

FABÍOLA IAGHER

Análise Estrutural e Estudo das Propriedades Reológicas de Polissacarídeos de Polpa de Manga (*Mangifera indica* L.)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora:

Prof.^ª Dr.^ª Joana Léa Meira Silveira Ganter

Co-orientadora:

Prof.^ª Dr.^ª Fany Reicher

CURITIBA

2000

Análise Estrutural e Estudo das Propriedades Reológicas de Polissacarídeos de Polpa de Manga (*Mangifera indica* L.)

Fabiola Iagher

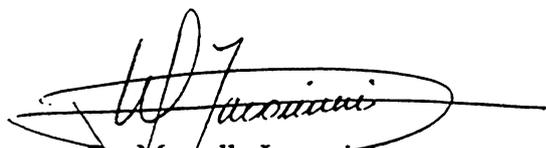
Dissertação aprovada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:



Dra. Fany Reicher (Co-Orientadora)
Depto. de Bioquímica – UFPR



Dra. Tania Mari Bellé Bresolin
Depto. de Farmácia – UFPR



Dr. Marcello Iacomini
Depto. de Bioquímica – UFPR



Dr. Miguel Nosedá
Depto. de Bioquímica – UFPR

Curitiba, 27 de julho de 2000.

Orientadora: Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter

Co-Orientadora: Profa. Dra. Fany Reicher

“Que Deus nos permita falar como quiséramos,
e ter pensamentos dignos dos dons que
recebemos, porque é Ele mesmo quem guia a
sabedoria e emenda os sábios, porque nós
estamos nas Suas mãos, nós e nossos discursos,
e toda a nossa habilidade.”

(Livro da Sabedoria 7, 15-16)

Aos meus pais, Antoninho e Adelaide, pela presença, doação, incentivo e carinho, por toda segurança e tranquilidade que sempre me transmitiram, e por tantas outras coisas. A vocês dedico todo o meu amor e gratidão.

Aos meus irmãos, Fabrício, João Rodrigo e Rafael Augusto, com muito carinho, pela preocupação, cuidado, auxílio, paciência e apoio. A presença de vocês tornou muito mais leve os momentos difíceis.

Ao Rafael, com amor, pela presença
tão importante, pelo apoio, incentivo
e carinho que fazem minha vida
ter mais cor e brilho.

Agradecimentos

A Deus, pela graça da vida e por estar sempre comigo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter, pelo aprendizado, e pela amizade, encorajamento e confiança que me fizeram ir sempre em frente.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Fany Reicher, pela presença essencial no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, incentivo e exemplo.

Ao Dr. Michel Milas pela importante colaboração no início deste trabalho.

À Fruteza S/A, na pessoa do Sr. Olívio Zanatta, pelo fornecimento da polpa de manga.

À Gisele, pela grande generosidade, auxílio inestimável no desenvolvimento e interpretação das análises reológicas, e acima de tudo pela amizade preciosa. Obrigada, Gi, sem você eu não teria conseguido!

À Ana Paula, por estar sempre pronta a ajudar. Agradeço sinceramente a amizade, boa vontade, apoio, preocupação, e ainda pelas conversas e risadas.

À Luciane, pela companhia divertida de todos os dias. Com você aprendi muitas coisas, e agradeço com muito carinho a amizade e toda a ajuda que me prestou.

À Eliana, pelo exemplo de dedicação e por todo o auxílio neste trabalho. Agradeço pelas lições, pela paciência, pela tranquilidade contagiante, e principalmente pela sua amizade.

Ao Renato, pela gratuidade da sua ajuda, pela capacidade de tornar tudo mais simples e por ser um amigo muito querido pra mim. Você contribuiu muito neste trabalho, obrigada mesmo!

À Angela, pela alegria e desprendimento que tornaram nosso ambiente de trabalho agradável e descontraído. Agradeço sinceramente pela disponibilidade em me ajudar apesar da distância, pela companhia na bancada que deixou muitas saudades, e especialmente por sermos amigas.

À Sílvia, pelo incentivo e companheirismo, carinho e amizade, solicitude e alegria. Você faz muita falta aqui no laboratório!

Ao Juan, pelas análises de SEC-MALLS, pelo auxílio na interpretação dos resultados, e principalmente pela presença tranquilizadora, pela paciência, disponibilidade e amizade.

À Andréia, pelas análises de g.l.c., por toda a atenção, colaboração, eficiência e especialmente pela amizade sincera e pelo exemplo de simplicidade.

Ao Adriano, pela nossa amizade, pelas boas risadas e pela alegria contagiante. Obrigada por tudo o que fez por mim!

Aos meus colegas de turma, Eduardo, Fábio, Guilherme, Jean, Júlio e Sabrina, pela amizade solidária, pelo convívio alegre, por termos partilhado momentos de crescimento e conquista, e ainda termos dividido e minimizado juntos as dificuldades que apareceram. Recebam meu carinho e agradecimento sincero.

Às amigas que passaram pelo laboratório Eloisa, Carmem e Tânia Mara, e aos amigos que estão por perto Heloísa, Clarice, Diogo, Fabíola, Guilhermina, João Armando e Fernanda, e Priscila, pelo auxílio, amizade e incentivo.

Às queridas amigas Daniela Athanásio e Sandra Freiburger, por todo auxílio, direto ou indireto, e pela amizade sincera. Devo muito a vocês, obrigada!!

Ao César, pelas análises de ^{13}C -RMN, e à Rosane, pelas análises de GC-MS.

Ao Adriano Fabrício Perissutti, pelo auxílio no desenho dos gráficos.

A todos os colegas do departamento, pela convivência diária e pelo aprendizado mútuo.

Às bibliotecárias Izabella, Mariza, Ruth e Telma, pela atenção e auxílio prestado.

A todas às pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de tabelas	xii
Lista de figuras	xiii
Lista de símbolos, siglas e abreviaturas	xvii
Resumo	xix
1. Introdução	1
1.1. Géis.....	2
1.2. Reologia.....	5
1.2.1. Viscosidade.....	6
1.2.2. Viscosidade intrínseca.....	9
1.2.3. Concentração crítica.....	12
1.2.4. Comportamento pseudoplástico.....	14
1.2.5. Viscoelasticidade.....	16
1.2.6. Medidas de tensão temporária ou transitória (“creep and recovery”).....	17
1.2.7. Medidas reológicas dinâmicas.....	20
1.3. Polissacarídeos de polpa de fruta.....	25
1.3.1. Amido.....	25
1.3.2. Pectina.....	27
1.4. Reologia de produtos obtidos de frutas.....	30
1.5. Manga.....	33
1.5.1. Estudos reológicos.....	38
2. Objetivos	42
3. Materiais e métodos	43
3.1. Obtenção da polpa.....	43
3.2. Obtenção e purificação dos polissacarídeos.....	43
3.3. Preparo das soluções para as análises reológicas.....	44

3.4. Hidrólise ácida total.....	44
3.5. Redução.....	45
3.6. Acetilação.....	45
3.7. Dosagem de açúcar total.....	46
3.8. Dosagem de proteínas.....	46
3.9. Dosagem de ácidos urônicos.....	46
3.10. Determinação qualitativa de amido.....	46
3.11. Obtenção da fração 4C-4.....	47
3.12. Hidrólise enzimática.....	47
3.13. Carbóxi-redução.....	48
3.14. Teste de umidade.....	48
3.15. Polarimetria.....	48
3.16. Métodos cromatográficos.....	49
3.16.1. Cromatografia líquido-gasosa (g.l.c.).....	49
3.16.2. SEC-MALLS (Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de espalhamento de luz a laser em multiângulos).....	49
3.16.3. Fracionamento em coluna de troca iônica DEAE-Trisacryl Plus M.....	50
3.17. Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (¹³ C –RMN).....	51
3.18. Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS).....	51
3.19. Métodos reológicos.....	51
3.19.1. Determinação das viscosidades absolutas (η).....	52
3.19.2. Determinação da viscosidade intrínseca. ($[\eta]$).....	54
3.19.3. Estabelecimento das curvas de fluxo.....	54
3.19.4. Determinação da concentração crítica (c^*).....	55
3.19.5. Medidas de tensão temporária ou transitória (“creep and recovery”).....	55
3.19.6. Análise do comportamento dinâmico.....	55
4. Resultados e discussão.....	57
4.1. Obtenção e análise dos polissacarídeos solúveis da polpa de manga.....	57
4.1.1. Tratamento da fração FS2-B com α -amilase.....	66
4.1.2. Tratamento da fração FS2-B por centrifugação a baixa temperatura.....	67

4.1.3. Fracionamento em coluna de troca iônica.....	70
4.1.4. Análise das frações por ¹³ C-RMN.....	72
4.1.5. Carbóxi-redução da fração FS2-B.....	75
4.2. Análise reológica da fração FS2-B.....	77
4.2.1. Determinação da viscosidade intrínseca ([η]) da fração FS2-B.....	77
4.2.2. Análise do comportamento de fluxo da fração FS2-B.....	79
4.2.3. Determinação da concentração crítica (c*) da fração FS2-B.....	80
4.2.4. Análise de tensão temporária da fração FS2-B.....	84
4.2.5. Análise dinâmica da viscoelasticidade.....	86
4.2.5.1. Determinação da região de comportamento viscoelástico linear da fração FS2-B.....	86
4.2.5.2. Análise do comportamento viscoelástico da fração FS2-B.....	88
5. Conclusões.....	90
6. Referências bibliográficas.....	92

Lista de tabelas

Tabela I: Caracterização das frações FS1 e FS2- A.....	59
Tabela II: Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de ^{13}C -RMN das unidades de glucose da fração FS2-A, padrão de amilose, α -D-metil-glucopiranosídeo e glucana com ligações $\alpha(1\rightarrow 3)$ - $\alpha(1\rightarrow 4)$ de <i>Cladonia penicillata</i>	62
Tabela III: Análise comparativa das frações FS2-A e FS2-B.....	63
Tabela IV: Comparação das composições monossacarídicas das frações FS2-B e FE.....	67
Tabela V: Análise comparativa entre as frações FS2-B e 4C-4.....	69
Tabela VI: Rendimento e composição monossacarídica das frações obtidas por fracionamento em DEAE-Trisacryl Plus M da fração 4C-4.....	70
Tabela VII: Obtenção dos valores numéricos para a construção do gráfico determinante da concentração crítica (c^*).....	82

Lista de figuras

Figura 1: Modelos estruturais de géis binários. A) rede formada pela associação de um único polímero, B) rede interpenetrada, C) rede de fases separadas, e D) rede acoplada.....	4
Figura 2: Desenho esquemático mostrando o fluxo laminar de um fluido contido entre duas placas paralelas.....	6
Figura 3: Comportamento de fluxo de fluidos Newtoniano e não-Newtonianos	8
Figura 4: Comportamento de moléculas em repouso e sob cisalhamento	9
Figura 5: Determinação gráfica da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e constante de Huggins (K').....	11
Figura 6: Diferentes regimes de concentração: A) solução diluída ($c < c^*$), B) moléculas mostrando incipiente sobreposição ($c = c^*$) e C) moléculas emaranhadas ($c > c^*$).....	12
Figura 7: Ilustração esquemática do gráfico para a obtenção da concentração crítica (c^*).....	14
Figura 8: Dependência da viscosidade absoluta (η) de líquidos pseudoplásticos, da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$).....	15
Figura 9: Representação gráfica da viscosidade absoluta (η) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) de soluções em várias concentrações.....	16
Figura 10: Respostas de diferentes materiais em um teste de tensão temporária (“creep and recovery”). a) sólido ideal, b) sólido viscoelástico, c) líquido viscoelástico e d) líquido viscoso.....	19

Figura 11: Desenho esquemático mostrando as respostas dos materiais em testes oscilatórios em fase e fora de fase a) deformação em função do tempo, b) comportamento de um sólido elástico, c) líquido viscoso e d) material viscoelástico.....	22
Figura 12: Representação gráfica genérica de sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas. a) gel forte, b) solução concentrada ou gel fraco e c) solução diluída.....	24
Figura 13: Representação esquemática da estrutura de uma pectina mostrando a região ramificada (ramnogalacturonana e cadeias laterais), a região linear (galacturonana linear) e a dobra na estrutura entre estas duas regiões.....	28
Figura 14: Frutos de <i>Mangifera indica</i> L.....	33
Figura 15: Esquema de um sensor de geometria do tipo cilindro-coaxial.....	52
Figura 16: Esquema de um sensor de geometria do tipo cone-placa.....	53
Figura 17: Perfil de eluição da fração FS2-A através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).....	60
Figura 18: Espectro de ¹³ C-RMN da fração FS2-A.....	61
Figura 19: Fotografia ilustrando as diferentes respostas ao teste com lugol das frações A) FS2-A e B) FS2-B, preparadas na mesma concentração (10 g/L). C) controle.....	64
Figura 20: Perfil de eluição da fração FS2-B através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).....	65
Figura 21: Perfil de eluição da fração FS2-B através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e ultravioleta (UV).....	66

Figura 22: Perfil de eluição da fração FE através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).....	68
Figura 23: Perfil de eluição da fração 4C-4 através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).....	69
Figura 24: Perfil de eluição da fração ácida eluída com NaCl 0,5 mol.L ⁻¹ da coluna de DEAE-Trisacryl Plus M através de SEC-MALLS, utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).....	72
Figura 25: Espectro de ¹³ C-RMN da fração FS2-B.....	73
Figura 26: Espectro de ¹³ C-RMN das frações a) 4C-4 e b) fração eluída da coluna de DEAE-Trisacryl Plus M com NaCl 0,5 mol.L ⁻¹	74
Figura 27: Representação esquemática da molécula de ácido galacturônico após carbóxi-redução com boroidreto deuterado (NaBD ₄), hidrólise, redução e acetilação.....	75
Figura 28: Determinação gráfica da viscosidade intrínseca ([η]) da fração FS2-B.....	78
Figura 29: Viscosidade absoluta (η) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para a fração FS2-B em solução de NaCl 0,01 mol . L ⁻¹ , nas concentrações de 0,5 a 30g/L.....	80
Figura 30: Viscosidade específica (η _{sp}) em função do parâmetro de abrangência a) c[η], b) c[η] + K'(c[η]) ² , para soluções em NaCl 0,01 mol.L ⁻¹ da fração FS2-B.....	83
Figura 31: Análise de tensão temporária da fração FS2-B em solução de NaCl 0,01mol.L ⁻¹ nas concentrações de 20 e 30 g/L.....	85
Figura 32: Análise do comportamento viscoelástico linear para a fração FS2-B em solução de NaCl 0,01mol.L ⁻¹ nas concentrações 15, 20 e 30 g/L.....	87

Figura 33: Análise do comportamento viscoelástico da fração FS2-B em solução de NaCl $0,01\text{mol.L}^{-1}$ nas concentrações de 15, 20 e 30 g/L.....89

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas

α - ângulo de desvio da luz plano-polarizada

$[\alpha]_D$ - rotação óptica específica

δ - ângulo de fase

γ - deformação

γ_0 - amplitude de deformação

$\dot{\gamma}$ - velocidade de cisalhamento

η - viscosidade absoluta

η_s - viscosidade do solvente

η_{rel} - viscosidade relativa

η_{sp} - viscosidade específica

η_{red} - viscosidade reduzida

$[\eta]$ - viscosidade intrínseca

η^* - viscosidade dinâmica complexa

τ - tensão de cisalhamento

τ_0 - amplitude de tensão

f - frequência

c - concentração

c^* - concentração crítica

CS – (“controled stress”) módulo de tensão controlada

^{13}C -RMN - ressonância magnética nuclear de carbono 13

d - deslocamento químico

F – força

FS1- fração solúvel bruta

FS2- fração solúvel purificada

FE- fração obtida por ação enzimática

4C-4- fração obtida por centrifugação a baixa temperatura

G^* - módulo de cisalhamento dinâmico complexo

G' - módulo de cisalhamento dinâmico elástico

G'' - módulo de cisalhamento dinâmico viscoso

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa

g.l.c. - cromatografia líquido-gasosa

Hz - hertz

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBRAF- Instituto Brasileiro de Frutas

ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos

J - parâmetro de complacência (“creep compliance”)

L – comprimento do caminho óptico

LS – espalhamento de luz a laser em multiângulos

K’- constante de Huggins

K- coeficiente de consistência

n- índice de comportamento de fluxo

Pa – pascal

RG I – ramnogalacturonana do tipo I

RG II – ramnogalacturonana do tipo II

RI – índice de refração

SEC-MALLS- cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de espalhamento de luz a laser com multiângulos

t- tempo

UV – ultravioleta

V - volume

Resumo

A composição da fração solúvel da polpa de manga industrializada, a estrutura dos polissacarídeos presentes nesta fração, e as suas propriedades reológicas foram investigadas. A fração solúvel mostrou-se heterogênea em análise por SEC-MALLS pela presença de dois picos registrados pelo detector de índice de refração. A presença de amido nesta fração foi demonstrada pela reação positiva com lugol, em análise por ^{13}C -RMN e pela digestão com α -amilase, enquanto que a presença de polissacarídeos pécnicos foi evidenciada pelo conteúdo de ácidos urônicos em dosagem colorimétrica, sinal de ácido urônico característico em análise por ^{13}C -RMN e por carbóxi-redução. O polissacarídeo pécnico predominante é ácido poligalacturônico, havendo sinais da presença de cadeias laterais neutras de ramnogalacturonana do tipo I e fragmentos de ramnogalacturonana do tipo II. As propriedades reológicas da fração solúvel de polpa de manga em solução de NaCl 0,01M foram analisadas em sistema estático e dinâmico. Foram determinados os valores da viscosidade intrínseca ($[\eta]= 700 \text{ mL/g}$) e da constante de Huggins ($K'= 0,393$) desta fração, assim como a sua concentração crítica ($c^* \sim 1,6$). O comportamento de fluxo da fração solúvel foi analisado nas concentrações de 0,5 a 30 g/L, e observou-se que para concentrações acima de 2 g/L as soluções mostraram comportamento pseudoplástico. Em experimentos de tensão transitória realizados com as concentrações de 20 e 30 g/L foi verificado uma diminuição do parâmetro de complacência (J) para a maior concentração, indicando a maior elasticidade da solução a 30 g/L, sendo que em ambas as concentrações houve comportamento característico de líquido viscoelástico. As análises realizadas em sistema dinâmico revelaram, através dos módulos G' e G'' , um caráter de gel fraco para soluções nas concentrações de 15, 20 e 30 g/L, com valores de G' no ponto de inversão dos módulos de 8, 18 e 40 Pa, respectivamente.

— *INTRODUÇÃO* —

1. Introdução

Os polissacarídeos constituem um dos mais antigos e abundantes reservatórios de biopolímeros, são amplamente distribuídos, e exercem funções essenciais para o desenvolvimento e manutenção da vida, sendo fonte de energia, agindo com função estrutural ou ainda regulando ciclos metabólicos (Pazur, 1994).

Dentre os polissacarídeos, aqueles solúveis em água (hidrocolóides) são muito utilizados na indústria alimentícia e em outros ramos industriais. Sua aplicação nesses campos se deve ao fato de polissacarídeos afetarem o comportamento de escoamento dos fluidos tornando possível o controle da viscosidade das fases aquosas, além de apresentarem custos relativamente baixos e ampla disponibilidade (Whistler, 1993). Além disso, em comparação com polímeros sintéticos, polissacarídeos naturais produzem soluções com altas viscosidades em concentrações relativamente baixas (Morris *et al.*, 1981).

Polissacarídeos ocupam um importante lugar dentre os polímeros naturais, sendo que os solúveis em água (iônicos ou neutros) são usualmente utilizados como polímeros espessantes ou geleificantes, especialmente na indústria alimentícia (Glicksman, 1979 e 1991; Sanderson, 1981; Morris *et al.*, 1981; Rinaudo, 1993). Podem ainda atuar como estabilizantes, aumentando a viscosidade de emulsões e impedindo a separação de fase e, em alguns casos, como emulsificantes pela adsorção na interface das partículas de óleo e água (Glicksman, 1979 e 1991; Sanderson, 1981). As propriedades emulsificantes do propilenoglicol alginato e derivados de celulose como metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e carboximetilcelulose (Gaonkar, 1991), xantana e succinoglicana (Cao, 1991) e galactomananas de fenugreek (Garti, 1997) têm sido estudadas em sistemas óleo/água.

A habilidade de um polissacarídeo atuar como espessante, geleificante, estabilizante ou emulsificante depende de suas propriedades funcionais em solução, que por sua vez dependem da forma molecular do polímero. Sendo que polissacarídeos podem apresentar um vasto número de conformações diferentes, muitas soluções com diferentes propriedades podem ser obtidas (Sanderson, 1981). As principais propriedades de polissacarídeos são controladas por sua estrutura primária e conformação molecular (Rinaudo, 1993). Além da estrutura e conformação molecular, outra propriedade fundamental que determina o comportamento dos polissacarídeos em solução é a massa molecular.

Considerando que nos últimos anos os consumidores têm se tornado particularmente conscientes a respeito do uso de “aditivos” em alimentos manufaturados, o uso de hidrocolóides na indústria alimentícia tem aumentado devido ao fato de que são naturais, não oferecem risco à saúde e podem demonstrar óbvias vantagens no melhoramento da qualidade dos alimentos, tanto do ponto de vista de textura quanto do ponto de vista nutricional (Lillford & Norton, 1992).

Os principais polissacarídeos utilizados em alimentos processados incluem o amido (polissacarídeo de reserva de vegetais superiores), pectinas (obtidas de extratos de plantas), goma arábica (de exudatos vegetais), alginatos, carragenanas e ágar (extraídos de algas), galactomananas (presentes em sementes), goma xantana (origem microbiana) e derivados da celulose como a carboximetilcelulose e metilcelulose (Sanderson, 1981). Os critérios utilizados para selecionar o polissacarídeo mais apropriado são o custo e a disponibilidade, sendo que esta diz respeito à fonte da qual o polímero é derivado. Todos os polissacarídeos são obtidos de fontes renováveis, principalmente plantas (Sanderson, 1998).

O estudo reológico de soluções polissacarídicas é de grande importância para avaliar e compreender em bases moleculares a função destes componentes em sistemas alimentícios. Além disso, tais propriedades reológicas características são de interesse em muitas outras áreas industriais, e um desenvolvimento adicional para a utilização destes polímeros pode ser esperado destes estudos (Castelain *et al.*, 1987).

1.1. Géis

Géis podem ser considerados como intermediários entre sólidos e líquidos, possuindo propriedades de ambos (Sanderson, 1981).

Em termos de constituintes químicos, géis geralmente contêm como componente principal uma substância de massa molecular relativamente baixa, que em forma pura é simplesmente um líquido, por exemplo a água. A característica elástica do gel é atribuída à presença de um segundo componente de maior massa molecular, que está presente em menor quantidade quando comparado com o solvente. Esta substância de maior massa molecular pode ser um polímero ou uma substância coloidal, mas independente da sua natureza, a

elasticidade do gel usualmente implica que no mínimo parte deste material torne-se parte de uma rede tridimensional (Clark, 1991).

Muitos dos agentes geleificantes disponíveis para a indústria alimentícia são polissacarídeos, e desta forma a química de carboidratos é de grande importância particularmente pela habilidade dos polissacarídeos formarem estruturas regulares em forma de hélice ou fita (Oakenfull, 1998). As cadeias poliméricas podem conferir a elevação da viscosidade de soluções, ou gerar uma rede interconectada com textura e propriedades características, formando géis (Morris, 1995). A estereoregularidade das moléculas e os processos cooperativos (temperatura, pH, força iônica) são importantes características para controlar a rigidez da molécula ou a conectividade da rede, determinando o comportamento viscoso ou de gel (Rinaudo & Milas, 1987).

Géis alimentícios são sistemas aquosos de biopolímeros com ligações cruzadas em forma de uma rede molecular interconectada que expande o volume no meio líquido. Em outras palavras, as moléculas de polímero são agregadas em uma grande molécula com uma estrutura tridimensional que preenche o líquido. É esta estrutura em rede que oferece ao gel suas propriedades reológicas características (Oakenfull, 1998).

Polissacarídeos que compõem as paredes celulares das células vegetais, tendo, portanto, função estrutural, como as pectinas por exemplo, revertem de uma forma desordenada para um estado parcialmente ordenado durante a geleificação. Polissacarídeos de reserva como o amido têm sua estrutura granular parcialmente rompida a fim de permitir subsequente geleificação (Morris, 1985).

Os géis mais simples contêm apenas um tipo de polissacarídeo, no entanto, géis alimentícios são freqüentemente misturas de biopolímeros (Morris, 1985; Zasytkin *et al.*, 1997; Oakenfull, 1998), constituídos por vários componentes como proteínas, polissacarídeos, lipídeos e vários co-solutos iônicos e não-iônicos (embora não façam parte da rede de polímero, tais componentes podem contribuir para o comportamento de gel).

Estudos viscosimétricos de sistemas contendo xantana mais galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham ou de *Schizolobium parahybae* indicaram um efeito sinérgico, levando à formação de géis em baixas concentrações (Bresolin *et al.*, 1997). Misturas de galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham e proteínas do leite mostraram interação sinérgica levando a um aumento da elasticidade das soluções quando analisadas em sistema dinâmico em comparação com as soluções isoladas de leite e galactomanana em solução aquosa, sendo que

a adição de CaCl_2 ao sistema apresentou um efeito positivo sobre a interação galactomanana-leite (Perissutti, 1999).

Pelo fato de os alimentos formulados usualmente conterem misturas de hidrocolóides desenvolvendo alterações na consistência, a investigação das interações entre estes hidrocolóides em soluções aquosas e géis é necessária para o melhoramento de alimentos convencionais, o desenvolvimento de novas formulações de alimentos e para o controle das propriedades funcionais dos mesmos (Zasytkin *et al.*, 1997).

Um gel binário é a forma mais simplificada de gel formado por multicomponentes. Várias estruturas podem surgir quando dois polímeros estão misturados e geleificados, conforme os modelos esquemáticos mostrados na Figura 1.

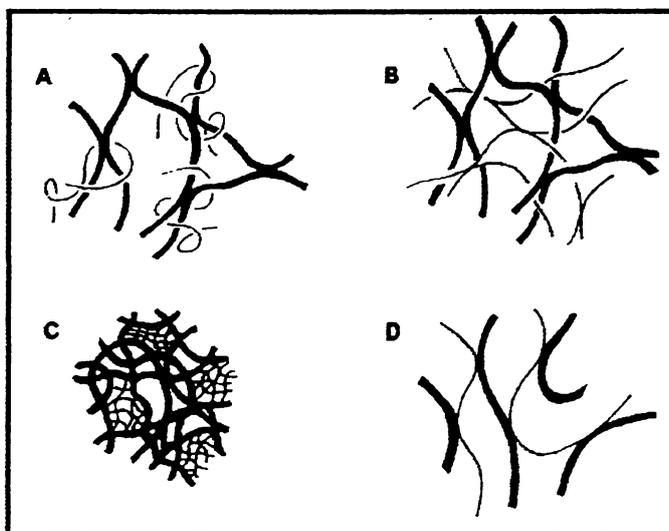


Figura 1: Modelos estruturais de géis binários. A) rede formada pela associação de um único polímero, B) rede interpenetrada, C) rede de fases separadas, e D) rede acoplada (Fonte: Morris, 1991).

A Figura 1a mostra apenas um polissacarídeo formando uma rede. A situação na Figura 1b ocorre quando ambos os polissacarídeos formam redes interpenetradas independentes. Se ocorrer separação dos polímeros antes da geleificação, então uma rede de fases separadas é formada, como mostra a Figura 1c. Finalmente, se um polissacarídeo liga-se ao outro, uma rede acoplada é formada (Figura 1d) (Morris, 1991).

Géis formados por vários agentes geleificantes também podem ser divididos em três grupos: géis com partículas dispersas (“filled”), misturas de géis e géis complexos (Morris, 1985; Zasytkin *et al.*, 1997). Os géis com partículas dispersas contêm uma ou várias redes de biopolímeros independentes formando uma fase contínua preenchida com partículas dispersas que podem ser de natureza sólida, líquida ou gasosa (Zasytkin *et al.*, 1997). Estas partículas dispersas podem ser bolhas de ar, gotículas de água ou óleo, cristais de gelo ou gordura, ou ainda grânulos de amido, sendo que mais de um tipo de partícula pode estar presente (Morris, 1985). Misturas de géis consistem de duas ou mais redes independentes, que se expandem por todo o sistema, mas apresentam interações entre si apenas localizadas (Zasytkin *et al.*, 1997). Géis complexos envolvem associação direta entre os diferentes polímeros e subsequente formação de rede (Zasytkin *et al.*, 1997). Estes tipos de géis também são classificados como sendo géis acoplados, de acordo com Morris (Morris, 1985).

1.2. Reologia

Reologia é o ramo da física que estuda a deformação e o fluxo da matéria (Schott, 1992). É uma ciência que se interessa pela relação entre a força agindo sobre um corpo e a deformação resultante (Mitchell, 1984).

Considerando um material em forma de cubo firmemente aderido a uma superfície, ao se aplicar uma força sobre este material, perpendicular à superfície, é possível esticá-lo (tensão) ou comprimí-lo (compressão). A força aplicada por unidade de área é conhecida como “stress” (τ), ou seja, tensão ou pressão, cuja unidade é o pascal (Pa). O aumento ou decréscimo resultante na altura do material é conhecido como deformação (γ), e é adimensional (Morris, 1984).

