e eluição dos picos retidos (PII) realizada com tampão β-alanina 0,1M, pH 2,6.

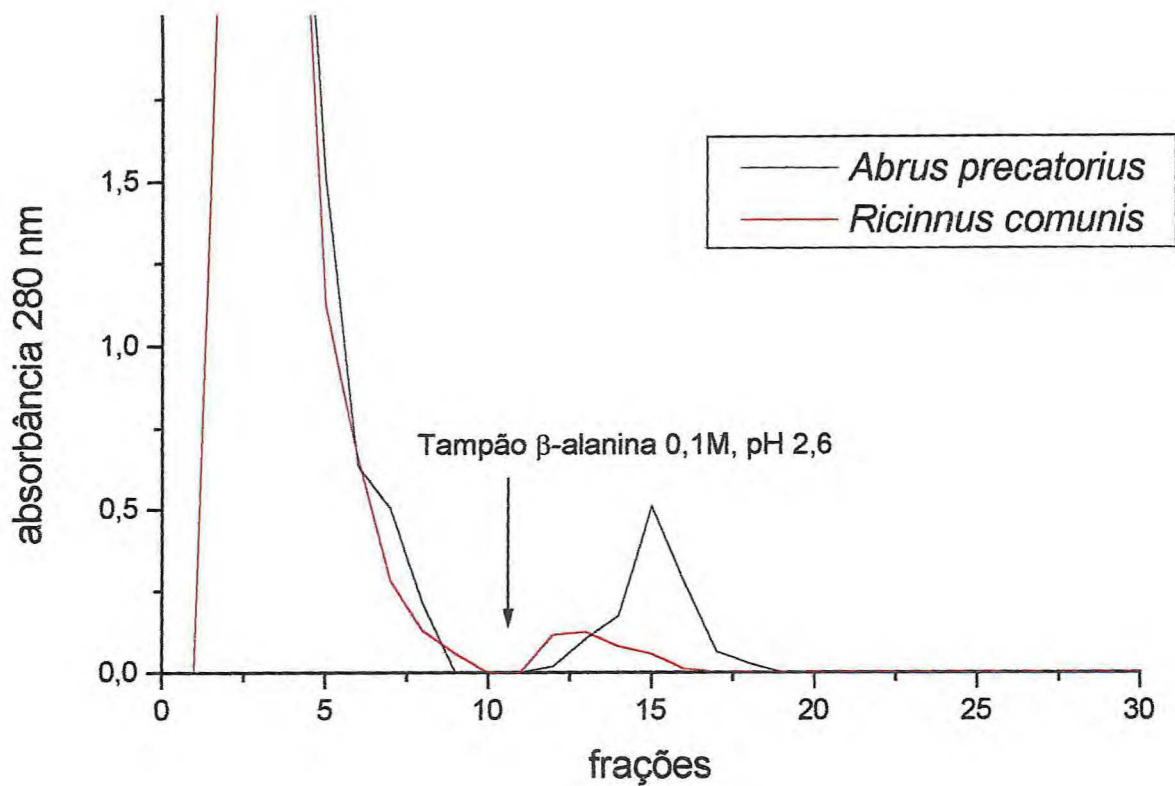


FIGURA 22. Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epicloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*. Eluição dos picos não retidos (PI) com solução salina (NaCl 0,15M) e eluição dos picos retidos (PII) realizada com tampão β-alanina 0,1M, pH 2,6.

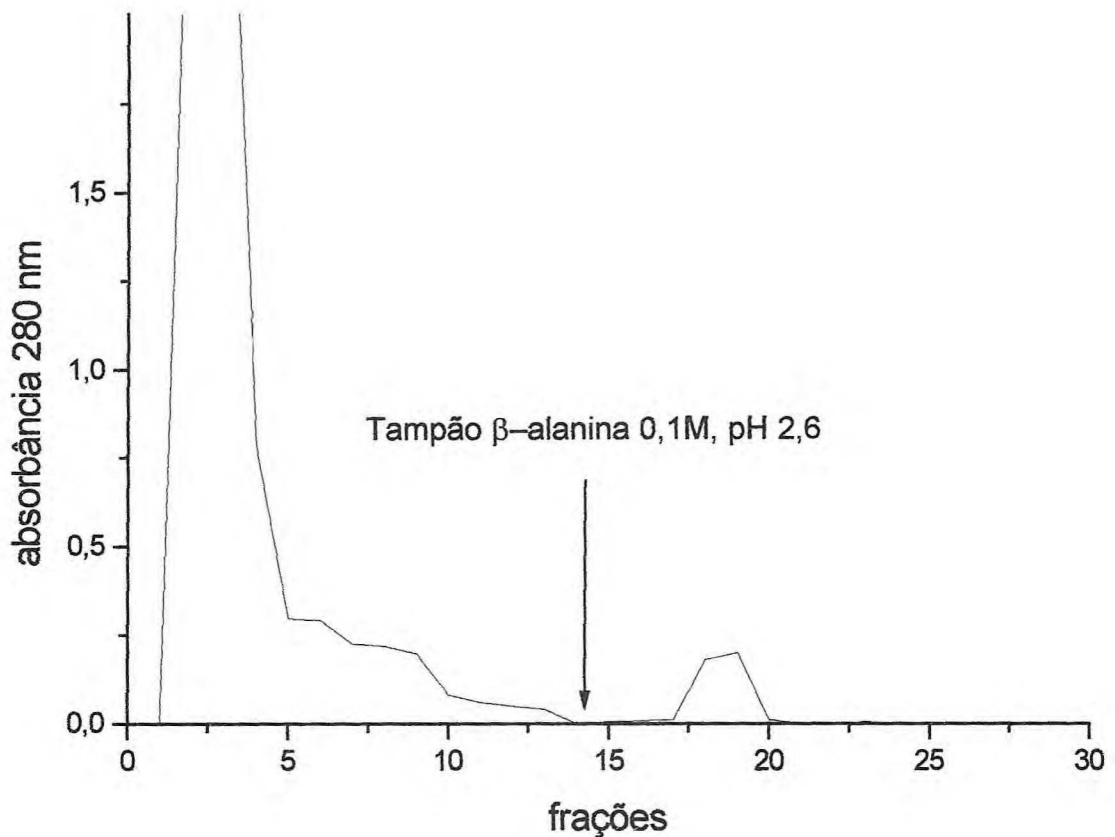


FIGURA 23. Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epícloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Luetzelburgia auriculata*. Eluição dos picos não retidos (PI) com solução salina (NaCl 0,15M) e eluição dos picos retidos (PII) realizada com tampão β -alanina 0,1M, pH 2,6.

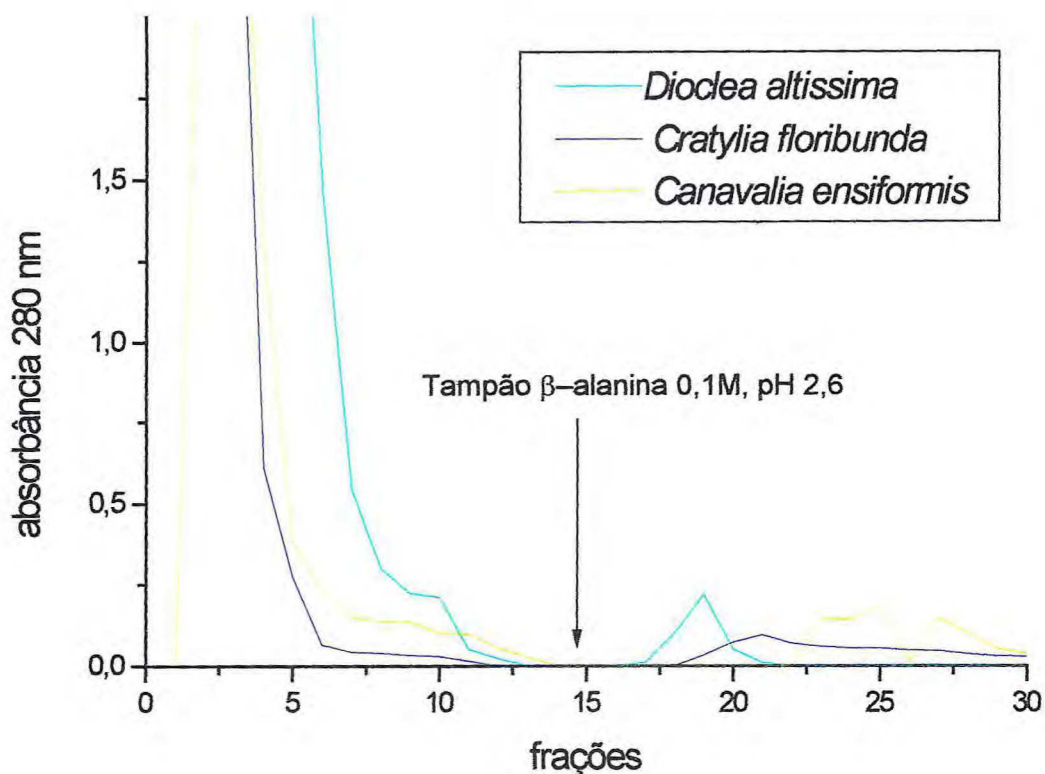


FIGURA 24. Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epícloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia ensiformis*. Eluição dos picos não retidos (PI) com solução salina (NaCl 0,15M) e eluição dos picos retidos (PII) realizada com tampão β -alanina 0,1M, pH 2,6.

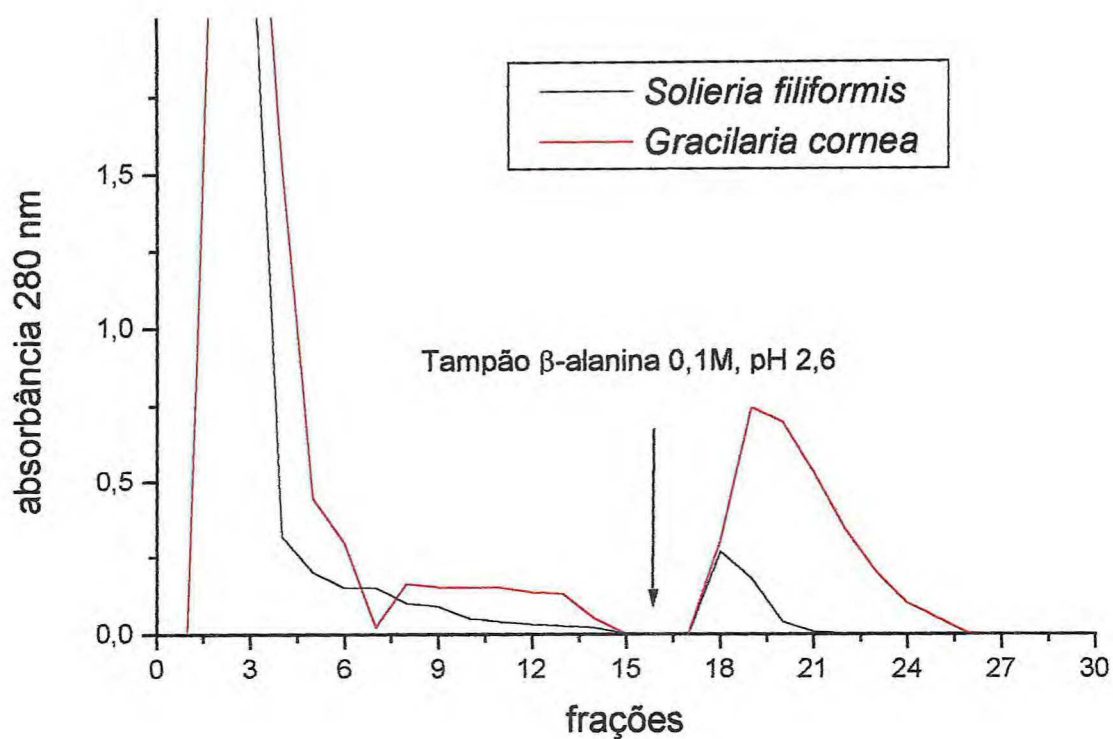


FIGURA 25. Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epiclorigidrina. Aplicação de extrato total de algas marinhas *Solieria filiformis* e *Gracilaria cornea*. Eluição dos picos não retidos (PI) com solução salina (NaCl 0,15M) e eluição dos picos retidos (PII) realizada com tampão β-alanina 0,1M, pH 2,6.

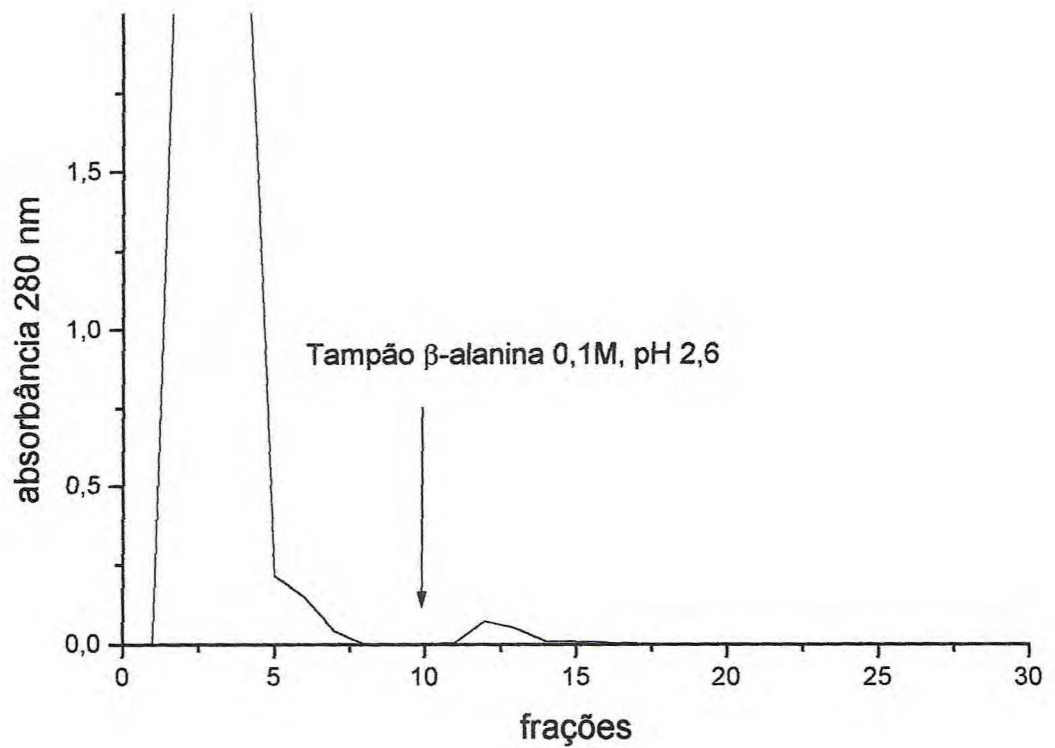


FIGURA 26. Cromatografia de afinidade em coluna de goma de cajueiro reticulada com epícloridrina. Aplicação de extrato total de sementes de *Pachira aquatica*. Eluição dos picos não retidos (PI) com solução salina (NaCl 0,15M) e eluição dos picos retidos (PII) com tampão β -alanina 0,1M, pH 2,6.

A eficiência do modelo de bioidentificação de proteínas vegetais, idealizado para a goma exsudada de cajueiro, também foi verificada através da montagem de matrizes cromatográficas e através de "sachês submersos" contendo a goma exsudada de cajueiro reticulada com epícloridrina. Os resultados dos procedimentos cromatográficos preliminares, conforme expostos pelos gráficos anteriores (FIGURAS 21 a 26), podem ser comparados através de análise da TABELA 11.

Tabela 11. Lectinas retidas na coluna de goma exsudada de *A. occidentale* reticulada

Espécie	Especificidade da Lectina	Área Total do Pico II ^b
<i>Artocarpus incisa</i>	Galactose	0,567
<i>Artocarpus integrifolia</i>	Galactose	0,455
<i>Abrus precatorius</i>	Galactose	1,165
<i>Ricinnus comunis</i>	Galactose/N-acetil-gal	0,382
<i>Pachira aquatica</i>	Galactose/N-acetil-D-gal	0,151
<i>Luetzelburgia auriculata</i>	N-acetil-D-glucosamina	0,415
<i>Canavalia ensiformis</i>	Glucose/Manose	0,881
<i>Cratylia floribunda</i>	Glucose/Manose	0,686
<i>Dioclea altissima</i>	Glucose	0,289
<i>Solieria filiformis</i> ^a	Glicoproteínas	0,491
<i>Gracilaria cornea</i> ^a	Xilose, Mucina, Fetuína	2,947

^a espécie de alga

^b expressa em D.O. total

O gel obtido via procedimento de reticulação, foi acondicionado em saquinhos de tecido inerte (*nylon*) e foi submetido a contato (24 horas) com o extrato total de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* e *Abrus precatorius*, conforme demonstrado pela área dos Picos II, indicada na TABELA 12.

A escolha destes materiais foi feita com base na capacidade da coluna de goma de cajueiro em reter as proteínas das sementes mencionadas. Além desta justificativa, a seleção dos três materiais apresentados deve-se ao fato de duas das lectinas de sementes (*Artocarpus incisa* e *A.integrifolia*) apresentarem especificidade de ligação por monômeros glicosídicos α e a lectina de *Ricinus communis* possuir especificidade por anômeros α e β .

Materiais biológicos constituem uma classe de crescente interesse, com larga aplicação em biossensores e biotecnologia. Muitas macromoléculas, por serem solúveis em água, têm os seus processos de automontagem e adsorção facilitados. Além disso, a necessidade de se obter as referidas macromoléculas no estado carregado pode ser facilmente atendida variando-se o pH de suas soluções, sem que a atividade biológica seja perdida (PATERNO *et al.*, 2001).

Tabela 12. Ensaio de identificação de lectinas galactose-ligantes, a partir de extratos totais de sementes, utilizando o procedimento de montagem de um biossensor do tipo "sachê"

Espécie	Especificidade da Lectina	Área Total do Pico II ²
<i>Artocarpus incisa</i>	Galactose	0,414
<i>Artocarpus integrifolia</i>	Galactose	0,304
<i>Abrus precatorius</i>	Galactose	0,126

- expressa em D.O. total

VI.4.2.2. Perfil Eletroforético

Todos os materiais protéicos obtidos através dos procedimentos cromatográficos foram submetidos a procedimentos de eletroforese em condições desnaturantes e podem ser avaliados nas **FIGURAS 27 a 31**.

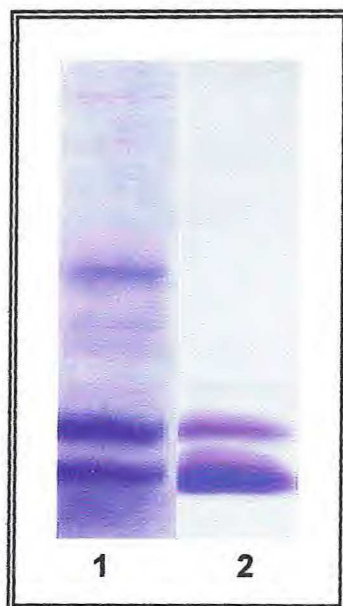


Figura 27. Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Artocarpus incisa*. Linha 1. Pico I e Linha 2. Pico II.

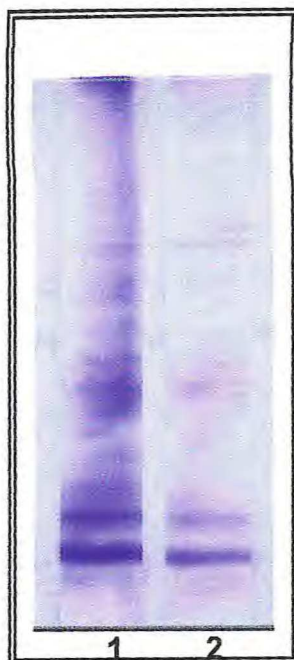


Figura 28. Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Artocarpus integrifolia*. Linha 1. Pico I e Linha 2. Pico II.

