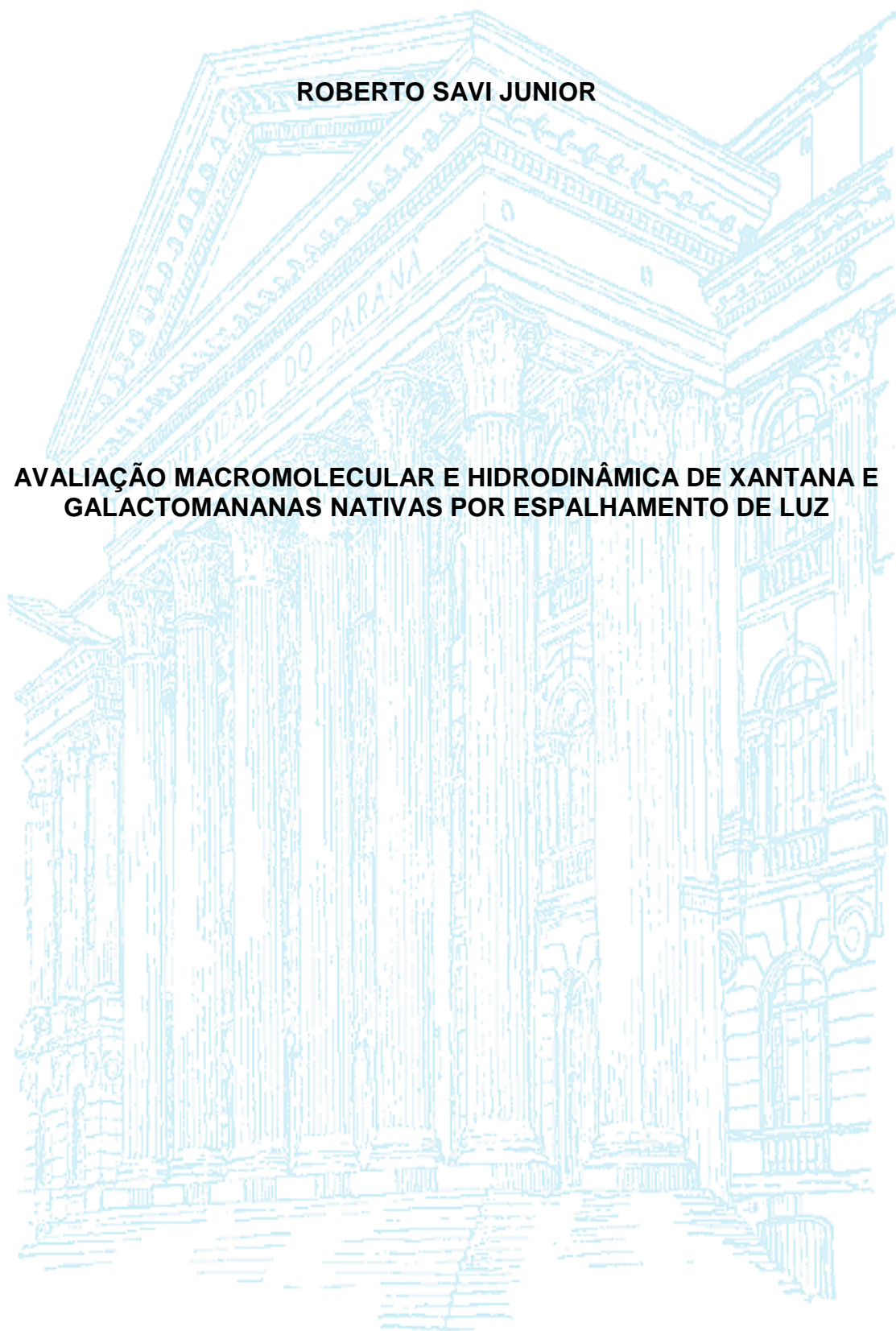


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS – BIOQUÍMICA**

ROBERTO SAVI JUNIOR

**AVALIAÇÃO MACROMOLECULAR E HIDRODINÂMICA DE XANTANA E
GALACTOMANANAS NATIVAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ**



**CURITIBA
2014**

ROBERTO SAVI JUNIOR

**AVALIAÇÃO MACROMOLECULAR E HIDRODINÂMICA DE XANTANA E
GALACTOMANANAS NATIVAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação
em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná como requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciências - Bioquímica.
Matrícula: 02 de abril de 2012.

Orientadora: Prof^a. Joana Léa Meira Silveira
Co-orientador: Prof. Rilton Alves de Freitas
Colaboradora: Dra. Heidegrid Koop

**CURITIBA
2014**

TERMO DE APROVAÇÃO

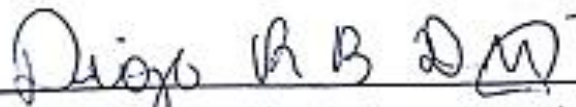
Roberto Savi Junior

AVALIAÇÃO MACROMOLECULAR E HIDRODINÂMICA DE XANTANA E GALACTOMANANAS NATIVAS POR ESPALHAMENTO DE LUZ E REOLOGIA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.^a Dra. Joana Léa Meira Silveira – Presidente
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof. Dr. Diogo Ricardo Bazan Ducatti
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr^a Caroline Mellinger Silva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Curitiba, 10 de março de 2014

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo crescimento científico e às agências de fomento CAPES, CNPq, REUni, Rede Nanoglicobiotec pelo amparo financeiro.

À professora Dra. Joana Léa Meira Silveira por aceitar ser minha orientadora nessa caminhada científica, pela paciência, pelas oportunidades de aprendizado, pelas correções, pela transmissão de força e conhecimento e pelo seu grandessíssimo empenho no desenvolvimento dessa formação.

Ao professor Dr. Rilton Alves de Freitas por aceitar ser meu coorientador durante o mestrado, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência, pelos conselhos profissionais, pelas ideias inovadoras e visão de trabalho.

Ao Professor Dr. Diogo Ducatti pelos conhecimentos transmitidos na disciplina de mecanismos de reação, sem os quais seria impossível realizar esse estudo, pela prontidão em auxiliar nas dúvidas que apareciam no decorrer do trabalho e por ter aceitado ser banca do mesmo.

À professora Dra. Caroline Mellinger Silva, minha madrinha de graduação, por ter sido uma verdadeira mentora científica e ter me inspirado a estudar a Bioquímica aprofundadamente, pelas aulas ministradas, pelas broncas e elogios, pela dedicação, pelo carinho e por ter aceito o convite de ser banca deste trabalho.

À minha Família pelo apoio, força, amor, e compreensão durante os últimos quatro anos em que estive envolvido com esta pesquisa de modo a muitas vezes acabar por ficar ausente.

Ao meu pai Roberto pelo amor, ensinamentos de força, coragem, persistência, responsabilidade, conselhos, ética, exemplo de profissionalismo e por ser o meu Herói.

À minha mãe Élita por todo amor, carinho, compreensão, pelos momentos em que precisei de seu colo, conselhos, força, coragem, fé e por ser minha Heroína.

Às minhas irmãs Day e Dany pelo amor, momentos de amizade, alegria, desabafo, apoio e todo cuidado que tiveram com o caçula.

À minha namorada Amanda pelo amor, momentos de cumplicidade, apoio, pelas alegrias, paciência e carinho.

Ao meu tio Rogério pelos conselhos, inspirações, orientações, desabafos, força e pelo incentivo em continuar progredindo.

À minha tia Marcia pela forma de ver o mundo, pelo exemplo de fé e perseverança e pelo apoio nos momentos em que precisei.

À professora Dra. Maria Rita Sierakovski pelas grandiosas contribuições no trabalho, pela prontidão às atividades que se fizeram necessárias no decorrer do mestrado, pela avaliação do projeto e pelo amparo técnico-científico direto e indireto.

À Heide pela amizade construída no decorrer dos últimos quatro anos, por ter me ensinado como trabalhar com muita paciência e grandeza, pelos diversos momentos de descontração, pelo incentivo e por ter me transmitido sua forma de pensar a pesquisa.

À Eliz por toda a ajuda, disponibilidade, boa vontade, por ter me transmitido segurança em trabalhar no HPSEC-MALLS, pelas vezes que me ajudou no laboratório, pelos cafezinhos que tomamos bem cedo, pelas vezes que me salvou de ficar trancado para fora do laboratório e por ter se tornado uma grande amiga.

À Marina pela amizade, pelas ideias inovadoras, pelas longas conversas e por me transmitir a coragem e o incentivo de buscar o novo.

À Shayla pela amizade, momentos de descontração, pelas inúmeras vezes que me ajudou com experimentais e com as disciplinas, pelas vezes que me salvou de ficar trancado para fora do laboratório e pelas palavras de incentivo.

Ao professor Dr. Guilherme Sasaki pela ajuda e amparo científico nos raciocínios de ressonância, pela visão diferenciada da ciência, pelas palavras de incentivo e amizade.

A professora Fernanda Simas pela amizade, pelo apoio, pelas conversas sobre perspectivas futuras, pela inspiração, pelo apoio e por ter sido umas das pessoas que me fez querer seguir essa carreira de pesquisador.

Ao professor Dr. Miguel Noseda pela inspiração como pesquisador, pela amizade e pelo incentivo.

Aos professores Dr. Diogo Ducatti e Dr. Thales Cipriani pela supervisão durante o estágio em docência realizado no segundo semestre do mestrado, e pelas suas contribuições de cunho inspiratório na realização do mesmo.

À professora Dra. Agnes de Paula Scheer pelo empréstimo do equipamento onde realizamos a granulometria dos polissacarídeos estudados no trabalho.

Ao professor Gilberto Abate pelo empréstimo do Fotômetro de chama utilizado para quantificar os íons da xantana.

Ao professor Dr. Lucas Ferrari pelos ensinamentos que possibilitaram o desenvolvimento do programa de análise de dados do experimento de mistura automática contínua com espalhamento de luz.

Aos meus colegas de iniciação científica Edson, Rodrigo e particularmente ao Augusto que teve uma participação bastante importante no caminhar da iniciação pela amizade que tínhamos que tornou o desenvolvimento bem mais facilitado.

Aos alunos de iniciação científica Surya e José, pela ajuda com a parte de extração e purificação das galactomananas e a Jéssica e Luana pelo apoio e cafezinhos no laboratório.

Aos amigos André, Augusto, Felipe, Hamilton, Jairo, Tamashiro e Tisca pelos momentos em que tudo que eu precisava era dos bons e velhos amigos, para conversar, dar risada, tomar uma cerveja, fazer um churrasco, ganhar coragem e folego para começar a estudar novamente.

Aos amigos Cassiano e Pauline que conheci no laboratório ao lado, com quem desenvolvi uma grande amizade e que levarei além dessa etapa da minha vida.

Ao Larry, pelas grandiosas discussões desde sobre os mais não-convencionais raciocínios de físico-química até cálculos simples de molaridade, os quais sentia uma necessidade incrível de confirmar, e, também pelo incentivo em procurar o novo.

Ao Arquimedes e Diego, quero dizer Popó, pela ajuda no RMN, pela visão de pesquisa, pelas conversas sobre as possibilidades de experimentos e ensaios e pelas tantas vezes que me direcionaram a um caminho mais facilitado.

Aos amigos Alex, Lucas e Euclides, que tornaram mais prazeroso o tempo investido nas disciplinas do mestrado e também nas horas de tomar aquele cafezinho esperto.

A minha turma de mestrado, 2012-2014, pela companhia nas disciplinas formativas, pela ajuda que todos deram quando requisitados, pelos momentos de descontração, desabafo, bagunça, estudo, bagunça, seminários, bagunça, referatas, apoio e amizade.

"Se fui capaz de ver mais longe, é porque me apoiei em ombros de gigantes."
Sir Isaak Newton

"Você pode encarar um erro como uma
besteira a ser esquecida, ou como um
resultado que aponta uma nova direção."
Steve Jobs

RESUMO

A interação binária entre xantana e galactomananas de guapuruvu [G - relação manose:galactose (Man:Gal) 2,5:1] e bracinga (B - Man:Gal 1,1:1) vem sendo bastante estudada. O mecanismo de interação entre esses polissacarídeos envolve a ligação de hidrogênio formada entre o oxigênio do hemiacetal da manose interna do trissacarídeo de xantana, com o hidrogênio da hidroxila ligada a C-2 da manose livre da cadeia principal da galactomanana, entretanto, pouco se sabe sobre a influência dos contraíons nesta interação, visto que os estudos realizados até hoje utilizam a xantana em seu estado sódico. A xantana pode assumir duas conformações estruturais de acordo com sua composição iônica, sendo hélice simples e hélice dupla (sódica). O presente trabalho possui duas frentes, sendo a primeira delas a purificação da xantana através de um protocolo envolvendo autoclave e diálises exaustivas contra água ultra pura (tipo I), visando obter xantana em hélice simples, e a segunda avaliar, utilizando técnicas reológicas, a interação com as galactomananas B e G em água e adicionando sal à solução. Foi observado o comportamento da xantana em hélice simples pela metodologia em tempo real de mistura automática contínua acoplada a detectores de espalhamento de luz laser, índice de refração e viscosimétrico, e pôde-se concluir que mesmo após a disponibilização de NaCl, a molécula de xantana purificada não torna a formar hélice dupla. Quanto a interação binária entre os polissacarídeos, concluiu-se que a xantana em hélice simples não é capaz de interagir tão fortemente com as galactomananas a ponto de formar um gel forte, como acontece com a xantana em hélice dupla quando misturada com galactomananas.

Palavras chave: Xantana, Galactomanana, Influência iônica, conformação macromolecular, interação sinérgica.

ABSTRACT

The binary interaction between xanthan and galactomannans from guapuruvu [G - mannose:galactose ratio (Man:Gal) 2.5:1] and bracinga (B - Man:Gal 1.1:1) has been extensively studied. The mechanism of interaction between these polysaccharides involves the hydrogen bond formed between the hemiacetal oxygen in the internal mannose unit of the trisaccharide portion of xanthan with the hydroxyl hydrogen attached to C-2 of the free mannose main chain of galactomannan. However, little is known about the influence of the counterions in this interaction, as most studies conducted to the present time use xanthan in its sodium state. Xanthan can take two structural conformations according to their ionic composition: single stranded and double stranded (sodium). This study has two fronts, the first one being the purification of xanthan by a protocol involving autoclaving and exhaustive dialysis against Type I-ultra pure water to obtain single stranded xanthan, and the second part, using rheological techniques to evaluate xanthan interaction with galactomannans (B and G) in water and saline solutions. It was observed that the behavior of single stranded xanthan by using real-time automatic continuous mixing coupled to laser light scattering, refractive index and viscometric detectors, and concluded that even after adding NaCl, purified xanthan molecules cannot form double helix structures. Regarding the binary interaction between both polysaccharides, we concluded that single stranded xanthan is not able to make strong interactions with galactomannans, so as to form a strong gel, as double helix xanthan is.

Key words: Xanthan, Galactomannan, Ionic influence, macromolecular conformation, synergic interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema de um segmento da estrutura genérica da xantana
- Figura 2 Esquema de um segmento da estrutura genérica de galactomanana
- Figura 3 Árvores das espécies de estudo
- Figura 4 Esquema da interação sinérgica entre xantana e galactomanana indicando as ligações de hidrogênio
- Figura 5 Esquema original do HPSEC-MALLS-RI
- Figura 6 Exemplo de pico polidisperso (M_w/M_n)
- Figura 7 Sistema de mistura automática contínua
- Figura 8 Relação de R_g e R_h
- Figura 9 Tensão e taxa de cisalhamento
- Figura 10 Fluxo entre duas placas paralelas
- Figura 11 Comportamentos de fluxo
- Figura 12 Exemplo do spin nuclear
- Figura 13 Movimento de precessão
- Figura 14 Diagrama de purificação da xantana
- Figura 15 Diferenças de tamanho das sementes de guapuruvu e bracatinga.
- Figura 16 Foto do equipamento de cromatografia de exclusão estérica com multi detecção - HPSEC-MALLS-RI-VIS/UV – UFPR
- Figura 17 Análise de homogeneidade de galactomananas
- Figura 18 Comparação de dados de massa molar média ponderal em peso com dados de literatura
- Figura 19 Análise de homogeneidade da xantana
- Figura 20 Varredura de frequência de mistura binária de xantana purificada e galactomananas (B e G)
- Figura 21 Varredura de frequência de mistura binária de xantana comercial e galactomananas (B e G)
- Figura 22 Comparação de curvas de viscosidade dos polissacarídeos isoladamente e em mistura sinérgica

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	Equação de Stokes Einstein
Equação 2	Equação de Rayleigh-Zimm-Debye-Gans
Equação 3	Equação da Constante Óptica
Equação 4	Equação do R_{θ}
Equação 5	Equação do dn/dc
Equação 6	Equação do Vetor de espalhamento de luz laser
Equação 7	Equação da conversão de voltagem do detector de índice de refração para concentração
Equação 8	Equação de Huggins
Equação 9.a	Equação de conversão de voltagem do detector viscosimétrico em viscosidade inicial
Equação 9.b	Equação de conversão da viscosidade inicial em Viscosidade específica
Equação 9.c	Equação de conversão de viscosidade específica em viscosidade reduzida e aproximação para viscosidade intrínseca.
Equação 10	Equação de Flory Fox
Equação 11.a	Equação de determinação do Fator de expansão de Flory Fox
Equação 11.b	Equação de Mark-Houwink-Sakurada
Equação 12	Equação de determinação de L_p Worm-like
Equação 13	Equação de auto-correlação
Equação 14	Equação de determinação de fator de forma
Equação 15	Equação da taxa de cisalhamento
Equação 16	Dedução da unidade de medida da viscosidade I
Equação 17	Dedução da unidade de medida da viscosidade II
Equação 18	Equação básica da Ressonância magnética nuclear
Equação 19	Equação da taxa de giro magnético
Equação 20.a	Equação da reta
Equação 20.b	Equação do coeficiente angular de Pearson
Equação 21	Equação do coeficiente linear de Pearson
Equação 22	Equação do r

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACM	<i>Automatic Continuous Mixing</i> – (Mistura automática contínua)
A_2	Segundo coeficiente de difusão virial
B	Galactomanana de Bracatinga
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> – (Espalhamento de Luz Dinâmico)
G	Galactomanana de Guapuruvu
ε	Fator de expansão de Flory Fox
φ_0	Coeficiente de Flory Fox
$g_{(2)}(\tau)$	Intensidade de Luz no momento τ
$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento
HPSEC	<i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i> – (Cromatografia Líquida de Exclusão Estérica de Alta Eficiência)
L_p	Comprimento de Persistência
MALLS	<i>Multi Angle Laser Light Scattering</i> – (Espalhamento de luz laser multi-ângulos)
M_n	Massa molar média ponderal em número
M_w	Massa molar média ponderal em peso
M_z	Massa molar média ponderal Z
NaCl	Cloreto de Sódio
η_i	Viscosidade inicial
η_{sp}	Viscosidade específica
$[\eta]$	Viscosidade intrínseca
ρ	Fator de forma
Pd	Índice de polidispersão
Rec	Taxa de Recuperação
RMN	Ressonância magnética nuclear
R_g	Raio de giro
R_h	Raio hidrodinâmico
RI	<i>Refractive Index</i> – (Índice de Refração)
SLS	Static Light Scattering – (Espalhaento de Luz Estático)
τ	τ (tempo DLS e tensão de cisalhamento para reologia)
VIS	<i>Viscometer</i> – (Detector viscosimétrico)
$X_{\text{-FFCS}}$	Xantana comercial grau de pureza MERCK.
$X_{\text{-P}}$	Xantana purificada

LISTA DE TABELAS

- | | |
|----------|--|
| Tabela 1 | Valores de importação e exportação de polissacádídeos no ano de 2013 |
| Tabela 2 | Valores de ρ para partículas com topologia típicas |
| Tabela 3 | Parâmetros macromoleculares das amostras de galactomanana de bracinga e guapuruvu |
| Tabela 4 | Parâmetros físico-químicos e macromoleculares das amostras de xantana |
| Tabela 5 | Parâmetros macromoleculares de xantana e galactomanana de guapuruvu obtidos por espalhamento de luz dinâmico |

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 XANTANA E SUAS DIFERENTES CONFORMAÇÕES MOLECULARES .	19
2.2 PECULIARIDADES E SEMELHANÇAS DAS GALACTOMANANAS COMERCIAIS E NATIVAS	21
2.3 O SISTEMA BINÁRIO XANTANA:GALACTOMANANA	25
2.4 ESPALHAMENTO DE LUZ LASER	28
2.4.1 Histórico da técnica	28
2.4.2 Espalhamento de luz laser estático – SLS	30
2.4.2.1 Mistura automática contínua – ACM.....	33
2.4.2.2 Viscosidade em sistema de fluxo	35
2.4.2.3 Comprimento de Persistência	37
2.4.3 Espalhamento de luz dinâmico - DLS	37
2.5 REOLOGIA	39
2.5.1 Histórico da técnica	39
2.5.2 Parâmetros reológicos e relações físicas	40
2.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	43
2.6.1 Histórico da técnica	43
2.6.2 Princípios de eletromagnetismo e radiofrequência associados à ressonância magnética nuclear.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 MATERIAL DE ESTUDO.....	46
3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	46
3.2.1 Purificação da xantana	46
3.2.2 Extração das galactomananas.....	47
3.3 HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DE MASSAS	49

3.4	REOLOGIA	50
3.5	FOTOMETRIA DE CHAMA	51
3.6	SISTEMA DE MISTURA AUTOMÁTICA CONTÍNUA ACOPLADO A ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO (ACM-SLS).....	52
3.7	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	54
4.	<i>ARTIGO INERENTE À CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL DA XANTANA INDUZIDA POR MEIO SALINO</i>	<i>55</i>
5.	<i>DEMAIS RESULTADOS E DISCUSSÕES</i>	<i>72</i>
5.1	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS GALACTOMANANAS	72
5.2	XANTANA.....	74
5.3	ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	77
5.4	REOLOGIA DAS MISTURAS	78
7.	<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	<i>81</i>
	<i>ANEXOS.....</i>	<i>82</i>
	<i>REFERÊNCIAS.....</i>	<i>89</i>

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são alvo de estudo para formação de géis, principalmente utilizados nas indústrias alimentícia, cosmética ou farmacêutica, e até mesmo na construção civil (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2010; SALVALAGGIO, 2010; KOOP *et al.* 2009, 2012 e 2013).

Eles podem ser utilizados tanto isoladamente como concomitantemente com outros polímeros como proteínas ou outras classes de polissacarídeos, e, dentre as possíveis combinações destaca-se a interação xantana e galactomanana. A interação sinérgica desses dois polissacarídeos gera um gel, enquanto que isoladamente ambos originam soluções viscosas (MORRIS *et al.*, 1980; WANG *et al.*, 2002; KHOURRIEH *et al.*, 2007, SANDOLO *et al.*, 2010).

Várias pesquisas foram realizadas visando esclarecer as interações inter e intramoleculares desses polissacarídeos, entretanto fatores como a força iônica dos solventes, temperatura de mistura, proporção polissacarídica e a estabilidade do sistema necessitam de mais investigação. Existe ainda, a necessidade de valorizar as galactomananas nativas na discussão de mistura de xantana com galactomanana. (WANG *et al.*, 2002; JOSHI *et al.*, 2003; RICHTER *et al.*, 2005; KHOURYEH *et al.*, 2007; CERQUEIRA *et al.*, 2009; SANDOLO *et al.*, 2010; SALVALAGGIO *et al.*, 2010).

Ressalta-se nesse trabalho a magnitude dos custos a que a indústria brasileira é submetida com a importação das galactomananas comerciais. Dentre as fontes de galactomananas comerciais destacam-se as obtidas de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* (guar) e *Ceratonia siliqua* (alfarroba). No ano de 2013 foram importados mais de 450.000 Kg de alfarroba, o que representa um valor de mais de 7,3 milhões de reais e para goma guar esses valores foram de 3.400.000 Kg e 53 milhões de reais, no mesmo período (ALICEWEB2, 2014).

É possível encontrar no Brasil galactomananas equivalentes às utilizadas comercialmente no endosperma de sementes de bracinga (B) e de guapuruvu (G). Entretanto, é preciso observar a razão manose/galactose (Man/Gal) das mesmas, pois, dentre outros fatores, a interação sinérgica xantana:galactomanana é dependente do grau de ramificação das galactomananas (DEA *et al.*, 1975; BRESOLIN *et al.*, 1998 e 1999; KOOP *et al.* 2009, 2012 e 2013).

A xantana (X) é um exopolissacarídeo proveniente da bactéria *Xantomonas campestris* e tem como característica principal ser um polieletrólito, o que lhe confere diferentes conformações macromoleculares em função da temperatura e condição salina do solvente (MORRIS *et al.*, 1977; BRESOLIN *et al.*, 1996, 1998 e 1999, BERGMANN *et al.*, 2008).

Da mesma forma que a relação Man/Gal, a conformação estrutural da xantana influencia diretamente a sinergia de interação xantana:galactomanana. Portanto, esse trabalho buscou avaliar as diferentes condições iônicas e de proporções de xantana:galactomananas (X:B e X:G) utilizando técnicas de espalhamento de luz laser e reológicas.