Além de ser submetido a forças perpendiculares, um material pode sofrer a ação de forças tangenciais. Imagine-se um fluido contido entre duas placas paralelas, dividido em camadas paralelas entre si e em relação à placa (Figura 2). Ao se aplicar uma força constante F paralela à direção do eixo x à placa superior, a placa inferior se mantém estacionária. As velocidades das camadas líquidas estão representadas por vetores. A camada líquida em contato com a placa móvel se adere a ela e se move com a mesma velocidade v da placa. A

segunda camada, adjacente à anterior, é arrastada por fricção, mas sua velocidade é reduzida pela resistência das camadas subjacentes. A camada inferior se adere à placa estacionária e tem velocidade nula. A velocidade das camadas líquidas aumenta na direção do eixo das ordenadas (y), perpendicularmente à direção de fluxo (eixo x). O fluxo de líquidos em camadas paralelas que se movem uma após a outra e arrastam consigo as camadas adjacentes denomina-se fluxo laminar, e é limitado a baixas velocidades. Com o passar do tempo, todas as camadas líquidas sofrem deformação, exceto a estática. O que distingue um fluido do outro é a velocidade com a qual a deformação aumenta em relação ao tempo, a qual é denominada velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), cuja unidade é s^{-1} . Esta velocidade indica com que rapidez o líquido flui quando a ele se aplica uma tensão de cisalhamento (τ) (Schott, 1992).

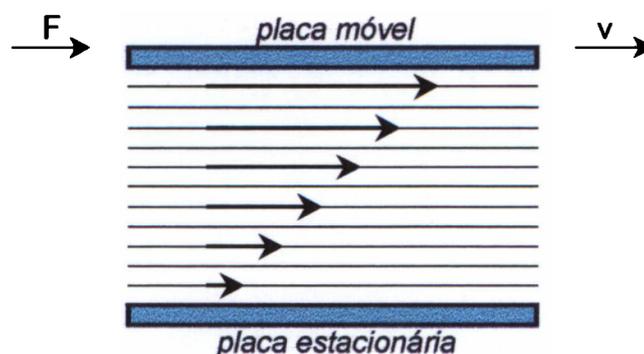


Figura 2: Desenho esquemático mostrando o fluxo laminar de um fluido contido entre duas placas paralelas (adaptado de Schott, 1992).

1.2.1. Viscosidade

Neste contexto, a viscosidade absoluta (η) pode ser definida como a resistência ao movimento relativo de camadas adjacentes de líquido, e pode ser calculada pela relação entre a tensão de cisalhamento (τ) e a velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$):

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad (\text{Pa} \cdot \text{s}) \quad (1)$$

Os fluidos, quando submetidos a um gradiente crescente de cisalhamento podem ser descritos de acordo com sua composição. Os líquidos simples, que consistem de pequenas moléculas ou de soluções onde o soluto é uma molécula pequena, apresentam um comportamento dito Newtoniano e obedecem a forma predita na Equação 1, ou seja, seguem a Lei de Newton onde a tensão de cisalhamento é proporcional à velocidade de cisalhamento (Hiemenz & Rajagopalan, 1997). O gráfico de tensão de cisalhamento contra velocidade de cisalhamento equivalente a esta equação para um líquido viscoso ideal é uma linha reta que passa pela origem, onde dividindo-se um valor de tensão de cisalhamento por seu correspondente valor de velocidade de cisalhamento obtém-se o valor da viscosidade absoluta, o qual é constante para este tipo de fluido (Schramm, 1994).

Soluções contendo solutos sólidos, como polímeros diluídos, comumente têm sua viscosidade aumentada com o aumento da concentração devido a maior possibilidade de choques entre as partículas e interação entre elas. Genericamente, quando submetidas a crescentes velocidades de cisalhamento, estas soluções fogem do padrão Newtoniano e sua viscosidade absoluta cai gradativamente. Estes fluidos são chamados não-Newtonianos e são comparados com um fluido Newtoniano na Figura 3.

Fluidos não-Newtonianos, em um gráfico de tensão de cisalhamento em relação à velocidade de cisalhamento, geralmente apresentam um perfil não linear indicando que a viscosidade varia com a velocidade de cisalhamento, ou seja, a deformação aumenta de maneira descontínua a medida que a tensão é aplicada.

Em um fluido pseudoplástico (Figura 3.2) os valores de velocidade aumentam de forma mais acentuada enquanto há pequenas variações de tensão, revelando que a deformação ocorreu de forma não uniforme permitindo que velocidades maiores fossem alcançadas devido a menor resistência oferecida pelo fluido. O comportamento dilatante (Figura 3.3), ao contrário do pseudoplástico, revela um “espessamento” do líquido pela pequena alteração na velocidade a medida que maior tensão é aplicada. Líquidos plásticos (plástico de Bingham), por sua vez, necessitam que um determinado valor de tensão (valor crítico) seja alcançado para que possam fluir (Figura 3.4).

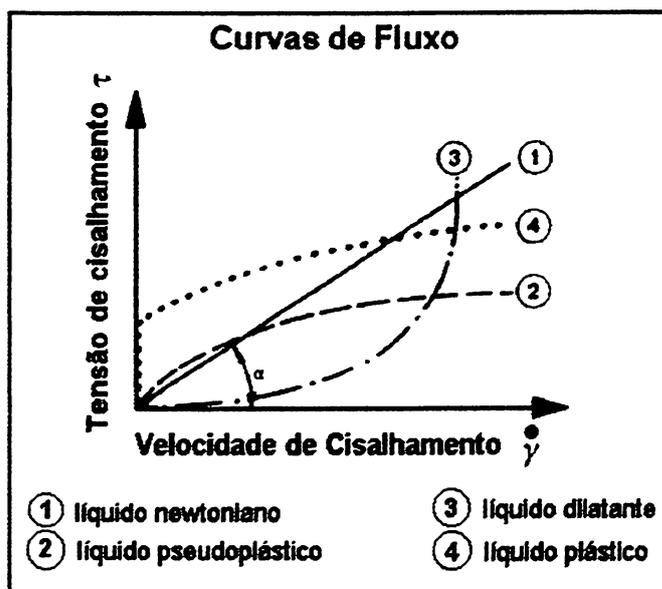


Figura 3: Comportamento de fluxo de fluidos Newtoniano e não-Newtonianos (adaptado de Schramm, 1994).

Muitas substâncias tais como emulsões, suspensões ou dispersões de grande importância técnica e comercial, inclusive soluções de polissacarídeos, são pseudoplásticas, ou seja, são fluidos que se tornam mais viscosos (“menos espessos”) enquanto a velocidade de cisalhamento aumenta. Algumas razões pelas quais ocorre o efeito de diminuição da viscosidade neste tipo de material são ilustradas na Figura 4.

Nas soluções de polímeros, o emaranhado de moléculas e a imobilização de solvente por este emaranhado sustentam a estrutura. As cadeias poliméricas formam estruturas na forma de emaranhados ao acaso (“random coil”), não compactas, penetradas por água. Ao se aplicar uma tensão de cisalhamento, um movimento laminar unidirecional se sobrepõe ao movimento térmico arbitrário das moléculas de água e dos segmentos de cadeia polimérica. As cadeias de polímero tendem a separar-se e alinhar-se na direção do fluxo, ao mesmo tempo que a quantidade de água no interior do emaranhado se faz menor, o que diminui o tamanho da unidade de fluxo, e conseqüentemente ocorre a redução na viscosidade (Figura 3.2) (Schott, 1992).



Figura 4: Comportamento de moléculas em repouso (1) e sob cisalhamento (2) (adaptado de Schramm, 1994).

Viscosidade, portanto, é uma característica reológica passível de ser analisada através da aplicação de forças tangenciais (forças de cisalhamento) sobre um material fluido. Como resultado, um material poderá se comportar como um fluido Newtoniano, assim como o ar e a água, ou apresentar características pseudoplásticas, dilatantes, e outros comportamentos não-Newtonianos.

1.2.2. Viscosidade intrínseca

A viscosidade intrínseca de um polímero é determinada experimentalmente através de medidas de viscosidade de soluções em concentrações diluídas (Morris, 1995).

Em soluções diluídas, onde os polímeros se encontram afastados uns dos outros, é possível considerar o comportamento de uma macromolécula independentemente das outras que a cercam. Desta forma, é em regime diluído, onde o fluido apresenta comportamento Newtoniano, que se torna possível determinar os valores de viscosidade relativa (η_{rel}), viscosidade específica (η_{sp}) e viscosidade reduzida (η_{red}), necessários para a obtenção do valor de viscosidade intrínseca ($[\eta]$).

A viscosidade relativa (η_{rel}) é calculada pela razão entre a viscosidade absoluta (η) de uma solução e a viscosidade do solvente puro (η_s):

$$\eta_{rel} = \eta / \eta_s \quad (2)$$

A viscosidade específica (η_{sp}) é obtida pela divisão entre a viscosidade absoluta (η) da solução diminuída do valor da viscosidade do solvente, e a viscosidade do solvente puro (η_s), ou ainda, é a viscosidade relativa (η_{rel}) diminuída de uma unidade:

$$\eta_{sp} = \eta - \eta_s / \eta_s = \eta_{rel} - 1 \quad (3)$$

A razão entre a viscosidade específica (η_{sp}) e a concentração da solução (c) fornece o valor numérico para a viscosidade reduzida (η_{red}):

$$\eta_{red} = \eta_{sp} / c \quad (4)$$

A caracterização do volume hidrodinâmico ocupado por uma cadeia polimérica isolada pode ser realizada em regime diluído pela determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$). De acordo com Tager (1978), a variação da viscosidade reduzida (η_{sp} / c) com a concentração em soluções diluídas é dada por uma linha reta descrita pela equação:

$$\eta_{sp} / c = K'c[\eta]^2 + [\eta] \quad (5)$$

onde $[\eta]$ corresponde ao coeficiente linear da reta e K' representa o coeficiente angular, sendo este a constante de Huggins cujo valor depende da qualidade do solvente e da conformação das moléculas (Tager, 1978). O gráfico da viscosidade reduzida (η_{red}) contra a concentração (c), correspondente à Equação 5, está representado na Figura 5.

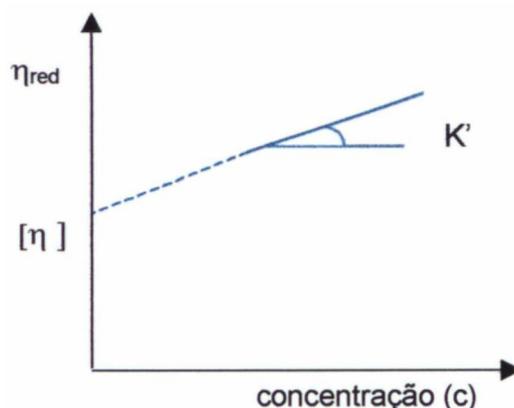


Figura 5: Determinação gráfica da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e constante de Huggins (K').

A determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é feita pela extrapolação da viscosidade reduzida (η_{red}), expressa em função da concentração de polímero, à concentração nula (Figura 5), e pode ser representada da seguinte forma:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left\{ \eta_{sp} / c \right\} \quad (6)$$

onde entende-se que a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) corresponde a um valor de viscosidade reduzida (η_{sp} / c) quando a concentração (c) tende a zero (Morris, 1995).

Quando um polímero é um polieletrólito, durante a solubilização em água são removidos os contra-íons responsáveis pela anulação das cargas da macromolécula. Assim, as cargas existentes nos polímeros sofrem repulsões eletrostáticas, as cadeias se expandem e alteram a viscosidade relativa. Devido a este fato, a viscosidade intrínseca dos polieletrólitos deve ser determinada em soluções salinas a fim de reduzir as repulsões intra e intermoleculares, e o polímero assumir dimensões equivalentes a de um polímero neutro (Morris, 1979; Mitchell, 1979).

1.2.3. Concentração crítica

Em soluções diluídas as cadeias poliméricas individuais estão espacialmente separadas, enquanto que, quando a concentração da solução aumenta, as moléculas individuais são colocadas em contato umas com as outras (Figura 6). Isto é acompanhado por uma mudança no comportamento de fluxo e, em particular, por um aumento na viscosidade analisada em patamar newtoniano (Morris *et al.*, 1981; Robinson *et al.*, 1982; Morris, 1995).

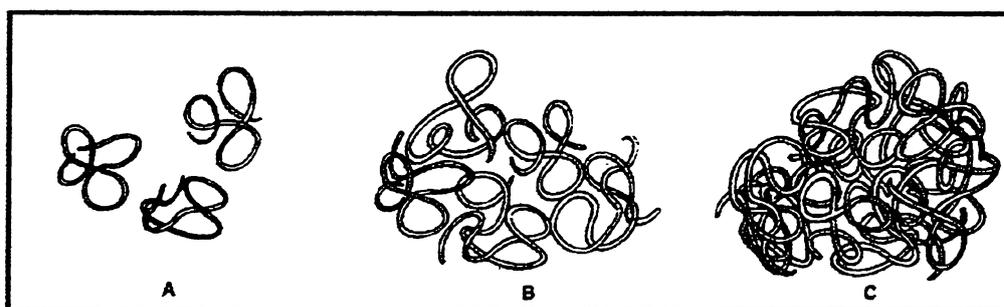


Figura 6: Diferentes regimes de concentração: A) solução diluída ($c < c^*$); B) moléculas mostrando incipiente sobreposição ($c = c^*$); C) moléculas emaranhadas ($c > c^*$) (Fonte: Robinson *et al.*, 1982).

A concentração crítica (c^*) é aquela onde as cadeias ocupam todo o volume disponível em solução, sem que haja entrelaçamento entre elas (Figura 6b). A obtenção do valor numérico para a concentração crítica (c^*) se faz pela construção de um gráfico em escala logarítmica, onde a viscosidade específica (η_{sp}) é plotada contra o volume de ocupação do polímero (Figura 7).

O volume total ocupado por um polímero é caracterizado pelo produto da concentração (c , proporcional ao número de cadeias presentes) e viscosidade intrínseca ($[\eta]$, proporcional ao volume da cadeia), podendo ser expresso por $c[\eta]$, chamado de “coil overlap” ou parâmetro de abrangência. A viscosidade medida em platô Newtoniano é expressa como viscosidade específica (η_{sp}) para descontar a influência do solvente em baixas concentrações (Morris, 1995).

O volume de cadeia pode variar significativamente de amostra para amostra, com correspondente variação na concentração crítica, na qual o entrelaçamento entre as cadeias inicia. Então, quando as viscosidades específicas medidas são plotadas em função do parâmetro de abrangência, ao invés de serem plotadas apenas contra a concentração, a concentração crítica de polímeros tipo “random coil” ou emaranhado ao acaso, tanto neutros quanto carregados, é dependente dos valores individuais de concentração (c) e de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) (pode existir grande número de pequenas moléculas ou pequeno número de grandes moléculas) (Morris, 1995).

Os valores de viscosidade específica (η_{sp}) podem ser plotados em função de $c[\eta] + K'(c[\eta])^2$ (equação de Huggins modificada), onde K' é a constante de Huggins. O valor de K' para polímeros flexíveis é compreendido entre 0,3 a 0,4 em bons solventes e entre 0,5 e 0,8 em solventes θ . No caso de existirem interações intermoleculares, o valor de K' pode ser superior a 0,8, e quando os valores obtidos para a constante são inferiores a 0,3, significa que as moléculas foram submetidas a elevadas velocidades de cisalhamento (Tager, 1978).

A faixa linear da curva que relaciona a viscosidade específica com a equação $c[\eta] + K'(c[\eta])^2$ (Figura 7b) fornece, por extrapolação à curva representada pela Figura 7a, a concentração crítica.

Quando a viscosidade no regime Newtoniano é considerada, um comportamento comum para diferentes polímeros é obtido ao se plotar η_{sp} em função de $c[\eta] + K'(c[\eta])^2$. Isto porque nesta equação a constante de Huggins é considerada, e esta constante considera a estrutura do polímero e a qualidade do solvente. Comparando-se o perfil das curvas obtidas com η_{sp} versus $c[\eta]$ e η_{sp} versus $c[\eta] + K'(c[\eta])^2$, são observadas diferenças no perfil para diferentes polímeros quando η_{sp} versus $c[\eta]$ é considerado (Rinaudo & Milas, 1987). Desta forma, o valor de concentração crítica obtido a partir das duas curvas determinadas pelas equações acima é mais confiável.

Polissacarídeos com menor flexibilidade de cadeia apresentam valores mais elevados para a concentração crítica (Ganter *et al.*, 1992a).

A concentração crítica tem importante validade para a indústria pois identifica a concentração mínima de polímeros necessária para a obtenção de uma viscosidade desejada, sem desperdiçar material para obter o mesmo resultado.

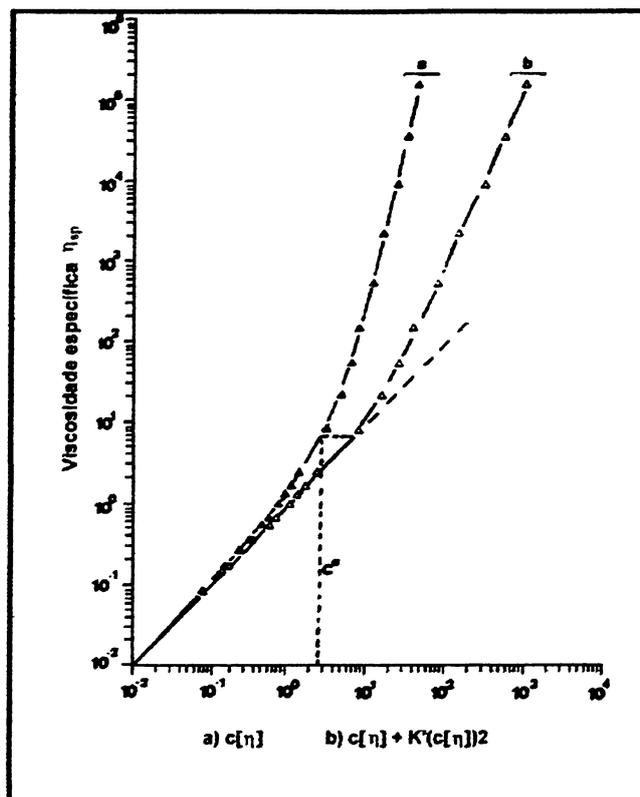


Figura 7: Ilustração esquemática do gráfico para a obtenção da concentração crítica (c^*).

1.2.4. Comportamento pseudoplástico

O comportamento pseudoplástico de um fluido é observado quando há perda de viscosidade absoluta (η) com o aumento da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$).

Para soluções diluídas, a redução na viscosidade com o aumento do cisalhamento é pequena, e surge do alinhamento de cadeias temporariamente alongadas. Para soluções concentradas a perda de viscosidade é muito mais dramática, e surge por um mecanismo totalmente diverso. Em baixas velocidades de cisalhamento, as interações entre cadeias poliméricas emaranhadas, que são rompidas pela deformação imposta, são substituídas por novas interações entre diferentes cadeias, e não ocorre redução na viscosidade. Esta situação corresponde ao patamar newtoniano, onde a viscosidade permanece com valor constante (viscosidade igual àquela em ausência de cisalhamento). O início da perda de viscosidade (“shear thinning”) ocorre quando o padrão de movimento imposto externamente se torna

maior que o padrão de formação de novas interações intercadeias, e então a viscosidade diminui (Morris *et al.*, 1981).

A literatura aponta outra possível razão para a perda de viscosidade de um material. Camadas de solvente são retiradas das moléculas dissolvidas reduzindo as interações intermoleculares, e assim a resistência ao fluxo (Schramm, 1994).

Em velocidades de cisalhamento muito altas, a viscosidade novamente assume um valor constante, indicando que um cisalhamento máximo foi alcançado. Assim, em baixas e em altas velocidades de cisalhamento tem-se o primeiro e o segundo patamar newtoniano respectivamente, onde a viscosidade de líquidos pseudoplásticos (não-Newtonianos) independe da velocidade de cisalhamento, havendo apenas mudanças muito pequenas na viscosidade (Figura 8).

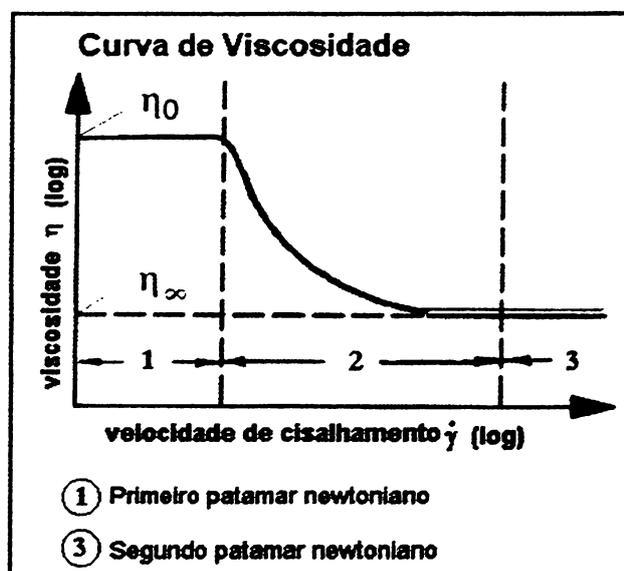


Figura 8: Dependência da viscosidade absoluta (η) de líquidos pseudoplásticos da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) (adaptado de Schramm, 1994).

Soluções de um mesmo polímero em diferentes concentrações podem ser submetidas a diferentes tensões de cisalhamento de modo que a velocidade máxima de cisalhamento seja alcançada em cada concentração. Desta forma é possível observar que, em um gráfico onde a viscosidade absoluta (η) é colocada em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), a medida em que a concentração aumenta, cresce a viscosidade em velocidade zero, e a queda da viscosidade se dá em velocidades cada vez menores (Figura 9).

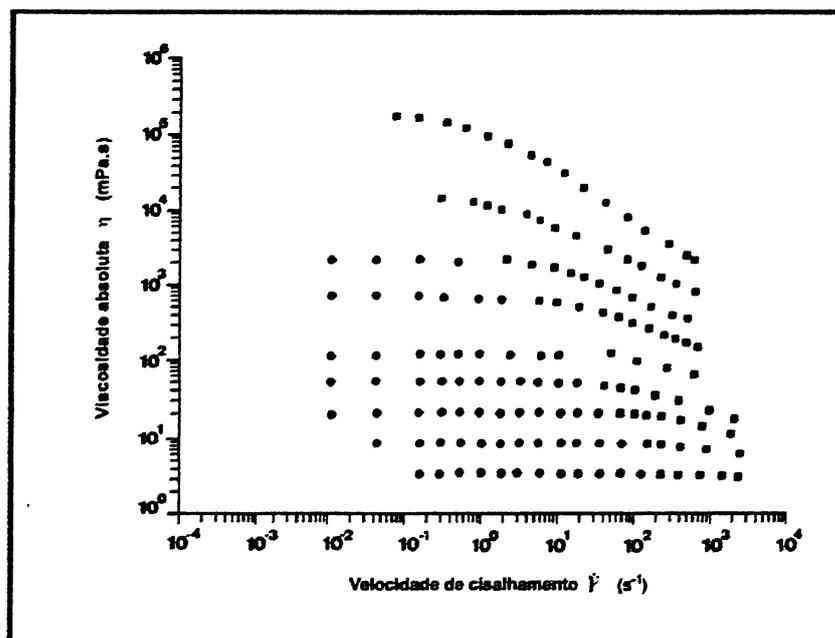


Figura 9: Representação gráfica da viscosidade absoluta (η) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) de soluções em várias concentrações (adaptado de Ganter *et al.*, 1992a).

A análise destas curvas de fluxo permite a visualização geral do comportamento de fluxo de um determinado polímero em solução, e contribui para a caracterização reológica do material.

1.2.5. Viscoelasticidade

A fim de se entender o comportamento de soluções poliméricas reais, é interessante considerar dois extremos ideais: um sólido perfeito (elástico) e um líquido perfeito (Newtoniano).

No caso de sólidos perfeitos, a força aplicada é diretamente proporcional à magnitude de deformação gerada. Ocorre uma deformação elástica, ou seja, a energia requerida para provocar a deformação é totalmente recuperada quando a força é removida. Ao contrário, líquidos viscosos ideais deformam-se irreversivelmente, isto é, a energia utilizada na

deformação é dissipada no fluido em forma de calor e não pode ser recuperada simplesmente pela remoção da força (Schramm, 1994).

O material é dito viscoelástico quando apresenta propriedades de sólido e líquido simultaneamente, ou seja, parte da energia aplicada é armazenada e outra parte é dissipada como calor.

Para os materiais reais a deformação depende não apenas da pressão aplicada mas também do tempo em que esta força permanece sobre o corpo. Este tipo de comportamento é chamado viscoelasticidade (Mitchell, 1984).

Um corpo que não é completamente sólido não mantém uma deformação constante sob pressão (“stress”) constante, mas continua deformando vagarosamente com o tempo. Quando tal corpo é submetido à deformação constante, a pressão requerida para manter esta deformação diminui gradualmente. Por outro lado, um material que não é completamente líquido pode, enquanto flui sob força constante, armazenar alguma energia ao invés de dissipá-la toda como calor, e recuperar parte desta deformação quando a força é removida. Materiais cujo comportamento exibe tais características são chamados viscoelásticos (Ferry, 1980).

1.2.6. Medidas de tensão temporária ou transitória (“creep and recovery”)

A caracterização de materiais viscoelásticos pode ser realizada através de medidas de tensão temporária em sistema estático, além das medidas dinâmicas.

Quando uma tensão fixa é aplicada sobre uma amostra, a deformação resultante gradualmente aumentará com o tempo, e a liberação da tensão promoverá apenas a parcial recuperação da geometria original das moléculas. Este comportamento pode ser entendido como um gradual rearranjo da rede polimérica para acomodar a deformação aplicada, pela dissociação de junções intercadeias pré-existentes e sua substituição por novas interações entre diferentes cadeias (Morris, 1984).

Em um experimento de tensão temporária, uma tensão constante é aplicada e a correspondente deformação é acompanhada em função do tempo. Os resultados são expressos em função do parâmetro de complacência (“creep compliance”) (Mitchel, 1984), de acordo com a equação:

$$J(t) = \gamma(t) / \tau \quad (7)$$

onde:

$J(t)$ = parâmetro de complacência, relacionado ao tempo

γ = deformação

τ = tensão de cisalhamento

t = tempo

Quanto maior o parâmetro de complacência $J(t)$, mais facilmente uma amostra pode ser deformada por uma dada tensão (Schramm, 1994).

Em análises de tensão temporária ou de arraste, uma tensão constante e de pequena amplitude é aplicada à amostra por meio da placa superior do reômetro (sensor). Esta tensão, que é uma tensão de cisalhamento (Equação 7), promove a torção do fluido em análise, enquanto baixas velocidades de cisalhamento são atingidas.

É necessário distinguir a complacência, onde os valores de deformação são muito pequenos, do fluxo, onde a deformação é muito grande (The Pharmaceutical Codex, 1994).

Estudos de complacência podem fornecer informações sobre o comportamento reológico de sistemas poliméricos em seu estado não perturbado. Estes estudos são divididos em fase de arraste e de recuperação. Na fase de arraste uma tensão é aplicada e a deformação provocada é monitorada em função do tempo. Na fase de recuperação a tensão é removida e a resposta da amostra é observada (Rayment *et al.*, 1998).

Experimentos de tensão temporária são usados para obter informações sobre mecanismos viscoelásticos que ocorrem em longas escalas de tempo. Permitem uma distinção entre um sólido e um líquido viscoelástico (Mitchell, 1984), conforme ilustra a Figura 10.

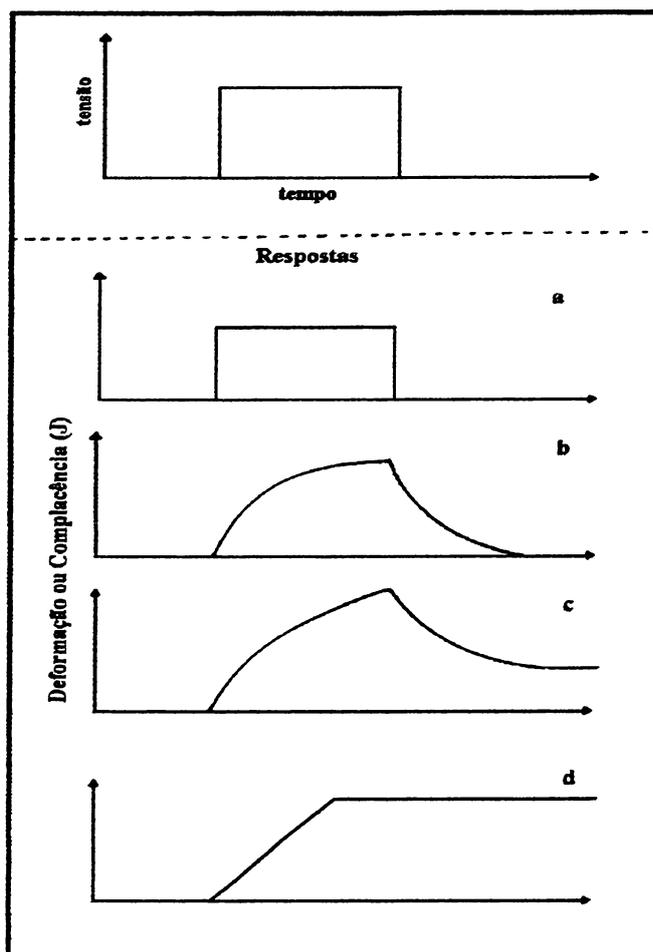


Figura 10: Respostas de diferentes materiais em um teste de tensão temporária (“creep and recovery”): a) sólido ideal, b) sólido viscoelástico, c) líquido viscoelástico, d) líquido viscoso (adaptado de Mitchell, 1984).

Para um sólido elástico ideal (Figura 10a), durante a aplicação de uma tensão fixa, uma determinada deformação é alcançada e mantida constante em função do tempo. Quando é removida a tensão, a energia utilizada na deformação é totalmente e instantaneamente recuperada, e o sólido assume sua forma original. Ao contrário, um líquido viscoso (Figura 10d) deforma-se de maneira ilimitada com a aplicação de uma tensão, e com a retirada desta tensão a deformação não é revertida, pois a energia é perdida em forma de calor. Já para materiais viscoelásticos (Figuras 10b e 10c) o comportamento é intermediário, isto é, a energia utilizada na deformação é armazenada em parte, dependendo das características elásticas ou viscosas destes fluidos.