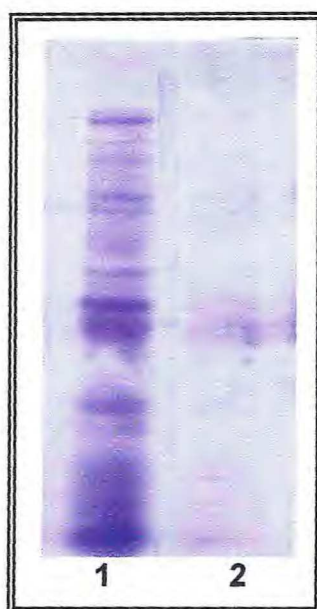


Figura 29. Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Luetzelburgia auriculata*. Linha 1. Pico I e Linha 2. Pico II.



Figura 30. Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Canavalia ensiformis*. Linha 1. Pico I de *C.ensiformis*.

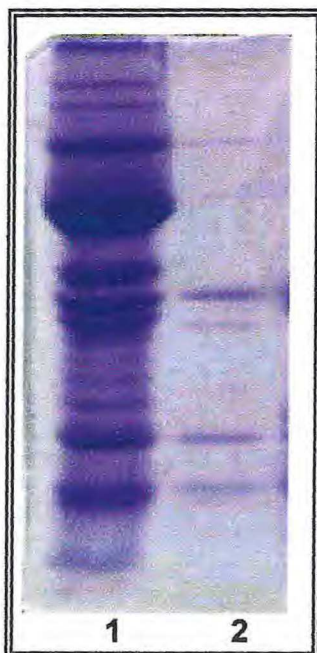


Figura 31. Eletroforese em condições desnaturantes (presença de SDS e β -mercaptoetanol) das frações cromatográficas de *Dioclea altissima*. Linha 1. Pico I e Linha 2. Pico II.

A capacidade da coluna cromatográfica confeccionada com a goma exsudada de cajueiro mostrou-se capaz de reter, com maior intensidade, lectinas vegetais galactose e N-acetil-galactosamina ligantes.

No entanto, a sua habilidade em ligar-se, também a lectinas do tipo glucose-ligantes torna-se possível visto que, além da presença de resíduos de galactose nas ramificações deste heteropolissacarídeo ácido de massa molecular próxima a 110 kDa (MENESTRINA *et al.*, 1998), podem ser observados resíduos de glucose e de ácido D-glucurônico. Dados na literatura ainda comprovam a existência de resíduos de manose (1%), rhamnose (4%) e arabinose (5%) presos às ramificações através de ligações do tipo 1,2 (SARUBBO *et al.*, 2000).

Esta observação justificaria a habilidade da goma de cajueiro reter lectinas de sementes de *Luetzelburgia auriculata*, de *Pachira aquatica*, *Canavalia ensiformis*, de *Cratylia floribunda* e de *Dioclea altissima*. As proteínas obtidas através dos ensaios cromatográficos de afinidade podem ter sua confirmação avaliada através dos géis eletroforéticos em condições desnaturantes (FIGURAS 27 a 31). A diferença de intensidade das bandas eletroforéticas é sugerida ter como causa o baixo teor protéico da amostra de partida, fato freqüentemente observado para extratos protéicos de algas (*Solieria filiformis* e *Gracilaria cornea*).

Embora a amostra de extrato total de sementes de *Abrus precatorius* tenha apresentado uma alta área referente ao Pico II (TABELA 11), quando comparada às duas outras amostras possuidoras de lectinas galactose-ligantes (*Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia*), este fato pode ser justificado da presença, além da lectina de *A.precatorius* no Pico II, estar presente a proteína tóxica *abrina*, uma RIP (proteína inativadora de ribossomos).

A sugerida presença da RIP de *Abrus precatorius* no pico retido pela coluna de goma exsudada de cajueiro, apesar de contribuir para a leitura de absorbância protéica, não possui atividade hemaglutinante.

O mesmo comportamento pode ser sugerido para a amostra de *Ricinus communis*, possuidora também da proteína tóxica *ricina*, que, embora apresente leitura a 280 nm, não possui atividade lectínica. Sugere-se, que, para a

confirmação da presença exclusiva de lectina nos picos retidos a partir dos extratos de *Abrus precatorius* e *Ricinus communis* viria com a realização de ensaios de toxicidade animal, usando os referidos picos.

Pela análise dos resultados obtidos nos experimentos de cromatografia de afinidade, pode-se observar que a goma exsudada de cajueiro reticulada com epicloridrina, apesar de apresentar uma maior intensidade na retenção de lectinas ligantes de galactose/galactosamina, mostrou-se também eficiente no reconhecimento (retenção) de lectinas ligantes de glucose/manose, conforme pode ser comprovado pela análise do fragmento estrutural (**FIGURA 32**).

Sachês preparados com as gomas de cajueiro, quando imersos em soluções diluídas de proteínas (contendo lectinas) de sementes de *Artocarpus incisa*, *Artocarpus integrifolia* e *Abrus precatorius*, mostraram uma eficiência compatível com o observado nas colunas de cromatografia de afinidade.

Esta observação sugere a possibilidade do uso de sachês para detecção de lectinas, mesmo em soluções pouco concentradas.

Sugere-se o uso de uma estratégia combinada entre um sistema de cromatografia de afinidade em coluna e um sistema de sachê submerso, com goma exsudada de cajueiro, para a identificação e isolamento de lectinas vegetais.

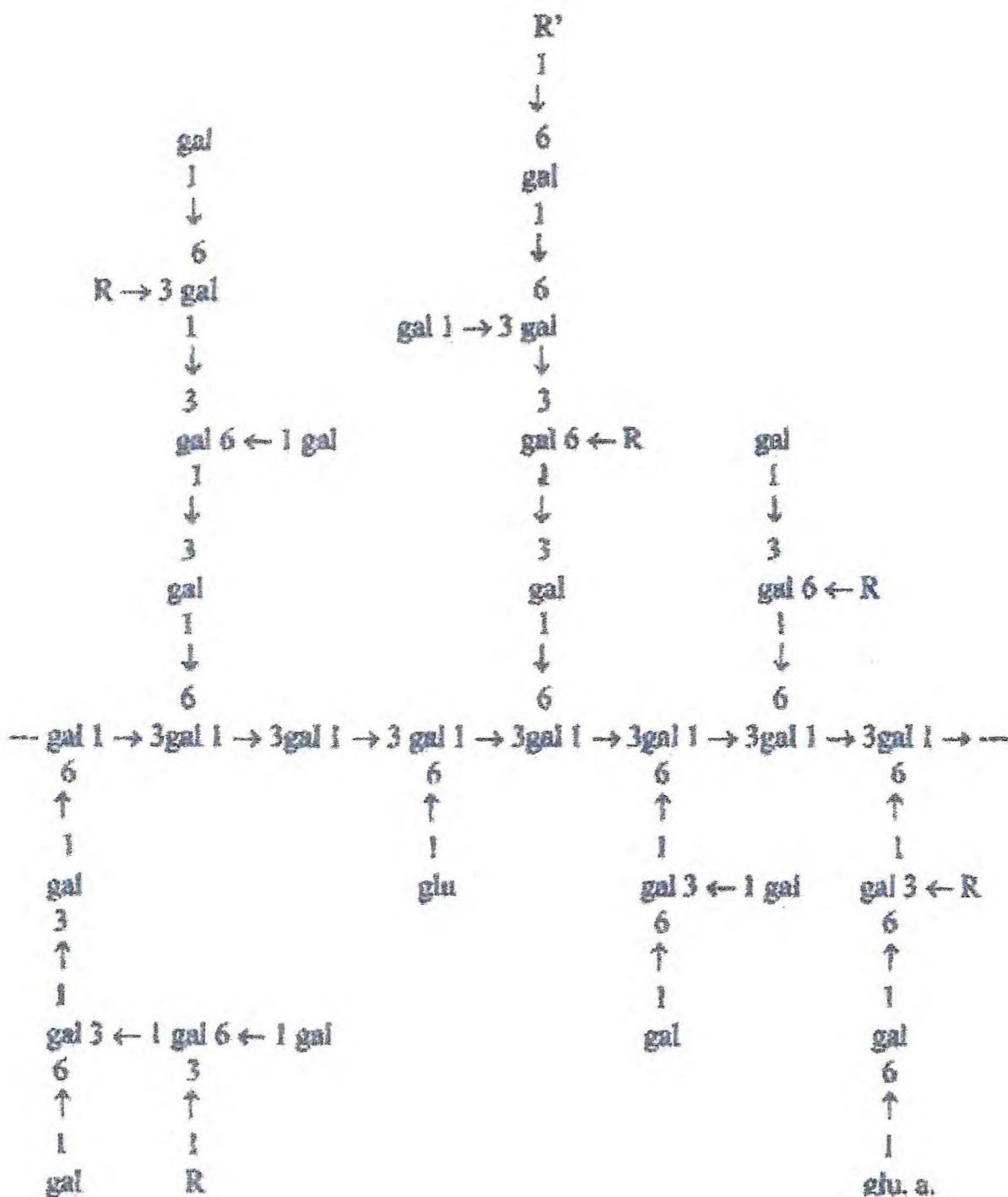


Figura 32. Fragmento estrutural da goma de cajueiro. Gal=galactose, R=cadeias de D-manose, L-rhamnose, L-arabinose ou arabinose ligadas 1,2. R'= D-glucose (glu) ou ácido D-glucurônico (glu a) (SARUBBO *et al.*, 2000).

Resumo dos Resultados

VII. Resumo dos Resultados

1. Os ductos responsáveis pela exsudação observada em troncos de árvores de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), planta comum ao longo da costa brasileira, típica de ambiente árido e semi-árido, apresentam uma origem esquizógena (esquizogenética), sendo formados a partir de especializações de células epiteliais durante processos de defesa orgânica ou frente à pressão ambiental;
2. A exsudação protetiva observada para a árvore de cajueiro, ao contrário do que fôra anteriormente sugerido para todas as espécies de anacardiáceas não é do tipo resina, mas sim se apresenta como uma exsudação *gomosa*, frente às suas características químicas e seu comportamento em solução aquosa;
3. Com relação à composição química mínima, a goma de cajueiro mostrou-se rica em açúcares, fato que está de acordo com as características dos produtos de exsudação vegetal. Também não foram observados carboidratos solúveis não redutores, em conformidade com o relatado pela literatura para outras espécies de anacardiáceas;
4. A metodologia para insolubilização (reticulação) da goma de cajueiro utilizando-se como agente químico *epicloridrina* 12,5 N em meio alcalino, mostrou-se ser mais eficiente que o procedimento de reticulação que sugere o uso de glutaraldeído. O gel/microbiofilme construído a partir da formação de ligações cruzadas com a epicloridrina apresentou-se resistente à quebra, insolúvel e não-quebradiço, ao contrário do observado para o tratamento com glutaraldeído;
5. Com relação ao comportamento reológico da goma de cajueiro, a análise da viscosidade revela um comportamento de fluido não-newtoniano, com a

sugestão aos valores de viscosidade intrínseca sendo influenciados pelo alto teor de ferro - e em menor intensidade, pelos teores de cálcio e magnésio - mostrando dependência direta da concentração da solução;

6. Quando soluções de goma de cajueiro foram dialisadas contra solução salina, a queda nos valores da viscosidade é apontada como tendo sido causada pela presença de íons Na^+ no meio, o que força o aparecimento de sais de sódio nas ramificações do polissacarídeo complexo (sais de ácido urônico), e desta forma induzindo diminuição dos valores da viscosidade;
7. Assim como a sugerida aplicação de calor, a submissão da solução de goma de cajueiro em meio aquoso ácido ou alcalino tende a induzir diminuição nos valores de viscosidade intrínseca da goma. Isso foi comprovado pela solubilização da goma em soluções de ácidos acético, sulfúrico e clorídrico. O primeiro desses não se mostrou eficiente na solubilização da goma; já a presença de ácido clorídrico, além de aumentar o grau de solubilidade de goma, foi responsável pela diminuição significativa de sua viscosidade, apresentando-se como um bom meio para dissolução da goma de cajueiro para estudos futuros;
8. A análise preliminar da condutividade elétrica aponta a goma exsudada de cajueiro como sendo um bom condutor elétrico, o que a torna ferramenta interessante para a confecção futura de um biossensor, ou mesmo servir como filme de superfície para a adesão de proteínas;
9. A análise do espectro de infravermelho da goma, em pastilha de KBr não apresentou diferença significativa entre as amostras precipitadas com etanol e as que foram liofilizadas, indicando que não houve formação de nenhum grupamento químico durante o processo de purificação do carboidrato com etanol.

10. O espectro da goma reticulada mostrou-se um pouco distinto daquele observado à goma sem tratamento químico, em função da presença de novos picos relativos à formação das ligações glicerol-éteri, oriundas da formação de ligações cruzadas induzidas pela epícloridrina.
11. A comparação entre o espectro de infravermelho da goma de cajueiro com a de outras gomas exsudadas vegetais - goma caraia e goma tragacante - revelou uma alta semelhança, mesmo depois de haverem sido submetidas a tratamento de reticulação, indicando a existência de semelhança estrutural entre os polissacarídeos vegetais. Essa constatação, no entanto, não pode ser estendida aos espectros referentes à goma endospermica de Carolina (*Adenantha pavonina*), por essa última possuir um perfil no infravermelho bastante distinto das demais gomas exsudadas e inclusive, da goma de cajueiro;
12. A goma exsudada do tronco mostrou-se eficiente na identificação e isolamento de lectinas vegetais, a despeito da especificidade por açúcares apresentada por essas;
13. A goma exsudada de cajueiro mostrou-se capaz de reconhecer apenas proteínas que possuíssem atividade ligante de carboidratos, fato interessante para futuros experimentos de isolamento de lectinas de tecidos vegetais. A confirmação da presença de lectinas retidas na coluna de afinidade, realizada através de procedimentos de ensaios de hemaglutinação contra hemáceas de coelho e através de eletroforese desnaturante, vêm a reforçar essa hipótese;
14. A possível utilização da goma exsudada de cajueiro como biossensor protéico (gel cromatográfico ou matriz de biofilme) é sugerida frente a sua alta reprodutibilidade, característica primordial na escolha de um biopolímero para estudos biotecnológicos ou de aplicação.

Conclusão

VIII. Conclusão

A praticidade obtida com a combinação dos sistemas de identificação de lectinas de tecidos vegetais (sachê submerso e matriz cromatográfica), utilizando a goma exsudada de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) revelou-se como um método eficiente e simples para identificação de lectinas galactose/galactosamina ligantes, porém, com menor intensidade, reconhece lectinas glucose/glucosamina ligantes, fato interessante para futuros experimentos de isolamento de lectinas de tecidos vegetais.

Perspectivas

IX. Perspectivas

A matriz de bioafinidade confeccionada com a resina exsudada de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), a despeito do seu relativo baixo poder de seleção entre lectinas de distintos grupos, mostra-se como uma ferramenta potencial de grande eficiência na identificação e isolamento de lectinas em larga escala.

Devido ao seu baixo custo de obtenção, montagem e reprodução, colunas cromatográficas construídas com o gel reticulado de exsudado de cajueiro são estratégias interessantes no emergente campo de estudo dos biomateriais. A facilidade de aquisição do exsudato vegetal é outra vantagem acessória ao referido estudo (LIMA *et al.*, 2002_b).

Métodos de obtenção de filmes ultrafinos são hoje um ponto de partida na tentativa de se viabilizar a aplicação tecnológica de materiais orgânicos no setor eletro-eletrônico. A necessidade de construir arquiteturas moleculares com controle estrutural pode ser satisfeita através da técnica de automontagem, que permite a fabricação de filmes ultrafinos a partir de diferentes tipos de materiais, de maneira rápida e barata, com um elevado controle da espessura dos filmes depositados. Este método é baseado em interações iônicas entre moléculas de carga oposta, como também por interações do tipo ligações de hidrogênio, o que abre a possibilidade de se utilizar uma vasta gama de materiais.

Sugere-se a partir desse trabalho, uma futura investigação aprofundada do comportamento químico e reológico da goma exsudada de cajueiro, assim como os mecanismos envolvidos durante os processos pré e pós-exsudativos dos tecidos vegetais. Como constatado por esse trabalho, a exsudação da goma não é restrita apenas a tecidos de caule, mas observada em outros tecidos vegetais, tais como os meristema e pecíolos.

Vem-se, desta forma, indicar um novo caminho a ser percorrido e explorado na bioquímica vegetal, que deve aliar-se a estudos histológicos de caracterização, químicos (caracterização dos oligo e monossacarídeos constituintes), físico-químicos e biológicos, a fim de que se possa entender o comportamento de

associação do polissacarídeo exsudado de cajueiro com outras biomoléculas, assim como o seu real papel no metabolismo secundário da planta. A imobilização de lectinas na matriz de afinidade de goma de cajueiro reticulada (gel) pode ser uma excelente estratégia para a tentativa de isolamento e caracterização de açúcares, em um mecanismo inverso à cromatografia de afinidade para o isolamento lectínico. A utilização da goma polissacarídica como biossensor protéico, já confirmada, pode vir a ser expandida e melhorada, uma vez que podem ser testados outros procedimentos de reticulação e/ou imobilização protéica ou enzimática em sua estrutura.

Referências Bibliográficas

X. Referências Bibliográficas

- AGRAWAL, B.B. & GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of Concanavalina A to cross linked dextran gels. **Biochem. J.**, **96**, 23-25, 1965.
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**; **72**: 286-287, 2001.
- AM-ENDE, M.T. & PEPPAS, N.A Transport of ionizable drugs and proteins in cross-linked polyacrylic acid and polyacrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate hidrogels II: Diffusion and release studies. **J. Control. Release**, **48**: 47-56, 1997.
- ANDERSON, D.M.W. & BELL, P.C. The composition of the gum exudates from some *Combretum* species: the botanical nomenclature and systematics of the *Combretaceae*. **Carbohydr. Res.**; **57**: 215-221, 1977.
- ANDERSON, D.M.W. & CREE, G.M. The structures of gum from *Acacia nubica* B. **Carbohydr. Res.**; **6**: 385-403, 1968.
- ANDREW, I.G. & LITTLE, J.W.L. A xyloglucan in etiolated seedlings of *Pinus radiata*. **Phytochemistry**; **46**: 203-207, 1997.
- ANTONYUK, L.Y & ANTONYUK, Y.O Interaction of immobilized lectin from *Leucojum vernum* L. with polysaccharides and glycoproteins. **Ukr. Biokhim. Zh.**; **65**: 69-76, 1993.
- APPUKUTAN, P.S., SUROLIA, A. & BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose binding protein from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian J. Biochem. Biophys.** **14**: 382 - 384, 1977.
- ARICA, M.Y.; AKIN-OKTEM, G. & DENIZLI, A. Novel hydrophobic ligand-containing hydrogel membrane matrix: preparation and application to γ -globulins adsorption.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces; 231: 273-283, 2001.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, Official Methods of Analysis, 12nd ed., Washington, DC, 1094p., 1970.

ARIFKHODZHAEV, A O Glucans of higher plants. **Chem Nat. Compounds**; 33: 1-9, 1997.

ARVANITTOYANNIS, I.; PSOMIADOU, E. & NAKAYAMA, A. Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars ou glicerol, Part 1. **Carbohydr. Polym.**; 31: 179-192, 1996.

ASPINALL, G.O., **Isolation and fractionation of polysaccharides**, In: The Polysaccharides. Vol. 1, Academic Pres., New York, p. 19-26, 1982.

AXÉN, R.; PORATH, J. & ERBACK, S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. **Nature**; 214: 1302-1304, 1967.

BACHHAWAT-SIKDER, K.; THOMAS, C.J. & SUROLIA, A. Thermodynamic analysis of the binding of galactose and poly-N-acetyllactosamine derivatives to human galectin-3. **FEBS Letters**; 500: 75-79, 2001.

BAETHGEN, W.E. & ALLEY, M.M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Commun. Soil Sci. Plant. Anal.**; 20 (9/10): 961-969, 1989.

BANDEIRA, C.T. **Métodos de extração da goma de cajueiro**. Boletim Comunicativo, EMBRAPA – CNPCa, 2p., 1991.

BARR, E. S. **The infrared Pioneers-I. Sir William Herschel. Infrared Physics**. Vol. 1, pp. 1-4, 1961.