O grupo de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná vem contribuindo para a elucidação da estrutura das galactomananas nativas e dos mecanismos de interação da sinergia entre xantana e galactomanana. Além da valorização das galactomananas de origem nativas no estudo de interação xantana:galactomanana, este trabalho contribui para ampliar as perspectivas de aplicações industriais das galactomananas nativas (GANTER *et al.*, 1992, 1993, 1995, 1997 e 2001; BRESOLIN *et al.*, 1996, 1998 e 1999; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000; CARBONERO *et al.*, 2003; VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; SALVALAGGIO, 2010; SOUZA *et al.*, 2010; VALENGA *et al.*, 2011; KOOP, *et al.* 2009, 2012 e 2013; BENTO *et al.*, 2013).

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o mecanismo de interação do sistema binário xantana:galactomanana em diferentes condições iônicas tendo como modelo as galactomananas nativas provenientes de endosperma de *Schizolobium parahybae* (guapuruvu) e sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga) por espalhamento de luz laser dinâmico e estático, em tempo real, e comparar o modelo otimizado com a técnica de reologia.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e purificar as galactomananas do endosperma de *Schizolobium parahybae* (G) e de sementes de *Mimosa scabrella* (B) por extração aquosa seguida de precipitação alcoólica.
- Purificar a xantana (comercial) através de solubilização aquosa, autoclave, centrifugação e diálise contra água ultrapura tipo I.
- Desenvolver um método de preparo de amostras de xantana e galactomananas em meio aquoso para análise por espalhamento de luz laser.
- Determinar o raio hidrodinâmico (R_h) dos polissacarídeos xantana e galactomanana em meio aquoso por espalhamento de luz dinâmico (DLS).
- Determinar os parâmetros físico-químicos dos polissacarídeos xantana e galactomananas em meio aquoso por espalhamento de luz estático (SLS).
- Avaliar a conformação da xantana em concentrações crescentes de cloreto de sódio em sistema de fluxo automático contínuo acoplado a espalhamento de luz laser estático (ACM-SLS), obtendo parâmetros em tempo real, tais como: Segundo coeficiente de difusão virial (A_2), comprimento de persistência (L_p), massa molar média ponderal em número (M_w) e raio de giração (R_g).
- Caracterizar o comportamento reológico da mistura binária xantana:galactomanana selecionada previamente por espalhamento de luz.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 XANTANA E SUAS DIFERENTES CONFORMAÇÕES MOLECULARES

A xantana é um exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Xantomonas campestris*, este polissacarídeo tem como característica importante a capacidade viscosante e por isso é utilizado, entre outras matérias primas, pela indústria alimentícia e farmacêutica como agente espessante e estabilizante.

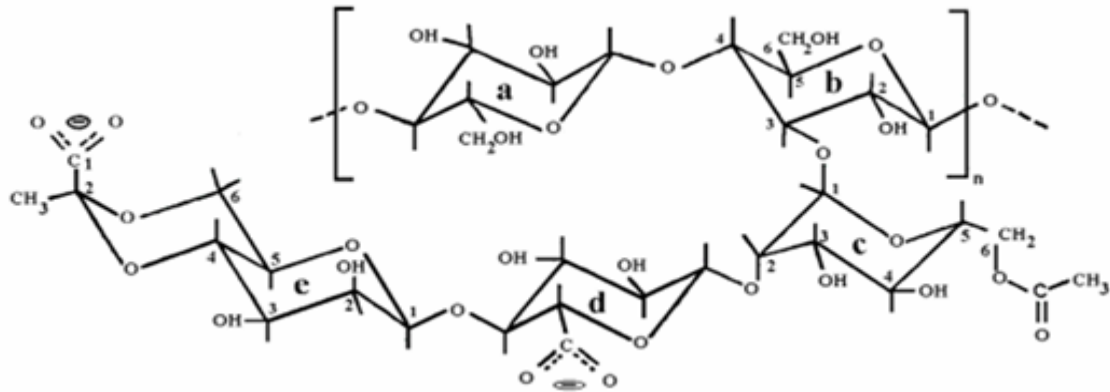
Segundo Dea e colaboradores (1977) a estrutura química da xantana (figura 1) é constituída por unidades de D-glucopiranosil unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, substituída, a cada unidade de glucose, em O-3 por um trissacarídeo composto por ácido glucurônico ligado a duas unidades de D-manopiranosil. A unidade de manose interna possui um grupamento acetil em C-6 e a manose terminal é substituída em C-4 e C-6 por um grupamento piruvato. A cadeia lateral liga-se à principal por uma ligação $\alpha(1\rightarrow3)$, a manose interna liga-se ao ácido glucurônico por uma ligação $\beta(1\rightarrow2)$ e por fim o ácido glucurônico liga-se à manose externa por uma ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (DEA *et al.*, 1977; MORRIS *et al.*, 1977; MILAS *et al.*, 1986; STANKOWSKI *et al.*, 1993; RODD *et al.*, 2000; BERGMANN *et al.*, 2008; TAKO *et al.*, 1984 e 2010).

A presença dos grupamentos ácido glucurônico e piruvato confere a xantana seu caráter iônico, isto é de um polieletrólito. A molécula apresenta a característica de transição conformacional dependente da temperatura, condição iônica, pH e concentrações poliméricas como descrito por Meyer e colaboradores (1993). (STANKOWSKI *et al.*, 1993; RODD *et al.*, 2000; BERGMANN *et al.*, 2008).

Quando em condições de baixa temperatura ou concentrações reduzidas de íons em solução apresenta-se em forma ordenada, permanecendo em forma rígida, enquanto em temperaturas superiores a 45°C ou mais de [0,04 M] de cloreto de sódio (NaCl) sua conformação é definida como cadeia aleatória ou aberta. Bergmann e colaboradores (2008) descreveram o perfil de estabilidade da xantana contra cátions bivalentes, os autores defenderam que a presença de íons, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , é capaz de blindar os grupamentos iônicos da cadeia lateral da xantana, descreveram também diferentes tempos e potências de sonicação da xantana e seu perfil de degradação por sonicação através da técnica de

cromatografia por exclusão estérica (MORRIS *et al.*, 1977; BRESOLIN *et al.*, 1996, 1998 e 1999, BERGMANN *et al.*, 2008).

FIGURA 1- ESQUEMA DE UM SEGMENTO DA ESTRUTURA GENÉRICA DA XANTANA



Legenda: Unidades de: glucose não substituída (a), glucose substituída (b), manose interna com substituinte acetil (c), ácido glucurônico (d) e manose externa com substituição por grupo piruvato (e) (DEA *et al.*, 1977).

Os grupamentos ionizáveis de xantana em solução iônica ficam mais expostos conferindo-lhe a conformação desordenada, enquanto na condição de ausência de íons em solução sua conformação é denominada como ordenada ou “em hélice” (MILAS *et al.*, 1986; BRESOLIN *et al.*, 1996 e 1998; BERGMANN *et al.*, 2008).

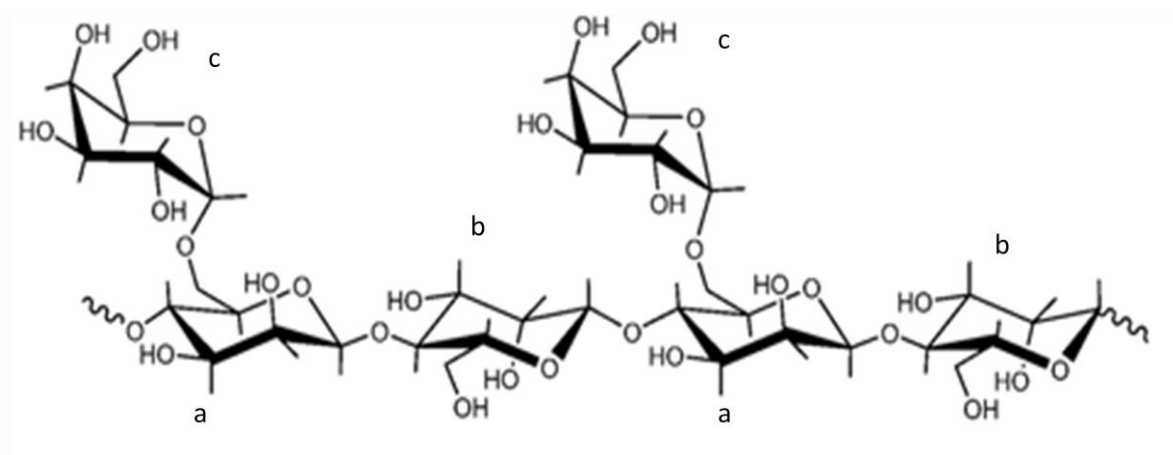
Há ainda a possibilidade de a molécula formar uma estrutura de dupla hélice, e isso também pode influenciar os seus parâmetros físico-químicos. (LECOURTIER *et al.*, 1986; MULLER *et al.*, 1986). Contudo existe ainda uma lacuna a respeito do comportamento dessa molécula na isenção total de íons, pois mesmo na molécula nativa existem contraíons ligados à estrutura, e esses são reponsáveis por manter a molécula em sua conformação. Sendo assim surge uma segunda pergunta sobre como a interação sinérgica aconteceria em uma isenção completa dos contraíons presentes na xantana nativa.

2.2 PECULIARIDADES E SEMELHANÇAS DAS GALACTOMANANAS COMERCIAIS E NATIVAS

As galactomananas estão presentes no endosperma das sementes da maioria das espécies de plantas, como as leguminosas (*Leguminosae*), essas são constituídas geralmente de uma cadeia linear principal de manose ligadas $\beta(1\rightarrow4)$ com substituições em C-6 por α -D-galactose (figura 2) (DEA *et al.*, 1975; GANTER *et al.*, 1995; PETKOWICZ *et al.*, 1998; POLLARD *et al.*, 2006, SALVALAGGIO, 2010, BENTO *et al.*, 2013).

As galactomananas são aplicadas na indústria, especialmente nas áreas petroquímica, alimentícia, farmacêutica, cosmética, papel, tecidos, minério e explosivo (SRIVASTAVA *et al.*, 2005). Dentre as galactomananas comerciais mais comumente utilizadas, encontram-se a goma guar, alfarroba e tara, obtidas do endosperma das sementes das espécies *Cyamopsis tetragonolobus*, *Ceratonia siliqua* e *Caesalpinia spinosa*, respectivamente (ERNANI, 1994; POLLARD *et al.*, 2010).

FIGURA 2 –ESQUEMA DE UM SEGMENTO DA ESTRUTURA GENÉRICA DE GALACTOMANANA



Legenda: a) Manoses da cadeia principal substituídas. B) Manoses da cadeia principal não substituídas. C) Galactoses ligadas à manoses da cadeia principal em C-6 (GANTER *et al.*, 1995).

A relação manose/galactose (Man/Gal) afeta tanto o tamanho molecular e estrutura quanto a solubilidade das galactomananas, portanto é uma característica

determinante para a capacidade das moléculas interagirem entre si e com outros polissacarídeos (MCCLEARY *et al.*, 1981; SECOUARD *et al.*, 2007; POLLARD *et al.*, 2007). O grau de substituição por unidades de D-galactose da galactomanana é diretamente proporcional a sua solubilidade em solventes aquosos, pois essas unidades substituintes são capazes de fazer ligações de hidrogênio com as moléculas de água. DOYLE *et al.* (2006) realizaram um trabalho com galactomananas em que foram adicionados outros monossacarídeos à solução, em diferentes concentrações, para avaliar a viscosidade da solução, e, uma de suas conclusões foi que a relação Man/Gal é mandatória na solubilidade e viscosidade da galactomanana (DEA *et al.*, 1986, DOYLE *et al.*, 2006).

O Grupo de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR vem estudando há mais de 40 anos a estrutura e o comportamento físico-químico de galactomananas (GANTER *et al.*, 1992, 1993, 1995, 1997 e 2001; BRESOLIN *et al.*, 1996, 1998 e 1999; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000; CARBONERO *et al.*, 2003; VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; SALVALAGGIO, 2010; SOUZA *et al.*, 2010; VALENGA *et al.*, 2011; KOOP, *et al.* 2009, 2012 e 2013; BENTO *et al.*, 2013). Dentre os estudos, Ganter e colaboradores (1995) analisaram três galactomananas provindas do endosperma das sementes de leguminosas brasileiras: a *Mimosa scabrella* (bracatinga), a *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) e o *Schizolobium parahybae* (guapuruvu). Com o intuito de caracterizar as galactomananas, os autores concluíram que a relação Man/Gal é de aproximadamente 1,1/1; 1,5/1 e 3/1, respectivamente.

Ganter *et al.* (2001) avaliaram a degalactozilação de galactomananas através de hidrólise enzimática, utilizando duas enzimas diferentes. Os autores utilizaram técnicas de espalhamento de luz estático em tempo real (TDSLS) e cromatografia de exclusão estérica e descreveram uma complementaridade entre as técnicas em estudos desse gênero.

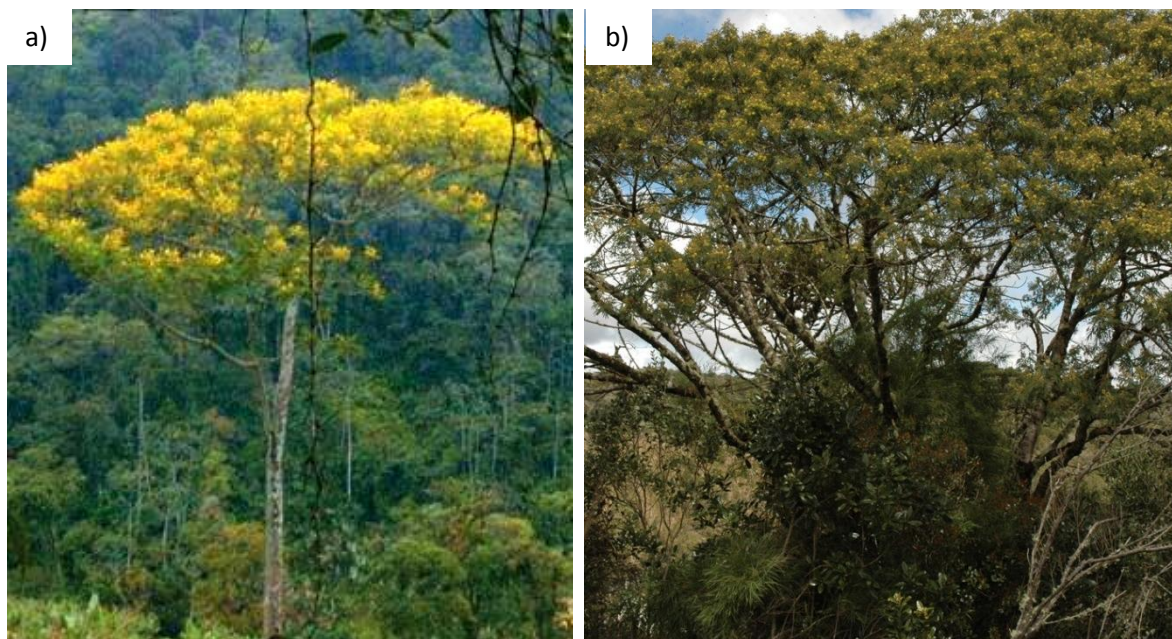
Recentemente, Salvalaggio e colaboradores (2010) avaliaram a otimização do processo de obtenção de galactomananas nativas (guaouruvu, bracatinga e barbatimão) por espalhamento de luz laser estático acoplado a um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPSEC-MALLS-RI). Os autores concluíram que para cada fonte de galactomanana houve um tempo de extração (na metodologia descrita pelos mesmos como direta) mais eficiente em relação ao rendimento obtido, ao comportamento molecular em solução e às características físico-químicas calculadas por HPSEC-MALLS-RI (SALVALAGGIO, 2010).

Segundo Dea *et al.* (1975) as galactomananas em meio aquoso apresentam uma conformação do tipo enovelada (“random coil”), um estado que só é revertido a formas mais organizadas em condições favoráveis de agregação ou interação com outros biopolímeros, como exemplo a xantana. Essa interação promove modificações de suas propriedades físico-químicas, causando o efeito sinérgico como aumento na viscosidade da mistura ou mesmo a geleificação (CUI *et al.*, 2006).

O presente trabalho avaliou galactomananas provenientes do endosperma de sementes de guapuruvu (G), e das sementes de bracatinga (B). Essas galactomananas foram escolhidas pelos seus valores de razão M/G, que são respectivamente o maior e o menor, estudados por Salvalaggio e colaboradores em 2010.

O guapuruvu (Figura 3.a) pertence à subfamília *Caesalpinoideae* e é característica do sul do estado da Bahia, regiões de Mata Atlântica e estados do Sul e Sudeste do Brasil (CARVALHO, 1994; ERNANI, 1994). Enquanto a bracatinga (Figura 3.b) pertence à subfamília *Mimosoideae* e é encontrada nos estados das regiões Sudeste e Sul do Brasil. É cultivada em altitudes superiores a 900 metros, bastante abundante no estado do Paraná (CARVALHO, 1994; MENDES *et al.*, 2008). Ressalta-se a importância do estudo dessas espécies devido ao fato de serem árvores nativas brasileiras, por terem um potencial de utilização interessante para o desenvolvimento nacional e pelas galactomananas de seus endospermas já terem sido caracterizadas estruturalmente pelo Grupo de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR.

FIGURA 3 – ÁRVORES DAS ESPÉCIES DE ESTUDO



NOTA: a) Árvore de Guapuruvu*. b) Árvore de Bracatinga**. *Fonte: Planta Sonya (2014) ** Fonte: Wikipedia.

As galactomananas nativas de fonte nacional são inexploradas industrialmente, mesmo com a ampla biodiversidade encontrada no país (AZERO *et al.*, 2002). No Brasil, a importação de polissacarídeos supera a exportação, o custo de importação de alfarroba no período de 2013 foi superior a 60 milhões de reais e inexistente histórico de exportação conforme demonstrado na tabela 1 (ALICEWEB2, 2014).

TABELA 1 – VALORES DE IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NO ANO DE 2013

Amostra	Valor importado (R\$)	Massa (Kg)
Alfarroba	7.359.195,28	464.886
Guar	53.687.181,99	3.409.348

NOTA: Dados extraídos do site do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio exterior.

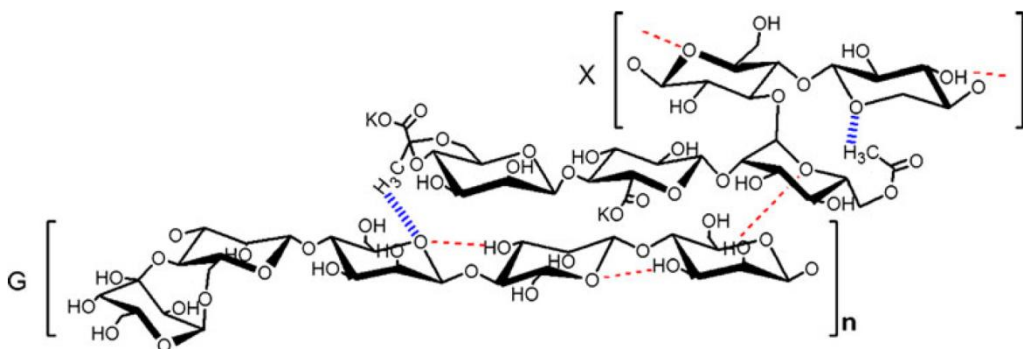
Sendo assim, o aprofundamento das investigações das características estruturais e macromoleculares das galactomananas se fazem necessários para que

as fontes nacionais sejam utilizadas e assim possam contribuir para o crescimento econômico do país (CUNHA *et al.*, 2009).

2.3 O SISTEMA BINÁRIO XANTANA:GALACTOMANANA

O modelo de interação de xantana e galactomanana foi apontado pela primeira vez por Rocks (1971) e continuou sendo investigado por outros grupos de pesquisadores como é o caso de Dea *et al.* (1977), Morris *et al.* (1977) e Cairns *et al.* (1986). Esses autores estudaram a interação sem levar em conta o papel da cadeia lateral da xantana. Pesquisas posteriores avaliaram esse fenômeno considerando a carga iônica da cadeia, pois segundo Tako *et al.* (1984) é por meio do trissacarídeo (ácido glucurônico ligado a duas unidades de D-manopiranosil - figura 1) que ocorre a interação com a galactomanana (TAKO *et al.*, 1984). Tako (1991), cita que existe ligação de hidrogênio entre o oxigênio do hemiacetal da manose interna do trissacarídeo de xantana, com o hidrogênio da hidroxila ligada a C-2 da manose da cadeia principal das galactomanana (interação - figura 4), e, ainda existe a possibilidade de atração eletrostática entre o oxigênio do cetil da galactomanana com o hidrogênio do ácido glucurônico do trissacarídeo, da cadeia lateral da molécula de xantana.

FIGURA 4 – ESQUEMA DA INTERAÇÃO SINÉRGICA ENTRE XANTANA E GALACTOMANANA INDICANDO AS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO



Legenda: Linhas pontilhadas (vermelhas) representam as ligações de hidrogênio e linhas paralelas (azuis) representam as forças van der waals (TAKO, *et al.* 2010).

A partir de análises reológicas Khouryieh *et al.* (2007) observaram um aumento da interação entre a xantana desacetilada (0,250 g/L) e galactomanana de guar (0,750 g/L), quando comparada a xantana nativa nas mesmas condições de concentração e em diferentes forças iônicas. Os autores demonstraram que existe incompatibilidade entre os polissacarídeos estudados quando a força iônica da solução salina atinge 40mM (NaCl). Já em concentração salina de 2 mM e em água pura existe a formação de gel. Esses resultados corroboraram para o modelo proposto por Tako *et al.* (1984).

Além da influência da estrutura química da xantana na interação xantana:galactomanana, ressalta-se a importância da relação Man/Gal da galactomanana. Morris *et al.* (1980) concluíram que misturas de xantana:galactomanana de alfarroba, tara e guar (Man/Gal 3,5/1; 3/1; 1,5/1, respectivamente) formam géis com diferentes forças de interação. Segundo os pesquisadores houve diminuição da interação sinérgica com o aumento da relação Man/Gal.

O Grupo de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR, em trabalhos realizados por Bresolin *et al.* (1996), compararam as galactomananas B e G em sistema binário com a xantana em água e concentração salina de NaCl 10 mM. Os autores concluíram que a relação Man/Gal influencia a interação sinérgica em ambas as condições de solvente. Foram obtidos géis mais rígidos em água e com a galactomanana G. Bresolin *et al.* (1998) propuseram, por calorimetria, o modelo de interação de xantana e galactomanana de guapuruvu buscando demonstrar a indução da conformação da xantana para a forma ordenada pela galactomanana. Os autores propuseram em 1999 que o mesmo fenômeno pode acontecer com galactomananas altamente substituídas como a proveniente de sementes de bracinga, contudo em menor intensidade.

Wang *et al.* (2002) estudaram a interação de xantana e galactomanana de alfarroba, em proporções: 20, 40, 60 e 80% de xantana com 80, 60, 40 e 20% de galactomanana, utilizando técnicas de cromatografia em gel permeação acoplada a viscosímetro, em três diferentes condições para a xantana: em concentração salina de 40 mM, em água e, desacetilada, em água. Os autores propuseram que a formação de gel é dependente da estrutura química da xantana pela presença do trissacarídeo da cadeia lateral (ácido glucurônico ligado a duas unidades de D-manopiranosil - figura 1), e também da força iônica da solução. Os autores descrevem ainda que além da presença de sal ser importante para estabilizar a

conformação em hélice da xantana, em concentração salina de 40 mM, foi necessário maior proporção de xantana para interagir de forma sinérgica com a galactomanana.

O fenômeno de alteração da conformação também já foi descrito por Bresolin e colaboradores (1998) que propuseram que a concentração de NaCl 40 mM induziu a conformação desordenada da molécula de xantana.

Ainda, tratando sobre as forças iônicas do solvente, Bresolin *et al.* (1998) testaram diferentes concentrações salinas para misturas de xantana e galactomanana de *Schizolobium parahybae*, a 25 e 60°C, para avaliar como esta concentração poderia alterar a conformação da xantana e influenciar na sinergia entre os polissacarídeos. Os autores propuseram que em concentrações salinas abaixo de 10 mM há desorganização da estrutura da xantana, com isso há interferência na rigidez do gel formado propondo que concentrações mais altas do que esse valor acabam por incompatibilizar o sistema.

Richter *et al.* (2005) propuseram um modelo de monitoramento do processo de termorreversibilidade da geleificação entre xantana e galactomanana de alfarroba em água a 4 g/L. Os autores observaram por ressonância magnética nuclear de próton ($^1\text{H-RMN}$) que a 50°C o sistema passa a apresentar pré-geleificação, e utilizando técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) notaram que o aumento da temperatura de 49,1 para 50,1°C passa a apresentar a formação do gel.

A interação sinérgica entre xantana e galactomanana foi recentemente estudada por Sandolo *et al.* (2010) utilizando espalhamento de luz dinâmico (DLS) e reologia. Os autores analisaram a mistura de xantana com galactomanana de alfarroba em solução aquosa em três proporções de xantana:galactomanana (1:1; 3:1 e 9:1), duas temperaturas de mistura diferentes (25 e 75°C) e concentração polimérica final de 1 g/L. O estudo propõe que tanto a proporção dos polissacarídeos quanto a temperatura influenciaram na intensidade de interação sinérgica. As proporções de xantana:galactomanana 1:1 (25 e 75°C), 9:1 (75°C) e 3:1 (25°C) apresentaram-se como gel, a proporção 3:1 (75°C) apontou um gel fraco enquanto a 9:1 (25°C) mostrou-se como uma solução viscosa. Estes resultados demonstram que pequenas modificações na temperatura de preparo ou mesmo a proporção entre xantana e galactomanana podem ser determinantes em interações entre os dois polímeros. Verificaram que as duas técnicas utilizadas se complementam, pois os dados de dimensão fractal obtidos pela reologia são compatíveis com os espectros de correlação do DLS, além de a técnica de DLS manter a estrutura original da

amostra enquanto a reologia possui a característica de deformar (SANDOLO *et al.*, 2010).

