

FRANCINE VALENGA

**ESTUDOS DE INTERAÇÃO ENTRE GALACTOMANANA E
ALGINATO E POSSÍVEIS APLICAÇÕES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Maria Rita Sierakowski

**CURITIBA
2007**

À minha família, meu pai Jorge, minha
mãe Rosane e aos meus irmãos,
Francielle e Jorginho, pessoas
fundamentais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado, guiando e iluminando minha vida com tantas bênçãos.

Aos meus pais, Jorge e Rosane, pelo grande apoio e suporte. Exemplos de pais. Minha família é tão maravilhosa por pura responsabilidade deles.

À minha irmã e melhor amiga, Francielle, talvez a pessoa mais incentivadora do meu mestrado. Acredita, confia e aposta em mim. Ao meu irmão lindo, Jorginho, sempre ao meu lado, contando boas histórias. Ao meu cunhado, Schoenau, por ter me assumido como irmã.

À minha avó, que me recebeu e me acolheu em Curitiba, ajudando desde os tempos do colégio. À minha tia Julinha e minha afilhada Bruna que nunca mediram esforços em me ajudar.

À minha orientadora, Prof. Dra. Maria Rita Sierakowski, um exemplo de pesquisadora, professora e ser humano. Uma pessoa iluminada e de muita garra, que me adotou desde o início da graduação e até hoje tem a paciência de orientar, apoiar e me incentivar na pesquisa. Tenho muito orgulho em tê-la como orientadora.

À Coordenação e ao Colegiado do curso de Pós-graduação em Bioquímica

À Adriana, não apenas pelas análises no AFM, mas por ter me ajudado muito, em vários assuntos extra-AFM, que acabou se tornando “une grande amie”.

Ao Centro de Microscopia Ótica da UFPR pelas análises de MEV e ao departamento da Física, pelas análises de AFM.

Muitos agradecimentos à família Biopol:

Neoli, pelo enorme apoio científico, precisei de muitas ajudas sua; e, pelo enorme apoio pessoal durante todo o meu mestrado;

Milena, muitas ajudas no laboratório, além de ser uma grande amiga;

Cris, pelas trocas de informações sobre o reômetro e pelas conversas;

Clayton, sempre prestativo, um enorme coração;

Prassad, pela correção do “abstract” e todo apoio à minha pesquisa;

Tatinha, pelo vários *e-mails* de ajuda e pela amizade;

Carolzinha, Íris, Carlinha, Manu, Myrian, Sérgio, obrigada por me ajudarem sempre que precisei (principalmente, no *Spray Drier*...).

À Lucy, sempre Biopol, por ter me direcionado quando eu estava perdida; e, por sempre ser uma grande e maravilhosa amiga.

À Sandra, ter tido muita paciência, pegado-me pela mão e me ensinado a caminhar na pesquisa.

À Carol, pessoa de quem me tornei muita amiga e que sempre me ajudou sendo a ponte entre informações Biológicas-Química. Sempre presente e disponível para me ajudar.

Turma do mestrado: Marco, muitas ajudas de Bio Mol e muitas risadas; Heide, trocas de conhecimentos e conversas amigas; Lu, por diversas vezes emprestar o laboratório.

As minhas amigas, Flá, Any e Schirlei, que indiretamente contribuíram para o meu trabalho, ao me ouvirem quando precisei choramingar, contribuindo para a “minha paz e meu equilíbrio espiritual”.

Ao Henrique não só pela direção de arte dos meus trabalhos, mas por ter sempre estado ao meu lado me ajudando, apoiando, escutando, opinando. Obrigada por tudo o que fez e faz por mim.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

**“Faz parte da arte de viver, não
barganhar com a oportunidade”
(MAKTUB)**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIACÕES	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 POLISSACARÍDEOS	1
1.2 GALACTOMANANAS	1
1.3 ALGINATO DE SÓDIO	6
1.4 OBTENÇÃO E CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE GÉIS	9
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS	17
3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GALACTOMANANA DE <i>L. leucocephala</i>	18
3.3 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS	19
3.3.1 Determinação de açúcar total da GML	19
3.3.2 Determinação de proteínas da GML	19
3.3.3 Determinação da composição monossacarídica da GML	19
3.3.4 Determinação da massa molecular média ponderal da GML	19
3.3.5 Análises Reológicas	20
3.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS	21
3.4.1 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
3.4.2 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)	23
3.5 PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS	24
3.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS NÃO ENCAPSULADAS NAS PARTÍCULAS	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO	26
4.2 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS	27

4.2.1 Determinação de açúcar total, proteínas e composição monossacarídica da GML	27
4.2.2 Determinação da massa molecular média da GML	28
4.3 ANÁLISES REOLÓGICAS	30
4.4 PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS	55
4.5 ANÁLISES DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .	55
4.6 ANÁLISES DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	58
4.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DA SOLUÇÃO CONTENDO AS PARTÍCULAS	64
5. CONCLUSÕES	65
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA PARCIAL DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA E GOMA – TARA	2
FIGURA 2 – IMAGEM DA LEGUMINOSA <i>Leucaena leucocephala</i>	5
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO ALGINATO DE SÓDIO	6
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA TIPO EGG-BOX DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SEQUÊNCIAS POLI – L – GULURONATO DO ALGINATO CROSS-LINKADA COM ÍONS CÁLCIO	7
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM FLUXO ENTRE DUAS PLACAS PARALELAS. F – FORÇA APLICADA. A – ÁREA EM QUE É APLICADA A FORÇA. H – ALTURA. X – DESLOCAMENTO DO FLUXO	12
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE LÍQUIDO EM REPOUSO (EM CIMA) E APÓS A APLICAÇÃO DE UMA TAXA DE CISALHAMENTO (À BAIXO)	13
FIGURA 7 – COMPORTAMENTO DE FLUXO DE UM FLUIDO. □ - COMPORTAMENTO NEWTONIANO, ○ – COMPORTAMENTO PSEUDOPLÁSTICO, ▽- COMPORTAMENTO DILATANTE	14
FIGURA 8 – APARELHO REÔMETRO RHEOSTRESS 600 E SENSOR PLACA-PLACA 35 mm UTILIZADOS PARA ANÁLISES REOLÓGICAS	21
FIGURA 9 – MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA E MICROANÁLISE, JEOL 6460 LV, JEOL, DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	22
FIGURA 10 – MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA SHIMADZU SPM – 9500J3, DEPARTAMENTO DE FÍSICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	24
FIGURA 11 – SPRAY – DRIER LM – MSD 1.0, LAB MAQ	25
FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i>	26
FIGURA 13 – PERFIL DE ELUIÇÃO DO HPSEC-MALLS PARA A GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML).(A) DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ (B) DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO	28

FIGURA 14 – PERFIL DE ELUIÇÃO DO HPSEC-MALLS PARA O ALGINATO DE SÓDIO.....	29
FIGURA 15 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA	31
FIGURA 16 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA	32
FIGURA 17 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA	33
FIGURA 18 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO	34
FIGURA 19 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO	35
FIGURA 20 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO.....	35
FIGURA 21 – VARREDURA DE TENSÃO PARA MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	37
FIGURA 22 – VARREDURA DE TENSÃO PARA MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	38
FIGURA 23 – VARREDURA DE TENSÃO PARA MISTURAS (15mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	39
FIGURA 24 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/GALACOTMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML)	40

FIGURA 25 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE GOMA-GUAR (GMC), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO, COM TENSÃO FIXA DE 3Pa. (■) G', (●) G"	41
FIGURA 26 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO, COM TENSÃO FIXA DE 3Pa. (■) G', (●) G"	41
FIGURA 27 – GRÁFICO DE COX-MERZ DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE <i>L. Leucocephala</i> (GML) EM SOLUÇ]ÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO. (●) VISCOSIDADE APARENTE (η), (■) VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*)	42
FIGURA 28 – GRÁFICO DE COX-MERZ DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO. (●) VISCOSIDADE APARENTE (η), (■) VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*)	43
FIGURA 29 – GRÁFICO DE COX-MERZ DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO. (●) VISCOSIDADE APARENTE (η), (■) VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*)	44
FIGURA 30 – ANÁLISE DA FLUÊNCIA (<i>CREEP</i>) E RECUPERAÇÃO PARA A MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), 15 mg.ml ⁻¹ , EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO.....	45
FIGURA 31 – ANÁLISE DA FLUÊNCIA (<i>CREEP</i>) E RECUPERAÇÃO PARA A MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	46
FIGURA 32 – ANÁLISE DA FLUÊNCIA (<i>CREEP</i>) E RECUPERAÇÃO PARA A MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	46
FIGURA 33 – CURVA DE TEMPERATURA DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. (■) G', (●) G".	48

FIGURA 34 – CURVA DE TEMPERATURA DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. (■) G', (●) G''	48
FIGURA 35 – CURVA DE TEMPERATURA DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE SEMENTES DE ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. (■) G', (●) G''	49
FIGURA 36 – CURVAS DE VISCOSIDADES PARA AS MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) MISTURAS DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO 5 mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA	50
FIGURA 37 – VARREDURA DE TENSÃO PARA AS MISTURAS (15 mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA	51
FIGURA 38 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L.leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA. (■) G', (●) G''	52
FIGURA 39 – GRÁFICO DE COX-MERZ DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO / GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO. (●) VISCOSIDADE APARENTE (η), (■) VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*)	53
FIGURA 40 – ANÁLISE DA FLUÊNCIA (CREEP) E RECUPERAÇÃO PARA A MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA .	54
FIGURA 41 – CURVA DE TEMPERATURA DA MISTURA (15 mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> EM SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA. (■) G', (●) G''	55
FIGURA 42 – FLUXOGRAMA DA PRAPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE AL (7,5 mg.ml ⁻¹) – GML (7,5 mg.ml ⁻¹) – ALB (5mg.ml ⁻¹) – IONS CÁLCIO (45 mMol)	56
FIGURA 43 – PARTÍCULAS DA MISTURA (15mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	57

FIGURA 44 – PARTÍCULAS DA MISTURA (15mg.ml ⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA	58
FIGURA 45 – IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MODO DINÂMICO (<i>TAPPING MODE</i>) DA MISTURA (15mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	60
FIGURA 46 – IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MODO DINÂMICO (<i>TAPPING MODE</i>) DA MISTURA (15mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML), COM 5mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA E CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	61
FIGURA 47 – HISTOGRAMA DA MISTURA DE ALGINATO / GALACTOMANANA (15mg.ml ⁻¹) DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML) CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO	62
FIGURA 48 – HISTOGRAMA DA MISTURA DE ALGINATO / GALACTOMANANA (15mg.ml ⁻¹) DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML) CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA	62
FIGURA 49 – IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MODO DINÂMICO (<i>TAPPING MODE</i>) DA MISTURA (15mg.ml ⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i> (GML) CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml ⁻¹ DE ALBUMINA.	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES DE RENDIMENTO ACÚCAR TOTAL, PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTOMANANA PURIFICADA DE SEMENTES DE <i>L. leucocephala</i>	27
TABELA 2 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS DE ALGINATO DE SÓDIO E GALACTOMANANA PARA ANÁLISES REOLÓGICAS	30

LISTA DE ABREVIÇÕES

ω	Velocidade angular
η	Viscosidade absoluta
η^*	Viscosidade complexa
τ	Tensão de cisalhamento
$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento
A	Área
AFM	Microscopia de Força Atômica
Alb	Albumina
AL	Alginato de sódio
dn/dc	relação entre índice de refração e concentração de uma amostra
F	Força
H ⁺	Íon hidrogênio
G*	Módulo complexo
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
Gal	Galactose
GM	Galactomanana
GMA	Galactomana alfarroba
GMG	Galactomanana goma-guar
GML	Galactomanana <i>Leucaena leucocephala</i>
H	Altura
Hz	Hertz
Man	Manose
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mw	Massa molecular ponderal média
tan δ	Relação G''/G'
X	Deslocamento

RESUMO

As galactomananas (GM), polissacarídeos amplamente encontrados na natureza desempenham a função de reserva em plantas. GM especialmente de sementes, por possuírem a habilidade de modificar a viscosidade dos meios aquosos, apresentam grande interesse biológico e comercial, todavia em sistema isolado não tem a capacidade de formação de géis. O alginato de sódio (AL), é um polissacarídeo aniônico de origem vegetal marinha, que em presença de íons cálcio geleifica e por isso apresenta várias aplicações, entre as quais está o encapsulamento de drogas de liberação controlada e a de algumas proteínas, tais como a albumina e a insulina. Três diferentes GM, previamente caracterizadas em termos de razão molar Man:Gal; homogeneidade e Mw, foram usadas nesse trabalho. A GM de goma-guar (GMG) e a GM de alfarroba (GMA) foram obtidas comercialmente, enquanto que a GM sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena) (GML) foi extraída em laboratório. As GMs foram utilizadas em estudos de interação com o AL a fim de se avaliar em termos de viscosidade, a possibilidade de substituição parcial do alginato por GM. Os sistemas de GM-AL foram analisados a 25°C através de ensaios reológicos em sistemas oscilatórios ou não. Através das curvas de viscosidade observou-se em diferentes proporções dos polissacarídeos, a uma concentração final de mistura a 15 mg.mL⁻¹ que, em qualquer um dos sistemas ocorre melhor interação entre ambos os polissacarídeos com a substituição de 50% em massa de alginato por galactomanana, e essa % de substituição foi mantida para os demais ensaios. A adição de íons cálcio aos sistemas mostrou aumento do caráter viscoso e complexação, definindo-se como melhor valor a concentração de 45 mMol. Em medidas oscilatórias observou-se a formação de gel para o sistema GM-AL. A viscoelasticidade de todos os sistemas se manteve estável numa faixa de temperatura de 20-40°C. A mistura contendo GML-AL (50%, m.m⁻¹ de GML e 45 mMol de íons cálcio) foi escolhida para ensaios reológicos para se avaliar a capacidade de adsorção de albumina (Alb), onde se observou interação, porém com diminuição da viscoelasticidade. Essa diminuição de viscosidade ocorreu, provavelmente, devido à competição entre a albumina e o alginato pelos íons cálcio. No aquecimento a partir de 35°C, há também uma diminuição da viscosidade, que pode ser proveniente de uma mudança conformacional do sistema. Partículas de GM-AL-Alb foram feitas com um atomizador borrifando a solução ternária através de um *spray* em uma solução de cálcio. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM) demonstraram a formação de esferas de diâmetro de escala micro e nanométrica e, também, o encapsulamento da proteína. O encapsulamento da Alb nas esferas também pode viabilizar possíveis aplicações do sistema ternário na liberação controlada de medicamentos e/ou na formação de cápsulas de proteínas.

ABSTRACT

Galactomannans (GM), one of the polysaccharides found abundant in nature, are mainly food reserve of the plants. GM especially from seeds are of great biological and commercial interest in order to modify aqueous solution viscosities of polysaccharide compositions, since they will not form gels in isolated systems. Sodium alginate (AL), an anionic polysaccharide from seaweed, gelatinized in presence of calcium ions, is also widely used in applications such as drug delivery and albumin or insulin based proteins capsules. Three types of homogeneous GM of known molecular compositions of Man:Gal with known molecular weight, were utilized in the present work. GM from Guar (GMG) and Locust bean gum (GMA) obtained from commercial sources and the one which was extracted from the seeds of *Leucaena leucocephala* (leucena) (GML) were used in the present study. The interaction of AL with GM was studied by monitoring the viscosities of the blends for possible partial substitution of alginate by GM. Rheological characterization of the GM-AL blends were carried out at 25°C using oscillatory rheometer. The viscosity behavior of the blend indicated a better interaction between GM and AL at 50% substitution by weight of alginate in the blend, and this composition was used for further experiments. The addition of calcium ions at a concentration of 45 mMol in to the blend showed an increase in the viscosity of the system which may be due to the better complexation. Gel formation was also observed for GM-AL system during the oscillatory measures. A stable visco-elastic properties were observed at a temperature range of 20-40°C for all the systems studied. Albumin (Alb) adsorption capacity of the system was studied by following the rheology of the blend with a composition of GML:AL, 50:50 by weight ratio with 45 mMol of calcium ions in presence of Alb. The visco-elasticity of the system was lower and this lowering observed may be attributed to the competition of Alb and AL in complexation process with calcium ions. In heating process, when the temperature achieved 35°C, it showed a lower behavior, probably due to a conformational change. GM-AL-Alb Ca^{2+} cross-linked particles were made by spraying the ternary solution into a solution containing calcium ions using an atomizer. The scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) micrographs showed the formation of spherical particles with diameters in the range of micro and nanometer scales. Moreover the encapsulation of albumin over the micro spheres, we also suggest the possible applications of this ternary system in drug delivery and/or as protein capsules.

1. INTRODUÇÃO

1.1 POLISSACARÍDEOS

Entre os biopolímeros, os polissacarídeos compreendem uma das mais abundantes e diversificadas famílias de polissacarídeos. A sua estrutura primária varia em composição, seqüência, massa molecular, configuração anomérica, posição de ligações e densidade de carga. Essas variações podem dar origem à quase infinitas formas de estruturas químicas e de conformação, as quais refletem em diferentes propriedades, que direcionam muitas de suas aplicações. As de interesse comercial, por exemplo, são bastante diversas e cobrem o espectro de produtos químicos corriqueiros até especialidades químicas lucrativas para usos médicos e de alta tecnologia (YALPANI, 1988). O interesse nessas moléculas começa pelos diferentes monossacarídeos que podem constituir a cadeia polimérica, entre os quais, como modelos, estão as galactomananas e os alginatos descritos a seguir.

1.2 GALACTOMANANAS

Galactomananas são polissacarídeos extraídos de sementes de leguminosas e de algumas fontes microbiológicas, como fungos (DEA; MORRINSON, 1975) e líquens (WORANOVICZ, 1997).

As que constituem polímeros de reserva estão presentes em endospermas de algumas plantas onde, durante a germinação, esse carboidrato é catabolizado para fornecer produtos de metabolismo para o crescimento da planta (SINGHA; OBERLY; TOWSEND, 1987). A degradação da galactomanana no endosperma é feita pela ação combinada das enzimas α -galactosidase, β -mananase e β -manosidase manohidrolase (McCLEARY et al., 1981).

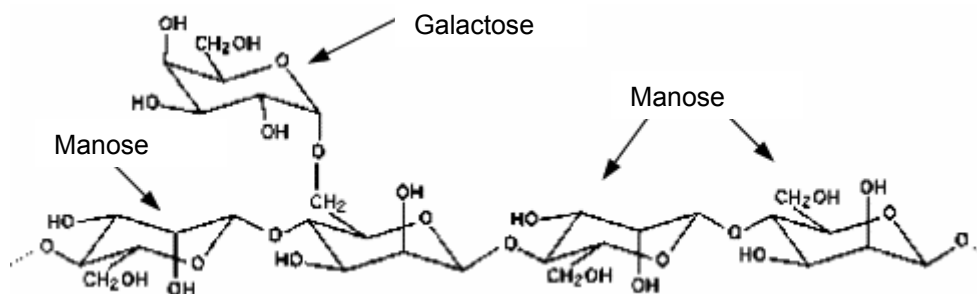
São encontradas em maiores quantidades nas sementes da família *Leguminosae* (REID, 1985) e em menores quantidades nas espécies das famílias

Palmae, Annonaceae, Convolvulaceae e Loganiaceae (DEA; MORRINSON, 1975; DEY, 1978)

Estruturalmente, apresenta uma cadeia principal formada por unidades β (1 \rightarrow 4) D-manose, as quais estão por D-galactose. A proporção de Man:Gal varia entre 1,1 a 4:1 nas diferentes espécies (WHISTLER, 1973).

Além das diferentes proporções Man:Gal, podem apresentar diferentes massas moleculares e estruturas finas (WHISTLER, 1973). A solubilidade em água depende do conteúdo de galactose substituinte; assim mananas, por exemplo, que não apresentam substituição, são insolúveis em água (McCLEARY et al., 1981).

FIGURA 1 – ESTRUTURA PARCIAL DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA E DE GOMA -TARA



FONTE: SITTIKUYOTHIN; TORRES; GONÇALVES (2005).

Duas galactomananas são produzidas comercialmente em grandes quantidades: a goma-guar, a partir de sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* e a alfaborra a partir de sementes de *Ceratonia siliqua*. Outras gomas como a tara e a *fenugreek* obtidas de sementes de *Caesalpinia spinosa* e *Trigorella Foenum-graecum*, respectivamente, também são comercializadas em menores quantidades (GLICKSMAN, 1986; HERALD, 1986; MAIER, et al. 1993).

As galactomananas podem interagir sinergicamente com vários polissacarídeos, como goma-xantana, ágar e carragenana, resultando na formação de gel (VIEBKE; PICULELL, 1992; ZHAN et al., 1993), já que soluções em que só há a presença da galactomananas, não formam gel (DEA;

MORRINSON, 1975). A habilidade das galactomananas interagirem sinergicamente com outros polímeros é geralmente influenciada pela menor quantidade de unidades de galactose (MORRIS, 1990).

O comportamento sinérgico e as propriedades físico-químicas da galactomanana são importantes para aplicações industriais. Esses polissacarídeos podem ser usados como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes, floculantes e inibidores sinérgicos (LUCYSZYN et al., 2006a; SORVARI et al., 1997), o que os fazem um material de escolha em indústrias alimentícias, cosméticas, farmacêuticas e têxteis (SHOBHA et al., 2005).