- BARROS, L.M. *Melhoramento*. in: LIMA, V.P.M.S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil/ETENE. p.321-356 (BNB/ETENE. Estudos Econômicos e Sociais, 35), 1988.
- BARROS, L.M.; ARAÚJO, F.E.; ALMEIDA, J.I.L.; TEIXEIRA, L.M.S. **A cultura do Cajueiro Anão**. Fortaleza: EPACE. 67p. (EPACE. Documentos, 3), 1984.
- BARROS, L.M.; PIMENTEL, C.R.M.; CORRÊA, M.P.F.; MESQUITA, A.L.M. **Recomendações Técnicas Para a Cultura do Cajueiro Anão Precoce**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 65p. (EMBRAPA-CNPAT. Circular Técnica, 1), 1993.
- BECKER, A; KATZEN, F; PUHLER, A & IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application; a bioreclical/genetic perspective. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**; **50**: 145-152,1998.
- BEYER, R.; MELTON, L.D. & KENNEDY, L.D. Viscosity studies on the polysaccharide gum from *Rhizobium* strain CB 744. **J. Sci. Food. Agric.**, **39 (2)**: 151-161, 1987.
- BIANCHI, E; MARASNO, E & TASHINO, A Termoreversible gels of chitin. **Carbohydr. Polym.**; **32**: 23-26, 1997.
- BLUNT, H.G., **Gum Arabic**, Oxford University Press, 1926, Enciclopaedia Chemical Technology, 12, 4, John Wiley & Sons, 1980.
- BOBBIO, P.R. & BOBBIO, F.O., **Química do Processamento de Alimentos**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 203pp., 1984.
- BOVIN, N.V., Polyacrylamide-base glycoconjugates as tools in glycobiology. **Glycoconjugate J.**; **15**: 431-446, 1998.
- BRAGA, M.R. & DIETRICH, S.M.C. Cell wall components as taxonomic markers in higher plants. **An. Acad. Bras. Ciências**; **71**: 175-179, 1999.

- BRAGA, R.C.; **Goma endospermica de *Caesalpinia pulcherrima* Sw. – utilização como matriz de afinidade no isolamento de lectinas galactose-ligantes.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 89 p., 2001.
- BUCKERIDGE, M.S., PANEGASSI, V.R., ROCHA, D.C. & DIETRICH, S.M.C., Seed galactomannan in the classification and evolution of *Leguminosae*. **Phytochemistry**; **38(4)**: 871-875, 1995.
- CARON, M.; SÈVE, A-P.; BLADIER, D.; JOUBERT-CARON, R. Glycoaffinity chromatography and biological recognition. **J. Chromat. B**; **715**: 153-161, 1998.
- CARVEY, J. Three-dimensional structures of carbohydrates and how they interact with proteins. **Carbohydr. Res.**; **300**: 1-2, 1997.
- CASTRO-DIEZ, P.; VILLAR-SALVADOR, P.; PEREZ-RONTOME, C.; MAESTRO-MARTINEZ, M. & MONTSERRAT-MARTÍ, G. Leaf morphology leaf chemical composition and stem xylem characteristics in two *Pistacia* (*Anacardiaceae*) species along a climatic gradient. **Flora**; **193**: 195-202, 1998.
- CEBRIAN, J. & DUARTE, C.M., Detrital stocks and dynamics of the seagrass *Posidonia oceanica* (L.) Delile in the Spanish mediterranean. **Aquat. Bot.**; **70**: 295-309, 2001.
- CHAITALI, P.D.; BAHADUR, A & SHAH, B.A Immobilization of pepsin on alginic acid base support. **Cellulose Chem. Technol.**; **31**: 315-320, 1997.
- CHARLWOOD, J.; BIREL, H. & CAMILLERI, P. Efficient carbohydrate release, purification and derivatization. **Anal. Biochem.**; **262**: 197-200, 1998.
- CHEN, R.H.; TSAIH, M.L. & LIN, W.C. Effects of chain flexibility of chitosan molecules on the preparation physical and release characteristics of the prepared capsule. **Carbohydr. Polym.**, **31**: 141-148, 1996.
- CHENG, GX, LIU, J.; ZHAO, R.Z.; YAO, K.D.; SUN, P.C.; MEN, A J.; WANG, W.H. & WIS,

L. Studies on dynamic behavior of water cross-linked chitosan hydrogel. **J. Appl. Polym. Sci;** **67:** 983-988, 1998.

CHURMS, S. C., STEPHEN, A. M. & STEYN, C. B. **Phytochemistry**, **25:** 2807, 1986.

COLLINGS, A.F. & CARUSO, F. Biosensors: recent advances. **Rep. Prog. Phys.;** **60:** 1397-1445, 1997.

CORDOMOY, H.J. **Les plantes à gommés. et à résines.** Encyclopédie Scientifique, Paris, 1911.

COUSO. R.O; IELPI, L. & DANKERT, M.A A xanthan gum like polysaccharide from *Acetobacter xylinum*. **J. Gen. Microbiol.**, **133:** 2123-2135, 1987.

DALLA-RIVA-TOMA, J. & KARL, C.L. Composition barrier film method for preventing contact dermatitis, **PCI Int. Appl.;** **38,** 1997.

DANGUY, A., DECAESTECKER, C., GENTEN, F., SALMON, I. KISS, R., Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta. Anat.** **161:** 206-218, 1998.

DAVE,B.C.; DUNN,B.; VALENTINE; J. S.; ZINK, J. I., Sol-Gel Encapsulation Methods for Biosensors, **Analytical Chemistry;** **66(22),** 1994.

DE PAULA, R. C. M., **Characterisation of Brazilian Tree Exudate Gums from *Anacardium occidentale* and *Anadenanthera macrocarpa* B.** Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Química da Universidade de Manchester, 169 pp., 1995.

DE PAULA, R.C.M.; BUDD, P.M. & RODRIGUES, J.F. Characterization of *Adenathera macrocarpa* exudate polysaccharide. **Polym. Int.;** **44:** 55-60, 1997.

DE PAULA, R.C.M.; HEALTHY, F.; BUDD, P.M. Characterization of *Anacardium*

occidentale exudate polysaccharide. **Polym, Int.**; **45**: 27-35, 1998.

DE PINTO, G.; MARTINEZ, M.; MENDOZA, J. A.; OCANDO, E. & RIVAS, C. Comparison of three *Anacardiaceae* gum exudates. **Biochem. Syst. Ecol.**, **23**: 151-156, 1995.

DEY, P.M., Biochemistry of Plant Galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, **35**: 341-376, 1978.

DIAZ, C.L., MELCHERS, L.S., HOOYKAAS, P.J.J., LUGTENBERG, B.J.J. & KIJNE, J.W., Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* legume symbiosis. **Nature**, **338**: 579-581, 1989.

DIETRICH, S.M.C.; BUCKERIDGE, M.S.; TINE, M.A; YOUNG, M.C.M.; BOLZANI, V.S.; BRAGA, M.R. & MARQUES, M.R. Plant cell wall research related to evolution and chemical defenses. **An Acad. Bras. Ciências**; **70**: 727-731, 1998.

DIXON, R. A & HARRISON, MÀ. Early events in the activation of plant defense responses. **Ann. Rev. Phytopathol.**; **32**: 479-501, 1994.

DUBOIS, M.; GILES, K.A; HAMILTON, JK; REBERS, P.A & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**; **28**: 350-356, 1956.

ELFSTRAND, M. **Über Giftig Eiweisse Welche Blutkörtchen. Verkleben.** Thesis, Uppsalas, 1898.

EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAJU (CNPc). **Relatório Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Caju**, 88 pp., Fortaleza, Ceará, 1990.

FERNANDES, P.S.; OSÓRIO, R.G.S.; BRITO, J.O. & STAPE, J.L., **Efeito exaustivo de estimulantes químicos na resinagem intensiva de *Pinus elliottii* Eng. var. *elliottii*.** Boletim Técnico Instituto de Fisiologia; 42139-148, 1988.

FLODIN, P., **Dextran gels and their applications in gel filtration.** Dissertation, 85 pp.,

AB Pharmacia, Upssala, Sweden, 1962.

FUGITA, Y, OISHI, K., SUZUKI & IMAHORY, K., Purification and properties of Anti-B hemagglutinin produced by *Streptomyces* sp. **Biochemistry**, **14**: 4465-4470, 1975.

GARCIA, O F.; MOLINA, A; ALAMILLO, J.M. & RODRIGUES-VALENZUELA, P. plant defense peptides. **Biopolymers**; **47**: 479-491, 1998.

GARROS-ROSA, I.; **Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L.: caracterização estrutural e aplicações no isolamento de lectinas ligantes de galactose**. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 114p., 2000.

GEYER, H. & GEYER, R. Strategies for glycoconjugate analysis. **Acta Anat.**; **161**: 18-35, 1998.

GHOSAL, P.K. & THAKUR, S. Structure features of the acidic polysaccharide of *Spondias pinnata* gum exudate. **Carbohydr. Res.**; **98**: 75-83, 1981.

GLAVCHEV, I.; SIRASHKI, G. & MATEVA, R. Characterization of polyepichlorohydrin and copolymers of epichlorohydrin-glycidyl ethers by IR spectroscopy. **Polymer Testing**, **19**: 415-417, 2000.

GLIKO-KABIR, I.; PENHASI, A. & RUBINSTEIN, A. Characterization of crosslinked guar by thermal analysis. **Carb. Res.**; **316**: 6-13, 1999.

GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. **Isolation, physicochemical, characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins**. In: LIENER, I.E. SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. eds. **The lectins: Properties, Functions, and Application in Biology and Medicine**. Academic Press, Inc. 600 p, 1986.

GRANGEIRO, T.B. **Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br) de sementes de *Canavalia brasiliensis***. Tese de Doutorado, apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará,

120pp. Fortaleza Ceará, 1996.

GREUB, L.J. & WEDIN, W.F. Determination of total available carbohydrates in forage legume roots by extraction with takadiastase, amyloglucosidase or sulfuric acid. **Crop Sci.**; **9**: 595-598, 1969.

GUILBERT, S.; CUQ, B. & GONTARD, N. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. **Food Addit. Contaminants**; **14**: 741-751, 1997.

HARRIS, L.E. **Os métodos químicos e biológicos empregados na análise de alimentos**. Universidade da Flórida, Gainesville, USA, 1970.

HARRISON, M. & HILLS, B.P. A mathematical model to describe flavors release from gelatine gels. **Internat. J. Food Sci. Technol.**; **31**: 167-176, 1996.

HEDO, J.A., HARRINSON, L. C. & ROTH JR. Binding of insulin receptores to lectins: evidence for common carbohydrate determinants on several membrane receptors. **Biochemistry**, **20**: 3385- 93, 1981.

HEGNAUER, R. Phytochemistry and plant taxonomy – an essay on the chemotaxonomy of higher plants. **Phytochemistry**; **25**: 1519-1535, 1986.

HELM, R.M. & FROESE, A. Binding of the receptores for IgE by various lectins. **Internat. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, **65**: 81-84, 1981.

HUGGINS, M. Theory of solutions of high polymers. **J. Am. Chem. Soc.**; **64**: 1712, 1942.

HYPOLITE, CL.; McLERNON, TL.; ADAMS, D.N.; CHAPMAN, K.E; HUBERT, C.B.; HUANG, C.C.; DISTEFANO, M.D. & HU, W.S. Formation of microscale gradients of protein using heterobifunctional photolinkers. **Bioconjugate Chem.**; **8**: 658-663, 1997.

ILLARINOVA, EK.; KALININA, TK; CHERFAROVSKAYAN, T.I; KHOKHLOVA, V.A., Fibrous film and porous materials made from chitosan, **Khim. Voiokna**; **6**: 18-22, 1995.

INBAR, J. & CHET, I. Lectins and biocontrol. **Critical Rev. Biotech.**; **17**: 1-20, 1997.

IQBAL, S.S.; MAYO, M.W.; BRUNO, J.G.; BRONK, B.V.; BATT, C.A. & CHAMBERS, J.P.,
A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat
agents. **Biosensors & Bioelectronics**; **15**: 549-578, 2000.

ISOBE, Y.; TOYAMA, Y.; MINAMORI, M.; YOKOIGAWA, K.; ENDO, K.; KAWAI, F. &
KAWAI, K. Comparision of physicochemical properties of a novel polysaccharide
produced by *Bacillus circulans* with a commercial polysaccharide. **J. Japanese Soc.
Food Sci. Technol.**; **43**: 634-641, 1996.

JAGUR-CRODZINSKI, J. Biomedical application of functional polymers. **Reative
Functional Polym.**; **39**: 99-138, 1999.

JORDAN, J.D.; DUNBAR, R.A & BRIGHT, F.V. Aerosol-generated sol-gel-derived thin
films as biosensing platforms. **Anal. Chim. Acta**; **332**: 83-91, 1996.

KALTER, H. & STIERSTORFER, B. Animal lectins as cell adhesion molecules, **Acta
Anat.**; **161**: 162-179, 1998.

KATO, A & MATSUDOMI, N. Gels in the polysaccharide-protein mixture system. **Nippon
Shokukin Kagaho Kogahu Kaishi**; **45**: 171-175, 1998.

KIM, S.H.; WON, C.Y. CHU, C.C. Synthesis and characterization of dextran-based
hydrogel prepared by photocrosslinking. **Carb. Polym.**; **40**: 183-190, 1999.

LAWTON, J.W. Effect of starch type on the properties of starch containing films.
Carbohydr. Polym.; **29**: 203-208, 1996.

LEITE, L.A. de S.A., **A agroindústria do caju no Brasil: políticas públicas e
transformações econômicas**. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 195 p., 1994.

LEÓN DE PINTO, G. Carbon 13-NMR-spectral study of *Acacia xanthophloeae* gum and its
degradation products. **Carbohydr. Res.**; **220**: 229-242, 1991.

- LEÓN DE PINTO, G.; ALVAREZ, S.; MARTINEZ, M.; ROJAS, A & LEAL, E. Structural studies of *Melicocca bijuga* gum exudate. **Carbohydr. Res.**; **239**: 257-265, 1993_a.
- LEÓN DE PINTO, G.; NAVA, M.; MARTINEZ, M. & RIVAS, C. Gum polysaccharide of 9 specimens of *Laguncularia racemosa*. **Biochem. Syst. Ecol.**; **21**: 463-466, 1993_b.
- LEÓN DE PINTO, G.; MARTINEZ, M.; LUDOVIC DE CORREDOR, A; RIVAS, C. & OCANDO, E Chemical and ¹³C-MR studies of *Enterolobium cyclocarpum* gum and its degradation products. **Phytochemistry**; **37**: 1311-1315, 1994.
- LEÓN DE PINTO, G.; MARTINEZ, M.; GUTIÉRREZ DE GOTERA, O; VERA, A; RIVAS, C. & OCANDO, E. Composition of 2 *Pithecellobium* gum exudates. **Biochem. Syst. Ecol.**; **23**: 849-853, 1995.
- LEÓN DE PINTO, G.; PAZ DE MONCADA, N.; MARTINEZ, M.; GUTIÉRREZ DE GOTERA, O; RIVAS, C. & OCANDO, E. Composition of *Pereskia guamacho* gum exudates. **Biochem. Syst. Ecol.**; **2**: 291-295, 1995.
- LEÓN DE PINTO, G.; MARTINEZ, M.; MENDONZA, JA AVILA, 13; OCANDO, E. & RIVAS, C. Structural study of the polysaccharide isolated from *Spondias purpurea* gum exudate. **Carbohydr. Res.**; **290**: 97-103, 1996.
- LI, Y.; PFULLER, U.; LARSSON, E.L.; JUNGVID, H.; YU, I. & MATTIASSON, B., Separation of mistletoe lectins based on the degree of glycosylation using boronate affinity chromatography. **J. Chromat. A**; **925**: 115-121, 2001.
- LIENER, I. E., SHAROH, N. & GOLDSTEIN, I.J. **The Lectins. Properties, Functions and Applications**. In: **Biology and Medicine**, 600, pp., Academic Press. Inc. New York, 1986.
- LIMA, A C., **Efeito de estimulantes químicos (ácido sulfúrico e ácido 2-cloroetilfosfônico) e técnicas operacionais na extração da goma de cajueiro – *Anacardium occidentale* L.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, 88pp., 1992.

- LIMA, R.S.N.; SALIS, C.R.; HORTA, A.C.G. & MOREIRA, R.A. A **universal polysaccharidic matrix for detection of plant tissues' lectins**. 6º Congresso Brasileiro de Polímeros/IX International Macromolecular Colloquium; hipertexto (CDrom), trabalho nº 540. Gramado, RS, 11-15/11/2001.
- LIMA, R.S.N.; LIMA, J.R.; SALIS, C.R. & MOREIRA, R.A. Cashew tree exudate gum (*Anacardium occidentale* L.): A novel bioligand tool. **Biotech. Appl. Biochem.**; **35**: 45-53, 2002_a.
- LIMA, R.S.N.; LIMA, J.R.; BANDEIRA, C.T. & MOREIRA, R.A. Utilização biotecnológica da resina exsudada de cajueiro. **Revista Anima.**; **2**: 09-16, 2002_b.
- LIMA, V.L.M.; CORREIA, M.T.S.; CECHINEL, Y.M.N.; SAMPAIO, C.A M.; OWEN, J.S. & COELHO, L.C.B.B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydr. Polym.**; **33**: 27-32, 1997.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem Rev.**; **98**: 637-674, 1998.
- LOWE, C.R., Combinatory approaches to affinity chromatography. **Curr. Opin. Chem. Biol.**; **5**: 248-256, 2001.
- LOYD, L.L.; KENNEDY, J.F.; METHACARON, P.; PATERSON, M. & KILL, C.J. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydr. Polym.**; **37**: 315-322, 1998.
- LUCAS, J.R.; MOONEY, M.; BOWSON, M.J. & POWELL, T.C. The application of advanced water-based technology in the control of public health and hygien insect pests. **Pyrethrun Post**; **19**: 83-91, 1996.
- MAKELA, D., Studies in haemagglutinins of *Leguminosae* seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.** **35(11)**: 1-156, 1957.

- MANSUR, H.S.; ORÉFICE, R. L.; VASCONCELOS, W. L.; SILVA, R. F.; LOBATO, Z. P. Biomateriais para fixação de proteínas: Desenvolvimento de um processo de fabricação de vidros porosos via sol-gel para fixação de proteínas. *Revista Eletrônica Biotecnologia* in http://www.biotecnologia.com.br/9_b.htm (02/02/00).
- MARBAN-MENDONZA, N., JEYAPRAKASH, A., JANSSEON, H-B.; DAMON, Jr. R.A. & ZUCKERMAN, B.M., Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. *J. Nematol.* **19**: 331-335, 1987.
- MARTINEZ, M.; LEÓN DE PINTO, G. & RIVAS, C. Composition of *Acacia macracantha* gum exudates. *Phytochemistry*; **31**: 535-536, 1992.
- MARTINEZ, M.; LEÓN DE PINTO, G.; RIVAS, C. & OCANDO, E. Chemical and spectroscopical studies of the gum polysaccharide from *Acacia macracantha*. *Carbohydr. Polym.*; **29**: 247-252, 1996.
- MATOS, V.C.; **Gomas endospérmicas de *Delonix regia* e *Schizolobium parahybae*.** Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 113p., 2000.
- MCGARVIE, DONALD & PAROLIS, HARALAMBOS. Methylation analysis of the mucilage of *Opuntia ficus-indica*. *Carbohydr. Res.*; **88**: 305-314, 1981.
- MCLEAN, M.A.; STAYTON, P. S.; SLIGAR, S. G., Engineering Protein Orientation at Surfaces to Control Macromolecular Recognition Events, *Anal. Chem.*; **65**: 2676-2678, 1993.
- MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M.; JONES, C. & GORIN, P.A., Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum from *Anacardium occidentale*. *Phytochemistry*; **47(5)**: 715-721, 1998.
- MISRA, A N.; BAWEJA, J.M. & KALABHAVAN, M.S. Modified guar gum as hydrophilic matrix for controlled release tablets. *Indian Drugs*; **34**: 216-223, 1997.

- MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. **Tese de Doutorado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- MORAES, S. D. M., Purificação, caracterização parcial e estudos preliminares de mobilização durante a germinação da lectina de *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* (Ridley) Kruff. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 109 pp., Fortaleza, 1992.
- MOREIRA, R. A, AIHOUS, I. L., OLIVEIRA, J. A.T. & CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **86(II)**: 211-218, 1991.
- MOREIRA, R. A. & DE OLIVEIRA, J. T. A. Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins (I). **Biologia Plantarum**, **25**: 336-342, 1983_a.
- MOREIRA, R. A. & OLIVEIRA, J.T.A. Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins (II). **Biologia Plantarum**, **25**: 374-382, 1983_b.
- MOREIRA, R. A. & PERRONE, J. C., Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, **59**: 783-787, 1977.
- MOREIRA, R. A. Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química. **Tese de Titular** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 600pp., 1998.
- MOTHÉ, C.G. & RAO, M.A., Rheological behavior of aqueous dispersions of cashew gum and gum arabic: effect of concentration and blending. **Food Hydrocolloids**; **13**: 501-506, 1999.
- MURAMATSU, H.; DICKS, J.; TAMIYA, E.; KARUBE, I., Piezoelectric Crystal Biosensor Modified with Protein-A for Determination of Immunoglobulins. **Anal. Chem.**; **59**: 2760-2763, 1987.

- NAIR, S.V.; PEARCE, S.; GREEN, P.L.; MAHAJAN, D.; NEWTON, R. & RAFTOS, D.A., A collectin-like protein from tunicates. **Comparative Biochem. Physiol. Part B**; **125**: 279-289, 2000.
- O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E., **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne, Temarcarphi, 345p., 1981.
- OCHIENG, J.; GREEN, B.; SHAWNDA, E.; JAMES, O & WARFIELD, P. Modulation of the biological functions of galectins-3 by matrix metalloproteinases. **Biochim. Biophysic. Acta**; 97-106, 1998.
- OECHSLEIN, C.R.; FRICKER, G. & KISSEL, T. Nasal delivery of octreotide: absorption enhancement by particulate carrier systems. **Internat. J. Pharmaceutics**; **139**: 25-32, 1996.
- OLIVEIRA, J.D.; SILVA, D.A.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. & PAULA, H.C.B., Composition and effect of salt on rheological and gelation properties of *Enterolobium contortisiliquum* gum exudates. **Internat. J. Biol. Macromol.**; **29**: 35-44, 2001.
- OLSEN, L.R.; DEPEN, A; GUPTA, D.; SABESAN, S.; SACCHATTINI, J.C. & BREWER, C.F. X-ray chrystallographic studies of unique cross-linked lattuces betwen 4 isomeric biantennary oligosaccharides and soybean agglutinin. **Biochemistry**, **36**: 15073-15080, 1997.
- OTANI, Y.; TABATA, Y. & IKADA, Y. Rapidly curable biological glue composed of gelatin and poly-L-glutaminic acid. **Biomaterials**; **17**: 1387-1391, 1996.
- OXLEY, D. & WIKINSON, S.G. Structural studies of acidi galactomannan from 2 reference strain of *Serratia marcescens*. **Carbohydr. Res.**; **182**: 101-109, 1988.
- PATERNO, L.G.; MATTOSO, L.H.C. & OLIVEIRA Jr., O.N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**; **24(2)**: 228-235, 2001.

- PAULA PESSOA, P.F.; LEITE, L.A.S; PIMENTEL, C.R.M. **Situação Atual e Perspectivas da Agroindústria do Caju.** in: ARAÚJO, J.P.P.; SILVA, V.V. **Cajucultura: Modernas Técnicas de Produção.** Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, p.23-42, 1995.
- PEREZ G., R. M. SANCHEZ A, J., PEREZ G.,S., VRGAS. S., R. An analytical study of gums from *Leucaena glabrata* and *Spondias purpurea*. **J. Sci. Food Agric.**, **68**: 39-41, 1995.
- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**; **109**: 347-352, 1995.
- PINTO, F.S.C. Isolamento e caracterização das lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* L. var. *seminifera*, **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 125 pp., Fortaleza, 1987.
- POVEDA, A & BARBERO, J. NMR studies of carbohydrate-proteins interactions in solution. **Chem. Soc. Rev.**; **27**: 133-143, 1998.
- RABINOVICH, G.A; RIEVA, C.M.; LANDA, C.A & SOTOMAYOR, C.E. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. **Braz. J. Med. Biol. Res.**; **32**: 383-393, 1999.
- RAMOS, M. V., Características estruturais e funcionais de lectinas de *Diocleinae*. **Tese de Doutorado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 120pp, Fortaleza, 1996.
- REICHER, F., **Estrutura e propriedades de glicanas de espécies nativas.**Tese de Titular apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, 188 pp., Curitiba, 1998.
- REICHER, F., LEITNER, S.C.S., SIERAKOWSKI, M.R., FONTANA, J.D., CORRÊA, J.B.C. Properties of seed gum of *Stryphnodendron barbatiman*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**; **28/29**: 353-361, 1991.

- RINDLAV, A; HULLEMAN, S.H.D.& GATENHOLN, P. Formation of starch films varying crystallinity. **Carbohydr. Polym**, **34**: 25-30, 1997.
- ROBBINS, M.P., **Secondary plant products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding.** Book Review, authors: CAYGILL, J.C. & MUELLER-HARVEY, I., Nottingham University Press, 1999. **Phytochemistry**; **56**: 211, 2001.
- ROY, R.; PAGE, D.; PEREZ, S.F. & BENCOMO, V.V. Effect of shape, size and valency of multivalent mannosides on their binding properties to phytohemagglutinins. **Glycoconjugate J.**; **15**: 251-263, 1998.
- RUDIGER, H. Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of the plant lectins. **Acta Anat.**, **161**: 130-152, 1998.
- SALES, P.V.P., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. Isolation and characterization of a lectin from *Vaitarea macrocarpa*. Duke seeds. **Arq. Biol. Technol.**; **32 (1)**: 151, 1989.
- SARUBBO, L.A., OLIVEIRA, L.A., PORTO, A.L.F., DUARTE, H.S., CARNEIRO-LEÃO, A.M.A., LIMA-FILHO, J.L., CAMPOS TAKAKI, G.M. & TAMBOURGI, E.B. New aqueous two-phase system based on cashew-nut gum and poly(ethylene glycol). **J. Chromat. B**, **743**: 79-84, 2000.
- SASTRY, T.P.; ROSE, C.; GOMATHINAYAGAN, S. & GANGA, R. Chemically modified fibrin-gelatin composites: preparation and characterization. **J. Appl. Polym. Sci.**; **68**: 1109-1115, 1998.
- SCHORSCH, C.; GARNIER, C. & DOUBLIER, J.L. Viscoelastic properties os xanthan/galactomannan mixtures: comparision of guar gum with locust bean gum, **Carbohydr. Polym.**, **34 (3)**: 165-175, 1997.
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, **246**: 227-234, 1989_a.

SHARON, N. & LIS, H. Lectins. 126 p. Chapman and Hall, London, 1989_b.

SHARON, N. & LIS, H. Legume lectins: a large family of homologous proteins. **FASEB J.**; **4**: 3198–3207, 1990.

SHARON, N. Glycoproteins now and then: a personal account. **Acta Anat.**; **161**: 7-17, 1998.

SHIH, I.I. Edible firris from rice protein concentrate and pullulan. **Cereal Chem** **73**: 406-409, 1996.

SIMANEK, E.E.; MCGARVEY, G.J.; JABLONOWSKI, J.A & WONG, C.H. Selectin-carbohydrate interactions: from natural ligands to designed mimics. **Chem. Rev.**; **98**: 833-862, 1998.

SINOWATZ, F.; PLENDL, J. & KOLLE, S. Proteins-carbohydrate interactions during fertilization. **Acta Anat.**; **161**: 196-205, 1998.

SKARDA, V. & RIPACEK, F. Permeation of proteins through a biodegradable hydrogel. **J. Bioactive Compatible Polym.**; **12**: 186-195, 1997.

SOGA, R. & HEIGER, D.N. Simultaneous determination of monosaccharides in glycoproteins by capillary electrophoresis. **Anal. Biochem.**; **261**: 73-78, 1998.

STEPHEN, A M. & CHURMS, A. **Food polysaccharides and their applications**. Marcel Dekker Inc., New York, p.674, 1995.

STILLMARK, H. Uber Rizin, ein Giftiges Ferment aus Samen Von *Ricinus communis* L., und Einizen Anderen Euphorbiaceen. **Tese de Doutorado**, Universidade de Dorpad, Dorpad, 1888.

STREET, C.A & ANDERSON, D.M.W. Refinement of structures previously proposed for gum arabic and other *Acacia* gum exudates. **Talanta**; **30**: 887-893, 1983.

- TAGER, A. **Determination of molecular mass of polymers, size and shape of macromolecules: Estimation of thermodynamic flexibility of a chain** In: **Physical chemistry of polymers**. Moscow: Mir Publishers, p. 175-523, 1978_a.
- TAGER, A. **Rheological properties of polymers in fluid state** In: **Physical chemistry of polymers**. TAGER, A. Moscow: Mir Publishers, p. 266-305, 1978_b.
- TAVARES, G.A. **Estrutura e propriedades físico-química da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa* Willd.** Dissertação de Mestrado em Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.
- TAVARES, R. O. **Galactomanana de *Adenantha pavonina* L. Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza: 95 p., 1998.
- TEIXEIRA, D.M.A. **Goma exsudada de *Spondias purpurea*: uma nova matriz para o isolamento de lectinas galactose ligantes.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza: 90 p., 2001.
- TOMIHATA, K. & IKADA, Y. Cross-linking of hyaluronic acid with water soluble carbodiimide. **J. Biomedical Material Res.**; **37**: 243-351, 1997.
- TRIEBOLD, H.O. Quantitative analysis with applications to agricultural and food products. New York; D. Van Nostrand Co., p.331, 1946.
- TROMBETTA, E.S. & HELENJUS, A Lectins as chaperones in glycoproteins folding, **Curr. Opin. Struct. Biol.**; **8**: 587-592, 1998.
- TSURUTANI, R.; YOSHIMURA, M.; TANIMOTO, N. & KIFUNE, K. Chitin film; properties and applications as biomaterials. **Membrane**; **20**: 255-262, 1995.
- VAN DAMME, E.J.M., GOLDSTEIN, I.J. & PEUMANS, W.J. A comparative study of

- mannose-binding lectins from the *Amaryllidaceae* and *Alliaceae* **Phytochemistry**, **30** (2): 509-514, 1991.
- VENNING, F.D. The ontogeny of the laticiferous canals in the *Anacardiaceae*. **Am. J. Bot.**: **35**: 637-644, 1948.
- VICENTE, C.; SEBASTIÁN, B.; FONTANIELLA, B.; MÁRQUEZ, A.; XAVIER-FILHO, J. & LEGAZ, M-E., Bioskin as an affinity matrix for the separation of glycoproteins. **J. Chromat. A**; **917**: 55-61, 2001.
- VON DER LIETH, C. W., SIEBERT, H. C., KOZAR, T. Lectin ligands: new insights into their conformations and their dynamic behavior and the discovery of conformer selection by lectins. **Acta Anat.**, **161**: 91-109, 1998.
- WEIS, W.I. Cell surface carbohydrate recognition by animal and viral lectins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**; **7**: 624-630, 1997.
- WESTFALL, D.A; FLORES, R.R.; NEGRETE, G.R.; MARTINEZ, A O & HARO, L.S. High-resolution polyacrylamide gel electrophoresis of carbohydrates derivatized with a visible dye. **Anal. Biochem.**; **265**: 232-237, 1998.
- WHISTLER, R. L. & BETMILLER. J. N., **Polysaccharides and Their Derivates**. In: **Industrial Gums**. New York: Academic Press, 3rd ed., 619p., 1993.
- WU, A. M.; SUGII, S. & HERP, A. **A guide for carbohydrate specificities of lectins**. In: WU, A. M. **The molecular immunology of complex carbohydrate**. Pienum Publ. Co. p. 819-847, 1988.
- ZAKARIA, M.B. & RAHMAN, Z.A., Rheological properties of cashew gum. **Carbohydr. Polym.**; **29(1)**: 25-27, 1996.
- ZANETTA, J.P. Structure and functions of lectins in the central and peripheral nervous systems. **Acta Anat.**; **161**: 180-195, 1998.

Anexo

Cashew-tree (*Anacardium occidentale* L.) exudate gum: a novel bioligand tool

Raquel da Silveira Nogueira Lima¹, Jacira Rabelo Lima, Celio Ribeiro de Salis and Renato de Azevedo Moreira

Lectins and glycoconjugates Laboratory (LABLEC), Federal University of Ceará, Campus do Pici, Block 907, P.O. Box 6020, Fortaleza, Ceará 60455–900, Brazil

The potential of bioaffinity as a tool for the study of biological-recognition mechanisms is gaining increasing value. The search continues for alternative products that can be obtained from renewable sources, such as the bark exudate gum from the cashew tree (*Anacardium occidentale* L.), which grows wild in many tropical and subtropical countries. Its potential use as a chromatographic matrix and/or for bioaffinity ligand for proteins (lectins) has been investigated. The crude gum was cross-linked in order to obtain a kind of chromatographic matrix (gel). To evaluate the gum's ability to retain glycoproteins (lectins), affinity chromatography was performed and, in addition, the reological behaviour of the gum was characterized.

Introduction

Origin and characterization

Substances frequently called gums are hydrocarbons of high molecular mass; others are petroleum products, rubber latex synthetic polymeric gums, balms and resins. Recently the term 'gum', as technically employed in industry, refers to plant or microbial polysaccharides and their derivatives that are capable of forming dispersions in cold or hot water, producing viscous mixtures or solutions. The latter references to the term gum mean soluble cellulose derivatives and those derived from, and modifications of, other polysaccharides that, in their original (natural form), would be insoluble. Thus the definition of gum can include mucilaginous polysaccharides. Modification of gums, and the addition of gums in solution even in low concentrations, can affect the viscosity of the dispersion. Cashew-tree gum represents a non-conventional alternative. The art of lacquering began in China centuries ago, reaching its climax of development during the Ming dynasty (1368–1644 A.D.). The lacquers used were obtained from the varnish tree (*Rhus vernicifera*). The milky exudate from this tree darkens and thickens rapidly on exposure to air. Lacquer, when applied as a varnish, provides remarkable protection, as it is unchanged by acids, alkalies, alcohol or heat up to 70 °C (158 °F). The Burmese lacquer tree (*Gluta usitata*) produces a more slowly

drying lacquer. The mastic tree (*Pistacia lentiscus*), from the Mediterranean region, produces mastic, a varnish used for coating metals and oil and watercolour pictures. It is one of the most expensive resins to produce. The tropical American trees *Anacardium humile* (monkey nut), *A. occidentale* (cashew tree) and *A. nanum* produce cashew gum, a substitute for gum arabic. Not only are they good adhesives, but they also contain a small amount of cashew oil, which can be used as an insect repellent or as a lubricant in the electrical insulation of aeroplanes. Comparative studies among specimens of gums obtained from different geographical areas have been made. The results indicate that there are significant variations in properties associated with climatic conditions, such as the specific rotation and composition. Studies of exudate gums from species belonging to the family Anacardiaceae have been made mainly on representatives of the genus *Anacardium* and *Spondias*. In *A. occidentale*, galacturonic acid is not observed, suggesting a combination of agalacturonic acid and 4-O-methylglucuronic acid, which are not commonly found in the family Anacardiaceae [1]. *Spondias mombim* (yellow mombim) and *S. purpurea* (red mombim) gums show similar intrinsic viscosities, both being dextrorotatory; however, *S. purpurea* presents a higher specific rotation. *A. occidentale* L. exudate gum has been object of recent analysis, the partial composition having been obtained by GLC and ¹³C NMR. The results have revealed 72% β-D-galactopyranose, 14% of α-D-glucopyranose, 4.6% of α-L arabinofuranose, 3.2% of α-rhamnopyranose and 4.5% β-D-glucuronic acid [2].

The cashew tree belongs to the botanical family Anacardiaceae, which contains 60–80 genera and about 600 species distributed pantropically, but with a few genera in northern temperate regions and some native to the semi-arid coasts of Brazil. Economically, the family is important for various reasons. Fossils attributed to the family have been found in Palaeocene, and more recent, deposits. The family includes resinous trees, shrubs and climbers in which the leaves are alternate, mostly pinnate and exstipulate. The

Key words: bioaffinity ligand, lectin.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail: rsnlima@yahoo.com).



Figure 1 The cashew tree and its fruit



Figure 2 Exudation from cashew-tree bark

resin is synthesized in the epithelial cells lining pockets or canals and then secreted into these internal cavities. Synthesis generally occurs in all organs of the plant, with different quantitative composition, appearing to be genetically controlled and little influenced by environmental conditions (Figures 1 and 2). The flowers are regular, and mostly bisexual. The fruit is usually a drupe. The gum is similar to gum arabic and may be used as a substitute for liquid glue for paper, in the pharmaceutical and cosmetic industries, as an agglutinant for capsules and pills, and in the food industry as a stabilizer of juices, beer and icecream, as well as for the clarification of juices; it can also be utilized in the making of cashew wine. Research has already been carried out in respect of its use in the making of inks and varnishes. Cashew-gum extraction represents one more source of revenue for the producer, in addition to the cashew nut and the peduncle, as well as an alternative for the utilization of non-productive cashew trees in a phase of decline or senescence. Members of the Anacardiaceae, like those of the Rutaceae and Sapindaceae, are known for their fruits. Cashew was one of the first fruit trees to be distributed throughout the tropics by early Spanish and Portuguese adventurers. The seed produces the cashew nut, while the

reddish, swollen axis under the fruit proper is the cashew apple. The former is roasted and eaten, while the latter is crushed, strained, and with water and sugar, is made into a refreshing drink consumed throughout tropical America. Mango (*Mangifera indica*), native to Indo-Malaysia is also now cultivated throughout the tropics. The fruit of this large tree has a thick, aromatic, and tasty flesh; it has been called the 'queen of the tropical fruits'. This is a commonly grown ornamental tree in subtropical America, where it has frequently become part of the natural habitat. It is grown for its feathery, evergreen, compound leaves and red berries (of the female tree). The ground seeds are used as a condiment or as an adulterant in pepper. It grows well on poor soils. The dhobi nut (*Semecarpus anacardium*) has young fruits with a black resin insoluble in water that is used as a marking ink in south-east Asia. Other species of Anacardiaceae are also grown as ornamental plants. The smoke tree (*Cotinus coggygria*), from southern Europe to central China, is a shrub with purplish foliage and large, diffuse inflorescences that give it its 'smoky' appearance. It is commonly planted in temperate regions. Few Anacardiaceae species are exploited for their wood for building or for cabinet-making; however, many of them have valuable tannins that are extracted for tanning leather.

Cashew gum is a complex polysaccharide of high molecular mass. A molecular mass as high as 9 500 000 has been reported. On hydrolysis it yields galactose, rhamnose and galacturonic acid. It occurs as a partially acetylated derivative. The acid number has been found to vary from 13.4 to 22.7. The variation in acid number is influenced not only by the source of the sample, but also by its age. The gum has a peculiar property of splitting off free acetic acid, and this loss is loosely correlated with particle size. The gum is composed of complex branched heteropolysaccharides and their calcium, magnesium, potassium and sodium salts, with a weight-average molecular mass (M_w) of about 1.5×10^4 , and a polydispersity index of about 1.49, determined by size-exclusion chromatography. Hydrolysis of a sample of CG gum from Brazil gave the following composition: 70% galactose, 5% arabinose, 11% glucose, 4% rhamnose, 1% mannose and 6% glucuronic acid [3].

Interaction between carbohydrate and protein

Since glycoconjugates and glycans have been shown to interact with many biological systems, both *in vivo* and *in vitro*, a great deal of attention has been focused on the development of polymer or glycosidic ligands. In principle, a glycosidic ligand should retain its selective interaction after attachment to a polymeric material, despite some limiting factors arising from the heterogeneity introduced by the polymer. Therefore a large variety of glycopolymers have been designed and their behaviour toward carbohydrate-

binding proteins has been investigated. The interaction between proteins capable of binding glycoconjugates and carbohydrates is of some interest, as sugars are the postulated mediators for the transmission of biological information by forming specific recognition codes. Owing to the progress in understanding the importance of glycoconjugates in many biological interactions, the development of carbohydrate-based technologies (or glycotecnologies) is being intensively pursued. Among the broad spectrum of technologies, glycoaffinity chromatography allows the purification and the study of two interacting components, namely a carbohydrate-binding protein (lectin) and a glycoligand. This interaction is due to the ability of a particular protein domain to bind specifically to a certain sugar sequence in oligosaccharides and glycoconjugates. Glycopolymers have been used to prepare soluble gels for affinity. The lectin-carbohydrate interaction appears to be dependent on the environmental conditions, and particularly on the sugar concentration in the eluent, suggesting that they bind together.