Para um sólido viscoelástico (Figura 10b), em longas escalas de tempo a complacência alcançará um valor de equilíbrio que decairá a zero quando a tensão é removida. Para líquidos viscoelásticos (Figura 10c), $J(t)$ é uma função linear de tempo em longos períodos de tempo, e a recuperação após a remoção da tensão atinge um valor constante diferente de zero (Mitchell, 1984).

1.2.7. Medidas reológicas dinâmicas

As medidas dinâmicas tornam possível o estudo do domínio viscoelástico que ocorre em soluções poliméricas concentradas, em relação ao sistema estático, separando caráter viscoso de elástico (Ferry, 1980). Na realidade, as propriedades reológicas de sistemas polissacarídicos invariavelmente mostram um elemento de ambos os caracteres: sólido e líquido (Morris, 1995).

A viscoelasticidade de um material pode ser medida através de análises dinâmicas ou oscilatórias, onde a solução é submetida a uma tensão ou deformação senoidal oscilatória de pequena amplitude no decorrer do tempo, a uma dada frequência.

Quando um material viscoelástico é submetido a uma força oscilatória senoidal, a deformação não se encontra exatamente em fase com a tensão (como seria para um sólido perfeito), nem 90° fora de fase (como seria para um líquido viscoso), mas em um ângulo intermediário. Uma parte da energia é armazenada e recuperada em cada ciclo, e uma parte é dissipada como calor (Ferry, 1980).

Sistemas reais de polissacarídeos comportam-se como materiais viscoelásticos, e o grau de caráter sólido e líquido pode ser quantificado. O módulo de cisalhamento elástico (G') é a razão entre tensão aplicada e deformação provocada em fase, enquanto que o correspondente parâmetro para a resposta fora de fase é o chamado módulo de cisalhamento viscoso (G'') (Morris, 1995). O módulo de cisalhamento elástico diz respeito ao caráter sólido do material, enquanto que o módulo de cisalhamento viscoso refere-se ao caráter líquido. Chama-se módulo de cisalhamento porque a tensão é aplicada por rotação do sensor, levando a um escoamento da amostra em camadas, ou seja, a amostra é submetida a uma força tangencial (Figura 1), e neste caso, oscilatória.

A energia usada na deformação de um sólido elástico é recuperada quando a amostra retorna ao seu estado original, enquanto que para um líquido ideal não há tal recuperação, e a energia é perdida. Assim, os módulos G' e G'' são também denominados módulos de estocagem e de perda, respectivamente (Morris, 1995; Mitchell, 1984). Para um material perfeitamente elástico toda a energia é armazenada, a tensão e a deformação encontram-se em fase, e G'' é igual a zero. Para um líquido que não possui nenhuma propriedade elástica toda a energia é dissipada como calor, G' é igual a zero, e a tensão e a deformação estão fora de fase.

Os módulos de cisalhamento elástico (G') e viscoso (G'') são dados pelas seguintes equações:

$$G' = (\tau_0 / \gamma_0) \cdot \cos \delta \quad (8)$$

$$G'' = (\tau_0 / \gamma_0) \cdot \sin \delta \quad (9)$$

$$G''/G' = \tan \delta \quad (10)$$

onde:

G' = módulo de cisalhamento dinâmico elástico

G'' = módulo de cisalhamento dinâmico viscoso

τ_0 = amplitude de tensão

γ_0 = amplitude de deformação

δ = ângulo de fase

A oscilação visualizada na Figura 11 é resultado da aplicação e remoção de tensão de modo alternado, produzindo a onda senoidal com o passar do tempo. Na Figura 11b, a deformação e a tensão encontram-se em fase, ou seja, o máximo de tensão corresponde ao máximo de deformação. Um líquido ideal apresenta um comportamento diverso, onde o valor máximo de tensão é alcançado na metade do ciclo, quando a deformação é nula, e cai para zero nos extremos de oscilação, quando a deformação é máxima (Figura 11c). Deformação e tensão, neste caso, estão exatamente 90° fora de fase. O comportamento viscoelástico é caracterizado por apresentar uma defasagem em graus (ângulo de fase δ) entre tensão e deformação que pode variar entre 0 e 90° (Figura 11d) (Mitchell, 1984; Morris, 1995).

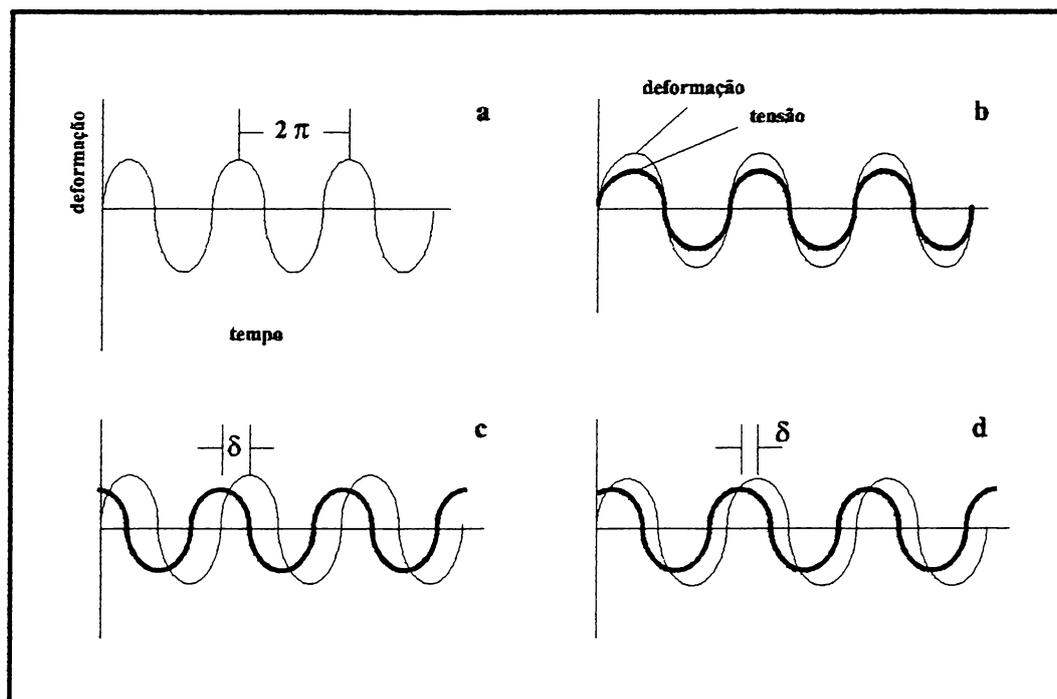


Figura 11: Desenho esquemático mostrando as respostas dos materiais em testes oscilatórios em fase e fora de fase: a) deformação em função do tempo, b) comportamento de um sólido elástico, c) líquido viscoso e d) material viscoelástico (adaptado de Vélez-Ruiz & Cánovas, 1997).

A resposta global de uma amostra a tensões e deformações oscilatórias pode ser caracterizada pelo módulo de cisalhamento dinâmico complexo G^* (Schramm, 1994; Morris, 1984; Morris, 1995), que é dado pela seguinte equação:

$$G^* = (G'^2 + G''^2)^{1/2} \quad (11)$$

onde:

G^* = módulo de cisalhamento dinâmico complexo

G' = módulo de cisalhamento dinâmico elástico

G'' = módulo de cisalhamento dinâmico viscoso

Alternativamente, o módulo dinâmico complexo G^* pode definir uma viscosidade complexa (η^*), que descreve a resistência total para uma medida dinâmica (Schramm, 1994), e é expressa pela equação:

$$\eta^* = G^* / f \quad (12)$$

onde:

η^* = viscosidade dinâmica complexa

G^* = módulo de cisalhamento dinâmico complexo

f = frequência

A frequência (f), expressa em Hz, pode ser considerada como análoga da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), e a viscosidade dinâmica complexa (η^*) como análoga da viscosidade absoluta (η) (Morris, 1995).

A análise dinâmica de um material, através dos módulos de cisalhamento dinâmico G' e G'' e da viscosidade dinâmica complexa, permite caracterizá-lo como tendo um caráter mais viscoso ou mais elástico, conforme mostra a Figura 12.

Na Figura 12a está representado o comportamento de um gel típico de polissacarídeo. O módulo de estocagem (G') é muito maior que o módulo de perda (G'') em toda a faixa de frequência analisada, revelando uma resposta predominantemente sólida, e ambos os módulos são essencialmente independentes da frequência, como seria esperado para uma rede elástica. A viscosidade dinâmica (η^*) decresce abruptamente com o aumento da frequência (Morris, 1995).

Em baixas frequências de oscilação, o espectro mecânico de soluções concentradas ou géis fracos (Figura 12b) é similar àquele de soluções diluídas: G'' é maior que G' , ambos os módulos crescendo com o aumento da frequência, e a η^* é inicialmente independente da frequência. Em frequências mais altas, entretanto, o comportamento aproxima-se àquele de gel mostrado na Figura 12a, onde a resposta elástica (G') predomina sobre o fluxo viscoso (G''), e a η^* declina.

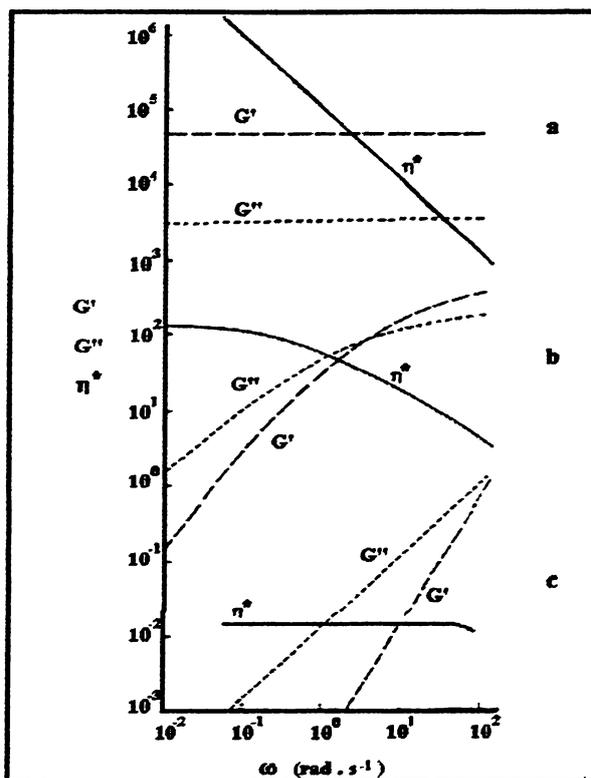


Figura 12: Representação gráfica genérica de sistemas polissacarídicos submetidos a medidas reológicas dinâmicas. a) gel forte, b) solução concentrada ou gel fraco, e c) solução diluída (Fonte: Morris, 1995).

Em altas frequências, onde o emaranhado entre as cadeias não têm tempo suficiente para separar-se no ciclo de oscilação, a rede comporta-se como um gel forte, enquanto que em baixas frequências as cadeias têm tempo suficiente para separarem-se e fluírem (Morris, 1984). O comportamento não-Newtoniano ocorre a altas frequências e caracteriza-se pela intersecção entre os módulos G' e G'' , o que indica transição do regime diluído para o semi-diluído (Ferry, 1980).

A Figura 12c mostra o espectro mecânico de uma solução típica diluída de polissacarídeo. A viscosidade dinâmica (η^*) mostra pequena variação com a frequência (demonstrando um comportamento essencialmente Newtoniano através da faixa de frequência alcançada), e o módulo de perda G'' é substancialmente maior do que o módulo de estocagem G' . O armazenamento de energia em soluções poliméricas diluídas ocorre por contorção das cadeias em conformações deformadas, enquanto que a energia é dissipada por movimento

translacional por entre o solvente. Em baixas frequências predomina o movimento translacional (G'' é maior que G') enquanto que em frequências mais altas os movimentos internos tornam-se mais importantes e G' aproxima-se de G'' (Morris, 1984).

As variações de G' , G'' e η^* fornecem importantes informações para a caracterização da escala de tempo das interações moleculares em sistemas poliméricos, e estas medidas reológicas podem ser aplicadas para ambos os sistemas sólido ou líquido, monitorando processos tais como a formação de géis físicos constituídos por polissacarídeos (Morris, 1995).

1.3. Polissacarídeos de polpa de fruta

A parede celular dos vegetais é constituída por celulose, hemicelulose e pectina, sendo que nas frutas a parede celular primária e a lamela média constituem grande proporção do tecido, e por isso o conteúdo de substâncias pécnicas é alto (Whistler & Corbett, 1957).

Além dos polissacarídeos de parede, polissacarídeos de reserva, notadamente o amido, estão presentes no mesocarpo das frutas.

1.3.1. Amido

O amido consiste primariamente de dois componentes poliméricos, amilose e amilopectina. Amilose é um polissacarídeo essencialmente linear composto de unidades de α -D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4), podendo apresentar um pequeno número de ramificações. Sua massa molecular varia de acordo com a fonte e método de extração, e ainda da maturidade e condições de crescimento da planta. Em solução, a amilose assume uma conformação helicoidal frouxamente enrolada, que se comporta quase como uma estrutura esférica enrolada ao acaso ("random coil") (BeMiller, 1993).

As moléculas de amilopectina são compostas por uma cadeia principal de unidades de α -D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo (1 \rightarrow 4), e por ramificações com a mesma composição que se inserem na cadeia principal por ligações α -(1 \rightarrow 6), com

comprimento de cadeia de 20 a 30 unidades de glucose. Sua massa molecular varia dependendo das mesmas condições que atuam sobre a massa molecular da amilose. (BeMiller, 1993).

As propriedades geleificantes do amido são dependentes principalmente da amilose que, devido a sua estrutura, pode formar pontes de hidrogênio com moléculas vizinhas e construir uma rede tridimensional. A amilopectina, sendo altamente ramificada, dificulta a associação física entre moléculas, inibindo a geleificação (Glicksman, 1979).

Estudos reológicos envolvendo amilose e amilopectina revelaram que ambas as moléculas apresentaram valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) semelhantes (154 e 127mL/g, respectivamente), sendo a massa molecular da amilose cerca de 50 vezes menor que a da amilopectina. Esta menor viscosidade da amilopectina pode ser atribuída a sua estrutura mais compacta, ocupando um volume hidrodinâmico menor quando comparada à amilose, e ainda à presença de ramificações impedindo associação intermolecular (Hwang e Kokini, 1991).

O amido encontra-se na forma de grânulos aproximadamente esféricos, semi-cristalinos. Quando dispersos em água e aquecidos, estes grânulos incham e liberam a amilose. Os grânulos inchados são dispersos na matriz de amilose, a qual é responsável pelos estágios iniciais da geleificação, e pela opacidade dos géis de amido. Estes grânulos inchados reforçam o gel, tornando-o mais forte com o passar do tempo devido à cristalização envolvendo curtas ramificações da amilopectina dentro dos grânulos (Morris, 1985; Morris, 1991).

Os géis de amido, após aquecimento e subsequente resfriamento, sofrem um processo chamado retrogradação. A retrogradação ocorre quando moléculas que se tornam desordenadas pelo aquecimento (cozimento) dos grânulos começam a se reassociar em uma estrutura ordenada. Primeiramente, moléculas flexíveis de amilose aproximam-se e associam-se em uma porção de seu comprimento, formando uma zona de junção e uma rede fraca e temporária, que com o tempo é convertida em uma rede forte, permanente e elástica contendo regiões cristalinas. Este processo resulta em um aumento na opacidade da pasta e na geleificação, ou leva à sinérese da pasta ou gel. Geralmente, extensiva retrogradação não é desejada. O comprimento das cadeias de amilose afeta o grau de retrogradação: máxima retrogradação ocorre quando as cadeias apresentam entre 100 e 200 unidades de glucose (BeMiller, 1993).

Amilose e amilopectina possuem características diferenciadas. A amilose forma complexos com iodo e várias moléculas orgânicas, apresenta solubilidade variável, forma

pastas opacas e géis que se tornam irreversivelmente mais firmes com o tempo devido à rápida retrogradação. A amilopectina, ao contrário, é solúvel, forma pastas sem opacidade, não forma géis ou apenas géis fracos, apresenta pouca retrogradação e não forma complexos com outros compostos. Amidos de diferentes fontes apresentam quantidades variadas dos dois polímeros, de modo que suas características em solução dependem da razão amilose:amilopectina (BeMiller, 1993).

1.3.2. Pectinas

Pectinas são uma classe de polissacarídeos complexos encontrados nas paredes celulares de vegetais superiores, onde funcionam como agente hidratante e material cimentante para a rede celulósica (Thakur *et al.*, 1997). Como muitos outros polissacarídeos de plantas, as pectinas apresentam-se de maneira polidispersa, e sua composição varia de acordo com a fonte e as condições aplicadas durante o isolamento (Rolin, 1993; Thakur *et al.*, 1997).

A mais alta concentração de pectinas na parede celular é vista na lamela média (região da interface de paredes celulares primárias de células vizinhas), com gradual decréscimo na parede primária em direção à membrana plasmática. As pectinas estão envolvidas nos processos de crescimento e desenvolvimento da planta, e amadurecimento de frutos (Thakur *et al.*, 1997). Tem sido mostrado que a matriz de pectina determina a porosidade da parede celular (McCann & Roberts, 1996).

As principais fontes de pectinas incluem polpa de maçã, casca de frutas cítricas, beterraba, resíduos das sementes de girassol e outras frutas como goiaba, maracujá, banana e manga, entre outras (Thakur *et al.*, 1997).

Todas as moléculas de pectina contêm segmentos lineares de unidades piranosídicas de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo α (1 \rightarrow 4), com alguns dos grupos carboxila esterificados com metanol. Unidades de α -L-ramnose piranosídica ocorrem como pontos de inserção dentro do esqueleto de ácido galacturônico, onde vários açúcares neutros são ligados formando cadeias laterais (Rolin, 1993). Estes açúcares presentes nas cadeias laterais incluem D-galactose, L-arabinose, D-xilose e L-fucose (Rombouts & Thibault, 1986). Os constituintes neutros mais comuns das cadeias laterais, D-galactose e L-arabinose,

são também encontrados formando galactanas, arabinanas e arabinogalactanas. Arabinanas consistem de unidades de L-arabinose α -(1 \rightarrow 5) ligadas, dispostas em uma estrutura altamente ramificada. Ao contrário, as galactanas são compostas por unidades de D-galactose β -(1 \rightarrow 4) ligadas em uma forma relativamente linear (Hwang e Kokini, 1991).

Por degradação enzimática ficou estabelecido que muitas das cadeias laterais estão localizadas em relativamente pequenas proporções de cadeia principal, distinguindo duas regiões distintas na molécula de pectina: região “hairy”, que corresponde à região com grande número de cadeias laterais, e região “smooth”, relativa à região isenta de cadeias laterais (Rombouts & Thibault, 1986).

Os segmentos formados apenas por unidades de ácido α -D-galacturônico (região “smooth”), com variados graus de esterificação, são chamados de homogalacturonanas, enquanto que as regiões ricas em unidades de ramnose, de onde partem as cadeias laterais, são classificadas como ramnogalacturonanas do tipo I (RG I). Estas são heteropolímeros de unidades repetidas de (1 \rightarrow 2) α -L-ramnose- (1 \rightarrow 4) ácido α -D-galacturônico, responsáveis pela complexidade química e estrutural das substâncias pécticas. Como mostra a Figura 13, as inserções de unidades de ramnose são incompatíveis com a conformação regular do esqueleto de ácido galacturônico e por isso nestas inserções ocorrem dobras na estrutura do polímero (Thakur *et al.*, 1997).

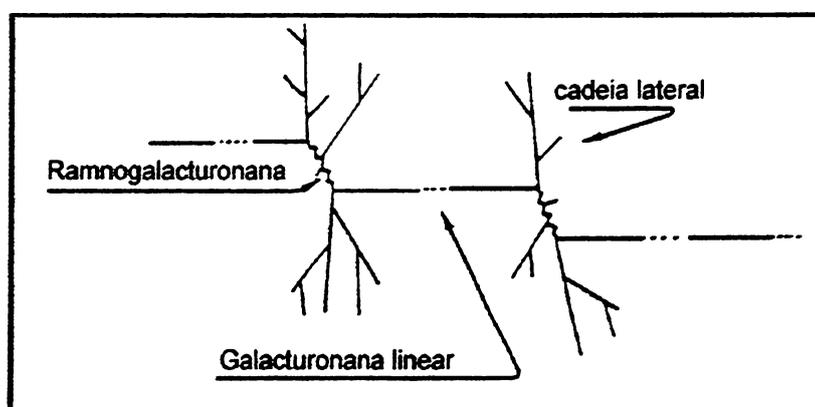


Figura 13: Representação esquemática da estrutura de uma pectina mostrando a região ramificada (ramnogalacturonana e cadeias laterais), a região linear (galacturonana linear), e a dobra na estrutura entre estas duas regiões (Fonte: Thakur *et al.*, 1997)

Ramnogalacturonanas que apresentam monossacarídeos raros nas cadeias laterais, tais como apiose, 2-*O*-metil-L-fucose, 2-*O*-metil-D-xilose, ácido-3-deoxi-D-mano-octulosônico, ácido-3-deoxi-D-heptulosárico e ácido acérico, além de monossacarídeos comuns, são classificadas como ramnogalacturonanas do tipo II (RG II). Estas estruturas têm sido encontradas em produtos derivados de compostos como vinho, suco de maçã e suco de tomate, após tratamento enzimático, como remanescentes do processamento das frutas (Schols *et al.*, 1990; Pellerin *et al.*, 1996).

Pectinas podem formar gel por dois mecanismos. Aquelas com alto grau de esterificação requerem uma concentração relativamente alta de sólidos solúveis (sacarose, por exemplo) e um baixo pH. Pectinas com baixo grau de esterificação requerem apenas a presença de cátions divalentes para haver a interação entre as cadeias e a geleificação (Rolin, 1993).

Pectinas altamente metoxiladas requerem concentrações de sacarose superiores a 65%. Este excesso de sacarose diminui a interação solvente-polímero, e as associações polímero-polímero são favorecidas. Entretanto, este aumento na interação entre polímeros não é suficiente para resultar na formação de gel devido às repulsões de carga entre moléculas de pectina negativamente carregadas. Isto é sobrepujado pela diminuição do pH da solução para níveis inferiores a 4,0, o que suprime a ionização dos grupamentos carboxila (Dea, 1993).

Pectinas com baixo grau de esterificação formam géis firmes do mesmo modo que os alginatos. Sequências de ácido poligalacturônico mostram ligações cooperativas ao cálcio em cadeias com número de unidades acima de 14-16 unidades. A geleificação e ligação de cálcio pelas pectinas pouco metoxiladas se dá pela formação de uma estrutura semelhante à “caixa de ovo”, mecanismo similar ao da geleificação do alginato. A força deste tipo de gel é drasticamente reduzida em estudos de inibição competitiva pela adição de blocos de ácido poligalacturônico. Segundo Dea (1993), o mecanismo de ligação em géis de pectato de cálcio se faz por zonas de junção envolvendo dimerização de cadeias mediadas por cálcio.

O uso de pectinas em alimentos é permitido em todos os países do mundo por ser um aditivo seguro sem dose/diária limite, sendo que a quantidade a ser usada depende apenas da textura desejada a um determinado produto. Estes polímeros podem ser utilizados em grande número de alimentos, atuando como agentes geleificantes, espessantes, emulsificantes, estabilizantes e, recentemente, como substituintes de açúcar e gordura em alimentos dietéticos. Esta multifuncionalidade das pectinas se origina da natureza de suas moléculas, as quais possuem regiões polares e não-polares que tornam possível sua incorporação em

diversos sistemas alimentícios. Podem ser usadas em alimentos como geléias, sobremesas, bebidas dietéticas e molhos (Thakur *et al.*, 1997).

Em produtos farmacêuticos pode agir como uma substância natural contra envenenamento com cátions tóxicos, atuando efetivamente na remoção de chumbo e mercúrio do trato gastrointestinal e respiratório. Se injetada intravenosamente, a pectina encurta o tempo de coagulação, sendo útil no controle de hemorragia e sangramento local, ao contrário da pectina sulfato que pode ser usada como substituinte da heparina, atuando como anticoagulante. Tem sido também publicado a ação da pectina na redução dos níveis de colesterol no sangue, sendo que o consumo de no mínimo 6g/dia seria necessário para haver redução significativa do colesterol (Thakur *et al.*, 1997).

1.4. Reologia de produtos obtidos de frutas

A caracterização e a análise do comportamento de fluxo de produtos fluidos de frutas tem sido assunto de numerosos estudos com o objetivo de obter dados para controle de qualidade, melhor entendimento da textura dos produtos, bem como controlar a consistência desejada (Mizrahi, 1979; Ibarz *et al.*, 1995).

As características de fluxo de produtos fluidos de frutas depende muito de sua composição, sendo o conteúdo de partículas de fruta um dos mais importantes fatores. Desta forma, o uso de parâmetros reológicos pode ser utilizado como instrumento na determinação do conteúdo de fruta presente em produtos tais como geléias (Carbonell *et al.*, 1991).

O comportamento reológico de sucos depende do seu conteúdo de polpa, pectina e de sólidos solúveis como a sacarose. Concentrados despectinados e clarificados mostram comportamento newtoniano, enquanto sucos com pectina e/ou conteúdo de polpa podem ser descritos por vários outros modelos reológicos (Ibarz *et al.*, 1995).

Saravacos (1970) analisou a viscosidade aparente de dois tipos de sucos de maçã: apenas filtrado (“cloudy”) e despectinizado enzimaticamente. A fração despectinizada mostrou comportamento Newtoniano, enquanto que a fração filtrada apresentou comportamento pseudoplástico, sendo que ambas apresentaram um decréscimo na viscosidade com a elevação da temperatura. A análise com aumento de temperatura também

foi realizada com purês de pêssego, pêra e maçã, sendo que o decréscimo progressivo da viscosidade também foi observado com a elevação da temperatura.

Khalil *et al.* (1989) investigaram o comportamento de fluxo de suco de banana despectinizado enzimaticamente e concentrado. Foi constatado que este suco despectinizado comportou-se como um fluido newtoniano em todas as concentrações, apresentando maior valor de viscosidade com o aumento da concentração. O efeito da temperatura sobre a viscosidade do suco despectinizado foi avaliado, com um decréscimo na viscosidade ocorrendo com o aumento da temperatura, sendo este efeito mais pronunciado em mais altas concentrações.

Ibarz *et al.* (1989) reportaram o comportamento reológico de suco de pêra comercializado, despectinizado enzimaticamente e seqüencialmente clarificado por sedimentação e filtração. Este suco comportou-se como um líquido newtoniano, mostrando um aumento nos valores de viscosidade absoluta com o aumento da concentração. Ao se aplicarem diferentes e crescentes temperaturas sobre cada concentração, foi verificado queda na viscosidade com o aumento da temperatura.

Ibarz *et al.* (1995) desenvolveram estudos reológicos com suco de kiwi a fim de verificar a influência da temperatura sobre a consistência do suco, mostrando o decréscimo da consistência com o aumento da temperatura. Além disso, foi constatado que o aumento do conteúdo sólido solúvel em uma dada temperatura causa um aumento na consistência, e as amostras tornam-se mais viscosas.

Carbonell *et al.* (1991) caracterizaram o comportamento de fluxo de geléias de quatro diferentes frutas: morango, pêssego, ameixa e damasco. Produtos finais de cada fruta, em concentrações de 30 e 50% de conteúdo de polpa, foram analisados quanto à viscosidade e tipo de fluxo, a fim de avaliar a influência do conteúdo de polpa sobre os parâmetros reológicos. Os resultados revelaram um comportamento mais pseudoplástico para as amostras mais concentradas (50% de conteúdo de polpa).

Guerrero & Alzamorra (1998) verificaram que o comportamento de fluxo de purês de pêssego, manga e mamão foi similar mostrando pequenas alterações com a variação na temperatura e pH. No entanto, com a adição de açúcar (glucose) houve um aumento na viscosidade reduzida dos purês de manga e mamão, enquanto que no purê de pêssego a adição de glucose teve pouca influência. Os autores afirmam que o conteúdo de pectina nestas frutas poderia ser uma razão para as diferenças reológicas observadas: no pêssego a principal fração

de pectina é constituída de protopectina (complexo macromolecular insolúvel onde cadeias individuais de pectina são unidas por ligações cruzadas, formando um gel com água nos interstícios da macromolécula), enquanto que na manga e no mamão as frações de pectina solúveis em água e em solvente quelante são as principais. As características de fluxo dos purês de manga e mamão mostraram a mesma dependência de glucose que as soluções aquosas de pectinas altamente metoxiladas, ou seja, aumento da viscosidade reduzida com o aumento da concentração de açúcar.

Piñera *et al.* (1997) realizaram a análise do comportamento reológico de polpa de goiaba de diferentes variedades, a fim de verificar possíveis diferenças de consistência entre elas. A análise dos valores de viscosidade aparente das diferentes variedades indicou que nem todas poderiam ser utilizadas na fabricação de polpa (valores de viscosidade aparente entre 15 e 16 Pa.s foram considerados adequados). Foi sugerido como explicação diferenças nos conteúdos de pectina e outros polissacarídeos, além de diferentes tamanhos e formas dos polímeros em cada variedade da fruta.

Isaacs *et al.* (1988) desenvolveram pesquisas com suco de maracujá com o intuito de verificar as condições adequadas para a estabilidade durante o armazenamento. O suco de maracujá pasteurizado a ser comercializado requer armazenamento e transporte a baixa temperatura, o que aumenta os custos. Foi verificado que, devido à acidez da fruta, torna-se mais fácil o armazenamento do concentrado da fruta, possibilitando resistência a ataques microbianos e manutenção do sabor. A investigação indica que o concentrado pode ser guardado em temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por seis meses, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por três meses e $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um mês.

