TANIA MARI BELLÉ BRESOLIN

### PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE BIOPOLÍMEROS: XANTANA/GALACTOMANANAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

CURITIBA 1998 TANIA MARI BELLÉ BRESOLIN

# PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE BIOPOLÍMEROS: XANTANA/GALACTOMANANAS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica

CURITIBA 1998

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Joana Léa Meira Silveira Ganter Co-orientação: Prof. Dr. Paulo Cezar Sander

Parte desta tese foi realizada no Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales - CERMAV/CNRS, ligado à Universidade Joseph Fourier, Grenoble (França), através do programa "Sanduiche" - CAPES, sob a orientação de:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marguerite Rinaudo Prof. Dr. Michel Milas

Ao meu marido José, pelo incentivo e apoio e ao meu filho Francisco, pelo sacrifício de minha ausência. Com todo o meu amor.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo exemplo de vida e valores, e à Iria, pelo apoio fundamental e carinho com que nos auxiliou neste período importante de nossas vidas.

Não mantenhas em tua bolsa diferentes pesos, nem haverá em tua casa um alqueire maior e outro menor; terás um peso justo e verdadeiro, e o teu alqueire será exatamente igual e sempre o mesmo, para assim viveres muito tempo na terra que o Senhor teu Deus te der. Deuteronômio, 25 À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Joana Léa Meira Silveira Ganter, pelo entusiasmo, dedicação e amizade neste trabalho e importante período de minha vida, obrigada pelo exemplo de luta e perseverança.

Ao meu co-orientador, Prof. Paulo Cezar Sander, pela valiosa contribuição no desenvolvimento do trabalho e em minha formação profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Fany Reicher, pela importante colaboração, apoio e discussões neste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. M. Rinaudo e Prof. Dr. M. Milas, pela essencial contribuição técnica e acompanhamento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Maria Rita Sierakowski, pela colaboração nas análises experimentais.

À Eliana, Cármem e Janice, pelo companheirismo, ajuda e convivência, meu carinho e consideração.

À Selma, pela amizade e auxílio prestado em relação à espécie Schizolobium parahybae.

Ao Renato, pela gentileza e generosidade, à Gisele, Luciane e Vanessa, pelo incentivo, carinho e apoio, meus sinceros agradecimentos e amizade.

Aos demais colegas de laboratório, pela amizade e boa convivência.

Aos meus colegas de turma: Tania, Clarice, Mareci, Carla, Sandro, Selene, Silvia, Paulo e Fabiana, pelo companheirismo e apoio inestimáveis.

A todos os Professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Bioquímica pela colaboração e amizade.

Aos colegas do Departamento de Farmácia, pela colaboração.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências da Saúde, pela competente e gentil assistência prestada.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

### SUMÁRIO

LIST	A DE TABELAS	XV
LIST	A DE FIGURAS	XVI
LIST	A DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	XXII
RES	UMO	XXIV
ABS	TRACT	XXV
CAP	ÍTULO I -Introdução	01
1. (	Comportamento reológico de polissacarídeos em solução	02
1.1. (	Géis	02
2.	Reologia	04
2.1.	Viscosidade	05
2.2.	Fluido newtoniano	07
2.3.	Fluido não-newtoniano	08
2.3.1	. Comportamentos de fluxo independentes do tempo de aplicação da pressão de	
	cisalhamento	08
2.3.2	. Comportamentos de fluxo dependentes do tempo de aplicação da pressão de	
	cisalhamento	11
2.3.3	. Viscoelasticidade	12
2.4.	Relação entre a viscosidade e a concentração	14
2.5	Relação entre a viscosidade e a massa molecular	17
2.6.	Medidas reológicas	18
3.	Polissacarídeos de origem vegetal	21
3.1.	Galactomananas	22
3.1.1	. Estrutura química	22
3.1.2	2. Relação entre a estrutura química e as funções biológicas	23
3.1.3	B. Propriedades físico-químicas e utilização industrial	24
3.1.4	l. Contaminantes fenólicos	25
		X