Estudos com diferentes espécies de sementes foram realizados pelo Grupo de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná. Estruturas químicas de galactomananas de *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman* e *Schizolobium parahybum* foram estudadas por GANTER et al. (1993). PETKOWICZ et al. (1998) estudaram as galactomananas obtidas de *Schizolobium amazonicum* e de *Schizolobium parahybum*, respectivamente. GANTER et al. (1995) estudaram a hidrólise enzimática da galactomanana. VARGAS-RECHIA et al. (1995) estudaram a galactomanana extraída de sementes de *Senna multijuga*. Complexos de galactomananas com íons Cu^{2+} extraídas de *Cassia fastuosa* e *Leucaena leucocephala* foram analisados por MERCÊ et al. (1998). BRESOLIN et al. (1997) observou o efeito sinérgico entre a galactomanana de *M. scabrella* e a xantana, enquanto que as propriedades reológicas de geleificação foram estudadas por AMARAL (1998). LUCYSZYN (2004) testou uma parcial substituição de ágar por galactomananas extraídas de *L. leucocephala* e *C. fastuosa*. Estudos de galactomananas modificadas foram realizados por LIMA et al. (1996), que descreveram o comportamento de galactomananas de *Caesalpinia leiostachya* sulfatadas e GERMANO (1996) analisou a atividade anticoagulante de galactomananas sulfatadas (*M. scabrella* e *C. fastuosa*). Propriedades biológicas foram analisadas por PIRES et al. (2001), com a sulfatação da galactomanana extraída de *Senna macranthera* a fim de se obter um ativo heparínico. Derivados oxidados e anfílicos foram obtidos para galactomananas de sementes de *L. leucocephala* (SIERAKOWSKI et al., 2000). Esses derivados juntamente com os

derivados oxidados da galactomanana de *Cassia fastuosa* foram aplicados para obtenção de filmes como suporte para adesão de albumina (SIERAKOWSKI et al., 2000). ONO et al. (2003) verificaram possíveis propriedades antivirais da galactomanana sulfatada de sementes de *M. scabrella* e *L. leucocephala*. Mais recentemente LUCYSZYN et al. (2006a) aplicaram géis de misturas de galactomananas e ágar para cultivo de células vegetais.

Assim, pode-se perceber que o Brasil apresenta fontes de espécies diversificadas para a extração de galactomananas a partir de sementes que poderiam suprir a demanda de importação desses polissacarídeos, além de incluir a melhoria do valor agregado pela utilização de sementes sem capacidade germinativa. Destaca-se que, nos últimos cinco anos, a importação de galactomanana correspondeu a um valor aproximado de U\$ 52.100.000,00 (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2006). Particularmente, pela utilização de sementes de *L. leucocephala* como fonte de uma das galactomananas nas atividades experimentais desse trabalho, a seguir, será descrito um pouco sobre a parte botânica dessa espécie vegetal que é popularmente conhecida no Brasil como leucena, acácia, tamarindo silvestre, entre outros. Entre os sinônimos botânicos estão descritos *Leucaena glauca* (Willd) Benth, *Mimosa leucocephala* Lam, *Acacia biceps* Willd.

Na atual classificação, feita pelo o Grupo de Filogenia das Angiospermas (APG, 2003), a galactomanana apresenta seguinte classificação sistemática:

Divisão: Angiospermae

Classe: Core eudicots

Sub-classe: Rosidace

Ordem: Fabales Bromhead (1838)

Família: Fabaceae Lindl. (1863) nom. cons.

Gênero: *Leucaena*

Espécie: *L. leucocephala* (Lam) de Wit

Árvore de porte arbustivo a arbóreo de folhas bipinadas de 15-25 cm de comprimento, com 4-8 pares de pinas de 5-10 cm de comprimento, contendo 5-20 pares de folíolos. A inflorescência é globosa, de 2,5-3,0 cm de diâmetro, formada de flores brancas e pequenas.

As vagens são finas com 12-18 cm de comprimento, contendo de 15 a 25 sementes de cor marrom-brilhante. A coleta das vagens é realizada entre os meses de novembro, dezembro e janeiro (CEPEN, 2006), das quais é extraída a galactomanana (MITZI, 2002).

Árvore originária da América Central e atualmente presente em toda região tropical, apresenta um valor nutritivo nas sementes que é usado na alimentação de ruminantes (SÁ, 1997). Na América Central, Indonésia e Tailândia, suas folhas são utilizadas para alimentação humana (NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 1977). A sua madeira e galhos podem ainda ser usados na fabricação de papel (SHELTON; BREWBAKER, 1994).

FIGURA 2 – IMAGEM DA LEGUMINOSA *Leucaena leucocephala*



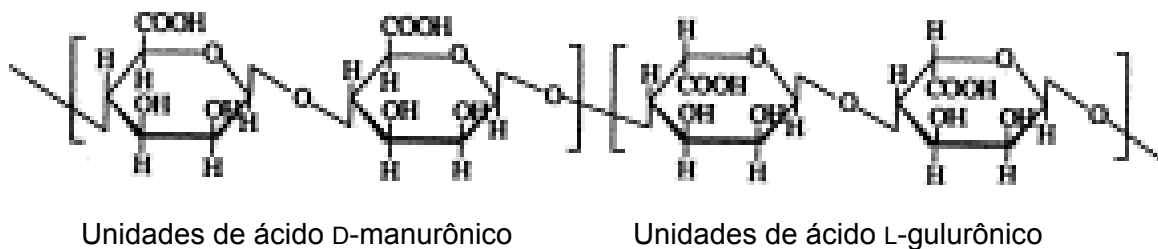
FONTE: TROPICAL SEEDS (2006), HEAR (2006).

1.3 ALGINATO DE SÓDIO

Alginato é um biopolímero extraído de diferentes espécies de macroalgas, principalmente algas marrons, tais como, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystid pyrifera* (GOMBOTZ, WEE, 1998).

Quimicamente é um polissacarídeo aniônico com uma estrutura (fig. 3) linear compreendida por ligações glicosídicas (1→4) de unidades de β-D-ácido manurônico e α-L-gulurônico (ZHANG; CHENG; YING, 2006), as quais podem variar em composição e seqüência, arranjadas em blocos ao longo da cadeia. A composição e tamanho desses blocos, juntamente com a massa molecular determinam as propriedades físico-químicas do polissacarídeo. A variabilidade molecular depende da alga em que o alginato foi extraído (GOMBOTZ, WEE 1998). A seqüência da composição dos monossacarídeos e a massa molecular são importantes fatores para determinar propriedades físicas de um gel formado pelo alginato (LIEW et al., 2006).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DO ALGINATO



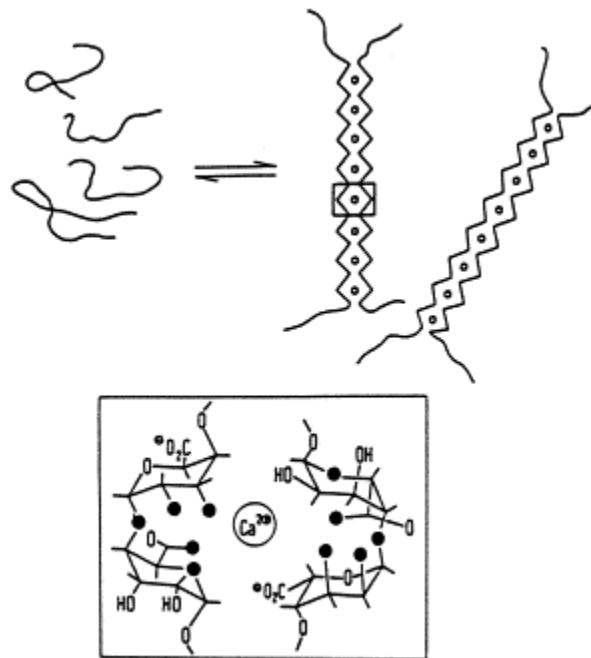
FONTE: MACGREGOR; GREENWOOD, 1980

Algumas das funções biológicas desempenhadas pelo alginato na alga são as características de prevenir a dessecação, manter a integridade celular e prover força mecânica à célula (McLACHLAN, 1985; KENNEDY; GRITHS; ATKINS, 1984). Em presença de íons divalentes, o alginato de sódio pode, através de um processo de ligação cruzada, trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, geleificando o meio em que se encontra. Os cátions monovalentes e o

íon Mg^{2+} não induzem a essa geleificação. Íons como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} possuem um uso limitado por apresentarem uma certa toxicidade (GOMBOTZ; WEE, 1998). Devido a essa propriedade de geleificação, o alginato pode ser usado como matriz e assim envolver moléculas de significância biológica, tais como, enzimas, plantas, células animais e medicamentos.

Na maioria das vezes, essa reticulação é feita ao se trocar o íon Na^+ dos ácidos gulurônico com cátions divalentes formando uma estrutura do tipo caixa de ovo. (fig. 4). Os cátions divalentes se ligam aos blocos de ácidos α -L-gulurônico de uma maneira cooperativa que pode ter mais de 20 monômeros associados. Cada cadeia de alginato pode dimerizar para formar junções com muitas outras cadeias resultando em cadeias de gel (GOMBOTZ; WEE 1998).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA TIPO CAIXA DE OVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SEQUÊNCIAS POLI - L - GULURONATO DO ALGINATO RETICULADA COM ÍONS CÁLCIO



FONTE: REES (1981).

Géis de alginato maiores de 1,0 mm podem ser formados ao se gotejar uma solução de alginato de sódio em uma solução contendo cátions divalentes (OUWERX et al., 1988). O diâmetro das partículas formadas é dependente do tamanho do diâmetro da agulha usada para gotejar a solução e da viscosidade da solução de alginato. Maiores diâmetros e viscosidades mais altas produzem partículas maiores. Os géis de alginato são estáveis entre uma faixa de temperatura de 0-100°C apesar do seu módulo de rigidez diminuir com o aumento da temperatura (GACESA, 1988). Esses géis podem ser preparados tanto em água quente quanto em água fria (CHAPMAN; CHAPMAN, 1980).

Há, principalmente, três métodos muito bem descritos para se preparar partículas menores de 0,2 mm de diâmetro: atomização, emulsificação (água/óleo) e coacervação (GOMBOTZ; WEE, 1998). O mais comum é atomizar, com um orifício pequeno, a solução de alginato em uma solução de cátions divalentes (LEONARD et al., 2004). A emulsificação óleo em água é um método mais utilizado para encapsular peptídeos e proteínas ou drogas sintéticas de baixo peso molecular já que reagentes orgânicos são usados para remover o óleo no final do processo (GOMBOTZ; WEE, 1998). A coacervação entre polieletrólitos de cargas opostas é feita usando condições específicas de pH, força iônica e concentração do poliânion. A separação das partículas é feita através de filtração/centrifugação, onde a fase densa contém as partículas (AGNIHOTRI; MALLIKARJUN; AMINABHAVI, 2004).

Atualmente, indústrias farmacêuticas e biomédicas têm apresentado muito interesse no uso do alginato (SHILPA; AGRAWAL; RAY, 2003). Uma de suas propriedades bem exploradas é a sua capacidade de agir como espessante, geleificante e agente coloidal (LIEW et al, 2006). Como apresenta, também, propriedades de imunogenicidade (GOMBOTZ; WEE, 1998), de biocompatibilidade (EISELT et al., 2000), bioadesão (PEPPAS; BURI, 1985) e de baixa toxicidade (SMIDSRD; SKJAOK-Br, 1990), pode ser muito utilizado em indústrias de biotecnologia.

Aplicações cirúrgicas também podem ser feitas ao se utilizar o alginato em reparações de tecidos celulares, em hemorragias capilares e tratamento de

queimaduras (BLAINE, 1947). Géis de alginato podem ser aplicados na superfície ocular onde, o α -L-gulurônico complexa com os íons cálcio presentes na lágrima atuando então como uma liberação controlada de drogas oculares (COHEN, et al. 1997).

Em sistemas de liberação controlada de medicamentos, já foi descrito o uso de sistemas que contenham alginato de sódio e doador de íon cálcio (CaHPO_3) (GOMBOTZ; WEE, 1998). Após a administração, o fluido gastrointestinal dissolve o complexo do alginato - íon cálcio liberando a droga. Essa liberação depende da dissolução do gel e da difusão da droga no fluido gastrointestinal. Há estudos também em que utilizam o alginato para liberação controlada de medicamentos por via oral, em que esse sistema apresenta uma resistência ao ácido gástrico (STOCKWELL; WALKER, 1986).

Atualmente é ampla a utilização de micro e nanoesferas de alginato associadas com proteínas. Interações entre a albumina e alginato foram descritos por NEISER, DRAGET e SMIDSDORT (1999) e LEONARD et al. (2004). Estudos recentes de partículas contendo insulina foram realizados por SILVA et al. (2006) e SARMENTO et al. (2006), assim como interações em micro e nanopartículas de uma mistura de alginato/quitosana (PAN et al., 2002; AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004) e alginato/agarose (SAKAI; HASHIMOTO; KAWAKAMI, 2006).

Uma das técnicas para se avaliar a formação de géis de alginato e a sua estabilidade com relação a diferentes condições como pH, temperatura e eletrólitos podem ser interpretadas através do comportamento reológico.

1.4 OBTENÇÃO E CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS DE GÉIS

As facilidades com que um polissacarídeo se dissolve, assim como se comportamento em solução, dependem não somente da estrutura química, mas também da conformação (WHISTLER, 1973). Desse modo, os polissacarídeos apresentam a capacidade de alterar as propriedades físicas da água, como originam elevação da viscosidade das soluções e, em algumas situações, criam

por interação física coesivas redes intermoleculares, que originam a formação de géis (MORRIS et al., 1981).

Um gel é uma rede tridimensional obtida através de ligações das macromoléculas envoltas por um solvente. Géis, como os sólidos elásticos, suportam a própria massa e mantém a sua forma.

A presença de ligações cruzadas não covalentes dificulta enormemente a descrição das propriedades físicas dessas redes, devido ao número e a posição destas ligações poderem variar com a temperatura e com o tempo. A reversibilidade dos géis físicos deve-se à natureza das interações envolvidas; entretanto, esta reversibilidade é freqüentemente associada a fenômenos de histerese (ROSS – MURPHY; MORRIS; MORRIS, 1983). Os géis, geralmente, apresentam propriedades viscosas e elásticas, porém observa-se uma preponderância do modo elástico (G') sobre o viscoso (G''). G' e G'' referem-se ao modo dinâmico de cisalhamento de um material.

As propriedades funcionais dos polissacarídeos solúveis em água são largamente utilizadas na indústria. Para a otimização desse emprego industrial, tornou-se necessário desenvolver métodos que permitissem prever a estrutura e a função destes polímeros através do conhecimento das conformações adotadas pelos mesmos. Entre os métodos físicos-químicos utilizados nessa avaliação estão, por exemplo, as técnicas reológicas.

A reologia é a ciência que descreve as propriedades mecânicas dos vários materiais, sob várias condições de deformação, quando eles exibem a capacidade de escoar e/ou acumular deformações reversíveis (NAVARRO, 1997). Envolve a elasticidade, a viscosidade e a plasticidade. Os materiais, segundo SCHRAMM (2006), podem ser:

- Sólidos ideais: os quais se deformam elasticamente. A energia requerida para a deformação é completamente recuperada quando a tensão é removida.

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

Os corpos reais não são nem sólidos ideais e nem fluidos ideais. A grande maioria dos líquidos apresenta um comportamento reológico que os classifica entre sólido e líquido: são elásticos e viscosos portanto, chamados de viscoelásticos (SCHRAMM, 2006).

Com esse estudo, é possível compreender os fenômenos que ocorrem com polímeros em solução.

A viscosidade é a grandeza que mede o atrito entre camadas consecutivas de líquido, é a resistência de um fluido a qualquer mudança do seu volume, sendo função da resistência denominada de cisalhamento (*shearing*), que é a força necessária para causar o movimento das camadas, e ocorre quando o fluido se move fisicamente ou é distribuído. Assim, fluidos viscosos necessitam de mais força para se mover que aqueles menos viscosos (MILAS; RINAUDO, 1991; SCHOTT, 1992; BERRIAUD; MILAS; RINAUDO, 1994).

A viscosidade depende de alguns parâmetros:

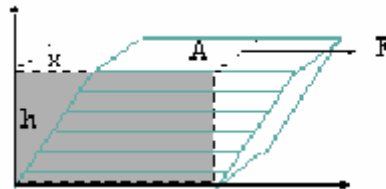
- natureza físico-química de uma substância;
- temperatura; a viscosidade geralmente diminui com o aumento da temperatura;
- pressão; geralmente o aumento de pressão aumenta a viscosidade;
- $\dot{\gamma}$ (taxa de cisalhamento); fator decisivo, o aumento dessa pode aumentar ou diminuir a viscosidade;
- tempo; dependência da viscosidade de uma substância em relação a um tempo de cisalhamento.

Isaac Newton foi o primeiro a descrever o comportamento de fluxo de um líquido ideal ao relacionar $\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$, onde τ é a tensão de cisalhamento; η é a viscosidade e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento.

A tensão de cisalhamento é uma força aplicada tangencialmente em uma área, sendo a interface entre a placa superior e o líquido abaixo, gerando um fluxo na camada líquida. A velocidade do fluxo pode ser mantida com uma força constante controlada pela resistência interna do líquido, a viscosidade (SCHRAMM, 2006).

A tensão de cisalhamento provoca um fluxo, cuja velocidade máxima se encontra na camada superior do líquido e diminui atravessando o corpo, como demonstra a fig. 5. No fluxo laminar, uma camada infinitamente fina de líquido desliza sobre a outra e esse gradiente de velocidade é denominado taxa de cisalhamento.

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM FLUXO ENTRE DUAS PLACAS PARALELAS. F – FORÇA APLICADA. A – ÁREA EM QUE É APLICADA A FORÇA. H – ALTURA. X – DESLOCAMENTO DO FLUXO

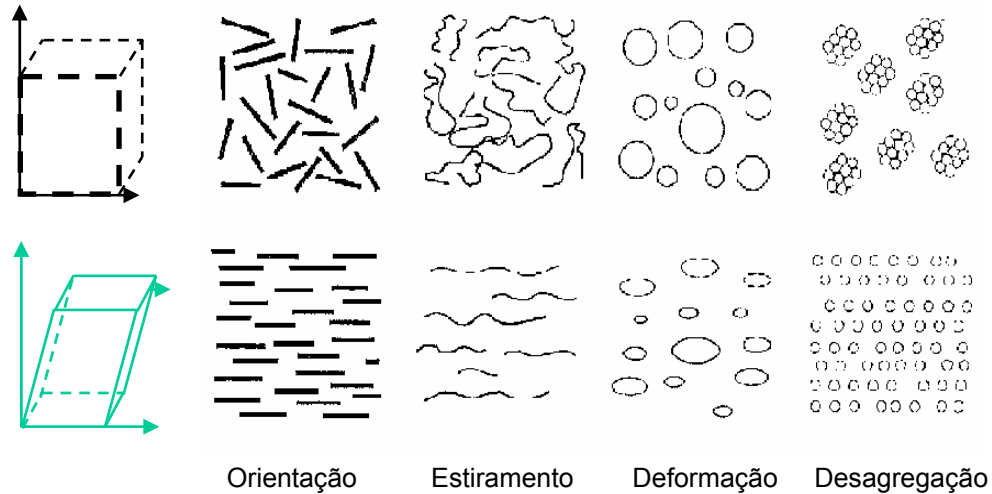


FONTE: SCHRAMM (2006).

A viscosidade, portanto, pode ser expressa matematicamente ao dividir a tensão pela taxa de cisalhamento.

Com o aumento da taxa de cisalhamento (fig. 6), partículas rígidas se orientam em direção ao fluxo. Nas moléculas poliméricas, os entrelaçamentos entre elas podem ser desfeitos e as moléculas se orientam em direção ao fluxo. Partículas esféricas podem ser deformadas para uma forma mais alongada e com o cisalhamento agregados podem ser quebrados (SCRHAMM, 2006).

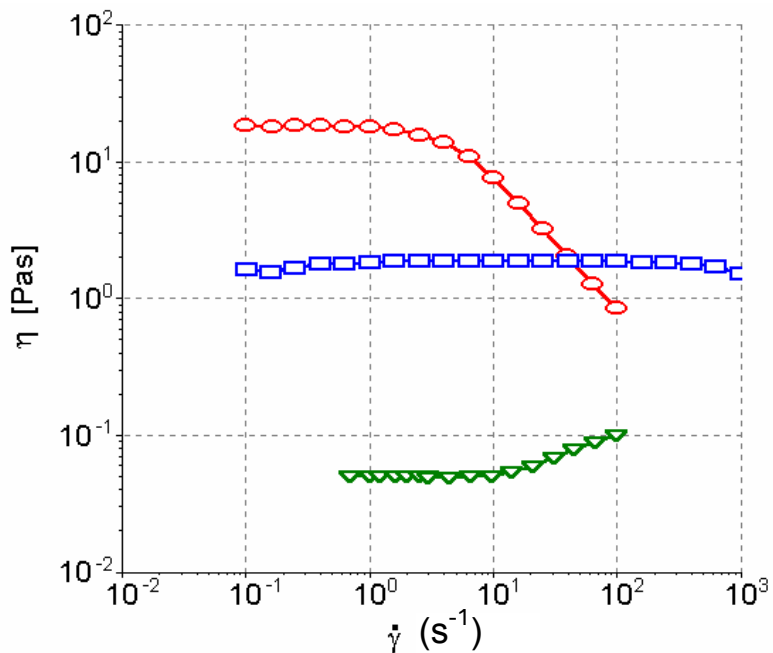
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE LÍQUIDO EM REPOUSO (EM CIMA) E APÓS A APLICAÇÃO DE UMA TAXA DE CISALHAMENTO (À BAIXO)



FONTE: SCHRAMM (2006).