Senter *et al.* (1993) investigaram a qualidade do suco de maracujá de diferentes espécies (*Passiflora edulis* e *Passiflora incarnata*), e de um híbrido das duas espécies. Foi verificado que o nível de acidez e a quantidade de sólidos solúveis foram mais altas no híbrido do que na espécie *P. incarnata*. O híbrido proporcionou menor rendimento de suco por fruta do que a espécie *P. edulis*. Este estudo foi realizado para verificar as vantagens de produção de determinada espécie em uma região de clima temperado.

Cooper *et al.* (1992), pela desramificação enzimática de arabinana isolada de beterraba, obtiveram um polímero linear capaz de produzir um gel 80 vezes mais forte em uma concentração de 20% do que em concentração de 10%. Além disso, ambos os géis apresentaram-se com potencial para serem utilizados como substituintes de gordura (“fat

replacement”) pelas suas características de gel coesivo e ao mesmo tempo expansivo (“spreadable”).

1.5. Manga

A manga (*Mangifera indica* L.) pertence à família Anacardiaceae, e é nativa da Ásia tropical, sendo a única espécie do gênero bem conhecida horticulturalmente. É extensivamente cultivada nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África e América (ITAL, 1981).

Descrita como a mais apreciada fruta dos trópicos, a manga é de grande interesse econômico por sua posição no mercado de frutas no mundo: quinto lugar em termos de produção e segundo em preferência entre as frutas tropicais, sendo a Índia o maior produtor mundial (10 milhões de toneladas/ano, cerca de 60% da produção mundial) (Ollé *et al.*, 1996). Considera-se que a exportação de polpa de manga da Índia para outros países abrange cerca de 62% do total de exportações de frutas e verduras (Sreenath *et al.*, 1995).



Figura 14: Frutos de *Mangifera indica* L.

O Brasil é o segundo maior produtor de manga da América Latina. A produção é bastante difundida em 8 estados, com mais de 2.000 hectares em cada de área plantada.

Destes 8 estados, São Paulo e Minas Gerais lideram com 50% de toda a área plantada do país, seguidos pelos estados do Piauí, Bahia, Paraíba, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Segundo dados do IBGE, a produção anual de manga no Brasil é de aproximadamente 700 mil toneladas (IBRAF, 1995).

Mais de 14 milhões de toneladas da fruta são produzidas no mundo, sendo que, com o aumento na produção de manga no sul da Flórida, o consumo da fruta nos Estados Unidos cresceu devido ao aumento da disponibilidade das variedades Keitt e Tommy Atkins (Mitcham & McDonald, 1992).

Há centenas de variedades de manga, sendo que nem todas são cultivadas em escala comercial (MacLeod & Pieris, 1984). No Brasil há cerca de 500 variedades, sendo que na Índia são reconhecidas mais de 1.000 variedades (ITAL, 1981).

A maior parte da produção mundial é consumida cru como sobremesa, e o restante é destinado ao processamento gerando diversos produtos tais como néctar, sucos, enlatados, molhos e outros (Ollé *et al.*, 1996).

Alguns estudos a respeito da estrutura química de polissacarídeos de manga vêm sendo realizados a fim de elucidar as diferenças de composição das frutas verdes e maduras. Isto porque a manga sofre amadurecimento e amolecimento muito rápido, e a perda de firmeza da fruta aumenta a susceptibilidade à injúria durante transporte e armazenamento. O amolecimento de frutos carnosos ocorre primariamente devido a modificações na parede celular, e análises da composição da parede celular em diferentes estágios de amadurecimento têm sido desenvolvidas (Mitcham & McDonald, 1992).

Brinson *et al.* (1988) avaliaram as mudanças estruturais nos polissacarídeos de alta massa molecular de parede celular de células de mesocarpo de manga variedade Ngowe durante o amadurecimento da fruta. Foi constatado que em frutos verdes há um maior rendimento de polímeros de parede celular em comparação com frutos maduros, havendo uma marcada redução nos conteúdos de arabinose, galactose e ácido galacturônico das paredes celulares do mesocarpo durante o amadurecimento, indicando perda no conteúdo de pectina. A perda acentuada de arabinose e galactose no processo de maturação geraria um material com uma maior quantidade proporcional de ácido galacturônico, solúvel em água fria. Foi também verificado que o material hemicelulósico presente na parede celular sofreu pequenas modificações em comparação com o material péctico.

Ollé *et al.* (1996) estudaram os polissacarídeos solúveis de quatro variedades diferentes de manga: Amélie, Palmer, M'Bingue e Tête de Chat. Foi verificado que esses polissacarídeos solúveis eram essencialmente pécticos de acordo com seu alto conteúdo de ácido urônico (de 50 a 60%) e predominância de arabinose e galactose como açúcares neutros. Um alto grau de metil esterificação foi observado para os quatro cultivares. O conteúdo de material de parede celular da polpa de manga foi comparável àquele encontrado na casca da maçã e no endocarpo e mesocarpo de goiaba.

Mitcham & McDonald (1992) analisaram o processo de amolecimento de dois cultivares de manga crescidos na Flórida: Keitt e Tommy Atkins. Os estudos mostraram um decréscimo constante nos conteúdos de arabinose, ramnose e galactose em ambos os cultivares, bem como um aumento na quantidade de uronídeos solúveis com o amadurecimento. Este aumento de uronídeos solúveis foi mais acentuado nos primeiros estágios de amadurecimento, sendo acompanhado por decréscimo contínuo do conteúdo de pectina na parede celular. A atividade de poligalacturonase foi similar para as duas variedades quando comparada com a atividade desta enzima em outras variedades de manga. Considerável decréscimo na massa molecular de frações hemicelulósicas durante o amadurecimento ocorreu nas duas variedades da fruta, podendo ser em parte devido à atividade da celulase, que foi detectada na variedade Tommy Atkins.

Muda *et al.* (1995) também investigaram as mudanças na parede celular do mesocarpo de manga durante o amadurecimento, e verificaram que as mudanças freqüentemente mais aparentes envolvem o aumento da solubilidade de pectinas, o decréscimo de massa molecular destas pectinas e a perda de açúcares pécticos neutros tais como galactose e deoxi hexoses. Os polímeros solúveis extraídos de frutos em processo de maturação apresentaram uma progressiva despolicimerização, resultando em decréscimo de massa molecular e aumento da polidispersidade destes polímeros. A perda de galactose durante o amadurecimento foi correlacionada com a aumentada atividade da enzima β -galactosidase na manga durante a sua maturação.

Ketsa *et al.* (1999) avaliaram a perda de firmeza de mangas mantidas a temperatura ambiente após colheita, e de mangas resfriadas a 4°C pelo período de uma a três semanas. O retardo na perda de firmeza das frutas submetidas a resfriamento foi atribuído ao decréscimo

na atividade das enzimas poligalacturonase e β -galactosidase durante este período, que segundo os autores pode ser devido ao decréscimo na síntese destas enzimas.

Kratchanova *et al.* (1991) estabeleceram comparações entre pectinas extraídas da polpa e da casca de manga das variedades Ceni e Springfield, em termos de rendimento de substâncias pécticas, quantidade de poliuronídeos, conteúdo de aminoácidos ligados e composição monossacarídica. O material péctico extraído da casca de ambas as variedades apresentaram maior rendimento quando comparado ao material extraído da porção carnosa da fruta. O conteúdo de poliuronídeos foi ligeiramente maior nas pectinas obtidas da casca para a variedade Ceni, e igual ou menor nas pectinas obtidas da casca na variedade Springfield. O conteúdo de aminoácidos ligado às pectinas das duas variedades foi quantitativa e qualitativamente semelhante, enquanto que a composição monossacarídica de pectinas extraídas da casca das duas variedades apresentaram algumas diferenças quantitativas. A variedade Sprigfield mostrou-se com conteúdo significativamente maior de unidades de D-glucose, e ligeiramente maior de unidades de D-xilose e D-galactose.

Würsch & Hood (1981) isolaram amido do caroço de manga da variedade Alphonso, fracionando-o posteriormente em amilose e amilopectina. A amilopectina apresentou uma estrutura molecular muito semelhante àquelas reportadas para amidos de outras fontes. As moléculas de amilose apresentaram ramificações contendo um número significativo de unidades de glucose. Os grânulos de amido, quando observados em microscópio eletrônico, mostraram-se em forma elipsoidal, com pequenas ondulações em sua superfície externa, semelhante aos grânulos de amido de milho e sorgo.

Arogba (1999) obteve farinha do caroço de manga, e analisou-a em termos de composição química e em um modelo de sistema alimentício onde poderia atuar como substituinte para a farinha de trigo em biscoitos. Foi demonstrado que a farinha obtida do caroço de manga da variedade Ikanekpo apresentou menos umidade e menor conteúdo de proteínas, com maiores porcentagens de gordura, fibras e resíduos do que a farinha de trigo normalmente utilizada. O conteúdo total de carboidratos para as farinhas de ambas as fontes foi similar ($710 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), com amido constituindo cerca de $500 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Segundo o autor, biscoitos produzidos com 50% de farinha de trigo e 50% de farinha de caroço de manga apresentaram boa aceitabilidade e ainda ótima suplementação em proteína e aumentado conteúdo energético, quando comparados com biscoitos feitos unicamente à base de trigo.

As variedades de manga exibem aromas e sabores característicos que as distinguem entre si, e muitos estudos têm sido realizados a esse respeito. MacLeod & Pieris (1984) avaliaram a variação de aroma em três diferentes cultivares do Sri-Lanka (Parrot, Willard e Jaffna) cultivados em diferentes épocas do ano, e verificaram a presença de diferentes compostos químicos nas três variedades. Ramteke & Eipeson (1997) estudaram a estabilidade do aroma concentrado extraído da variedade Alphonso usando antioxidantes durante um determinado período de armazenamento, verificando que o antioxidante mais efetivo foi o sulfito de sódio. El-Nemr & Ismail (1988) analisaram suco de manga após engarrafamento e durante armazenamento de 2 a 4 meses, a fim de monitorar as mudanças no aroma do produto. Foi verificado que o processamento do suco a quente e o seu armazenamento levaram à formação de derivados químicos não encontrados no suco fresco, sendo, portanto, fatores contribuintes para a alteração no aroma do suco.

Devido a sua natureza viscosa, a polpa de manga não pode ser prensada para produção de suco. O uso de enzimas para reduzir a viscosidade é particularmente útil em liquefazer a polpa de manga e obter maior quantidade de suco e com baixa viscosidade. Sreenath *et al.* (1995) testaram preparações comerciais de pectinase (Pectinex) e celulase (Celluclast) em polpas de manga das variedades Alphonso, Totapuri, Neelum, Malgoa e Raspuri, em diferentes concentrações e por tempo variado. A preparação Pectinex revelou maior eficiência na redução da viscosidade das polpas do que a preparação Celluclast, e a combinação de ambas as enzimas foi cerca de 10% mais eficiente que a pectinase. A variedade Raspuri apresentou maior rendimento de suco que as demais variedades quando as mesmas condições de tempo e concentração de enzima foram utilizadas.

De acordo com Larrauri (1999), estudos sobre fibras dietéticas têm sido desenvolvidos com frutas, inclusive com subprodutos de manga. O autor afirma que, embora fibras dietéticas de cereais sejam mais frequentemente usadas do que fibras de frutas, estas apresentam melhor qualidade devido ao maior conteúdo de fibras solúveis, maior capacidade de reter água e menor conteúdo calórico. Foi verificado que os processos de lavagem e secagem dos materiais extraídos das frutas são as etapas que exigem maior controle a fim de minimizar perdas no conteúdo de fibras solúveis e na atividade biológica de compostos associados tais como flavonóides, polifenóis e carotenóides.

1.5.1. Estudos reológicos

Produtos extraídos de manga, além de serem estudados quanto a sua composição, têm sido objeto de estudos reológicos, assim como vários produtos obtidos de outras frutas com interesse comercial.

Rao *et al.* (1985) analisaram o comportamento pseudoplástico de polpa de manga da variedade Alphonso em diferentes concentrações, e em temperaturas variadas. Foi verificado que o aumento da concentração era diretamente proporcional ao aumento da viscosidade absoluta e que a temperatura, ao contrário, era inversamente proporcional, isto é, com o aumento da temperatura havia uma sensível queda na viscosidade. Os autores tiveram por objetivo determinar o coeficiente de consistência (K) e o índice de comportamento de fluxo (n) da polpa de manga através destes estudos, utilizando para isso variações na temperatura e concentração. Estes índices foram calculados através da equação denominada “power law model”: $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$, onde τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ é a velocidade de cisalhamento, K é o índice de consistência e n é o índice de comportamento de fluxo. Este modelo é extensivamente usado para relacionar tensão e velocidade de cisalhamento em fluidos pseudoplásticos, e valores típicos de K e n para muitos alimentos são encontrados na literatura. Enquanto o índice de consistência (K) é uma função da concentração e temperatura (o valor de K aumenta com o aumento da concentração, e diminui com a elevação da temperatura), o índice de comportamento de fluxo (n) é constante em todas as condições, sendo que valores maiores indicam uma tendência do fluido a assumir comportamento newtoniano. Neste estudo, o valor numérico de n encontrado para polpa de manga foi de 0,314, apresentando-se em concordância com o valor encontrado por Rao *et al.* (1974).

Gunjal & Waghmare (1987) avaliaram o efeito da composição, velocidade de cisalhamento e temperatura sobre as características viscosimétricas da polpa, suco e néctar das variedades de manga Baneshan e Neelum. Os valores de viscosidade absoluta da polpa de ambas as variedades foram maiores que os do suco, e a viscosidade absoluta deste maior que a do néctar, quando estes produtos foram submetidos a mesma velocidade de cisalhamento e mesma temperatura. O maior conteúdo de sólidos insolúveis e pectina na polpa justificaria a maior viscosidade apresentada. Comparativamente, os valores de viscosidade absoluta para a polpa, suco e néctar em condições de velocidade e temperatura semelhantes, foram maiores

para a variedade Neelum. Pronunciado decréscimo na viscosidade foi constatado com o aumento da velocidade de cisalhamento, indicando comportamento pseudoplástico em todos os casos. A viscosidade decresceu consideravelmente para todos os produtos das duas variedades com o aumento da temperatura.

Dando continuidade aos dois estudos descritos acima, Manojar *et al.* (1990) estudaram as propriedades de fluxo da polpa de manga, analisando-as em diferentes temperaturas, e diferentes conteúdos de pectina e sólidos solúveis. A polpa de manga íntegra apresentou maior coeficiente de consistência (K) que a polpa de manga despectinizada enzimaticamente (1g de TRIZYME para cada 100g de polpa), sendo que a redução no conteúdo de pectina em 5,7% reduziu a viscosidade absoluta em 48%. Os resultados mostraram que, para polpa de manga despectinizada em uma mesma concentração de sólidos solúveis, houve queda nos valores de índice de consistência (K) proporcionalmente à despectinização. Para um mesmo conteúdo de pectina e sólidos solúveis, o aumento da temperatura levou ao declínio nos valores de K. O valor encontrado para o índice de comportamento de fluxo (n) não foi alterado com a variação no quantidade de sólidos solúveis, pectina e temperatura, assumindo um valor de 0,286. Os autores comentam que as variações no valor de n para polpa de manga em diferentes trabalhos podem ser devidas à variedade da fruta, composição da polpa e método de medida.

Bhattacharya & Rastogi (1998) estudaram o efeito do tratamento enzimático com pectinase (Novo Pectinex 3XL) sobre polpa de manga da variedade Totapuri em diferentes tempos (30-150 min) e temperaturas (25-60 °C) de tratamento, e em várias concentrações de enzima (0,005 – 0,095%), com a finalidade de obter informações detalhadas sobre o estado reológico do produto nas diferentes condições de ação enzimática. Assim como Sreenath *et al.* (1995), os autores deste trabalho mencionam a importância da redução da viscosidade da polpa a fim de aumentar o rendimento na produção de suco. Foi constatado que a polpa bruta apresentou comportamento pseudoplástico, assim como a polpa tratada enzimaticamente. Esta apresentou característica pseudoplástica possivelmente devido à presença de materiais insolúveis em suspensão e ao amido presente na polpa de manga, que não poderiam ser degradados pela pectinase. Entretanto, a viscosidade absoluta decresceu na polpa tratada, provavelmente porque o material péctico íntegro possui alta capacidade de adsorver água e desenvolver com isso uma estrutura em rede coesiva, estrutura esta que é desintegrada pela ação da enzima. Um aumento no tempo de tratamento e/ou concentração de enzima foi

associado com o decréscimo na viscosidade da polpa, e a ação da temperatura sobre a viscosidade absoluta foi negativa. Foi verificado que um aumento no tempo de ação e/ou concentração de enzima induz a um aumento no valor do índice de comportamento de fluxo (n), indicando que a polpa tende a comportar-se como um fluido newtoniano. O coeficiente de consistência (K), definido como sendo igual à viscosidade absoluta em velocidade de cisalhamento de $1s^{-1}$, decresceu marcadamente com o aumento da concentração da enzima, independentemente do tempo e temperatura do tratamento enzimático. Concluiu-se, portanto, que as diferentes condições de tempo e temperatura de tratamento, e a concentração de enzima afetam diretamente os diferentes parâmetros reológicos (viscosidade absoluta, n e K).

Bhattacharya (1999) estudou o comportamento reológico da polpa de manga da variedade Totapuri, e verificou tratar-se de um fluido com propriedades tixotrópicas. Tixotropia descreve o comportamento de substâncias que mudam de um estado de alta viscosidade para uma viscosidade menor como resultado do cisalhamento exercido por um determinado período de tempo, e que recuperam parte da sua viscosidade original quando o material é mantido em repouso. O autor comenta que a perda de viscosidade com o cisalhamento poderia ser devido à quebra inicial de flóculos ou ainda pela orientação ou deformação da estrutura de sólidos suspensos.

Gowda *et al.* (1994) compararam as características físico-químicas e de processamento de quatro variedades de híbridos de manga, Arka Aruna (H-10), Arka Puneet (H-13), Arka Anmol (H-17-3) e (H-51), com dois cultivares comerciais, Alphonso e Totapuri. Em termos de viscosidade absoluta, os autores encontraram valores inferiores para os sucos processados (enlatados) quando comparados aos valores da polpa das respectivas variedades. A polpa extraída da variedade Totapuri apresentou a maior viscosidade sendo seguida pela variedade híbrida Arka Puneet, Alphonso e Arka Anmol. Desses resultados os autores concluíram que os híbridos Arka Puneet e Arka Anmol poderiam ser usados para a preparação suco processado por apresentarem qualidades comparáveis às da variedade Alphonso, um dos principais cultivares comercializados devido a sua excelente qualidade e aroma.

A polpa de manga, de acordo com o exposto acima, tem sido alvo de inúmeros trabalhos realizados com o intuito de caracterizar este produto como um todo, tanto do ponto de vista de composição química como do ponto de vista reológico. No entanto a investigação do comportamento reológico dos polímeros isolados desta fruta é ainda pouco discutida.

A elevada produção de manga no país e, conseqüentemente, a disponibilidade de seus produtos, e ainda a análise restrita com relação às características reológicas de seus polímeros, estimulou a investigação da estrutura química e propriedades reológicas dos componentes polissacarídicos da manga presentes na fração solúvel da polpa industrializada, com o intuito de obter e caracterizar um material com potencial aplicação em diferentes produtos comerciais.

———— *OBJETIVOS* ————

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral investigar a estrutura de polissacarídeos obtidos de polpa de manga, bem como analisar seu comportamento reológico, de acordo com os seguintes objetivos específicos:

1. Isolamento e análise estrutural de polissacarídeos de polpa industrializada de manga, através de técnicas químicas, e físico-químicas de espectroscopia de ^{13}C -RMN e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).
2. Análise das características reológicas da fração solúvel principal obtida da polpa de manga, por meio dos seguintes parâmetros:
 - caracterização do comportamento de fluxo;
 - determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$);
 - determinação da concentração crítica (c^*);
 - análise do comportamento viscoelástico do material através de medidas reológicas de tensão temporária no sistema estático (“creep and recovery”), e medidas dinâmicas oscilatórias (G' e G'').

*MATERIAIS E
MÉTODOS*

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção da polpa

A polpa de manga foi fornecida pela empresa Fruteza S/A, localizada em Dracena-SP. As frutas utilizadas na fabricação da polpa foram provenientes de vários produtores do oeste paulista, e incluem as variedades Bourbom, Tommy Atkins, Espada e Coquinho. Após lavagem, as frutas foram primeiramente cortadas em fatiadores e em seguida as rodela obtidas foram processadas em batedouros, onde as cascas e os caroços foram separados da polpa com o auxílio de duas peneiras de diferentes porosidades. Neste processamento industrial, as cascas e as sementes não são trituradas, e portanto estima-se que na polpa (mesocarpo da fruta homogeneizado) haja menos de 0,5% de resíduos da casca e caroço como contaminantes.

3.2. Obtenção e purificação dos polissacarídeos

A polpa foi centrifugada em centrífuga Hitachi Himac CR21E a 30.200g por 15 minutos, em temperatura de 20°C (Esquema I, p. 58).

O precipitado foi separado, lavado com água destilada e centrifugado nas mesmas condições três vezes sucessivas. Posteriormente foi lavado com etanol comercial e seco em estufa a vácuo, à temperatura ambiente. O sobrenadante 1 foi submetido a nova centrifugação por 4 horas a 22.200g, em temperatura de 20°C, para remoção de resíduos insolúveis restantes.

Ao sobrenadante 2 foi adicionado 2 volumes de etanol comercial, sob agitação vigorosa e constante. A separação do polissacarídeo precipitado (fração solúvel 1 – FS1) foi feita por filtração em tecido limpo e seco, e a secagem foi em estufa à vácuo, à temperatura ambiente.

Obtido o polissacarídeo solúvel bruto (fração FS1) seco, 1g foi solubilizado em 500mL de água destilada durante 15 horas à temperatura ambiente (concentração de 2g/L), e a

solução filtrada em membranas de nitrocelulose de porosidade decrescente (3,0; 0,8 e 0,45 μ m). Este filtrado foi submetido a 2 horas de centrifugação a 22.200g em temperatura de 20°C para remoção de resíduos insolúveis remanescentes. Subseqüentemente foi adicionado aos 500mL de solução, 5g de cloreto de sódio (NaCl), e então 1 ½ V de etanol comercial sob agitação vigorosa. O precipitado obtido sofreu lavagens sucessivas com gradiente de etanol (70% - 100%). O material foi seco em estufa a vácuo em temperatura ambiente e denominado fração solúvel 2 (FS2).

3.3. Preparo das soluções para as análises reológicas

A fração FS2-B (fração obtida da segunda partida de polpa de manga, com a qual foram desenvolvidos os estudos reológicos) foi pesada com precisão em balança analítica e solubilizada sob agitação moderada em solução de NaCl 0,01 mols . L⁻¹. A solubilização foi realizada por um período de 1 hora e trinta minutos para soluções de 0,5 a 5g/L , e de 3 horas e trinta minutos para soluções acima de 5 g/L, para garantir completa solubilização. As amostras foram solubilizadas em banho-maria com temperatura controlada de 30 - 40°C, não ultrapassando 40°C. As amostras foram mantidas em repouso por 1 hora antes do início das análises, em temperatura ambiente.

3.4. Hidrólise ácida total

A amostra a ser hidrolisada foi solubilizada em 1 mL de água destilada e em seguida foi adicionado 1 mL de ácido trifluoracético (TFA) 2 mols . L⁻¹, permanecendo a solução em banho-maria a 100°C por 5 horas.

Após a hidrólise o TFA foi totalmente evaporado em capela à temperatura ambiente e as amostras foram lavadas com água destilada até a remoção total do ácido residual (Adams, 1969).

3.5. Redução

Os monossacarídeos resultantes da hidrólise ácida total foram reduzidos em presença de boroidreto de sódio (NaBH_4) (Wolfrom & Thompson, 1963a) em temperatura ambiente por pelo menos 3 horas.

Os íons hidreto (H^-) fornecidos pelo agente redutor (NaBH_4) reduzem os grupamentos carbonila da extremidade redutora dos monossacarídeos formando alditóis. O excesso de agente redutor é decomposto e os cátions Na^+ removidos pela adição de resina trocadora de cátions na forma ácida (Lewatit S-100). A solução foi filtrada em algodão e o filtrado evaporado até a secura. O ácido bórico formado foi removido pela adição de metanol ao sistema, ocorrendo a formação de borato de tetrametila, composto volátil eliminado em rotaevaporador.

3.6. Acetilação

Os alditóis resultantes foram acetilados (Wolfrom e Thompson, 1963b) pela adição de 0,5 mL de piridina (agente catalisador) e 0,5 mL de anidrido acético (agente acetilante), em um tubo de hidrólise hermeticamente fechado, por 24 horas à temperatura ambiente.

A adição de gelo ao sistema promove a interrupção da reação pela degradação do anidrido acético em excesso. Os acetatos de alditóis foram extraídos com clorofórmio (cerca de 3 mL) e o excesso de piridina foi complexado com sulfato de cobre (CuSO_4) 5% em água, formando sulfato de piridina, solúvel em água, sendo assim separado da fase clorofórmica e eliminado pelas sucessivas e intercaladas lavagens com água destilada.

A fase clorofórmica contendo os acetatos de alditóis foi coletada, e após evaporação total do clorofórmio em capela, a amostra foi analisada por cromatografia líquido-gasosa (g.l.c.).

3.7. Dosagem de açúcar total

A concentração total de açúcar presente nas frações foi determinada pelo método fenol – ácido sulfúrico (Dubois *et al*, 1956).

A absorvância foi medida em espectrofotômetro Spectronic ® 20 Genesys, em comprimento de onda de 490nm, utilizando-se como padrão solução de glucose (Sigma, nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL) para obtenção de uma curva de calibração. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.8. Dosagem de proteínas

A determinação da quantidade de proteína presente nas amostras foi feita pelo método de Hartree (Hartree, 1972), empregando a soroalbumina bovina (BSA-Sigma) para obtenção da curva padrão (concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL). A leitura em espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda de 650nm, em triplicata.

3.9. Dosagem de ácidos urônicos

As dosagens de ácido urônico das frações de interesse foram realizadas através do método de Blumenkrantz & Asboe-Hans (1973), tendo como solução padrão ácido glucurônico (Sigma, concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL).

A absorvância foi determinada em comprimento de onda de 520 nm, tendo as leituras sido feitas em triplicata.

3.10. Determinação qualitativa de amido

As frações em concentração de 10g/L foram submetidas a teste com lugol [iodo a 1% (m/v) e iodeto de potássio 5% (m/v)] para verificar a presença de amido no material. As

soluções a serem analisadas foram colocadas em uma superfície de vidro côncava (cerca de 5 mL) e 3 gotas de lugol foram adicionadas.

3.11. Obtenção da fração 4C-4

A fração FS2-B (200mg) foi solubilizada em água destilada (100mL) e submetida a 2 ciclos de centrifugação em centrífuga Hitashi Himac CR21E a 30.200g, por 2 horas cada ciclo, a 4°C. A cada ciclo, o sobrenadante obtido foi filtrado em membranas de nitrocelulose de porosidade 0,2 µm. Ao sobrenadante obtido após os 2 ciclos de centrifugação e filtragem, foi adicionado 1 ½ V de etanol comercial sob agitação vigorosa, e o precipitado resultante foi lavado em gradiente de etanol e seco em estufa a vácuo. Esta fração foi denominada 4C-4.

3.12. Hidrólise enzimática

A fração FS2-B foi submetida à hidrólise enzimática pela ação da enzima α -amilase salivar (diluição 1:10 em solução de NaCl 5mMols . L⁻¹). A amostra foi solubilizada em água destilada em uma concentração de 1%. O sistema permaneceu em incubação por 40 minutos em banho-maria a 37°C, e alíquotas foram coletadas no tempo 0 (antes da adição da enzima) e após 5, 10, 20 e 40 minutos. Estas alíquotas foram submetidas a teste com lugol. Em seguida foi adicionado etanol comercial ao sistema contendo polissacarídeo e enzima, e o precipitado obtido foi lavado exaustivamente com etanol para remoção de resíduos hidrolisados. Após secagem em estufa a vácuo a 20°C, a fração (FE) foi submetida à análise por SEC-MALLS e g.l.c..

3.13. Carbóxi-redução

O tratamento por carbóxi-redução foi realizado de acordo com o método de Taylor & Conrad (1972), porém controlando-se o pH do meio reacional com soluções tampão (Stone & Anderson, 1985).

A fração FS2-B (60 mg) foi solubilizada em tampão MES 0,2 mols.L⁻¹ pH 4,75, sob agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Durante este período foi adicionado em pequenas porções a carbodiimida (CMC), em uma proporção de 3 mg de CMC para 1 mg de polissacarídeo. A reação foi conduzida por mais 30 minutos de agitação, e neutralizada a pH 7,0 pela adição de tampão TES 2 mols.L⁻¹ pH 7,0. Em seguida foi adicionado boroidreto de sódio deuterado (NaBD₄) na proporção de 9 mg de NaBD₄ para 1 mg de polissacarídeo em pequenas quantidades, ainda sob agitação até a concentração de 2 mols.L⁻¹ ser atingida. Pequeno volume de octanol foi utilizado a fim de evitar formação excessiva de espuma. A solução ficou em repouso, e posteriormente foi dialisada contra etilenoglicol 10%, NaCl 0,5 mols.L⁻¹ e água destilada, sucessivamente.

Os polissacarídeos carbóxi-reduzidos foram hidrolisados com TFA 1 mol . L⁻¹, por 5 horas a 100°C, e analisados por g.l.c. e GC-MS na forma de acetatos de alditóis.