O presente trabalho aprofundou esses conhecimentos utilizando diferentes concentrações salinas (2 mM e 40 mM de NaCl), para a mistura de xantana:galactomanana (sob proporção de 50%), visando avaliar as transições conformacionais assumidas pela xantana e a influência na sinergia entre os polissacarídeos. Vale ressaltar que, previamente às análises de interação foi realizada purificação da xantana visando modificar sua conformação e disponibilizar os grupamentos iônicos moleculares para averiguar o comportamento macromolecular da xantana frente a redistribuição de íons, e, na interação com galactomananas na isenção iônica. As análises acima citadas foram monitoradas pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico e estático, em tempo real, e análises reológicas, levando em consideração concomitantemente a razão Man/Gal das galactomananas.

2.4 ESPALHAMENTO DE LUZ LASER

Dentre as possíveis técnicas de determinação de parâmetros macromoleculares pode-se ressaltar o espalhamento de luz laser, esse método é capaz de determinar de maneira absoluta a massa molar média ponderal em peso (M_w), a massa molar média ponderal em número (M_n), o raio de giração molecular (R_g), o Índice de polidispersão (Pd) e o segundo coeficiente de difusão virial (A_2) conforme descrito no item 2.4.2 desse trabalho.

2.4.1 Histórico da técnica

O estudo dessa técnica de espalhamento de luz laser iniciou com a definição de Einstein (1910) de que a luz consiste de partículas chamadas por ele de quanta, segundo Einstein a cada ciclo de frequência dos fótons poderia ser associada uma energia.

Em 1905 Einstein publicou, em sua tese e em publicação formal, o estudo do movimento browniano de partículas em solução utilizando a modelagem matemática de Stokes. Sutherland (1905) publicou simultaneamente um estudo do mesmo âmbito. O movimento browniano tem esse nome em homenagem a Robert Brown que descobriu experimentalmente o movimento aleatório de grãos de pólen de flores em suspensão na água (EINSTEIN, 1905; SUTHERLAND, 1905).

Nesse estudo Einstein demonstrou o movimento browniano a partir do cálculo do coeficiente de difusão (D) de uma partícula esférica utilizando como modelo a Lei de Stokes segundo a Equação 1, onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade e r o raio da partícula esférica.

$$D = \frac{K_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (\text{Equação 1})$$

Essa relação ficou conhecida como relação de Stokes-Einstein, e baseando-se nela RAMAN (1927) formulou o que se conhece como Efeito de Raman. Esse efeito descreve que o processo de vibração molecular quando perturbado por um feixe de laser [*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, portanto ondas eletromagnéticas ou quanta (EINSTEIN, 1905)] pode gerar espalhamento inelástico, isto é, a diferença da energia dos fótons absorvida e reemitida corresponde à energia necessária para excitar a molécula a um nível maior de vibração molecular (EINSTEIN, 1910; RAMAN, 1927).

Segundo Debye (1944), existem duas possíveis modelagens matemáticas para análise molecular, de espalhamento de luz, baseadas nas premissas estabelecidas por Lord Rayleigh. A primeira delas é para partículas menores do que $1/20$ do comprimento de onda do laser incidente, e a segunda contendo variáveis inerentes à molécula analisada, o solvente e o tipo de luz incidente. Em seguida, Zimm (1945 e 1948) determinou modelagens matemáticas para análise de moléculas em fluídos na condição em que o diâmetro molecular é menor que $1/20$ do comprimento de onda do laser.

2.4.2 Espalhamento de luz laser estático – SLS

Os princípios estabelecidos por Einstein, Raman, Debye e Zimm foram estudados por diferentes autores da área de mecânica quântica e físico-química gerando a equação de Rayleigh-Zimm-Debye-Gans (Equação 2) (WYATT, 1993; REED, 1995 e 1996).

$$\frac{Kc}{R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} + \frac{\langle S^2 \rangle_z}{3 M_w} * q^2 + 2A_2c \quad (\text{Equação 2})$$

Nessa equação tem-se K sendo a constante óptica (Equação 3), c a concentração da amostra, R_{θ} a intensidade normalizada de luz espalhada (Equação 4), M_w a massa molar média ponderal em peso, q o vetor de espalhamento (Equação 5), $\langle S^2 \rangle_z$ o quadrado da soma das médias das distâncias intramoleculares até o centro de massa da molécula (tratado daqui por diante como quadrado do raio de giro - R_g^2) e, por fim, A_2 o segundo coeficiente de difusão virial (WYATT, 1993; MURPHY, 1997; REED, 1995 e 1996; STRELITZKI *et al.*, 1999; KOSTANSKI *et al.*, 2004; NICOLAU *et al.*, 2009; SALVALAGIO, 2010).

$$K = \frac{2^2 * \pi^2 * 1,335^2 * \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{N_A * (\lambda)^4} \quad (\text{Equação 3})$$

A equação 3 demonstra a razão entre o produto dos quadrados de 2π , índice de refração da água e dn/dc (variação do índice de refração da solução em um dado incremento de concentração, expressa como g/ mL – Equação 5) da amostra pelo o produto do número de Avogadro e quarta potência do comprimento de onda do laser (HUGLIN, 1972).

$$R_{\theta} = \frac{\frac{V_{i(a)} - V_{i(s)}}{V_{i(tol)}} * 0,944 * 2258203,827}{(\lambda)^4} * N \quad (\text{Equação 4})$$

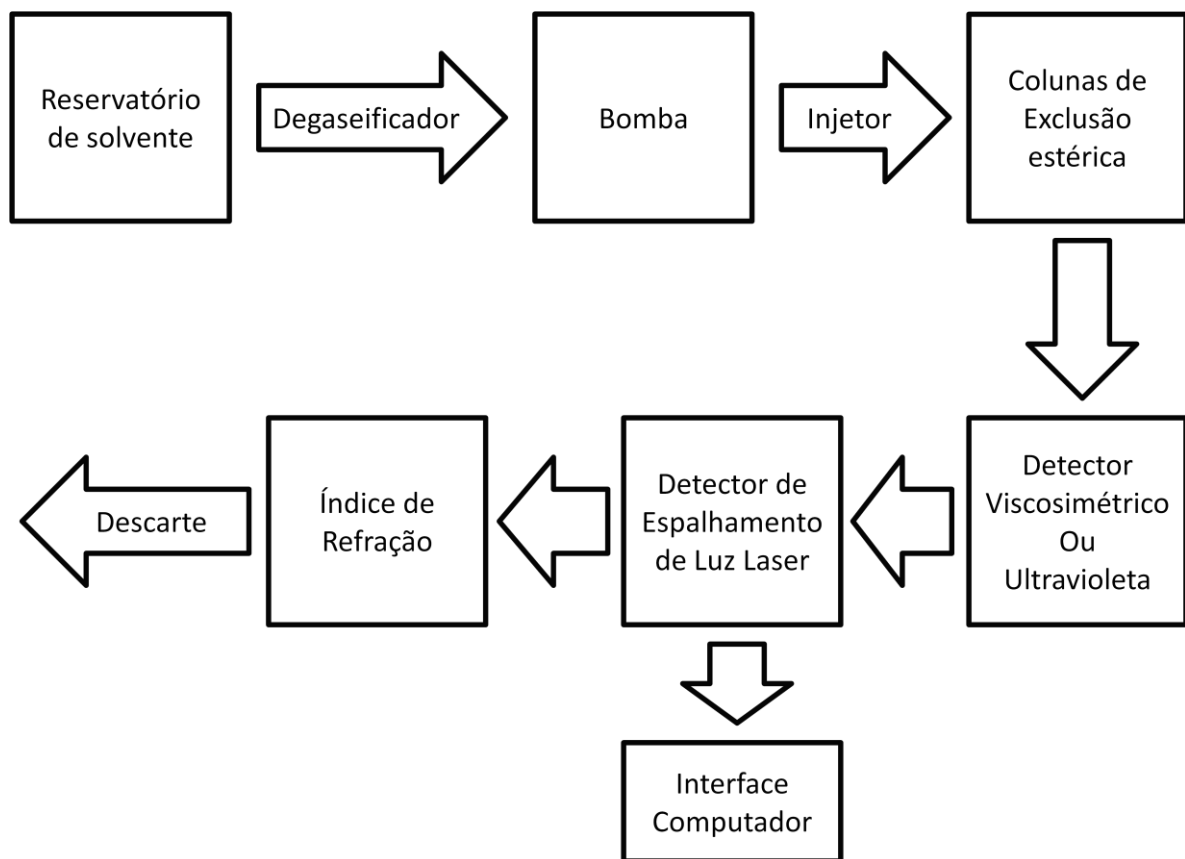
$$\nu = \left. \frac{dn}{dc} \right|_{c=0} = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{n - n_0}{c} \right) \quad (\text{Equação 5})$$

Na equação 4 têm-se que $V_{i(a)}$ é a voltagem da amostra, $V_{i(s)}$ a voltagem inicial do solvente, $V_{i(tol)}$ a voltagem inicial do tolueno, o valor 0,944 é referente a correção ótica e 2.258.203,827 é referente a calibração do equipamento, N é o fator de normalização para o ângulo de 90° e λ é a medida do comprimento de onda do laser. Finalmente na Equação 6, n é o índice de refração da água, λ é o comprimento de onda do laser e Θ o ângulo de observação do vetor.

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} * \text{sen} \left(\frac{\Theta}{2} \right) \quad (\text{Equação 6})$$

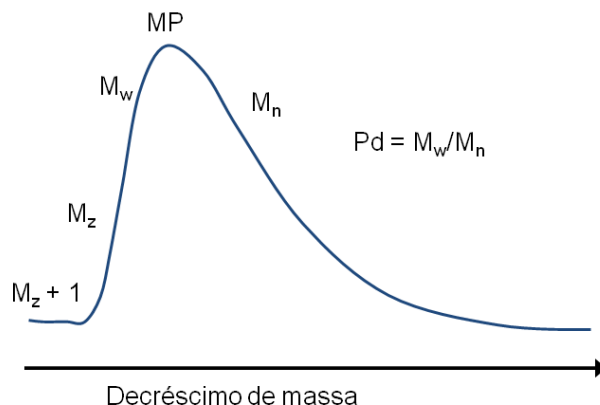
Wyatt (1993) introduziu a esse método a separação por exclusão estérica, então foi possível inferir sobre diferentes tamanhos moleculares em relação a suas concentrações conforme a figura 4. Essa inclusão possibilitou a diferenciação entre a massa molar média ponderal em número (M_n) e massa molar média ponderal em peso (M_w).

FIGURA 5 – ESQUEMA ORIGINAL DO HPSEC-MALLS-RI



Legenda: Sequência da análise: Fase móvel eluída do reservatório passando por um degaseificador, em seguida bombeada para o injetor e nesse momento a amostra é inserida no sistema, a fase móvel carregando a amostra passa pela fase estacionária (colunas) e em seguida o resultado da cromatografia é lido pelos detectores viscosimétrico ou ultravioleta, seguido do detector de espalhamento de luz laser e de índice de refração, então a amostra é descartada. FONTE: O Autor.

A técnica de cromatografia por exclusão estérica de alta performance acoplada a detector de espalhamento de luz laser multi ângulos e índice de refração (HPSEC-MALLS-RI) permite a análise macromolecular de biopolímeros, considerando que estas biomoléculas apresentam ampla diversidade estrutural e de composição. Além da massa molecular é possível obter o índice de polidispersão (Pd) (figura 5). Quanto mais homogênea for a distribuição das famílias de moléculas, mais próximo de 1 será o Pd, isto é a relação M_w/M_n será igual. A diferença entre M_w e M_n é basicamente que o primeiro é relacionado mais com peso da molécula do que com o número de moléculas, enquanto o segundo indica a média de peso da maioria das moléculas (SETTLE, 1997; KOSTANSKI *et al.*, 2004; AGILENT TECHNOLOGIES, 2013).

FIGURA 6 – EXEMPLO DE PICO POLIDISPERSO (M_w/M_n)

NOTA: Exemplo de pico polidisperso eluído por SEC de um polímero. M_z+1 refere-se às famílias de moléculas com maior massa, M_z às famílias com massa imediatamente inferior as M_z+1 , M_w refere-se às famílias em que a massa em peso é mais influente do que o número de moléculas com aquela massa, MP é a massa do pico e por fim M_n refere-se às famílias mais representadas estatisticamente e com menores massas. FONTE: O Autor.

Mais recentemente foram adicionados ao sistema HPSEC-MALLS-RI um detector viscosimétrico e um detector de ultravioleta (HPSEC-MALLS-RI-UV) após as colunas de exclusão estérica, esses são usados para determinar a viscosidade da amostra nas condições de cromatografia e se existem concentrações de proteínas (280 nm) na eluição apresentada, respectivamente.

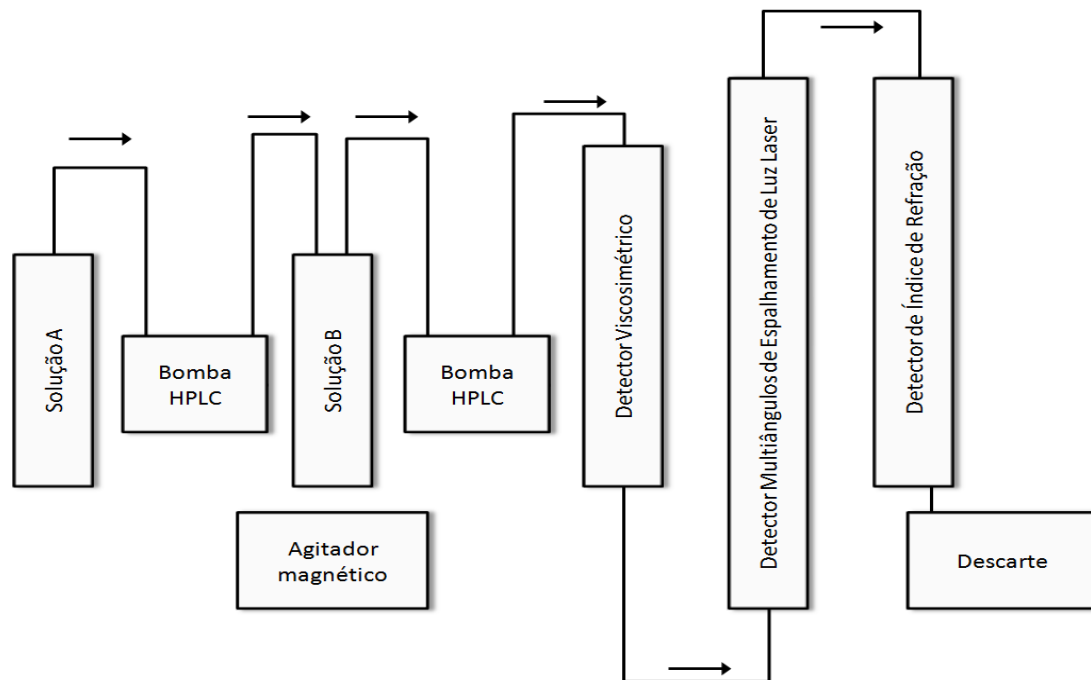
2.4.2.1 Mistura automática contínua – ACM

A técnica de espalhamento de luz estático (SLS) pode ser modificada do esquema demonstrado na figura 4 quando pretende-se realizar análise de mistura automática contínua de duas soluções. Desacoplando-se as colunas de cromatografia de gel permeação e inserindo uma bomba antes do sistema iniciar a eluição pela bomba original do equipamento obtém-se o sistema de mistura automática contínua (ACM) como demonstra a figura 6 (SORCI *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2011).

As soluções em análise da mesma molécula são contituídas uma com alta concentração salina (A) e outra solubilizada apenas em água ultrapura (B). O procedimento consiste na eluição da solução B pela bomba do equipamento, então são extraídos os dados de R_g e M_w , em seguida a solução A começa a ser

bombeada, no mesmo fluxo, sobre a solução B criando um gradiente de concentração. Há também a hipótese da solução A ser um polissacarídeo e a solução B ser outro, nesse caso as mesmas aferições são possíveis, contudo as informações devem ser processadas em função das proporções polissacarídicas.

FIGURA 7 – SISTEMA DE MISTURA AUTOMÁTICA CONTÍNUA



Legenda: Sequencia da análise: Solução A é bombeada para a solução B. Esta solução está sob constante agitação magnética e é bombeada para passar pelos detectores viscosimétrico, de espalhamento de luz laser e de índice de refração. FONTE: O AUTOR.

A partir dos dados obtidos pelo detector de índice de refração é possível extrair a concentração da solução (do solvente, NaCl) em tempo real através da conversão dada na Equação 7. A variação da voltagem medida (índice de refração) é multiplicada pelo fator de correção do equipamento ($5,858 \times 10^{-4}$ – calibração atual do detector de índice de refração do equipamento do Laboratório de Carboidratos Vegetais da UFPR) e dividida pelo dn/dc (do solvente, NaCl).

$$\Delta V \cdot Fc = \frac{dn}{dc} \cdot C$$

(Equação 7)

2.4.2.2 Viscosidade em sistema de fluxo

Conforme descrito anteriormente, é possível acoplar ao HPSEC-MALLS-RI o detector viscosimétrico, pois através dele é possível determinar a viscosidade relativa das amostras, sendo assim, para cada fração de concentração obtida em tempo real é possível correlacionar os parâmetros obtidos por espalhamento de luz laser (M_w , A_2 , R_g) com os valores da viscosidade relativa, obtendo assim parâmetros inerentes à conformação tridimensional da molécula (FREITAS *et al.*, 2005; DAKIA *et al.*, 2007; POLLARD *et al.*, 2010).

A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é uma propriedade molecular definida pelo volume hidrodinâmico (expressa em dL/g, pois está relacionada com o inverso da densidade do polímero em solução) ocupado pelas moléculas de determinada amostra isoladamente. Esse valor pode ser encontrado pela modelagem matemática de Huggins (Equação 8) que relaciona a viscosidade relativa (η_i) com a concentração da solução (c) e a constante de Huggins (K) com a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e concentração (c). Os valores da constante K indicam a condição de solubilidade no solvente, assim como o A_2 . Os valores de K para solvente na condição Θ esta entre 0,5 e 0,8 (KHOURYIEH *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009).

$$\frac{\eta_i}{c} = [\eta] + K \cdot [\eta]^2 \cdot c \quad \text{(Equação 8)}$$

Na análise de mistura automática contínua – ACM (item 2.4.2.1), proposto no presente trabalho é possível extrair os valores de voltagem da viscosidade relativa em função do gradiente de concentração salina do solvente. Para isso é preciso converter o sinal da voltagem em viscosidade relativa, seguida pela conversão para viscosidade específica e por fim a reduzida, isso é feito aplicando a Equação 9.a, 9.b e 9.c, respectivamente.

$$\eta_i = \frac{V_{(amostra)} - V_{(zero)}}{V_{(solvente)} - V_{(zero)}} \quad \text{(Equação 9.a)}$$

$$\eta_i - 1 = \eta_{sp} \quad (\text{Equação 9.b})$$

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = \eta_{red} \cong [\eta] \quad (\text{Equação 9.c})$$

Através da equação 10, desenvolvida por Flory-Fox (1953), é possível relacionar $[\eta]$ diretamente com o parâmetro φ_0 , que indica a viscosidade, e com R_g e inversamente com M_w (FREITAS *et al.*, 2005).

$$[\eta] = \frac{\varphi_0 \cdot 6^{3/2} \cdot R_g^3}{M_w} \quad (\text{Equação 10})$$

O parâmetro φ_0 é calculado a partir do fator de expansão (ε). O fator ε indica a razão das dimensões da cadeia molecular em determinado solvente, e, como pode ser observado na Equação 11.a, possui relação direta ao parâmetro α da equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 11.b) (YAMAKAWA, 1971; GIDLEY *et al.*, 1991; FREITAS *et al.*, 2005).

$$\varepsilon = 2 \cdot \alpha - 1 \quad (\text{Equação 11.a})$$

$$[\eta] = K \cdot M_w^\alpha \quad (\text{Equação 11.b})$$

Segundo Freitas *et al.* (2005) os parâmetros K e α da Equação 11.b podem ser relacionados à equação da reta do gráfico obtido através da relação de M_w e R_g , onde o coeficiente linear é K e o coeficiente angular refere-se a α .

2.4.2.3 Comprimento de Persistência

A partir da determinação do R_g , é possível calcular o comprimento de persistência (L_p), parâmetro que infere sobre a rigidez dos polímeros. No caso de moléculas com cadeias semiflexíveis, como a xantana, é possível aplicar o modelo “*worm-like chain*” (equação 12, onde a partir de dados do comprimento da unidade do mero [(unidade repetitiva) (L)] pode-se encontrar graficamente os valores compatíveis com o L_p , para xantana no L deve ser considerado o comprimento da unidade repetitiva que contém 5 monossacarídeos – 2 glucoses da cadeia principal e o trissacarídeo da cadeia lateral). O modelo “*worm-like chain*” é particularmente adequado para descrever polímeros com sucessivos segmentos que exibem certa cooperação, todos apontando para a mesma direção. Esse modelo é influenciado pela temperatura, e, para a xantana à temperatura ambiente a estrutura tridimensional do bastão é suavemente curvada e a 0 K totalmente rígida (SHO *et al.*, 1986; REED, *et al.*; 1991; DOI *et al.*, 1999).

$$R_g^2 = \frac{L \cdot L_p}{3} - L_p^2 + \frac{2 \cdot L_p^3}{L} - 2 \cdot \left(\frac{L_p^4}{L^2} \right) * \left[1 - \exp * \left(\frac{-L}{L_p} \right) \right] \quad (\text{Equação 12})$$

2.4.3 Espalhamento de luz dinâmico - DLS

O fator utilizado para análise de géis é o coeficiente de decaimento (μ) da função de correlação de intensidade de luz $g_{(2)}(\tau)$ normalizada (equação 13). Onde $g_{(2)}$ é a função de correlação de intensidade de espalhamento de luz em função do tempo (τ), e o parâmetro de decaimento exponencial (μ) (KONAK *et al.*, 1991; DALGLEISH *et al.*, 1995).

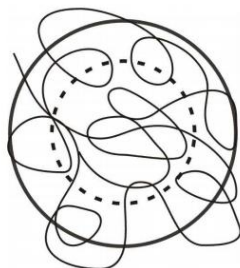
$$g_{(2)}(\tau) - 1 = \frac{(I_{(0)} \cdot I_{(t)})}{(I)^2} - 1 \tau^{-\mu} \quad (\text{Equação 13})$$

Quanto menor for o valor do coeficiente de decaimento (μ), mais rígida será a estrutura do gel formado enquanto soluções estão contidas entre 0,5 e 0,9 (SHIBAYAMA *et al.*, 2002; KOSTKO *et al.*, 2003).

O espalhamento de luz laser dinâmico é capaz de determinar o raio hidrodinâmico (R_h), esse parâmetro corresponde ao valor hipotético do raio de uma esfera rígida que difunde com a mesma velocidade da partícula em estudo, contudo como no estudo de polímeros complexos geralmente não se encontram esferas rígidas o R_h é calculado para levar em conta o grau de solvatação e hidratação do polímero (SCHÄRTL, 2007; GIACOMELLI, 2009).

Assim sendo, ao associar as técnicas de DLS e SLS é possível inferir sobre a forma da molécula estudada, basta calcular o parâmetro sensível à forma (ρ) (Equação 14) que é composto pela razão entre o R_g e R_h . Para ilustrar uma possível relação de R_g e R_h pode-se imaginar o exemplo da figura 7. A relação de forma do fator ρ para algumas topologias está definida na tabela 2 (BURCHARD, 2003; SCHÄRTL, 2007; GIACOMELLI, 2009).

FIGURA 8 – RELAÇÃO DE R_g E R_h



NOTA: A linha contínua desenhada ao acaso representa um polímero em solução. O círculo de linha pontilhada representa o Raio hidrodinâmico de uma esfera rígida com a mesma velocidade de difusão do polímero considerando a solvatação do mesmo. O círculo de linha contínua representa o Raio de giro que consiste da média da somatória dos raios internos do polímero. FONTE: GIACOMELLI, 2009.

$$\rho = \frac{R_g}{R_h}$$

(Equação 14)

TABELA 2 – VALORES DE ρ PARA PARTÍCULAS COM TOPOLOGIA TÍPICAS

Topologia	ρ
Esfera rígida homogênea	0,774
Condição Theta	1,504
Bom solvente	1,78
Esfera Oca	1,0
Microgel	0,3 ~0,5
Bastão rígido	> 2,0

NOTA: Tabela comparativa dos fatores de forma clássicos. FONTE: SCHÄRTL, 2007.

2.5 REOLOGIA

Outra técnica físico-química para análise de macromoléculas em solução é a reologia, esse nome deriva-se do grego *Rheos*, que quer dizer fluxo, e *Logos*, que significa estudo, conhecimento (SINKO, 2011).