Os fluidos podem ainda ser classificados como líquidos newtonianos e não-newtonianos. Os newtonianos são aqueles em que a viscosidade não é afetada por mudanças da taxa de cisalhamento. Todos os outros fluidos que não apresentam esse comportamento são chamados de não-newtonianos. Os não-newtonianos podem ainda ser divididos em pseudoplástico, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e sua estrutura é recuperada quando a taxa de cisalhamento retorna a zero; e dilatante, em que a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento (fig. 7).

FIGURA 7 – COMPORTAMENTO DE FLUXO DE UM FLUIDO. \square - COMPORTAMENTO NEWTONIANO, \circ - COMPORTAMENTO PSEUDOPLÁSTICO, ∇ - COMPORTAMENTO DILATANTE



FONTE: SCHRAMM (2006).

A maioria das dispersões polissacarídicas tem sua viscosidade aumentada com o grau de polimerização de suas cadeias e com a concentração polissacarídica, porém reduzida diante das temperaturas crescentes (WALTER,1998).

Para dispersões polissacarídicas diluídas o comportamento de fluxo chega a ser de um fluido Newtoniano (WALTER, 1998). Para as dispersões mais concentradas, o comportamento freqüentemente observado é o pseudoplástico.

Além de apenas aplicar uma tensão constante a um fluido, levando a um fluxo em estado estacionário, pode-se submeter amostras viscoelásticas a tensões ou deformações oscilantes. Os testes dinâmicos fornecem dados de viscosidade e elasticidade relacionados a uma freqüência aplicada, relacionando a freqüência ou velocidade angular com a deformação ou tensão.

Em sistema oscilatório, as soluções de polissacarídeos possuem comportamento entre sólido ideal e líquido ideal e podem ser classificadas de acordo com valores obtidos para os módulos elásticos G' ou viscoso G'' .

Na reologia oscilatória pode-se medir o caráter sólido da amostra através do módulo G' . Quanto maior for o valor de G' , maior é o caráter sólido do gel (WALTER, 1998) e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (RAO, 1992).

Além disso, pode-se medir o módulo de cisalhamento dinâmico viscoso ou de perda, G'' , que indica o caráter líquido do material.

Através de análise em sistema oscilatório é possível determinar a viscosidade dinâmica complexa (η^*) da amostra, obtida pela razão entre o módulo de cisalhamento dinâmico complexo (G^*) e a frequência (ω). G^* representa a resistência total de uma substância contra uma deformação aplicada.

Quando a amostra polissacarídica apresenta o módulo de cisalhamento elástico (G') muito maior do que o módulo de cisalhamento viscoso (G''), ambos independentes da frequência na região de viscoelasticidade, tem-se um material de caráter predominantemente sólido. Tratando-se, portanto, de um gel forte (OLIVEIRA, 2001).

Para as soluções poliméricas viscosas o espectro revela, principalmente, em baixas frequências, valores significativamente maiores de G'' em relação a G' (MORRIS, 1990).

Sendo os géis de alginato especialmente utilizados na liberação controlada de medicamento, assunto em grande desenvolvimento e com grande aplicação, o trabalho aqui proposto visa avaliar a interação entre galactomananas e alginato, uma vez que na literatura não se encontrou nenhum trabalho que trate desse assunto. Para tal desenvolvimento utilizou-se como ferramentas análises das características reológicas e da morfologia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de interação de sistemas contendo galactomanana-alginato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Extrair e purificar galactomanana de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena);
- Analisar o teor de açúcar e de proteínas, a composição monossacarídica e a massa molecular, as quais são características físico-químicas da galactomanana de leucena;
- Analisar por métodos reológicos estáticos e dinâmicos a possível interação entre a galactomanana de leucena, com o alginato de sódio, em presença ou não de eletrólito, em estudo comparativo com duas GM comerciais (guar e alfarroba);
- Analisar o possível encapsulamento de albumina em algum dos sistemas formulados utilizando técnicas reológicas estáticas e dinâmicas e técnicas microscópicas, através da microscopia eletrônica de varredura e da microscopia de força atômica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

Uma das galactomananas aplicada nesse trabalho foi obtida a partir de sementes de *Leucaena leucocephala* (leucena), coletadas no *campus* Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba. Um “voucher” (excicata) da espécie encontra-se no Herbarium UPCB (Departamento de Botânica/UFPR) sob o número 14028.

A galactomanana de goma-guar, GMG (*Cyamopsis tetragonolobus*) comercializada pela Indian Gum Limited – B-5/7. M.I.A., Basni, Phase – Ist, Jodhpur – 342005, Índia, foi fornecida pela empresa Herbarium S.A. – Produtos Naturais – Curitiba/ Brasil. A massa molecular foi calculada como de aproximadamente $610.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e a razão Man:Gal obtida foi de 1,9:1 (LUCYSZYN et al., 2006a).

A galactomanana de alfarroba, GMA (*Ceratonia siliqua*) foi adquirida comercialmente da Sigma, com o código G0753. Possui uma massa molecular de aproximadamente $310.000 \text{ g.mol}^{-1}$ e uma relação Man:Gal de 4:1.

O alginato de sódio (AL) foi adquirido comercialmente da Proquimios, Rio de Janeiro / Brasil, a massa molecular fornecida pelo fabricante é de aproximadamente $300.000 \text{ g.mol}^{-1}$.

A ovoalbumina (Alb) foi adquirida comercialmente da Sigma, com o código O04757, com uma massa molecular especificada de aproximadamente $45.000 \text{ g.mol}^{-1}$.

3.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GALACTOMANANA DE *L. leucocephala*

Para a extração da galactomanana, as vagens da árvore de *L. leucocephala* foram colhidas e abertas para retirar as sementes, com aproximadamente um tamanho de 2 cm cada semente, presentes no interior. Após serem lavadas, as sementes foram colocadas em um recipiente com água e aquecidas até a fervura por 15 minutos, a fim de que ocorresse a desnaturação

das enzimas. Em seguida, foram deixadas em estufa a 40°C por aproximadamente 16 horas. Então, as sementes foram moídas e deslipidificadas através do sistema “Soxhlet”, por 5 horas, usando como solvente o éter etílico sob refluxo. Para enfim fazer a extração da galactomanana, essas sementes tratadas foram colocadas em um agitador mecânico com água destilada a 25°C. Essa agitação faz com que o polissacarídeo seja extraído da semente e permaneça na fase aquosa. Aproximadamente 3 litros de água são adicionados ao sistema para uma quantidade de 50 gramas de sementes bruta.

À solução de polissacarídeo obtida foi acrescentado NaCl até que a concentração fosse 0,1 mol.l⁻¹. O material foi centrifugado por 20 minutos, a 13.000 rpm em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi precipitado com 2 volumes de etanol e seco a temperatura ambiente.

O material foi ressolubilizado em uma concentração de 1 mg.ml⁻¹ e filtrado por membrana de acetato celulose com poros de 3, 0,8 e 0,22 µm, respectivamente. A solução resultante foi concentrada, precipitada com etanol, seca com acetona a 25°C e denominada de GML.

3.3 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO – QUÍMICAS

3.3.1 Determinação do açúcar total da GML

A dosagem foi realizada pelo método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), pelo qual pode-se quantificar carboidratos em geral. Sobre a solução a qual desejava-se dosar, colocou-se fenol 5% seguido de ácido sulfúrico puro para análise (P.A.). O produto dessa reação, o hidroxiacetilfurfural, foi um composto colorido, que pode ser quantificado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 490 nm. O mesmo procedimento fez-se para a curva-padrão (10-100 µg.ml⁻¹), em que se utilizou a mistura Man:Gal na proporção de 1,4:1 como padrão.

3.3.2 Determinação de proteínas da GML

A quantificação de proteínas foi feita pelo método HARTREE (1972). Nesse método, usaram-se três soluções; A, B e C. A solução A é uma mistura dos sais tartarato de sódio e potássio e carbonato de cálcio, em hidróxido de sódio 1N; a solução B é outra mistura de sais, taratarato de sódio e potássio com sulfato de cobre, também em presença de hidróxido de sódio; e a solução C é o Reagente de Folin diluído. As leituras foram feitas em comprimento de onda de 650 nm. Para a curva - padrão ($20 - 100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) foi utilizada a albumina bovina.

3.3.3 Determinação da composição monossacarídica da GML

Para essa determinação foi feita a hidrólise da galactomanana com H_2SO_4 a 72%, durante 1h a 4°C . Em seguida, o ácido foi diluído para 8% e o sistema aquecido por 4h a 96°C . Foi adicionado, então, carbonato de bário para a neutralização do pH e filtrado para a remoção de sal (SAEMAN et al., 1954). Em seguida, foi feita a redução com borohidreto de sódio por aproximadamente 16h. As amostras foram tratadas com resina LEWATIT – S – 100 (H^+), e separadas por filtração. As soluções foram, então, evaporadas e lavadas várias vezes com metanol até a secura.

Os alditóis foram acetilados com o sistema anidrido acético e piridina, por 12h. A reação foi interrompida pela adição de gelo moído, os acetatos de alditol foram extraídos com clorofórmio, lavados várias vezes com solução aquosa de CuSO_4 (5%), evaporados e redissolvidos em clorofórmio para a análise por cromatografia gasosa, CG (SAWADEKER, SLONEKER, JEANES; 1965).

3.3.4 Determinação da massa molecular média ponderal da GML

O dn/dc galactomanana de *L. leucocephala* foi determinado usando um refratômetro diferencial Waters, modelo 2410, com comprimento de onda de 546 nm, com 5 concentrações entre $0,1$ a $1,0 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ (filtradas por filtro Millipore, $0,45$

μm). O índice de refração de cada concentração forneceu a constante dn/dc (0,146), que foi usada para calcular a massa molecular.

A amostra, com concentração de $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$, foi solubilizada em nitrato de sódio $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, contendo azida de sódio 200 ppm, foi filtrada por membrana Millipore de $0,22 \mu\text{m}$ e injetada no GPC, contendo colunas de ultrahidrogel 2000, 500, 250 e 120, conectados em série, com limite de exclusão de $7 \cdot 10^6$, $4 \cdot 10^5$, $8 \cdot 10^4$ e $5 \cdot 10^3$. A detecção foi feita usando refratômetro Waters e um detetor de espalhamento de laser multiângulo à $632,8 \text{ nm}$, modelo DAWN DSP-F, Wyatt Technology. O solvente foi a mesma solução usada para solubilizar as amostras e o fluxo foi de $0,6 \text{ ml.min}^{-1}$ (WYATT, 1993).

O mesmo procedimento para a preparação da amostra foi adotado para o alginato de sódio, em que se pretendia observar se esse polissacarídeo apresentava-se sem contaminantes, já que esse foi adquirido comercialmente.

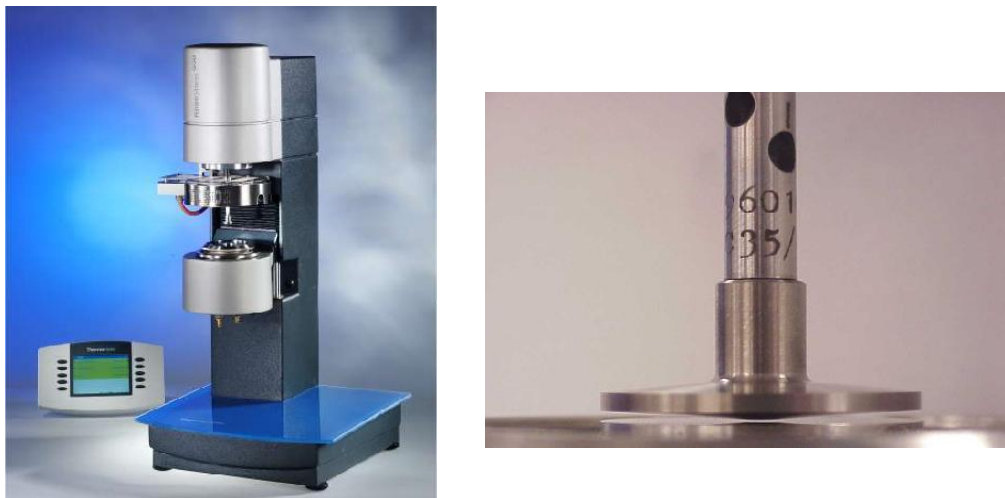
3.3.5. Análises Reológicas

Amostras de galactomanana e alginato de sódio foram quantificadas em massa e misturadas. Esse pó obtido foi adicionado ao solvente água sob agitação. A amostra foi deixada solubilizando sob agitação por 16 horas, a uma temperatura ambiente.

O eletrólito, Ca^{2+} (concentrações de 20, 30 e 45 mMol.l^{-1}), para análises de reticulação, foi adicionado após a mistura dos polissacarídeos estar solubilizada e o sistema foi agitado por mais 30 minutos.

As misturas efetuadas em presença de eletrólito ou não foram analisadas em reômetro HAAKE modelo Rheostress 600, com sensor PP 35, acoplado a um microcomputador com software "Haake rheometer" (fig. 8). A temperatura de 25°C dos ensaios foi controlada através de um banho termo circulante Haake (DC30) e um dispositivo de termostatização Universal Thermo Controller (UTC).

FIGURA 8 – APARELHO REÔMETRO RHEOSTRESS 600 E SENSOR PLACA-PLACA 35 mm UTILIZADOS PARA ANÁLISES REOLÓGICAS



Modelos matemáticos foram usados para a avaliação dos comportamentos em fluxo e na região do comportamento viscoelástico linear. Também foram feitos experimentos para as análises interpretadas usando o modelo de Cox-Merz [$\eta(\dot{\gamma}) \sim |\eta^*|(\omega = \dot{\gamma})$, onde η = viscosidade aparente, $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento, $|\eta^*|$ = módulo da viscosidade complexa, ω = velocidade angular (rad.s^{-1})] (BARNES, HUTTON, WALTER; 1989). Todos os experimentos foram efetuados em triplicatas e os desvios não foram superiores a 3%.

3.4 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

3.4.1 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a Microscopia Eletrônica da Varredura (MEV) foram analisadas amostras contendo partículas das misturas formuladas por:

- Alginato de sódio + galactomanana + íons cálcio (branco), com a concentração final dos polissacarídeos de 15 mg.ml^{-1} e 45 mMol do eletrólito;

- Alginato de sódio + galactomanana + íons cálcio + albumina, com a concentração final dos polissacarídeos de 15 mg.ml^{-1} , 45 mMol do eletrólito e 5 mg.ml^{-1} de albumina.

O suporte de alumínio foi previamente lavado e submetido a sonificação com uma solução de álcool isopropílico com a finalidade de deixar a superfície bem limpa para assim evitar contaminantes. Esse suporte foi colocado sobre uma chapa aquecida e então foram pipetados $20 \mu\text{l}$ da amostra contendo as partículas das misturas. O calor é necessário para que o solvente da solução seja evaporado e restem apenas as partículas sobre o suporte. Para garantir que não tivesse água, já que essa interfere nas análises, esses suportes foram ainda deixados por 24h em uma estufa a vácuo, a 100°C .

Os suportes foram submetidos à metalização com ouro e então, analisados por microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM – 6360 LV, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (fig. 9).

FIGURA 9 - MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA E MICROANÁLISE, 6460 LV, JEOL, DO CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



3.4.2 Análises por microscopia de força atômica (AFM)

Em tal procedimento foram analisadas amostras contendo partículas das misturas formuladas por:

- Alginato de sódio + galactomanana + íons cálcio (branco), com a concentração final dos polissacarídeos de 15 mg.ml^{-1} e 45 mMol do eletrólito;
- Alginato de sódio + galactomanana + íons cálcio + albumina, com a concentração final dos polissacarídeos de 15 mg.ml^{-1} , 45 mMol do eletrólito e 5 mg. ml^{-1} de albumina.

Alíquotas de $5 \text{ }\mu\text{l}$ das amostras contendo as partículas foram pipetadas sobre a superfície de mica muscovita (grau de pureza 4 e fabricante S2pi), incubadas por 1 minuto e em seguida, lavadas com $90 \text{ }\mu\text{l}$ de água destilada. As amostras foram deixadas para secagem em sala com umidade 45% e temperatura controlada de 23°C durante 24h antes da análise por microscópio. As imagens em modo dinâmico e em fase foram feitas a 25°C , utilizando um microscópio comercial Shimadzu SPM - 9500J3, com ponta constante de mola de 4.5 N.m^{-1} (Fabricante micromash) e Raio de Scan de 1Hz, no Departamento de Física da UFPR. As imagens foram tratadas pelo programa SPIP – Scanning Probe Image Process, Metrology. A análise de grão utilizou um índice de detecção e uma altura de 35 nm e 70,39 nm para amostra com proteína e, 6 nm e 3,14 nm para a amostra sem proteína. O filtro de ruído foi de 10% e o método de contorno foi o *Threshold*.

FIGURA 10 – MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA SHIMADZU SPM - 9500J3, DEPARTAMENTO DE FÍSICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



3.5 PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS

Os pós dos polissacarídeos alginato de sódio e galactomanana e da proteína albumina foram pesados, misturados na proporção de 50% de cada polissacarídeo e solubilizados por 16h, obtendo uma concentração final de 15 mg.ml^{-1} da mistura polissacarídeos e 5 mg.ml^{-1} em proteína.

A bomba peristáltica do *spray-drier* (fig. 11), da Lab Maq modelo LM – MSD 1.0 foi utilizada para borrifar, através de um atomizador, a solução de polissacarídeo e albumina em uma solução de cloreto de cálcio 45 mMol . O fluxo usado foi de $0,22 \text{ ml.min}^{-1}$, em uma temperatura de 25°C . A solução de cloreto de cálcio foi mantida sob agitação constante.

As partículas formadas foram separadas por filtração por membrana de $0,8 \mu\text{m}$ e centrifugadas com uma velocidade de 8.000 rpm , a uma temperatura de 25°C .

FIGURA 11 – *SPRAY – DRIER* LM – MSD 1.0, LAB MAQ.



3.6 DOSAGEM DE PROTEÍNAS NÃO ENCAPSULADAS NAS PARTÍCULAS

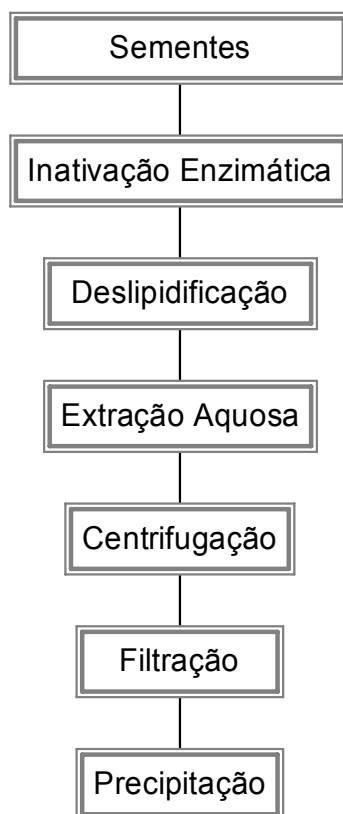
A solução contendo as partículas foi centrifugada por 15 minutos a 8.000 rpm. No sobrenadante procedeu-se a dosagem de proteínas não encapsuladas, utilizando pelo método de HARTREE (1972) para essa determinação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

O processo da extração e purificação da galactomanana a partir das sementes de *L. leucocephala* estão demonstrados no fluxograma da fig.12. Uma extração aquosa exaustiva da galactomanana a uma temperatura de 25°C, obteve-se um rendimento de 31,4% (m/m) para a amostra bruta, que é considerado bom para polissacarídeos obtidos de sementes quando se compara esse resultado com dados de LUCYSZYN (2006b) e ONO (2003). Os rendimentos dos polissacarídeos bruto e purificado por centrifugação e ultrafiltração estão demonstrados na Tabela 1.

FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GALACTOMANANA OBTIDA DE SEMENTES DE *L. leucocephala*



Após a centrifugação e todas as filtrações por membranas obteve-se um rendimento de 19,3%. Apesar de ser mais baixo o rendimento, a filtração é necessária a fim de se obter amostra mais pura nas soluções aquosa para que o polissacarídeo possa ser utilizado no encapsulamento de proteínas. Esses valores, com relação a sementes totais são semelhantes aos encontrados para as galactomananas em estudo antes do processo de centrifugação e filtração por LUCYSZYN (2004) que obteve um valor de 31%, porém, sendo um valor mais alto ao comparado com 17,5% de ONO (2003) e 9,7-15,7% de BUCKERIDGE, DIETRICH, MALUF (1987).

4.2 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO - QUÍMICAS

4.2.1 Determinação de açúcar total, proteínas e composição monossacarídica da GML

A Tabela 1 mostra o conteúdo de proteínas, carboidratos e composição monossacarídica da amostra de galactomanana de sementes de *Leucaena leucocephala* purificada.