4.	Polissacarídeos de origem microbiana	25
4.1.	Xantana	25
4.1.1.	Estrutura primária e secundária	25
4.2.	Papel biológico	30
4.3.	Propriedades e interesse industrial	31
5.	Interação entre polissacarídeos	33
5.1.	Função biológica	33
5.2.	Aspectos físico-químicos	33
5.3.	Mecanismos de interação	35
CAPÍ	TULO II - Objetivos	54
1.	Objetivo geral	54
2.	Objetivos específicos	54
2.1.	Galactomananas	54
2.2.	Xantana	54
2.3.	Xantana: Galactomananas	54
CAPÍ	TULO III- Materiais e métodos	55
1.	Métodos gerais	55
1.1.	Obtenção das sementes de Mimosa scabrella Bentham	55
1.2.	Extração e separação da galactomanana de Mimosa scabrella Bentham	55
1.3.	Obtenção das sementes de Schizolobium parahybae (Vellozo) Blake	55
1.4.	Extração e separação da galactomanana do endosperma de Schizolobium	
	parahybae	55
1.5.	Extração dos compostos fenólicos	56
1.6.	Separação e purificação da xantana a partir do meio de cultura	57
1.7.	Purificação da xantana a partir de amostras comerciais	57
1.8.	Preparo das soluções dos polissacarídeos isolados e de suas misturas	57
1.8.1	. Soluções de xantana (forma sódica), galactomananas e suas misturas	57

1.8.2.	Soluções de xantana na forma ácida $(H^{+})$ , galactomananas e suas misturas	58
2.	Métodos químicos	58
2.1.	Determinação do conteúdo de carboidratos e proteínas	58
2.2.	Purificação da galactomanana de M. scabrella	59
2.3.	Detecção de fenólicos	60
2.4.	Hidrólise total, redução e acetilação das galactomananas	61
3.	Métodos físicos	61
3.1.	Métodos ópticos e espectroscópicos	61
3.1.1.	Ressonância magnética nuclear de carbono-treze ( <sup>13</sup> C-NMR)	61
3.1.2.	Ressonância magnética nuclear de próton ( <sup>1</sup> H- NMR)	62
3.1.3.	Medidas quirópticas	63
3.1.3.	1. Polarimetria	63
3.1.3.	1.1. Monitoramento polarimétrico da temperatura de transição conformacional (T <sub>m</sub> )	
	da xantana	64
3.1.3.	2. Dicroísmo circular	64
3.1.4.	Refratômetro diferencial	67
3.2.	Métodos reológicos	68
3.2.1.	Viscosímetro rotacional cilindro-coaxial (sistema Searle)	68
3.2.2.	Viscosímetro rotacional oscilatório (tipo cone-placa)	69
3.2.3.	Viscosímetro capilar (tipo Ubbelohde)	70
3.3.	Métodos termoanalíticos	71
3.3.1.	Perda por dessecação	71
3.3.2.	. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	71
3.4.	Métodos cromatográficos	72
3.4.1.	. Cromatografia líquido-gasosa	72
3.4.2	. Cromatografia de exclusão estérica (SEC) acoplado a multidetectores	72
3.4.2	.1. Determinação da massa molecular média ( $M_w$ ), raio de giro ( $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ ) e viscosidade	

	intrínseca [η]	72
3.4.2.2	2. Determinação do comprimento de persistência (L <sub>p</sub> )	76
3.5.	Métodos eletrométricos	77
3.5.1.	Potenciometria	77
3.5.2.	Condutometria	77
CAPÍ	TULO IV - Resultados e discussões	78
1.	Obtenção das sementes	78
1.1.	Mimosa scabrella Bentham	78
1.2.	Schizolobium parahybae (Vellozo) Blake	80
•		
2.	Obtenção e caracterização dos polissacarideos	82
2.1.	Caracterização das galactomananas	84
2.1.1.	Investigação do componente protéico	88
2.1.2.	Investigação dos compostos fenólicos na galactomanana de M. scabrella	90
2.2.	Obtenção, purificação e caracterização da xantana	94
3.	Análise reológica do sistema xantana (Sigma):galactomananas	100
3.1.	Comportamento de fluxo dos polissacarídeos isolados	100
3.2.	Influência do grau de substituição da galactomanana na interação entre os	
	polissacarídeos	101
3.3.	Efeito da temperatura na interação entre os polissacarídeos	105
3.4.	Tixotropia das misturas de polissacarídeos	107
	A (1) (C) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (	100
4. 4	Analise fisico-química do sistema xantana (Rhone-Poulenc).galactomananas	109
4.1.1	Determinação da região viscoelástica linear	109
4.2. \$	Seleção da proporção xantana:galactomanana	110
4.3. I	Influência da temperatura	111
4.4. I	Influência da força iônica	114
4.5. <i>A</i>	Análise calorimétrica	118
		XIII

4.6. Influência da concentração iônica na análise calorimétrica	121
4.7. Efeitos de ciclos de temperatura na interação dos polissacarídeos	123
4.8. Análise quiróptica	126
4.8.1. Rotação óptica	126
4.8.2. Dicroísmo circular	128
4.9. Comportamento da interação em função do pH	132
CAPÍTULO V - Conclusões	136
Referências bibliográficas	140
Anexos	157