2.5.1 Histórico da técnica

O termo Reologia foi utilizado pela primeira vez por BINGHAM e CRAWFORD, para descrever o fluxo e deformação em materiais líquidos e sólidos, respectivamente (SINKO, 2011).

Segundo SCHRAMM (2006), a definição de sólido ideal e fluído ideal é:

“Sólidos ideais se deformam elasticamente. A energia requerida para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida.

Fluidos ideais, tais como líquidos e gases, deformam-se irreversivelmente, eles fluem. A energia requerida para a deformação é dissipada sob a forma de calor e não pode ser recuperada pela remoção da tensão.”

O primeiro a postular uma lei matemática para a reometria (medida das propriedades reológicas) foi Sir Isaac Newton, em seu trabalho sobre mecânica

contínua, descreve que um fluido ideal é aquele em que as forças relacionadas à deformação (cisalhamento) e ao fluxo são sempre proporcionais. Newton também relacionou esses parâmetros em seu estudo sobre cálculo diferencial, e, por isso, postumamente, esse tipo de fluido passou a ser nomeado como fluido Newtoniano (SCHRAMM, 2006).

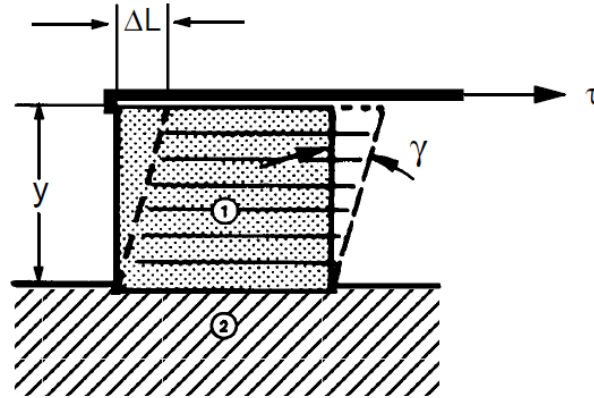
2.5.2 Parâmetros reológicos e relações físicas

O modelo matemático do fluido Newtoniano (Equação 15) relaciona tensão de cisalhamento (τ), viscosidade (η) e taxa de cisalhamento [$\dot{\gamma}$ (o ponto sobre a letra grega gamma indica que a taxa de cisalhamento é derivada do tempo da deformação causada pela ação de τ sobre a amostra)] (SCHRAMM, 2006; BATCHELOR, 2002).

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{Equação 15})$$

A tensão de cisalhamento é a força aplicada tangencialmente a amostra, ao aplicá-la em um determinado material, o comportamento do mesmo pode ser comparado ao de um baralho de cartas em que a camada superior deslizará com maior velocidade e deslocamento, e, conforme a distância entre as camadas e a superfície aumenta a velocidade e o deslocamento das mesmas diminui dando origem a um gradiente de velocidade, esse gradiente é denominado taxa de cisalhamento (figura 8) (SCHRAMM, 2006).

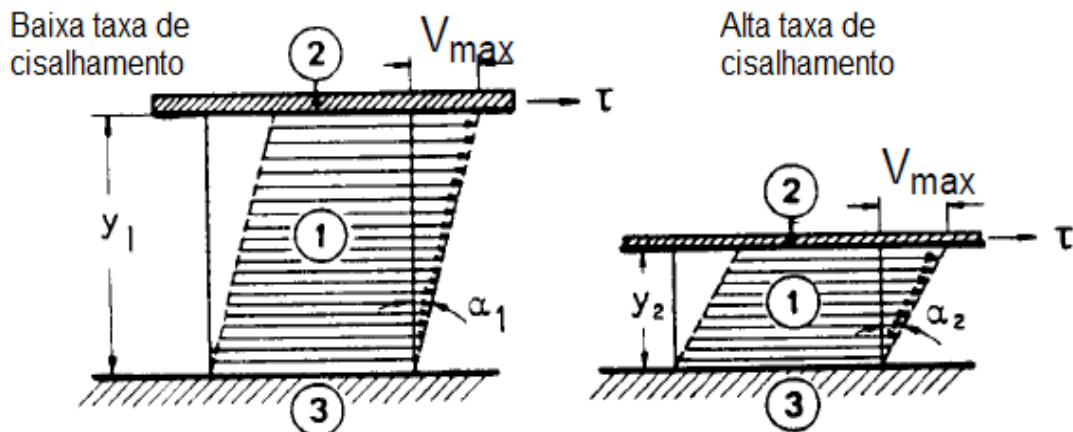
FIGURA 9 – TENSÃO E TAXA DE CISALHAMENTO



NOTA: 1: Amostra (Blocos hachurado e pontilhado). 2: Base sólida (placa). Bloco hachurado: Amostra em repouso. Bloco pontilhado: Amostra deformada pela Força τ . τ : Tensão de cisalhamento (Força/área(N/m^2 ou Pa)). y : Altura da amostra (gap). ΔL : Deformação da amostra (cm). γ : Tensão de cisalhamento (resistência ao fluxo). FONTE: SCHRAMM, 2006.

A taxa de cisalhamento é, portanto, dependente ainda da altura (dy) do “gap” entre a base e a placa superior e do deslocamento (dv) das lâminas superiores da amostra (figura 9). A inserção desses parâmetros na discussão da viscosidade leva a dedução da equação 16 (SCHRAMM, 2006).

FIGURA 10 – FLUXO ENTRE DUAS PLACAS PARALELAS



NOTA: 1: Líquido cisalhado. 2: Placa móvel. 3: Placa fixa. y_1 : Altura da amostra sob baixa taxa de cisalhamento. y_2 : Altura da amostra sob alta taxa de cisalhamento. τ : Tensão de cisalhamento constante. α_1 : Ângulo de inclinação compatível com y_1 . α_2 : Ângulo de inclinação compatível com y_2 . V_{max} : Velocidade da lâmina superior da amostra cisalhada dependente da altura da amostra. FONTE: SCHRAMM, 2006.

$$\tau = \eta \cdot \frac{dv}{dy} = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

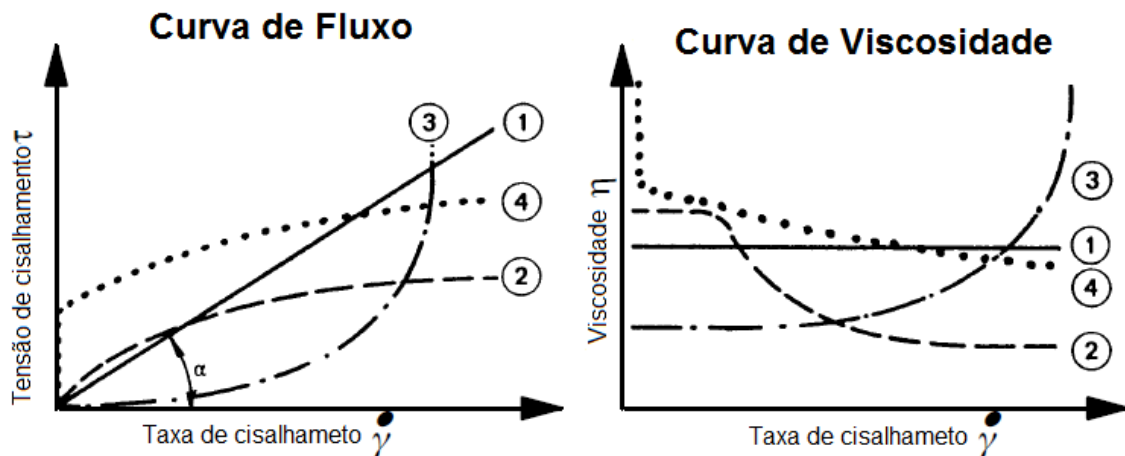
(Equação 16)

Sendo a unidade de τ N/m² e de $\dot{\gamma}$ s⁻¹ após o rearranjo da Equação 16 têm-se que a unidade da viscosidade dinâmica é Pa.s (Equação 17). É possível plotar dois tipos de gráficos a partir dessas variáveis: O gráfico de curva de fluxo (τ por $\dot{\gamma}$) e de curva de viscosidade (η por $\dot{\gamma}$), isso facilita a classificação visual da amostra como Newtoniana ou não-Newtoniana (SCHRAMM, 2006).

$$\text{se } \tau = \frac{N}{m^2} \quad \text{e } \dot{\gamma} = \frac{m/s}{m} \quad \text{então} \quad \eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \therefore \quad \eta = \frac{\frac{N}{m^2}}{\frac{1}{s}} \quad (\text{Equação 17})$$

Dentre os possíveis comportamentos das soluções não-Newtonianas encontram-se: Líquidos pseudoplásticos, dilatantes, plásticos, entre outros. As soluções polissacarídicas geralmente são não-Newtonianas, em sua maioria se enquadram no comportamento pseudoplástico, isto é, consistem de líquidos que apresentam diminuição drástica da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 10).

FIGURA 11 – COMPORTAMENTOS DE FLUXO



NOTA: 1: Líquido Newtoniano. 2: Líquido Pseudoplástico. 3: Líquido dilatante. 4: Líquido plástico.
 FONTE: SCHRAMM, 2006.

Essa é uma propriedade bastante interessante das soluções de polissacarídeos, pois como foi demonstrado por Einstein (1905) o movimento browniano é totalmente aleatório, e, com os polissacarídeos não é diferente. Ao inserir uma taxa de cisalhamento que tende a zero essas soluções comportam-se de maneira similar aos líquidos Newtonianos e com o aumento da taxa de cisalhamento

o movimento browniano mantém as moléculas dispersas aleatoriamente, contudo conforme há acréscimo do cisalhamento a viscosidade passa a diminuir até atingir o máximo de orientação molecular, superando o efeito do movimento browniano (SCHRAMM, 2006).

2.6 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

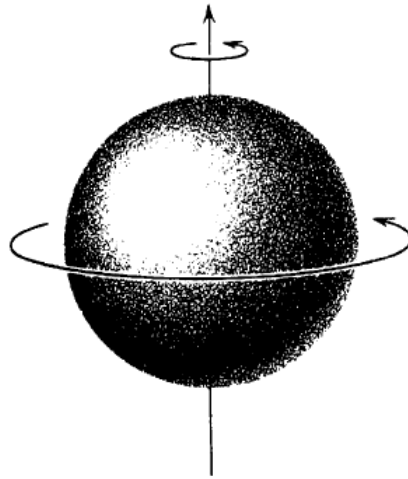
2.6.1 Histórico da técnica

A técnica de ressonância nuclear magnética (RMN), assim como as anteriores, é físico-química. Foi descrita pela primeira vez por Isidor Rabi (RABI, 1937), que aprofundou o experimento de Stern-Gerlach: Nesse estudo descreveu a polarização de elétrons segundo o spin, diferentemente do que acontece com o magnetismo convencional. Esse fenômeno tem como princípio a transição entre os níveis energéticos magnéticos, isso acontece quando o núcleo do átomo é imerso em um campo magnético externo em frequência oscilatória definida.

2.6.2 Princípios de eletromagnetismo e radiofrequência associados à ressonância magnética nuclear

Parte-se do princípio de que o núcleo do átomo carrega uma carga, essa carga em determinados átomos tem como propriedade o spin (figura 11), isto é, giro em seu próprio eixo. O fato é que o spin gera um campo magnético e pode ser medido numericamente, a essa medida é dado o nome de momento magnético que pode variar entre 0, $\frac{1}{2}$, 1 e $\frac{3}{4}$ (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

FIGURA 12 – EXEMPLO DO SPIN NUCLEAR



NOTA: Esfera: núcleo e vetor horizontal: spin. FONTE: SILVERSTEIN, 2005.

Para o próton o valor do spin pode variar de $-\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{2}$, formando duas situações de polaridade magnética muito distintas. Uma vez que existe uma polaridade magnética definida pela partícula nuclear é possível influenciá-la através de um campo magnético externo, este cede energia para a partícula em forma de radiação de radiofrequência, gerando a equação básica da ressonância magnética nuclear (Equação 18) (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

$$v_1 = \frac{\gamma}{2 \cdot \pi} \cdot B_0 \quad (\text{Equação 18})$$

Onde, v_1 é a radiação de radiofrequência, γ é a taxa de giro magnético (Equação 18) e B_0 é a força de campo magnético da partícula. A Equação 19 demonstra a relação direta entre a taxa de giro magnético e o momento de dipolo magnético (μ) e inversa para h (constante de *Plank*) e I (spin) (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

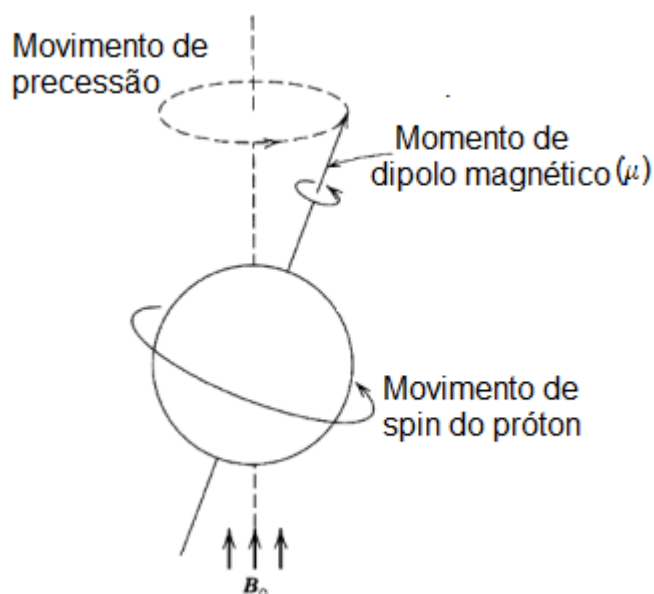
$$\gamma = \frac{2 \cdot \pi \cdot \mu}{h \cdot I} \quad (\text{Equação 19})$$

Quando o spin do núcleo é perturbado pelo pulso de frequência, este tende a retornar ao seu movimento inicial e esse retorno é denominado precessão (figura 12). O tempo decorrido no movimento de precessão pode ser transformado através

da transformação de Fourier, essa aplicação rendeu a Richard Ernst, em 1991, o prêmio Nobel de Química (SILVERSTEIN *et al.*, 2005; ERNST, 2013).

Ao inverter o campo magnético externo com um pulso contrário de radiofrequência, os parâmetros de γ e B_0 acompanham a modificação e o tempo necessário para retornar às condições iniciais é chamado de tempo de relaxação, esse tempo pode ser medido e transformado pelo modelo citado anteriormente em um sinal de deslocamento químico que relaciona os prótons conforme a influência de seus próprios tempos de relaxação e dos tempos de relaxação dos prótons ligados a átomos vizinhos, gerando assim o espectro de ressonância magnética nuclear (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

FIGURA 13 – MOVIMENTO DE PRECESSÃO



NOTA: Próton girando em movimento de precessão no campo magnético (B_0) e gerando momento de dipolo magnético (μ) FONTE: SILVERSTEIN *et al.*, 2005.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDO

As galactomananas utilizadas no trabalho foram extraídas de sementes trituradas de Bracatinga e do endosperma de sementes de Guapuruvu (recebendo a nomenclatura de B e G, respectivamente). As sementes foram cedidas pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e pelo Viveiro Mata Atlântica (São Paulo, SP), respectivamente.

A xantana utilizada (Lote: 2518963 - MERCK) foi minuciosamente escolhida pelo seu grau de pureza FFCS estipulado pelo próprio fornecedor; essa sigla significa que a amostra possui granulometria inferior a 200 MESH, é grau alimentício e passou por tratamento visando retirada de proteínas residuais. A amostra foi gentilmente cedida pela Merck Milipore (Alphaville, SP).

3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

3.2.1 Purificação da xantana

A amostra de xantana foi solubilizada em água ultrapura tipo I, na concentração de 1g/L, em seguida, o material passou por um procedimento de purificação, conforme descrito no diagrama da figura 13, com a finalidade de retirar o máximo de íons possíveis.

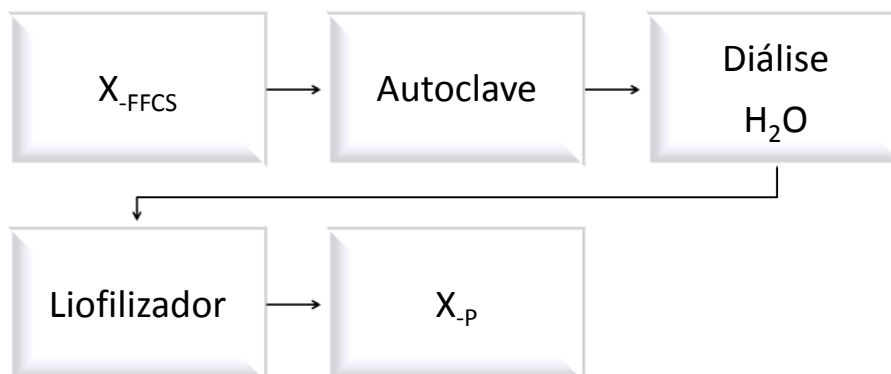
O procedimento consistiu das seguintes etapas: A solução de xantana foi autoclavada por 20 min, a 127°C e 1,5 atm; essa etapa foi utilizada para que a molécula ficasse em seu estado desordenado para facilitar a troca iônica com o meio nos procedimentos de diálise subsequentes.

Logo, com a amostra ainda quente foram realizadas sucessivas diálises fechadas contra água ultra pura tipo I, sob constante agitação magnética, até que a condutividade e o pH da água de troca ficassem iguais ao da água ultrapura. Após

os procedimentos de diálise as amostras foram liofilizadas e mantidas em ambiente livre do efeito higroscópico (BRESOLIN *et al.*, 1996 e 1998; KOURRIEH *et al.*, 2007; BERGMANN *et al.*, 2008; SANDOLO *et al.*, 2010; TAKO *et al.*, 2010).

A amostra de xantana proveniente da diálise contra água ultrapura foi denominada X_p enquanto a comercial ficou sendo chamada de X_{FFCS}.

FIGURA 14 – DIAGRAMA DE PURIFICAÇÃO DA XANTANA



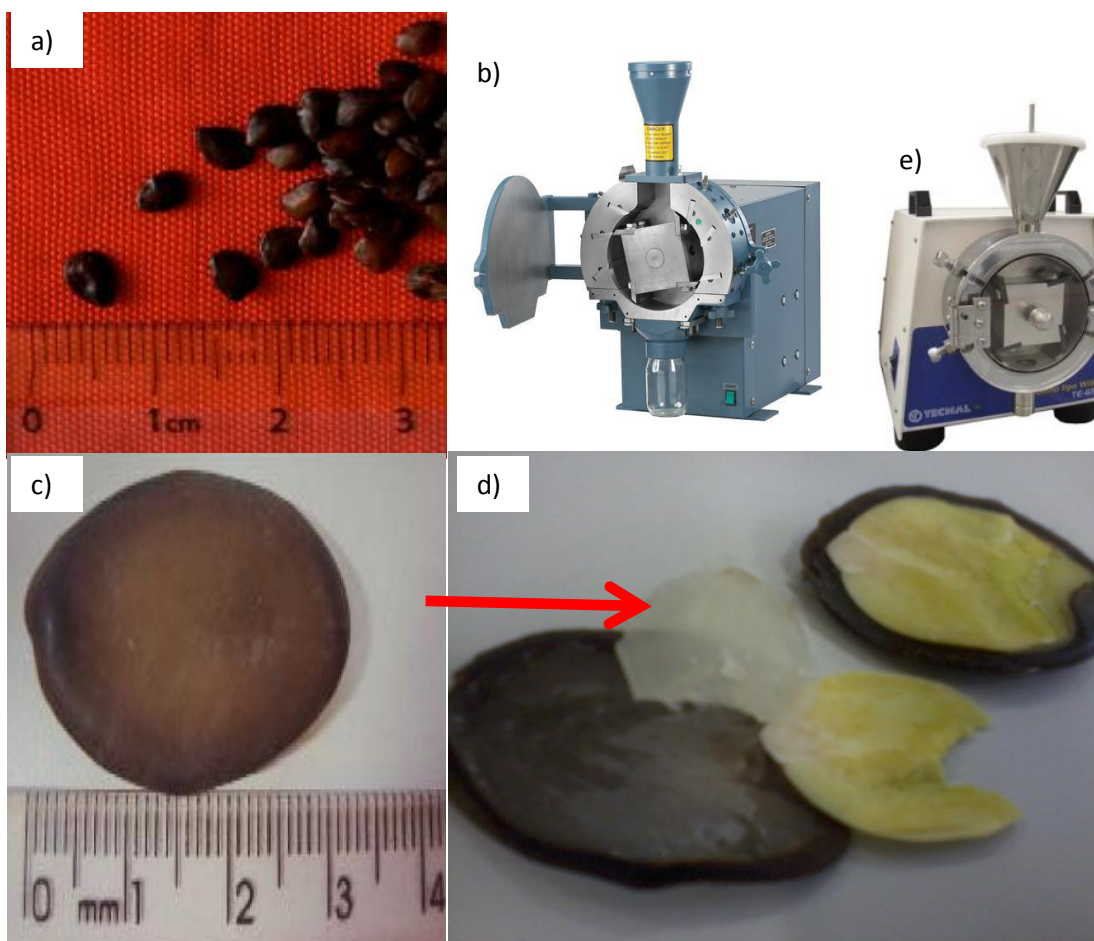
NOTA: Diagrama descrevendo o processo de purificação de X_{FFCS} para a X_p.

3.2.2 Extração das galactomananas

Utilizando o protocolo de extração do Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais da UFPR, a galactomanana do endosperma de sementes de bracinga foi extraída a partir da moagem das sementes inteiras, pois a mesma é demasiadamente pequena para a retirada do endosperma isoladamente (figura - 14.a). Esse material foi triturado em moinho Standard Model NO.3 – Willey Mill – Arthur H. Thomas Co. (figura - 14.b) usando peneiras com abertura de 2 e 1 mm (SALVALAGGIO, 2010; KOOP *et al.* 2009, 2012 e 2013).

No caso da semente de guapuruvu (figura - 14.c) foi possível efetuar um corte longitudinal e retirar os endospermas (figura - 14.d). Posteriormente à retirada, os endospermas foram secos a vácuo e a 25° C para em seguida serem moídos em moinho Tecnal TE-650 (figura -14.e) (SALVALAGGIO, 2010; KOOP *et al.* 2009, 2012 e 2013).

FIGURA 15 – DIFERENÇAS DE TAMANHO DAS SEMENTES DE GUAPURUVU E BRACATINGA.



NOTA: a) Semente de bracatinga.* b) Moinho Standard Model no. 3 – Wiley Mill – Arthur h. Thomas co.**. c) Semente de guapuruvu.* d) A película transparente no interior da casca (indicada pela seta vermelha) é o endosperma contendo a galactomanana da semente de guapuruvu.** e) Moinho Tecnal TE-650.****

*Fonte: Fotografias tiradas das próprias sementes no trabalho de SALVALAGGIO (2010). **Fonte: O AUTOR. ***Fonte: © THOMAS SCIENTIFIC, 2013. ****Fonte: TECNAL EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIO (2013).

Previamente à trituração ou corte do material (sementes) foi preciso realizar a inativação enzimática pelo método de fervura (10 min) e resfriamento em banho de gelo. O material triturado foi dissolvido em água destilada, 1g/L, e centrifugado em centrífuga Hitachi Himac CR21E por 30 minutos, a 10.000 rpm (1680 G), a 10° C. O precipitado foi desprezado; então ao material solúvel foi adicionado 50% de etanol seguido de centrifugação, nas mesmas condições anteriores, contudo dessa vez o polissacarídeo está presente no precipitado, sendo esta fração, portanto, a recuperada. O processo se repetiu com percentagens crescentes de etanol 70, 85, e 98,9% de mistura final com etanol.

Uma vez tendo as galactomananas extraídas, estas foram secas em estufa a vácuo a 25° C, o material resultante foi moído em sistema cadinho/pistilo e por fim os grãos passaram por separação pelo método de granulometria no Departamento de Engenharia de Alimentos.

A granulometria das galactomananas foi realizada para garantir a reprodutibilidade das solubilizações das mesmas, já que essas após extração e secagem apresentaram partículas de diferentes tamanhos o que influencia no processo de solubilização, conforme descrito por Pollard e colaboradores (2007). O material previamente macerado foi submetido à granulometria de 200 MESH, utilizando agitador de peneiras Bertel tipo magnético-12.03 por 10 minutos, sendo os rendimentos da granulometria de 67% para G e 95% B. O agitador de peneiras foi gentilmente cedido pela Prof.^a Dra. Agnes de Paula Scheer do Departamento de Engenharia de Alimentos da UFPR.

A partir do momento que as amostras foram pesadas após a granulometria elas passaram a ser nomeadas como B para galactomanana extraída de semente de bracinga e G para galactomanana extraída do endosperma da semente de guapuruvu.

3.3 HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DE MASSAS

Primeiramente foi preciso analisar isoladamente a xantana e as galactomananas e, para esse fim, o método de HPSEC-MALLS foi o escolhido. As cromatografias foram efetuadas em um sistema WATERS, contendo quatro colunas de gel permeação conectadas em série, sendo elas Ultrahydrogel 2000, 500, 250 e 120, com limites de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$ g/mol, respectivamente.