TABELA 1 - VALORES DE RENDIMENTO, DE ACÚCAR TOTAL, PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTOMANANA PURIFICADA DE SEMENTES DE *L. leucocephala*

Espécie	Rendimento da amostra bruta (%)	Rendimento da amostra purificada (%)	Açúcar Total (%) ^a	Proteínas (%) ^b	Composição Monossacarídica ^c
<i>L.leucocephala</i>	31,4	19,3	80%	8%	Man:Gal 1,7:1

a- DUBOIS, 1956

b- HARTREE, 1972

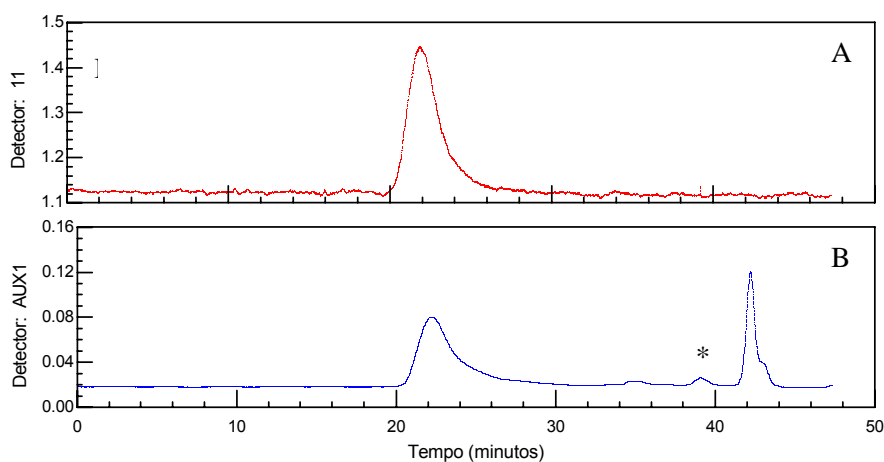
c- SAEMAN et al., 1954 e SAWADEKER et al., 1965

O valor de açúcar total e a composição monossacarídica estão semelhantes a valores obtidos em literatura por LUCYSZIN (2006a) e ONO (2003). Durante o processo de extração aquosa, cloreto de sódio foi adicionado ao extrato antes da centrifugação para que precipitasse possíveis proteínas existentes. No entanto, um valor de 8% de proteínas ainda foi encontrado na galactomanana purificada por centrifugação e ultrafiltração, sugerindo ser mesmo essa a quantidade de proteínas presentes na semente coletada no campus do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná.

4.2.2 Determinação da massa molecular média da GML

Pela análise do índice de refração da amostra em diferentes concentrações foi obtido um dn/dc de 0,146. A análise de HPSEC-MALLS mostra que o processo de purificação foi eficiente, como pode ser observado pelo perfil normal cômico apresentado na figura 13.

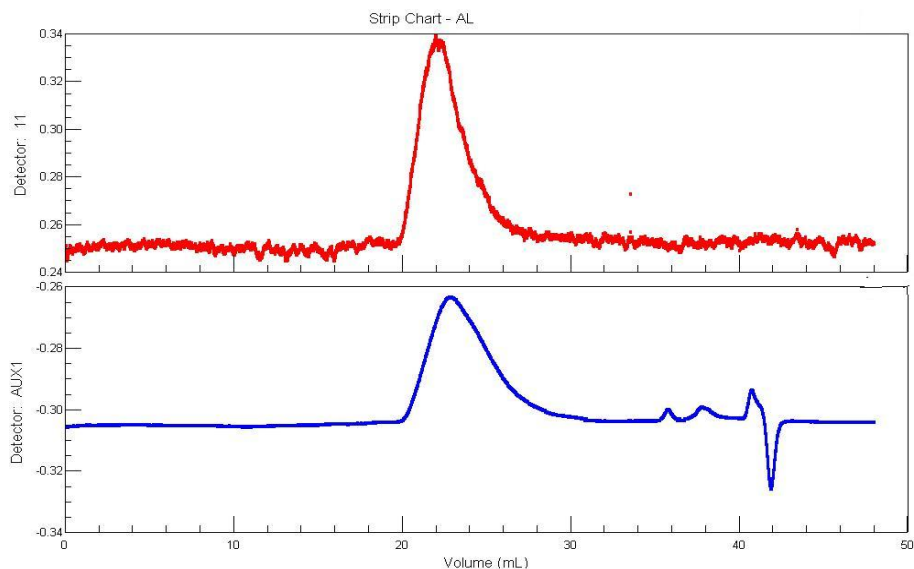
FIGURA 13 - PERFIL DE ELUIÇÃO DO HPSEC-MALLS PARA A GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML). (A) DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ (B) DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO



A massa molecular obtida foi $713.600 \text{ g.mol}^{-1}$ (WYATT, 1993). O pico que aparece aproximadamente no tempo de 23 minutos, nos detectores de espalhamento de luz e no índice de refração, corresponde a galactomanana. No tempo de 42 minutos aparece um outro pico de concentração significativa que, provavelmente deve ser a arabionose e a xilose, monossacarídeos que estão presentes na casca da semente da leucena. Observa-se um polissacarídeo polidisperso em uma solução sem contaminantes. Esses resultados são semelhantes aos obtido por LUCYSZYN et al. (2006).

O perfil de eluição do alginato de sódio pode se visto na fig. 14. Assim como a GML, o alginato apresenta um perfil normal cômico e polidesperso. Essa análise foi feita apenas para verificar se esse polissacarídeo adquirido comercialmente apresentava-se realmente puro.

FIGURA 14 - PERFIL DE ELUIÇÃO DO HPSEC-MALLS PARA O ALGINATO DE SÓDIO. (A) DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ (B) DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO



4.2. ANÁLISES REOLÓGICAS

Análises reológicas foram realizadas para se verificar uma possível interação entre a galactomanana com o alginato de sódio. Para isso, analisaram-se diferentes percentagens de cada polímero nas misturas, conforme demonstrado na tabela 2. As misturas dos polissacarídeos foram feitas enquanto esses estavam sob a forma de pó, pois foi testada a mistura feita com as soluções (solução de alginato, misturando com solução da galactomanana); mas como eram muito viscosas, pipetá-las causava um valor impreciso na concentração final das misturas.

As análises reológicas de misturas de polissacarídeos foram feitas para a GML e para duas outras adquiridas comercialmente, GMG e GMA.

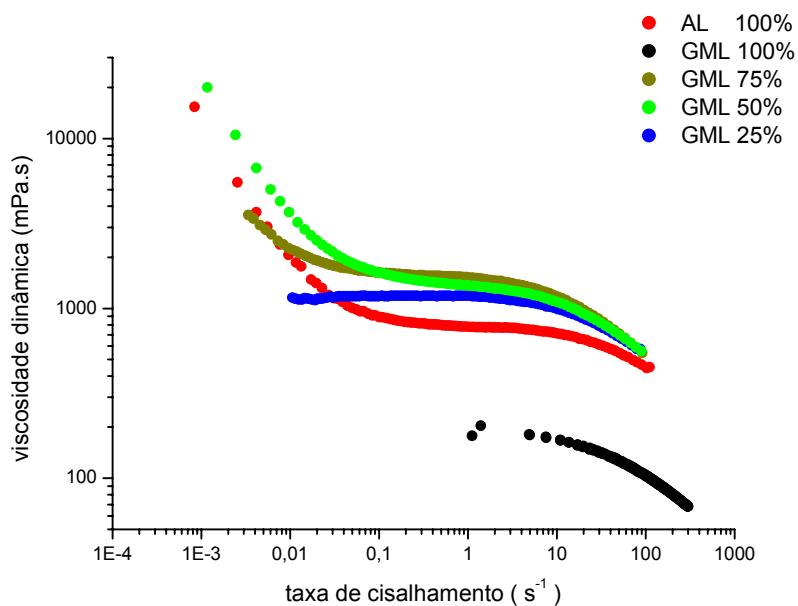
TABELA 2 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS DE ALGINATO DE SÓDIO E GALACTOMANANA PARA ANÁLISES REOLÓGICAS

Concentração de Alginato de Sódio (%)	Concentração de galactomanana (%)
100	0
75	25
50	50
25	75
0	100

As curvas de viscosidade para as diferentes misturas de alginato de sódio (AL) e GML estão demonstradas na fig. 15. Observa-se, em baixas taxas de cisalhamento ($0,3$ a 3 s^{-1}), a presença de um patamar newtoniano praticamente para todas as amostras em sistema isolado ou em misturas, seguido de um comportamento pseudoplástico similar ao encontrado para outras soluções de polissacarídeos da literatura (IAGHER; REICHER; GANTER, 2002; SCHILLING, et al., 2002). Pela inclinação da curva a pseudoplasticidade foi mais pronunciada para a amostra de alginato, seguida para as misturas contendo 50 e 75% de

galactomanana. Fixando-se uma taxa de cisalhamento de 4 s^{-1} para todos os sistemas observa-se a capacidade de interação da GML com o alginato, em função da viscosidade aparente das misturas ser superior à do sistema contendo somente alginato. Por outro lado, na mesma taxa de cisalhamento observa-se que a viscosidade da galactomanana a 15 mg.mL^{-1} em sistema isolado é cerca de quatro vezes menor que a do alginato.

FIGURA 15 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.mL^{-1}) DE ALGINATO/GALACTOMANANA EXTRAÍDA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA, COM UMA TAXA DE CISALHAMENTO DE $1. 10^{-4}$ A $3. 10^2 \text{ s}^{-1}$. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C



As curvas de viscosidade para as misturas de AL com as galactomananas comerciais também foram feitas a fim de se obter comparações de comportamento com a galactomanana extraída no laboratório de Biopolímeros, no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Os resultados estão demonstrados nas figs. 16 e 17.

FIGURA 16 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.ml⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA, COM UMA TAXA DE CISALHAMENTO DE 1.10⁻⁴ A 3. 10² s⁻¹. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C

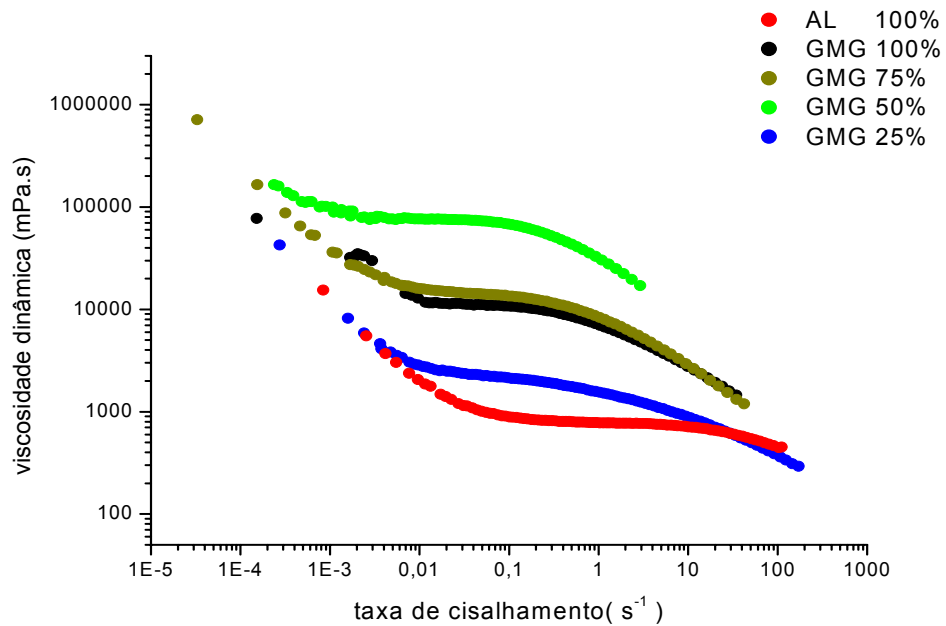
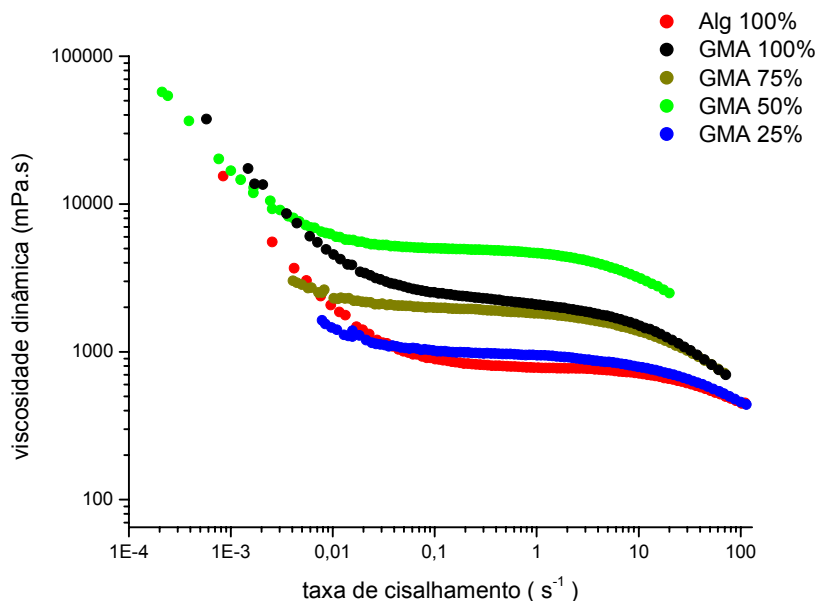


FIGURA 17 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.ml⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA, COM UMA TAXA DE CISALHAMENTO DE 1. 10⁻⁴ A 3. 10² s⁻¹. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C



As curvas de viscosidade da goma de alfarroba e da guar também apresentam um patamar newtoniano seguido, em mais altas taxas de cisalhamento, de um comportamento pseudoplástico. A uma taxa de cisalhamento de 0,3 s⁻¹ a mistura contendo a GMG ou GMA apresenta um valor de viscosidade aparente de 9.530 e 2.300 mPa.s respectivamente, o alginato de 8.160 mPa.s e a GML de 181 mPa.s em uma taxa de cisalhamento de 4,8 s⁻¹. Em qualquer um dos dois sistemas observa-se que a mistura contendo 50% de galactomanana é a que apresenta uma maior viscosidade, indicando também possibilidade de interação entre os dois polissacarídeos.

Para a galactomanana extraída de sementes de *L. leucocephala*, as misturas contendo de 50 e 75% de galactomanana (fig.15) apresentam os valores de viscosidades próximos, sendo esses também os que apresentam os maiores valores.

O alginato de sódio é um polissacarídeo que em presença de alguns íons divalentes geleifica, portanto, em função dos resultados acima foi escolhido o valor de 50% de substituição nas misturas, para se testar o comportamento dos polissacarídeos frente ao eletrólito íon cálcio.

As curvas de viscosidades com diferentes concentrações de íons cálcio foram feitas para as misturas de AL – GML, AL – GMG e AL – GMA (fig. 18-20).

FIGURA 18 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA AS MISTURAS (15 mg.mL^{-1}) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO, EM TAXA DE CISALHAMENTO DE $1. 10^{-4}$ A $3. 10^2 \text{ s}^{-1}$. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C

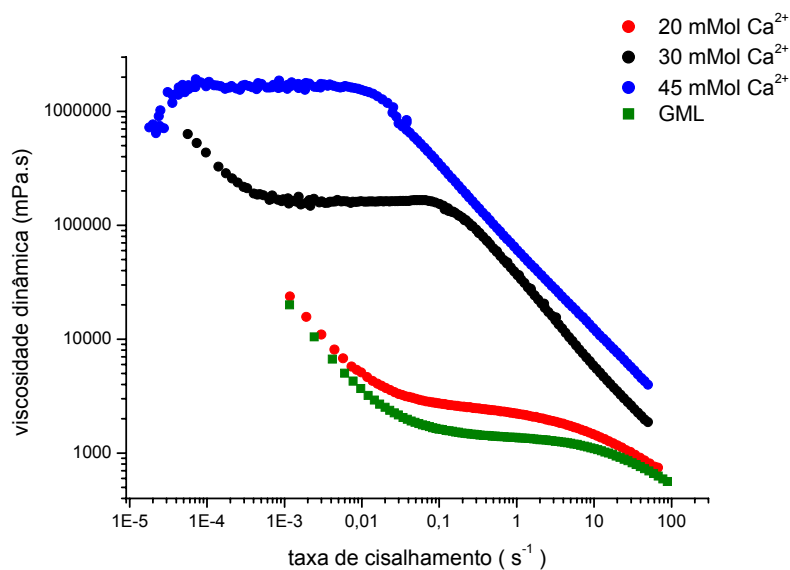


FIGURA 19 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.mL⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO, EM TAXA DE CISALHAMENTO DE 1. 10⁻⁴ A 3. 10² s⁻¹. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C

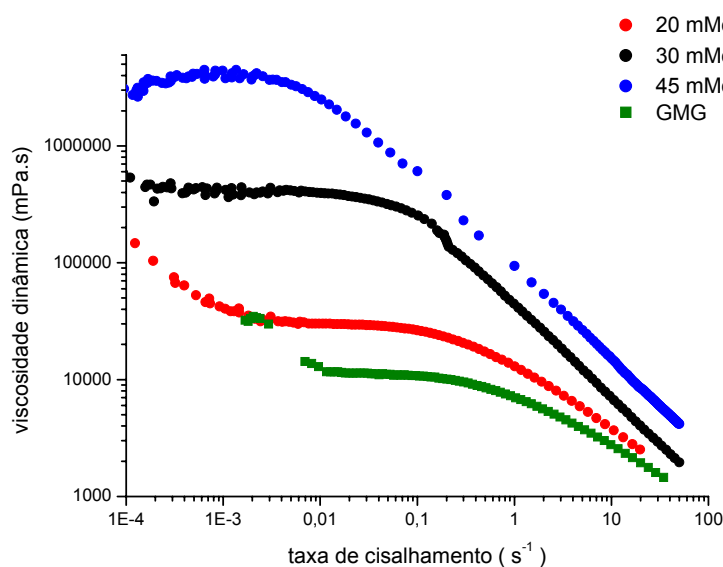
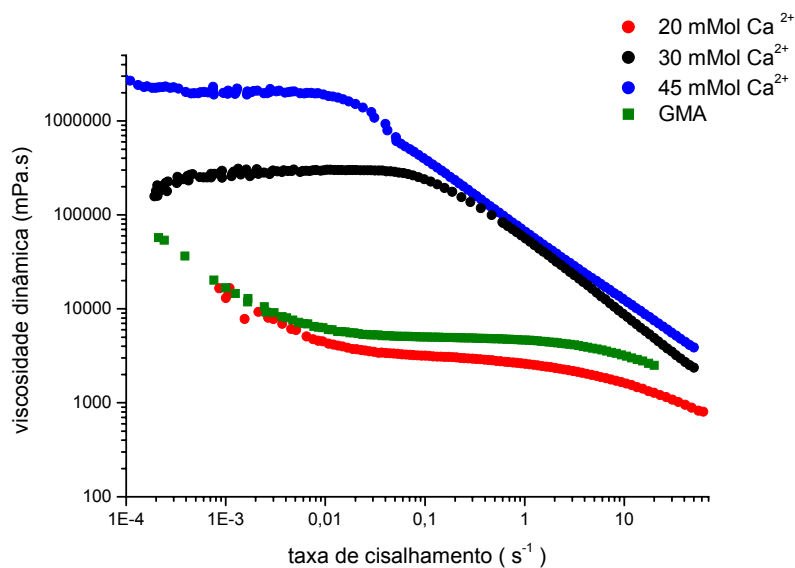


FIGURA 20 – CURVAS DE VISCOSIDADE PARA MISTURAS (15 mg.mL⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO, EM TAXA DE CISALHAMENTO DE 1. 10⁻⁴ A 3. 10² s⁻¹. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C



Nas figuras 18-20, observa-se que para todas galactomananas que os íons cálcio na concentração de 45 mMol contribuiu para que todos os sistemas apresentassem valores mais altos para a curva de viscosidade dinâmica. Também foram testadas concentrações maiores de íons, como 50 mMol e 100 mMol (dados não apresentados), porém para essas o gel se tornava com um aspecto quebradiço e não homogêneo, sendo descartada a utilização dessas concentrações de íons.

A fim de se enfatizar o aumento de viscosidade do sistema provocado pela adição dos íons cálcio, nas figuras 18-20 há também, a curva de viscosidade referente à mistura dos dois polissacarídeos na ausência do eletrólito. Esses polissacarídeos estão na concentração de 15 mg.ml^{-1} , numa proporção de 50%. Observa-se como a presença dos íons cálcio acentua a formação de soluções mais viscosas.

Fixada a proporção AL – GM contendo 50% de cada polissacarídeo numa concentração final de mistura de 15 mg.ml^{-1} , e a concentração de 45 mMol de íons cálcio, fez-se então as análises reológicas oscilatórias com a finalidade de se complementar a análise do comportamento das misturas em relação ao comportamento viscoelástico.

As varreduras de tensão de 0,002-300 Pa foram efetuadas para frequências fixas de 0,1, 1, 3 e 10 Hz. Os ensaios com diferentes frequências foram realizados porque a faixa de viscoelasticidade linear é dependente da frequência. Dessa forma, foram analisadas as regiões de viscoelasticidade para as misturas de AL – GML, AL – GMG e AL – GMA cujas respostas estão nas figuras 21, 22 e 23.