#### LISTA DE TABELAS

1.	Polissacarídeos	01
2.	Variação da concentração de proteína na galactomanana de bracatinga, após	
	precipitação com etanol	84
3.	Análise das galactomananas	84
4.	Conteúdo de proteína da fração de galactomanana de M. scabrella após diferentes	
	métodos de purificação	89
5.	Detecção de fenólicos totais	92
6.	Detecção de flavonóides	93
7.	Detecção de taninos	93
8.	Caracterização das amostras de xantana	95
9.	Determinação da temperatura de transição conformacional (T <sub>m</sub> ) da xantana	
	(Rhone Poulenc) através de calorimetria e polarimetria	<b>98</b>
10.	Valores de G' e G" para a xantana a 4 g/L em diferentes concentrações de NaCl	116
11.	Módulo de elasticidade para a mistura xantana:galactomanana de S. parahybae	
	(4:2 g/L), em diferentes forças iônicas	117
12.	ΔH para a mistura xantana:galactomanana de S. parahybae 4:2 (g/L) em	
	diferentes forças iônicas	123
13.	Medidas de G' e determinações calorimétricas (ΔH) para as misturas de	
	xantana (x); galactomanana (g) de S. parahybae em 10 mM de NaCl ( $T_m \approx 50$ °C)	
	e 50 mM de NaCl ( $T_m \approx 43 \text{ °C}$ )	125

#### LISTA DE FIGURAS

1.	Diferentes tipos de pressões (P) normais e tangenciais aplicadas sobre um elemento de
	superficie (A)
2.	Representação de um fluido entre duas placas planas paralelas de área A e distância
	L sendo a superior, puxada com uma força F, constante e se deslocando com
	velocidade v
3.	Pressão de cisalhamento (a) e viscosidade (b) em função da velocidade de cisalhamento
4.	Cadeia emaranhada de polímeros em repouso, com forma esférica (a) e sob ação de
	cisalhamento, alinhada à direção de fluxo (b)
5.	Curva de fluxo mostrando o fenômeno de histerese de um fluido tixotrópico
6.	Representação esquemática do arranjo das moléculas em solução nos regimes diluído
	(a), semi-diluído(b) e concentrado (c)
7.	Determinação gráfica da viscosidade intrínseca
8.	Mudança da viscosidade reduzida de um polieletrólito na ausência (a) e na presença
	(b) de sal externo em função da concentração de polieletrólito
9.	Freqüência de oscilação em função de G'(), G" () e n* () para:
	(a) gel forte; (b) rede emaranhada ou gel fraco; (c) solução diluída ()
10	Estrutura genérica de galactomananas: manose (M), galactose (G)
11	. Estrutura genérica da xantana: glucose não-substituída (a), glucose substituída (b),
	manose interna com substituinte acetil (c), ácido glucurônico (d) e manose
	externa com substituição por grupo piruvato (e)
12	. Conformações da xantana: nativa (I), desnaturada (II) e desordenada (III)
13	. Diferentes conformações da xantana em solução: xantana nativa (NX); xantana
	desnaturada (DX); xantana renaturada (RX)
14	. Modelos esquemáticos para redes de géis binários de polímeros
15	. Representação esquemática da interação da hélice da xantana com as regiões
	não-substituídas da galactomanana
16	. Representação esquemática da interação de cadeias ordenadas de xantana (X)
	com o lado não-substituído das cadeias de galactomanana
17	. Representação esquemática da interação de xantana (X) com galactomanana (G).
	Em (a) a interação incompleta pode ocorrer devido à maior rigidez na estrutura

	proporcionada pelas associações dos grupos acetil das cadeias laterais da xantana	
	com a cadeia principal da galactomanana. Em (b) Interação após desacetilção,	
	promovendo maior flexibilidade à estrutura	39
18.	Possíveis sítios de ligação para interações específicas da D-manose entre a xantana	
	desacetilada e a goma de alfarrobo: () pontes de hidrogênio; ()	
	interações eletrostáticas	40
19.	Representações esquemáticas de possíveis ligações entre a cadeia principal da	
	xantana (X) e galactomanana (G). Em (a) com as regiões não-substituídas da	
	galactomanana; (b) com a galactomanana substituída ao acaso; (c) com a	
	galactomanana substituída em resíduos alternados de manose; (d) estrutura	
	em sanduíche	42
20.	Modelo para as zonas de junção entre a xantana (X) e galactomanana (G).	
	O sentido das cadeias é indicado por setas. As cadeias de galactomanana estariam	
	substituídas somente em uma face (triângulos sólidos). Uma substituição completa	
	da galactomanana (mais os triângulos pontilhados), não seria acomodado neste modelo	44
21.	Modelo esquemático para a interação de xantana-galactomanana de alfarrobo	
	em nível supermolecular. (a) rede formada pelos feixes de xantana os quais são	
	interconectados na superfície por regiões curtas da cadeia principal da galactomanana	
	mais substituída, (b) interconexão por regiões mais longas da cadeia principal da	
	galactomanana menos substituída	48
22.	Efeito de amostra opticamente ativa sobre a luz linearmente polarizada. (a) luz	
	incidente linearmente polarizada; (b) luz emergente elipticamente polarizada; (c)	
	resolução da luz linearmente polarizada em componentes polarizados circularmente à	
	esquerda e à direita; (d) efeito de amostra opticamente ativa sobre os dois componentes	
	circularmente polarizados	64
23.	Dependência do dicroísmo circular em relação à temperatura (10, 30, 50, 70 e 80 °C)	
	para solução de xantana. A amplitude do pico e da depressão mudam com o	
	aquecimento, o pico diminui e a depressão aumenta em tamanho, diminuindo os valores	
	de comprimento de onda de absorção mínimo e máximo	66
24.	. Representação do viscosímetro rotacional cilindro-coaxial, sistema Searle, onde	
	o cilindo externo é fixo e o cilindro interno é rotatório	68