3.14. Teste de umidade

A fração FS2-B foi pesada com precisão em balança eletrônica analítica e 40 mg foram igualmente distribuídos em 4 viais (10 mg em cada vial). As amostras foram submetidas à secagem em estufa a 100°C, e a cada 24 horas foram pesadas na mesma balança. O procedimento se repetiu até que 2 pesagens consecutivas não diferissem entre si.

3.15. Polarimetria

A análise polarimétrica foi realizada em polarímetro Autopol®III com uma solução polissacarídica a 0,5%, em temperatura de 25°C. Para eliminar a turbidez da solução, esta foi

centrifugada a fim de se obter uma amostra passível de análise. A leitura foi feita utilizando-se um tubo de 1 dm de caminho óptico e os valores experimentais do ângulo de desvio da luz plano-polarizada, fornecidos pelo aparelho, foram utilizados para o cálculo da rotação óptica específica ($[\alpha]_D$), de acordo com a equação:

$$[\alpha]_D^{25} = \alpha / L \cdot c$$

onde

α = ângulo de desvio da luz plano-polarizada;

L = comprimento do caminho óptico, em dm;

c = concentração da solução, em g/mL.

3.16. Métodos cromatográficos

3.16.1. Cromatografia líquido-gasosa (g.l.c.)

A análise dos acetatos de alditóis foi realizada em cromatógrafo Hewlett Packard 5890 A Série II, com detector de ionização de chama (FID), e temperatura do detector e injetor de 250°C. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio em um fluxo de 2.0 mL/min, a 220°C, e a coluna capilar utilizada foi modelo DB-225 (Sloneker, 1972).

3.16.2. SEC-MALLS (Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de espalhamento de luz a laser com multiângulos)

As amostras foram solubilizadas em solução de nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol.L⁻¹ contendo azida de sódio (NaN_3) 200 ppm, em concentração de 3mg/mL, e filtradas em membranas de acetato de celulose nas porosidades de 0,45 e 0,2 μm sucessivamente. As amostras foram injetadas no sistema SEC-MALLS com detecção por índice de refração (RI)

WATERS modelo 2410 e pelo detector de espalhamento de luz a laser em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 canais acoplados em série. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de 1.10^6 , 4.10^5 , 8.10^4 e 5.10^3 , em série. O eluente foi o mesmo utilizado para a solubilização das amostras, com fluxo de 0,6 mL/min, pressão de 920 psi a 30°C, através de bomba peristáltica WATERS 515.

Foi também utilizado outro sistema (SEC-MALLS) em colaboração com o Laboratório de Física da Universidade de Tulane – New Orleans - USA, onde as amostras foram solubilizadas em concentração de 1 g/L em solução de nitrato de amônia (NH_4NO_3) 0,1 mol . L⁻¹, na qual azida de sódio 0,5 g/L foi adicionada como preservante. As análises foram executadas em equipamento de multidetecção consistindo de uma bomba isocrática HP 1100, refratômetro diferencial ANSPEC ECR-7522, espectrofotômetro UV/ visível Shimadzu SPV-10AV, fotômetro de espalhamento de luz a laser com multiângulos e um viscosímetro capilar baseado em um transdutor de pressão Validyne P55D adaptado por Dr. Wayne Reed (Reed, 1995). Duas colunas Shodex (OH-pakSB 804 e 806) foram conectadas em série e acopladas ao equipamento de multidetecção.

3.16.3. Fracionamento em coluna de troca iônica DEAE-Trisacryl Plus M

A fração 4C-4 (10g/L, em água deionizada) foi cromatografada em coluna de troca-iônica DEAE-Trisacryl Plus M (forma Cl^-) de 20 cm de altura por 1,7 cm de diâmetro, após lavagem exaustiva com água deionizada para remoção do excesso de NaCl utilizado para conservação da resina (controle realizado por gotejamento de nitrato de prata). A coluna foi eluída seqüencialmente com água deionizada e soluções aquosas de NaCl 0,5 e 1 mol.L⁻¹, e NaOH 0,5 mol.L⁻¹.

Após as eluições as frações foram neutralizadas (fração alcalina), dialisadas, concentradas, e liofilizadas. Todas as frações eluídas foram monitoradas em relação ao açúcar total pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al*, 1956).

3.17. Ressonância magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C - RMN)

As análises de ^{13}C -RMN das frações solubilizadas em óxido de deutério (D_2O) foram realizadas em tubo de 5mm de diâmetro, em espectrômetro Bruker modelo Avance-DRX-400 acoplado a um transformador de Fourier. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, e os espectros foram obtidos em 100 MHz, a 70°C.

3.18. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

As análises do tipo GC-MS foram feitas em cromatógrafo líquido-gasoso VARIAN, modelo 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNINGAM TRAP, modelo 410, utilizando coluna capilar OV-225. Hélio foi usado como gás de arraste em um fluxo de 2 mL/min, em temperatura inicial de 50°C, seguida de um gradiente de 1°C/min até 220°C (Harris, 1984).

3.19. Métodos Reológicos

As análises reológicas foram realizadas em reômetro HAAKE RS75 Rheostress acoplado a um banho termostatizado HAAKE K15 e termocirculador de água DC5B3. Os testes realizaram-se a uma temperatura constante de 25°C, tanto em sistema estático quanto em sistema dinâmico, e os sensores utilizados foram o cilindro-coaxial (DG 41AL) (Figura 15, p.52) para amostras nas concentrações de 0,5 a 10 g/L, e o cone-placa (C60/2°) (Figura 16, p.53) para soluções em maiores concentrações (acima de 10g/L).

Antecedendo as análises reológicas, a determinação da inércia do aparelho com o sensor a ser utilizado em posição, foi realizada para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos. Este procedimento se repetiu a cada troca de sensor. Os testes reológicos foram executados em triplicata, com as amostras sendo preparadas diariamente. Durante as análises a temperatura ambiente foi controlada e mantida entre 25 e 27°C.

3.19.1 Determinação das viscosidades absolutas (η)

a) Em sensor cilindro-coaxial

Para soluções poliméricas nas concentrações de 0,5 a 10 g/L, as viscosidades absolutas (η) foram medidas em sensor cilindro-coaxial (DG41 AL) do tipo Couette cuja capacidade é de 6,3 mL de amostra para cada análise.

Neste tipo de sensor o material fica contido em um espaço entre um cilindro interno (móvel) e uma cubeta cilíndrica externa (fixa), permanecendo entre dois cilindros concêntricos, conforme indicado na Figura 15. A geometria Couette foi designada para manipular fluidos de baixas viscosidades por apresentar uma grande superfície de contato que aumenta a sensibilidade de medida.

Neste sensor uma força de rotação é aplicada ao cilindro móvel mantendo-o em uma velocidade de rotação constante bem definida contra o arraste viscoso do fluido (Schott, 1992). O movimento do cilindro interno arrasta a camada de líquido mais próxima por atrito, e é transmitido à superfície do cilindro externo. Sabendo-se a velocidade de cisalhamento imposta pela rotação do cilindro interno, o torque aplicado pela amostra à superfície do cilindro externo permite a determinação da viscosidade do líquido (Schramm, 1994).

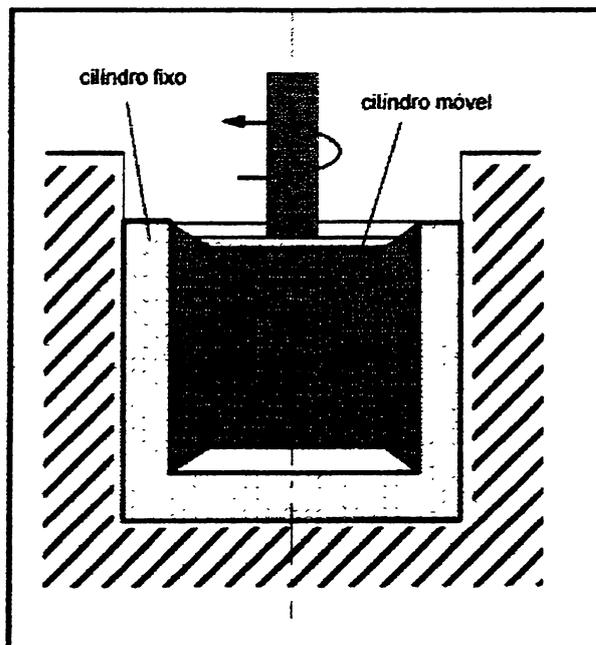


Figura 15: Esquema de um sensor de geometria do tipo cilindro-coaxial (adaptado de Schramm, 1994).

As soluções nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0 e 10 g/L foram submetidas às tensões de cisalhamento de 5, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 25 e 40 Pa, respectivamente, com os valores numéricos relativos às viscosidades absolutas correspondendo ao patamar newtoniano em uma velocidade de cisalhamento nula.

b) Em sensor cone-placa

O sensor cone-placa (C60/2°) foi utilizado para análise de soluções poliméricas em concentrações de 15, 20 e 30 g/L por ser suficientemente sensível nestas condições e ainda por necessitar de menor quantidade de amostra (cerca de 2,5 mL) para a realização da medida.

Este instrumento consiste de uma placa plana inferior estacionária e um cone rotatório superior com diâmetro de 60 mm e ângulo de 2° (α), como mostra a Figura 16. O fluido permanece entre a placa e o cone sem derramar-se devido à sua tensão superficial, e deve preencher inteiramente o espaço entre eles de modo que as medições não sejam alteradas.

O cone atua em velocidades de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) controladas, e o arraste viscoso sob o cone rotativo exerce uma força de rotação que é proporcional à tensão de cisalhamento (τ) (Schott, 1992).

Para as concentrações de 15, 20 e 30 g/L foram aplicadas as tensões de 60, 150 e 250 Pa, respectivamente.

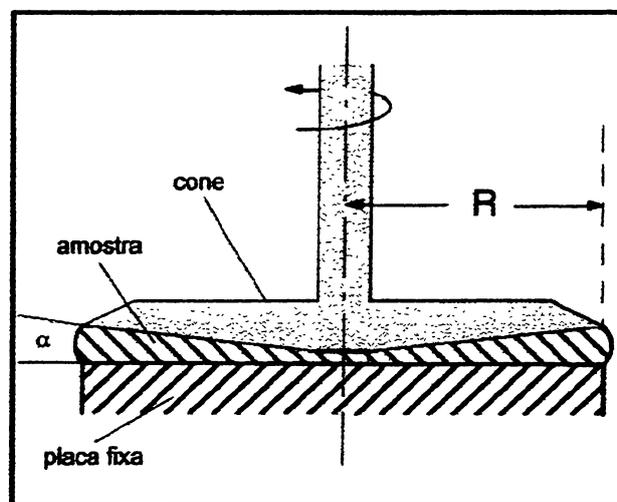


Figura 16: Esquema de um sensor de geometria do tipo cone-placa (adaptado de Schramm, 1994).

Em ambos os sensores, a análise das viscosidades absolutas das amostras foi realizada em uma faixa de velocidade de cisalhamento entre 10^{-3} e 2000 s^{-1} , correspondente à capacidade do equipamento. Para soluções mais diluídas, entretanto, a faixa de velocidade alcançada foi menor (entre 10 e 2000 s^{-1}) devido a limitações na sensibilidade do aparelho.

3.19.2. Determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$)

A viscosidade intrínseca da fração FS2-B de *Mangifera indica* L. foi determinada a partir da obtenção dos valores das viscosidades absolutas extrapoladas para $\dot{\gamma} = 0 \text{ s}^{-1}$ no platô newtoniano, de soluções diluídas nas concentrações de 0,79; 1,05; 1,18 e 1,33 g/L, utilizando-se o sensor cilindro-coaxial DG41 AL. Para cada concentração foram realizadas análises em triplicata, e os valores obtidos de viscosidade absoluta foram aplicados nas Equações 2, 3 e 4 (p. 10 e 11), para se obter os valores de viscosidade relativa (η_{rel}), viscosidade específica (η_{sp}), e viscosidade reduzida (η_{red}), respectivamente.

Cada valor de viscosidade reduzida foi plotado contra seu respectivo valor de concentração no programa computacional EXCEL, obtendo-se por regressão linear dos quatro pontos a equação da reta da qual foram extraídos os valores numéricos para a viscosidade intrínseca (coeficiente linear, que representa o ponto de intersecção do prolongamento da reta com o eixo y) e constante de Huggins (coeficiente angular, que indica o valor da tangente do ângulo formado pela reta e o eixo x).

3.19.3 Estabelecimento das curvas de fluxo

As amostras preparadas nas concentrações de 0,5 a 10 g/L foram analisadas em sensor cilindro-coaxial (conforme descrito no item 3.19.1a), enquanto as soluções de 15, 20 e 30 g/L foram estudadas em sensor cone-placa (como mostra o item 3.19.1b). As curvas obtidas ($\eta \times \dot{\gamma}$) para cada concentração, em triplicata, foram reunidas em um único gráfico através do programa RHEOWIN, podendo ser comparadas quanto ao seu comportamento reológico.

3.19.4 Determinação da concentração crítica (c^*)

Os valores de viscosidade específica (η_{sp}) obtidos pela Equação 3 (p. 10) a partir dos valores de viscosidade absoluta extrapolados para $\dot{\gamma} = 0 \text{ s}^{-1}$ em platô newtoniano nas concentrações de 0,5 a 30 g/L, foram plotados contra os valores obtidos das equações de Huggins ($c[\eta]$) e Huggins modificada $\{c[\eta] + K' (c[\eta])^2\}$, em um gráfico com escala logarítmica.

3.19.5 Medidas de tensão temporária ou transitória (“creep and recovery”)

O comportamento viscoelástico das amostras foi analisado no sistema estático através de medidas de tensão temporária, utilizando-se o sensor cone-placa (60 mm de diâmetro e ângulo de 2°) e soluções nas concentrações de 20 e 30 g/L. Estas soluções foram submetidas a uma tensão de cisalhamento (τ) constante e de pequena amplitude de 0,017 Pa (tensão mínima programável), com as análises ocorrendo por um período de 1000 segundos (500 segundos com tensão aplicada e 500 segundos com tensão zero).

3.19.6 Análise do comportamento dinâmico

O comportamento viscoelástico das amostras foi analisado através do sistema dinâmico ou oscilatório em sensor do tipo cone-placa (diâmetro de 60 mm e ângulo de 2°), com soluções nas concentrações de 15, 20 e 30 g/L.

Primeiramente foi realizada uma varredura de tensão (10^{-2} a 10 Pa) a fim de se determinar a região viscoelástica linear das amostras, isto é, a região em que os módulos elástico (G') e viscoso (G'') permanecem lineares e paralelos, sem variação com o aumento da deformação (γ). Nesta faixa de deformação em que os módulos permanecem estáveis, não ocorre perturbação significativa na estrutura dos polímeros, e a menor deformação possível é escolhida para as análises posteriores no sistema dinâmico. A deformação escolhida dentro da faixa viscoelástica linear foi de 3%.

Foram realizadas análises em triplicata nas frequências de 0,1, 1 e 10 Hz, mas apenas os resultados obtidos com a frequência de 1 Hz foram considerados por apresentarem melhor definição.

Após a determinação da deformação a ser utilizada, foram desenvolvidas as varreduras de frequência da fração FS2-B, nas concentrações de 15, 20 e 30 g/L, também em sensor cone-placa. A faixa de frequência aplicada às amostras foi de 10^{-2} a 10 Hz, com deformação fixa de 3%.

*RESULTADOS E
DISCUSSÃO*

4. Resultados e Discussão

4.1. Obtenção e análise dos polissacarídeos solúveis da polpa de manga

A polpa de manga industrializada foi submetida à centrifugação a fim de se separar a fração solúvel do resíduo contendo macromoléculas insolúveis, conforme mostra o Esquema I.

O resíduo (precipitado 1) obtido da centrifugação foi lavado três vezes sucessivas com água destilada com centrifugações intercaladas, a fim de remover a fração solúvel remanescente, e em seguida foi seco em estufa à vácuo. Este resíduo (0,7g% de rendimento em relação ao peso inicial da polpa líquida) cuja composição em açúcares neutros foi ramnose 4,5%, fucose 2,5%, arabinose 7%, xilose 17%, manose 4%, galactose 9% e glucose 56%, foi reservado.

O sobrenadante 1 foi centrifugado por 4 horas sucessivas a 22.200g para remoção dos resíduos insolúveis que permaneceram após a primeira centrifugação.

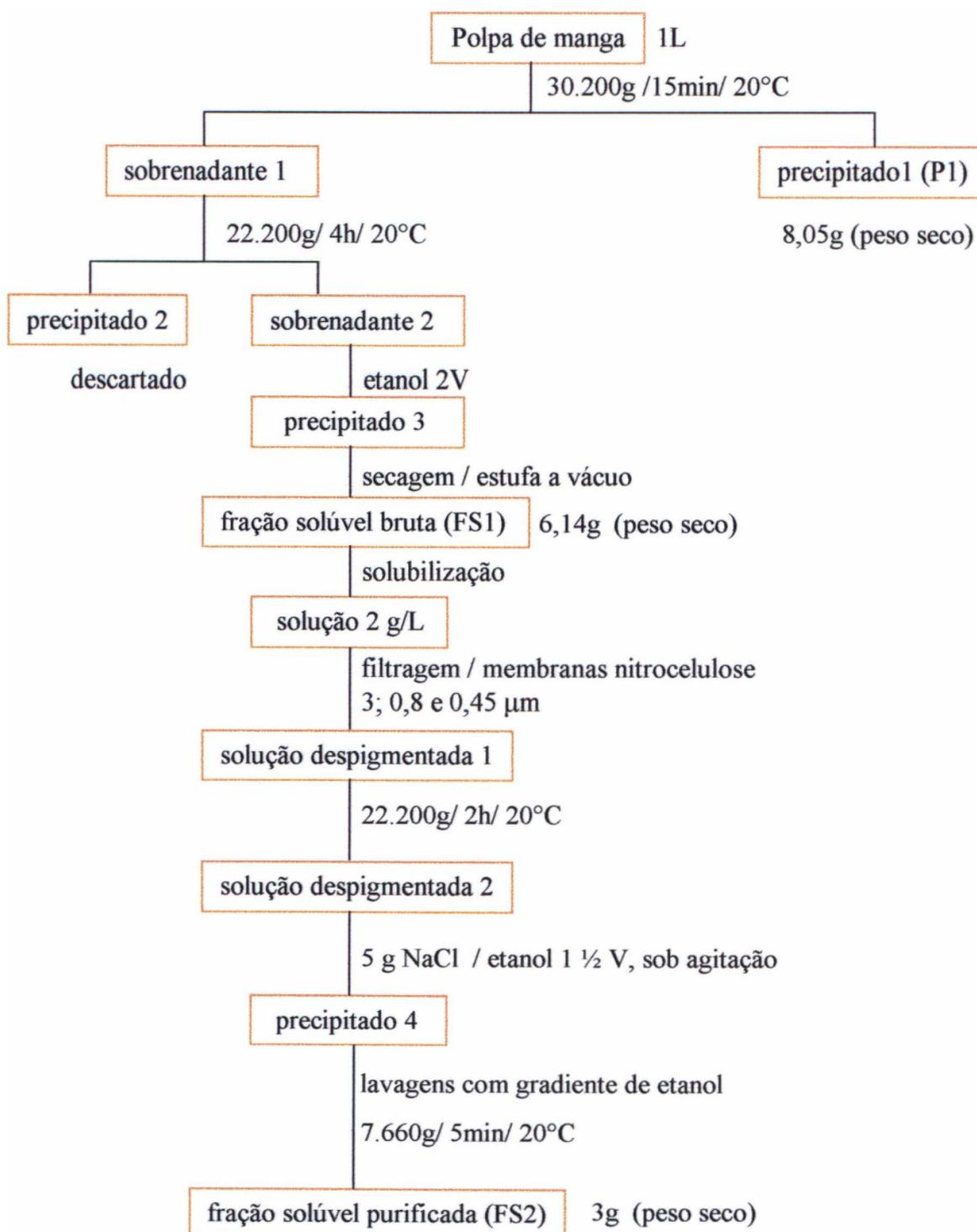
Ao sobrenadante 2 foi adicionado etanol para a precipitação dos polissacarídeos solúveis. Este precipitado obtido e seco em estufa à vácuo, apresentou coloração alaranjada e odor característico da fruta, e foi denominado FS1 (fração solúvel 1).

A fração FS1 foi submetida à purificação por resolubilização em água, filtragem em membranas de nitrocelulose, centrifugação, reprecipitação com etanol, lavagens sucessivas com gradiente de etanol e secagem (Esquema I). Foi então obtida a fração solúvel purificada (FS2), que apresentou ausência de aroma e coloração esbranquiçada.

Para cada 1g de FS1, foi obtido cerca de 0,5g de FS2.

Para ensaios preliminares foi utilizada uma primeira partida de polpa de manga de onde foi obtida a fração FS2 (conforme Esquema I), sendo denominada fração FS2-A.

Esquema I: Obtenção dos polissacarídeos solúveis de polpa de manga.



As frações FS1 e FS2-A foram analisadas quanto a sua composição monossacarídica, conteúdo protéico e rendimento, como está demonstrado na Tabela I.

Tabela I: Caracterização das frações FS1 e FS2-A

Fração	Rendim. ^a (g%)	Proteína ^b (%)	Composição monossacarídica ^c %							
			Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Ác.Urôn. ^d
FS1	0,57	4	1,3	0,2	10	0,5	3	8	51	26
FS2-A	0,28	4,7	1	0,1	7,2	0,5	1,3	11,5	52,4	26

- a) rendimento em relação ao peso inicial da polpa líquida;
- b) determinação pelo método de Hartree, 1972;
- c) acetatos de alditóis analisados por g.l.c.;
- d) determinação pelo método de Blumenkrantz & Asboe-Hans, 1973.

Os resultados obtidos na Tabela I revelam que as frações FS1 e FS2-A são quimicamente semelhantes, porém a fração FS2-A apresentou ausência de aroma e ausência de pigmentação alaranjada após o processo de purificação descrito no Esquema I (p. 58), sendo, portanto, mais interessante para os estudos reológicos.

A fração FS2-A foi também submetida à análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de espalhamento de luz a laser em multiângulos (SEC-MALLS) e detector de índice de refração, e o perfil obtido encontra-se representado na Figura 17.

O perfil de eluição registrado pelo detector de espalhamento de luz (LS) mostra a presença de um único pico relativamente homogêneo, enquanto o detector de índice de refração (RI) revela a existência de dois picos distintos. Esta análise mostra a heterogeneidade da fração, a qual apresenta polissacarídeos com massas moleculares diferentes.

A grande quantidade de glucose presente na fração FS2-A (Tabela I), a qual apresentou reação positiva ao lugol, e a presença de dois picos registrados pelo detector de índice de refração na análise por SEC-MALLS, sugeriram a existência de amido na fração, além de polissacarídeo ácido.

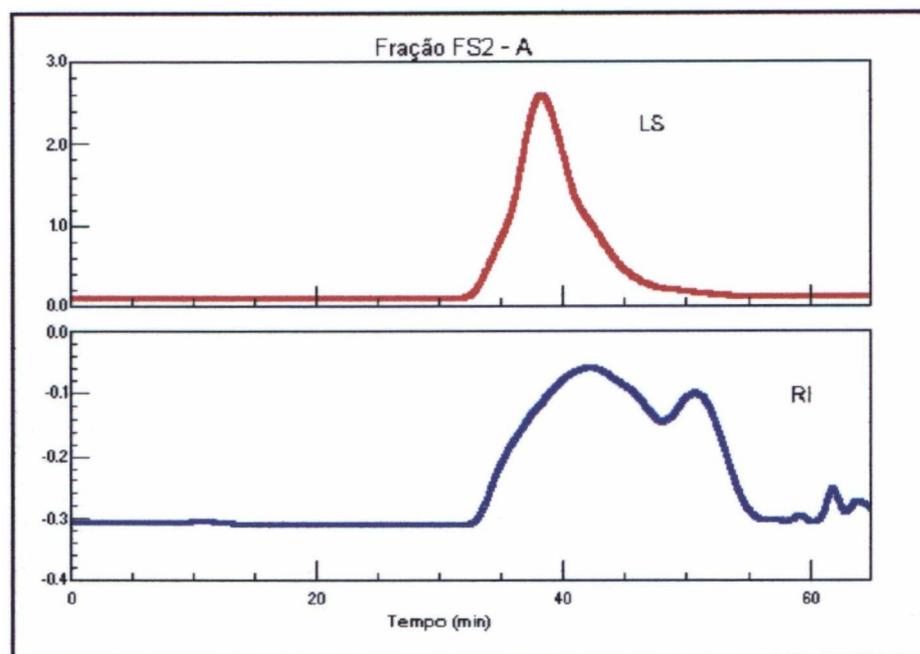


Figura 17: Perfil de eluição da fração FS2-A através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).

De acordo com Brinson *et al.* (1988), parte da glucose de preparações de parede celular de mesocarpo de manga é provavelmente derivada do amido que tem sido reportado constituir cerca de 13% do tecido maduro da fruta. Guilbot & Mercier (1985) também estudaram a amilose obtida de manga, e os diferentes graus de polimerização (massa molecular) e capacidade de complexação com o iodo dependendo da origem botânica do amido e das condições usadas para fracionamento e purificação.

Foi realizada análise por ^{13}C -RMN da fração FS2-A, e o espectro obtido está demonstrado na Figura 18.

Os sinais encontrados para as unidades de glucose foram semelhantes às atribuições descritas para a glucana $\alpha(1\rightarrow3)\text{-}\alpha(1\rightarrow4)$ de *Cladonia penicillata* (Barreira, 1999), e também

foram comparados com padrão de amilose (Sigma) e com os sinais para metil- α -D-glucopiranosídeo descritos por Gorin & Mazurek (1975) (Tabela II).

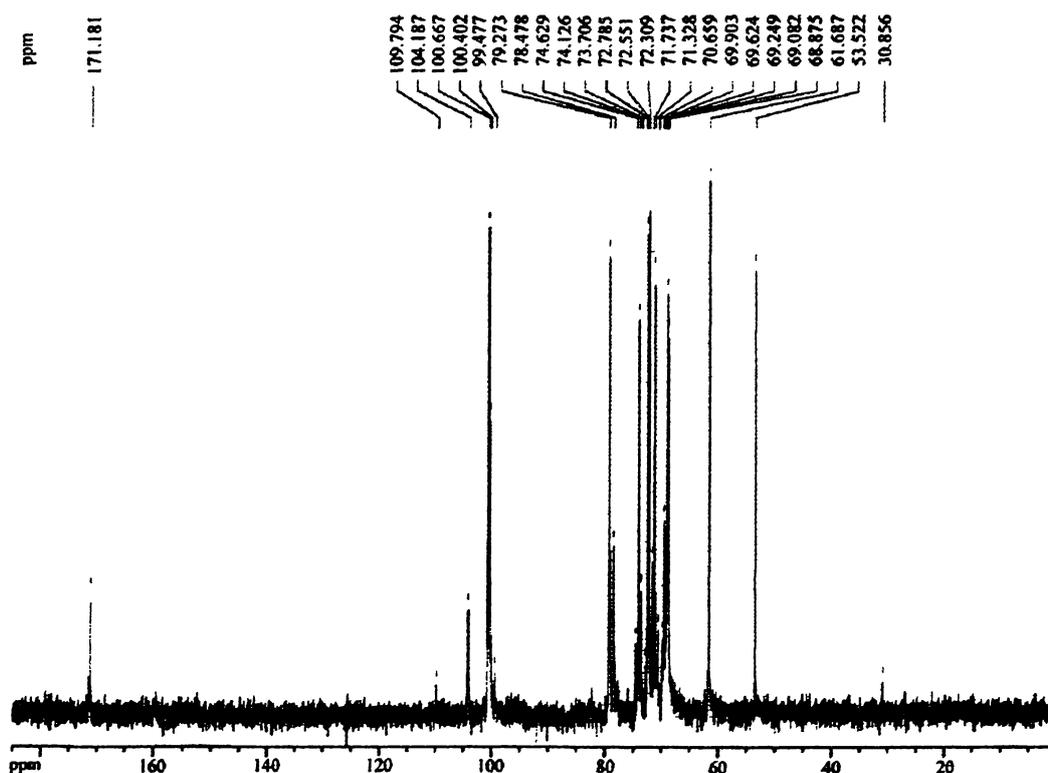


Figura 18: Espectro de ^{13}C -RMN da fração FS2-A.

A ligação (1 \rightarrow 4) entre as unidades de α -D-glucopiranosose presentes na fração FS2-A fica evidente através do deslocamento para campo mais baixo do sinal de C-4 (δ = 79,2 ppm), e sugere a presença de amido na fração, cuja estrutura apresenta unidades de α -D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4).

No espectro de ^{13}C -RMN (Figura 18) é visível o sinal em 171,1, correspondente ao sinal do C-6 de ácido urônico. O sinal em 109,7 é atribuído ao C-1 das unidades de α -L-arabinofuranose, o sinal em 104,1 ao C-1 das unidades de β -D-galactopiranosose e o sinal em 100,6 ao C-1 das unidades de α -D-glucopiranosose.

Tabela II: Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de ^{13}C -RMN das unidades de glucose da fração FS2-A, padrão de amilose, metil- α -D-glucopiranosídeo e glucana com ligações $\alpha(1\rightarrow3)$ - $\alpha(1\rightarrow4)$ de *Cladonia penicillata*.

	δ (ppm)			
	FS2-A ^a	Padrão de amilose ^b	metil- α -D-glucopiranosídeo ^c	Glucana $\alpha(1\rightarrow3)$ - $\alpha(1\rightarrow4)$ (<i>Cladonia penicillata</i>) ^d
C-1	100,6	100,0	100,3	100,05
C-2	71,3	71,6	72,5	70,6
C-3	74,1	73,2	74,2	72,0
C-4	79,2	78,9	70,6	79,0
C-5	72,3	72,0	72,7	72,7
C-6	61,6	60,6	61,7	60,5

a) presente trabalho, em D_2O , 70°C

b) padrão de amilose Sigma

c) Gorin & Mazurek (1975), em D_2O , 33°C

c) Barreira (1999), em DMSO-d_6

A fim de disponibilizar material para os estudos reológicos, o procedimento de obtenção dos polissacarídeos solúveis da polpa de manga, descrito no Esquema I, foi repetido com uma

partida diferente da polpa industrializada, e a fração purificada obtida foi denominada fração FS2-B.