Biomaterials for protein fixation

The high efficiency presented by the biological macromolecules in reagent selection and in specific interaction with reaction sites has promoted the current interest in research involving fine films of associated macromolecules to advanced materials. Proteins especially are macromolecules with high biological importance, and the study of their interactions with several materials and chemical solutions is fundamental to an in-depth study of the organic and functional properties of living organisms. These studies usually involve the fixation or immobilization of one or more proteins on substrates through several mechanisms, including covalent connection, physical adsorption, cross-reactions, polarization and ester chemistry. One or more of these mechanisms will be involved in the process of fixation of the protein with the substrate. Several parameters involved in the process, such as pH, temperature, superficial area, ions and chelating agents and complexing agents determine the efficiency levels and the degree of selectivity of the protein-substrate interactions.

Objectives

The present paper seeks to provide some information about the possible biotechnological utilization of cashew-tree exudate gum (purified polysaccharide) as a useful natural matrix for affinity-chromatographic procedures for the isolation and characterization of lectins. Lectins are carbohydrate-binding proteins that have a non-immune origin, bind sugar complexes reversibly and are able to agglutinate cells or precipitate polysaccharides and glycoconjugates.

Material and methods

Materials

Exudate gum The gum sample was collected from trees (injury site) grown in the State of Ceará on the Northeast coast of Brazil. A few details of the botanical aspects of the species were noted. The 'tears' of exudate were somewhat contaminated with bark and were colourless to light amber in colour. Samples were ground to pass through a 2.5 mm-mesh-size sieve.

Rational extraction and gum polysaccharide isolation Although specific biosynthetic studies are lacking, it is believed that the production of the gums in the plants is the result of a physical defence mechanism towards the attack of bacteria. Natural factors that reduce the vitality of the plant, such as soils poor in nutrients and non-favourable climatic conditions, stimulate the production of gums. Exudate formation can also be induced by deliberate incision of the plants, as well as by the introduction in the chemical agents, such as ethylene oxide and chemicals derived from benzoic acid. Gum isolation is defined as being the separation of polysaccharides present in the crude material. The purification stage involves the transformation of the isolated material acid groups into the carboxylate form, generally sodium. The stages of isolation and purification influence the gums' general characteristics, the control of which is essential for academic study or industrial application [2,4,5]. Among the factors that can affect those characteristics are the pH of the dissolution stage and the ethanol/water ratio. Another important factor that should be considered is the yield of the gum during the purification and isolation process [6]. The exudate gums from *A. occidentale*, *Spondias purpurea* and *S. mombim* showed excellent solubility in cold water. When the analytic data from Venezuelan species from different geographical places were compared, interesting similarities and differences were observed; for example the maximum viscosity of the Venezuelan gums are lower than those observed for species that were from Papua and India [1]. However, the galactose/arabinose ratios were different. Fifteen species of trees or perennial bushes, from small bushes to large trees, comprise the genus *Anacardium* native to tropical parts of South and Central America and of Western India. The present study sought, therefore, to investigate the possible use of the exudate of one of the species belonging to the family Anacardiaceae (*A. occidentale* L.) in the making of polysaccharide matrices as chromatographic supports in the assembly of protein-isolation columns. The possibility of substituting commercial supports with a raw material of lower production cost presents itself.

Obtaining and purifying the polysaccharide Dried gum (10 g) was stirred in distilled water (250 ml) for 6–8 h at room

temperature. The supernatant was obtained by centrifugation. The residue was washed with water and the washings were added to the separated supernatant. The procedure was repeated four more times. Finally, the supernatant was made up to 500 ml and treated with ethanol (1:4, v/v) in order to precipitate all the carbohydrates. The precipitated material was washed again with distilled water and freeze-dried.

Elemental analysis

Humidity determination For humidity determination, weighed filters, containing samples of gums and mucilages, were placed in a greenhouse at 110 °C for 24 h. Soon afterwards they were placed in a dryer to equilibrate with its temperature until constant weight was achieved. The humidity is calculated by the difference between the initial and final weights of the samples, the value being expressed as a percentage.

Ash content determination For the determination of ash content, porcelain crucibles containing 2 g of the sample were placed in an oven at 600 °C until complete incineration of the organic matter was achieved. The material was maintained in a dryer until constant weight was reached. The ash content, calculated as the relationship between the weight of the residue and the initial weight of the sample, was expressed as a percentage.

Determination of total protein The determination of total protein in the samples was done using the kjedahl method. To a sample of 100 mg, 1.1 g of catalyst were added (100 g of KH_2SO_4 , 10 g of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 1 g of selenium) and 1.5 ml of concentrated H_2SO_4 . The mixture was then placed in a soxhlet apparatus, left for at least 30 min or until a limpid solution is obtained, the solution then being diluted to 25 ml with distilled water. The samples were then placed in water at (37 °C) for 15 min and the A_{650} read. The amount of nitrogen in the sample was calculated in relation to a standard curve obtained with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the amount of crude protein calculated by multiplying the value of total nitrogen by 6.25.

Determination of lipids Although this fraction contains the fats, it also contains other hexane-soluble substances, such as waxes, resins and some pigments. Extraction was made with 1 g of sample in a continuous extractor, using anhydrous hexane as solvent. After 8 h of reflux, the flask containing the lipid extract was weighed and the amount of lipid contained in the sample was calculated.

Determination of total carbohydrate The amount of carbohydrate was determined by the phenol/ H_2SO_4 method, a

solution of D-mannose at 100 μl (50%, w/v, solution)/ml [7]. All the readings were taken at 490 nm in a Spectronic 20 spectrophotometer.

Determination of soluble carbohydrate The soluble carbohydrates include fructosans, oligosaccharides and starch (amylose). The determination was based on the extraction of the soluble carbohydrates and their colorimetric determination, a glucose solution being used as the standard.

Determination of total non-structural carbohydrates The quantitative determination of the non-structural carbohydrates requires the extraction of polysaccharides, sucrose, glucose and fructose, and the hydrolysis of polysaccharide into monomeric sucrose reducing units, with minimal extraction and hydrolysis of structural carbohydrates. The unfolding of starch and sucrose was accomplished by the commercial enzyme clarase 900, an α -amylase containing small amounts of maltase, peptidase, phosphatase, cellulase, sulphatase and invertase. The reducing units obtained were used in the reduction of Cu^{2+} prior to iodometric determination. The percentage of total carbohydrate represented by non-structural carbohydrate was expressed by the relationship:

$$\begin{aligned} \text{Non-structural carbohydrate (\%)} \\ &= [\text{glucose (mg)} \times \text{dilution factor}] \\ &\times 100/\text{weight of the sample (mg)} \end{aligned}$$

Determination of total fibre The gum sample was dried and delipidated then submitted to acid (H_2SO_4 , 1.25%) and alkaline (NaOH, 1.25%) digestion (30 min per digestion). The organic residue was previously received in porcelain gooch crucible prepared with amianthus (a fine silky asbestos). The percentage of crude fibre was calculated by the difference in the weight of the crucible before and after the burning residue.

Determination of total crude energy 'Crude energy' refers to the amount of heat [kcal (1 kcal = 4.184 kJ)/kg or kcal/g] liberated by the sample when it is completely oxidized in an atmosphere rich [25–30 atm (2.53–30.4 Pa)] in oxygen. The gum sample (0.5–1.0 g) was placed into a metallic capsules, heated, then cooled in a dryer. Titration was accomplished by using standardized calcium carbonate, with Methyl Orange as indicator, to determine the amount of acid formed by oxidation during heat treatment. Each 1 ml of the calcium carbonate solution used up in the titration corresponds to 1 calorie. The total energy in the gum was expressed as kcal/100 g of gum.

Evaluation of viscosity The viscosity of the cashew-tree exudate gum is largely dependent on its freshness, that is, how recently it was gathered from the trees. The viscosity

is affected by conditions of climate and growth. Viscosity is also affected by storage. Powdered gum will show a decrease in viscosity after it has been stored over 6 months. Cashew-tree-gum sols are sensitive to alkali and attain their maximum viscosity at pH 8.5. Above that pH the sols tend to become stringy.

For viscosimetric analyses, the polysaccharide solutions (0.25–2.0 g/l) were prepared in distilled water and/or NaCl (0.1 mol/l) solutions at room temperature under agitation in magnetic agitator for 16 h. The viscosity measurements for the galactomannan sample were done on a Brookfield model LVDV-III reometer (Pharmacia Biotech) with a coax cylinder, using SC4-18 and CP40 cones and a ULA adaptor. For measurements in the capillary system, a Ubbelohde type viscosimeter (Pharmacia Biotech) were used (0.5 mm capillary). The viscometric parameters for the measured systems through the reometer were calculated by the program Rheocalc v 1.0. Temperature control was accomplished with a thermostatically controlled circulating water bath (Brookfield model TC-500). The Huggins [8] constant was determined applying the equation:

$$h_{red.} = \{[H] + K' \cdot (C \cdot [H])^2\}$$

where K' is the Huggins constant, C is the concentration, and $[H]$ is the intrinsic viscosity [9].

Gum IR spectrometry

IR radiation at frequencies lower than approx. 100 cm^{-1} , when absorbed by an organic molecule, turns into molecular rotation energy. The absorption process was measured, and, in consequence, the spectrum of rotation of the molecules consists of a series of lines. The intensities of the bands can be expressed as transmittance (T) or absorbance (A) (also called absorbance). The absorbance is the relationship between the radiant energy transmitted by a sample and the radiant energy. The absorbance is the logarithm (to base 10) of the reciprocal transmittance. Two types of molecular vibrations exist: axial deformations and angular deformations. A vibration of axial deformation is a rhythmic movement along the axis of the connection, so that interatomic distance increases and decreases alternatively. The vibrations of angular deformation correspond to variations of connection angles, whether internally in a group of atoms or a group of atoms in relation to the molecule as a whole. Rigid rules do not exist for the interpretation of an IR spectrum. It is necessary, though, to take into consideration certain requirements so that the interpretation can be reliable: the spectrum should be appropriately resolved and of reasonable intensity; the spectrum should show a reasonably pure composition; the spectrophotometer should be calibrated with standards so that the observed bands can be assigned to their frequencies or wavelengths. Quite reasonable calibrations can be made with a standard,

for instance, polystyrene. The method of handling of the sample should be identified. If solvents are used, it is necessary to indicate the concentration of the solution and the thickness of the cell.

Insolubilization treatment: gum treatment with epichlorohydrin

Chromatographic columns (5 ml of gel) were prepared with the polysaccharides obtained, closely following the procedure proposed by Appukutan et al. [9] and Fugita et al. [10]. To each 6 g of cashew-tree-gum 1.0 ml of epichlorohydrin (a cross-linking agent) and 8.0 ml of NaOH (5 M) were added. The mixture was shaken manually, left for 24 h at 40°C and for 12 h at 70°C . After this period, the material was exhaustively washed with distilled water until all the fine particles in suspension were removed. The material was homogenized and passed through a 30-mesh sieve, the fine particles being removed by exhausting washing with distilled water.

Obtaining of seed lectins from *Artocarpus integrifolia* (jack fruit) and *Artocarpus incisa* (bread nut)

Preparation of the seed meals The seed meals of *A. integrifolia* and *A. incisa* were obtained by breakage of seed in a sheet mill after the elimination of the tegument and drying with acetone. The resulting fine flours were conditioned in hermetic flasks and kept at ambient temperature.

Obtaining crude seed extracts The crude extracts of seeds of *A. integrifolia* and *A. incisa* were obtained by extraction with saline (NaCl, 0.15 M) in the proportion of 1:10 (w/v) with continuous agitation, for 4 h at ambient temperature. The resulting suspensions were centrifuged 9000 g for 20 min in a refrigerated (4°C) centrifuge (Sorvall) RC-5B. The supernatants, after filtration with filter paper, were kept in a freezer until subsequent analysis.

Obtaining lectin-rich fractions To obtain a more concentrated fraction free from sludges of low molecular mass, total extracts were precipitated by the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 80% saturation. After 4 h the material was centrifuged at 9000 g for 30 min in the refrigerated centrifuge and the resultant precipitate dissolved in saline, exhaustively dialysed against deionized water, and freeze-dried. The fractions obtained were conditioned in hermetic flasks and kept in the freezer for subsequent use.

Bioaffinity evaluation

The application of molecular recognition or biorecognition is now widespread in virtually all fields of biology, chemistry, molecular biology and biotechnology. In many cases, the

Table 1 Different cross-linking treatments used in order to establish the optimum epichlorohydrin/NaOH/gum ratio in the chromatographic gel

In each treatment the mass of gum was 0.5 g and the epichlorohydrin concentration 12.5 M.

Seed extract	Treatment	Epichlorohydrin vol. (ml)	[NaOH] (M)	
			Initial	Final
<i>A. incisa</i>	a	0.135	3.0	2.0
	b	0.27	3.0	2.0
	c	0.47	3.0	2.0
	d	0.27	5.0	3.3
	e	0.405	5.0	3.3
<i>A. integrifolia</i>	a	0.135	3.0	2.0
	b	0.27	3.0	2.0
	c	0.47	3.0	2.0
	d	0.27	5.0	3.3
	e	0.405	5.0	3.3

entire field of research is based on this principle. Affinity chromatography itself (and its derivatives) has also been considerably developed.

Chromatographic procedures Prior experiments were run in order to establish the best ratio of epichlorohydrin to gum mass to employ. The whole screening procedure is shown on Table 1. According to the results, treatment 'e' was chosen to be the one used as the 'best' chromatographic gel. The chromatographic procedures were accomplished in 5 ml hypodermic syringes. The columns were constructed by leaving the gel (0.3 g) to self-sediment by gravity, equilibrated with NaCl at 0.15 M. Lectin-rich samples were applied and left in contact with the gel for 30 min. Elution was initially made with the same equilibration solution, followed by elution with β -alanine (0.1 M, pH 2.6) in 0.15 M, NaCl, pH 2.6. Elution was accomplished at a constant flow rate, and the fractions obtained had their absorbances determined at 280 nm.

Confirmation of the presence of lectins Confirmation of the presence of lectin was done by SDS/PAGE [11] and by haemagglutination assay.

Haemagglutinating activity To determine the lectin-fraction (non-retained chromatographic peak) haemagglutinating activity, the method of Moreira and Perrone [12] was used; erythrocytes, diluted to 2%, were added to serial dilutions of the sample. The assay was carried out in haemagglutinating tubes, to which were added in each tube, 100 μ l of NaCl (0.15 M). In the first tube, the sample was diluted to 100 μ l and serial dilutions (1:2, 1:4, 1:8 etc.) were made, homogenization being done completely before each transfer. To all wells soon after was 100 μ l of an erythrocyte suspension (to 2%). The tubes were incubated to 37 °C for 30 min then left for more than 30 min at room temperature.

Agglutination was made noted by simple observation, and the results were expressed as specific activity (UH/mg of protein), where an UH still represents the inverse of the largest dilution capable of agglutinating erythrocytes.

SDS/PAGE

SDS/PAGE in the presence of β -mercaptoethanol was accomplished as described by Laemmli [11]. The top gel contained 3.5% acrylamide in Tris/HCl (0.5 M, pH 6.8) buffer, and the separation gel contained 12.5% acrylamide in Tris/HCl (3 M, pH 8.8) buffer, adapted for the use in plates measuring 10 cm \times 8 cm (System Hoefer SE 250; Pharmacia Biotech). The freeze-dried samples (10 mg/ml) were dissolved in Tris/HCl (3 M, pH 8.3) buffer, containing 10% SDS 10% β -mercaptoethanol, Bromophenol Blue (0.02%) and then incubated at 110 °C for 10 min. To facilitate application of the sample, sucrose crystals were added to increase the density. Aliquots (10 μ l) of the treated samples were applied to the gel and then submitted to a current of 40 mA for 90 min. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 in 0.05% methanol/acetic acid/water (1.0:3.5:8.0, by vol.).

Results and discussion

Glycotechnology and lectins

The interaction between proteins capable of binding glycoconjugates and carbohydrates is of considerable interest, since sugars are the postulated mediators for the transmission of biological information by forming specific recognition codes. Because of the importance of glycoconjugates in many biological interactions, the development of carbohydrate-based technologies (or glycotechnologies) has been intensively pursued. Among the broad spectrum of technologies that includes basic studies of cellular functions, prevention of interactions between lectins and cell receptors, the selective retrieval or elimination of cell populations, carbohydrate-mediated targeting, bioaffinity sensors and solid-phase affinity assays, glycoaffinity chromatography, which allows the purification and study of two interacting components, seems to be the best to be studied. The interaction of a carbohydrate-binding protein (lectin) with a glycoligand is due to the ability of a particular protein domain to bind specifically to a certain sugar sequence in oligosaccharides and glycoconjugates. Complex carbohydrate moieties of glycoproteins and glycolipids at the cell surface are involved in the cell-cell contact, as well as cellular, bacterial and viral adhesions [13]. They are also recognition molecules for proteins and, together with chaperones, play an important role in *in vivo* folding of glycoproteins. In addition, glycosaminoglycans, the carbohydrate moieties of

proteoglycans, take part in a wide range of biological functions. The abundance of lectins in plants, and the solubility of these proteins, have helped to make plant lectins immobilized on various supports the most widely used category of tools for the purification of glycoproteins, glycopeptides and oligosaccharides to date. Moreover, affinity adsorbents derived from these lectins are useful not only for preparative chromatography, but also for other purposes, such as analysis and diagnosis. In addition, glycosylated polymers can be used as models of glycoproteins and glycolipids, and as affinity supports to purify and identify complementary proteins from tissue extracts. Biospecific adsorbents obtained by immobilization of carbohydrates or lectins are considered as models that may be used advantageously for studies of the mechanisms involved in glycobiology. Gums from plants of the Old World are ones that just came from plant exudation. Many botanical families include species that exude gums to some extent. Gums may be exuded in smaller or greater amounts, generating what may be called incrustations. Plant gums correspond to about 10–15% of the total of natural gums now marketed. Plants that produce non-toxic gums are usually bushes or trees of small size. The characterization of exuded polysaccharides can be achieved, *inter alia*, through the use of GLC and ^{13}C NMR [2]. Seeds have also been a source of gums. A lot of seeds contain starch as the main store of polysaccharide and energy, which is used by the embryonic plant during its initial growth. Almost all the plants used by Man produce seeds with starch as the storage carbohydrate. Starches, which can differ in their physical appearance and physical behaviour, have been used in the application of gums when dispersed or solubilized in water. A lot of seeds contain nutritious storage polysaccharides that are not exclusively starch, for example sete cascas or alfarobo (*samanea inopinata*) seeds. In the majority of cases, for the isolation of cashew-gum polysaccharides, the plant material is first extracted with water and then submitted to a sequential treatment with ethanol, in order to eliminate pigments, low-molecular-mass compounds and substances of non-carbohydrate nature. All the applications depend the molecular properties and the several hydration characteristics; however, they are mainly dependent on the molecular behaviour in solutions and gels [14]. In practical terms, gums are defined as molecular structures, tending to high molecular mass, usually with colloidal properties, that, in an appropriate solvent produce gels or suspensions of high viscosity or solutions of low matter content that can absorb water at ten times their weight, a property that may be used as a defence of young plants against hydric stress. This is one of the probable functions attributed to the endospermic gums, found in seeds, that are so important in establishing the embryonic plant [16]. Several seeds have had their endospermic gums structurally investigated, and all have been shown to basically consist of

galactose and mannose, with different proportions of these two monosaccharide units; such seeds include those of *Caesalpinia spinosa* (tara tree), *Cyanopsis tetragonolobus* (guar), *Mimosa scabrella* (bracinga) and *Schizolobium parahybum* (guancaxtle, bacurubu or yellow jacaranda) [16].