25.	Geometria do viscosímetro cônico-plano onde R é o raio do cone (cm), $\theta$ é o ângulo do	
	cone (°) e $\omega$ a velocidade angular (rad/s)	69
26.	Diagrama de Zimm	74
27.	Bracatingal [Embrapa, município de Colombo (PR)]	79
28.	Ramos floridos de M scabrella	80
29.	Flor, fruto e semente de <i>M. scabrella</i>	80
30.	S. parahybae (Vellozo) Blake	81
31.	Sementes de S. parahybae	81
32.	Fluxograma de obtenção de galactomanana de Mimosa scabrella Benth	82
33.	Perfil da galactomanana de M. scabrella, através de SEC, usando detectores de	
(	difusão de luz (LS), índice de refração (RI) e viscosimétrico (VIS)	86
34.	Perfil da galactomanana de S. parahybae, através de SEC, usando detectores de difusão	
(	de luz (LS) e índice de refração (RI)	86
35.	Comparação entre os valores de raio de giro teórico e experimental em função	
(	da massa molecular: — relação teórica (Benoit-Doty, 1953) para L <sub>p</sub> = 10 nm;	
	• e x dados experimentais para duas amostras de galactomanana de M. scabrella	88
36.	Fluxograma de obtenção das Frações 1e 2	91
37.	Fluxograma de hidrólise da galactomanana de bracatinga	92
38.	Determinação da $T_m$ da xantana por polarimetria	97
39.	Determinação da T <sub>m</sub> da xantana (Rhône-Poulenc) em concentração de 4 g/L, em	
	10 mM de NaCl, por DSC. Resfriamento a 0,2 °C/min	98
40.	Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas,	
	pré-aquecidos a 80 °C, em uma concentração total de 1 g/L, em água e 10 mM de NaCl.	
	Valores medidos a 70 s <sup>-1</sup> em 20 °C; galactomanana de <i>M. scabrella</i> em água e	
	em sal (■); xantana em água (▲) em em sal (Δ); misturas xantana:galactomanana em	
	água (●) e em sal (O); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de	
	interação ( )	102
41.	Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas, pré-	
	aquecidas a 80 °C, em concentração total de 2 g/L, em água. Valores medidos a 70 s <sup>-1</sup>	
	em 20 °C; galactomanana de <i>M. scabrella</i> (■); xantana (▲); misturas xantana:	
	galactomanana ( $ullet$ ); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de	