O rendimento da fração FS2-B (0,3g%) apresentou-se similar ao rendimento da fração FS2-A (0,28g%), porém a análise por g.l.c. apresentou uma redução significativa no conteúdo de glucose, e aumento relativo de galactose e ácido urônico para a fração FS2-B, conforme mostra a Tabela III.

As diferenças na quantidade de glucose, galactose e ácido urônico encontradas entre as duas frações, confirmam a hipótese de existir em cada fração dois polissacarídeos distintos.

Tabela III: Análise comparativa das frações FS2-A e FS2-B.

Fração	Rendim. ^a (g%)	Proteína ^b (%)	Composição monossacarídica ^c %							
			Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu	Ac.Urôn. ^d
FS2-A	0,28	4,7	1	0,1	7,2	0,5	1,3	11,5	52,4	26
FS2-B	0,3	10,8	2,5	0,2	8,5	0,3	0,8	22,5	23,2	42

a) rendimento em relação ao peso inicial de polpa líquida;

b) determinação pelo método de Hartree, 1972;

c) acetatos de alditóis analisados por g.l.c.;

d) determinação pelo método de Blumenkrantz & Asboe-Hans, 1973.

Embora com menor intensidade que a amostra obtida da primeira partida de polpa, a fração FS2-B também apresentou reação positiva para lugol (Figura 19).

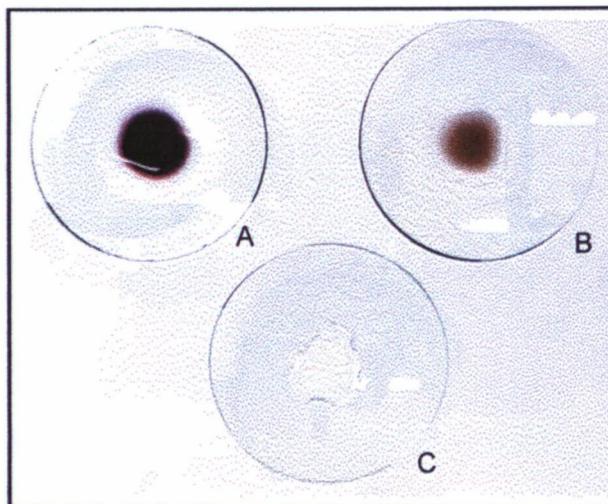


Figura 19: Fotografia ilustrando as diferentes respostas ao teste com lugol das frações A) FS2-A e B) FS2-B, preparadas na mesma concentração (10g/L). C) controle.

A coloração característica da reação com lugol foi menos intensa para a fração FS2-B, indicando menor quantidade de amido comparada à fração FS2-A. Este resultado está de acordo com a porcentagem de glicose encontrada para cada fração, como foi mostrado na Tabela III.

A respeito da porcentagem de proteínas encontradas na fração FS2-B, há dados na literatura sobre a presença de proteínas ligadas em polissacarídeos ácidos. Foram investigados polissacarídeos e glicoproteínas de parede celular de maçã, e verificou-se a presença de aminoácidos em preparações de poliuronídeos solúveis em ácido e álcali. Isto implica que substâncias pécticas podem ser provavelmente ligadas covalentemente com proteínas. Análises sobre o conteúdo protéico de pectinas obtidas da polpa de manga mostraram a presença de 5 a 7% de aminoácidos (Kratchanova *et al.*, 1991).

A fração FS2-B, que apresentou maior conteúdo protéico quando comparada à fração FS2-A (Tabela III), foi submetida à análise pelo método de Peterson (Peterson, 1977) para determinação do conteúdo protéico sem interferência de compostos fenólicos. A porcentagem de proteínas encontrada foi de 10%, confirmando o resultado obtido pelo ensaio de Hartree (10,8%).

O perfil obtido em análise por SEC-MALLS com detector de RI e LS da fração FS2-B foi similar ao anteriormente verificado para a fração FS2-A, como mostra a Figura 20.

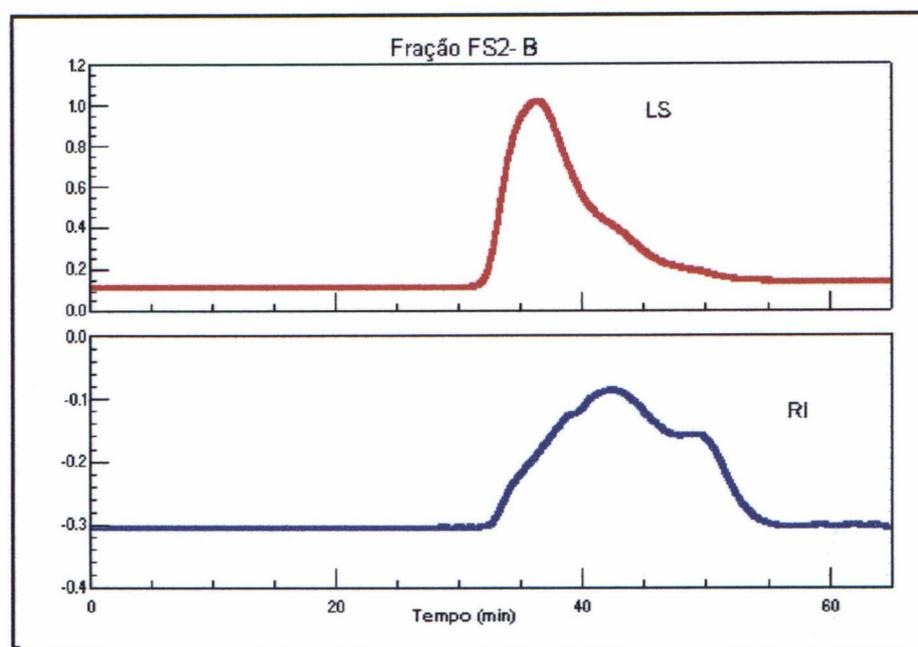


Figura 20: Perfil de eluição da fração FS2-B através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).

A fração FS2-B foi também analisada por SEC-MALLS em aparelho contendo além dos dois detectores descritos, um detector de UV, conforme mostra a Figura 21.

Pela análise desta figura é possível verificar que a fração FS2-B solubilizada em água apresentou uma banda de absorção de UV (em preto) próxima ao pico de RI (em verde), o que poderia sugerir a presença de proteínas ligadas ionicamente ao polissacarídeo, e outra banda não coincidente com o pico de RI, provavelmente devido a uma porcentagem de proteína não ligada. Entretanto, a fração FS2-B solubilizada em sal (NH_4NO_3 / NaN_3) não mostrou nenhuma absorção em ultravioleta (em azul), sugerindo que as proteínas presentes na fração, nestas condições, não estariam ligadas ao polissacarídeo, mas possivelmente retidas no filtro.

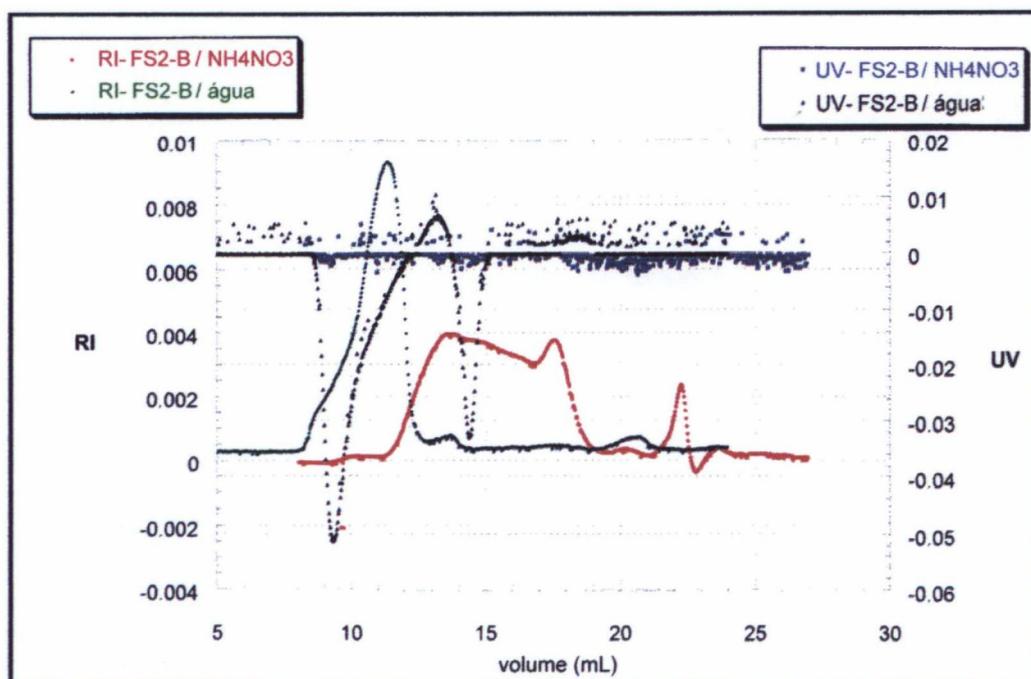


Figura 21: Perfil de eluição da fração FS2-B através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e ultravioleta (UV).

Na tentativa de purificar a fração FS2-B que se mostrou heterogênea, separando os polissacarídeos presentes, dois procedimentos foram realizados: tratamento com α -amilase e fracionamento por centrifugação a baixa temperatura.

4.1.1. Tratamento da fração FS2-B com α -amilase

A fração FS2-B foi tratada com a enzima α -amilase, e durante a incubação foram retiradas alíquotas de 0,1 mL nos tempos 0, 5, 10, 20 e 40 minutos. Verificou-se que após 5 minutos o teste com lugol resultou negativo, sugerindo a degradação do amido presente. A alíquota coletada no tempo zero (controle) acusou a presença de amido pelo teste com lugol.

Com o sobrenadante da precipitação etanólica após incubação enzimática, foi realizada cromatografia em papel utilizando-se dentre os padrões, maltose. Sabe-se que a maltose, dissacarídeo constituído por duas unidades de glucose unidas glicosidicamente por ligação do tipo α -(1 \rightarrow 4), é um produto de hidrólise do amido por α -amilase salivar. Foi verificada a presença de maltose neste sobrenadante analisado, sugerindo a presença de amido na fração FS2-B.

A fração resultante da precipitação etanólica do sistema polissacarídeo-enzima, denominada fração FE, foi submetida à análise por g.l.c., e o resultado encontra-se na Tabela IV.

Tabela IV: Comparação das composições monossacarídicas das frações FS2-B e FE.

Composição monossacarídica ^a %							
Fração	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu
FS2-B	4,5	0,4	14,5	0,6	1,4	38,6	40
FE	5,5	0,5	20	1	2	53	18

a) acetatos de alditóis analisados por g.l.c.

Os valores adotados na Tabela IV para a fração FS2-B não incluem a porcentagem de ácidos urônicos a fim de ser possível a comparação com os valores obtidos para a fração FE, cuja dosagem colorimétrica de ácidos urônicos não foi efetuada.

Pela análise comparativa da quantidade de glucose presente nas frações FS2-B e FE, é possível constatar o decréscimo ocorrido na fração tratada com a enzima. Este resultado sugere que parte da glucose presente na fração FS2-B é proveniente do amido.

A fração FE foi analisada por SEC-MALLS, e o perfil obtido é demonstrado na Figura 22.

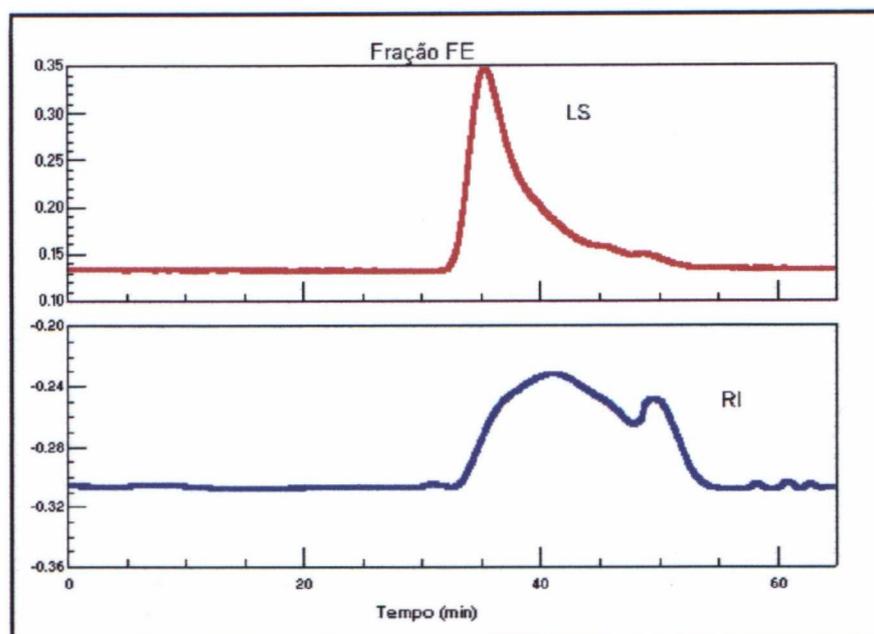


Figura 22: Perfil de eluição da fração FE através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).

4.1.2. Tratamento da fração FS2-B por centrifugação a baixa temperatura

A fração FS2-B foi centrifugada em temperatura de 4°C, filtrada em membrana de nitrocelulose e tratada com etanol (conforme descrito no item 3.11), e o precipitado obtido foi denominado fração 4C-4 (fração obtida após centrifugação a 4°C, por 4 horas). O objetivo da centrifugação a baixa temperatura foi diminuir a solubilidade do amido presente, facilitando sua precipitação em alta velocidade (30.200g). A fração 4C-4 foi analisada quanto a sua composição monossacarídica, conteúdo de ácido urônico e conteúdo protéico, conforme mostra a Tabela V.

Por este procedimento, o conteúdo de glucose na fração 4C-4 diminuiu em relação à fração FS2-B.

Tabela V: Análise comparativa entre as frações FS2-B e 4C-4.

Fração	Proteína ^a (%)	Composição monossacarídica ^b %						
		Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glu
FS2-B	10,8	4,5	0,4	14,5	0,6	1,4	38,6	40
4C-4	6,8	6	0,6	31	1	0,4	46	15

* o conteúdo de ácidos urônicos da fração 4C-4 foi de 45,5%, e da fração FS2-B foi de 42% (método de Blumenkrantz & Asboe-Hans, 1973).

a) determinação pelo método de Hartree, 1972;

b) acetatos de alditóis analisados por g.l.c.;

A análise por SEC-MALLS da fração 4C-4 revelou um perfil heterogêneo registrado pelo detector de índice de refração, similar àqueles registrados para as frações FS2-B e FE.

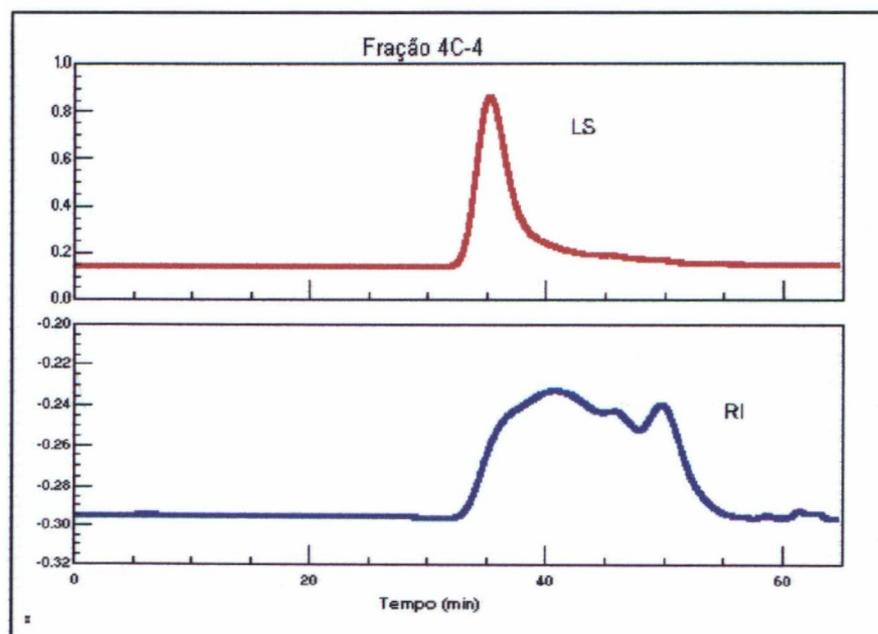


Figura 23: Perfil de eluição da fração 4C-4 através de SEC-MALLS utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).

4.1.3. Fracionamento em coluna de troca iônica

A fração 4C-4 foi cromatografada em coluna de troca iônica DEAE-Trisacryl Plus M (Cl⁻), sendo que o primeiro solvente a ser utilizado na eluição foi água, seguido por solução de NaCl 0,5 e 1 mol . L⁻¹, e hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mol . L⁻¹.

A fração neutra eluída com água foi hidrolisada e analisada por g.l.c., e a fração ácida obtida em maior rendimento, eluída com NaCl 0,5 mol . L⁻¹, foi submetida à análise por g.l.c., e dosagem de ácido urônico. As frações eluídas com NaCl 1 mol . L⁻¹ e com NaOH 0,5 mol . L⁻¹ não foram analisadas devido ao seu baixo rendimento.

Tabela VI: Rendimento e composição monossacarídica das frações obtidas por fracionamento em DEAE-Trisacryl Plus M da fração 4C-4.

Eluente	Rend. ^a (%)	Composição monossacarídica ^b %					
		Ram	Ara	Xil	Man	Gal	Glu
água	10	9,5	20	3	2	20	45,5
NaCl 0,5 mol.L ⁻¹	58,6	9	33,5	0,5	-	54	3

* o conteúdo de ácidos urônicos determinado para a fração eluída da coluna com NaCl 0,5 mol.L⁻¹ foi de 44,5% (método de Blumenkrantz & Asboe-Hans, 1973).

a) rendimento em relação à fração aplicada na coluna;

b) acetatos de alditóis analisados por g.l.c.;

O rendimento total obtido da coluna de DEAE-Trisacryl Plus M foi de 83,6%, considerando que dos 100mg da fração aplicada, 58,6mg foram recuperados pela eluição com NaCl 0,5 mol . L⁻¹, 10mg com NaOH 0,5 mol . L⁻¹, 10mg com água e 5mg NaCl 1 mol . L⁻¹.

A presença de grande quantidade de glucose na fração neutra é provavelmente proveniente do amido, uma vez que a reação de parte desta fração com lugol foi positiva. Mas além de glucose, que era o monossacarídeo esperado na fração, foi observado um conteúdo significativo de arabinose e galactose.

Segundo Brett e Waldron (1990), ramnogalacturonanas do tipo I (RG I), que são componentes da lamela média e parede celular primária de plantas dicotiledôneas, podem conter diferentes cadeias laterais sendo compostas principalmente por arabinose e galactose.

Arabinanas foram isoladas de parede celular de raízes, sementes e frutos de várias espécies, estando geralmente associadas com material péctico (Zawadzki-Baggio *et al.*, 1992).

Considerando que o material utilizado como fonte de polissacarídeos é um produto industrializado, e que as frutas apresentam grande quantidade de pectina em suas paredes celulares, provavelmente o conteúdo de arabinose e galactose na fração neutra é originário de arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas neutras que podem constituir as cadeias laterais das ramnogalacturonanas do tipo I.

A fração ácida eluída com $\text{NaCl } 0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, foi analisada quanto a sua homogeneidade por SEC-MALLS, e o perfil obtido está apresentado na Figura 24.

O perfil obtido em ambos os detectores revela a heterogeneidade da fração, sendo que polímeros de menor massa molecular (correspondentes aos dois últimos picos no detector LS) se encontram em maior quantidade. Esta análise sugere que a fração ácida eluída com sal é constituída de diferentes fragmentos de polímero ácido.

Analisando-se os perfis obtidos por SEC-MALLS das frações FS2-B (Figura 20), FE (Figura 22) e 4C-4 (Figura 23) é possível verificar que o pico registrado pelo detector de espalhamento de luz (LS) no tempo de eluição de 35 minutos para as frações FE e 4C-4 apresenta-se mais estreito (“sharp”) do que na fração de origem (FS2-B). Considerando que as frações FE e 4C-4 resultam de tratamentos para redução da quantidade de amido na amostra, estes resultados sugerem que o pico registrado em LS e o pico correspondente em RI (primeiro pico) na fração FS2-B referem-se ao amido juntamente com outro polímero. Esta hipótese é reforçada pelo perfil obtido da fração ácida eluída da coluna (Figura 24), onde o pico em LS no tempo de 35 minutos apresenta-se reduzido, sem o pico em RI correspondente, indicando que há uma quantidade muito pequena destas moléculas.

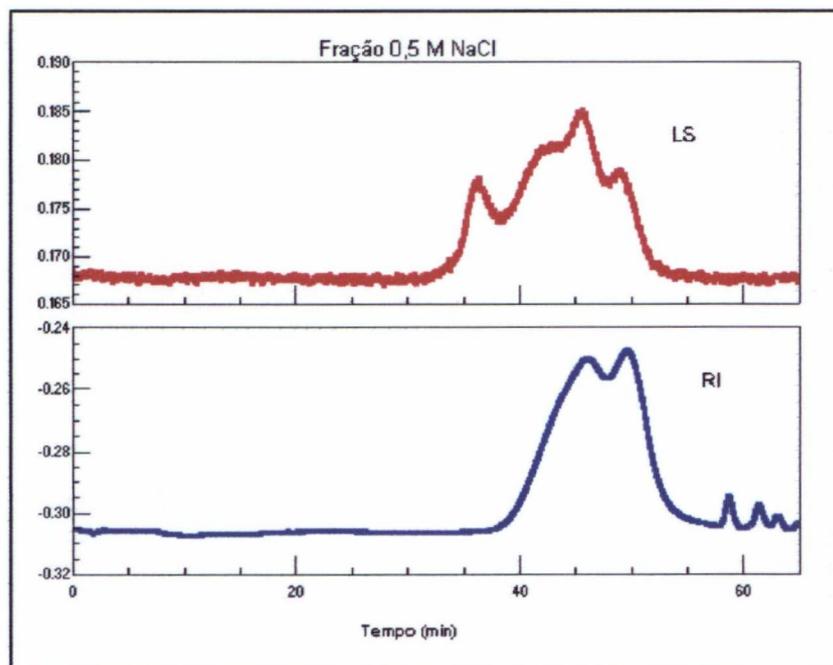


Figura 24: Perfil de eluição da fração ácida eluída com NaCl 0,5 mol.L⁻¹ da coluna de DEAE-Trisacryl Plus M através de SEC-MALLS, utilizando-se detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz em multiângulos (LS).

4.1.4. Análise das frações por ¹³C-RMN

As frações FS2-B, 4C-4 e a fração ácida de maior rendimento obtida da coluna foram analisadas por ¹³C-RMN, como mostram as Figuras 25 e 26.

O espectro mostrado na Figura 25 apresentou-se similar ao da fração FS2-A mostrado anteriormente (Figura 18, p.61), porém com sinais menos intensos referentes à glucose, predominando os sinais referentes ao polissacarídeo ácido. É característico neste espectro o sinal em 170,6 ppm referente ao C-6 de ácido urônico, e o sinal em 100,0 ppm correspondente ao C-1 de ácido urônico.

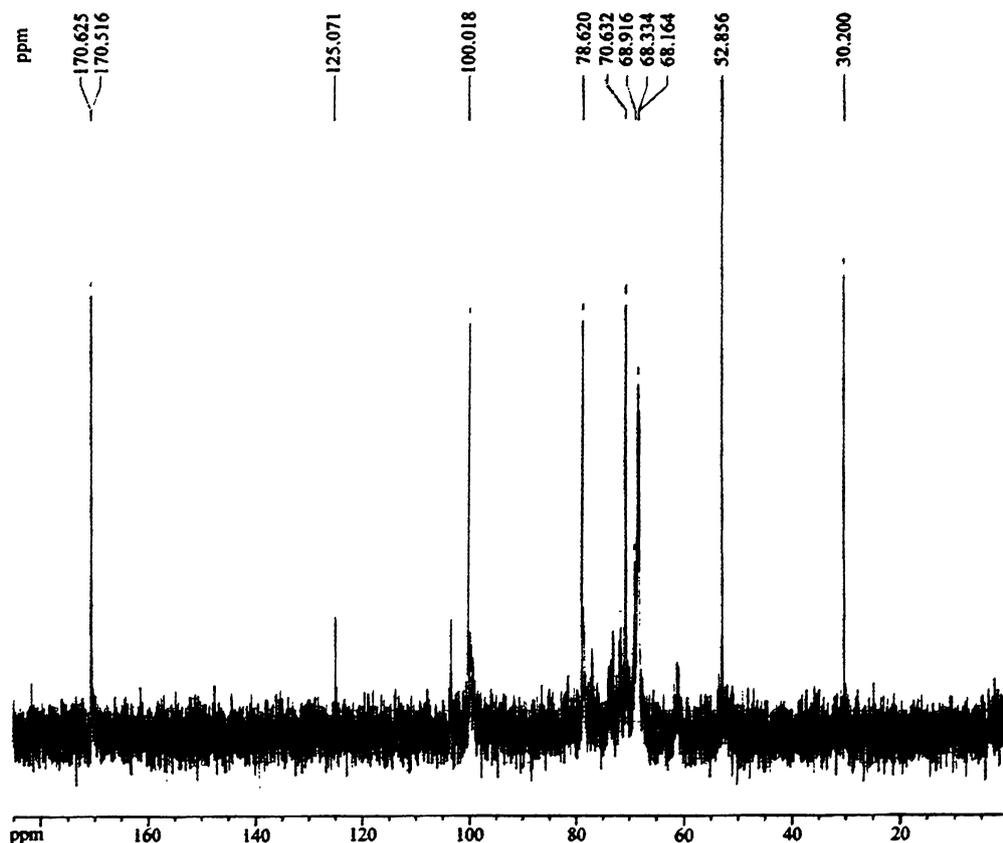


Figura 25: Espectro de ^{13}C -RMN da fração FS2-B.

O espectro a mostrado na Figura 26 (fração 4C-4) evidenciou os sinais menos intensos presentes no espectro da fração FS2-B (Figura 25), indicando uma subfração com menor conteúdo de polissacarídeo pécico que provavelmente foi perdido durante os processos de centrifugação e filtragem. O sinal característico do C-6 de ácido urônico em 170,5 ppm apresentou-se menos intenso que na fração FS2-B. Na região de C-1 é possível atribuir os sinais em 109,1 e 107,4 ao C-1 das unidades de α -L-arabinofuranose (Beleski-Carneiro *et al.*, 1999; Zawadzki-Baggio *et al.*, 1992), o sinal em 103,3 ao C-1 das unidades de β -D-galactopiranosose e o sinal em 100,3 ao C-1 das unidades de ácido urônico.

O espectro b mostrado na Figura 26 (correspondente à fração eluída da coluna de troca iônica com sal) apresentou número menor de sinais comparado com a fração que lhe deu origem (4C-4). É característico o sinal em 174,5 ppm referente ao C-6 de ácido urônico, em 108,5 ppm ao C-1 das unidades de α -L-arabinofuranose, em 104,7 ppm ao C-1 das unidades de β -D-galactopiranosose e em 100,6 ppm ao C-1 de ácido urônico.

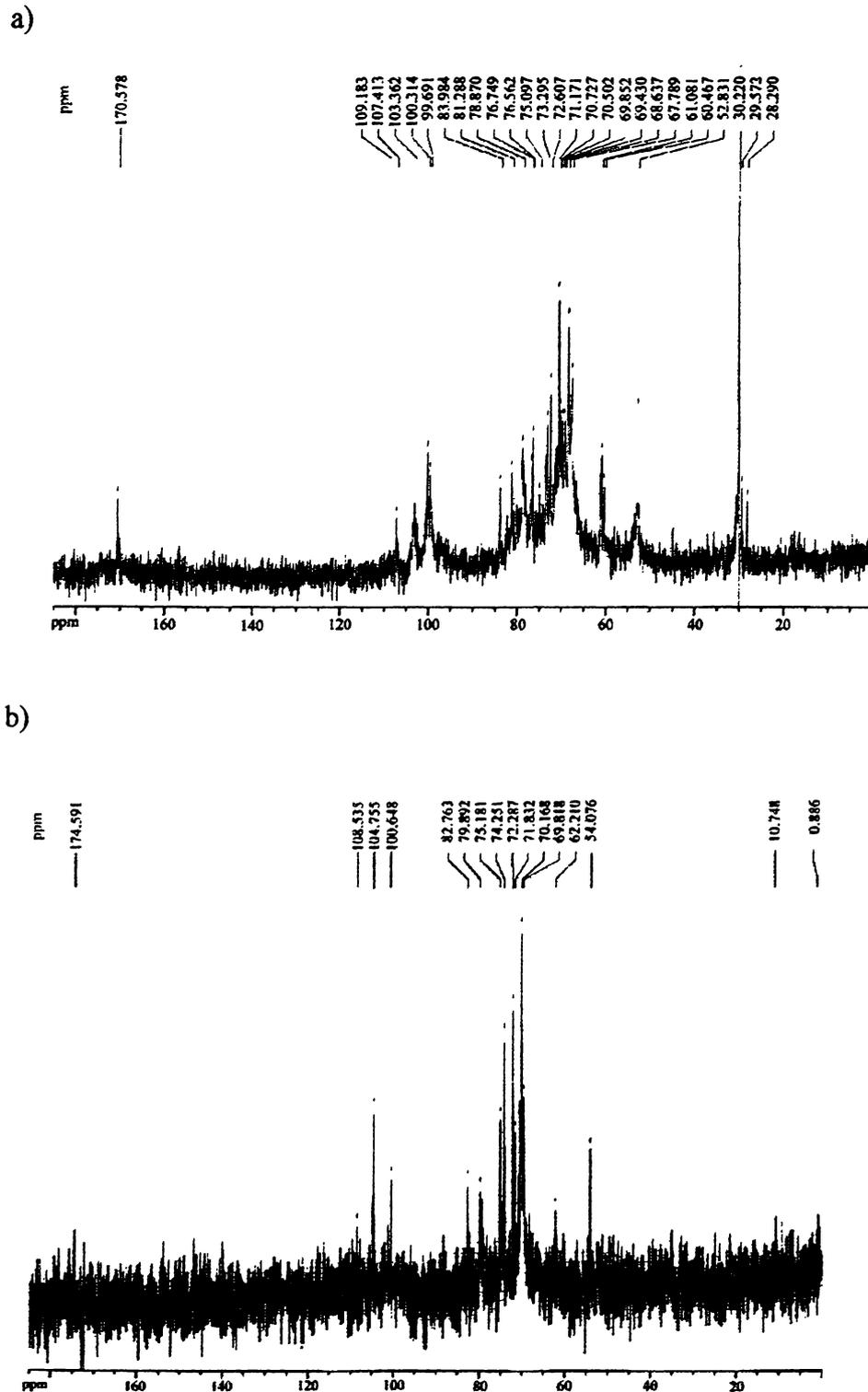


Figura 26: Espectro de ^{13}C -RMN das frações a) 4C-4 e b) fração eluída da coluna de DEAE-Trisacryl Plus M com $\text{NaCl } 0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Nos espectros de ^{13}C -RMN das frações FS2-B (Figura 25), 4C-4 (Figura 26a), fração ácida obtida da coluna (Figura 26b), bem como da fração FS2-A (Figura 18, p.61) são encontrados sinais em 52,8; 52,8; 54,0 e 53,5 ppm, respectivamente, que correspondem ao grupamento *O*-metil das unidades de ácido urônico metil-esterificadas (Breitmaier & Voelter, 1987).