Cashew-tree exudate gum

Cashew gum is a bark exudate of *A. occidentale*, a tree that grows wild in many tropical and subtropical countries. The tree is known for its nuts, which are used as a food ingredient, especially in oriental delicacies. Although cashew gum has not found many industrial uses, its application in the field of pharmacy has been described [17]. The gum is a complex polysaccharide, comprising 61% galactose, 14% arabinose, 7% rhamnose, 8% glucose, 5% glucuronic acid and < 2% other sugar residues. It has a highly branched galactan framework consisting of chains of (1 → 3)-linked β -D-galactopyranosyl units with interspersed β (1 → 6) linkages. The main aldobiouronic acid present is 6-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose. Since it is soluble in water, its further characterization is desirable, with a view to incorporating it in porous films or beads in combination with other polysaccharides or proteins; such possibilities are currently being studied.

Elementary analysis revealed: water content, 7.4%; total protein, measured by the Kjeldahl method, 0.5%; total lipids, 0.06%; fibres, 0.95%; ash, 0.95%. The total content of carbohydrate (taken by difference) was 98%. While there were no non-reductive sugars (sucrose), the amount of reductive sugars (glucose) was 1.9%. The ash composition showed: Ca, 0.14%; Mg, 0.14%; P, 0.005%; and Fe, 1.25%. The total energy content (heat pump) was around 284 kcal/100 g of gum. Polysaccharides of plant origin are widely used in various branches of the national economy, including medicine. They are biopolymers of high molecular mass that have been known from comparatively ancient times and are widely used in folk medicine. The bulk of the dry mass of higher plants is attributable to polysaccharides, the functions of which are exceptionally diverse. The most studied among the polysaccharides are the glucans, which have been isolated from bacteria, fungi, animals, algae, higher and lower plants, and other sources, and differ from one another in properties and structures. They possess anti-inflammatory, antitumoral, antisclerotic and anticoagulant properties; they also have antibiotic activities, such as influencing various viral infections and acting on ulcerous diseases [2]. In dilute solutions of polymers, where molecules are widely separated, the viscosity shows slight shear-rate-dependence. With increasing polymer concentration, a stage is reached at which the polymer coils interpenetrate and the physical contact changes the flow behaviour. In solutions of intermediate concentration, the viscosity is controlled primarily by the

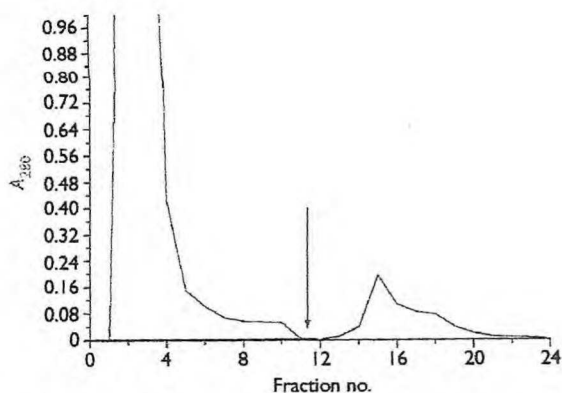


Figure 3 Affinity chromatography of *A. integrifolia* seed extract

extent to which the polymer chains interpenetrate, a property that can be characterized by the coil overlap parameter, $c[\eta]$; it indicates the volume occupied by the polymer molecule in the solution.

Effect of salts

Exudate gums are acid polysaccharides containing various metal ions as neutralized cations. The nature and content of these constituents depend on the composition of the soil upon which trees grow. The major cations of *A. occidentale* L. are K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} . The crude *A. occidentale* gum containing these cations tend to be naturally transformed into the sodium salts after purification by dialysis against 0.15 M NaCl. The results regarding the cashew-gum dispersion agreed with the findings of Mothé and Rao [18], namely the exhibition of shear-thinning non-Newtonian flow behaviour. If no intermolecular interaction occurs, the viscosity of the diluted gum solution decreases owing the screening of charge and contraction of the macromolecule in the presence of counter-ion. In more concentrated solution, the presence of multivalent ions may promote interaction between chains and an increase in viscosity. As the gum concentration increases, the effect of the interaction between polysaccharide molecules over the reduced viscosity becomes predominant. These changes in interaction are reflected in changes in the Huggins viscosity slope parameter, k_H .

A small decrease in viscosity was observed for the solution at different gum concentrations. Because of the dispersion shear-thinning nature, the cashew gum should be suitable for application as a thickening agent. The haemagglutinating activity shown by the non-retained peak (Figures 3 and 4) using *A. integrifolia* and *A. incisa* seed extracts, eluted with β -alanine, was 128 haemagglutination units. The electrophoretic pattern revealed the gum's ability to retain galac-

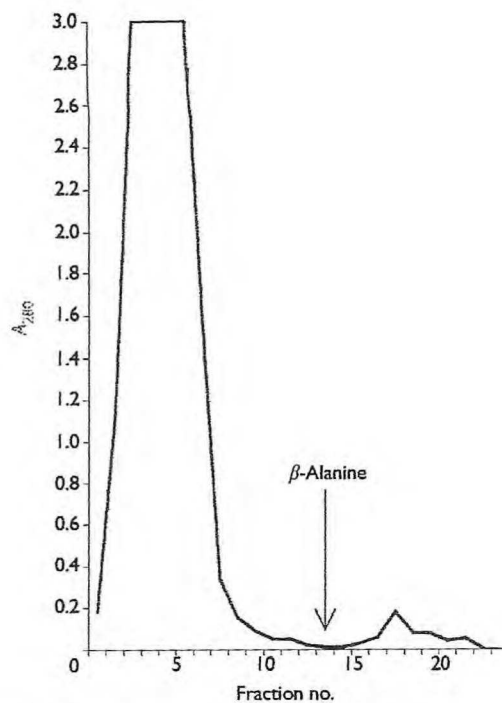


Figure 4 Affinity chromatography of *A. incisa* seed extract

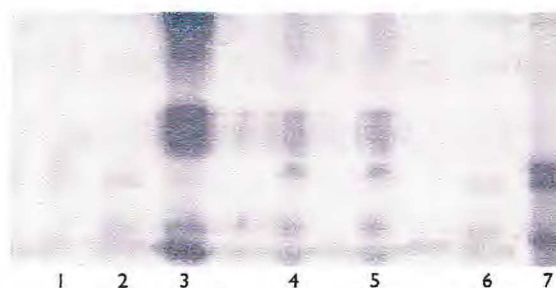


Figure 5 Denaturing PAGE

Lanes 1 and 2, *A. incisa* peak I; lane 3, peak II, *A. integrifolia*; lane 4, crude seed extract of *A. incisa*; lanes 5 and 6, peak I, non-retained *A. integrifolia*; lane 7, crude seed extract of *A. integrifolia*.

tose-specific lectins, as shown in Figure 5. Both chromatographic peaks (retained and non-retained), when submitted to denaturing electrophoresis, showed the respective lectin bands.

The gum showed its capacity to link galactose-specific proteins (frutalin and jacalin, lectins from *Artocarpus* seeds). The data support the idea of using the cashew-tree exudate gum as an efficient protein ligand for biological recognition (biosensor), stimulating future lectin identification or purification procedures.

Conclusions

The use of natural gums, taken from the exudates and extracts of plants, has been given a strong stimulus as a result of the many and lucrative possibilities for industrial use and in the international market. By natural exudation, or by means of incision, a gum or resin of a yellowish colour soluble in water, and which presents a great potential for industrial usage, appears on the trunk and branches of the cashew tree. Exudates from the stems of various species of the Anacardiaceae yield lacquers, resins or gums. The cashew-tree-exudate gum represents a non-conventional alternative. It is similar to gum arabic and may be used as a substitute for liquid glue for paper, in the pharmaceutical and cosmetic industry, as an agglutinant for capsules and pills, and in the food industry as a stabilizer of juices, beer and ice-cream, as well as for the clarification of juices; it can also be used in the making of cashew wine. Recently there has been much interest in the use of aqueous two-phase systems for the commercial purification and concentration of biological fermentation products. In some cases, inexpensive poly(ethylene glycol)/salt systems are limited by the high salt concentration necessary for the formation of the phases. Polymer/polymer phase systems are more generally useful, but commercial exploitation of these products has been restricted by the high cost of the fractionated dextran used in the dextran/poly(ethylene glycol) phase systems on which most of the literature is based. Therefore there have been a number of attempts to develop other polymer pairs that combine to form phase systems having properties comparable with, but lower costs than, dextran/poly(ethylene glycol) systems. The use of cashew-tree-exudate gum polysaccharides in order to construct a kind of chromatographic matrix (hydrogel) has become a useful tool for modern biotechnology in underdeveloped countries. A hydrogel is a three-dimensional network of hydrophilic polymer chains in which at least 20% by weight is retained water. Cashew-gum hydrogels swell and shrink in the presence or absence of water and, if the water is completely removed, they collapse to form a xerogel. The use of cashew-tree-exudate gum as a possible matrix for chromatographic procedures appears to be an efficient method for detection and elucidation of galactose-specific lectins. This is due to the presence of uronic acids, galactose, rhamnose, glucuronic acid and 4-O methylglucuronic acid residues in the branches of the exudate-gum structure [3]. Affinity adsorbents derived from lectins should be useful not only for preparative chromatography, but also for other purposes such as analysis and diagnosis. In addition, glycosylated polymers could be used as models of glycoproteins and as affinity supports to purify and identify complementary proteins from tissue extracts.

These results clearly indicate the possibility of using the exudate resin from cashew tree (a common plant along the Brazilian coast) as a new biotechnological tool for glycobiology and glycobiochemistry.

Acknowledgement

We thank Mr. Leonel Green Miranda of the George Washington University, Washington, DC, U.S.A., for checking the English.

References

- 1 De Pinto, G., Martinez, M., Mendoza, J. A., Ocando, E. and Rivas, C. (1995) *Biochem. Systems. Ecol.* **23**, 151–156
- 2 De Paula, R. C. M., Healthy, F. and Budd, P. M. (1998) *Polym. Int.* **45**, 27–35
- 3 De Paula, R. C. M. (1995) Ph.D. Thesis, University of Manchester
- 4 León de Pinto, G., Alvarez, S., Martinez, M., Rojas, A. and Leal, E. (1993) *Carbohydr. Res.* **239**, 257–265
- 5 León de Pinto, G., Nava, M., Martinez, M. and Rivas, C. (1993) *Biochem. Systems. Ecol.* **21**, 463–466
- 6 Ghosal, P. K. and Thakur, S. (1981) *Carbohydr. Res.* **98**, 75–83
- 7 Dubois, M., Giles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* **28**, 350–356
- 8 Huggins, M. (1942) *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 1712
- 9 Appukutan, P. S., Surolia, A. and Bachhawat, B. K. (1997) *Indian J. Biochem. Biophys.* **14**, 382–384
- 10 Fagita, Y., Oishi, K., Suzuki and Imahory, K. (1975) *Biochemistry* **14**, 4465–4470
- 11 Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680–685
- 12 Moreira, R. A. and Renone, J. C. (1977) *Plant Physiol.* **59**, 783–787
- 13 Quasha, P. K. (2000) *Carbohydr. Polym.* **41**, 293–309
- 14 Cordomou, H. J. (1911) *Les Plantes à Gommés et à Résines*, Encyclopédie Scientifique, Paris
- 15 Aspinall, G. O. (1982) *The Polysaccharides*, vol. 1, pp. 19–26, Academic Press, New York
- 16 Tavares, R. O. (1998) *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza
- 17 Zakaria, M. B. and Rahman, Z. Ab. (1996) *Carbohydr. Polym.* **29**(1), 25–27
- 18 Mothé, C. G. and Rao, M. A. (1999) *Food Hydrocolloids* **13**, 501–506

Received 30 April 2001; accepted 25 September 2001



FAB
Foro Argentino
de Biotecnología

II Congreso Argentino de Biotecnología IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología

Por la Presente certifico que

LIMA, R.S.N., ha presentado el siguiente trabajo:
*"BIOTECHNOLOGICAL UTILIZATION OF CASHEW TREE
(ANACARDIUM OCCIDENTALE L.) EXUDATE GUM: AN
USEFUL TOOL FOR GLUCOBIOCHEMICAL STUDIES"*

EN EL II CONGRESO ARGENTINO y IV FERIA -
CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA

Realizado en el Hotel Sheraton Libertador de la Ciudad
de Buenos Aires durante los días 26, 27 y 28 de Junio.

María Marta Sosa de Mc Carthy
Coord. Gral. Biolatina 2000
Gerente FAB

Buenos Aires, 28 de Junio de año 2000

BIOTECHNOLOGICAL UTILIZATION OF CASHEW TREE (*ANACARDIUM OCCIDENTALE* L.) EXUDATE GUM: AN USEFUL TOOL FOR GLUCOBIOCHEMICAL STUDIES.

LIMA, R.S.N & MOREIRA, R.A.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.
Ceará, Brasil

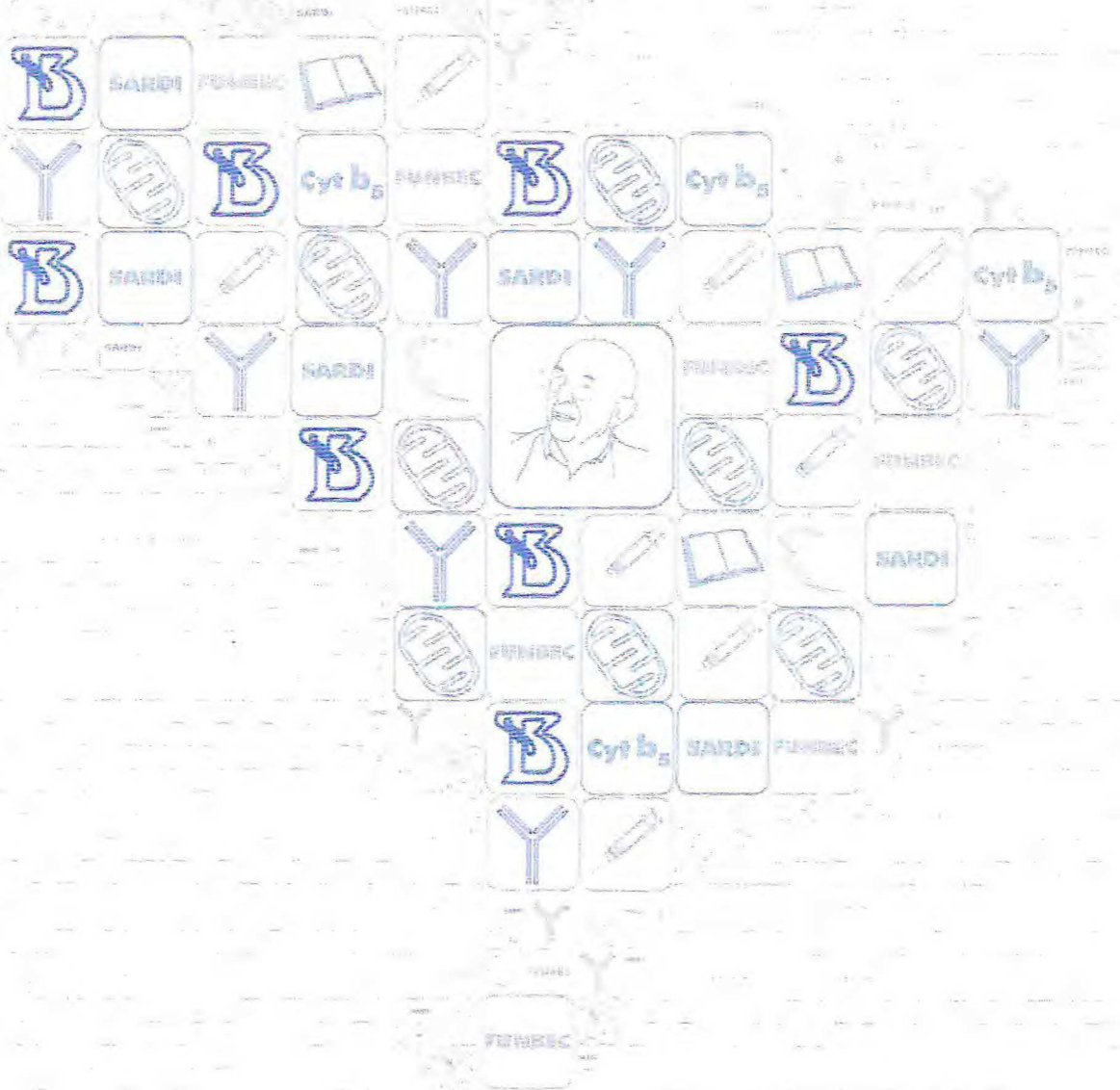
e-mail: rlima@sec.secel.com.br

RESUMEN

The use of natural gums, taken from the exudates and extracts of plants, have been given a strong impulse due to the many a lucrative possibilities for industrialization and to the excellent international market: one billion pounds are consumed in the United States each year where the growth in demand exceeds 8% per year. By natural exudation or by means of incisions, a gum or resin of a yellowish color, soluble in water, and which presents a great potential for industrialization, appears on the trunk and branches of the cashew tree. This gum represents a non-conventional alternative. It is similar to gum arabic and may be used as to a substitute for liquid glue for paper, in the pharmaceutical cosmetic industry and as an agglutinant for capsules and pills, and in the food industry as a stabilizer of juices, beer and ice cream, as well as for clarification of juices, and also be utilized in the making of cashew wine. Besides proving to be a strong wood glue when mixed with water, it presents a fungicidal and insecticidal action, and because of this is much used in book binding. Research already exists on its utilization in the making of inks and varnishes. Cashew gum extraction represents one more source of revenue for the producer, in addition to the nut and the peduncle, as well as an alternative for the utilization of improductive cashew trees, in phase of decline or senescence. From a wider point of view, cashew gum not only can end the importation of gum Arabic, which costs Brazil US\$ 1,900,000/year, but can also become an export item. The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) belongs to the botanical family *Anacardiaceae*, this one consisting of 60-80 genera and about 600 species distributed pantropically, but with a few genera in northern temperate regions and native to the semi-add coasts of Brazil. Economically, the family is important for various reasons. Fossils, both micro and macro, attributed to the family have been found in Paleocene and more recent deposits. This family presents resinous trees, shrubs and climbers, in which the leaves are alternate, mostly pinnate and exstipulate. The flowers are regular, and mostly bisexual; they have fused sepals, 5 free petals, 5-10 stamens, a disc and a superior ovary which is 1- to 5-locular, each locule having a pendulous ovule. The fruit is usually a drupe. This work tries to bring up some explanation about possible biotechnological utilization of cashew tree exudate gum, such as an useful natural matrix for affinity chromatographic procedures, in order to isolate and characterize lectins galactose-specific. Lectins are carbohydrate binding proteins, which have a non-immune origin, that bind reversibly sugar complexes and are able to agglutinate cells or precipitate polysaccharides and glucoconjugates. This resin is synthesized in the epithelial cells lining pockets or canals and then secreted into these internal cavities. Synthesis generally occurs in all organs of the plant, with different quantitative composition, appearing to be genetically controlled and little influenced by environmental conditions. The gum sample was collected from the tree (injury site), isolated and the elementary analysis was taken revealing: humidity (7,4%), total protein, taken through Kjeldahl method (0,5%), total lipids (0,06%), fibers (0,95%) and ashes (0,95%). The total content of carbohydrate (taken by difference from the others) was 98%. While there were no non-reductive sugars in sacarose, the tenor of reductive sugars (in glucose) was 1,9%. The ashes composition showed: Ca (0,14%), Mg (0,14%), P (0,005%) and Fe (1,25%). The total energy content (calorimetric pump) was around 284 kcal/100 g gum. The crude gum was cross-linked with NaOH 3N and epychlorohydrin 1 N in order to obtain a kind of chromatographic matrix (gel). These previous results can clearly show the possibility to use the exudate resin from cashew tree (a common plant along Brazilian coast) as a biotechnological tool for glucobiology and glucobiochemistry nowadays.