	interação ( )	103
42.	Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas, pré-	
	aquecidos a 80 °C, em uma concentração total de 1 g/L, em água e 10 mM de NaCl.	
	Valores medidos a 70 s <sup>-1</sup> em 20 °C; galactomanana de S. parahybum em água e em	
	sal ( $\blacksquare$ ); xantana em água ( $\blacktriangle$ ) em sal ( $\Delta$ ); misturas xantana:galactomanana em água ( $\bullet$ )	
	e em sal (O); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de	
	interação ( )	104
43.	Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas	
	(preparados a 25 °C), em uma concentração total de 2 g/L, em água. Valores medidos a	
	70 s <sup>-1</sup> em 20 °C; galactomanana de <i>M. scabrella</i> ( $\blacksquare$ ); xantana ( $\blacktriangle$ ); misturas xantana:	
	galactomanana ( $ullet$ ); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de	
	interação ( )	105
44.	Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas	
	(preparados a 25 °C), em uma concentração total de 2 g/L, em água. Valores medidos a	
	70 s <sup>-1</sup> em 20 °C; galactomanana de S. parahybum (■); xantana (▲); misturas xantana:	
	galactomanana ( $ullet$ ); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de	
	interação ( )	106
45.	Viscosidade absoluta em função da velocidade de cisalhamento para a solução	
	de xantana:galactomanana de M. scabrella (x:g 1:3), a 20 °C, em uma concentração	
	total de 2 g/L, em água. Amostra pré-aquecida a 80 °C: primeiro ciclo de cisalhamento	
	(●); segundo ciclo após 120 min (O)	107
46.	Viscosidade absoluta em função da velocidade de cisalhamento para a solução de	
	xantana:galactomanana de S. parahybae (x:g 1:2), a 20 °C, em água. Amostra pré-	
	aquecida a 80 °C: concentração total de 2 g/L(O); e 1 g/L (●)	108
47.	. Variação de G', G" em função do aumento de deformação, a 0,1 Hz, 25 °C, para o	
	sistema xantana:galactomanana de S. parahybae 4:2 g/L, 10 mM NaCl	110
48.	. Variação do módulo elástico (G)' e módulo viscoso (G"), durante resfriamento a	
	1°C/min G' para a mistura de xantana:galactomanana de S. parahybae (4:2 g/L) em	
	5 mM de NaCl, 1 Hz, 7% deformação	112
49.	. Variação do módulo elástico (G)', módulo viscoso (G") e viscosidade dinâmica ( $\eta^*$ )	
	durante resfriamento a 1°C/min para a xantana 4g/L, em 5 mM de NaCl, 1 Hz,	

7% deformação	113
50. Variação do módulo elástico (G)' e módulo viscoso (G"), durante resfriamento a	
1°C/min G' para a mistura de xantana:galactomanana de M. scabrella (4:2 g/L) em	
5 mM de NaCl, 1 Hz, 7% deformação	114
51. Influência da temperatura sobre G' e G' para a mistura de xantana:galactomanana de	
S. parahybae (4:2 g/L), em diferentes concentrações de NaCl, aquecidas a 80°C seguido	
por resfriamento com 1 °C/min, a 1 Hz, 7 % de deformação	115
52. Influência da temperatura sobre G' e G' para a mistura de xantana:galactomanana de	
S. parahybae (4:2 g/L), em diferentes concentrações de NaCl, aquecidas a 35 °C	
seguido por resfriamento com 1 °C/min, a 1 Hz, 7 % de deformação	117
53. Termograma de 1- galactomanana de S. parahybae (2 g/L); 2- xantana (4 g/L) e	
3-mistura x:g 4:2 (g/L), em 10 mM de NaCl, durante resfriamento a 0,2 °C/min	119
54. Termograma da mistura xantana:galactomanana de M. scabrella (4:2 g/L), em 5 mM	
de NaCl, durante resfriamento a 0,2 °C/min	120
55. Termograma da mistura xantana:galactomanana de M. scabrella, em 5 mM de NaCl,	
durante resfriamento a 0,2 °C/min: (a) x:g 4:4 g/L; (b) x:g 4:6 g/L	121
56. DSC da mistura xantana:galactomanana de S. parahybae 4:2 g/L, em água, 5 e 10 mM	
de NaCl. Aquecimento a 0,2 °C/min	122
57. DSC da mistura xantana:galactomanana de S. parahybae 4:2 g/L, em água, 5 e 10 mM	
de NaCl. Aquecimento a 0,2 °C/min	124
58. Rotação óptica a 365 nm, 1 dm de caminho óptico, das soluções de galactomanana	
de S. parahybae 0,5 g/L; xantana 1 g/L e sua mistura (1:0,5 g/L), em 10 mM de NaCl	127
59. Rotação óptica a 365 nm, 1 dm de caminho óptico, da mistura xantana:galactomanana	
de S. parahybae 0,9: 0,1 g/L, em 5 mM de NaCl	128
60. Espectro de dicroísmo circular da solução de xantana 1 g/L em 10 mM de NaCl a	
15 °C () (estrutura ordenada, com $\lambda$ máx. = 210 nm e $\lambda$ mín. = 225 nm); a	
60 °C () (estrutura desordenada, com $\lambda$ máx. = 205 nm e $\lambda$ mín. = 218 nm)	129
61. Espectro de dicroísmo circular de solução de galactomanana de S. parahybae a 1 g/L,	
em água, a 20 °C	130
62. Espectro de dicroísmo circular: (a —) mistura xantana:galactomanana de S. parahybae	
1:1 g/L a 20 °C (estrutura ordenada, com $\lambda$ máx. = 210 nm e $\lambda$ mín. = 226 nm);	