FIGURA 21 – VARREDURA DE TENSÃO PARA MISTURAS (15 mg.ml⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 45mMol DE ÍONS CÁLCIO, EM FREQUÊNCIAS FIXAS DE 0,1, 1, 3 e 10 Hz, COM TENSÃO VARIANDO DE 0,002-300 Pa. LEITURAS REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA DE 35 mm, A 25 °C

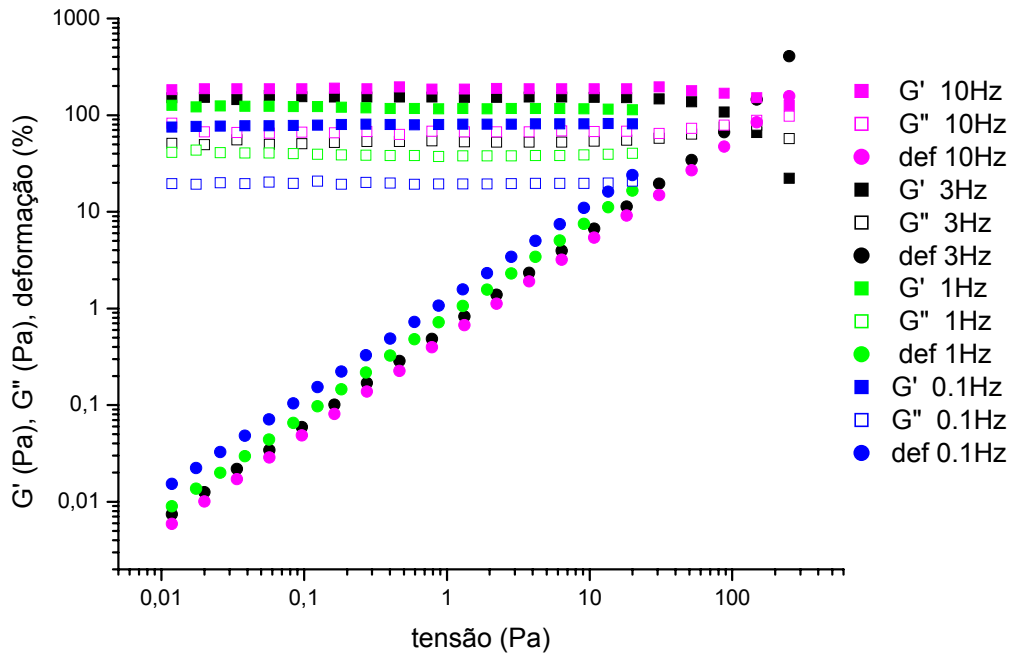


FIGURA 22 – VARREDURA DE TENSÃO PARA MISTURAS (15 mg.ml⁻¹) DE ALGINATO/GALACTOMANANA GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 45mMol DE ÍONS CÁLCIO, EM FREQUÊNCIAS FIXAS DE 0,1, 1, 3 e 10 Hz, COM TENSÃO VARIANDO DE 0,002-300 Pa. LEITURAS REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA DE 35 mm, A 25 °C

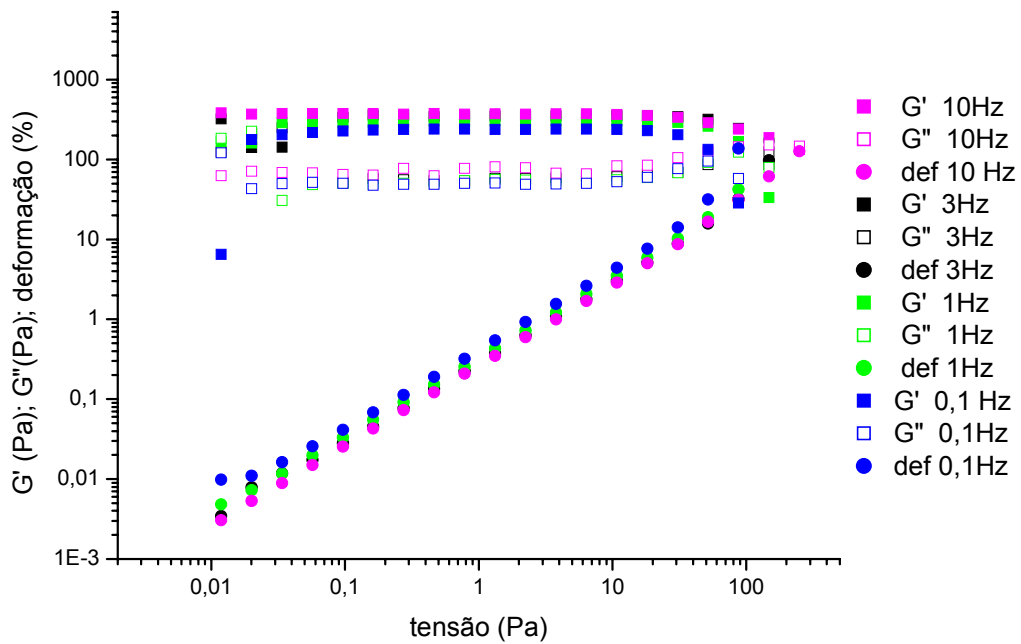
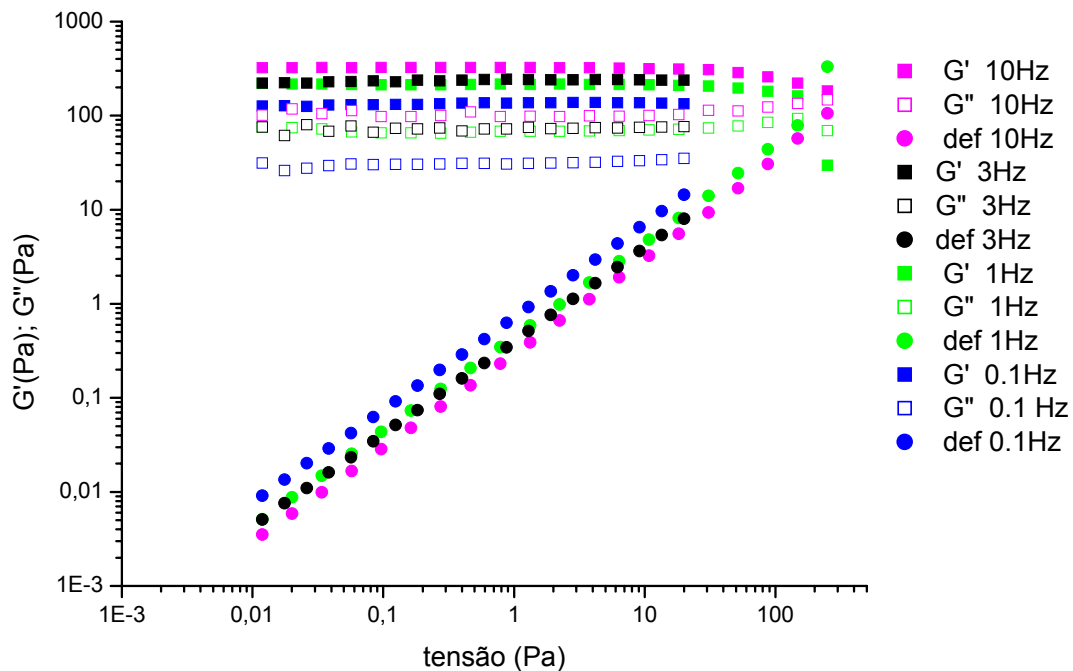


FIGURA 23 – VARREDURA DE TENSÃO PARA MISTURAS (15mg.ml⁻¹) DE ALGINATO/GALTOMANANA DE ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO E EM FREQUÊNCIAS FIXAS DE 0,1, 1, 3 e 10 Hz, COM TENSÃO VARIANDO DE 0,002-300 Pa. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C



Nos perfis das figuras 21-23, observa-se um comportamento de gel para todas as faixas de frequência, já que os valores de G' são maiores do que os valores do G'' . Observa-se também, que a região de viscoelasticidade é constante até uma tensão de aproximadamente 100 Pa para a GML. Nas duas galactomananas comerciais, essa faixa é um pouco menor, e a região de viscoelasticidade é constante até aproximadamente 100 Pa. A deformação até uma tensão de 10 Pa apresenta valores inferiores a 10% de deformação para qualquer um dos sistemas contendo as diferentes galactomananas.

O valor de $\tan \delta$ (G''/G') para a mistura contendo a GML a uma frequência de 1 Hz e com uma tensão de 1 Pa foi de 0,32; enquanto que para a de goma-guar foi 0,206 e para a de alfarroba foi de 0,230. A determinação do valor de $\tan \delta$ é importante porque ao relacionar os dois módulos se pode caracterizar o

comportamento da amostra, ou seja: apresenta um caráter mais elástico ou de mais viscoso. Quanto mais baixo o valor de $\tan \delta$ maior é a característica de gel. Portanto, nessa frequência, a mistura AL – GMG é que apresentou o caráter mais sólido.

Para fazer a varredura de frequência é necessário que um valor de tensão seja fixado. Esse valor tem que estar dentro da região de viscoelasticidade. Assim, observando nos gráficos de varredura de tensão, fixou-se um valor de tensão de 3 Pa para as três galactomananas. Experimentalmente, varrer uma frequência significa que a frequência de deformação é aumentada passo a passo (SCHRAMM, 2006).

FIGURA 24 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg.ml^{-1}) ALGINATO/GALACOTMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO, COM TENSÃO FIXA DE 3Pa. (■) G' , (●) G'' . AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C

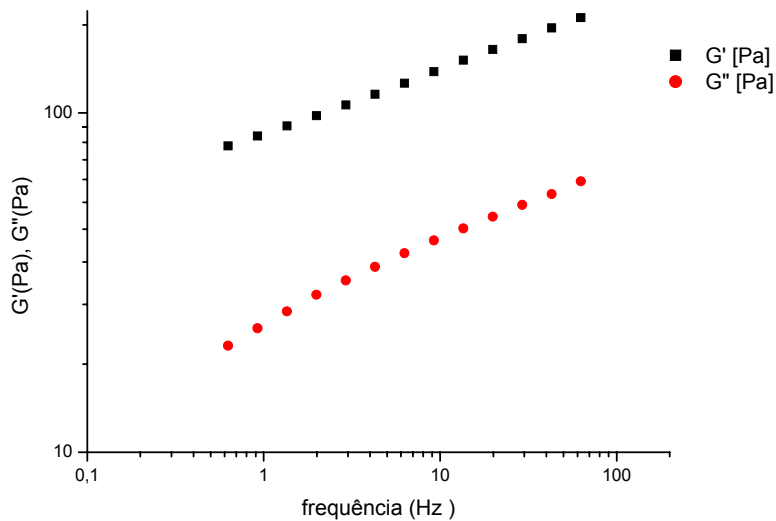


FIGURA 25 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg.ml⁻¹) ALGINATO/ GALACOTMANANA DE GOMA-GUAR (GMC), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO, COM TENSÃO FIXA DE 3Pa. (■) G', (●) G". AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C

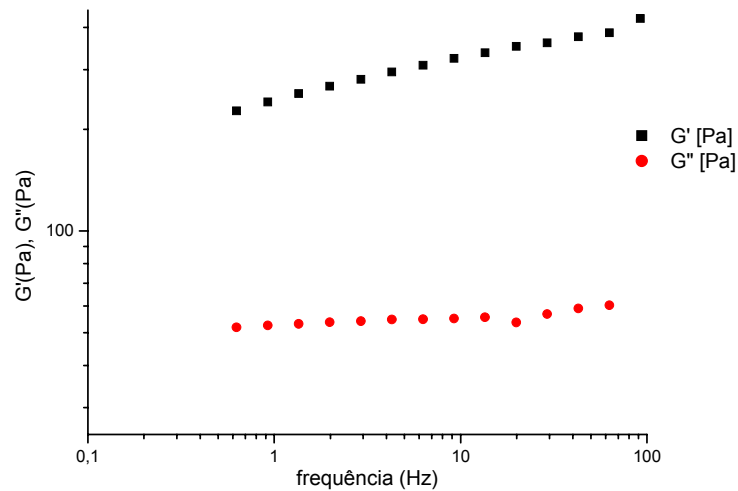
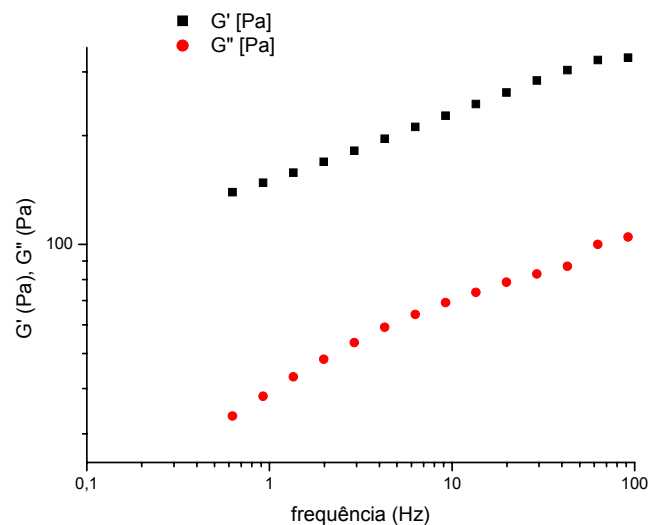


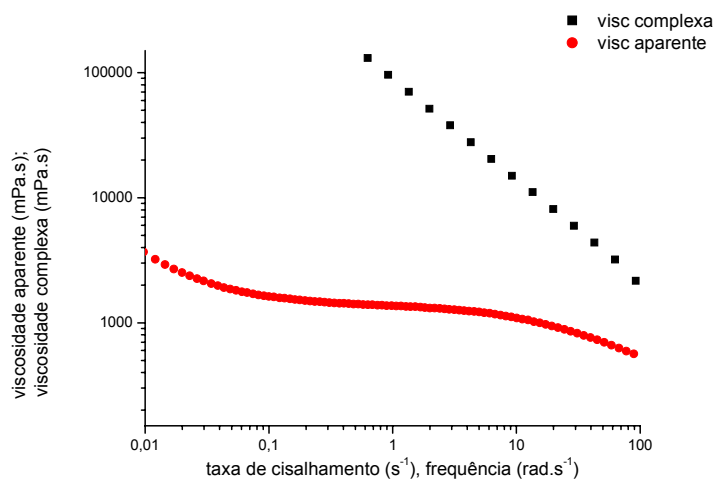
FIGURA 26 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg.ml⁻¹) ALGINATO/ GALACOTMANANA DE ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO, COM TENSÃO FIXA DE 3Pa. (■) G', (●) G". AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C



Nas figuras 24-26 todas as misturas de AL – GMs exibiram um perfil na varredura de frequência de um material com características de gel. Os valores de G' foram superiores aos de G'' desde as frequências mais baixas até os valores mais altos. A galactomanana goma-guar foi a que apresentou o comportamento de gel mais rígido, em que os valores dos módulos viscoso foi praticamente independentes, enquanto os do elástico foram os menos dependentes da frequência, comparada com os das outras duas GMs.

Empiricamente, Cox e Merz (1958) descobriram que a viscosidade medida em função da taxa de cisalhamento pode ser comparada diretamente com a viscosidade dinâmica complexa em função da velocidade angular. Essa relação é válida para diversos polímeros fundidos e soluções poliméricas. Propriedades de reologia dinâmica podem ser comparadas com as propriedades de reologia estática para provar o comportamento da amostra (SILVA; OLIVERITA; RAO, 1998).

FIGURA 27 – GRÁFICO DE COX-MERZ DA MISTURA (15 mg.ml^{-1}) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE *L. Leucocephala* (GML) EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. (●) VISCOSIDADE APARENTE (η), (■) VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*). TAXA DE CISALHAMENTO VARIANDO $0,1\text{-}50 \text{ s}^{-1}$ E FREQUÊNCIA DE $0,1\text{-}100 \text{ rad.s}^{-1}$. LEITURAS REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C



Uma estrutura de gel existe quando a curva de viscosidade complexa vs frequência apresenta-se maior do que a curva de viscosidade aparente vs taxa de cisalhamento, portanto, realizando-se as interpretações do caráter de gel pelas análises através do modelo de Cox-Merz (figs. 27 – 29), pode-se observar que os sistemas AL – GML, de AL – GMA e AL – GMC formam uma estrutura de gel (COX; MERZ, 1958; BOT et al., 2001; HAN et al., 2002; ROBERTS; CAMERON, 2002).

A correlação Cox-Merz tem sido estudada para um grande número de soluções poliméricas, sendo geralmente aplicado para moléculas flexíveis. Algumas derivações de Cox-Merz foram feitas para polímeros sintéticos, suspensões de sistemas de biopolímeros diluídos e concentrados e para alguns alimentos (TIZIANI; VODOVOTZ, 2005).

FIGURA 28 – GRÁFICO DE COX-MERZ DA MISTURA (15 mg.ml^{-1}) ALGINATO/GALACTOMANANA GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO. (●) VISCOSIDADE APARENTE (η), (■) VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*). TAXA DE CISALHAMENTO VARIANDO 0,1-50 s^{-1} E FREQUÊNCIA DE 0,1-100 rad.s^{-1} . LEITURAS REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C

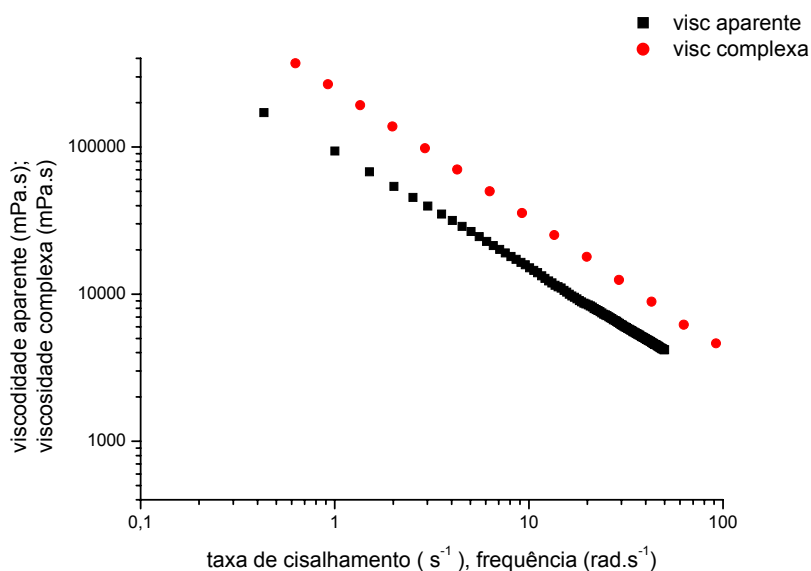
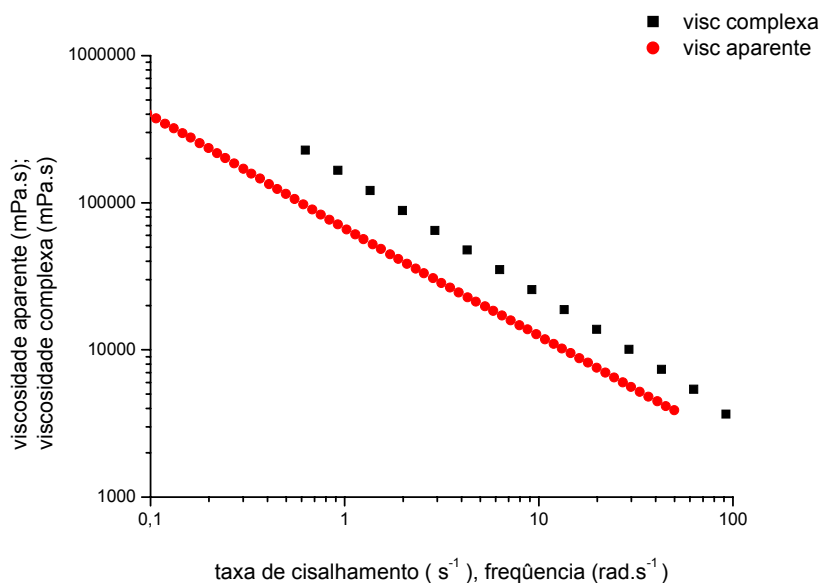


FIGURA 29 – GRÁFICO DE COX-MERZ DA MISTURA (15 mg.ml⁻¹) ALGINATO/GALACTOMANANA ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO. (●) VISCOSIDADE APARENTE (η), (■) VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*). TAXA DE CISALHAMENTO VARIANDO 0,1-50 s⁻¹ E FREQUÊNCIA DE 0,1-100 rad.s⁻¹. LEITURAS REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C



Por outro lado, o ensaio de Fluência (*creep*) e recuperação é um teste de viscoelasticidade que permite diferenciar as respostas elásticas das respostas viscosas. Diferente das medições que mostram a dependência entre a taxa de cisalhamento e a viscosidade ou elasticidade, o ensaio de *creep* introduz um parâmetro adicional de tempo de resposta que é dependente da tensão, para o comportamento elástico e viscoso.

Para se realizar essa análise com cada uma das três misturas fixou-se uma tensão de 3 Pa, tensão essa escolhida dentro da região de viscoelasticidade no perfil do gráfico da varredura de tensão (figs. 21 – 23). Essa tensão foi aplicada durante 120 segundos, e depois suspensa para avaliar a recuperação.

Os resultados obtidos nessas análises dependem da resposta do fluido, a saber:

Resposta elástica: a deformação elástica é completamente recuperável.

Resposta viscosa: energia fornecida para o material fluir não é recuperada.

Resposta viscoelástica: onde o comportamento varia entre as respostas de tensão/deformação.

Nos sistemas testados foi observado pelos resultados de comportamento dos gráficos das figuras 30, 31 e 32 que os sistemas formulados apresentam, portanto, uma resposta viscoelástica.