Acoplados ao sistema de cromatografia de exclusão estérica estão três detectores: detector de espalhamento de luz laser (632,8 nm) multiângulos modelo DSP-F Wyatt Technology, detector diferencial de índice de refração (IR) WATERS 2410 e detector viscosimétrico Validyne P55 acoplado ao voltímetro Elenco Precision XP-581 (WYATT, 1993).

O sistema está representado na figura 15, e, para obtenção e interpretação dos resultados o software utilizado foi o ASTRA versão 4.70.07. O fluxo utilizado foi

de 0,6 mL/min, tendo como fase móvel nitrito de sódio 0,1 mol/L acrescido de azida de sódio 0,2 g/L, e temperatura de 25 °C.

Para a determinação da homogeneidade e dos cálculos dos parâmetros M_w , Pd, porcentagem de recuperação e R_g todas as amostras foram solubilizadas por 16 horas em alíquota da mesma fase móvel do sistema HPSEC-MALLS-RI-VIS.

FIGURA 16 – FOTO DO EQUIPAMENTO DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO ESTÉRIA COM MULTI DETECÇÃO - HPSEC-MALLS-RI-VIS/UV – UFPR



NOTA: a) Equipamento de HPSEC-MALLS-RI. b) Forno de armazenamento das colunas de exclusão estérica. Fonte: O autor.

3.4 REOLOGIA

As análises reológicas foram realizadas a 25°C, em Reômetro Haake MARS II acoplado por intermédio de uma unidade de controle de temperatura (UTMC) a um banho termostático HAAKE K15, a um termocirculador de água DC5, e a um

controlador térmico (Peltier). O sensor utilizado foi cone-placa C60/2°Ti com diâmetro de 60 mm com fenda de 0,1 mm.

Para a realização das varreduras de frequência foi realizado previamente uma análise de varredura de tensão para identificar a faixa viscoelástica linear, sendo que para ambos os casos esse valor de tensão foi de 10 Pa. As varreduras de frequência tiveram início em 0,03 Hz e final em 100 Hz, e foram realizadas em concentração polimérica iguais ao experimento de curva de viscosidade.

Foram feitas curvas de viscosidade dos polissacarídeos isoladamente, e, em seguida do sistema binário xantana:galactomanana (na proporção 1:1 v/v (5 g/L)) comparando a xantana comercial e a amostra X_p em mistura com a galactomanana de G. Apenas a galactomanana de guapuruvu foi escolhida para continuidade do trabalho, pois em resultados preliminares não houveram diferenças significativas na interação da galactomanana de bracinga com a amostra X_p em relação a interação entre a galactomanana de guapuruvu e a amostra X_p.

As misturas foram feitas em três condições de solventes diferentes: água, NaCl 0,002 mol/L e NaCl 0,04 mol/L. As amostras foram mantidas em repouso por 24 horas para estabilização das malhas poliméricas formadas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os dados aqui apresentados são de origem da média aritmética dos ensaios (KHOURYEH *et al.*, 2007; SANDOLO *et al.*, 2010).

3.5 FOTOMETRIA DE CHAMA

A fotometria de chama é uma técnica analítica baseada em espectroscopia atômica. Nessa metodologia, a amostra é inserida em uma chama e emite radiação referente ao metal em questão. Isso é possível pois quando os cátions recebem a energia de uma chama eles geram espécies excitadas, e, quando essas espécies retornam para o estado normal liberam parte da energia recebida na forma de radiação, essa energia é liberada em comprimentos de onda característicos para cada elemento químico (OKUMURA *et al.*, 2004).

Os metais alcalinos e alcalinos terrosos emitem radiação eletromagnética (na faixa de luz visível) em uma chama ar-gás combustível (GLP), em uma temperatura entre 1700 e 1900 °C. Assim, é possível gerar a emissão de linhas atômicas

características para cada elemento, contudo essa análise é principalmente feita para determinação e quantificação de Na, K, Ca e Li (OKUMURA *et al.*, 2004).

Para confirmar a qualidade da purificação da xantana foram efetuados ensaios de quantificação de íons sódio e potássio pelo método de fotometria de chama no equipamento Micronal modelo B462 abastecido com butano.

As análises quantitativas foram feitas através do estabelecimento de curva padrão dos íons.

3.6 SISTEMA DE MISTURA AUTOMÁTICA CONTÍNUA ACOPLADO A ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO (ACM-SLS)

Para a análise de ACM-SLS o equipamento de HPSEC-MALLS-RI-VIS, descrito no item 3.3 deste trabalho foi adaptado. As colunas cromatográficas foram retiradas e adicionada mais uma bomba de HPLC Waters[®], modelo 505 HPLC Pump, para misturar as fases móveis, assim como descrito no item 2.4.2.1.

O ensaio da influência salina na conformação da xantana foi realizado utilizando como solução A: xantana (X_p) 0,25 g/L em NaCl 0,05 M e como solução B: X_p em água ultrapura sob concentração de 0,25 g/L.

É necessário fazer uma análise da equação de espalhamento de luz para aplicá-la corretamente aos valores de voltagem bruta extraídos do equipamento. Comparando a equação de Rayleigh-Zimm-Debye-Gans (equação 2) com a equação da reta (equação 20), temos que y é igual a K_c/R_θ , o coeficiente angular é regido por $R_g^2/3 \cdot M_w$, x é igual ao quadrado do vetor de espalhamento (q^2) e o coeficiente linear é $\frac{1}{M_w} + 2 \cdot A_2 \cdot c$. A determinação de y pôde ser calculada a partir das equações 3, 4 e 5, e x através da equação 6.

$$y = a * x + b \quad \text{(Equação 20).}$$

Para obter os valores de coeficiente angular e linear basta aplicar o modelo de regressão linear de Pearson (Equação 21.a e 21.b, respectivamente). Na

primeira, N é o número de pares ordenados de y e x , ou seja, o número de relações de K_c/R_θ entre os ângulos escolhidos pelos seus respectivos vetores de espalhamento de luz laser (q). O coeficiente angular é dado pela razão entre N vezes o somatório do produto de x e y subtraído do produto dos somatórios de x e de y por N vezes o somatório do quadrado de x subtraído pelo quadrado do somatório de x . Uma vez determinado o coeficiente angular, é possível calcular o coeficiente linear aplicando a equação 21.b, que consiste da média de y subtraída do produto entre o coeficiente angular e a média de x (FIGUEREDO *et al.*, 2009).

$$a = \frac{N \cdot \Sigma(x \cdot y) - \Sigma(x) \cdot \Sigma(y)}{N \cdot \Sigma(x^2) - (\Sigma(x))^2} \quad (\text{Equação 21.a})$$

$$b = \bar{y} - a \cdot \bar{x} \quad (\text{Equação 21.b})$$

Para avaliar a linearidade dessa regressão, o método conta com o cálculo do coeficiente de correlação r (Equação 22), sendo que quanto mais próximo o valor do seu quadrado estiver de 1, maior é a relação entre os pares ordenados. Nessa equação o N é o mesmo valor utilizado na equação 21.a (FIGUEREDO *et al.*, 2009).

O valor de r é dado pelo produto de N e o somatório do produto de x e y subtraído pelo produto dos somatórios de x e y , da mesma forma que o coeficiente linear, contudo para r esse valor é dividido pela raiz quadrada de do produto de N e o somatório do quadrado de x subtraído pelo produto do somatório do quadrado de x e o produto de N e o somatório do quadrado de y subtraído do quadrado do somatório de y (FIGUEREDO *et al.*, 2009).

$$r = \frac{N \cdot \Sigma(x \cdot y) - \Sigma(x) \cdot \Sigma(y)}{\sqrt{N \cdot \Sigma(x^2) - \Sigma(x)^2 \cdot (N \cdot \Sigma(y^2) - (\Sigma(y))^2)}} \quad (\text{Equação 22})$$

Este estudo teve como grande diferencial a análise mistura automática contínua em espalhamento de luz laser em tempo real. Por isso, fez-se necessário realizar os cálculos de massa utilizando ferramentas de informática não oriundas do

fabricante do equipamento, e, foi desenvolvido no presente estudo um programa de tratamento de dados em linguagem C, código fonte em anexo, que utilizou as equações 2, 3, 5, 6, 7, 12, 19, 20.a, 20.b e 21. O programa de tratamento de dados encontra-se como anexo neste trabalho.

3.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Afim de complementar o estudo de espalhamento de luz laser e reologia, foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear no centro de ressonância magnética nuclear da UFPR, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme Sasaki. O equipamento utilizado foi o Bruker Avance III 600 MHz, com probe QXI 5 mm. A análise quantitativa de próton foi realizada a 70 °C com amostras na concentração de 2 g/L em D₂O utilizando 128 scans.

O padrão de referência interna utilizado foi TMSP (ácido trimetilsililpropanóico), então foi calculado o valor das integrais dos grupamentos de piruvato e acetil em relação ao próton anomérico α da manose interna da cadeia lateral das moléculas de X-FFCS e X-P.

4. ARTIGO INERENTE À CARACTERIZAÇÃO CONFORMACIONAL DA XANTANA INDUZIDA POR MEIO SALINO

Real-time monitoring of the stiffness dependence of the single strand xanthan gum induced by NaCl

Roberto Savi Junior^a, Rilton Alves de Freitas^b, Guilherme Sasaki^a, Heidegrid Siebert Koop^a, Joana Léa Meira Silveira^a

^aLaboratory of Plant Carbohydrates, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-990, PR, Brazil

^bBioPol, Department of Chemistry, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-990, PR, Brazil

ABSTRACT

The conformation of polyelectrolytes is strongly influenced by the interaction with the solvent and it is not different for xanthan gum. Yet it is essential to consider the ionic composition already present in the molecule. So, it is possible to study the physical-chemical characteristics of the molecule, excluding side effects. In this work it was observed, in real time, using automatic continuous mixing (ACM), the influence of salt concentration on the conformation of the single strand xanthan gum (X). The results confirm that in water, X are in single stranded, with R_g and L_p values of 40 nm and 37 nm, respectively. During ACM experiment, the salt concentration increases, reaching to a limit that changes the conformation transition to a compact strand, when the R_g and L_p decrease to 20 nm and 29 nm, respectively, with reduction in the A_2 . The ACM can be used as a powerful tool to study the conformational transition of polyelectrolytes induced by salt.

KEYWORDS: Xanthan, Ionic influence, Automatic continuous mixing (ACM), Conformation.

1. INTRODUCTION

The xanthan gum (X) is an exopolysaccharide produced by the bacterium *Xanthomonas campestris*. This polysaccharide has its major feature the viscous capacity, and therefore it is used in the food and pharmaceutical industry as a thickener and stabilizer^{1, 2, 3}.

According Dea *et al.*⁴ the chemical structure of X consists of D-glucopyranosyl units linked by $\beta(1\rightarrow4)$ and substituted alternately at O-3 of every glucose unit by a trisaccharide chain, composed by a glucuronic acid linked between two D-mannopyranosyl units, while the inner mannose has an acetyl group in C-6 and the terminal mannose is substituted at C-4 and C-6 by a pyruvate group, however, it is not a stoichiometric substitution^{4, 5, 6, 7, 8, 9}.

As observed, X is a charged polysaccharide, a polyelectrolyte, and its properties in solution are widely studied, since it is capable of conformational transition, dependent of temperature, ionic solution condition, pH and polymer concentrations¹⁰.

Several authors demonstrated the influence of NaCl on the X viscosity, however only few works were evaluated in diluted and semi-diluted concentrations and none using real-time analysis^{1, 3, 7}.

When the ionizable groups of X, in saline, are more exposed, it is organized in what is known as ordered conformation or helix, while the condition of absence of ions in solution, its conformation is called as disordered^{11, 12}.

In this manuscript we propose a different way to study the order-disorder conformational transition of X in low diluted concentrations (0.25 g.L^{-1}) and its interaction with NaCl (range of $0\text{-}0.1 \text{ mol.L}^{-1}$), using an automatic continuous mixing (ACM). The technique consists in analyse the changes of conformational properties of X, in real time by multidetectos like multi-angle static light scattering, refraction

index and viscometer (ACM-SLS-VIS). The parameters evaluated were the radius of gyration (R_g), viscosity, persistence length (L_p) and second virial coefficient (A_2). Complementary analysis was performed by circular dichroism¹³ and nuclear magnetic resonance.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Material

Xanthan (X_{FFCS}) was gently provided by Merck Millipore® (Alphaville, SP) and selected for its purity grade (FFCS), this abbreviation means that the sample has less than 200 mesh particle size, is food grade and passed by treatment aimed at removing residual proteins. All the other reagents were of analytical grade and supplied by Sigma-Aldrich.

2.2 Xanthan purification

X_{FFCS} was solubilized in type I ultrapure water (Millipore System), in a concentration of 1 g/L, at room temperature, under continuous stirring, during 18 h. Then the material passed through the process of autoclaving at 121°C, 1.5 atm for 20 min and further dialyzed exhaustively against type I ultrapure water. After the procedures of dialysis the sample was freeze dried and kept in an environment free of moisture^{1, 9, 11, 12, 14, 15}. This sample was named X_{P} .

2.3 Ionic quantification

The quantification of ionic concentration was performed by flame photometry method using a model B462 MICRONAL®.

2.4 High performance size exclusion chromatography coupled to multidetectors (HPSEC-MALLS/RI/VIS)

High performance steric exclusion chromatography coupled with multi-angle static laser light scattering and refractive index detectors (HPSEC-MALLS-RI) to analyze the xanthan was performed. Chromatograms were carried on a Waters® system containing four gel permeation columns Ultrahydrogel® 2000, 500, 250 and 120, connected in series, with exclusion limits of $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ and $5 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, respectively.

The flow rate used was $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and as mobile phase sodium nitrite in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and sodium azide $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ used as conservative, at 25° C .

Attached to the steric exclusion system there was two detectors: The multi-angle static laser light scattering (632.8 nm), model DSP-F Wyatt Technology, a differential refractive index, model WATERS 2410 and a homebuilt single capillary viscometer based on Valydine DP15 pressure transducer and Valydine CD12 carrier demodulator. The data were collected using Wyatt technology ASTRA software, version 4.70.07.

For obtaining and interpreting the results the equipment software was ASTRA version 4.70.07.

The HPSEC-MALLS-RI was the method utilized to determine weight-average molar mass (M_w), radius of gyration (R_g), polydispersivity Index (P) and recovery rate. All of these parameters can be calculated by equation 1.

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \frac{\langle S^2 \rangle_z}{3 M_w} * q^2 + 2A_2c \quad (\text{Equation 1})$$

Where K is the optical constant appropriate for vertically polarized incident light and the polymers solutions used, where $K = 4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2 / N_A \lambda^4$, and n is the

refractive index of used solvent, N_A is the Avogadro's number and λ is the vacuum wavelength of the laser (632.8 nm). The dn/dc of 0.135 ml.g^{-1} for X was calculated and used.

c is the concentration of polymer (g.mL^{-1}), R_θ is the excess of Rayleigh laser light scattering ratio (cm^{-1}), q is the scattering detector angle, M_w is ponderal average molecular mass by weight, $\langle S^2 \rangle_z$ is the z-averaged mean square radius of gyration (in this work we used the root square of its value, which refers to R_g), q is the scattering wave vector ($q = (4 \pi.n/\lambda) \sin(q/2)$) and A_2 is the second virial coefficient.

2.5 Real time analysis of the salt effect on xanthan gum

Using the static light scattering (SLS), it was possible to perform an experiment in which two mobile phases are mixed and the resulting solution was analyzed by SLS and viscometry in real time. This assay is called automatic continuous mixing (ACM) with high-resolving technique, static laser light scattering and viscometer (ACM-SLS-VIS). The first mobile phase of ACM-SLS-VIS was X_p solubilized in purified water at polymer concentration of 0.25 mg.mL^{-1} and filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ membrane filter, at 20°C . To half of this solution was added a saturated NaCl solution that was previously filtered by $0.22 \mu\text{m}$, under continuous stirring, to adjust the salt concentration to 0.1 mol.L^{-1} . In both cases the final polymer concentration was 0.25 mg.mL^{-1} , in water or in NaCl 0.1 mol.L^{-1} . The polymer concentrations were confirmed using differential refractometer. The solution was used immediately after filtration and after the salt concentration adjustment. These experiments were performed using 7 detector angles between 30° to 150° to supply the equation 1.

The X_p in water was titrated with the saline X_p and the mixture, in continuous stirring, was passed throughout the multi-detectors at a flow rate of 0.5 mL.min^{-1} .

Thus it was possible to observe, in real time, the saline influence on physical-chemical parameters of the purified xanthan molecule, without altering the X_p concentration.

Using ACM coupled to light scattering, it was possible to determine the M_w , R_g and A_2 , and using viscometer, it was possible to determine the R_g by the Flory Fox equation (Equation 2).

$$[\eta] = \frac{6^{3/2} * \phi * R_g^3}{M_w} \quad (\text{Equation 2})$$

where $[\eta]$ is intrinsic viscosity (obtained by the reduced viscosity, calculated from viscometer), $\phi = 2.56 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ is the Fox-Flory constant, R_g is the viscometric radius of gyration.

The increase in the salt concentration was determined using an additional detector, the refractive index (RI). The dn/dc for NaCl was $0.120 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$.

The effect of the salt concentration was analyzed by persistence length (L_p) parameter. The calculus of the R_g in real time for each concentration of NaCl, as well as the L_p according the Eq. 3, is given by the square of the radius of gyration (Flory Fox R_g was used) and the contour length ($L = M_w / (m \cdot b)$), where m is the mass of mere and b is the their length.

$$R_g^2 = \frac{L \cdot L_p}{3} - L_p^2 + \frac{2 \cdot L_p^3}{L} - 2 * \left(\frac{L_p^4}{L^2} \right) * \left[1 - \exp * \left(\frac{-L}{L_p} \right) \right] \quad (\text{Equation 3})$$

2.6 Circular Dichroism analysis

Transitions in the conformation of X, was also confirmed by circular dichroism spectra, measured on X_p dissolved in ultra-pure water and dissolved in NaCl

concentrations from 0.007 to 0.1 mol.L⁻¹. The experiment was carried out with an acquisition rate of 1 nm per second in a Jasco J-815 CD spectrometer coupled with a 163 - 900 nm photomultiplier and a controller CDF – 4265/15. For this experiment the samples were solubilized by 0.25 % in ultrapure water and 0.1 mol.L⁻¹ NaCl, at 25 °C, a quartz cell with 0.5 cm optical pass length and with a thermostat jacket was used for the measurements^{6, 13}.

2.7 Nuclear magnetic Resonance

The quantitation of acetyl and pyruvate in X samples were determined using nuclear magnetic resonance analyzes were performed on Bruker Avance III 600 MHz, equipped with 5 mm inverse probe QXI, in the UFPR NMR Center. Quantitative ¹H-NMR were performed after 90° (p1) pulse calibration by evolution until 360° using a start p1 of 4 ms plus increment of 2 ms (p1-8.93 ms, relaxation delay = 10.0 s, number of time domain points 65536 and acquisition time = 5.12 s), calculation of offset (2832.7 Hz) to obtain a spectrum width of 6394.0 Hz. The spectra (2mg/ml) of X_{-FFCS} and, X_{-P} were measured at 70° C in D₂O and 128 scans were collected to give a Signal/Noise (S/N) ratio of 1697 and 553 for the methyl groups of pyruvate and acetyl units, respectively. Integration of H-1 areas belonging to mannose, acetyl and pyruvate groups⁹ were performed without tube rotation and respecting a TMS signal with a medium half line width varying from 1.3 Hz after Lorentzian deconvolution^{16,17,18}.

3. RESULTS

3.1 Characterization of xanthan samples

The X_{-FFCS} sample purification was realized to achieve salt reduction and to obtain a single strand of polysaccharide, namely X_{-P}. To confirm the reduction of the ionic concentration, it was performed a flame photometry assay. It was possible to

determine a reduction in the sodium concentration, for the purified sample (X_{-P}) from 2.1 to 1.5 ppm, and there is no significant reduction for potassium.

The effect of autoclaving and dialysis steps during X_{-FFCS} purification that resulted of X_{-P} sample was analysed by HPSEC-MALLS-RI. The parameters weight-average molar mass (M_w), radius of gyration (R_g) and polydispersity (P) can be seen in the Table 1.

Table 1 – Physical-chemical parameters of weight-average molar mass (M_w), radius of gyration (R_g), polydispersity (P) and rate of recovery of the samples X_{-FFCS} and X_{-P} .

Sample	M_w ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)/ 10^{-6}	R_g (nm)	P ($M_w\cdot M_n^{-1}$)	Recovery (%)	Pyruvate	Acetyl
X_{-FFCS}	2.0 ± 0.2	135.4 ± 3.4	1.0 ± 0.1	65	0.74	0.36
X_{-P}	1.2 ± 0.1	86.5 ± 2.6	1.2 ± 0.1	100	0.70	0.30

* Recovery rate calculated from the HPSEC-MALLS system. ** Integral relation between the pyruvate and acetyl for α anomeric proton signal calculated by $^1\text{H-NMR}$.

It was possible to observe a decrease, in a half, of M_w for X_{-P} , as well as a decrease of R_g and a small increase of the polydispersity (P), suggesting that the purification procedure changed the macromolecule from a double helix to a single-helix, without a re-transition from a single to double helix after drying. Also, there was an increase in the recovery from HPSEC-MALLS system, which is justified by the greater ease in passing through the pre-analytical filter. The purification also did not alter the pyruvate and acetyl content in the sample.

3.2 Automatic Continuous Mixing

Fig. 1 shows the time dependence of the raw data from the real time salt titration of X_{-P} sample performed by ACM-SLS-VIS.

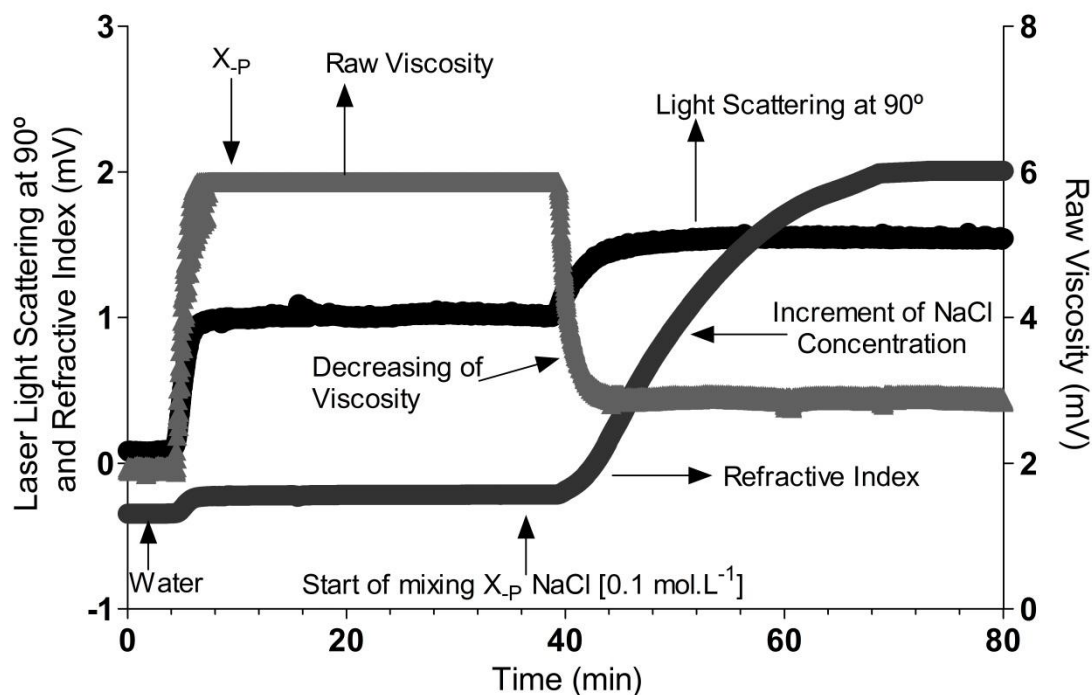


Figure 1. ACM-SLS raw laser light scattering, viscosity, refractive index vs time. Polymeric concentration used was 0.25 mg/mL, flow rate 0.5 mL/min, beginning of mixing at 38 min.

Initially, at 8 min, it is possible to observe an increase in the raw scattered light intensity at $\theta = 90^\circ$, and viscosity detector signals. At this moment, the solvent, purified water, was exchanged to X_p in water at 8 min, and a stable plateau on light scattering, refractive index and viscosity was observed for between 8 and 30 min. From 38 min, starts the mixture between X_p in 0.1 mol.L^{-1} NaCl and X_p in water, using a continuous titration method, where there was clearly observed an abrupt decrease in the signal of viscosity as well as an increased in the scattered light intensity and steady increase of the refractive index due to increasing molarity of NaCl.