	(b) solução de xantana 1 g/L em água a 20 °C (estrutura desordenada, com $\lambda$ máx. =	
	205 nm $e \lambda min. = 218 \text{ nm}$ )	130
63	. a) Termograma da mistura xantana:galactomanana de S. parahybae 4:4 g/L, em água,	
	durante aquecimento a 0,2 °C/min; b) Espectro de dicroísmo circular da mistura	
	xantana:galactomanana de S. parahybae 1:1 g/L, em água: () a 20 °C	
	(estrutura ordenada, com $\lambda$ máx. = 210 nm e $\lambda$ mín. = 225 nm); () a 30 °C	
	(estrutura desordenada, com $\lambda$ máx. = 207 nm e $\lambda$ mín. = 220 nm)	131
64	. Espectro de dicroísmo circular: (a) mistura xantana:galactomanana de M. scabrella	
	1:1 g/L a 20 °C (estrutura ordenada, com $\lambda$ máx. = 211 nm e $\lambda$ mín. = 226 nm);	
	(b) solução de xantana 1 g/L em água a 20 °C (estrutura desordenada, com $\lambda$ máx.	
	= 205 nm e $\lambda$ mín. = 218 nm)	132
65	. Curva de neutralização da (H <sup>+</sup> )xantana a 1 g/L, 15 °C, com KOH 0,4 M	133
66	. G' em função do grau de neutralização ( $\alpha$ ) com KOH da mistura (H <sup>+</sup> )xantana:	
	galactomanana de S. parahybae 1:1 g/L, a 15 °C, 1 Hz, 7% de deformação	134
67	. Espectro de dicroísmo circular da (H <sup>+</sup> )xantana 1 g/L, a 15 °C, $\alpha = 0$ (com $\lambda$ máx. =	
	233 nm e $\lambda$ mín. = 210 nm), $\alpha$ = 0,5 (com $\lambda$ máx. = 228 nm e $\lambda$ mín. = 208 nm); $\alpha$ = 1,0	
	$(\cos \lambda \text{ máx.} = 221 \text{ nm e } \lambda \text{ mín.} = 206 \text{ nm})$	135
68	8. Espectro de dicroísmo circular da (H <sup>+</sup> )xantana:galactomanana de S. parahybae 1:1 g/L,	
	a 15 °C, $\alpha = 0$ (com $\lambda$ máx. = 233 nm e $\lambda$ mín. = 210 nm); $\alpha = 1,0$ (com $\lambda$ máx. =	
	230 nm e $\lambda$ mín. = 210 nm)	135

### LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

η	viscosidade
η <sub>sp</sub>	viscosidade específica
$\eta_{red}$	viscosidade reduzida
[η]	viscosidade intrínseca
η*	viscosidade dinâmica complexa
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	rotação óptica específica, usando a raia D, a 20 °C
α	rotação óptica
γ΄	velocidade de cisalhamento
τ	pressão de cisalhamento
λ	comprimento de onda
$\Delta G_{m}$	energia livre de mistura
ΔΗ	mudança de entalpia
ω	velocidade angular
٥	grau
%	porcentagem
μL	microlitro
μm	micrometro
<>	média
A	área
°C	graus Celsius
c*	concentração crítica
c[η]	parâmetro de recobrimento
CD	dicroísmo circular
cm	centímetro
Da/A	dalton/angstrom
D <sub>2</sub> O	óxido de deutério
dv	velocidade relativa de cada lâmina
dy	altura relativa de cada lâmina
dm	decímetro

F	força
G'	módulo de elasticidade ou armazenamento
G"	módulo de viscosidade ou perda
G*	módulo complexo
g	grama
Hz	hertz
h	hora
K <sub>H</sub>	constante de Huggins
k	constante de Mark-Houwink
kg	quilograma
L	litro
Lp	comprimento de persistência
M <sub>w</sub>	massa molecular média em massa
M/G	relação manose/galactose
M	molar
mM	milimolar
mg	miligrama
mL	mililitro
min	minuto
m/v	massa em volume
m <sup>2</sup>	metro quadrado
nm	nanometro
N . m	newton . metro (joule)
Ра	pascal
рН	logarítmo negativo da concentração de íon hidrogênio
S	segundo
s <sup>-1</sup>	inverso do segundo
S <sup>2</sup>	"radius of gyration"(raio de giro)
T <sub>m</sub>	"melting temperature" (temperatura de transição conformacional)
T <sub>g.</sub>	"gelling temperature" (temperatura de formação/fusão do gel)
TCA	ácido tricloroacético
v/v	volume em volume

#### RESUMO

A interação entre a xantana, um exopolissacarídeo microbiano, comercialmente utilizado, e galactomananas de sementes de espécies nativas foi investigada. Xantana e galactomananas interagem em solução resultando em significativos aumentos na viscosidade ou formação de gel, apesar de ambos os polissacarídeos isolados não serem geleificantes. Com a finalidade de contribuir na elucidação do efeito sinérgico da mistura foram selecionadas duas galactomananas, cujas estruturas químicas foram previamente elucidadas: um modelo altamente substituído, a galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham com relação manose/galactose (M/G) de 1,1 e a de *Schizolobium parahybae* (Vellozo) Blake, com M/G = 3, ambas com rendimento comparável ao das galactomananas importadas, usadas comercialmente ( $\approx$  30 %).