Considerando estes resultados, a fração FS2-B foi escolhida para os estudos que se seguiram.

4.1.5. Carbóxi-redução da fração FS2-B

Para esclarecer se o monossacarídeo ácido presente na fração FS2-B seria ácido galacturônico, a amostra foi carbóxi-reduzida conforme descrito no item 3.13.

Análise por GC-MS da fração FS2-B acetilada e FS2-B carbóxi-reduzida, mostrou nesta um aumento da proporção relativa de galactose, sugerindo a presença de ácido galacturônico na composição da fração. Estudo detalhado da fragmentação dos picos obtidos foi realizado para confirmar se no tempo de retenção relativo à galactose os fragmentos deuterados presentes eram referentes ao C-6.

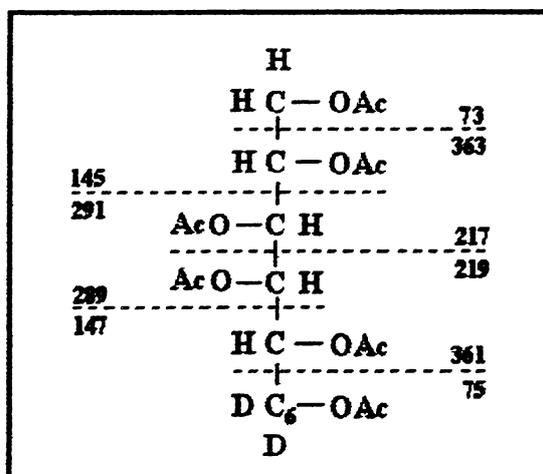


Figura 27: Representação esquemática da molécula de ácido galacturônico após carbóxi-redução com boroidreto deuterado (NaBD_4), hidrólise, redução e acetilação (Fonte: Carpita & Shea, 1989).

Nesta figura estão apresentados os valores de unidade de massa de cada fragmento da molécula de ácido galacturônico possível de ser formado, sendo que os valores encontrados abaixo da linha pontilhada se referem ao fragmento também localizado abaixo da linha, e portanto, incluem o C-6 deuterado (identificado na figura).

No espectro de GC-MS da amostra carbóxi-reduzida, no tempo de retenção relativo à galactose, foram encontrados 3 fragmentos não existentes no padrão (amostra apenas acetilada): 159, 129 e 117.

O fragmento secundário de massa 159 provavelmente resulta da saída de uma molécula de ácido acético (60) do fragmento primário de massa 219. O fragmento de massa 129 é terciário, e deve ser resultante da perda de uma molécula de formaldeído (30) do fragmento 159. E o fragmento secundário de massa 117 corresponde ao fragmento de massa 147 menos uma molécula de formaldeído. Como mostrado na Figura 27, os fragmentos de massa 219 e 147 incluem o C-6 deuterado da unidade de galactose.

Desta forma sugere-se que a fração FS2-B contém ácido poligalacturônico, apresentando pequenas proporções de ramnogalacturonana do tipo I (RG-I) de acordo com a pequena quantidade de ramnose encontrada pela análise em g.l.c. Segundo Brett e Waldron (1990), homogalacturonanas (ácido poligalacturônico) são encontradas em quantidades consideráveis em frutas.

A presença de ramnogalacturonana do tipo II (RG-II) na fração FS2-B pode ser também sugerida pelo padrão de fragmentação encontrado em amostra acetilada condizente com o monossacarídeo 2-O-metil-L-fucose, característico de RG-II.

Na análise por polarimetria, a fração FS2-B apresentou rotação óptica específica de $[\alpha]_D^{25} +184,6^\circ$, em água.

De acordo com Collins e Ferrier (1995), compostos α -D apresentam sinal positivo. A fração FS2-B apresenta em sua constituição ácido poligalacturônico formado por unidades de ácido α -D-galacturônico, e ainda amido constituído por unidades de α -D-glucopirranose, o que justifica o valor positivo encontrado neste experimento.

4.2. Análise reológica da fração FS2-B

Após a determinação da constituição química da fração FS2-B, foram iniciados os estudos reológicos desta fração, a qual foi considerada adequada a este propósito tendo em vista sua elevada viscosidade, e por se apresentar desta forma como fonte potencial para diferentes aplicações industriais.

Foram realizadas análises reológicas estáticas e dinâmicas, sendo que as estáticas foram desenvolvidas no modo de tensão controlada (“controled stress” - CS), onde a tensão é aplicada na amostra e a deformação provocada é medida. Neste tipo de reômetro-CS é possível alcançar uma ampla faixa de tensão, com sensibilidade suficiente na detecção de pequenas deformações, permitindo tanto estudos em baixas tensões (“creep and recovery”) como em altas tensões (curvas de fluxo).

Os testes dinâmicos foram igualmente realizados no modo CS, onde são aplicadas às amostras tensões oscilatórias, e determinadas as deformações resultantes dependentes do tempo.

4.2.1. Determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) da fração FS2-B

Soluções poliméricas em baixas concentrações apresentam suas cadeias individuais bem separadas umas das outras, e livres para moverem-se independentemente. Com o aumento da concentração, entretanto, as cadeias começam a se tocar, e então as moléculas se acomodam por sobreposição e interpenetração umas nas outras. O início desta sobreposição de cadeias é determinado por dois fatores: o número de cadeias presentes (proporcional à concentração), e o volume que elas ocupam. Este volume hidrodinâmico ocupado por cada cadeia é caracterizado pela viscosidade intrínseca ($[\eta]$).

A determinação da viscosidade intrínseca da fração FS2-B foi realizada a fim de se estabelecer um parâmetro de comparação com outros materiais, além de ser um dado fundamental para a obtenção da concentração crítica (parâmetro reológico discutido a seguir).

A fração FS2-B foi analisada em 4 concentrações distintas: 0,79; 1,05; 1,18 e 1,33 g/L. A análise foi realizada em sensor coaxial, o qual possui sensibilidade adequada para a

determinação da viscosidade de soluções diluídas (este sensor é utilizado para fluidos com viscosidade absoluta abaixo de 1000 mPa.s). Os valores de viscosidade absoluta (η) fornecidos pelo reômetro foram convertidos em valores de viscosidade reduzida (η_{red}) por meio de fórmulas já estabelecidas, demonstradas anteriormente (item 1.2.2., p.10).

A obtenção da viscosidade intrínseca da fração FS2-B está demonstrada na Figura 28.

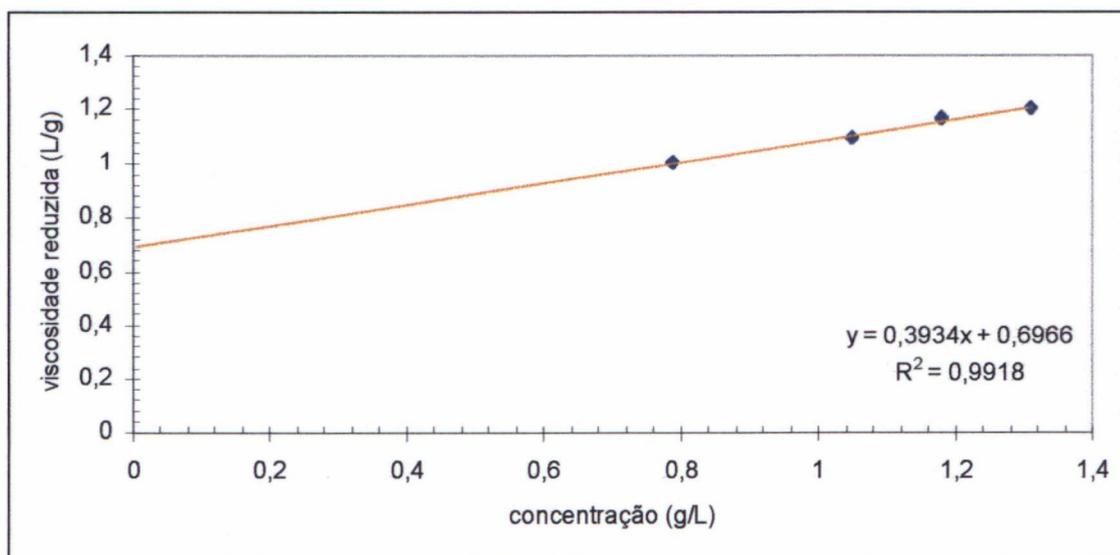


Figura 28: Determinação gráfica da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) da fração FS2-B.

Considerando que a tangente do ângulo formado pela reta obtida em relação ao eixo x corresponde à constante de Huggins (K'), pela equação da reta apresentada na Figura 28, o valor de K' corresponde ao coeficiente angular, enquanto o valor da viscosidade intrínseca corresponde ao coeficiente linear.

Desta forma, o valor de viscosidade intrínseca encontrado para a fração FS2-B foi de ~ 700 mL/g. Segundo Guilbot & Mercier (1985), a amilose obtida de manga apresentou viscosidade intrínseca de 400 mL/g, sendo portanto comparável com o valor encontrado no presente trabalho, visto que a fração FS2-B apresentou viscosidade maior provavelmente devido à presença de ácido poligalacturônico além de amido.

O valor da constante de Huggins informa sobre a qualidade do solvente. Considera-se que os valores de K' entre 0,3 e 0,4 qualificam um bom solvente, e, por isso, o valor encontrado para K' de 0,393 para a fração FS2-B indica que o solvente NaCl 0,01 mol. L⁻¹ foi adequado para a amostra analisada.

Após determinada a viscosidade intrínseca da fração FS2-B, partiu-se para a análise do seu comportamento de fluxo.

4.2.2. Análise do comportamento de fluxo da fração FS2-B

Para soluções de pequenas moléculas, tais como sacarose, a mesma viscosidade absoluta é obtida independentemente da velocidade de cisalhamento alcançada. Para soluções moderadamente concentradas de hidrocolóides, entretanto, este comportamento Newtoniano é observado apenas em baixas velocidades de cisalhamento, enquanto que em mais altas velocidades, a viscosidade medida decresce (Morris, 1984).

A construção das curvas de fluxo através das medidas de viscosidade absoluta das amostras em diferentes concentrações, evidenciam a transição de um comportamento Newtoniano, observado em baixas velocidades de cisalhamento, para pseudoplástico, variando de acordo com a concentração de polímero.

Por estas medidas realizadas em sistema estático é possível visualizar a concentração polimérica na qual o comportamento pseudoplástico é manifestado. Por serem medidas reológicas estáticas, as curvas de fluxo são destrutivas, ou seja, há alteração da estrutura tridimensional do polímero pela progressiva ruptura da rede polimérica com o aumento da velocidade de cisalhamento.

Para verificar o comportamento de fluxo de soluções da fração FS2-B, foram determinadas as curvas de fluxo e sua dependência da velocidade de cisalhamento em uma larga faixa de concentração (0,5 a 30g/L), como demonstrado na Figura 29.

O valor de velocidade de cisalhamento de 10 s^{-1} foi escolhido por conveniência experimental para comparação das viscosidades absolutas (η) entre as diversas concentrações da fração FS2-B estudadas. Observa-se que nesta velocidade, as viscosidades absolutas das soluções nas concentrações de 0,5 a 10 g/L encontram-se no platô Newtoniano.

A Figura 29 mostra que as soluções da fração FS2-B em NaCl $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nas concentrações de 0,5; 1; 1,5 e 2 g/L, apresentam comportamento Newtoniano na faixa de velocidade de cisalhamento selecionada ($10 \text{ a } 5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$), tendo como valores de viscosidade absoluta 1,3; 1,6; 2,3 e 3,1 mPa.s, respectivamente.

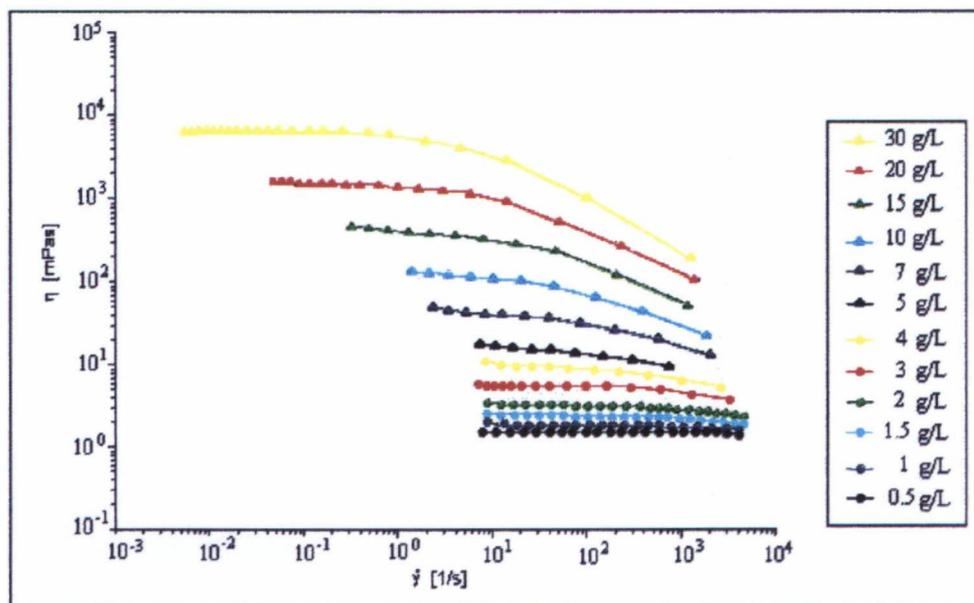


Figura 29: Viscosidade absoluta (η) em função da velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para a fração FS2-B em solução de NaCl $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, nas concentrações de 0,5 a 30g/L.

As concentrações de 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20 e 30g/L apresentaram comportamento pseudoplástico ou não-Newtoniano, com valores de viscosidade absoluta no platô Newtoniano de 5,5; 9,8; 15; 38,5; 122,5; 370; 1.465 e 6.652 mPa.s, respectivamente.

Este comportamento pseudoplástico observado para a fração FS2-B está de acordo com os resultados obtidos por Bhattacharya (1999) para polpa de manga íntegra e por Guerrero & Alzamora (1998) para purê de manga, ambos caracterizados como fluidos pseudoplásticos.

4.2.3. Determinação da concentração crítica (c^*) da fração FS2-B

Além de variar com a velocidade de cisalhamento, a viscosidade depende da concentração polimérica em solução, como observado nas curvas de fluxo.

O início do enovelamento entre as cadeias em uma solução marca a transição do regime diluído para o regime semi-diluído, tanto para polímeros neutros como para polímeros

carregados (Morris, 1995). A concentração de polímero nesta fase de transição é denominada concentração crítica (c^*).

A determinação gráfica da concentração crítica depende do valor numérico da viscosidade intrínseca ($[\eta]$), constante de Huggins (K'), e viscosidade específica (η_{sp}) de soluções poliméricas em diferentes concentrações.

Para a fração FS2-B, o valor da viscosidade intrínseca ($[\eta] = 700 \text{ mL/g}$) e da constante de Huggins ($K' = 0,393$) foram utilizados para a obtenção do gráfico determinante da concentração crítica, bem como os valores de viscosidade específica das concentrações de 0,5 a 30 g/L.

A taxa de umidade de 21,5% encontrada para a fração FS2-B foi descontada dos valores de concentração de 0,5 a 30g/L para a determinação da concentração crítica.

Os valores numéricos necessários para a construção do gráfico, resultantes dos cálculos através da equação de Huggins ($c[\eta]$) e equação de Huggins modificada ($c[\eta] + K' \{ c[\eta] \}^2$) são mostrados na Tabela VII.

Os valores de viscosidade específica (eixo das ordenadas) contra os valores obtidos com as duas equações acima (eixo das abcissas) resulta em duas curvas através das quais se determina a concentração crítica (Figura 30).

A faixa linear de inclinação 1,1 (linha em vermelho) da curva b fornece por extrapolação à curva a o valor da concentração crítica de aproximadamente 1,6. Este ponto é atribuído à transição do regime diluído e semi-diluído, onde as moléculas que compõem a fração FS2-B iniciam o entrelaçamento polimérico, como mostrado na Figura 6b.

O mesmo procedimento foi utilizado para todo o domínio de concentração na determinação da c^* para xantana (Milas *et al.*, 1990), succinoglicana e escleroglucana (Rinaudo & Milas, 1987), que apresentaram valor de $c^* \sim 1$.

A determinação da concentração crítica da galactomanana de *Mimosa scabrella* foi realizada por esta mesma representação, apresentando valor de $c^* \sim 2,6$ (Ganter, 1991). Este valor foi similar ao encontrado para polímeros flexíveis como poliestireno e poliestireno sulfonado (Ganter, 1991; Ganter *et al.*, 1992b).

Tabela VII: Obtenção dos valores numéricos para a construção do gráfico determinante da concentração crítica (c^*).

concentração (c) g/mL ^a	viscosidade absoluta (η) mPa.s	Viscosidade específica (η_{sp}) adimensional	$c[\eta]^b$	$c[\eta] + K'(c[\eta])^2{}^c$
$0,39 \cdot 10^{-3}$	1,360	0,402	0,272	0,299
$0,78 \cdot 10^{-3}$	1,678	0,729	0,543	0,658
$1,17 \cdot 10^{-3}$	2,336	1,408	0,815	1,076
$1,57 \cdot 10^{-3}$	3,184	2,282	1,094	1,562
$2,35 \cdot 10^{-3}$	5,488	4,148	1,637	2,690
$3,14 \cdot 10^{-3}$	9,838	8,228	2,187	4,066
$3,92 \cdot 10^{-3}$	15,043	13,864	2,731	5,658
$5,49 \cdot 10^{-3}$	38,596	37,138	3,824	9,570
$7,85 \cdot 10^{-3}$	122,580	120,126	5,468	17,218
$11,77 \cdot 10^{-3}$	370,366	364,974	8,199	34,610
$15,70 \cdot 10^{-3}$	1464,660	1425,153	10,937	57,937
$23,55 \cdot 10^{-3}$	6652,000	6476,117	16,405	122,156

a) valores de concentração com taxa de umidade descontada

b) $[\eta] = 700\text{mL/g}$

c) $K' = 0,393$

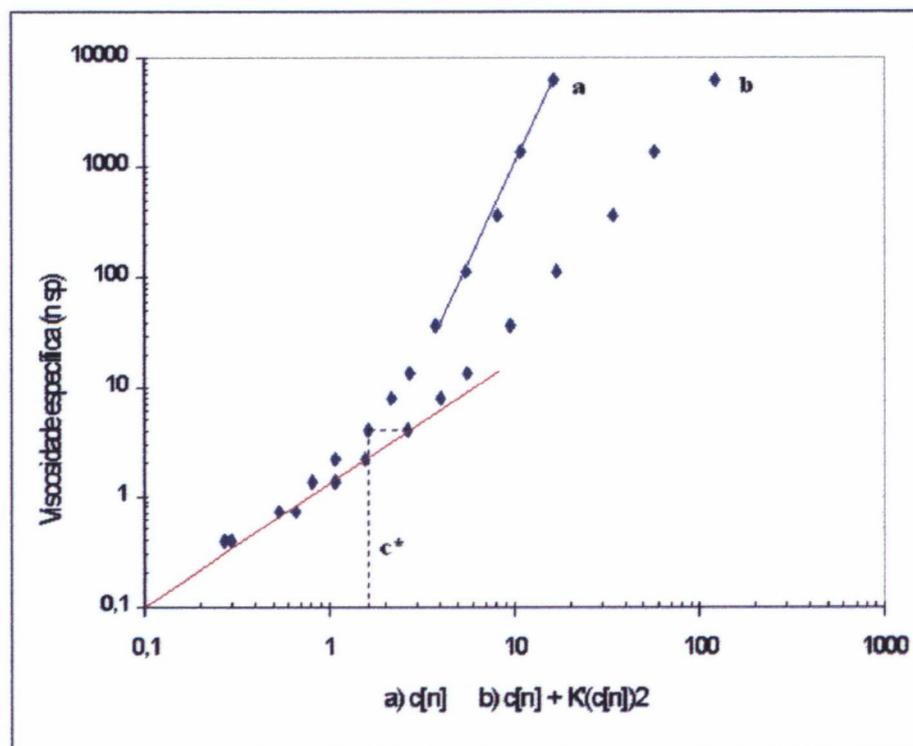


Figura 30: Viscosidade específica (η_{sp}) em função do parâmetro de abrangência a) $c[\eta]$, b) $c[\eta] + K'(c[\eta])^2$, para soluções em NaCl 0,01 mol.L⁻¹ da fração FS2-B.

O valor de c^* determinado para a fração FS2-B encontra-se entre os valores admitidos para polissacarídeos microbianos, como xantana (Milas *et al.*, 1990) e succinoglucana (Rinaudo & Milas, 1987), e polímeros como galactomananas, dextranas, carragenanas (Morris, 1981), poliestireno e poliestireno sulfonado (Ganter *et al.*, 1992b). Considerando que os polissacarídeos microbianos apresentam maior rigidez molecular que as galactomananas (Robinson *et al.*, 1982), pode-se sugerir que a fração polimérica FS2-B apresenta uma rigidez intermediária entre os polímeros microbianos e os demais citados.

Foi observado que para valores de $c[\eta]$ maiores que 4 (Figura 30a) a dependência logarítmica da viscosidade específica em função de $c[\eta]$ torna-se linear (linha azul) com uma inclinação de 3,5. Considerando que quanto maior o valor desta inclinação, maior é a interação entre as cadeias poliméricas (Rinaudo *et al.*, 1999), o valor encontrado para

galactomanana de *Mimosa scabrella* de 4,2 (Ganter, 1991) indica a existência de uma maior interação intermolecular em regime concentrado que na fração FS2-B.

4.2.4. Análise de tensão temporária da fração FS2-B

Na análise de tensão transitória, os experimentos são realizados no sistema estático e servem para avaliar o comportamento viscoelástico dos polímeros.

Em experimentos de tensão transitória é aplicada uma tensão constante e de pequena amplitude sobre o material em um período de tempo determinado, e a correspondente deformação é observada em função do tempo. Após este período denominado fase de arraste, inicia-se a fase de recuperação onde a tensão é totalmente retirada, e a resposta da amostra pode ser avaliada.

Quando uma tensão é aplicada sobre um fluido viscoelástico, este pode instantaneamente reagir com várias fases de deformação relacionadas ao tempo. Inicialmente há alongação espontânea de alguns segmentos posicionados paralelamente à tensão aplicada. Em seguida outros segmentos e a rede emaranhada deformam dentro de seus limites mecânicos e, finalmente as moléculas do emaranhado se desfazem, e o fluido começa a fluir continuamente. A deformação provocada em função do tempo mostra-se inicialmente rápida, seguida por um gradual decréscimo na inclinação da curva de deformação, como mostra a Figura 10. Ao cessar a tensão aplicada, inicia-se a fase de recuperação, quando a deformação diminui em função do tempo indicando que houve recuperação de parte da energia utilizada na deformação da amostra (Schramm, 1994).

Nesta técnica utiliza-se o menor valor de tensão possível, e a análise do comportamento viscoelástico das amostras pode ser realizado sem que haja perturbação significativa na estrutura intermolecular dos polímeros.

Para a realização desta análise com grande sensibilidade, utiliza-se sensor com geometria cone-placa com ângulo pequeno ($< 4^\circ$).

A análise do comportamento viscoelástico da fração FS2-B em solução de NaCl 0,01 mol.L⁻¹ foi realizada com as concentrações de 20 e 30 g/L como mostra a Figura 31.

É possível observar que a fração FS2-B nas concentrações de 20 e 30 g/L apresentou um perfil característico de um líquido viscoelástico com a recuperação da deformação atingindo

um valor de complacência (J) constante diferente de zero, de 200 e 50 Pa⁻¹, respectivamente, sendo que a fração FS2-B em concentração de 30 g/L apresenta um caráter mais elástico que em concentração de 20 g/L, devido ao menor valor de complacência desta amostra.

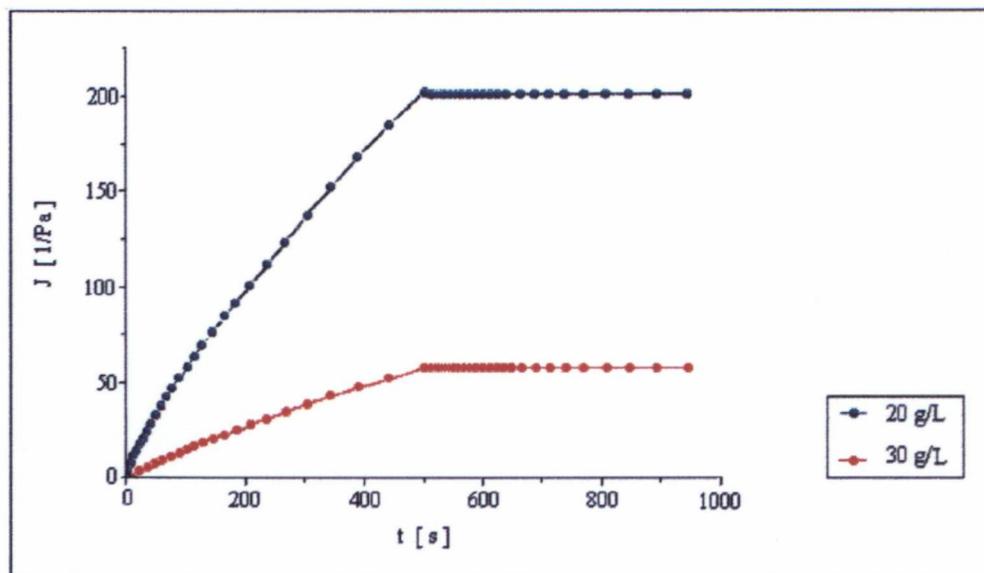


Figura 31: Análise de tensão temporária da fração FS2-B em solução de NaCl 0,01 mol.L⁻¹ nas concentrações de 20 e 30 g/L.

O perfil das soluções da fração FS2-B em 20 e 30 g/L, quando em comparação com a Figura 10, revela um comportamento de líquido viscoelástico, onde ocorre uma pequena recuperação do parâmetro de complacência após a retirada da tensão.

Estes resultados são concordantes com os valores obtidos pela análise do comportamento de fluxo em sistema estático, onde uma maior viscosidade absoluta foi encontrada para a concentração de 30 g/L (6.652 mPa.s) em relação à concentração de 20 g/L (1465 mPa.s).

4.2.5. Análise dinâmica da viscoelasticidade

As medidas reológicas dinâmicas ou oscilatórias apresentam a vantagem de permitir a utilização de amplitudes de tensão muito pequenas, minimizando os efeitos de ruptura sobre a estrutura molecular do polímero (The pharmaceutical codex, 1994).

São realizadas com soluções poliméricas em concentrações elevadas, de modo que os polímeros enovelam-se ao acaso e atuam como redes elásticas quando submetidos a pressões por um pequeno intervalo de tempo. Assim, quando as medidas dinâmicas são realizadas em amplitudes de oscilação suficientemente pequenas, encontram-se dentro do limite viscoelástico linear da amostra, onde não há perturbação significativa do sistema durante o experimento a ser realizado.

Considerando-se que polissacarídeos atuam como materiais viscoelásticos (apresentam características de sólido e líquido simultaneamente), e que os módulos G' e G'' referem-se ao caráter elástico e viscoso de um material, respectivamente, é possível quantificar a predominância do caráter sólido ou líquido de uma amostra através das medidas dinâmicas.

Sendo assim, para a determinação dos módulos G' e G'' em relação à frequência é necessário que se esteja na região de comportamento viscoelástico linear da amostra, ou seja, em condições nas quais haja uma relação linear entre a deformação sofrida e a tensão imposta ao material. Isto garante que a deformação utilizada na determinação dos módulos G' e G'' mantenha a estrutura original na amostra, evitando erro na análise dos parâmetros viscoelásticos.