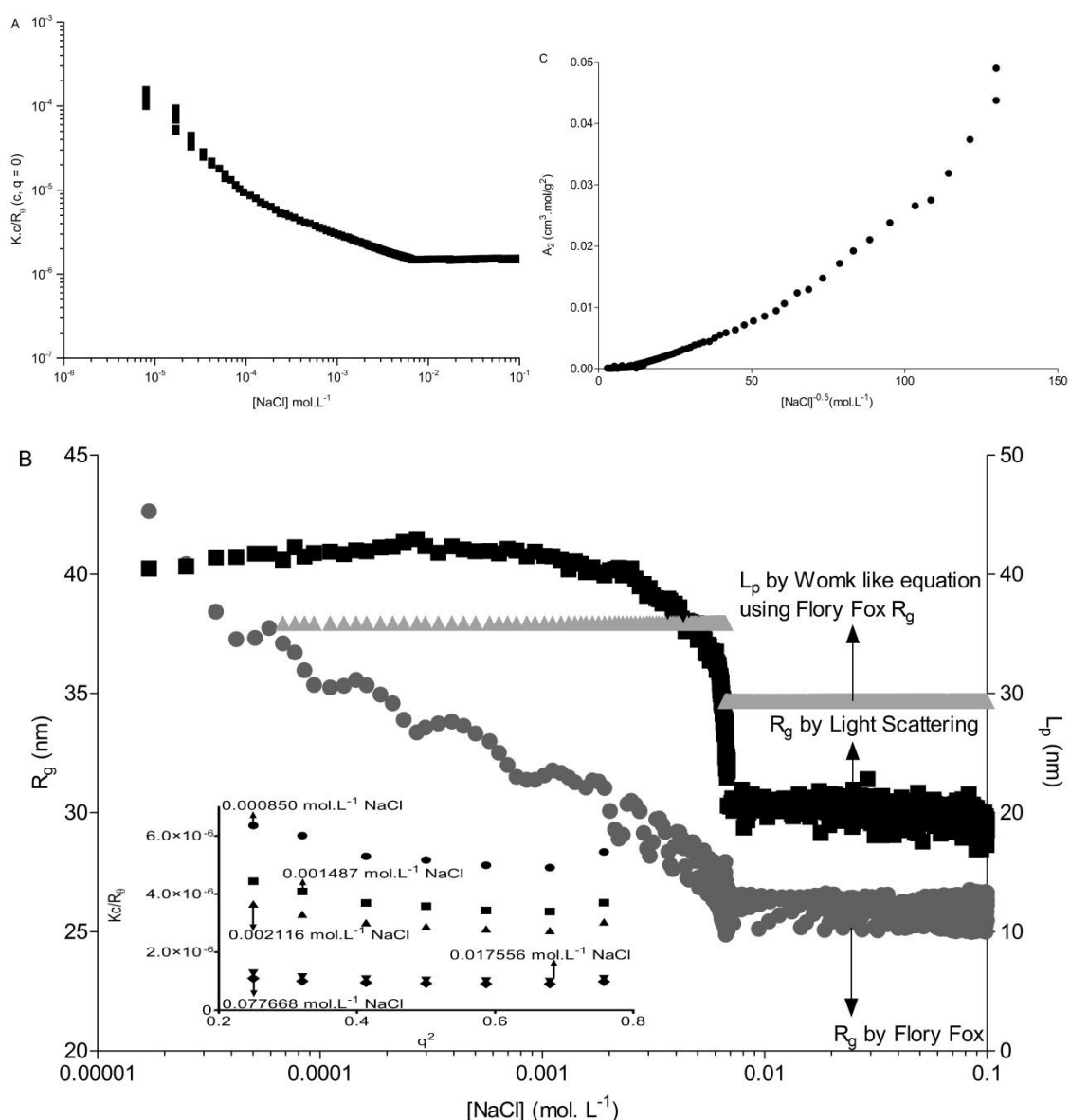


Figure 2 A) Kc/R_θ by log of NaCl concentration of ACM-SLS, polymeric concentration 0.25 mg/mL, flow rate 0.5 mL/min. B) R_g by light scattering (black), R_g by Flory Fox (gray), and L_p by worm-like equation (light gray) as a log function of NaCl concentration (mol.L $^{-1}$). Insert: Shows the Kc/R_θ extrapolation to zero angle in different concentrations of NaCl. C) Dependence of A_2 by $[NaCl]^{-0.5}$; Conditions of essay: X_{-P} in water solution, and X_{-P} on NaCl 0.1 mol.L $^{-1}$ solution.

The reciprocal representation in terms of Kc/R_θ provides a more revealing depiction of the conformational transition of X_{-P} . Fig. 2A shows an abrupt reduction in the ratio Kc/R_θ of X_{-P} during NaCl titration due to increase in the R_θ , characteristic of a polyelectrolyte behavior during salt titration.

We presented on Fig. 2B the R_g calculated by Rayleigh-Debye-Gans and from Flory-Fox equations, respectively. In both cases the values of R_g , at the beginning (≈ 38 min), with X_{-P} in water, presents a higher R_g . However, starting the titration with

X_p in NaCl, it was observed a decrease of R_g by light scattering and determined by Flory-Fox equation to about half and a similar reduction in the persistence length (light gray) mathematically obtained from worm-like model.

The extrapolation of Kc/R_q versus $\sin^2(q/2)$ of random concentrations of NaCl is plotted as an insert of Fig 2B. In this figure, it is important to observe the scale linearity of data points. At low NaCl concentrations (8.5×10^{-4} - 2.1×10^{-3} mol.L⁻¹), the slope is negative, as expected for polyelectrolytes in low concentration. As NaCl concentration increases the slope becomes less negative or even positive. Fig 2.C demonstrate the A_2 in relation to the concentration of NaCl^{-1/2}, which shows that lower the NaCl concentration, higher the value of A_2 .

3.3 Circular Dichroism

The figure 3 shows the circular dichroism spectra of X_p in water and X_p in 0.1 mol.L⁻¹ NaCl at 25°C. It was observed for both samples a positive peak and a weaker negative peak at around 200 and 220 nm, respectively. The increase in the intensity of the first peak (200 nm), as the salt concentration increased, and the decrease of the valley at 220 nm. This was compatible with a transition to a more compact single strand helix in NaCl 0.1 mol.L⁻¹.

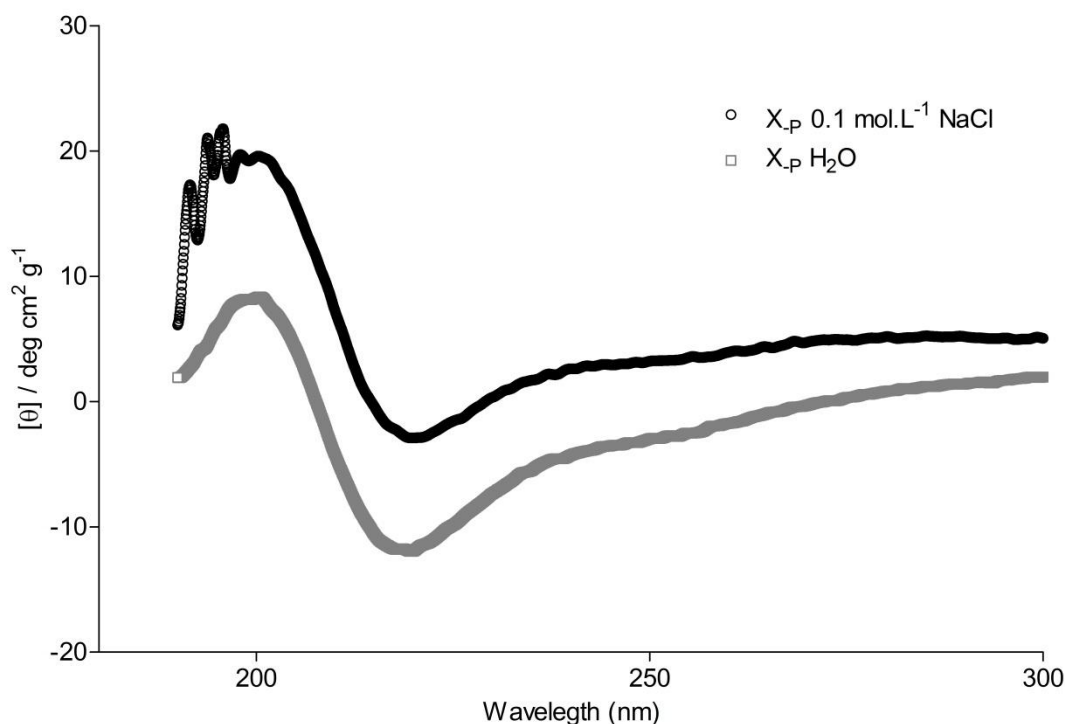


Figure. 3. Circular dichroism spectra of X_p in water and X_p 0.1 mol.L^{-1} NaCl at 25°C .

4. DISCUSSION

4.1 Characterization

Xanthan gum (X) could be presented in three forms, random coil, single helix or double helix, depending of the extraction process or purification, temperature, concentration or ionic strength^{1, 2, 3, 13, 19, 20, 21, 22, 23, 24}.

The present study gives new insights about the conformational transition of X from a expanded to a more compact helix, using for this a purification step of X to single strand helix and using the automatic continuous mixing (ACM) analysis in real time, to monitoring the double helix formation. Additional techniques are used as a support to our finding.

The purification step was efficient in removing the counterions in excess from the X_p . However, it was necessary to evaluate the macromolecular characteristics after and before to proceed the purification step. For this purpose the HPSEC-MALLS-RI was indispensable¹.

After purification of $X_{\text{-FFCS}}$ to $X_{\text{-P}}$, the value of the R_g and M_w was decreased and the recovery rate was increased. Similar results are presented by Gulrez *et al.*²⁵, that observed a reduction of M_w and R_g , as well as an increase in the % of mass recovery from HPSEC. According to the authors there are two possibilities to explain the reduction in the molar mass, 1st: it happens a dissociation process, due to high temperature forming single strand helix and 2nd: a degradation process, due to high pressure. The authors found that both processes can occur simultaneously. We observed in our study a small increase in the P, that can suggest some degradation. However, it is suggested that the 1st process was the main aspect related to our X, once the degradation occur mainly after a long heating process. The fact of complete dissociation of $X_{\text{-FFCS}}$ to $X_{\text{-P}}$ could be also achieved during the heating due to the high pyruvate content of X, promoting an strong electrostatic repulsion of the double strand in water, and promoting the single strand formation, during the purification process²⁰.

4.2 Light Scattering and Automatic Continuous Mixing

Using the $X_{\text{-P}}$ in single strand helix form, it was evaluate the conformational change using ACM-SLS. Scattering intensity increase with increasing [NaCl], due to the decrease in interchain repulsion and decrease in the virial coefficients. Viscosity decreases as the polymer coil contracts, giving a smaller hydrodynamic volume, and, consequently smaller intrinsic viscosity. In the figure 2A, the $q=0$ intercepts of $Kc/R_{\theta(c,q=0)}$ vs [NaCl] for $X_{\text{-P}}$ at 0.25 mg/mL, the steep drop with increasing salt reflects the interparticle shielding and decrease in A_2 ²⁴.

To achieve the macromolecular parameters from the linear regression on extrapolation to zero angle from the Kc/R_{θ} versus q^2 give us, in real time, the molar

mass, and there is no increase in M_w , evaluating only the extrapolation of the higher scattering wave vector, as a function of NaCl increasing^{24, 26} (data not shown).

The reduction in the R_g for X_{-P} during [NaCl] titration in the X_{-P} in water, may indicate that the molecules are reorganizing themselves into more compact structures, with reduction in the excluded volume. The initial expanded chain, with higher excluded volume, is caused by the ionization of adjacent ionic groups.

To avoid the influence of aggregates that could be randomly influencing the light scattering experiment, it was used a second detector, less sensible to aggregates in solution, obtaining the R_g from the viscometer and from the Flory-Fox equation. There are differences between the R_g from light scattering experiments and viscometer, suggesting that the results from light scattering could be polluted with some aggregates in solution.

The L_p , provide an important information about the rigidity of the system. In the absence of salt in xanthan, a state of single-helix, influenced by the ionization of pyruvate groups of X_{-P} . When there is an increased [NaCl], a reduction in the L_p was observed.

The same phenomena was observed by Atomic Force Microscopy¹⁶, with a reduction in the L_p , only by changing the saline condition of the method. The authors state that when the salt concentration is low, the intramolecular electrostatic repulsion is strong, justifying higher L_p ¹⁹. According to the AFM technique, the values used can generally vary between 30 and 130 nm between denatured and native samples¹⁹. In this study, after the purification procedure, the sample X_{-P} present a of L_p of 45 nm and there was a shift to 30 nm when there was a change of the other physical-chemical parameters. Similar results were observed by Muller *et al.*²³, that observed transition in the same order, for X , in equivalent molar concentrations¹⁹.

The finding here is also in good agreement with the previous results published by Tinland and Rinaudo²⁷, that observed for xanthan, with different molar mass, a L_p around 31 nm in high ionic strength (0.1 mol/L) and at low salt concentration (0.01 mol/L), a small electrostatic contribution, and L_p of 34.2 nm. The same authors also observed an increase in the molar mass and intrinsic viscosity, only at concentrations higher than 0.3 mol/L, suggesting the formation of aggregates in such situation.

The A_2 calculated against the reciprocal of the square root of the salt molarity of the X_p provides a major contribution to the understanding of ionic influences in saline conformation. It is presented with a number of points obtained in real time. We observed that there was a very significant increase in the slope of the curve of A_2 vs $[\text{NaCl}]^{-0.5}$, where in low salt concentrations the calculated value of A_2 was quite high in relation to the values of higher salt concentration, and the extent that the salt concentration was increasing the values of A_2 were significantly decreased, this may be related to the change in conformation of single-helix, because it is closely related to the effect observed in R_g and L_p where it's assumed that the counter ion has an influence on intra electrostatic expansion on the xanthan molecule. Similar results were also observed by Muller *et al.*²³, using punctual experiments, and now confirmed with thousand of points.

4.3 Circular Dichroism

The result shown by circular dichroism, supports the reasoning of the conformational change of single-stranded to a more compact structure, because there was a very significant change in the molecular conformation of the saline sample (X_p 0.1 molL⁻¹ NaCl) compared to the same purified (X-P) in water.

According to Matsuda, Biyajima and Sato¹³, on circular dichroism the increasing of peak at 200nm indicates the change in xanthan conformation to a compact single-helix, confirming the found results^{13, 21}.

5. Conclusion

The xanthan molecule is very sensitive to changes in saline concentration, so that in the absence of counter ions assumes an expanded and rigid single stranded conformation and as demonstrated by the correlation between R_g , M_w , A_2 , L_p and circular dichroism discussed here when the solvent changes from ultra-pure water to low salt concentration there is an abrupt change for a single compact helix. So, the use of ACM could be a powerful tool to indicate and observe abrupt changes in polyelectrolyte concentration, like Xanthan gum.

6. References

- (1) Bergmann, D.; Furth, G.; Mayer, C. *International Journal of Biological Macromolecules* **2008**, 43, 245–251.
- (2) Rodd, A.B.; Dunstan, B.D.E.; Bogera; D.V. *Carbohydrate polymers* **2000**, 42, 159-174.
- (3) Stankowski, J.D.; Mueller, B.E.; Zeller, S.G. *Carbohydrate Research* **1993**, 241-321.
- (4) Dea, I.C.M., Morris, E.R. *Extracellular Microbial Polysaccharides* **1977**, 45, 174-182.
- (5) Milas, M.; Rinaudo, M. *Carbohydrate Polymers* **1986**, 158, 191-204.
- (6) Morris, E.R.; Rees, D.A.; Young, G.; Walkinshaw, M.D.; Darke, A. *Journal of Molecular Biology* **1977**, 110, 1-16.
- (7) Rodd, A.B.; Dunstan, B.D.E.; Bogera; D.V. *Carbohydrate polymers* **2000**, 42, 159-174.
- (8) Tako, M.; Nakamura, S. *Carbohydrate Research* **1984**, 138, 207-213.
- (9) Tako, M.; Teruya, T.; Tamaki, Y.; *Colloid and Polymer Science* **2010**, 288, 1161-1166.
- (10) Meyer, E.L.; Fuller, G.G.; Clark, R.C.; Kulicke, W.M. *Macromolecules* **1993**, 26, 504-511.
- (11) Bresolin, T.M.; Sander, P.C.; Reicher, F.; Sierakowski, M.R.; Rinaudo, M.; Ganter, J.L.M.S. *Carbohydrate polymers* **1997**, 33, 131-138.
- (12) Bresolin, T.M.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Reicher, F.; Ganter, J.L.M.S. *International Journal of Biological Macromolecules* **1999**, 26, 225-231.
- (13) Matsuda, Y.; Biyajima, Y.; Sato, T. *Polymer Journal* **2009**, 41, 7, 526-532.

- (14) Khouryieh, H.A.; Herald, T.J.; Aramouni, S.; Alavi, S. *Food research international* **2007**, 40, 883–893.
- (15) Sandolo, C.; Bulone, D.; Mangione, M.R.; Meo, C.D.; Alhaique, F.; Matricardi, P.; Coviello, T. *Carbohydrate Polymers* **2010**, 82, 733-741.
- (16) Rinaudo, M.; Milas, M.; Lambert, F. *Macromolecules* **1983**, 16, 816-819.
- (17) Sasaki, G. L., Riter, D. S.; Santana Filho, A. P.; Guerrini, M.; Lima, M. A.; Cosentino, C.; Souza, L.M.; Cipriani, T.R.; Rudd, T.R.; Nader, H.B.; Yates, E.A.; Gorin, P.A.J.; Torri, G.; Iacomini, M. *Analyst* **2011**, 136, 2330-2338.
- (18) Renou, F.; Petibon, O.; Malhiac, C.; Grisel, M. *Food Hydrocolloids* **2013**, 32, 331-340.
- (19) Camesano, T.A.; Wilkinson, K.J. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 1184-1191.
- (20) Lecourtier, J.; Chauveteau, G.; Muller, G. *International Journal of Biological Macromolecules* **1986**, 8, 306-310.
- (21) Milas, M.; Rinaudo, M. *Carbohydrate Research* **1979**, 76, 189-196.
- (22) Milas, M.; Reed, R.F.; Printz, S. *Biological Macromolecules* **1996**, 18, 211-221.
- (23) Muller, G.; Anrhourrache, M.; Lecourtier, J.; Chauveteau, G. *International Journal of Biological Macromolecules* **1985**, 8, 167-172.
- (24) Sorci, G.A.; Reed, W.F. *Macromolecules* **2002**, 35, 5218-5227.
- (25) Gulrez, S.K.H.; Al-Assaf, S.; Fang, Y.; Phillips, G.O.; Guning, A.P. *Carbohydrate polymers* **2012**, 90, 1235-1243.
- (26) Freitas, R.A.; Drenski, M.F.; Alb, A.M.; Reed, W.F. *Materials Science and Engineering C* **2010**, 30, 34-41.
- (27) Tinland, B.; Rinaudo, M. *Macromolecules* **1989**, 22, 1863-1865.

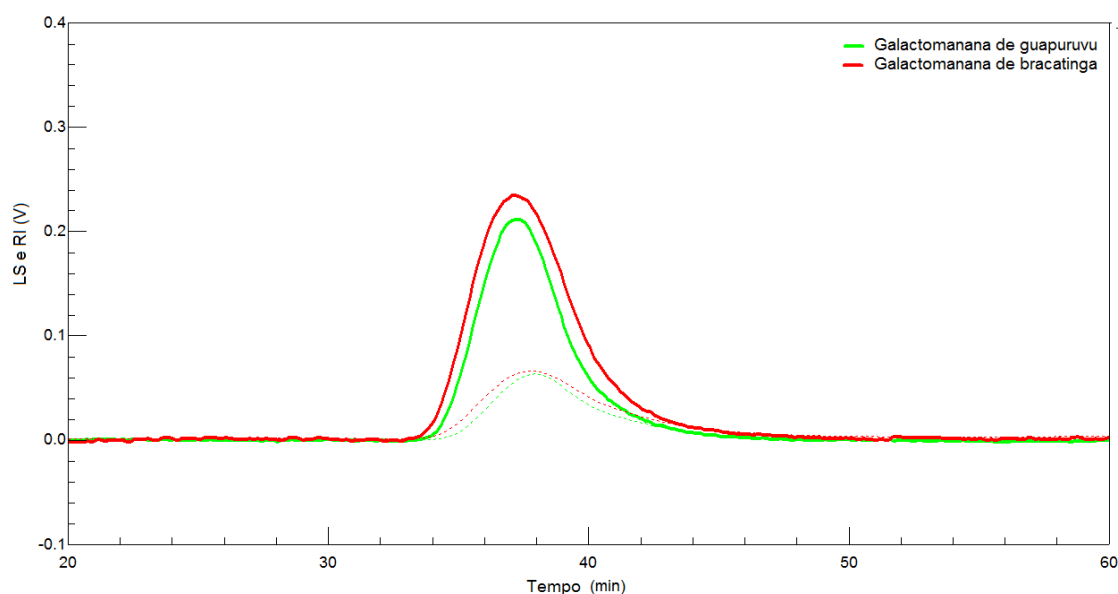
5. DEMAIS RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS GALACTOMANANAS

Após realizar a extração e purificação das galactomananas B e G, segundo o protocolo descrito nos material e métodos deste trabalho, foi possível estabelecer algumas comparações com os valores encontrados na literatura para as amostras de mesma espécie.

As amostras de galactomananas de bracinga (B) e guapuruvu (G) provenientes dos procedimentos de extração e purificação foram injetadas em HPSEC-MALLS-RI-VIS, os perfis obtidos foram homogêneos (figura 17) e apresentaram, respectivamente, valores de massa molar média ponderal em peso (M_w) de 873.500 e 713.100 g/mol, raio de giração (R_g) de 65,2 e 42,3 nm e índice de polidispersão (Pd) de 1,532 e 1,382 (Tabela 3).

FIGURA 17 – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DE GALACTOMANANAS



NOTA: HPSEC-MALLS-RI, Linha contínua: Espalhamento de luz laser a 90°. Linha pontilhada: Índice de refração. Condições: Nitrito de sódio 0,1 M + Azida de sódio 200 ppm, 0,6 mL/min, 25° C.

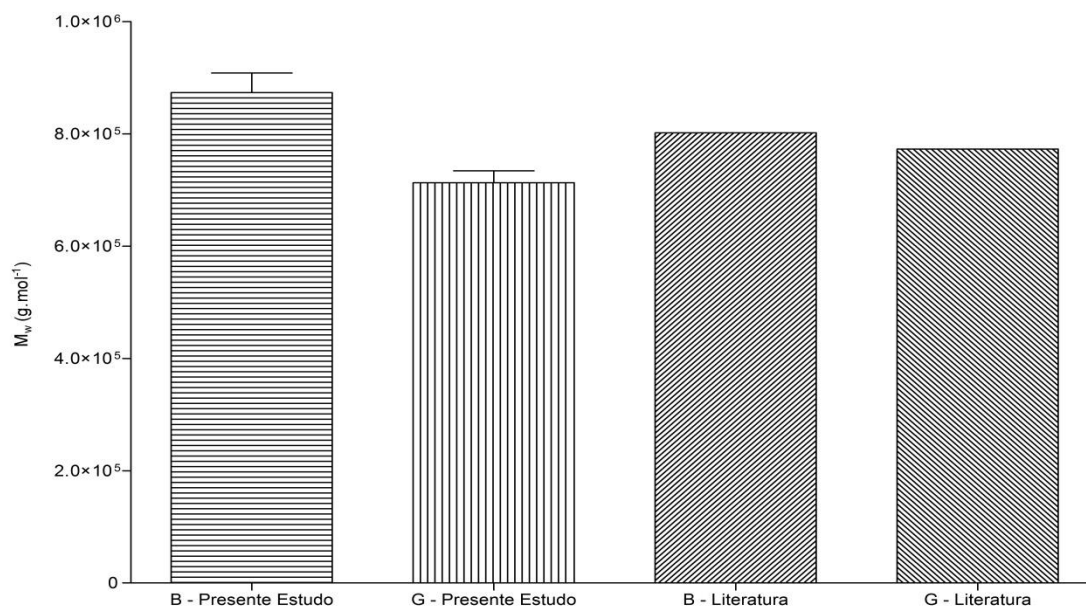
TABELA 3 – PARÂMETROS MACROMOLECULARES DAS AMOSTRAS DE GALACTOMANANA DE BRACATINGA E GUAPURUVU

Amostra	M_w (g/mol)	R_g (nm)	Pd (M_w/M_n)	Rec (%)
B	873.500 ± 34.940	$65,2 \pm 3,3$	$1,532 \pm 0,166$	85
G	713.100 ± 21.393	$42,3 \pm 3,8$	$1,382 \pm 0,116$	100

NOTA: M_w : Massa molar média ponderal em peso. R_g : Raio de giração. Pd: Índice de polidispersão (M_w/M_n). Rec: Recuperação (% de massa recuperada).

Seguindo os mesmos protocolos SALVALAGGIO *et al.* (2010) e KOOP *et al.* (2012) obtiveram respectivamente em média 802.000 g/mol para amostra B e 773.000 g/mol para a amostra G, considerando a ordem de grandeza dos valores e o fato das sementes utilizadas nos trabalhos serem de partidas diferentes é possível estabelecer uma semelhança entre os resultados. A Figura 18 representa a comparação dos dados de M_w do presente estudo com os encontrados por SALVALAGGIO *et al.* (2010) e KOOP *et al.* (2012).