As principais características químicas e físico-químicas das amostras foram analisadas e o comportamento reológico das misturas dos polissacarídeos foi investigado. A análise viscosimétrica a 20 °C em aparelho Brookfield revelou uma forte interação da xantana com a galactomanana de *S. parahybae*, consistente com os dados da literatura acerca da influência do conteúdo de galactose da galactomanana. A interação ocorreu nas misturas aquecidas ou não acima da temperatura de transição conformacional (T<sub>m</sub>) da xantana, porém foi mais evidente nas condições em que a xantana apresentou a conformação desordenada. A galactomanana de *M. scabrella* revelou uma interação mais fraca, porém significativa, considerando-se que praticamente todas as unidades de manose são substituídas, confrontando os mecanismos citados na literatura que apontam uma interação via regiões não-substituídas da mesma.

A análise da interação, através de medidas reológicas oscilatórias de baixa deformação, microcalorimetria (DSC) e medidas quirópticas, especialmente com o sistema xantana:galactomanana de *S. parahybae*, em função da conformação da xantana, revelou uma interação mais efetiva com os segmentos desordenados de xantana. Tais segmentos parecem ser mais abundantes em baixas concentrações de sal, porém estão presentes em menor proporção em condições nas quais a xantana apresenta-se sob conformação ordenada, mesmo antes de aquecer a mistura acima da  $T_m$  da xantana. A dependência do dicroísmo circular com a temperatura sugere um ordenamento das cadeias de xantana induzido pela galactomanana, abaixo da temperatura de formação do gel ( $T_g \approx 25$  °C), sob condições nas quais a xantana

#### ABSTRACT

The interaction between xanthan, a commercial exopolysaccharide, and galactomannans from seeds of native plant species, were investigated. Xanthan and galactomannans interacted in solution, resulting in significant increase of viscosity or gel formation although each polymer separately did not gel. In order to contribute to the elucidation of the synergic effect of these mixtures, two galactomannans were selected, whose chemistry structures were previously elucidated: a highly substituted one, the galactomannan of *Mimosa scabrella* Bentham, with a mannose/galactose ratio (M/G) of 1.1 and the galactomannan of *Schizolobium parahybae* (Vellozo) Blake, with M/G = 3. Both prepared in yields as high as those of commercially imported galactomannans, ( $\approx 30$  %).

The main chemical and physiochemical characteristics of the samples were analysed and the mixtures of polysaccharides investigated. Viscometric analysis at 20 °C in a Brookfield viscometer revealed a strong interaction between xanthan and galactomannan of *S. parahybae*, consistent with literature concerning the influence of galactose content of the galactomannan. The interaction occurred in mixtures even without heating above the conformational transition temperature ( $T_m$ ) of xanthan, but was more evident in conditions where the xanthan was in the disordered conformation. The galactomannan of *M. scabrella* showed a smaller but significant interaction, even showing practically all the mannosyl units are substituted, in disagreement with the mechanisms described in literature which argue that it occurs via unsubstituted regions of galactomannans.

Interaction analysis, using oscillatory small deformation measurements, microcalorimetry (DSC) and chiroptical analysis, especially with the system xanthan:galactomannan of S. parahybae, in function of xanthan conformation, showed a more effective interaction with disordered segments of xanthan. These segments seem more abundant at low salt concentrations but are present, in lower proportions under condition where the xanthan has an ordered conformation, even before heating the mixture above the T<sub>m</sub> of xanthan. The circular dichroism dependence with temperature suggested an ordering of the xanthan chains, induced by galactomannan, at the temperature of gel formation ( $T_g \approx 25$  °C), under conditions where xanthan alone exhibits a disordered conformation.

### CAPÍTULO I - Introdução

#### **CAPÍTULO I - Introdução**

Muitas centenas de polissacarídeos com estruturas e funções diversas representam um dos mais ricos e antigos reservatórios de biopolímeros, ocupando um papel essencial no desenvolvimento da vida. Alguns destes compostos são os principais constituintes de alimentos e servem como fonte de energia, outros como elementos estruturais, viabilizando a forma e o tamanho da entidade viva. Eles podem desempenhar funções inespecíficas como barreira à passagem de metabólitos e substâncias estranhas para o interior das células ou ter uma atuação mais específica na regulação de ciclos metabólicos. Outro papel importante destes biopolímeros é o seu envolvimento em funções imunológicas (Yalpani, 1987; Pazur, 1994).