SBBq 2002

XXXI Reunião Anual
Programa e Resumos
Caxambu 18 a 21 de maio



SBBq

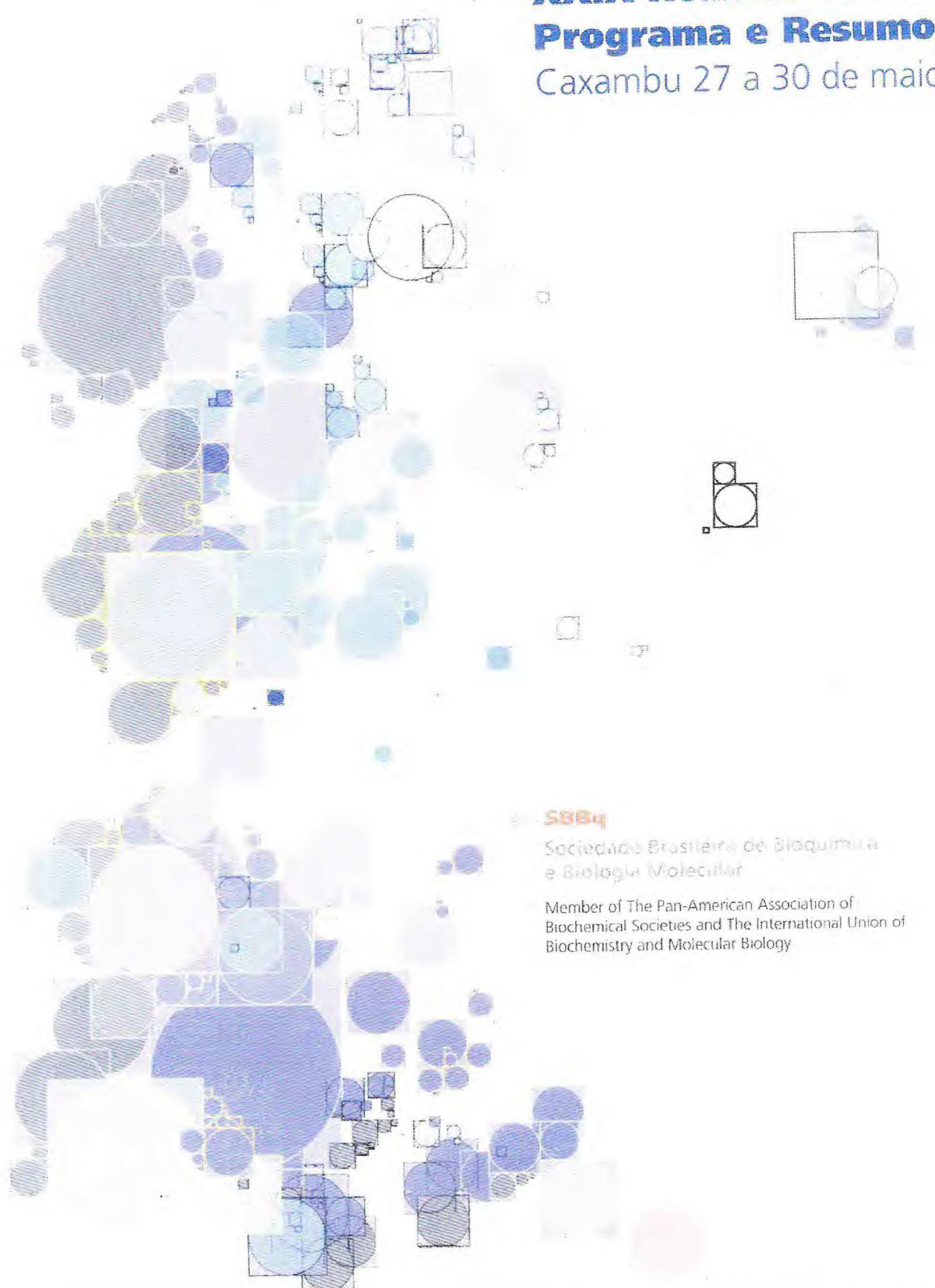
Sociedade Brasileira de Bioquímica
e Biologia Molecular

Member of the Pan-American Association for
Biochemistry and Molecular Biology and The International
Union of Biochemistry and Molecular Biology

SBBq 2000

**XXIX Reunião Anual
Programa e Resumos**

Caxambu 27 a 30 de maio



SBBq

Sociedade Brasileira de Bioquímica
e Biologia Molecular

Member of The Pan-American Association of
Biochemical Societies and The International Union of
Biochemistry and Molecular Biology

T - 07

ETHNIC POLYMORPHIC DIFFERENCES OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES M1 AND T1 IN WOMEN FROM RIO DE JANEIRO
Rossini, A.M.; Amorim, L.M.F., de Moura Gallo, C.V.; Ribeiro Pinto, L.F.
 Departamento de Bioquímica - Laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular - UERJ - Rio de Janeiro

The glutathione S-transferases (GSTs) are key enzymes in detoxication pathways. They catalyze the conjugation of electrophilic xenobiotics with reduced glutathione, resulting in more stable compounds. They seem to be particularly effective in metabolizing some environmental carcinogens, such as polycyclic aromatic hydrocarbons presents in tobacco smoke. Although polymorphic forms of GST genes have been implicated in lung cancer development in the Japanese population, this association was not so clear when studying other types of tumors and other populations, showing that there are intrinsic differences among different ethnic groups. In this work, we studied the polymorphisms of *GSTM1* and *GSTT1* from women living at Rio de Janeiro, looking for a characteristic pattern from this group. The polymorphisms characterization were performed by a PCR-Multiplex procedure, with the concomitant amplification of *GSTM1* and *GSTT1* from genomic DNA extracted from blood lymphocytes from 198 caucasian women and 178 negroid women. The *CYP1A1* amplification was used as positive control. The products of PCR reaction were visualized in ethidium bromide 2% agarose gels. The bands at 216 bp and 480 bp indicated the amplification of *GSTM1* and *GSTT1*, respectively. The polymorphic distribution of *GSTT1* was similar in the two groups of women (27% and 24.7% of the negroid and caucasian were *GSTT1*, respectively). However, we found that in the negroid group the frequencies of *GSTM1* and *GSTM1/GSTT1* were statistically different from those of the caucasian group ($p < 0.05$). The results also showed that there are important polymorphic differences among our population and those studied by other authors, probably due to the great ethnic miscegenation found in Rio de Janeiro. We are performing other studies looking for the possible association between the ethnic differences we found and cancer susceptibility.

T - 09

SINAXIAL® AS GANGLIOSIDE STANDARDS FOR TLC ANALYSIS

Raasch, J.R. and Trindade, V.M.T.

Departamento de Bioquímica - ICBS - UFRGS

Rua Ramiro Barcelos 2600 - anexo - CEP 91.035-003 - Porto Alegre - RS.

Ganglioside is the generic term for glycosphingolipids containing one or more sialic acids, which are a group of derivatives of neuraminic acid. Changes in ganglioside composition occur in the mammalian brain not only during development, but also in aging and several neuropathological situations. Sinaxial® is a medicine that has been used in various CNS diseases. It has been administered as injectable solution and it is constituted by a mixture of GM1, GD1a, GD1b and GT1b gangliosides. The aim of the present work is to study whether or not Sinaxial® could be to use as ganglioside standard for thin layer chromatography. The medicine was submitted to lyophilization and dialysis to remove the saline vehicle. Total ganglioside contents were determined by resorcinol procedure. TLC for identification of the individual gangliosides was carried out on silicagel G-60 plates and C.M CaCl₂ 0.25% (60/35/8) was used as the ascending solvent mixture. The chromatogram was revealed with resorcinol spray. The relative contribution of each ganglioside component was determined by densitometric scanning. There were not statistical differences in total contents and chromatographic patterns between processed and not processed Sinaxial®. Surprisingly, the saline vehicle does not alter the medicine ganglioside pattern. These results indicate that Sinaxial® may be an inexpensive choice for ganglioside profile analysis.

Acknowledgments: PROPESQ/UFRGS, FAPERGS, CNPq-PIBIC/UFRGS.

T - 11

THE BINDING OF CHARGED LIGANDS TO MACROMOLECULES. A MONTE CARLO STUDY OF AN ANOMALOUS SALT DEPENDENCE.

Da Silva, F.L.B.; Linse, S. and Jönsson, B.

Department of Theoretical Chemistry and Physical Chemistry 2

University of Lund - POB 124, S-221 00 Lund, SWEDEN

e-mail: fernando@signe.teckem.lu.se

Although interactions in biological systems occur in the presence of a large number of charged species, the binding of charged ligands to different biomolecules is often analyzed in a simplified model focussing only upon the macromolecule, ligand and added salt. Here we demonstrate that the presence of other charged macromolecules can affect the binding of the original species in an unexpected way. Experimental studies of the binding of barium ions to the chelator 5,5'-B₂BAPTA in the presence of charged silica sols show that the binding increases with added neutral salt. The experimental findings are verified in Monte Carlo simulations using a dielectric continuum model. The anomalous salt behaviour is caused by a reduction of the chemical potential of the ligand which interacts strongly with other oppositely charged macromolecules. These results are also relevant for the interpretation of competition studies often used in case of strong ligand binding.

T - 08

DIABETIC ORAL STATUS: BIOCHEMICAL AND CLINICAL ANALYSIS

Lima, R. B.; Nascimento, C. B.S.; Medeiros, H.K.S.; Lima D.F. and Negreir A.N.M.

Departamento de Bioquímica - Centro de Biociências - UFRN - Natal - RN

Diabetic Patients besides presenting systemic manifestation and ch complication, appears to have a number of periodontal diseases and dental c in bucal cavity. In this research diabetics patients were evaluated by biochen salivary and periodontal analysis. The subjective were 45 volunteers dia patients and 15 health person as control. The parameters used were occurren caries, salivary buffer capacity, salivary glucose, index of gum bleeding glycosiladated hemoglobin (HbA_{1c}). The results shoed that Insulin Dependent Dia Mellitus (IDDM) and Insulin Non Dependent Diabetes Mellitus (NIC descompensated diabetic patients presented high leves of HbA_{1c}, plaqua ir carious lesions and gum bleeding index, while only NIDDM descompens presented high levels of salivary buffer capacity. All diabetics presented nc salivary glucose and salivar flow as expected, in all diabetic patients wh control, the level of gum bleeding was followed of elevation of the (HbA_{1c}).

Supported by: CAPES, CNPq-PIBIC

T - 10

POTENTIAL USE OF CASHEW TREE EXUDATE GUM AS A MATRIX AFFINITY CHROMATOGRAPHY OF GALACTOSE-BINDING LECTINS.

Lima, R.S.N.^{1,2} and Moreira, R.A.²

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, CC, UFC, ²Centro de Cêr da Saúde, UNIFOR, Fortaleza, Ceará

e-mail: rlima@ccs.unifor.br

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) belongs to the family *Anacardiaceae* which consists of 60 to 80 genera and 600 species, distributed in the tropics, with genera in Brazilian temperate and semi arid regions. The exudate gum is synthe in the epithelial cell lining pockets or canals and then secreted into these inte cavities. This synthesis occurs generally in all organs of the plant, with diff quantitative composition, apparently genetically controlled with almost no influe from environmental conditions. The gum exudation is a defensive reaction agt insect or mechanical injury. In this work, the possible use of the *Anacard occidentale* exudate gum as matrix for affinity chromatography of galactose bin lectins was investigated. The gum, collected from the injury site, in the tree, show water content of 7.4%, 0.5% of protein (N₂ basis), 0.06% lipids, 0.95% fibers 0.95% ashes. Although the carbohydrate content (obtained by difference) wa: 98%, only 1.9% was found for the reductive sugars. The purified gum was cr linked with epichlorohydrin in the presence of NaOH and the gel obtained was u as a matrix for the chromatographic isolation of galactose binding lectins. Thus, w saline crude extracts from *Abrus precatorius*, *Artocarpus integrifolia* and *Artocai incisa* seeds were applied on the column, two fractions were obtained. The retai fraction, eluted with β-alanine-HCl pH 2.6 buffer, presented all the hemagglutina activity and when submitted to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed lectin characteristic bands, indicating a high degree of purification.

Supported by CAPES, CNPq and FINECAP

T - 12

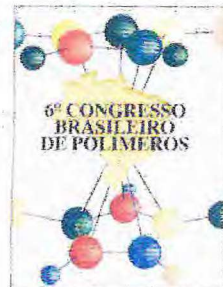
Airborne Particles on Mangrove Leaves in Channel of Santa Cruz

Viviane Lucia Romão de Souza - Centro Regional de Ciências Nucleares, Rua Cônego Barão 999, Recife, Pernambuco.

Particles in the atmosphere contribute to almost every air pollution problem. Inre particulate concentrations correlate with increased incidence of health effects. Ae particles also influence global climate directly by scattering solar radiation and indirec changing the albedo and occurrence of clouds. Aerosol particles are emitted from antropogenic and natural sources. As the biologically effective results of pollution can be determined by carrying out measurements on the organisms themselves, the suitable indicator organisms are plants. Used as bioindicators, plants show the effect air pollution thought reactions such as changes in population dynamics, developme certain damage symptoms and/or the accumulation of pollutant substances. Sampl plants (*Rhizophora mangle*) were collected from Channel of Santa Cruz, Recife, where there are many industries. Airborne particles, after treatment with chloroform, transferred to volumetric flask and completed to 100 ml. with 2% HNO₃ and before l analysed by inductively couple plasma mass spectrometry internal standards were a to all the analysed solutions (samples and standards, to calibration graphs). Environ Protect Agency reports that metals are generally present in the ambient atmosphe urban areas in concentrations greater than 0.5 µg/m³ and include arsenic, cadr copper, iron, lead, vanadium and zinc. Copper, 0.003-5.14 µg/m³ cause fever, dysj chills, headache, nausea, myalgia, cough, shortness of breath, sweet metallic v vomiting, 1-10 h occup exposure. Complaints of discomfort similar to onset of cor cold, chills or warmth, stuffiness of the head, 75-120 µg/m³, few weeks occup exp Analysed solutions demonstrated a concentration of 0.1 µg/l. of uranium, 5.6 µg copper, 0.08 µg/l. of corium and 0.01 µg/l. of torium. This results suggested that a concentration of copper was found. A better understanding of atmospheric partic lead to a better understanding of their effects on our health and climate.



IX International Macromolecular
Colloquium



Certificado

6º Congresso Brasileiro de Polímeros IX International Macromolecular Colloquium

Certificamos que o trabalho nº 540 "A universal polysaccharidic matrix for detections of plant tissues' lectins", de autoria de RAQUEL S. N. LIMA, CÉLIO R. SALIS, ANA C. G. HORTA e RENATO A. MOREIRA, foi apresentado no 6º Congresso Brasileiro de Polímeros/IX International Macromolecular Colloquium, realizado no Hotel Serrano, em Gramado/RS, de 11 a 15 de novembro de 2001.

Gramado, 15 de novembro de 2001.

Raquel S. Mauler
Coordenadora Geral do Congresso

Silvio Manrich
Presidente

Promoção:
Associação Brasileira de Polímeros
Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IQ/UFRGS)



IX International Macromolecular
Colloquium

A UNIVERSAL MATRIX FOR DETECTION OF LECTIN PRESENT IN PLANT TISSUES.



Raquel S. N. Lima^{1,2,3*}, Célio R. Salis¹, Expedito R. Cordeiro Carlos¹, Ana Cecília G. Horta¹, Renato A. Moreira¹

¹Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará; ²Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Fortaleza, Ceará; ³Centro de Saúde, Faculdades Integradas do Ceará – rsnlima@yahoo.com

ABSTRACT

The potential of bioaffinity use as a tool for study of biological recognition mechanisms is gaining increasing value. The search for alternative products obtained from renewable sources, such as the bark exudate gum from cashew tree (*A. occidentale* L.), grown wild in many tropical and subtropical countries. Its potential use as a chromatographic matrix and/or for bioaffinity ligand for proteins (lectins) has been investigated. The crude gum was cross-linked in order to obtain a kind of chromatographic matrix (gel). Evaluating the gum's ability in retaining glycoproteins (lectins), affinity chromatographic procedures were done, besides the rheological behavior characterization.

Introduction

Substances frequently called gums are hydrocarbons of high molecular weight and other products of the petroleum, erasers, some polymeric ones synthetic, balms or resins. Recently, the term "gum" as technically employed in industry, refers to the plant polysaccharides or microbial and their derivative ones, skilled in forming dispersions in water cold or hot, producing viscous mixtures or solutions. This definition also includes soluble cellulose derivatives and to those derived and modifications of other polysaccharides that, in its original form (natural), would be insoluble. Thus, the current definition of gums can include mucilaginous polysaccharides.

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) belongs to the botanical family *Anacardiaceae*, this one consisting of 60-80 genera and about 600 species distributed pantropically, but with a few genera in northern temperate regions and native to the semi-arid coasts of Brazil. This family presents resinous trees, shrubs and climbers, in which the leaves are alternate, mostly pinnate and exstipulate. This resin is synthesized in the epithelial cells lining pockets or canals and then secreted into these internal cavities. Synthesis generally occurs in all organs of the plant, with different quantitative composition; appearing to be genetically controlled and little influenced by environmental conditions. The gum is similar to gum arabic and may be used as a substitute for liquid glue for paper, in the pharmaceutical cosmetic industry and as an agglutinant for capsules and pills. Since glycoconjugates and glycans have been shown to interact with many biological systems, both *in vivo* and

in vitro, a great deal of attention has been focused on the development of polymer or glycosidic ligands. In principle, a glycosidic ligand should retain its selective interaction after attachment to a polymeric material, despite some limiting factors arising from the heterogeneity introduced by the polymer. Therefore, a large variety of glycopolymers have been designed and their behavior toward carbohydrate-binding proteins have been investigated.

The comprehension of the interaction between proteins capable of binding glycoconjugates and carbohydrates is quite stimulating as sugars are the postulated mediators for the transmission of biological information by forming specific recognition codes. Owing to the progress in understanding the importance of glycoconjugates in many biological interactions, the development of carbohydrate-based technologies (or glycotecnologies) is being intensively pursued. Among the broad spectrum of technologies, glycoaffinity chromatography allows the purification and the study of two interacting components: a carbohydrate-binding protein (lectin) and a glycoligand. This interaction is due to the aptitude of a particular protein domain to bind specifically to a certain sugar sequence in oligosaccharides and glycoconjugates. Glycopolymers have been used to prepare soluble gels for affinity. The interaction lectin-carbohydrate appears to be dependent on the environmental conditions, and particularly on the sugar concentration in the eluent, suggesting that they bound together. The isolation stages and purification influence the gums' general characteristics, whose control is strongly essential for an academic study, or for industrial application (León de Pinto et al.,

1993 a,b; De Paula et al., 1998). Among the factors that more affects those characteristics, stand out the pH of the dissolution stage and the ethanol/water rate. Other important factor that it should be considered, it is treated of the revenue of the gum during the isolation and purification processes (Ghosal and Thakur, 1981; De Pinto et al., 1995).

The genus is composed by fifteen species of trees or perennial bushes, of small load to trees very discharges, compose the genus *Anacardium*, native of tropical parts of South America and Central and of western India. The present work project seeks, therefore, a possible use of the exudate from one of the species belonging to the family *Anacardiaceae* (*Anacardium occidentale* L.) in the making of polysaccharide bioligands supports, in the assembly of protein isolation. Such fact should be a great found, once there would be the substitution of commercial supports for a raw material of lower production cost. In the present work, the possible uses of the exudate gum from one of the species belonging to the genus *Anacardium* as bioligand supports, in the purification of carbohydrate-binding protein was investigates, a natural matrix for affinity chromatographic procedures, in order to isolate and characterize lectins.

Experimental

The exudate gum

The gum sample was collected from trees (injury site) grown on the State of Ceará, Northeast coast of Brazil. Few details of the botanical aspects were noted. The tears were somewhat contaminated with bark and were colorless to light amber in color. Samples were ground to pass through a 2.5 mm sieve.

Polysaccharide purification

Dried gum (10 g) was stirred in distilled water (250 mL) for 6-8 hours at room temperature (RT). A supernatant was obtained by centrifugation. The residue was washed with water and the washing was added to the separated supernatant. The procedure was repeated four times more. The supernatant was made up to 500 mL and treated with ethanol (1:4v/v) in order to precipitate all the carbohydrates. The moisture was washed again with distilled water and freeze-dried.