FIGURA 30 – ANÁLISE DA FLUÊNCIA (*CREEP*) E RECUPERAÇÃO PARA A MISTURA (15 mg.ml^{-1}) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), 15 mg.ml^{-1} , EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. USANDO UMA TENSÃO FIXA DE 3 Pa . AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM SENSOR PLACA DE 35 mm , A 25°C

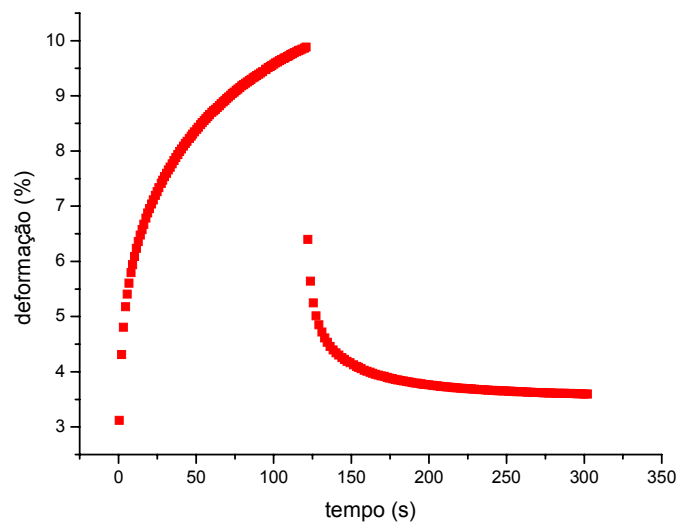


FIGURA 31 – ANÁLISE DA FLUÊNCIA (*CREEP*) E RECUPERAÇÃO PARA A MISTURA (15 mg.ml^{-1}) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. USANDO UMA TENSÃO FIXA DE 3Pa. AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM SENSOR PLACA DE 35 mm, A 25°C

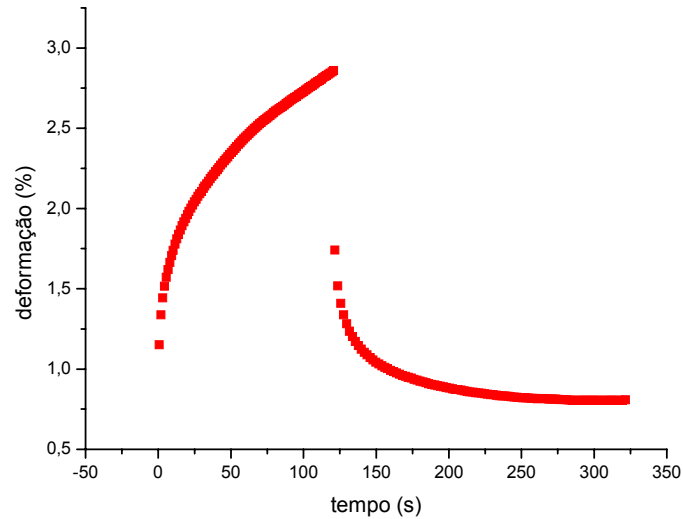
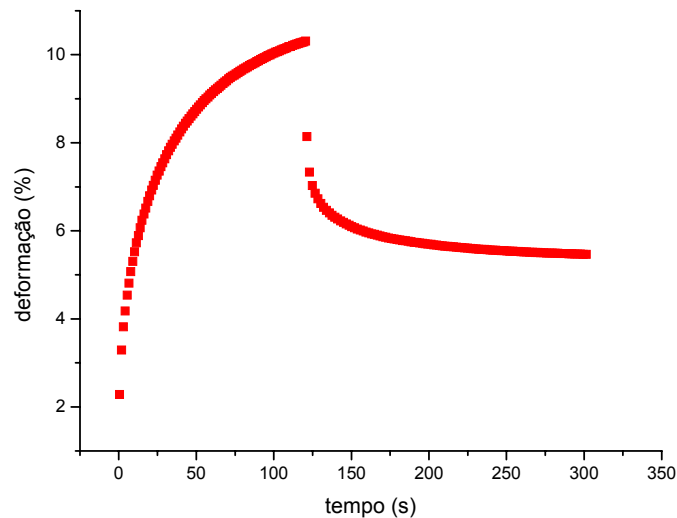


FIGURA 32 – ANÁLISE DA FLUÊNCIA (*CREEP*) E RECUPERAÇÃO PARA A MISTURA (15 mg.ml^{-1}) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. USANDO UMA TENSÃO FIXA DE 3Pa. AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM SENSOR PLACA DE 35 mm, A 25°C



Ao se plotar a resposta de deformação como função do tempo, as curvas das figuras 30-32 mostraram inicialmente um rápido crescimento da deformação seguido por um gradual decréscimo da inclinação até ficar paralela à abscissa. A recuperação é dependente do tempo, para determinar com precisão, teoricamente, seria necessário um tempo infinito. Mas nesses testes práticos, pode-se observar que a recuperação, não total, já acontece em torno de 3 minutos.

O sistema formulado o contendo a GML obteve uma recuperação de 65%; para a GMG houve um valor de 75% e a para a GMA 40%. Portanto, a mistura contendo a goma de alfarroba apresenta um comportamento mais viscoso do que elástico, e a goma-guar é a que apresenta a característica mais elástica, confirmando os resultados de todos os experimentos anteriores das curvas de tensão e frequência.

Complementando as análises reológicas foram efetuados ensaios dentro da região de comportamento viscoelástico linear para as misturas de alginato/galactomanana/íons cálcio, a fim de se avaliar o comportamento reológico das amostras frente às mudanças de temperatura.

FIGURA 33 – CURVA DE TEMPERATURA DA MISTURA (15 mg.ml⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO, COM TENSÃO FIXA DE 3Pa E FREQUÊNCIA DE 1 Hz. AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM SENSOR PLACA DE 35 mm, COM TEMPERATURA VARIANDO DE 20 – 40°C (taxa de 1° min⁻¹)

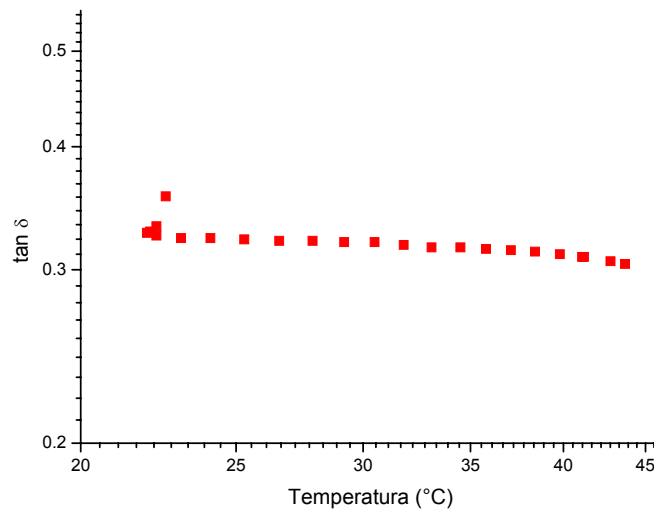


FIGURA 34 – CURVA DE TEMPERATURA DA MISTURA (15 mg.ml⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE GOMA-GUAR (GMG), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO, COM TENSÃO FIXA DE 3Pa E FREQUÊNCIA DE 1 Hz. AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM SENSOR PLACA DE 35 mm, COM TEMPERATURA VARIANDO DE 20 – 40°C (taxa de 1° min⁻¹)

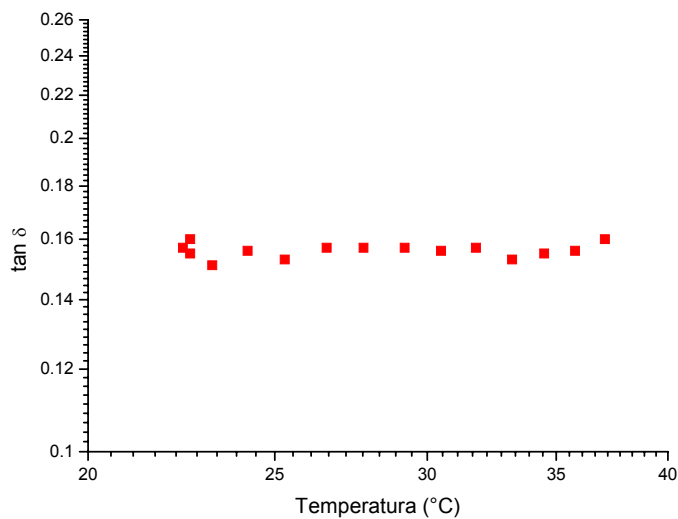
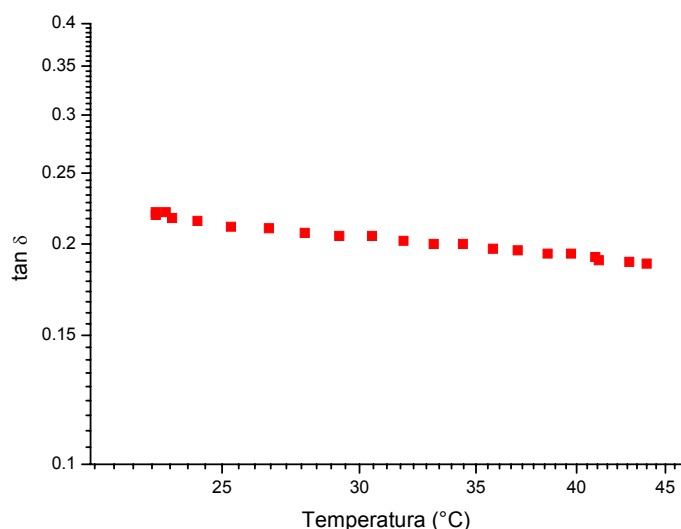


FIGURA 35 – CURVA DE TEMPERATURA DA MISTURA (15 mg.ml^{-1}) ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE ALFARROBA (GMA), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO, COM TENSÃO FIXA DE 3 Pa E FREQUÊNCIA DE 1 Hz . AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM SENSOR PLACA DE 35 mm , COM TEMPERATURA VARIANDO DE $20 - 40^\circ\text{C}$ (taxa de 1° min^{-1})



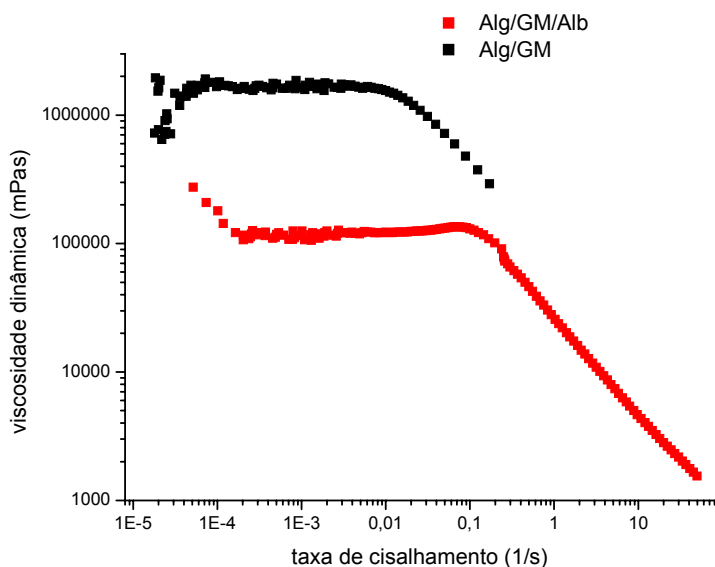
Nos três gráficos das figuras 33-35 se observa que os sistemas, quando submetidos a uma tensão de 3 Pa , frequência de 1 Hz e a variação de temperatura, apresentam comportamento relativamente estável, ou seja não sofrem nenhuma fusão frente a essa variação da temperatura. Apresentam valores de $\tan \delta$ (G''/G') inferiores a $0,4$, variando de $0,15$ a $0,32$, sendo o sistema com a GMG o que apresentou um maior caráter elástico.

Como um dos objetivos do presente trabalho foi o de tentar fazer partículas de AL – GM para encapsulamento de proteínas, ensaios reológicos da mistura de polissacarídeos com a presença de albumina também foram realizados.

Foi escolhida apenas a GML para a continuação das análises, pois há um grande interesse na GM extraída e caracterizada no laboratório de Biopolímeros. E, como foi visto nos resultados anteriores, a GML apresentou resultados tão bons quanto as outras GMs adquiridas comercialmente Inicialmente.

Uma curva de viscosidade foi feita para verificar as características de viscosidades da nova mistura frente às taxas de cisalhamento (fig. 36).

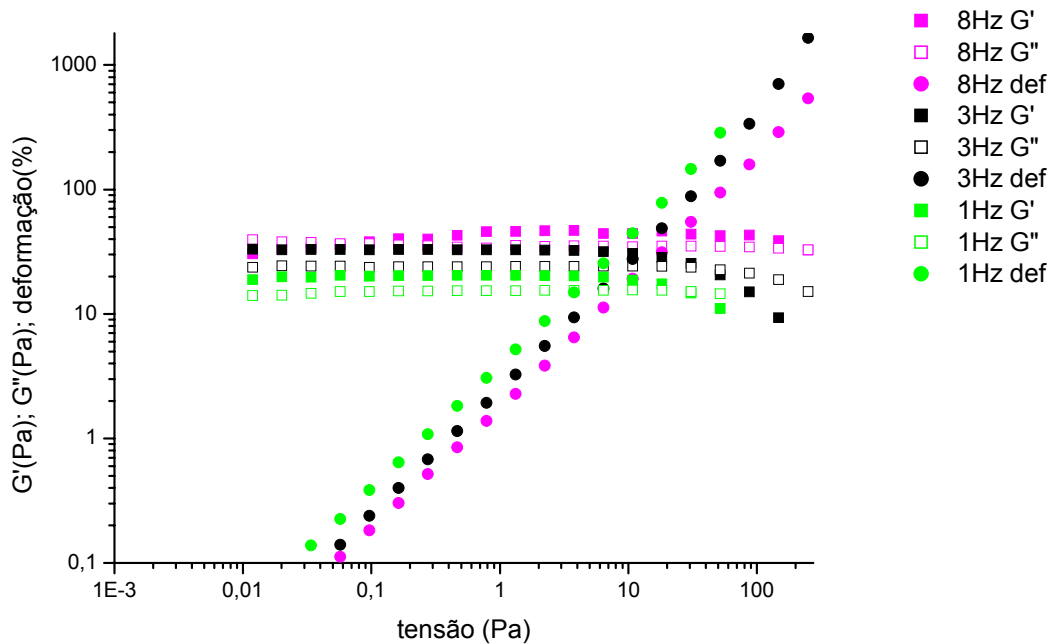
FIGURA 36 – CURVAS DE VISCOSIDADES PARA AS MISTURAS (15 mg.ml⁻¹) MISTURAS DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO 5 mg.ml⁻¹ DE ALBUMINA, EM UMA TAXA DE CISALHAMENTO DE 1. 10⁻⁵ a 1. 10² 1.s⁻¹. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, COM SENSOR PLACA 35 mm, A 25°C



Conforme demonstra a fig. 36 a curva de viscosidade da mistura contendo albumina apresenta menores valores do que a da mistura sem a proteína. A albumina e o ácido algínico apresentam ponto isoelétrico em torno de 5,5 (CARTER; HO, 1994) e 5,0 (CORADIN; LIVAGE, 2003) respectivamente o que lhes conferem uma carga negativa já que o sistema apresenta o pH em torno de 7,4. Portanto, a proteína e o alginato devem estar competindo pelos íons cálcios, vindo daí uma possível explicação para a diminuição da viscoelasticidade desse sistema.

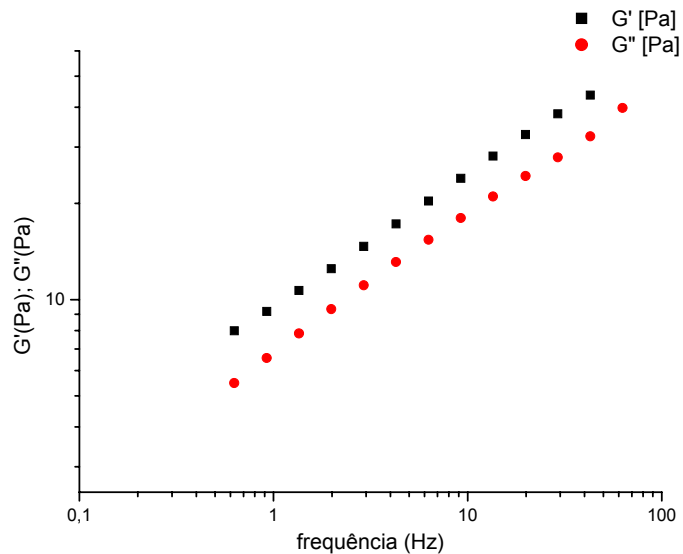
Porém, essa quantidade de proteína não impede que a mistura ainda se mantenha como uma solução viscoelástica, como pode ser visto na figura 37, em que na varredura de tensão com diferentes frequências, o valor de G' é superior ao de G''.

FIGURA 37 – VARREDURA DE TENSÃO PARA AS MISTURAS (15 mg.ml^{-1}) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml^{-1} DE ALBUMINA. FREQUÊNCIAS FIXAS DE 0,1, 1, 3 e 8 Hz, COM TENSÃO VARIANDO DE 0,002-200 Pa. LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS 600, SENSOR PLACA DE 35 mm, A 25°C



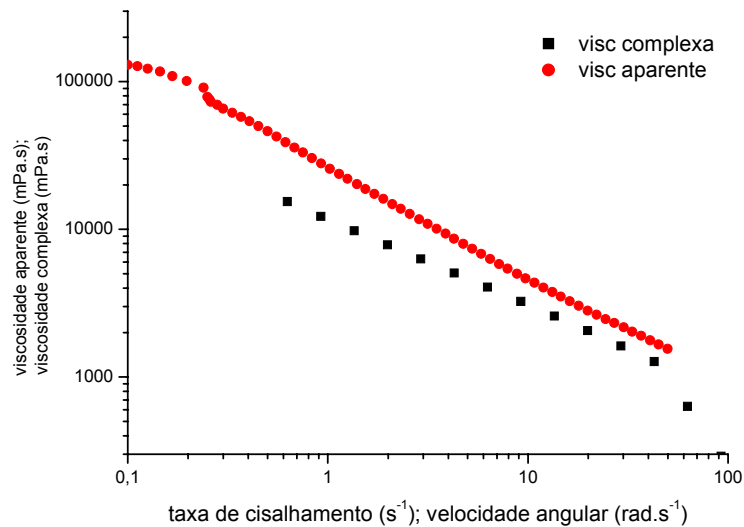
O $\tan \delta$ para a amostra AL – GML contendo albumina, a uma frequência de 1 Hz e tensão de 3 Pa é de 0,76. Esse valor é mais alto do que comparado àquele da mistura de polissacarídeos sem a albumina (0,33), apresentando o aumento do caráter viscoso. Também, na curva de frequência (fig.38) se observou que o módulo elástico foi superior ao do viscoso durante toda a faixa de frequência, porém com uma maior dependência da frequência e com as curvas dos módulos de G' e de G'' mais próximas uma da outra.

FIGURA 38 – CURVAS DE FREQUÊNCIA DA MISTURA (15 mg.ml⁻¹) ALGINATO/ GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L.leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml⁻¹ DE ALBUMINA. TENSÃO FIXA DE 3Pa. (■) G', (●) G". AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM SENSOR PLACA DE 35 mm, A 25°C



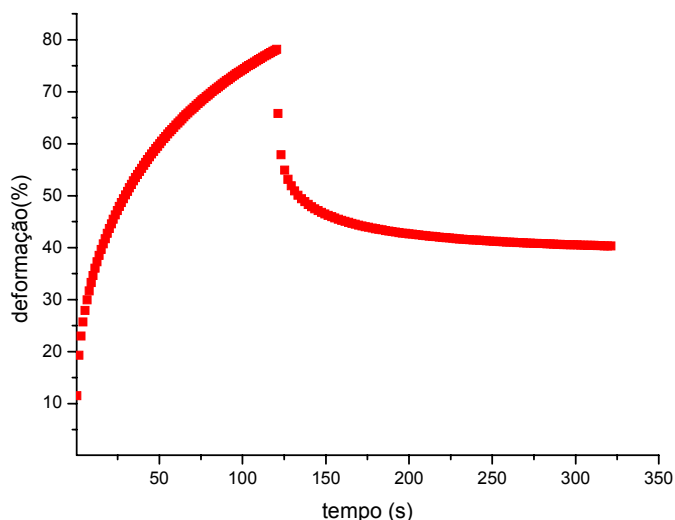
Na análise de Cox – Merz (fig. 39) para a mistura contendo a proteína, observou-se que a curva da viscosidade complexa se apresenta inferior a viscosidade aparente, indicando que para essa amostra há um comportamento de solução viscoelástica. Comportamento esse, diferente daquele em que não há a presença da albumina, já que sem a proteína, há uma típica formação de gel.

FIGURA 39 – GRÁFICO DE COX-MERZ DA MISTURA (15 mg.ml⁻¹) ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA COM 45mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml⁻¹ DE ALBUMINA. (●) VISCOSIDADE APARENTE (η), (■) VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*). TAXA DE CISALHAMENTO VARIANDO 0,1-50 s⁻¹ E FREQUÊNCIA DE 0,1-100 rad.s⁻¹. LEITURAS REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM PLACA PARALELA DE 35 mm, A 25°C



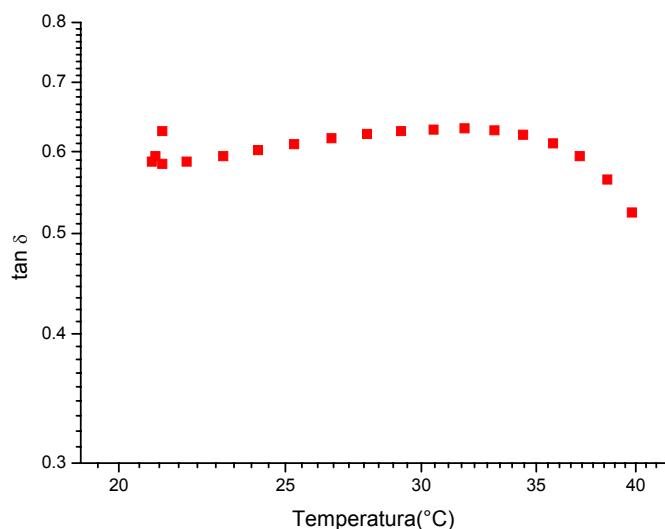
Na análise da curva de *creep* e recuperação para a mistura contendo albumina, observou-se que a amostra apresentou um caráter viscoso maior do que o elástico. Essa característica elástica é ainda menor quando comparada com a mistura sem a albumina já que a recuperação após a suspensão da tensão apresentou um valor em torno de 45% (fig. 40).