4.2.5.1. Determinação da região de comportamento viscoelástico linear da fração FS2-B

Foram realizadas varreduras de tensão onde os módulos G' e G'' variam em função da deformação aplicada, sendo que uma frequência fixa é estabelecida durante a análise. Chama-se varredura de tensão porque diferentes tensões com o passar do tempo são aplicadas à amostra, gerando nesta deformações correspondentes.

Nas varreduras de tensão é possível determinar a extensão da chamada resposta linear da amostra, ou seja, a faixa de deformação na qual os módulos G' e G'' são lineares (Clark, 1991).

As varreduras de tensão da fração FS2-B foram realizadas com soluções nas concentrações de 15, 20 e 30 g/L, em triplicata, na frequência de 1Hz, como mostra a Figura 32.

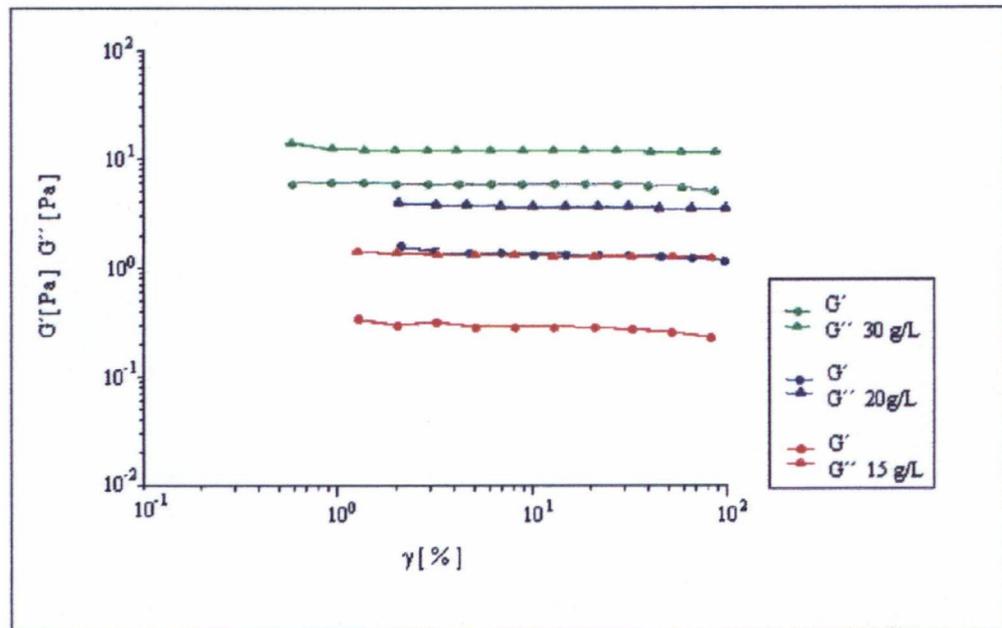


Figura 32: Análise do comportamento viscoelástico linear para a fração FS2-B em solução de NaCl $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ nas concentrações de 15, 20 e 30 g/L.

Verifica-se que quanto maior a concentração da solução, maiores são os valores dos módulos de cisalhamento dinâmico G' e G'' . E, com o aumento da tensão aplicada às amostras, há um progressivo aumento na deformação, e conseqüentemente uma diminuição nos valores do módulo dinâmico G' .

Para as 3 concentrações estudadas é possível observar que as linhas no gráfico correspondentes aos módulos G' e G'' encontram-se constantes e paralelas em uma faixa de deformação que varia de 1 a cerca de 20% (faixa de deformação coincidente para as 3 concentrações). Considerando que os valores de deformação ideais não devem exceder a 10%, uma deformação mínima de 3% foi adotada por conveniência experimental para ser empregada em testes subseqüentes, visto que esta deformação não provoca alteração na estrutura molecular em qualquer das 3 concentrações e garante a validade das análises.

Os valores de deformação utilizados em análises reológicas de polissacarídeos geralmente variam entre 1 e 10% (Chronakis & Kasapis, 1993; Hember & Morris, 1995;

Chronakis *et al.*, 1996; Bresolin *et al.*, 1996 e 1998; Schorsch *et al.*, 1997; Ridout *et al.*, 1998).

As varreduras de tensão com soluções nas mesmas concentrações (15, 20 e 30 g/L) foram também efetuadas nas frequências de 0,1 e 10 Hz, mas não se mostraram adequadas. Os gráficos obtidos com frequência de 0,1 Hz apresentaram pequena extensão de faixa viscoelástica linear, e os obtidos com frequência de 10 Hz apresentaram pouca precisão na extensão desta faixa. Portanto, estas frequências não foram utilizadas para a determinação do valor de deformação.

Soluções da fração FS2-B nas concentrações de 5, 7 e 10 g/L também foram avaliadas por varredura de tensão, entretanto encontram-se fora do limite de sensibilidade do equipamento, apresentando uma deformação acentuada em menores faixas de tensão.

Encontrada a deformação mínima adequada para a fração FS2-B, as varreduras de frequência foram iniciadas com o intuito de analisar o comportamento viscoelástico da fração.

4.2.5.2. Análise do comportamento viscoelástico da fração FS2-B

O comportamento viscoelástico da fração FS2-B foi analisado nas concentrações de 15, 20 e 30 g/L, em uma faixa de frequência de 10^{-2} a 10 Hz, com deformação fixa de 3%, em temperatura de 25°C, em triplicata. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 33.

Nas varreduras de frequência é possível analisar o comportamento dos polímeros, classificando-os entre os 3 tipos básicos de sistemas de polissacarídeos: gel forte, gel fraco (ou solução viscosa) e solução diluída (Morris, 1995).

Pela análise da Figura 33 verifica-se que em todas as concentrações o módulo viscoso (G'') é superior ao módulo elástico (G') apenas em baixos valores de frequência, ocorrendo inversão dos módulos em frequências mais elevadas, demonstrando o comportamento de gel fraco da fração FS2-B nestas concentrações.

Os valores de G' no ponto de inversão para as concentrações de 15, 20 e 30 g/L foram de 8, 18 e 40 Pa, respectivamente, mostrando um comportamento mais elástico em maiores concentrações, em concordância com os resultados anteriores de “creep” (Figura 31).

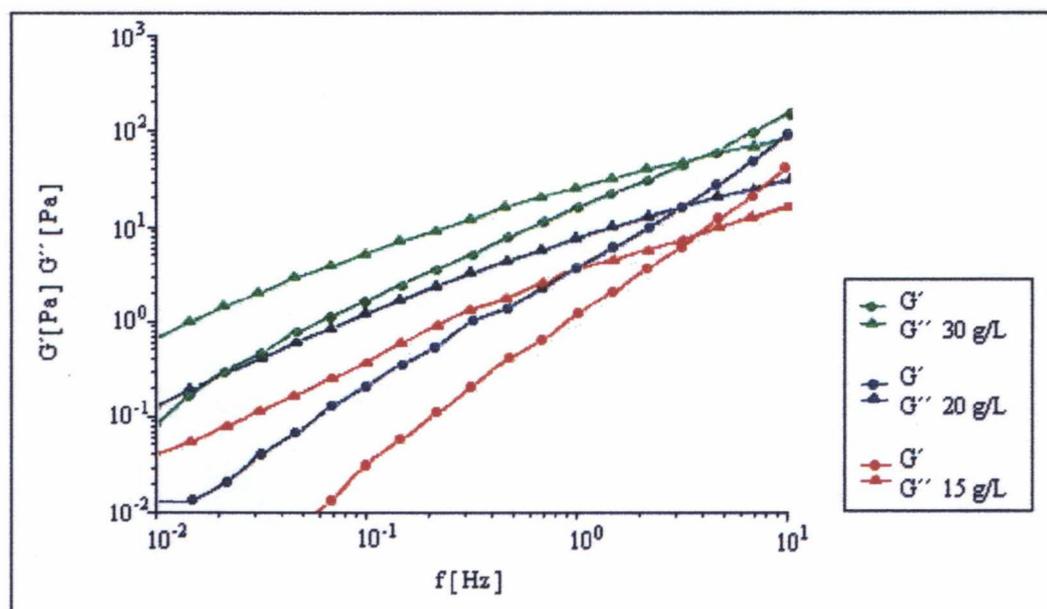


Figura 33: Análise do comportamento viscoelástico da fração FS2-B em solução de NaCl $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ nas concentrações de 15, 20 e 30 g/L.

Além disso, para a concentração de 30 g/L, os módulos elástico e viscoso em baixas frequências apresentam-se mais próximos que na concentração de 20 g/L, e nesta mais próximos que na concentração de 15 g/L, demonstrando um caráter mais elástico com o aumento da concentração de polímero, em concordância com os experimentos de tensão transitória.

Considerando que a fração FS2-B é constituída por polieletrólito (polissacarídeo pético) e polímero neutro (amido), pode-se sugerir uma possível interação entre os polímeros que necessita ser investigada.

Os estudos sobre polpa de manga presentes na literatura têm trazido informações sobre as características reológicas do produto total, e assim a investigação desenvolvida neste trabalho sobre a estrutura e características reológicas de polissacarídeos obtidos de polpa de manga pode ser útil no controle de qualidade de produtos, prevendo suas propriedades de fluxo.

De acordo com o caráter viscoelástico encontrado para a fração FS2-B nas concentrações analisadas, e considerando que o Brasil é grande produtor de manga, este produto apresenta potencial de aplicação na indústria alimentícia e cosmética.

———— *CONCLUSÕES* ————

5. Conclusões

1. A fração solúvel de polpa de manga FS2-B apresenta polissacarídeos pécticos e amido em sua composição. O amido foi caracterizado pela reação com lugol e pela susceptibilidade à ação de α -amilase salivar.
2. A análise por ^{13}C -RMN da fração FS2-B, e por GC-MS da fração FS2-B carboxireduzida sugerem que o polissacarídeo ácido predominante é ácido poligalacturônico.
3. A presença de arabinose e galactose além de glucose na fração neutra obtida da coluna de troca iônica sugere a presença de arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas neutras provavelmente oriundas de ramnogalacturonanas do tipo I, onde podem constituir cadeias laterais.
4. A identificação por GC-MS do monossacarídeo 2-*O*-metil-L-fucose na fração FS2-B sugere a presença de ramnogalacturonana do tipo II nesta fração.
5. O valor de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) encontrado para a fração FS2-B a 25°C é $[\eta] \sim 700$ mL/g, e o valor da constante de Huggins, $K' = 0,393$.
6. A transição entre o regime diluído e semi-diluído para soluções da fração FS2-B é determinada em $c^*[\eta] \sim 1,6$, valor intermediário entre os admitidos para polissacarídeos microbianos como a xantana e polissacarídeos vegetais como as galactomananas.
7. As análises das propriedades reológicas no sistema estático através de comportamento de fluxo mostraram que a fração FS2-B em solução de NaCl $0,01\text{mol.L}^{-1}$, em concentrações de 0,5 a 2 g/L apresentou comportamento Newtoniano, sendo que em concentrações superiores o comportamento foi caracterizado como pseudoplástico.

8. Os resultados obtidos no sistema estático através de medidas de tensão transitória indicam que nas concentrações analisadas (20 e 30g/L), as soluções da fração FS2-B em NaCl $0,01\text{mol.L}^{-1}$ comportaram-se como líquidos viscoelásticos, sendo que na maior concentração a solução apresentou-se mais elástica. Estes resultados encontram-se em concordância com os obtidos pela análise do comportamento de fluxo.

9. As medidas reológicas no sistema dinâmico indicam que a fração FS2-B em solução de NaCl $0,01\text{mol.L}^{-1}$ nas concentrações analisadas (15, 20 e 30g/L), comportou-se como gel fraco, demonstrando um caráter mais elástico com o aumento da concentração de polímero, o que está de acordo com os experimentos de comportamento de fluxo e de tensão transitória.

————— REFERÊNCIAS —————
BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 5, p. 269, 1969.
- AROGBA, S. S. The performance of processed mango (*Mangifera indica*) kernel flour in a model food system. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 70, n. 3, p. 277-281, 1999.
- BARREIRA, S. M. W. **Estudo comparativo de polissacarídeos e oligossacarídeos de líquens do gênero *Cladonia***. Curitiba, 1999. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná.
- BELESKI-CARNEIRO, E. B.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Structural aspects of the exudate from the fruit of *Chorisia speciosa* St. Hil. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxon, v. 26, p. 219-224, 1999.
- BeMILLER, J. N. Starch-based gums. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N. **Industrial Gums. Polysaccharides and Their Derivatives**, 3.ed., San Diego: Academic Press, 1993. p.579-600.
- BHATTACHARYA, S.; RASTOGI, N. K. Rheological properties of enzyme-treated mango pulp. **Journal of Food Engineering**, Oxon, v. 36, p. 249-262, 1998.
- BHATTACHARYA, S. Yield stress and time-dependent rheological properties of mango pulp. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 64, n. 6, p. 1029- 1033, 1999.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANS, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 54, p. 484-489, 1973.

- BREITMAIER, E.; VOELTER, W. **Carbon - 13 NMR spectroscopy : high resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry**. 3 ed. Weinheim: VCH, 1987, 515p.
- BRESOLIN, T. M. B.; BELTRAMINI, L. M.; SANDER, P. C.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Physiochemical aspects of intermolecular interaction of the galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella* Benth. **Latin American Applied Research**, v. 26, p. 5-7, 1996.
- BRESOLIN, T. M. B.; SANDER, P. C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Viscometric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 33, p. 131-138, 1997.
- BRESOLIN, T. M. B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules**, Oxon, v. 23, p. 263-275, 1998.
- BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, Ltda, 1990, 194 p.
- BRINSON, K.; DEY, P. M.; JOHN, M. A.; PRIDHAM, J. B. Post-harvest changes in *Mangifera indica* mesocarp cell walls and cytoplasmic polysaccharides. **Phytochemistry**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 719-723, 1988.
- CAO, Y.; DICKINSON, E.; WEDLOCK, D. J. Influence of polysaccharides on the creaming of casein-stabilized emulsions. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 443-454, 1991.
- CARBONELL, E.; COSTELL, E.; DURÁN, L. Rheological behaviour of sheared jams. Relation with fruit content. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v. 22, p. 33-43, 1991.

- CARPITA, N. C.; SHEA, E. M. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J.; McGINNIS, G. D. **Analysis of carbohydrates by GLC and MS**. Florida: CRC Press, 1989. P. 157-216.
- CASTELAIN, C.; DOUBLIER, J. L.; LEFEBVRE, J. A study of the viscosity of cellulose derivatives in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 7, p. 1-16, 1987.
- CLARK, A. H. Structural and mechanical properties of biopolymers gels. In: DICKINSON, E. **Food polymers, gels and colloids**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, n. 82, 1991. p.322-338.
- COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. **Monosaccharides: their chemistry and their role in natural products**. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. 574p.
- COOPER, J. M.; McCLEARY, B.V.; MORRIS, E.R.; RICHARDSON, R.K.; MARRS, W.M.; HART, R.J. Preparation, physical properties and potencial food applications of enzymically-debranched araban from sugar-beet. In: PHILLIPS, G.O., WILLIAMS, P.A.; WEDLOCK, D.J. **Gums and stabilizers for the food industry**, 1992. p. 451-460.
- CHRONAKIS, I. S.; KASAPIS, S. Structural properties of single and mixed milk/soya protein system. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 459-478, 1993.
- CHRONAKIS, I. S.; KASAPIS, S.; RICHARDSON, R. K. Small deformation rheological properties of maltodextrin-milk protein systems. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 29, p. 137-148, 1996.
- DEA, I. C. M. Conformational origins of polysaccharide solution and gel properties. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial gums, polysaccharides and their derivatives**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1993. p. 21-52.

- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- EL-NEMR, S. E.; ISMAIL, I. A. Aroma changes in mango juice during processing and storage. **Food Chemistry**, Oxon, v. 30, n. 4, p. 269-275, 1988.
- FERRY, J. D. Illustration of viscoelastic behaviour of polymeric systems. In: FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1980. p.33 – 55.
- GANTER, J. L. M. S. **Estudos de carboidratos de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga). Análise estrutural dos oligossacarídeos e propriedades reológicas da galactomanana**. Curitiba, 1991. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- GANTER, J. L. M. S.; MILAS, M.; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 17, p. 171-175, 1992a.
- GANTER, J. L. M. S.; MILAS, M.; RINAUDO, M. On the viscosity of sodium poly (styrene sulphonate), a flexible polyelectrolyte. **Polymers**, v. 33, n. 1, p. 113-116, 1992b.
- GAONKAR, A.G. Surface and interfacial activities and emulsion characteristics of some food hydrocolloids. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 329-337, 1991.
- GARTI, N.; MADAR, Z.; ASERIN, A.; STERNHEIM, B. Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 30, p. 305-311, 1997.

- GLIKSMAN, M. Gelling hydrocolloids in food product applications. In: BLANSHARD, J. M. V.; MITCHELL, J. R. **Polysaccharides in Food**. London: Butterworths, 1979. p. 185-204.
- GLIKSMAN, M. Hydrocolloids and the search for the “oily grail”. **Food Technology**, Chicago, n. 10, p. 94-101, 1991.
- GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 53, p. 1212 – 1223, 1975.
- GOWDA, I. N. D.; RAMANJANEYA, K. H.; IYER, C. P. A.; SUBRANANYAM, M. D.; DINESH, M. R. Physico-chemical and processing quality of four new mango hibrids in comparison to two commercial cultivars. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.31, n. 5, p. 385-388, 1994.
- GUERRERO, S. N.; ALZAMORRA, S. M. Effect of pH, temperature and glucose addition on flow behaviour of fruit purées: II. Peach, papaya and mango purées. **Journal of Food Engineering**, Oxon, v. 37, p. 77-101, 1998.
- GUILBOT, A.; MERCIER, C. Starch. In: ASPINALL, G. O. **The polysaccharides**, v. 3, Florida: Academic Press, Inc., 1985. p. 209-281.
- GUNJAL, B.B.; WAGHMARE, N.J. Flow characteristics of pulp, juice and nectar of “Baneshan” and “Neelum” mangoes. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 24, p. 20-23, 1987.
- HARRIS, P. J.; HENRY, R. J.; BLAKENEY, A. B.; STONE, B. A. An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polisaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 127, p. 59 – 73, 1984.

- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v.48, p.422-427, 1972.
- HEMBER, M. W. N.; MORRIS, E. R. Solubility, solution rheology and salt-induced gelation of welan polysaccharide in organic solvents. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 27, p. 23-36, 1995.
- HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. The rheology of dispersions. In: HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**. 3.ed. Marcel Dekker, Inc., 1997, p. 145-188.
- HWANG, J.; KOKINI, J. L. Structure and rheological function of side branches of carbohydrate polymers. **Journal of Textures Studies**, Trumbull, v. 22, p. 123-167, 1991.
- IBARZ, A. *et al.* Rheological properties of clarified pear juice concentrates. **Journal of Food Engineering**, Oxon, v. 10, p. 57-63, 1989.
- IBARZ, A.; GINER, J., PAGAN, J., GIMENO, V. e GARZA, S. Rheological behaviour of kiwi fruit juice concentrates. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v. 26, p. 137-145, 1995.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS - IBRAF. **Soluções fruta a fruta: manga**. São Paulo, 1995.
- INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - ITAL. **Manga: da cultura ao processamento e comercialização**. São Paulo, 1981. 358p.
- ISAACS, A. R.; BRADLEY, B. F.; NOTTINGHAM, S. M. The storage stability of passion fruit concentrate. **Food Technology in Australia**, Sydney, v. 40, n. 8, p. 318-319, 1988.

- KETSA, S.; CHIDTRAGOOL, S.; KLEIN, J. D.; LURIE, S. Firmness, pectin components and cell wall hydrolases of mango fruit following low-temperature stress. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, v. 74, n. 6, p. 685-689, 1999.
- KHALIL, K. E.; RAMAKRISHNA, P.; NANJUNDASWAMY, A. M.; PATWARDHAN, M. V. Rheological behaviour of clarified banana juice: effect of temperature and concentration. **Journal of Food Engineering**, Oxon, v. 10, p. 231-240, 1989.
- KRATCHANOVA, M.; BÉNÉMON, C.; KRATCHANOV, C. On the pectic substances of mango fruits. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 15, p. 271-282, 1991.
- LARRAURI, J. A. New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 3-8, 1999.
- LILLFORD, P. J.; NORTON, I. T. Food hydrocolloids: an end user's viewpoint. In: PHILLIP, G.O., WILLIAMS, P.A.; WEDLOCK, D.J. **Gums and stabilizers for the food industry 6**, Oxford: IRL Press, 1992. p. 3-15.
- MacLEOD, A.J.; PIERIS, N.M. Comparison of the volatile components of some mango cultivars. **Phytochemistry**, Oxon, v. 23, n. 2, p. 361-366, 1984.
- McCANN, M. C.; ROBERTS, K. Plant cell wall architecture: the role of pectins. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. **Pectin and pectinases**, Oxford: Elsevier Science, 1996. p. 91-107.
- MANOHAR, B.; RAMAKRISHNA, P.; RAMTEKE, R.S. Effect of pectin content on flow properties of mango pulp concentrates. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v. 21, p. 179-190, 1990.
- MILAS, M.; RINAUDO, M.; KNIPPER, M.; SCHUPPISER, J. L. Flow and viscoelastic properties of xanthan gum solutions. **Macromolecules**, v. 23, n. 9, p. 2506-2511, 1990.

- MITCHAM, E.J.; McDONALD, R.E. Cell wall modification during ripening of “keitt” and “tommy atkins” mango fruit. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, p. 919-924, 1992.
- MITCHELL, J. R. Rheology of polysaccharides solutions and gels. In: J. M. V. BLANSHARD; MITCHELL, J. R. **Polysaccharides in food**. London: Butterworths, 1979. p. 51.
- MITCHELL, J. R. Rheological techniques. In: GRUENWEDEL, D. W.; WHITAKEN, J. R. **Food analysis: principles and techniques [S.L.]** : Marcel-Dekker, Inc., 1984, p.151-220.
- MIZRAHI, S. A review of the physicochemical approach to the analysis of the structural viscosity of fluid fruit products. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v. 10, p. 67-82, 1978.
- MORRIS, E.R. Polysaccharides structure and conformation in solution and gels. In: BLANSHARD, J.M.V.; MITCHELL, J.R. **Polysaccharides in food**. London: Butterworths, 1979. p. 15.
- MORRIS, E.R.; CUTLER, A.N.; ROSS-MURPHY, S.B.; REES, D.A.; PRICE, J. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 1, p. 5-21, 1981.
- MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. **Gums and stabilizers for the food industry**, v. 2, Oxford: Pergamon Press, 1984. p. 57-78.
- MORRIS, V.J. Food gels – roles played by polysaccharides. **Chemistry and Industry**, London, v. 4, p.159-164, 1985.
- MORRIS, V. J. Weak and strong polysaccharides gels. In DICKINSON, E. **Food polymers, gels and colloids**, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991. p. 310-321.

- MORRIS, E. R. Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharide and their applications**, New York, 1995. p. 517 – 546.
- MUDA, P.; SEYMOUR, G.B.; ERRINGTON, N.; TUCKER, G.A. Compositional changes in cell wall polymers during mango fruit ripening. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 26, p. 255-260, 1995.
- OAKENFULL, D. **Gelling systems**. In: XIXth INTERNATIONAL CARBOHYDRATE SYMPOSIUM, (1998: San Diego). Anais. San Diego, 1998.
- OLLÉ, D.; LOZANO, Y. F.; BRILLOUET, J. Isolation and characterization of soluble polysaccharides and insoluble cell wall material of the pulp from four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p.2658-2662, 1996.
- PAZUR, J.H. Neutral polysaccharides. In: CHAPLIN, M.F. e KENNEDY, J.F. **Carbohydrates Analysis: A Pratical Approach**, 2 ed., New York: IRL Press, 1994. 324p.
- PELLERIN, P.; DOCO, T.; VIDAL, S.; WILLIAMS, P.; BRILLOUET, J. The pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is a major component of the polysaccharides present in fruit-derived products. In: VISSER, J.; VORAGEN, A.G. J. **Pectins and Pectinases**, Oxford: Elsevier, 1996. p. 67-78.
- PERISSUTI, G. E. **Estudo da interação entre galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham e proteínas do leite**. Curitiba, 1999. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 83, p. 346-356, 1977.

- PIÑERA, R.; HOMBRE, R.; BATISTA, A.; CEREZAL, P. Influencia de la variedad en la calidad de la pulpa de guayaba. **Alimentaria**, Madrid, v. 35, n. 280, p. 19-20, 1997.
- RAMTEKE, R.S.; EIPESON, W.E. Effect of additives on the stability of mango aroma concentrate during storage. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.34, n. 3, p.195-199, 1997.
- RAO, K.L.; EIPESON, W.E.; RAO, P.N.S.; PATWARDHAN, M.V.; RAMANATHAN, P.K. Rheological properties of mango pulp and concentrates. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 22, p. 30-33, 1985.
- RAYMENT, P.; ROSS-MURPHY, S. B.; ELLIS, P. R. Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures. II. Creep measurements. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 35, p. 55-63, 1998.
- REED, W. F. Data evaluation for multi - detector size exclusion chromatography-molar mass, viscosity and radius of gyration distributions. **Macromolecular Chemistry and Physics**, Basil, v.196, p. 1539-1575, 1995.
- RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.; MORRIS, V. J. Synergistic interactions of acetan with carob or konjac mannan. **Macromolecules**, v. 31, p. 2539-2544, 1998.
- RINAUDO, M.; MILAS, M. On the properties of polysaccharides. Relation between chemical structure and physical properties. In: **INDUSTRIAL Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure / Property Relations and Applications**, 1987. p. 217-223.
- RINAUDO, M. Polysaccharides characterization in relation with some original properties. **Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium**, v.52, p. 11-17, 1993.

- RINAUDO, M.; MILAS, M.; BRESOLIN, T.; GANTER, J. Physical properties of xanthan, galactomannan and their mixtures in aqueous solutions. **Macromolecular Symposia**, Basil, v. 140, p. 115-124, 1999.
- ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S. B.; MORRIS, E. R. Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 107, p. 17-32, 1982.
- ROLIN, C. Pectin. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial gums. polysaccharides and their derivatives**, 3.ed., San Diego: Academic Press, 1993. p.257-293.
- ROMBOUTS, F. M.; THIBAUT, J. Enzymic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 154, p. 189-203, 1986.
- SANDERSON, G. R. Polysaccharides in foods. **Food Technology**, Chicago, v. 35, p. 50-57, 1981.
- SANDERSON, G. R. **The rationale behind the applications of food polysaccharides. XIXth INTERNATIONAL CARBOHYDRATE SYMPOSIUM**, (1998 : San Diego). Anais. San Diego, 1998.
- SCHOLS, H. A.; POSTHUMUS, M. A.; VORAGEN, G. J. Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 206, p. 117-129, 1990.
- SARAVACOS, G. D. Effect of temperature on viscosity of fruit juices and purees. **Journal of Food Science**, Mysore, v. 35, p. 122-125, 1970.

- SCHORSCH, C.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. L. Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: comparison of guar gum with locust bean gum. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v. 34, p. 165-175, 1997.
- SCHOTT, H. Reologia. In: GENNARO, A. R. **Remington: Farmacia**, Buenos Aires: Panamericana, v. 2, 1992, p. 461.
- SCHRAMM, G. **A practical approach to rheology and rheometry**. Karlsruhe, Federal Republic of Germany: Gebrueder HAAKE GmbH, 1994. 290p.
- SENER, S. D.; PAYNE, J. A.; KNIGHT, R. J.; AMIS, A. A. Yield and quality of juice from passion fruit (*Passiflora edulis*), maypops (*P. incarnata*) and tetraploid passion fruit hybrids (*P. edulis x P. incarnata*). **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 62, p. 67-70, 1993.
- SLONEKER, J. H. Gas- liquid chromatography of alditol acetates. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 6, p. 20 – 24, 1972.
- SREENATH, H.K.; SUDARSHANA KRISHNA, K.R.; SANTHANAM, K. Enzymatic liquefaction of some varieties of mango pulp. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, p. 196-200, 1995.
- TAGER, A. **Physical chemistry of polymers**. 2.ed. Moscow: Mir Publishers, 1978, 652p.
- TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycours to monosaccharides following reduction of their carbodiimide activated carboxyl groups. **Biochemistry**, Washington, v. 11, n. 8, p. 1383-1388, 1972.
- THAKUR, B. R.; SINGH, R. K., HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 37, n. 1, p. 47-73, 1997.

- THE PHARMACEUTICAL CODEX. **Principles and practice of pharmaceuticals.**
WALTER, L., 12 ed., London: The Pharmaceutical Press, 1994. 1117p.
- VÉLEZ-RUIZ, J. F.; CÁNOVAS, G. V. B. Rheological properties of selected dairy products.
Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 37, n. 4, p. 311-359, 1997.
- WHISTLER, R. L.; CORBETT, W. M. Polysaccharides. In: PIGMAN, W. **The Carbohydrates. Chemistry, Biochemistry, Physiology**, New York: Academic Press, 1957, p. 641-708.
- WHISTLER, R.L. Introduction to industrial gums. In: WHISTLER, R.L. e BeMILLER, J.N. **Industrial Gums. Polysaccharides and their Derivatives**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1993. p.1.
- WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydrate. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, New York, v. 2, p. 65, 1963a.
- WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York, v.2, p.211, 1963b.
- WÜRSCH, P.; HOOD, L. F. Structure of starch from mango seed. **Starch**, Weinheim, v. 33, n. 7, p. 217-221, 1981.
- ZASYPKIN, D. V.; BRAUDO, E. E.; TOLSTOGUZOV, V. B. Multicomponent biopolymer gels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 159-170, 1997.
- ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; SIERAKOWSKI, M. R.; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F. A linear (1→ 5)-linked α -L-arabinofuranan from seeds of guapuruvu (*Schizolobium parahybum*). **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 233, p. 265-269, 1992.