Elementary Analysis: Humidity determination, ashes, lipid, protein and carbohydrate

For humidity determination, weigh-filters, containing samples of gums and mucilages are placed in greenhouse to 110 °C for 24 hours. Soon after, they are left in a dryer, until reaching the balance with the temperature it adapts, being then heavy, and so forth, until that the weights stay constant. For the determination of ashes, porcelain crucibles containing 2g of the sample was placed in oven to 600 °C until the complete incineration of the organic matter, being later

maintained in a dryer, until reaching the temperature it adapts. The determination of total protein (Baethgen and Alley, 1989) was made by the kjedahl method. A sample of 100mg 1,1 g of catalyst was added (100 g of KH_2SO_4 , 10 g of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 1 g of Se) and 1,5 mL of concentrated sulfuric acid. The mixture was taken the a mineralizator left for at least 30 minutes or until that a limpid solution is obtained, being diluted soon after for 25 mL with distilled water. The samples are placed then into water (37 °C) for 15 minutes and the reading of the absorbances to 650 nm. The content of nitrogen was calculated in relation to a standard curve obtained with ammonium sulfate and the content of rude protein calculated multiplying the value of total nitrogen for 6,25. Lipid fraction understands mainly the fats although they are in her included other soluble substances in hexano, such as waxes, resins and some pigments. The extraction was made with 1g of sample in continuous extractor, using as solvent the anhydro hexane after 8 hours of refluxe, the recipient containing the lipidic extract was weighed, and calculated the amount of lipid contained in the sample. The carbohydrates tenor were determined by the method of the phenol-sulfuric, being used as reference pattern a solution of D-manose in the concentration of 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Dubois et al., 1956).

Viscosity Evaluation

The viscosity measures for the galactomannana sample were accomplished in a BROOKFIELD model LVDV-III reometer with a coax cylinder, using the cones SC4-18, CP40 and ULA adaptor. For measures in the capillary system a UBBERLOHDE type viscosimeter were used (0,5 mm capillar). The viscosimetric parameters for the measured systems through the reometer were calculated by the program Rheocalc v 1.0. The temperature control were accomplished with a thermostable circulating water bath (BROOKFIELD model TC-500). The Huggins constant were determined applying the equation (HUGGINS, 1942):

$$\text{hred.} = \{[\text{H}] + \text{K}' \cdot (\text{C} \cdot [\text{H}])^2\}, \text{ where:}$$

K' = Huggins constant

C = concentration

[H] = intrinsic viscosity

Gum treatment with epychlorohydrin

Chromatographic columns (5 mL gel) were prepared with the obtained polysaccharides, closely following the procedure proposed by Appukutan (1977) and Fugita (1975). To each 6 g of cashew tree gum 1,0 mL of epychlorohydrin and 8,0 mL of NaOH 5M were added. The mixture was shaken manually, maintained for 24 hours to 40 °C and for 12 hours to 70 °C. After this period, the material was exhaustively washed with distilled water, until all the fine particles in suspension were removed. The material was homogenized and past in sieve of 30 mesh, being the

fine particles removed by exhausting wash with distilled water.

Chromatographic procedures

The exudate gum was treated with different concentrations of epychlorohydrin, in order to establish the best relation between epychlorohydrin and gum. The cross-linked gel was used as chromatographic matrix. The chromatographic procedures were accomplished in 5 mL columns. The columns were constructed leaving the gel (0,3 g) sedimentate itself by gravity and balanced with NaCl 0,15 M. Lectins rich samples were applied and left in contact with the gel for 30 minutes. The elution initially was made with the same balance solution, followed by beta-alanine (0.1M, pH 2.6) elution (in NaCl 0.15M pH 2.6. The elution was accomplished to a constant flow and the obtained fractions had their absorbances determined at 280 nm (Figure 1).

Haemagglutinating activity

The method described by Moreira and Perrone (1977) was followed, in the determination of the haemagglutinating activity. Thus, the erythrocytes, diluted to 2% were added to dilutions of the samples, in tubes, where it was added 100 μ L of NaCl 0,15M. In the first tube, it was increased 100mL of the sample and seriate dilutions (1/2, 1/4, 1/8...), being homogenized completely before each transfer. Soon after it was added to all the wells 100mL an erythrocyte suspension to 2%. Tubes were incubated to 37 °C for 30 minutes and, later left in rest for more 30 minutes at room temperature. The results were expressed as specific activity (UH/mg protein), where an UH still represents the inverse of the largest dilution capable to agglutinate erythrocytes.

PAGE-SDS Electrophoresis

The electrophoresis experiments in polyacrylamide gel in presence of SDS and (beta-mercaptoethanol) they were accomplished according to the technique of Laemmli (1970), being used a gel of application of 3,5% of acrylamide in Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 buffer and a separation gel containing 12,5% of acrylamide in Tris-HCl 3 M, pH 8,8 buffer, adapted for the use in plates measuring 10 x 8 cm (System Hoefer SE 250 - Pharmacia Biotech). The freeze-dried samples (10mg/mL) were dissolved in Tris-HCl 3M, pH 8,3 buffer, containing SDS 10%, beta-mercaptaethanol, blue of bromophenol 0,02% and soon after incubated to 110 °C by 10 minutes. In order to increase the density, facilitating the application, it was still added sucrose crystals. Aliquots of 10mL of the treated samples were applied in the gel, and then submitted the a current of 40 mA during approximately one hour and 30 minutes. The visualization of the bands was made with Coomassie Brilliant Blue R-250

to 0,05% in methanol, acetic acid and water (1,0; 3,5; 8,0, v/v/v).

Results and Discussion

Cashew gum is a bark exudate of *A. occidentale*, a tree that grows wild in many tropical and subtropical countries. The tree is known for its nuts, used as a food ingredient, especially in oriental delicacies. Although cashew gum has not found many industrial uses, its application in the field of pharmacy should be suggested. The gum is a complex polysaccharide, comprising 61% galactose, 14% arabinose, 7% rhamnose, 8% glucose, 5% glucuronic acid and <2% other sugar residues. It has a highly branched galactan framework consisting of chains of (1 \rightarrow 3)-linked β -D-galactopyranosyl units with interspersed β (1 \rightarrow 6) linkages. The main aldobiouronic acid present is 6-O-(β -D-glucopyranosyluronic acid)-D-galactose (De Paula et al., 1998). Its further characterization is desirable, with a view to incorporating it in porous films or beads in combination with other polysaccharides or proteins, which has been currently studied.

The elementary analysis taken revealed: humidity (7,4%), total protein, taken through Kjeldahl method (0,5%), total lipids (0,06%), fibers (0,95%) and ashes (0,95%). The carbohydrates were 98%. While there were no non-reductive sugars in saccharose, the content of reductive sugars (in glucose) was 1,9%. The ash composition showed: Ca (0,14%), Mg (0,14%), P (0,005%) and Fe (1,25%). The total energy content was around 284 kcal/100g gum.

In dilute solutions of polymers, where molecules are widely separated, the viscosity shows slight shear rate dependence. Increasing polymer concentration, a stage is reached at which the polymer coils interpenetrate and the physical contact changes the flow behavior. The gum is a mixture of acid polysaccharides containing various metal ions as neutralized cations. The nature and content of these constituents depend on the composition of the soil upon the trees grew. The major cations of *A. occidentale* L. are K^+ , Na^+ , Ca^{+2} and Mg^{+2} . The crude *A. occidentale* gum, containing these cations tends to be naturally transformed into Na salt, after purification our dialysis against NaCl 0,15 M. The results regarding to cashew gum dispersion show thinning non-newtonian flow behavior. If no intermolecular interaction occurs, the viscosity of the diluted gum solution decreases due the screening of charge and contraction of the macromolecule in the presence of counter-ion. As the gum concentration increases, the effect of the interaction between polysaccharide molecules over the reduced viscosity becomes predominant, reflected in changes in the huggins viscosity slope parameter, k_H . A little decrease of viscosity was observed for the solution at different gum concentrations. Because of the dispersion shear-thinning nature, the cashew gum should be suitable for application as a thickening agent.

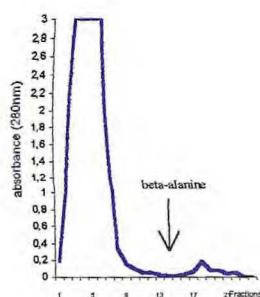


Figure 1 – *Artocarpus incisa* seed extract affinity chromatography

The cross-linked gum was used as an affinity matrix for the isolation of lectins. When protein crude extracts containing lectins with different specificity, it was found that either glucose and galactose lectins were retained (Table 1).

Table 1 – Some lectins retained on *A. occidentale* cross-linked exudate gum column

Plant Specie	Lectin Specificity	Peak Activity (HU/mg)
<i>Ricinnus comunis</i>	Galactose/ N-acetyl-gal	91,98
<i>Artocarpus incisa</i>	Galactose	2639,17
<i>Abrus precatorius</i>	Galactose	62,99
<i>Canavalia ensiformis</i>	Glucose/ Mannose	952,73
<i>Cratykia floribunda</i>	Glucose/ Mannose	344,08
<i>Pachira aquatica</i>	Galactose/ N-acetyl-D-gal	1032,25

It was observed a strong haemagglutinating activity (UH) at the non-retained peaks. The electrophoresis pattern reinforced the gum ability in retaining such as galactose, glucose and N-acetyl-galactosamine specific lectins. This data support the idea of using cashew tree exudate gum as an efficient protein ligand (biological recognition, biosensor), stimulating future lectin identification or purification procedures.

Conclusions

The use of natural gums, taken from the exudates and extracts of plants, have been given a strong impulse due to the many and lucrative possibilities for industrialization. The use of cashew tree exudate gum polysaccharydes may turn into an useful tool for modern biotechnology among underdeveloped Countries. The use of that gum as a possible matrix for chromatographic procedures appears to be an efficient method for detection and

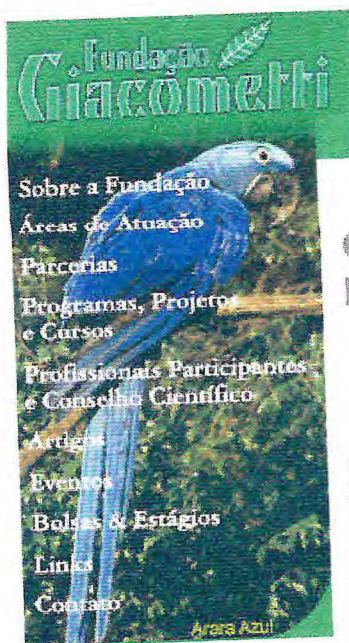
elucidation of specific plant lectins. This is due to the presence of uronic acids, galactose, rhamnose, galactosyl, glucuronic acid and 4-O-methyl glucuronic acid residues in the branches of the exudate gum structure (De Paula, 1995). Affinity adsorbents derived from lectins should be useful not only for preparative chromatography but also for other purpose such as analysis and diagnosis, In addition, glycosylated polymers could be used as models of glycoproteins and as affinity supports to purify and identify complementary proteins from tissue extracts. It could also be suggested the possibility to use the exudate gum from cashew tree as a biotechnological tool for glycobiology and glycobiocchemistry nowadays.

Acknowledgements

This work was supported by FUNCAP, CNPq and CAPES.

References

1. P.S. Appukuttan; A. Surolia; B.K. Bachhawat *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 1977, 14, 382-384.
2. W.E Baethgen & M.M. Alley. *Commun. Soil Sci. Plant. Anal.*, 20 (9/10): 961-969, 1989.
3. H.J. Cordemoy *Les plantes à gommés et à résines*. Encyclopédie Scientifique, Paris, 1911.
4. R.C.M. De Paula, P.M. Budd. & J.F. Rodrigues. *Polym. Int.*; 44: 55-60, 1997.
5. R.C.M. De Paula; F. Healthy, & M. Budd. *Polym. Int.*; 45: 27-35, 1998.
6. G. De Pinto, M. Martinez, J.A Mendonza, E. Ocando & C. Rivas. *Biochem. Syst. Ecol.*, 23: 151-156, 1995.
7. M. Dubois, K.A Giles, J.K. Hamilton, P.A Rebers, & F. Smith. *Anal. Chem.*; 28: 350-356, 1956.
8. Y. Fugita; K. Oishi; Suzuki; K. Imahory *Biochemistry*. 1975, 14, 4465-4470.
9. P.K. Ghosal. & S. Thakur. *Carbohydr. Res.*; 98: 75-83, 1981.
10. M. Huggins *J. Am. Chem. Soc.*; 64: 1712, 1942.
11. U.K. Laemmli *Nature*, (227): 680
12. G. León de Pinto, M. Martinez, O Gutierrez de Gotera, A Vera, C. Rivas. & E. Ocando. *Biochem. Syst. Ecol.*; 23: 849-853, 1995.
13. G. León de Pinto, M. Martinez, A. Ludovic de Corredor, C. Rivas & E. Ocando *Phytochemistry*; 37: 1311-1315, 1994.
14. G. León de Pinto, M. Martinez, J.A. Mendonza, J. Avila, E. Ocando. & C. Rivas. *Carbohydr. Res.*; 290: 97-103, 1996.
15. G. León de Pinto, M. Nava, M. Martinez & C. Rivas. *Biochem. Syst. Ecol.*; 21: 463-466, 1993.
16. G. León de Pinto, N. Paz de Moncada, O Gutierrez de Gotera, C. Rivas. & E. Ocando. *Biochem. Syst. Ecol.*; 2: 291-295, 1995.
17. R.A. Moreira; J.C. Perrone. *Plant Physiology*, 1977, 59, 783-787.



Bioquímica e Biotecnologia de Proteínas e Glicoconjugados - Potencial Biotecnológico da Resina Exsudada de Cajueiro

Raquel da Silveira Nogueira Lima

The characterization study and functional properties of the cashew tree exsudate gum (resine) has revealed that it is a promising source of plant biomaterials, as well as opened the field for possible chemotaxonomical studies. The evaluation of the potential use of exudate plant gums arises as a new strategy in the glycobiochemical field. This way, by stabilizing the polysaccharides and using them as chromatographic matrices and/or proteic ligands, the identification and efficient isolation of glicoproteins or lectins should be possible.

[VOLTAR PARA O ÍNDICE DE ARTIGOS](#)



SCN Quadra 01 Bloco "C" Edifício Brasília Trade Center Sala 901
CEP 70710-902, Brasília - Distrito Federal - Brasil
Telefones: +55 61 325-5560 Fax: +55 61 328-9604
Contatos com Luiz Rech (Diretor Administrativo) e Miriam Miller
(Assessora Técnica)

Copyright © 2000, Fundação Giacometti. Todos os direitos reservados.
Criado e desenvolvido por Daniel Silva.





Botany 2002

Botany in the Curriculum: Integrating Research and Teaching

**August 2-4: Forum on
Botanical Education &
Outreach**

**August 4-7: Annual
Scientific Conference**

**Pyle Conference
Center
University of
Wisconsin
Madison, Wisconsin**

**Selected Abstract
Viewer**

1. Phytochemical Section

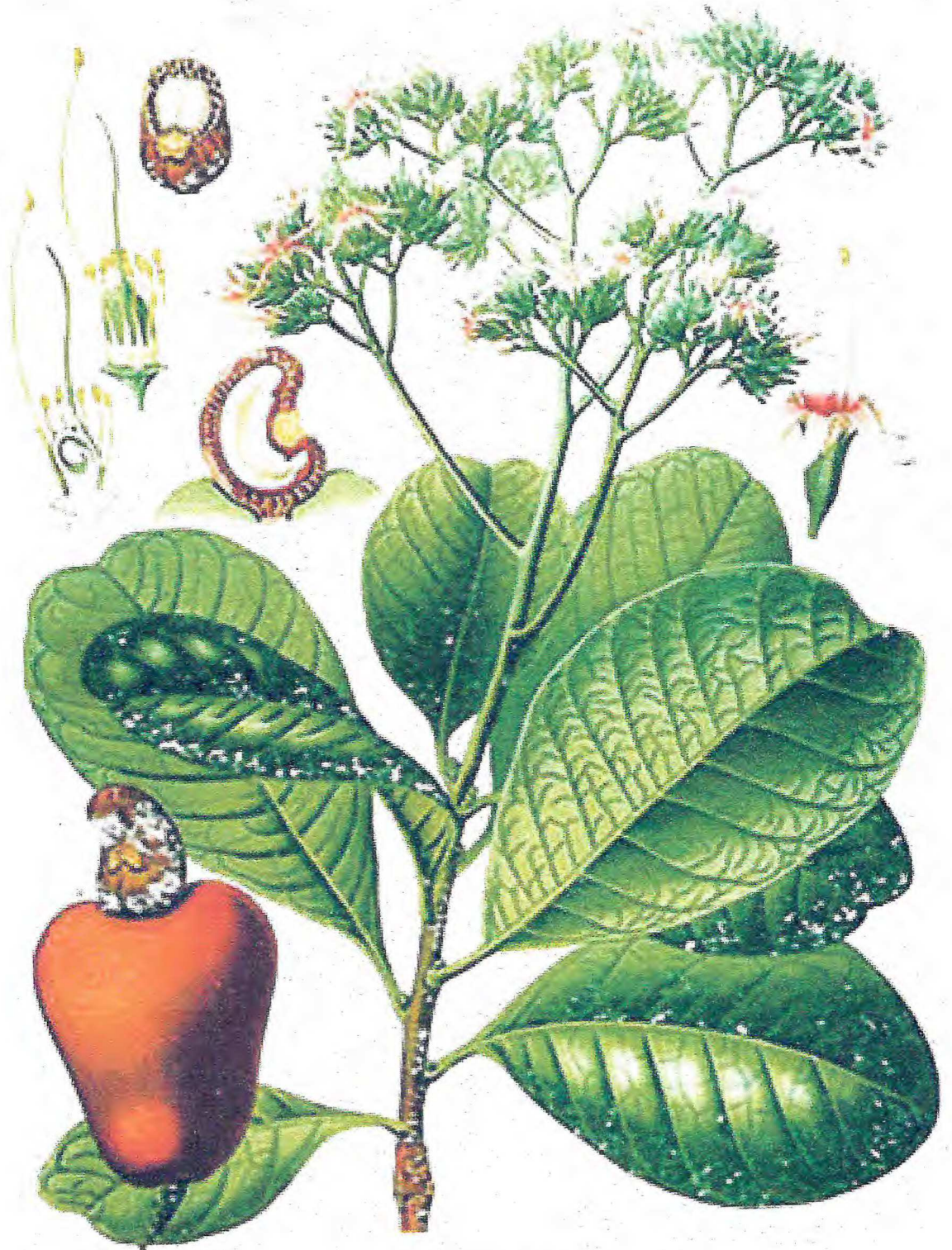
[LIMA, RAQUEL DA SILVEIRA NOGUEIRA](#)^{1*}, DALVA MARIA BUENO²,
ARLETE APARECIDA SOARES³, and RENATO DE AZEVEDO
MOREIRA¹. ¹Lectins and Glycoconjugates Laboratory, Department of
Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceara, Fortaleza,
Brazil; ²Plant Anatomy and Morphology Laboratory, Tropical Agroindustry

Company (EMBRAPA), Fortaleza, Ceara, Brazil; ³Plant Anatomy and Morphology Laboratory, Department of Biology, Federal University of Ceara, Fortaleza, Brazil. - Cashew tree exudate gum biological characterization: a new biotechnological tool for tropical countries.

Cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) belongs to the botanical family *Anacardiaceae*, this one consisting of 60-80 genera and about 600 species distributed pantropically, but with a few genera in northern temperate regions and native to the semi-arid coasts of Brazil. This family presents resinous trees, shrubs and climbers. This resin is synthesized in the epithelial cells lining pockets or canals and then secreted into these internal cavities. Synthesis generally occurs in all organs of the plant, with different quantitative composition; appearing to be genetically controlled and little influenced by environmental conditions. The gum is similar to gum arabic and may be used as to a substitute for liquid glue for paper, in the pharmaceutical cosmetic industry and as an agglutinant for capsules and pills. The use of natural gums, taken from the exudates and extracts of plants, have been given a strong impulse due to the many and lucrative possibilities for industrialization and to the excellent international market. By natural exudation or by means of incisions, a gum or resin of a yellowish color, soluble in water. In the present work, we studied the resin/gum secretory ducts that appear along the cashew tree bark, using histological procedures and microscopic observations. The gum was studied at its crude state and then chemically treated (insolubilization process) in order to obtain a kind of gel (microbiofilm). Besides the chemical composition proteins, lipids, sugars, fibers and ashes), it was studied the gum's electric conductivity, searching for a possible use as a biosensor for plant proteins.

[Return to Previous Page](#)

Anacardiaceae



Anacardium occidentale L.