FIGURA 40 – ANÁLISE DA FLUÊNCIA (*CREEP*) E RECUPERAÇÃO PARA A MISTURA (15 mg.ml⁻¹) ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), EM SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 45 mMOL DE ÍONS CÁLCIO E 5 mg.ml⁻¹ DE ALBUMINA. USANDO UMA TENSÃO FIXA DE 3Pa. AS LEITURAS FORAM REALIZADAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600 COM SENSOR PLACA DE 35 mm, A 25°C



O comportamento da mistura contendo a albumina frente à variação de temperatura pode ser visto na figura 41. A relação entre G''/G' ($\tan \delta$) no início é constante, mas, à partir de 35°C os valores diminuem, indicando que a presença de albumina melhora o processo da sinergia, com interferência possivelmente da mudança de conformação desse biopolímero, para a formação de um melhor sistema viscoelástico.

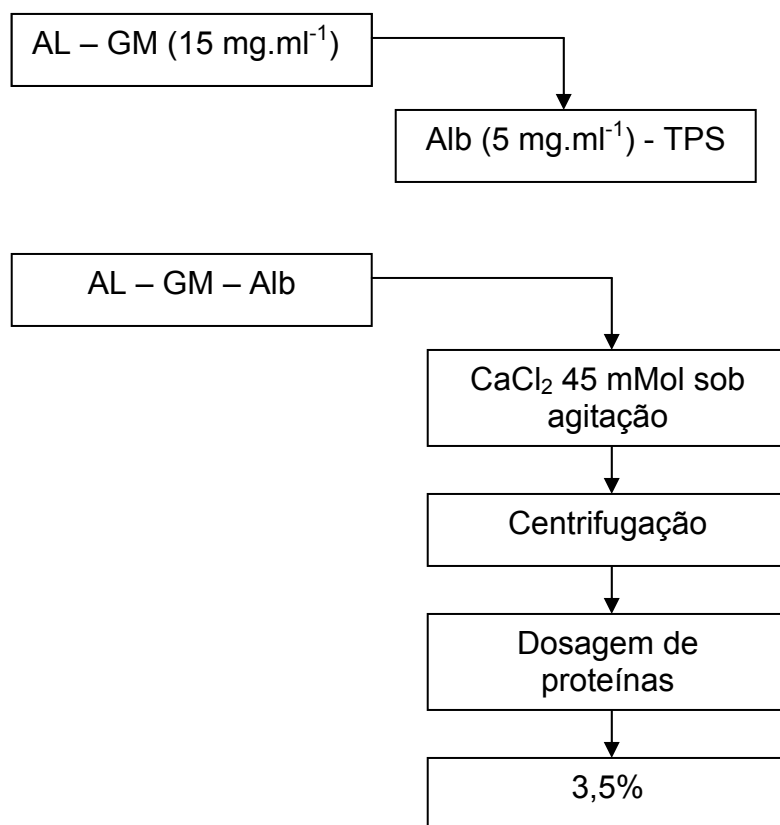
FIGURA 41 – CURVA DE TEMPERATURA DA MISTURA ($15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ALGINATO/ GALACTOAMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* EM SOLUÇÃO AQUOSA CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DE ALBUMINA. TENSÃO FIXA DE 3 Pa E FREQUÊNCIA DE 1 Hz . LEITURAS FEITAS EM REÔMETRO RHEOSTRESS RS600, COM SENSOR PLACA DE 35 mm , COM TEMPERATURA VARIANDO DE $20 - 40^\circ\text{C}$



4.4. PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS

As partículas foram preparadas conforme demonstra o fluxograma da fig.42, com o qual obteve-se uma solução final de cloreto de cálcio contendo as partículas dos polissacarídeos e albumina, que não eram visíveis macroscopicamente.

FIGURA 42 – FLUXOGRAMA DA PREPARAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE AL (7,5 mg.ml⁻¹) – GML (7,5 mg.ml⁻¹) – ALB (5 mg.ml⁻¹) – IONS CÁLCIO (45 mMol).



4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

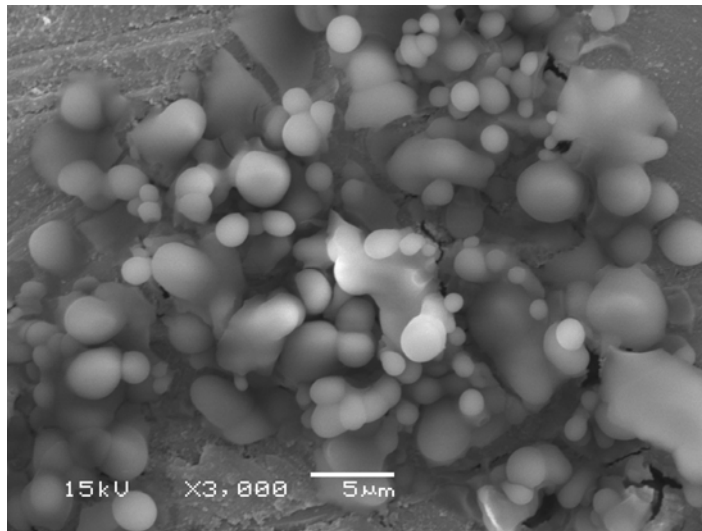
Partículas de alginato e galactomanana contendo albumina foram feitas. Novamente, escolheu-se apenas a GML para continuar os estudos de encapsulamento da proteína, já que essa galactomanana é extraída e muito estudada próprio laboratório de Biopolímeros da UFPR.

As partículas foram feitas ao se borrifar a solução de polissacarídeos em uma concentração de 15 mg.ml⁻¹, numa proporção de 50% de GML e 50% de AL contendo 5 mg.ml⁻¹ de albumina, em uma solução de cloreto de cálcio sob agitação. As partículas formadas não foram visíveis macroscopicamente. Sabe-se

da formação delas porque a solução de cloreto de cálcio deixou de ser límpida para se tornar turva com a presença das mesmas, como típica resposta da presença de um sistema coloidal.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para verificar como seria a superfície dessas partículas formadas (figs. 43 e 44).

FIGURA 43 – PARTÍCULAS DA MISTURA (15mg.ml⁻¹) ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. IMAGEM REALIZADA PELO MICRÓSCOPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL, COM AUMENTO DE 3.000 x.

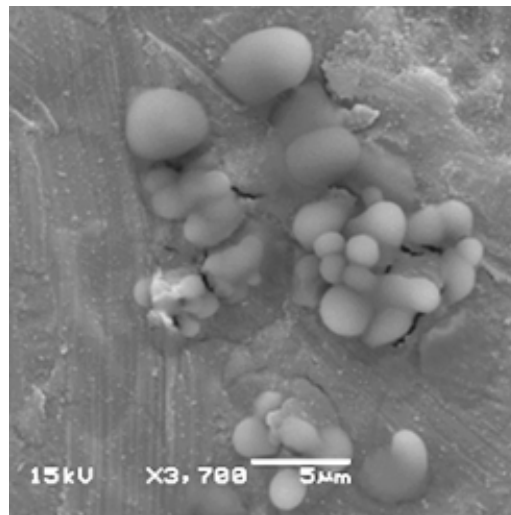


As partículas formadas apresentam uma forma esférica, lisas, tamanhos variando de escala de micra a alguns nanômetros.

A MEV também foi usada para se avaliar a morfologia das partículas contendo a albumina adsorvida (fig. 44). O aspecto visual é muito similar ao da amostra sem a proteína: esférico, liso e também em escala de micro a nanômetros. Portanto, a presença da albumina nas partículas não alterou as características da aparência do sistema.

Apenas com a MEV não é possível verificar se há um encapsulamento da proteína pois tanto as partículas sem a albumina como as que a contêm, não apresentam nenhuma alteração em suas morfologias.

FIGURA 44 – PARTÍCULAS DA MISTURA ($15\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), COM 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E $5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DE ALBUMINA. IMAGEM REALIZADA PELO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA JEOL, COM AUMENTO DE 3.700 x .



4.6 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Verificando-se pelos estudos acima a capacidade de interação da albumina com o sistema AL – GML – íons cálcio tentou-se avaliar por microscopia de força atômica o aprisionamento da proteína com o intuito de, futuramente, avaliar o encapsulamento para uma possível liberação controlada.

A microscopia de força atômica tem sido utilizada no estudo de polímeros (HODGES, 2002), devido a sua capacidade de fornecer informações que não se tinham com o uso da microscopia eletrônica de varredura. Por conseguir obter imagens de superfície de materiais sob as mais variadas condições (ar, vácuo e em meio líquido) se tornou um dos equipamentos mais completos para estudo de materiais em micro e nano escalas (BERNARDES; MATTOSO, 2003).

Um AFM é composto basicamente por uma ponta ou sonda, que varre a superfície da amostra em estudo. Mede-se a força de interação entre os átomos

da ponta e os da superfície e, utilizando recursos computacionais, os resultados são transformados em imagens da amostra. Investigar a superfície de uma amostra resulta no conhecimento de propriedades chamadas tribológicas como rugosidade, dureza, rigidez, elasticidade e atrito.

Fixadas e caracterizadas por análises reológicas as amostras partiu-se então para a formação das partículas a partir de misturas de AL ($7,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) – GML ($7,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) – íons cálcio (45 mMol) – Alb (5 mg.ml^{-1}), as quais uma vez obtidas não foram visíveis macroscopicamente. Sabe-se da formação dessas porque a solução de cloreto de cálcio deixou de ser límpida para se tornar turva, como uma típica resposta de sistema coloidal.

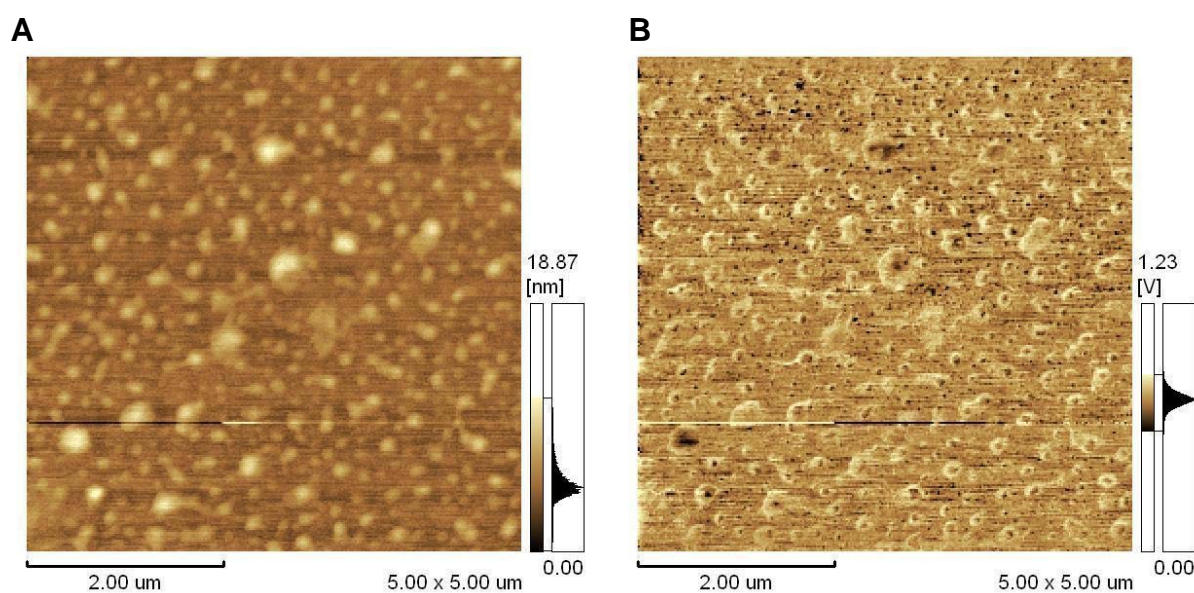
As micrografias em modo de fase e de topografia da mistura AL – GML – íons cálcio podem ser visualizadas na figura 45, na qual se observa a formação das partículas de tamanho micrométrico. Já a figura 46 mostra micrografias da mistura AL – GML – íons cálcio – Alb. A micrografia de topografia mostra a superfície da amostra, já o modo de fase, o AFM pode demonstrar diferentes materiais que constituem a amostra, sem que haja diferença na topografia. Isso é feito porque na topografia em fase a dureza do material ocasionará alteração na fase de detecção do cantilever que vibra durante a varredura da amostra (BERNARDES; MATTOSO, 2003).

Fixadas e caracterizadas por análises reológicas as amostras partiu-se então para a formação das partículas a partir de misturas de AL ($7,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) – GML ($7,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) – íons cálcio (45 mMol) – Alb (5 mg.ml^{-1}), as quais uma vez obtidas não foram visíveis macroscopicamente. Sabe-se da formação dessas porque a solução de cloreto de cálcio deixou de ser límpida para se tornar turva, como uma típica resposta de sistema coloidal.

As micrografias em modo de fase e de topografia da mistura AL – GML – íons cálcio podem ser visualizadas na figura 45, na qual se observa a formação das partículas de tamanho micrométrico. Já a figura 46 mostra micrografias da mistura AL – GML – íons cálcio – Alb. A micrografia de topografia mostra a superfície da amostra, já o modo de fase, o AFM pode demonstrar diferentes materiais que constituem a amostra, sem que haja diferença na topografia. Isso é

feito porque na topografia em fase a dureza do material ocasionará alteração na fase de detecção do cantilever que vibra durante a varredura da amostra (BERNARDES; MATTOSO, 2003).

FIGURA 45 – IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MODO DINÂMICO (*TAPPING MODE*) DA MISTURA ($15\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. A – IMAGEM EM MODO DE TOPOGRAFIA. B – IMAGEM EM MODO DE FASE. IMAGENS FEITAS EM MICROSCÓPIO SHIMADZU, A 25°C



Da análise comparativa, verifica-se que a principal diferença entre o sistema sem a proteína daquele que a contém é, principalmente, o tamanho das esferas formadas.

Os diâmetros das partículas estão demonstrados nas fig. 47 e 48. Para o sistema AL/GML/íons cálcio a distribuição dos tamanhos ocorre entre os valores $9,34 - 701\text{ nm}$, apresentando um valor médio de $58,4\text{ nm}$, enquanto que para o sistema que contém a proteína, a variação é $28 - 2028\text{ nm}$, com uma média de 518 nm . O sistema com albumina apresenta esferas de tamanho maiores, provavelmente, porque a proteína deve estar adsorvida nas esferas. Também

porque o grau de hidratação desse sistema deva ser maior em função da competição na complexação do alginato/albumina com os íons ali presentes.

FIGURA 46 – IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MODO DINÂMICO (*TAPPING MODE*) DA MISTURA ($15\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML), COM $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DE ALBUMINA E CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO. A – IMAGEM EM MODO DE TOPOGRAFIA. B – IMAGEM EM MODO DE FASE. IMAGENS FEITAS EM MICROSCÓPIO SHIMADZSU, A 25°C

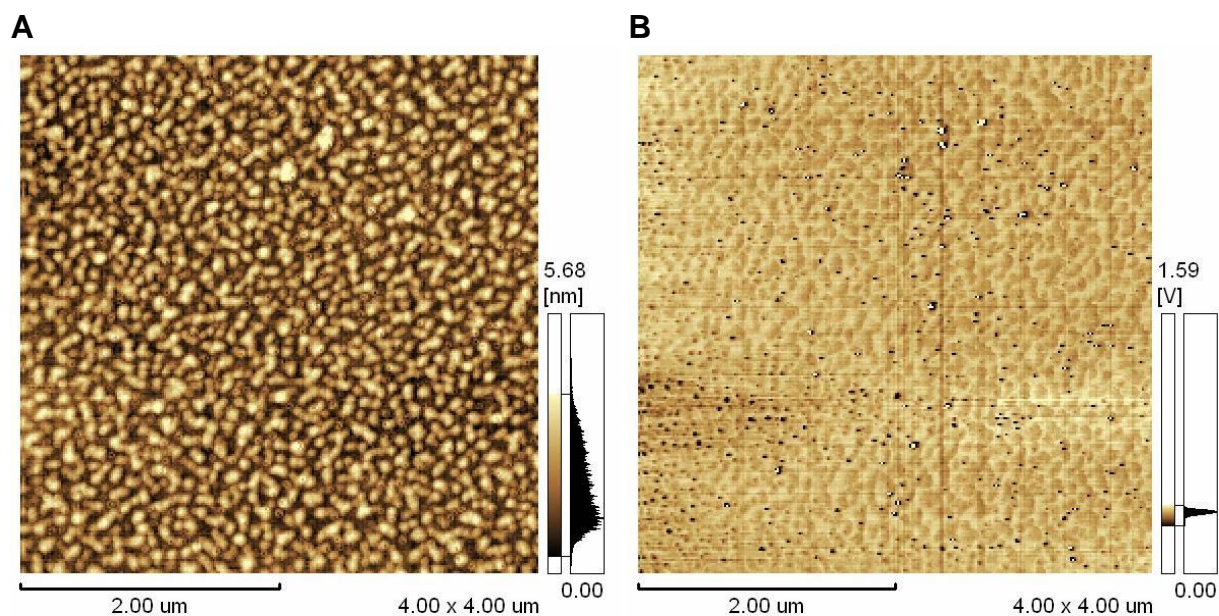


FIGURA 47 – HISTOGRAMA DA MISTURA DE ALGINATO/GALACTOMANANA ($15\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML) CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO ANALISADO PELO PROGRAMA SCANNING PROBE IMAGE PROCESSOR

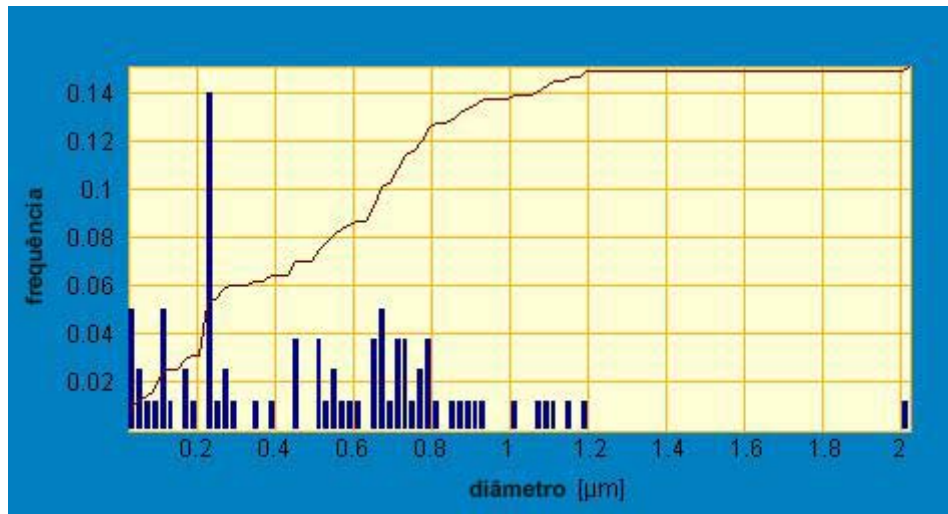


FIGURA 48 – HISTOGRAMA DA MISTURA DE ALGINATO/GALACTOMANANA ($15\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML) CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DE ALBUMINA ANALISADO PELO PROGRAMA SCANNING PROBE IMAGE PROCESSOR

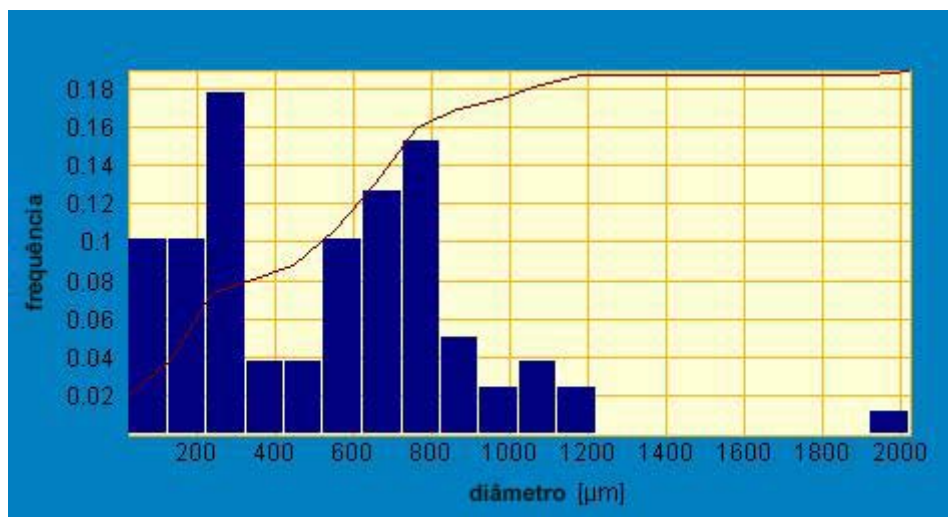
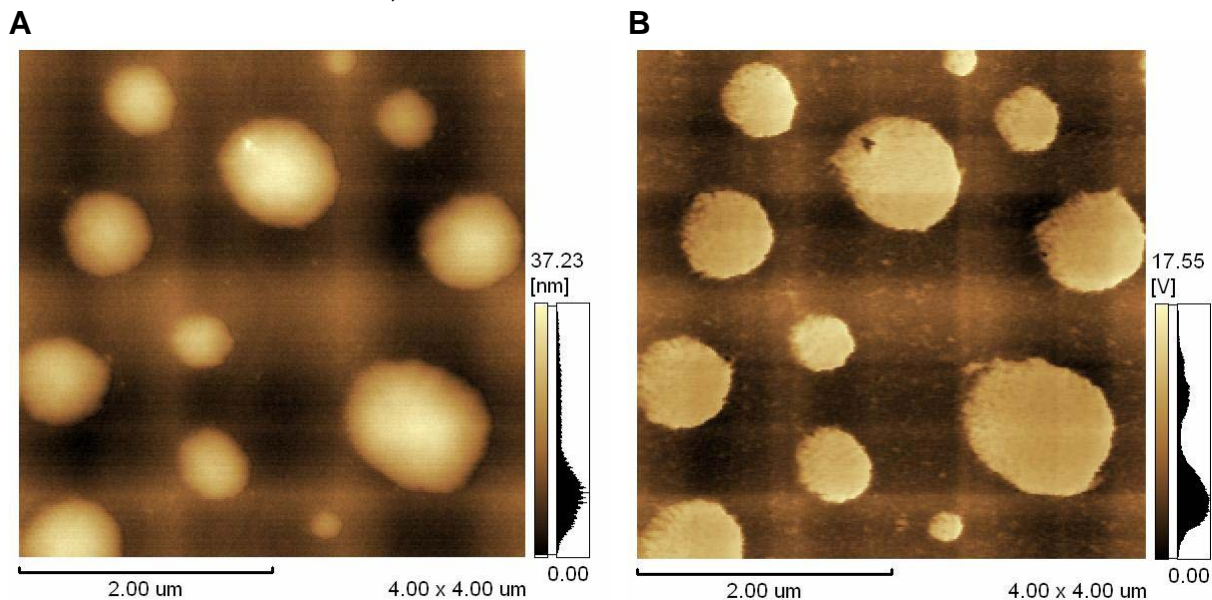


FIGURA 49 – IMAGEM POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA EM MODO DINÂMICO (*TAPPING MODE*) DA MISTURA ($15\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) DE ALGINATO/GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *L. leucocephala* (GML) CONTENDO 45 mMol DE ÍONS CÁLCIO E $5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DE ALBUMINA. A – IMAGEM EM MODO DE TOPOGRAFIA. B – IMAGEM EM MODO DE FASE. IMAGEM FEITA EM MICROSCÓPIO SHIMADZSU, A 25°C



Uma visualização da formação da camada superficial pode se vista na figura 49. Nessa imagem foi escolhido um campo em que apareciam partículas de tamanhos maiores e com uma disposição mais dispersa a fim de se poder ver mais detalhadamente a superfície das esferas. Na imagem de modo em fase (B) pode se ver perfeitamente certa rugosidade da esfera. Essa irregularidade é a presença dos polissacarídeos que estão formando a partícula. A albumina não pode ser visualizada nas figuras, mas sabe-se da presença da proteína no interior das partículas porque as esferas adquirem um tamanho maior de quando comparadas às esferas sem a presença de albumina.