FIGURA 18 – COMPARAÇÃO DE DADOS DE MASSA MOLAR MÉDIA PONDERAL EM PESO COM DADOS DE LITERATURA



NOTA: Gráfico comparativo de massas encontradas para as galactomananas, do presente estudo, em relação aos dados mais relevantes em literatura. Barras verticais e horizontais: Valores do presente estudo. Barras inclinadas: Valores de literatura. FONTE: O autor, SALVALAGGIO *et al.* (2010) e KOOP *et al.* (2012)

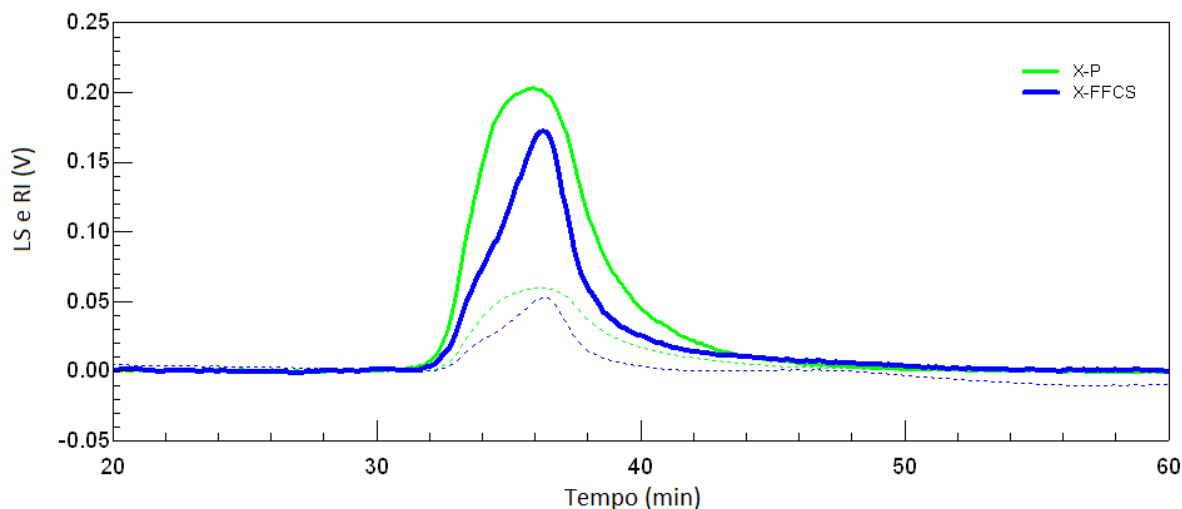
Um parâmetro importante para a análise de homogeneidade é o percentual de recuperação, esse cálculo é feito relacionando a massa detectada pelo equipamento pela massa que foi pesada e informada ao software. Na tabela 3, os valores de recuperação encontrados para as galactomananas B e G foram, respectivamente, 85 e 100%. Esse parâmetro é dado a partir do valor informado de massa de amostra injetada em relação à massa detectada pelo detector de índice de refração e calculada, pelo software Astra 4.70.07, ou seja, quanto mais próximo de 100% for esse valor, menos amostra é perdida por interferentes externos ou internos.

O Índice de polidispersão (Pd) encontrado (Tabela 3) para as amostras está dentro do esperado para um perfil homogêneo de polissacarídeos de origem vegetal, pois se deve considerar a ampla variabilidade de composição e de estrutura inerentes a origem do polímero, ambiente, tempo de maturação e até mesmo região de plantio (GANTER *et al.*, 1993 e 1995; SIERAKOWSKI *et al.*, 2000; CARBONERO *et al.*, 2003; SALVALAGGIO, 2010; VALENGA *et al.*, 2011).

5.2 XANTANA

Da mesma forma que para as galactomananas foram efetuados ensaios de HPSEC-MALLS-RI-VIS para a amostra X-FFCS e X-P, pode-se observar no gráfico 3 o aumento da intensidade do espalhamento de luz (linhas contínuas) na amostra purificada (X-P) e do seu índice de polidispersão (de 1,0 na amostra X-FFCS para 1,2 na amostra X-P), indicando, portanto, um aumento na distribuição dos tamanhos moleculares da xantana.

FIGURA 19 – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA XANTANA



NOTA: HPSEC-MALLS-RI, Linha contínua: Espalhamento de luz laser a 90°. Linha pontilhada: Índice de refração. Condições: Nitrito de sódio 0,1 M + Azida de sódio 200 ppm, 0,6 mL/min, 25° C.

A partir dos cromatogramas representados acima, aplicando a técnica de HPSEC-MALLS-RI-VIS os valores de M_w , R_g , Pd e Rec foram calculados e representados na tabela 4. A diminuição encontrada na massa de X_{-P} é proveniente provavelmente de um processo de desagregação e mudança conformacional de dupla hélice para hélice simples. Os valores de R_g , calculados por esse método, corroboram para esse raciocínio, já que também seguem uma tendência descendente após a purificação. Da mesma forma, como o índice de recuperação aumenta, tem-se mais um indício de que houve uma maior facilidade da molécula permear as colunas de exclusão estérica.

A amostra X_{-P} em nitrito de sódio, na concentração de solvente utilizada no ensaio de HPSEC-MALLS-RI (Nitrito de sódio 0,1 M + Azida de sódio 200 ppm), não torna a formar dupla hélice após o tratamento de purificação, conforme discutido no artigo constante no presente estudo.

Através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio das amostras X_{-FFCS} e X_{-P} , foi realizado o cálculo das integrais dos sinais do hidrogênio anomérico α da manose interna da cadeia lateral da molécula de xantana em relação ao sinal do grupamento de piruvato (1,45 ppm) e ao sinal do grupamento de acetil (2,18 ppm), conforme demonstrado na tabela 4.

TABELA 4 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MACROMOLECULARES DAS AMOSTRAS DE XANTANA

Amostra	M _w (g/mol)	R _g (nm)	Pd (M _w /M _n)	Rec (%)	$\int \alpha^1H$	\int Piruvato	\int Acetil
X-FFCS	2.000.000 ± 200.000	135,4 ± 3,4	1,0 ± 0,1	65	1,0	0,74	0,36
X-P	1.200.000 ± 100.000	86,5 ± 2,6	1,2 ± 0,05	100	1,0	0,70	0,30
Xantana ^a	1.800.000	-	1,4	-	1,0	1,0	0,12
Xantana ^b	4.800.000	-	-	-	1,0	0,98	0,99
Xantana ^c	3.600.000	230	-	-	-	-	-
Xantana ^d	2.900.000						

NOTA: M_w: Massa molar média ponderal em peso. R_g: Raio de giração. Pd: Índice de polidispersão (M_w/M_n). Rec: Recuperação (% de massa recuperada por HPSEC-MALLS-RI). Integrais obtidas por RMN através do software Topspin versão 2.1. X-FFCS: Xantana comercial do presente estudo. X-P: Xantana purificada do presente estudo. Xantana^a: Trabalho de Muller *et al.* (1986). Xantana^b: Trabalho de Lecourtier *et al.* (1986). Xantana^c: Trabalho de Milas *et al.* (1978). Xantana^d: Trabalho de Bergmann *et al.* (1978).

A tabela 4 demonstra a grande variedade de valores encontrados em literatura para M_w e R_g da xantana, isso se deve às diferentes estruturas conformacionais que a mesma pode assumir, bem como os diferentes métodos utilizados para sua obtenção e purificação.

É importante ressaltar o teor de piruvatação e acetilação da xantana, visto que são esses radicais que conferem à molécula a característica de polieletrólito. Nesse trabalho os teores de acetil e piruvato foram mantidos e os valores encontrados foram coerentes com a mudança conformacional da molécula de xantana, assim foi possível realizar um estudo inédito de análise da disponibilização iônica na conformação molecular, e, na interação com as galactomananas B e G.

5.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

Através dos ensaios de espalhamento de luz dinâmico foram determinados os valores de R_h , Pd, ρ (tabela 5). Além destes três parâmetros foram determinados valores de retenção de dados e diferença de linha de base. Esses dois últimos parâmetros são referentes a confiabilidade dos dados experimentais, sendo que quanto maior a retenção de dados maior a pureza da solução e quanto menor a diferença de linha de base menos interferentes externos influenciaram a leitura da autocorrelação.

TABELA 5 – PARÂMETROS MACROMOLECULARES DE XANTANA E GALACTOMANANA DE GUAPURUVU OBTIDOS POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

Amostra	R_h (nm)	Pd (DLS)	ρ^*	Retenção de dados (%)	Diferença de linha de base (%)
X-FFCS	369,15	0,402	0,367	-	0,350
X-P	240,45	0,336	0,360	97,93	0,143
G	241,75	0,433	0,175	-	2,806

NOTA: R_h : Raio hidrodinâmico. Pd: Polidispersão dinâmica. ρ : Fator de forma. Valores obtidos através de análise de espalhamento de luz dinâmico. *Valor calculado a partir de R_g/R_h .

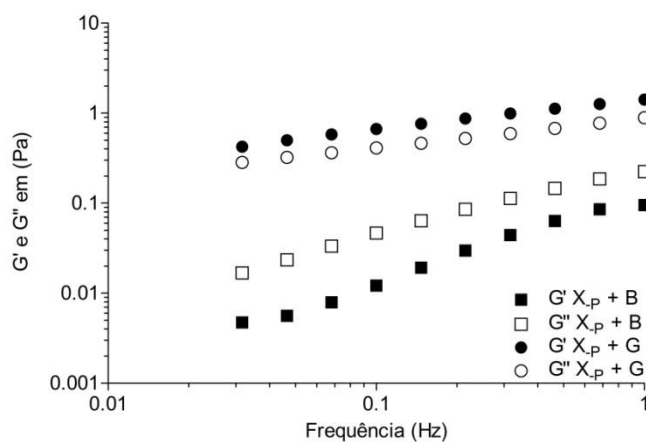
Os valores do fator (ρ) para as duas amostras de xantana (X-FFCS e X-P) são incompatíveis com os valores correspondentes a topografia de bastão. Essa diferença é provavelmente oriunda dos valores determinados para o R_h . Como a determinação do fator de forma se dá pela razão entre R_g e R_h houve diminuição do valor final. Como o método de espalhamento de luz dinâmico utilizado é realizado “in bath” é possível que tenha havido influência de emaranhados moleculares, não necessariamente agregados, mas sim emaranhados que mesmo após as filtrações foram se formando à medida que a auto-correlação de dados acontecia, justificando portanto, os altos valores encontrados não somente para as análises de xantana como também para a galactomanana G.

5.4 REOLOGIA DAS MISTURAS

Através da análise de varredura de frequência foram comparadas as misturas binárias de xantana purificada e galactomananas (B e G) (gráfico 4) com as misturas binárias de xantana comercial e galactomananas (B e G) (figura 20). É possível observar que para as misturas binárias contendo a galactomanana G houve formação de gel ($G' > G''$) em ambas as misturas com xantana (X_{-P} e X_{-FFCS}), contudo a mistura contendo a xantana comercial teve uma rigidez acentuadamente maior do que a mistura contendo xantana purificada. Isso pode ser observado comparando os valores de G' e G'' na frequência de 0,1 Hz, onde, para a mistura contendo xantana comercial obteve-se 5 e 2 Pa (respectivamente) contra apenas 0,6 e 0,4 Pa para a mistura contendo xantana purificada.

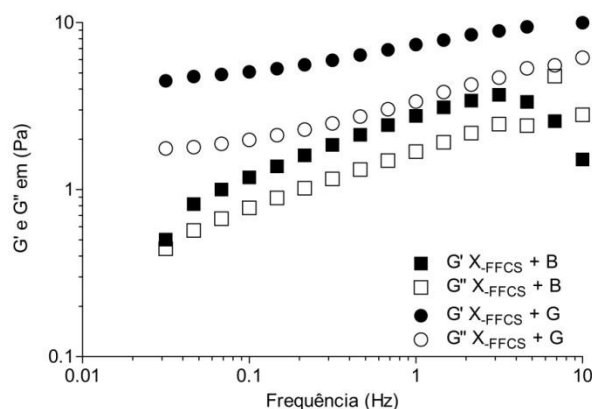
Quanto às misturas relacionadas à galactomanana B, quando misturada com xantana purificada houve sobreposição do caráter líquido (G'') sobre o caráter sólido (G'), em contra partida quando a mistura foi realizada com xantana comercial houve formação de gel ($G' > G''$). Também a 0,1 Hz pode-se observar para o caso da mistura de X_{-P} e B o valor de 0,01 Pa para G' contra 0,05 Pa para G'' , correspondendo portanto a uma solução viscosa, todavia na mistura de X_{-FFCS} e B o valor de G' é 1,0 Pa enquanto o de G'' é de apenas 0,6 Pa, caracterizando um gel.

FIGURA 20 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DE MISTURA BINÁRIA DE XANTANA PURIFICADA E GALACTOMANANAS (B E G)



NOTA: Varredura de frequência, com tensão de cisalhamento constante de 10 Pa estipulada através da faixa visco elástica linear pela varredura de tensão. Círculos: Misturas contendo galactomanana G. Quadrados: Misturas contendo galactomanana B. Símbolos fechados: Caráter Sólido. Símbolos abertos: Caráter líquido.

FIGURA 21 – VARREDURA DE FREQUÊNCIA DE MISTURA BINÁRIA DE XANTANA COMERCIAL E GALACTOMANANAS (B E G)



NOTA: Varredura de frequência, com tensão de cisalhamento constante de 10 Pa estipulada através da faixa visco elástica linear pela varredura de tensão. Círculos: Misturas contendo galactomanana G. Quadrados: Misturas contendo galactomanana B. Símbolos fechados: Caráter Sólido. Símbolos abertos: Caráter Líquido.

É possível ainda, correlacionar as geleificações entre si em função da razão Man/Gal comparando os géis formados pela mistura de X_{FFCS} e G com a mistura de X_{FFCS} e B (figura 21).

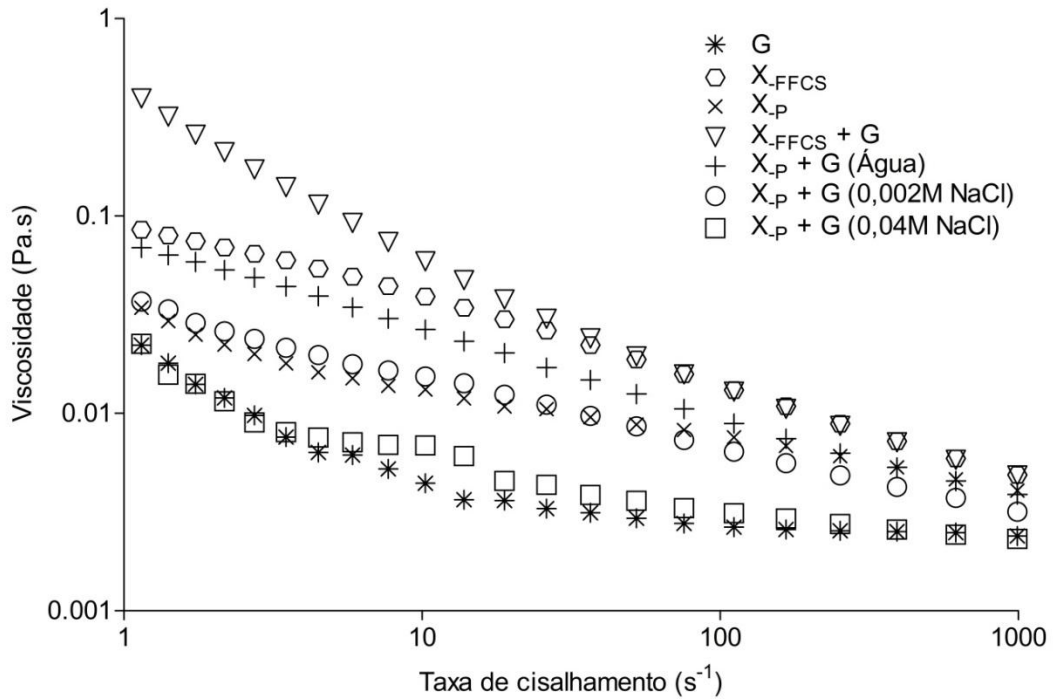
Esse resultado corrobora para a literatura apresentada na introdução desse estudo, pois a 0,1 Hz os valores de G' e G'' da mistura contendo a galactomanana menos substituída (G) são de uma ordem de grandeza superior ao dobro dos valores encontrados para mistura contendo a galactomanana mais substituída (B). Nessa análise, observa-se que a mistura de xantana:galactomanana contendo galactomanana mais substituída (B) teve formação de gel menos rígido do que a mistura xantana:galactomanana relacionada a galactomanana menos substituída (G).

As análises de curvas de viscosidade em diferentes concentrações salinas (0,002 M e 0,04 M de NaCl) foram realizadas apenas com a mistura contendo galactomanana de guapuruvu (G), pois foi essa a mistura que apresentou maior rigidez de geleificação no ensaio de varredura de frequência.

A figura 22 demonstra que a viscosidade inicial da mistura de X_{FFCS} com G foi cerca de dez vezes maior do que as viscosidades das amostras isoladas e das misturas de X_P com G, isso pode estar relacionado à conformação molecular, a estrutura de interação necessita de estabelecer ligações de hidrogênio conforme descrito por Tako *et al.* (2010) e ao retirar os contra-íons a molécula de X_P não é

mais compatível com a interação molecular que gera o aumento da viscosidade e consequente geleificação.

FIGURA 22 – COMPARAÇÃO DE CURVAS DE VISCOSIDADE DOS POLISSACARÍDEOS ISOLADAMENTE E EM MISTURA SINÉRGICA



NOTA: Asterisco: Galactomanana de guapuruvu. Hexágono: Xantana comercial (X_{FFCS}). X: Xantana purificada (X_P). Triângulo invertido: Mistura contendo xantana comercial e galactomanana de guapuruvu. Cruz: Mistura contendo xantana purificada e galactomanana de guapuruvu em água. Circulo: Mistura contendo xantana purificada e galactomanana de guapuruvu em solução de 0,002 M de NaCl. Quadrado: Mistura contendo xantana purificada e galactomanana de guapuruvu em solução de 0,04 M de NaCl. Todos os experimentos tiveram concentração polimérica final de 5 g/L.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As galactomananas de endosperma de *Schizolobium parahybae* (G) e de sementes de *Mimosa scabrella* (B) foram extraídas e analisadas por HPSEC-MALLS-RI e as amostras apresentaram perfil homogêneo.
- O procedimento de purificação da xantana (comercial) foi eficiente e proporcionou a análise da xantana em hélice simples (X_{-P}) para o estudo em tempo real de influência da salinidade da solução na sua conformação macromolecular.
- Para a análise de espalhamento de luz laser foi desenvolvido o sistema de mistura automática contínua, modificando o sistema de HPSEC-MALLS-RI, e, a metodologia foi eficiente para estudar os parâmetros macromoleculares da xantana purificada.
- A conformação da xantana foi avaliada **em tempo real** por ACM-SLS obtendo-se A_2 , L_p , M_w e R_g em função do aumento da concentração salina.
- Através do espalhamento de luz dinâmico foi possível determinar valores de R_h para X_{-FFCS} , X_{-P} e G.
- Através do HPSEC-MALLS-RI foi possível determinar os parâmetros físico-químicos dos polissacarídeos X_{-FFCS} , X_{-P} , B e G.
- Através dos ensaios reológicos pode-se observar a perda da capacidade geleificante da xantana purificada (hélice simples – X_{-P}) com as galactomananas.

ANEXOS

Código fonte programa em Linguagem C para tratamento de dados de ACM-SLS

```

#include<stdio.h>
#include<stdlib.h>
#include<math.h>
#define MAX 4500

struct estrutura{
float time,d8,d9,d10,d11,d12,d13,d14,ri,visco;
};

int main (){

    int j,i;
    float *ponteiro,lambdanm,vtolueno,k,c,nref,dndc,Na,lambda,teste;
    float normal[7], vsolvente[7], qquad[7], q[7], seno[7], coefang[MAX], coeflin[MAX],
Mw[MAX], Rg[MAX], ri[MAX], ritemp[MAX], recipraizri[MAX];
    float MwGPC, A2[MAX], Lp[MAX], RgLpchute, Lpcerto[MAX], L, Mw90[MAX],
viscorel[MAX], viscoesp[MAX], viscointr[MAX], RgFlory[MAX];
    struct estrutura dados[MAX];
    struct estrutura rtheta[MAX];
    struct estrutura kcrtheta[MAX];

    nref = 1.335;// indice de refracao
    dndc = 0.125;// sem unidade
    Na = 6.02214129e+23;// 1 mol -> numero de avogadro
    lambda = 0.00006328;// cm
    lambdanm = 632.8;
    vtolueno = 0.284386;// volts
    c = 0.0005;// g/cm3
    normal[0] = 0.765;
    normal[1] = 0.8;
    normal[2] = 1.033;
    normal[3] = 1.;
    normal[4] = 1.233;
    normal[5] = 1.086;
    normal[6] = 1.147;
    MwGPC = 1192000.;//Mw determinado pelo GPC.
    L = ((MwGPC * 1.04)/954.78526);

```

```

//calculo das constantes
k=(4*(M_PI*M_PI)*(nref*nref)*(dndc*dndc))/(Na*(lambda*lambda*lambda*lambda
));// constante optica

seno[0]=sin(((60/2)*M_PI)/180);
seno[1]=sin(((69/2)*M_PI)/180);
seno[2]=sin(((80/2)*M_PI)/180);
seno[3]=sin(((90/2)*M_PI)/180);
seno[4]=sin(((100/2)*M_PI)/180);
seno[5]=sin(((111/2)*M_PI)/180);
seno[6]=sin(((121/2)*M_PI)/180);

//      printf("valores dos senos de theta/2%f %f %f %f %f %f %f
\n\n\n\n\n\n",seno[0],seno[1],seno[2],seno[3],seno[4],seno[5],seno[6]);

q[0]=((4*M_PI*nref)/lambdanm)*seno[0];
q[1]=((4*M_PI*nref)/lambdanm)*seno[1];
q[2]=((4*M_PI*nref)/lambdanm)*seno[2];
q[3]=((4*M_PI*nref)/lambdanm)*seno[3];
q[4]=((4*M_PI*nref)/lambdanm)*seno[4];
q[5]=((4*M_PI*nref)/lambdanm)*seno[5];
q[6]=((4*M_PI*nref)/lambdanm)*seno[6];

qqquad[0]=q[0]*q[0];
qqquad[1]=q[1]*q[1];
qqquad[2]=q[2]*q[2];
qqquad[3]=q[3]*q[3];
qqquad[4]=q[4]*q[4];
qqquad[5]=q[5]*q[5];
qqquad[6]=q[6]*q[6];

printf("q 60°   - 69°   - 80°   - 90°   - 100°   - 111°   - 121°\n");
printf(" %f - %f - %f - %f - %f - %f - %f\n",q[0],q[1],q[2],q[3],q[4],q[5],q[6]);
printf("q² 60°   - 69°   - 80°   - 90°   - 100°   - 111°   - 121°\n");
printf(" %f - %f - %f - %f - %f - %f - %f\n", qqquad[0], qqquad[1], qqquad[2],
qqquad[3], qqquad[4], qqquad[5], qqquad[6]);
printf("k = %.10f \n",k);
printf("c = %f g/cm³\n",c);
getchar();

FILE *fp;
fp = fopen ("ACM.csv","r");//ACMII.CSV OU ACM.csv
if (fp == NULL) {
    printf ("Não foi possível abrir o arquivo ACM-IIA.TXT\n");
    return 1;
}

for(i=0;i<MAX;i++){

```

```

        fscanf(fp,"%f;%f;%f;%f;%f;%f;%f;%f;%f;%f", &datos[i].time, &datos[i].d8,
&datos[i].d9, &datos[i].d10, &datos[i].d11, &datos[i].d12, &datos[i].d13, &datos[i].d14,
&datos[i].ri, &datos[i].visco);
        //printf("%f;%f;%f;%f;%f;%f;%f;%f;%f;%f\n",datos[i].time, datos[i].d8, datos[i].d9,
datos[i].d10, datos[i].d11, datos[i].d12, datos[i].d13, datos[i].d14, datos[i].ri,
datos[i].visco);
    }
    vsolvente[0] = datos[50].d8;
    vsolvente[1] = datos[50].d9;
    vsolvente[2] = datos[50].d10;
    vsolvente[3] = datos[50].d11;
    vsolvente[4] = datos[50].d12;
    vsolvente[5] = datos[50].d13;
    vsolvente[6] = datos[50].d14;

    for(i=0;i<MAX;i++){

        //formula de rtheta
        rtheta[i].d8=((datos[i].d8-
vsolvente[0])/vtolueno)*0.944*(2258203.827/(lambdanm*lambdanm*lambdanm*lambdan
m))*normal[0];
        rtheta[i].d9=((datos[i].d9-
vsolvente[1])/vtolueno)*0.944*(2258203.827/(lambdanm*lambdanm*lambdanm*lambdan
m))*normal[1];
        rtheta[i].d10=((datos[i].d10-
vsolvente[2])/vtolueno)*0.944*(2258203.827/(lambdanm*lambdanm*lambdanm*lambdan
m))*normal[2];
        rtheta[i].d11=((datos[i].d11-
vsolvente[3])/vtolueno)*0.944*(2258203.827/(lambdanm*lambdanm*lambdanm*lambdan
m))*normal[3];
        rtheta[i].d12=((datos[i].d12-
vsolvente[4])/vtolueno)*0.944*(2258203.827/(lambdanm*lambdanm*lambdanm*lambdan
m))*normal[4];
        rtheta[i].d13=((datos[i].d13-
vsolvente[5])/vtolueno)*0.944*(2258203.827/(lambdanm*lambdanm*lambdanm*lambdan
m))*normal[5];
        rtheta[i].d14=((datos[i].d14-
vsolvente[6])/vtolueno)*0.944*(2258203.827/(lambdanm*lambdanm*lambdanm*lambdan
m))*normal[6];
    }

    for(i=0;i<MAX;i++){
        //printf("%.10f ; %.10f ; %.10f ; %.10f ; %.10f ; %.10f ;
%.10f\n",rtheta[i].d8,rtheta[i].d9,rtheta[i].d10,rtheta[i].d11,rtheta[i].d12,rtheta[i].d13,rtheta
[i].d14);

        kcrtheta[i].d8 = (k * c) / rtheta[i].d8;
        kcrtheta[i].d9 = (k * c) / rtheta[i].d9;
        kcrtheta[i].d10 = (k * c) / rtheta[i].d10;