4.7 DOSAGEM DE PROTEÍNAS DA SOLUÇÃO CONTENDO AS PARTÍCULAS

Como pode ser visto por AFM a presença de albumina nas partículas de polissacarídeos e íons cálcio, foi necessário dosar quanto dessa proteína não se ligou à mistura. Para isso, fez-se uma dosagem de proteínas na solução contendo as partículas e a albumina livre.

Um valor de 3% de proteínas não encapsuladas foi obtido. Isso quer dizer que 97% da proteína se ligou a mistura de polissacarídeos.

5. CONCLUSÕES

Análises químicas e físico-químicas da GM extraída de sementes de *Leucaena leucocephala* (GML) confirmaram a presença de um biopolímero homogêneo, porém polidisperso com uma razão molar Man:Gal de 1,7: 1, 8% de proteínas e uma massa molar de aproximadamente $700.000 \text{ g.mol}^{-1}$.

Na análise das curvas de viscosidade concluiu-se que, em misturas a 15 mg.mL^{-1} , a melhor interação do sistema GM-AL continha 50% de substituição de AL e 45 mMol de íons Ca^{2+} .

Entre as três GM utilizadas nas misturas todas geraram produto com comportamento viscoelástico, porém a que mostrou melhor sinergia para a formação de gel foi desenvolvida no sistema em que a goma-guar foi utilizada, tanto no modelo de Cox-Merz como nos ensaios de *creep*, em experimentos a 25°C .

O comportamento viscoelástico de todos os sistemas permaneceu estável mesmo com aquecimento no intervalo de $20\text{-}40^\circ\text{C}$, a uma taxa de aquecimento de 1°C.min^{-1} .

O sistema de polissacarídeos/íons cálcio/proteína formulado em presença de GM de leucena analisado por reologia confirmou o encapsulamento da proteína, porém, com uma formulação que apresenta uma maior dependência da frequência o que indica diminuição do caráter viscoelástico, que é alterado após a temperatura atingir 35°C , possivelmente, pela mudança conformacional do sistema em presença da proteína.

Através das microscopias eletrônica de varredura e de força atômica foi possível observar o tamanho e a morfologia das cápsulas formadas utilizando o atomizador de um equipamento de *spray* cuja escala das partículas desenvolvidas está na grandeza micro e nanométrica e, também, confirmar o encapsulamento da proteína.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A GML, extraída de sementes de *Leucaena leucocephala*, e a GMG, adquirida comercialmente, misturadas ao sistema alginato/íons cálcio, apresentaram um bom resultado na obtenção de sistemas viscoelásticos e no encapsulamento da proteína. Assim, o processo de encapsulamento deverá ser melhor estudado quanto a:

- estabilidade ou não ao pH e a temperatura;
- interferência da parte protéica ligada a GML quanto à interação com a albumina;
- interferência da concentração de íons cálcio para o melhor encapsulamento da proteína e menor tamanho das partículas;
- medidas de ângulo de contato dos sistemas para se avaliar a capacidade de formação de filmes finos;
- adsorção de outras drogas;
- microcalorimetria (DSC) que poderá servir para avaliar possíveis mudanças de conformação;

Além disso, também será interessante e necessário testar a liberação controlada dessa proteína em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N.N.; AMINABHAVI, T.M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 100, p. 5-28, 2004.

AGP. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders e families of flowering plants: AGP II. **Bot. J. of the Linn Soc.**, Londres, v. 141, p. 399-436, 2003.

AMARAL, J. **Estudo reológico da galactomanana de sementes de *Cassia fastuosa***. Curitiba, 1998. 123 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology**. Amsterdam: Elsevier, 1989, p. 4-6.

BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L.H.C. Estudo de polímeros por força atômica. **Comunicado Técnico**. Embrapa : São Carlos, p. 1-4, 2003.

BERRIAUD, N.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Rheological study on mixtures of different molecular wheight hyaluroates. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v.1, n.3, p.137-142, 1994.

BLAINE, M.G. Experimental observations on absorbable alginate products in surgery. **Ann. Surg**, Philadelphia, v.125, p. 102–114, 1947.

BOT, A.; SMORENBURG, H.E.; VREEKER, R.; PÂQUES, M.; CLARK, A.H. Melting behaviour of schizophyllan extracelular polysaccharide gels in the temperature range between 5 and 20°C. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 45, p. 363-372, 2001.

BRESOLIN, T.M.B.; SANDER, P.C.; REICHER, F.; SIERAKOSKI, M-R; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Viscosimetric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydr. Polym.**, Barking. v. 33, p.131-138, 1997.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.; MALUF, A.M. Galactomanana de sementes de diferentes populações de *Leucaena leucocephala*. **Rev. Bras. Bot**, São Paulo, v.19, p. 25-27, 1987.

CARTER, D.C.; HO, J.X. **Advances in Protein Chemistry**. Academic Press : Huntsville, Alabama, v. 45, 1994.

CEPEN. **Lista de árvores nativas do Brasil**. Disponível em: <http://www.cepen.com.br/arvore_nat_list>. Acesso em: 02 jan. 2007.

CHAPMAN, V.J.; CHAPAMAN, D.J. **Seaweeds and Their Uses**, Chapman and Hall. Amsterdam : Elsevier, New York, 1980, Capítulo 6.

COHEN, S.; LOBEL, E.; TREVGODA A.; PELED, Y. A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 44 , p. 201–208, 1997.

CORADIN, T.; LIVAGE, J. Synthesis of alginate/silica biocomposites. **J. Sol-Gel Sci. Tech.**, Netherlands, v. 26, p. 1165-1168, 2003.

COX, W.P.; MERZ, E.H. Correlation of dynamic and steady-flow viscosities. **J. Polym. Sci.**, New York, v. 28, p. 619, 1958.

DEA, I.C.M.; MORRINSON, A. Chemistry and interactions on seed galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, New York, v. 31, p. 241-312, 1975.

DEY, P.M. Biochemistry of plant galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, New York, v. 35, p. 341-376, 1978.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-356, 1956.

EISELT, P.; YEH, J.; LATTALA, R.K.; SHEA, L.D.; MOONEY, D.J. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. **Biomaterials**, Surrey, v. 21, p. 1921-1927, 2000.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydr. Polym.** Barking, v. 8, p. 161–182, 1988.

GANTER, J.L.M.S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C.L.O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromol**, Guildford, v. 17, p. 13-19, 1995.

GANTER, J.L.M.S.; ZAWADZKI-BAGGIO, S.F.; LEITNER, S.C.S.; SIERAKOWSKI, M-R; REICHER, F. Structural studies on galactomannan from Brazilian seeds. **Carbohydr. Chem.**, London, v. 12, p. 753-767, 1993.

GERMANO, S. **Heparinóides produzidos por modificação química em galactomananas de sementes de *Cassia fastuosa* Willd e *Mimosa scabrella* Bethan**. Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GLICKSMAN, M. Tara gums. In: GLICKSMAN, M. (Ed). **Food Hydrocol**, Oxford, v.3, p. 185-189, 1986.

GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, San Diego, v. 31, p. 267- 285, 1998.

HAN, X.-Z.; CAMPANELLA, O.H.; GUAN, H.; KEELING, P.L.; HAMAKER, B.R. Influence of maize starch granule-associated protein on rheological properties of starch pastes. Part II. Dynamic measurements of viscoelastic properties of starch pastes. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 49, p. 323-330, 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein. A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v.48, p. 422-427, 1972.

HEAR ORG. Disponível em: www.hear.org/pier/imagepages/songles/leleu47.htm. Acesso em 17 de fevereiro de 2006.

HERALD, C. J. Guar gums. In: GLICKSMAN, M. **Food Hydrocol**. Oxford, v.3, p. 172-183, 1986.

HODGES, C.S. Measuring forces with the AFM: polymeric surfaces in liquids. **Adv. In Col. And Int. Sci.**, Amsterdam, v. 99, p. 13-75, 2002.

IAGHER, F.; REICHER, F.; GANTER, J.L.M.S. Structural and rheological properties of polysaccharides from mango (*Mangifera indica* L.) pulp. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 31, p. 9-17, 2002.

KENNEDY, J., GRITHS, A, ATKINS, D. The application of hydrocolloids: recent developments, future trends. **Proc. Int. Conf. Gums Stab. Food Ind. Appl. Hydrocolloidy**, p. 417-55, 1984.

LEONARD, M.; RASTELLO DE BOISSESON, M.; HUBERT, P.; DALENÇON, F.; DELLACHERIE, E. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. **J. Control. Release**, Amsterdam, v.98, p. 395-405, 2004.

LIEW, C. V., CHAN, L. W., CHING, L. A., HENG, P. W. S., Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 309, p. 25-37, 2006.

LIMA, M.M.S.; ONO, L.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. Natural and sulphated polysaccharides from *Caesalpiniaaceae* seeds. **Latin Am. Appl. Res.**, Bahia Blanca, v. 26, p. 1-3, 1996.

LUCYSZYN, N.; HOMMA, M.M.; QUORIN, M.; SIERAKOWSKI, M-R. Blend agar/galactomannan – gelled medium in shoot proliferation of the pear. In: XXXIII

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 13., 2004, Caxambu. Programa e Resumos. Caxambu, 2004. CD-ROM.

LUCYSZYN, N.; QUORIN, M.; KOEHLER, H. S.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation **Scien. Horticult.** Amsterdam, v 4, p. 358-364, 2006a.

LUCYSZYN, N.; QUORIN, M.; RIBAS, L. F.; KOEHLER, H. S.; REICHER, F., SIERAKOWSKI, M-R. Micropropagation of *Durondeau* pear in modified – gelled medium. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plan.** Columbia, v. 42, p. 287-290. 2006b.

LUCYSZYN, N.; QUORIN, M.; HOMMA, M.M.; SIERAKOWSKI, M-R. Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. **Biol. Plantarium.** Praha, v. 51, p. 173-176, 2007.

MACGREGOR, E.A.; GREENWOOD, C.T.; **Polymers in Nature In Polysaccharides.** Wiley: New York. 1980, p. 240–329.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C. MAQNUNSON, K.; WHISTLER, R.L. Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. In : WHISTLER, R. L. BEMILLER, J. N. **Ind. Gums Polysacch. and their Deriv.** 3 ed. New York: Academic Press. 1993, p. 215-218.

McCLEARY, B.V.; AMADO, R.; WAILEL, R. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 92, p. 269-285, 1981.

McLACHLAN, J., Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization. **Plant Soil Sci.**, Scandinavica, v.89, p. 137–57, 1985.

MERCÊ, A. L.R.; LOMBARDI, S.C.; MANGRICH, A.S.; REICHER, F.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M-R. Equilibrium studies of galactomannan of *Cássia fastuosa* and *Leucaena leucocephala* and Cu^{2+} using potentiometry and EPR spectroscopy. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 35, p. 13-20, 1998.

MILLAS, M.; RINAUDO, M. **Polieletrólitos.** Instituto de Física e Química de São Paulo – USP, São Carlos, p. 83, 1991.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Importação. Disponível em: <[http://www. aliceweb.desenvolvimento.gov.br](http://www.aliceweb.desenvolvimento.gov.br)> Acesso em 02 jan. 2007.

MÍTZI, B. **Árvores nativas exóticas do estado de Minas Gerais.** Belo Horizonte: EPAMIG. 528 p, 2002.

MORRIS, E.R. Mixed polymer gels. In: Harris, P. **Food Gels.** London : Elsevier Applied Science. p. 291-359, 1990.

MORRIS, E. R.; CULLER, A. N.; ROSS-MURPHY, S.B.; REES, D. A. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random oil polysaccharide solution. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v.1; p.5-21, 1981.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Leucaena – promising forage and tree crop for the tropics**. Washington: National Academy of Sciences. 1977, 115 p.

NAVARRO, R.F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul, 1997, p. 9-11, 141-144.

NEISER, S.; DRAGET, K.I.; SMIDSDORT, O. Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems. **Food Hydrocol.**, Oxford, v.13, p. 445-458, 1999.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I.M.; COIMBRA, T.L.M.; GORIN, P.A.J.; SIERAKOWSKI, M-R. *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus. (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Res.**, Amsterdam, v.60, p. 201-208, 2003.

OUWERX, C.; VELINGS, N.; MESTDAGH, M.M.; AXELOS, M.A.V. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. **Pol. Gel and Networks**, Amsterdam, v. 6, p. 393-408, 1988.

PAN, Y.; LI, Y.; ZHAO, H.; ZHENG, J.; XU, H.; WEI, G.; HAO, J.; CUI, F. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 249, p. 139-147, 2002.

PEPPAS, N.A.; BURI, P.A. Surface, interfacial and molecular aspects of polymers bioadhesion on soft tissues. **J. Control. Release**, Amsterdam, v. 2, p. 257-275, 1985.

PETKOWICZ, C.L.O.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M-R; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds of *Caesalpinaceae*. **Phytochem.**, New York, v 49, p. 737-743, 1998.

PIRES, L.; GORIN. P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M-R. An active heparinoid obtained by sulphatation of a galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydr. Pol.**, Barking, v. 46, p. 165-169, 2001.

RAO, M.A. Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid foods. In: RAO, M.A.; STEFFE, J.F. **Viscoelastic properties of foods.**, New York : Elsevier Applied Science, 1992. p. 207-231.

REES, D.A.; Polysaccharide shapes and their interactions—some recent advances. **Pure Appl. Chem.**, Oxford, v.53, p. 1–14, 1981.

REID, G.J.S. Galactomannans. In: DEY, P.M.; DIXON, R.A. **Biochem. of Stor. Carbohydr.**, London: Academic Press. p. 265-286, 1985.

ROBERTS, S.A.; CAMERON, R.E. The effects of concentration and sodium hydroxide on the rheological properties of potato starch gelatinisation. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v.50, p. 133-143, 2002.

ROSS– MURPHY. S.B., MORRIS, V.J., MORRIS, E.R. Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. **Faraday Symp. Chem. Soc.**, London, v.18, p.115, 1983.

SÁ, J.P.G. **Leucena – Resultados da Pesquisa do Norte do Paraná**, Londrina: IAPAR – Informe de Pesquisa. n. 22, 32 p, 1997.

SAEMAN, J.F.; MOORE, W.E.; MITCHELL, R.L.; MILLETT, M.A. Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. **TAPPI.**, Atlanta, v. 37, n. 8, p. 336-343, 1954.

SAKAI, S.; HASHIMOTO, I.; KAWAKAMI, K. Development of alginate-agarose subsieve-size capsules for subsequent modification with a polyelectrolyte complex membrane. **Bioch. Engineering J.**, Amsterdam, v. 30, p. 76-81, 2006.

SARMENTO, B.; FERREIRA, D.; VEIGA, F.; RIBEIRO, A. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pré-gelation through DSC and FTIR studies. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v.66, p. 1-7, 2006

SAWADEKER, J.S.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. **Anal. Chem.**, Washington, v. 37, p. 1602-1604, 1965.

SCHOTT, H. **Reologia**. In: **GENARO, A. R.** Remingtons: **Farmacia. Buenos Aires: Ed. Med.Panamericana. p. 461-481, 1992**

SCHILLING, C. H.; LI, C.; TOMASIK, P.; KIM, J-C. The rheology of alumina suspensions: influence of polysaccharides. **J. Eur. Ceram. Soc.**, Oxford, v. 22, p. 923-931, 2002.

SHILPA, A., AGRAWAL, S.S., RAY, A.R., Controlled delivery of drugs from alginate matrix, **J. Macromol. Sci. Polym. Rev.**, v.43, p. 187–221, 2003.

SHOBHA, M.S., VISHU KUMAR, A.B, THARANATHAN, R.N., KOKA, R., GAONKAR, A.K., Modification of guar galactomannan the aid of *Aspergillus niger* pectinase . **Carbohydr. Polym.**, Barking, v 62.. p.267-273, 2005.

SCRHAMM, G. **Reologia e Reometria**. Fundamentos Teóricos e Práticos. São Paulo : Artliber. 2006.

SHELTON, H.M.; BREWBAKER, J.L. *Leucaena leucocephala* – the most widely used forage tree legume. In: GUTTERIGE, R.C.; SHELTON, H.M. **Forage tree legumes in tropical agriculture**. Austrália: CAB International. p. 16-29, 1994.

SIERAKOWSKI, M-R.; MILAS, M.; DESBRIÉRES, J.; RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydr. Pol.**, Barking, v. 42, p. 51-57, 2000.

SILVA, C.M.; RIBEIRO, A.J.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v. 29, p. 148-159, 2006.

SINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH of culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 11, p. 209-220, 1987.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M. P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions. **Carbohydr. Polym.**, Barking. v. 59, p. 339-350, 2005.

SMIDSDOD, O.; SKJÅOK-Br, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotech.**, Amsterdam, v. 8, p.71-78, 1990.

SORVARI, S.; TOLDI, O.; AHANEN, K.; VIINAMAKI, T. HAKONEM,T.; TAHVONEN, R. Using polysaccharides and galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, Alexandria, v. 122. n. 6, p. 878-883, 1997.

STOCKWELL, A. F.; WALKER, S.E. In vitro evaluation of alginate gel systems as sustained release drug delivery systems. **J. Control. Release**, Amsterdam, v 3, p. 167–175, 1986.

TIZIANI, S.; VODOVOTZ, Y. Rheological effects of soy protein addition to tomato juice. **Food Hydrocol.**, Oxford, v. 19, p.45-52, 2005. _

TROPICAL SEEDS. **Tropical Seeds Fruit List**. Disponível em <http://www.tradewindsfruit.com/order_fruit_f_o.htm>. Acesso em 20 dez. 2006.

VARGAS-RECHIA, C.G.; SIERAKOWSKI, M-R.; GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Polysaccharides from seeds of *Senna multijugal*. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford. v. 17, p. 409-413, 1995

VIEBKE, C.; PICULELL,L. Adsorption of galactomannans onto agarose. **Carbohydr. Polym.**, Barking, v. 29, n.1, p. 1-5,1992.

WALTER, R.H. **Polysaccharide Dispersions**: Chemistry and Technology in Food. San Diego : Academic Press, 1998.

WHISTLER, R. L. Solubility of Polysaccharides and their behaviour in solution. In: **Carbohydrates in Solution**. ACS Advances in Chemistry Series, 117, 1973. p. 242

WORANOWICZ, S.M.; GORIN, P.A.J.; MARCELLI, M.P.; TORRIS, G.; IACOMINI, M. Structural studies on the galactomannans of lichens of the genus *Cladonia*. **The Lichenologist**, London, v. 29, p. 471-481, 1997.

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

YALPANI, M. Polysaccharides : synthesis, modifications and structure / properties relations. **Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 1-7.**

ZHAN, D. F.; RIDOUT, M.J.; BROWNSEY, G.J.; MORRIS, V.J. Xanthan – locust bean interactions and gelation. **Carbohydr. Pol.**, Barking. v. 21, p. 53-58. 1993.

ZHANG, F. J.; CHENG, G. X.; YING, X. G. Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 66, p. 712-719, 2006.