```

```

krtheta[i].d11 = (k * c) / rtheta[i].d11;
krtheta[i].d12 = (k * c) / rtheta[i].d12;
krtheta[i].d13 = (k * c) / rtheta[i].d13;
krtheta[i].d14 = (k * c) / rtheta[i].d14;

/* if (((i+1)%1000)==0){
    printf("Tecla para continuar mostrando\n");
    getchar();
}

*/
}

for(i=0;i<MAX;i++){

    coefang[i] = ( (7 * ((qquad[0] * kcrtheta[i].d8) + (qquad[1] * kcrtheta[i].d9) +
(qquad[2] * kcrtheta[i].d10) + (qquad[3] * kcrtheta[i].d11) + (qquad[4] * kcrtheta[i].d12) +
(qquad[5] * kcrtheta[i].d13) + (qquad[6] * kcrtheta[i].d14)) - (qquad[0] + qquad[1] +
qquad[2] + qquad[3] + qquad[4] + qquad[5] + qquad[6]) * (kcrtheta[i].d8 + kcrtheta[i].d9 +
kcrtheta[i].d10 + kcrtheta[i].d11 + kcrtheta[i].d12 + kcrtheta[i].d13 + kcrtheta[i].d14)) / (7 *
((qquad[0] * qquad[0]) + (qquad[1] * qquad[1]) + (qquad[2] * qquad[2]) + (qquad[3] *
qquad[3]) + (qquad[4] * qquad[4]) + (qquad[5] * qquad[5]) + (qquad[6] * qquad[6])) -
((qquad[0] + qquad[1] + qquad[2] + qquad[3] + qquad[4] + qquad[5] + qquad[6]) * (qquad[0]
+ qquad[1] + qquad[2] + qquad[3] + qquad[4] + qquad[5] + qquad[6]))) );

    coeflin[i] = ( ((kcrtheta[i].d8 + kcrtheta[i].d9 + kcrtheta[i].d10 + kcrtheta[i].d11
+ kcrtheta[i].d12 + kcrtheta[i].d13 + kcrtheta[i].d14) / 7) - (coefang[i] * ((qquad[0] + qquad[1]
+ qquad[2] + qquad[3] + qquad[4] + qquad[5] + qquad[6]) / 7)));

    //printf("\n %d ---> a = %.10f ; b = %.10f \n",i+1,coefang[i], coeflin[i]);
}

for(i=0;i<MAX;i++){

    Mw[i] = (1/coeflin[i]);
    Rg[i] = (coefang[i] * Mw[i] * 3*(-1));
    Rg[i] = sqrt(Rg[i]);
    printf("%d ---> Mw = %.10f",i+1,Mw[i]);
    printf(" - Rg² = %.10f \n", Rg[i]);

/*    if (((i+1)%100)==0){
        printf("Tecla para continuar mostrando\n");
        getchar();
    }

*/
}

for(i=0;i<1668;i++){//esse numero Ã© onde a sensibilidade do detector de ri estoura
    ritemp[i]=(dados[i].ri-dados[50].ri);

```

```

        ritemp[i]=((ritemp[i]*0.000292908)/0.180);//regra de 3 com o (FC
0.000585816 ACMII) (FC 0.000292908 ACM).
        ritemp[i]=(ritemp[i]*1000);//convertendo para mg/ml.
        ri[i]=(ritemp[i]/58.44);//convertendo para mol/L.
        recipraizri[i]=(1/(sqrt(ri[i])));//reciproco da raiz quadrada de ri.
    }
    for(i=1668;i<MAX;i++){//esse numero Ã© onde a sensibilidade do detector de ri
estoura
        ritemp[i]=(dados[i].ri-dados[50].ri);
        ritemp[i]=((ritemp[i]*0.000585816)/0.180);//regra de 3 com o (FC
0.001171632 ACMII) (FC 0.000585816 ACM).
        ritemp[i]=(ritemp[i]*1000);//convertendo para mg/ml.
        ri[i]=(ritemp[i]/58.44);//convertendo para mol/L.
        recipraizri[i]=(1/(sqrt(ri[i])));//reciproco da raiz quadrada de ri.
    }
    for(i=0;i<MAX;i++){
        A2[i]=(coeflin[i]-(1/MwGPC))/2*c;
        printf("[NaCl] %f = A2 %.30f \n",ri[i],A2[i]);
/*
        if (((i+1)%100)==0){
            printf("Tecla para continuar mostrando\n");
            getchar();
        }
*/
    }

    for(i=0;i<MAX;i++){
        for(j=0;j<200;j++){
            RgLpchute = (((L*j)/3)-(j*j)+(2*(j*j*j)/L)-(2*((j*j*j*j)/(L*L)))*(1-exp(-
L/j)));
            RgLpchute = sqrt(RgLpchute);
            if ((RgLpchute >= (Rg[i] - (Rg[i]*0.05))) && (RgLpchute <= (Rg[i] +
(Rg[i]*0.05)))){
                Lp[i]=RgLpchute;
            }
        }
    }

    for(i=0;i<MAX;i++){
        printf("[NaCl] %f = Lp %f \n",ri[i],Lp[i]);
/*
        if (((i+1)%100)==0){
            printf("Tecla para continuar mostrando\n");
            getchar();
        }
*/
    }

    FILE *gravar;
    gravar = fopen ("RESULTADO.TXT","w");//RESULTADO.TXT E RESULTADO2.TXT

```

```

        if (gravar == NULL) {
            printf ("Nao foi possivel abrir o arquivo RESULTADO.TXT\n");
            return 1;
        }
        fprintf(gravar,"time ; Mw ; Rg ; ri ; 1/sqrt(ri) ; A2 ; Lp\n");
        for(i=0;i<MAX;i++){
            if(Lp[i]<=10)
                fprintf(gravar,"%f ; %f ; %f ; %f ; %f ; %.20f ; \n",dados[i].time, Mw[i],
Rg[i], ri[i], recipraizri[i], A2[i]);
            else
                fprintf(gravar,"%f ; %f ; %f ; %f ; %f ; %.20f ; %f \n",dados[i].time,
Mw[i], Rg[i], ri[i], recipraizri[i], A2[i], Lp[i]);

        }

        for(i=0;i<MAX;i++){
            Mw90[i]= (1 / kcrtheta[i].d11);
            printf("Mw para 90 = %f \n",Mw90[i]);
        }
        FILE *gravamw90;
        gravamw90 = fopen ("Mw.txt","w");
        if (gravamw90 == NULL){
            printf("nao foi possivel criar o arquivo Mw.txt");
            return 1;
        }
        fprintf (gravamw90,"[NaCl] ; Mw90 \n");
        for (i=0;i<MAX;i++){
            fprintf(gravamw90,"%f ; %f \n",ri[i],Mw90[i]);
        }

        fclose (fp);
        fclose (gravar);
        fclose (gravamw90);

        FILE *pkcrtheta;
        pkcrtheta = fopen ("kcrtheta.txt","w");
        if (pkcrtheta == NULL){
            printf("nao foi possivel criar o arquivo kcrtheta.txt");
            return 1;
        }
        fprintf (pkcrtheta,"[NaCl] ; 60 ; 69 ; 80 ; 90 ; 100 ; 111 ; 121 \n");
        for (i=0;i<MAX;i++){
            fprintf(pkcrtheta,"%f ; %.10f ; %.10f ; %.10f ; %.10f ; %.10f ; %.10f ; %.10f
\n",ri[i],kcrtheta[i].d8,kcrtheta[i].d9,kcrtheta[i].d10,kcrtheta[i].d11,kcrtheta[i].d12,kcrtheta[i]
].d13,kcrtheta[i].d14);
        }

        for(i=0;i<MAX;i++){

```

```

        viscorel[i]=((dados[i].visco-dados[4500].visco)/(dados[50].visco-
dados[4500].visco));
        viscoesp[i]=(viscorel[i]-1);
        viscointri[i]=(viscoesp[i]/c);
        RgFlory[i]=cbrt((viscointri[i]*MwGPC)/(cbrt(36)*2.56e+23));
        RgFlory[i]=RgFlory[i]*10000000;
        printf("%f \n",RgFlory[i]);
    }

    FILE *foxflory;
    foxflory = fopen ("foxflory.txt","w");
    if (foxflory == NULL){
        printf("nao foi possivel criar o arquivo foxflory.txt");
        return 1;
    }
    fprintf (foxflory,"ViscoIntrinseca ; RgFloryFox \n");
    for (i=0;i<MAX;i++){
        fprintf(foxflory,"%f ; %.10f \n",viscointri[i],RgFlory[i]);
    }

    fclose (fp);
    fclose (gravar);
    fclose (gravamw90);
    fclose (pkcrtheta);
    fclose (foxflory);

    /*
    Voltagem Tolueno = "0.284386"
    d8      -      60Â°
    d9      -      69Â°
    d10     -      80Â°
    d11     -      90Â°
    d12     -      100Â°
    d13     -      111Â°
    d14     -      121Â°
    */

    return 0;
}

```


REFERÊNCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES INC. Polymes Molecular Weight Distribution and Definitions of Mw Averages v. 5990.7890EN, 2011 Acesso em: 17 de setembro de 2013. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5990-7890EN.pdf>>.
- ALICEWEB2, Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior via Internet. Acesso em: 13 de agosto de 2012. Disponível em: <<http://aliceweb2.mdic.gov.br//index/home>>.
- AZERO, E.G.; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. *Polymer Testing. **Material properties***, v. 21, p. 551-556, 2002.
- BATCHELOR, G. K. An introduction to fluid dynamics. **Cambridge Mathematical Library**, 2002
- BENTO, J.F.; MAZZARO, I.; SILVA, L.M.A.; MOREIRA, R.A.; FERREIRA, M.L.C.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C.L.O. Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 192-199, 2013.
- BERGMANN, D.; FURTH, G.; MAYER, C.; Binding of bivalent cations by xanthan in aqueous solution. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 43, p. 245–251, 2008.
- BRESOLIN, T. M. *et al.*; Viscometric studies on xanthan galactomannan systems. **Carbohydrate polymers**, v. 33, p. 131-138, 1996.
- BRESOLIN, T. M. *et al.* Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **Biological Macromolecules**, P225-231, 1998.
- BRESOLIN, T. M. *et al.* Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan, **Biological Macromolecules**, v. 26, p. 225-231, 1999.
- BURCHARD, W. solubility and solution structure of cellulose derivattives. **Cellulose**, v. 10, p. 213-225, 2003
- CAIRNS, P.; MILES M. J.; MORRIS, V.; Intermolecular binding of xanthan gum and carob gum, **Nature**, v. 322, p. 89-90, 1986.
- CARBONERO, E. R. *et al.*; Structural characterization of a galactomannan from the cyanolichen *Leptogium azureum*. **Carbohydrate Polymers**, v.53, p. 469–473, 2003.
- CARVALHO, P. E. R. Espécies Florestais Brasileiras – Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. **Embrapa**, p. 338-471, 1994.
- CERQUEIRA, M.A. *et al.* Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 408-414, 2009.

CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 649–660, 2009.

CUI, S. W. *et al.* Synergisms between yellow mustard mucilage and galactomannans and applications in food products — A mini review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 121-130, p. 249-256, 2006.

DALGLEISH, D. G.; HALLET, F. R. Dynamic light scattering: applications to food systems. **Food Res. Int.**, v.28, n. 3, p. 181-193, 1995.

DAKIA, P.A.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. **Food chemistry**, v. 102, p. 1368-1374, 2007.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interruptions of seed galactomannans **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 31, p. 241, 1975.

DEA, I. C. M., MORRIS, E. R., Synergistic Xanthan Gels. **Extracellular Microbial Polysaccharides**, v. 45, Chapter 13, p. 174-182, 1977.

DEA, I. C. M.; CLARK, A.H.; MCCLEARY, B.V. Effect of galactose-substitution patterns on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 147, p. 275-294, 1986.

DEBYE, P. Light Scattering in Solutions **Journal of Applied Physics** v. 15, p. 338-342, 1944

DOI, M.; EDWARDS, S. F. The theory of polymer dynamics, **Oxford University Press**, v.73, 1999.

DOYLE, J.P.; GIANNOUL, P.; MARTIN, E.J.; BROOKS, M.; MORRIS, E.R.; Effect of sugars, galactose content and chain length on freeze–thaw gelation of galactomannans **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 391-401, 2006.

EINSTEIN, A. **Ann. der Physik**, v. 17, p. 549, 1905.

EINSTEIN, A. **Ann. Phys**, v. 33, p. 1275, 1910.

ERNANI, P. E. R. Espécies Florestais Brasileiras. Colombo, ed. **Embrapa-SP**, p. 47 e 475, 1994.

ERNST, R. R. Nobel Media, **Nobelprize.org**. Acesso em: agosto/2013. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1991/ernst-photo.html>

FIGUEREDO, D.B.F.; SILVA, J.A.J. Desvendando os mistérios do coeficiente de Pearson. **Revista Política Hoje**, v. 18, p. 115-146, 2009.

FREITAS, R.A.; MARTIN, S.; SANTOS, G.L.; VALENGA, F.; BUCKERIDGE, M.S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. Physico-chemical properties of seed

- xyloglucans from different sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 507–514, 2005.
- FREITAS, R. A.; BUSATO, A. P.; MITCHELL, D. A.; SILVEIRA, J. L. M. Degalatosylation of xyloglucan: Effect on aggregation and conformation, as determined by time dependent static light scattering, HPSEC–MALLS and viscosimetry. **Carbohydrate Polymers**, p. 1636-1642, v. 83, 2011.
- GANTER, J. L. M. S.; MILAS, M.; CORREA, J. B. C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydrate polymers**, v.17, p. 171-175, 1992.
- GANTER, J. L. M. S. *et al.* Structural Studies on Galactomannans From Brazilian Seeds, **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 12:6, p. 753-767, 1993.
- GANTER, J. L. M. S. *et al.* Galactomannans From Brazilian Seeds:Characterization Of The Oligosaccharides Produced By Mild Acid Hydrolysis.. **International Journal of Biological Macromolecules**, USA, v. 17, p. 13-19, 1995.
- GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Water-soluble galactomannans from seeds of *Mimosaceae* spp.. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 55-62, 1997.
- GANTER, J. L. M. S.; SABBI, J. C.; REED, W. R. Real-time monitoring of enzymatic hydrolysis of galactomannans. **Biopolymers**, v. 59, p. 226-242, 2001.
- GIDLEY, M.J.; LILFORD, P.J.; ROWLANDS, D.W.; LANG, P.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V.; EDWARDS, M.; FANUTTI, C.; REID, J.S.G. Structure and solution properties of tamarind-seed polysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 214, p. 299-314, 1991.
- HUGLIN, M.B. Light Scattering from Polymer Solutions, **Academic Press**, cap. 6, 1972.
- JOSHI, H.; KAPOOR, V.P. Cassia grandis Linn. f. seed galactomannan: structural and crystallographical studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1907-1912, 2003.
- KHOURYIEH, H. A. *et al.* Intrinsic viscosity and viscoelastic properties of xanthan/guar mixtures in dilute solutions: Effect of salt concentration on the polymer interactions. **Food research international**. v. 40 p. 883–893, 2007
- KONAK, C. *et al.*; Dynamic light scattering from polymer solutions and gels at the gelation threshold. **Polymer**, v. 32, p. 1077-1079, 1991.
- KOOP, H.S. *et al.* Rheological behavior of gel of xanthan with seed galactomannan: Effect of hydroalcoholic–ascorbic acid. **Materials Science and Engineering**, v. 29, p. 559–563, 2009.
- KOOP, H.S.; DA LOZZO, E. J.; FRANCO, C. R. C.; MARTINEZ, G. R.; MITCHELL, D. A.; SILVEIRA, J.L.M. Rheological characterization of a xanthan-galactomannan hydrogel loaded with lipophilic substances. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, p. 2457-2467, 2012.

KOOP, H.S.; FREITAS, R.A. de.; SOUZA, L.M.; SILVEIRA, J.L.M. Stability-indicating LC-PDA Method for Determination of Curcuminoids in Microemulsions and Polysaccharide Hydrogel. **Chromatographia**, v. 76, p. 1041-1048, 2013.

KOSTANSKI, L. K.; KELLER, D.M.; HAMIELEC, A.E. Size-exclusion chromatography - a review of calibration methodologies. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 58, p. 159-186, 2004.

KOSTKO, F. *et al.* Dynamic light-scattering monitoring of a transient biopolymer gel. **Physica A**, v.323, p.124-138, 2003.

LECOURTIER, J.; CHAUVETEAU, G.; MULLER, G. Salt-induced extension and dissociation of a native double-stranded xanthan **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, p. 306-310, 1986.

MENDES, M. M. *et al.* Anti-Snake Venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 859-866, 2008.

MEYER, E. L. *et al.* Investigation of xanthan gum solution behavior under shear-flow using rheo-optical techniques. **Macromolecules** 1993.

MILAS, M.; RINAUDO, M. Properties of xanthan gum in aqueous solutions: Role of the conformational transition. **Carbohydrate Polymers**, v. 158, p. 191-204, 1986.

MCCLEARY, B. V. *et al.* Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydrate Research**, v. 92, p. 269-285, 1981.

MORRIS, E. R. *et al.* Competitive inhibition of interchain interactions in polysaccharide systems. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 363, 1980.

MORRIS, E. R. *et al.* Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host. **Journal of Molecular Biology**, v.110, p. 1-16, 1977.

MULLER, G.; ANRHOURRACHE, M.; LECOURTIER, J.; CHAUVETEAU, G. Salt dependence of the conformation of a single-stranded xanthan **International Journal of Biological Macromolecules** v. 8, p. 167-172, 1986.

MURPHY, R. M. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? **Curr. Opin. Biotechn.** vol.8 p.25–30, 1997.

NASCIMENTO, B.; GUIMES, R. F. Síntese e caracterização do sulfato de acetato de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açúcar, para aplicação como aditivo na construção civil. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2010.

NICOLAU, A.; MARIATH, R.M.; SAMIOS, D. Study of the properties of polymers obtained from vegetable oil derivatives by light scattering techniques. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 2, p. 452-457, 2009.

OKUMURA, F.; CAVALHEIRO, E.T.G.; NÓBREGA, J.A. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. **Química Nova**, v.27, p. 832-836, 2004

PLANTA SONYA Acesso em: 18 de março de 2014. Disponível em: <<http://www.plantasonya.com.br/wp-content/img/Schizolobium-Parahyba.jpg>>.

PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of Caesalpinioideae. **Prytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 737-743, 1998.

POLLARD, M.A.; FISCHER, P.A. Partial aqueous solubility of low-galactose-content galactomannans - What is the quantitative basis? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 184–190, 2006.

POLLARD, M.A. *et al.* Investigation of equilibrium solubility of a carob galactomannan. **Food Hydrocolloids**. v. 21 p-683-692, 2007.

POLLARD, M. A. *et al.* Characterization of galactomannans isolated from legume endosperms of Caesalpinioideae and Faboideae subfamilies by multidetection aqueous SEC. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 70–84, 2010.

RABI, I. I. **Physical Review**, v. 51, p.652, 1937.

REED, C. E.; REED, W. F. Monte Carlo electrostatic persistence lengths compared with experiment and theory **Journal of Chemical Physics**, p. 8479, v. 94, 1991.

REED, W. F. Data evaluation for unified multi-detector size exclusion chromatography — molar mass, viscosity and radius of gyration distributions **Macromolecular Chemistry and Physics** , p. 1539-1575, v. 196, 1995.

REED, W. F. Conformations and flexibility of native and re-natured xanthan in aqueous solutions **International Journal of Biological Macromolecules**.v. 18, p. 211-221, 1996.

RICHTER, S.; BRAND, T.; BERGER, S. Comparative Monitoring of the Gelation Process of a Thermoreversible Gelling System Made of Xanthan Gum and Locust Bean Gum by Dynamic Light Scattering and ¹H NMR Spectroscopy. **Macromolecular rapid communications**, v. 25, p. 548-553, 2005.

ROCKS, J.K. Xanthan gum. **Food Technology**, v. 25, 1971.

RODD, A. B.; DUNSTANB, D. E.; BOGERA; D. V.; Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology. **Carbohydrate polymers**, v. 42, p. 159-174, 2000.

SALVALAGGIO, M.O. Galactomananas de sementes de espécies brasileiras: Otimização da extração, caracterização físico-química e por espalhamento de luz. Departamento de Bioquímica, **Universidade Federal do Paraná**, 2010.

SANDOLO, C. *et al.* Synergistic interaction of Locust Bean Gum and Xanthan investigated by rheology and light scattering. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 733-741, 2010.

SCHÄRTL, W. Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions. **Springer Laboratory**, v. 14, 2007.

SCHRAMM, G. Medidas do comportamento elástico de fluidos viscoelásticos, in: **Reologia e reometria - Fundamentos teóricos e práticos**, São Paulo, Artliber, 2006.

SHO, T.; SATO, T.; NORISUYE, T. Viscosity behavior and persistence length of sodium xanthan in aqueous sodium chloride, **Biophysical Chemistry** v. 25 p. 307-313, 1986.

SECOUARD, S.; GRISEL, M.; MALHIAC, C. Flavour release study as a way to explain xanthan–galactomannan interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1237-1244, 2007

SETTLE, F. A., Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. **Prentice Hall** c. 46, p. 853-866, 1997.

SHIBAYAMA, M., NORISUYE, T. Gel formation analyses by dynamic light scattering. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 75, p. 641–659, 2002.

SIERAKOWSKI, M. R. *et al.* Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p 51–57, 2000.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**, John Wiley & Sons, inc, v. 7, p. 144-157, 2005.

SINCO, P. J.; SINGH, Y. Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences. **Wolters Kluwer**, p.469-491, v.6, 2011.

SORCI, G.A.; REED, W.F. Effect of valence and chemical species of added electrolyte on polyelectrolyte conformations and interactions **Macromolecules** v. 35, p. 5218-5227, 2002.

SOUZA, C.F.; LUCYSZYN, N.; FERRAZ, F.A.; SIERAKOWSKI, M.R. Caesalpinia ferrea var. ferrea seeds as a new source of partially substituted galactomannan. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 641-647, 2010

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P. Seed galactomannans: an overview. **Chemistry and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 295-317, 2005.

STANKOWSKI, J.D.; MUELLER, B.E.; ZELLER, S.G. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydrate Research**, v. 241, p. 321, 1993.

STRELITZKI, R.; REED, W. F. Automated Batch Characterization of Polymer Solutions by Static Light Scattering and Viscometry. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 73, p. 2359–2368, 1999.

SUTHERLAND, W., **Phil. Magazine.**, v. 9, p. 781, 1905.

TAKO, M.; NAKAMURA, S.; Synergistic interaction between xanthan and guar gum, **Carbohydrate Research**, v. 138, p 207-213, 1984.

TAKO, M. Synergistic interaction between xanthan and tara-bean gum **Carbohydrate Polymers**. v. 16, p. 239–252, 1991.

TAKO, M.; TAKESHI, T.; TAMAKI, Y.; OHKAWA, K.; Co-gelation mechanism of xanthan and galactomannan **Colloid and Polymer Science** v. 288, p. 1161-1166, 2010.

Tecnal Equipamentos para laboratório 2013 Acesso em: 10/09/2013 Disponível em:<<http://www.tecnalab.com.br/ModuleHandlers/Content/picture.aspx?idContentPicture=1028&w=297&h=405>>.

©Thomas Scientific 2013 Acesso em: 10/09/2013 Disponível em: <http://www.thomasci.com/_resources/_global/media/resized/00005/ihwx.1267f683-e496-4ae1-9830-90ddafc73025.500.500.jpg>.

VALENGA, F. *et al.* Galactomannan-Alginate Synergism Applied in Albumin Encapsulation. **Macromolecular Symposia.**, v. 299-300, p. 99–106, 2011.

VENDRUSCOLO, C.W.; ANDREAZZA, I.F.; GANTER, J.L.M.S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T.M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 1-11, 2005

WANG, F.; WANG, Y. J.; SUN, Z. Conformational Role of Xanthan in its Interaction with Locust Bean Gum, **Food Chemistry and Toxicology**. v. 67, p. 2609-2614, 2002.

WIKIPEDIA, Ficheiro:Mimosa-scabrella.jpg, Acesso em: 18 de março de 2014. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Mimosa-scabrella.jpg>>.

WYATT, P.J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 272, p. 1-40, 1993

YANG, L.; ZHANG, L.-M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 3, p. 349, 361, 2009.

YAMAKAWA, H. **Modern Theory of Polymer Solutions**, Harper and Row: New York, 1971.

ZIMM, B.H. Molecular Theory of the Scattering of Light in Fluids. **The Journal of Chemical Physics**, v. 13, p. 141-145, 1945.

ZIMM, B.H. The Scattering of Light and the Radial Distribution Function of High Polymer Solutions. **The Journal of Chemical Physics**, v.16, p. 1093-1099, 1948.