A Tabela 1 apresenta alguns importantes polissacarídeos provenientes de distintas fontes.

microrganismos	plantas marinhas	plantas terrestres	animais
dextrana	ágar	amido	glucogênio
xantana	ácido algínico	celulose	sulfato de condroitina
manana	carragenana	xilana	heparina
succinoglucana	furcelana	pectina	ácido hialurônico
	laminarana	goma guar	quitina
		goma arábica	

Tabela 1. Exemplos de polissacarídeos de fontes diversas

Pazur (1994)

Entre estes polissacarídeos estão alguns membros importantes de polímeros solúveis em água de utilização na área alimentícea e em outros ramos industriais. Todas as aplicações dependem das propriedades fornecidas pela elevada massa molecular em vários estados de hidratação e principalmente pelas propriedades conferidas às soluções e géis. Sua utilização nesta área deve-se principalmente ao fato de possibilitarem o controle reológico de fases aquosas, aliado à ampla disponibilidade, custos relativamente baixos (menores do que os polímeros sintéticos) e baixa toxicidade em sua utilização (Whistler, 1993).

#### 1. Comportamento reológico de polissacarídeos em solução

No estado sólido as regiões poliméricas que se encontram em uma disposição espacial irrregular, dificultando a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias, originam as regiões ditas amorfas. Estas regiões constituem sítios favoráveis para a penetração de moléculas de água as quais, em maior número e menor tamanho, ligam-se facilmente aos segmentos desordenados das cadeias poliméricas. Como resultado destas interações, segmentos da cadeia polimérica tornam-se rápida e completamente solvatados e, através de processo cinético, entram em solução (Whistler, 1973a, 1973b).

O estágio intermediário de dissolução, quando a maior parte das cadeias apresenta segmentos solvatados e solubilizados, é chamado de gel transitório. Este estado ocorre no processo de dissolução de todos os polissacarídeos (Whistler, 1973a, 1973b). A continuidade do processo de hidratação conduz à formação de moléculas de polissacarídeo totalmente envolvidas por moléculas de água, a qual forma uma camada de solvatação e, finalmente, à formação de uma solução monodispersa. Alguns polissacarídeos, entretanto, não ultrapassam o estágio de gel transitório, mesmo com adição de um maior volume de água. Nestes casos, as macromoléculas permanecem dispersas de forma incompleta, formando géis cujas características físicas dependem da extensão de segmentos solvatados (Whistler, 1973a).

A facilidade com que um polissacarídeo se dissolve, assim como seu comportamento em solução, depende não somente da estrutura química, mas também da conformação (Whistler, 1973b). Deste modo, os polissacarídeos apresentam a capacidade de alterar as propriedades físicas da água, ou por conferir elevação da viscosidade às soluções ou por criarem coesivas redes intermoleculares, formando géis (Morris, 1995).

#### 1.1. Géis

As interações entre cadeias poliméricas praticamente elimina o movimento segmentar independente e o movimento de longo alcance das moléculas em solução, aumentando significativamente a viscosidade na transição do sistema fluido ao estado de gel. Propriedades elásticas e zonas de estrutura altamente organizada são fenômenos freqüentemente observados em géis (Tager, 1978; Carpenter, 1968). A forma física de gel é geralmente definida como uma rede tridimensional permanente de macromoléculas, intumescidas por um solvente, o qual domina quantitativamente. Os géis apresentam propriedades mecânicas similares à dos sólidos

elásticos, sendo capazes de suportar o própria massa, mantendo a sua forma. A fase dispersa constitui uma rede contínua, no interior da qual é retido o solvente. A tridimensionalidade é obtida através de ligações entre as diferentes macromoléculas. Estas ligações podem apresentar duas naturezas: i) quimica, através de ligações pontuais covalentes, formando um "gel químico"; ii) fisica, pela formação de ligações de baixa energia e não permanentes, como ligações eletrostáticas, de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando domínios ordenados, freqüentemente de natureza cristalina. A geleificação química é irreversível enquanto que os géis físicos são reversíveis à medida que os "cristais", ou domínios ordenados, podem ser fundidos e novamente reformados sob o efeito de ciclos térmicos (Morris, 1984; Roos-Murphy, 1991).

Devido às ligações de baixa energia, a manutenção da estrutura tridimensional necessita de múltiplas interações, seja ao longo das moléculas, seja em microdomínios, bi- ou tridimensionais. Estas estruturas ordenadas constituem as zonas de junção do gel. Trata-se portanto, de um fenômeno de cooperatividade que necessita uma certa regularidade estrutural ou conformacional ao longo de segmentos da cadeia polimérica de maneira a permitir a aproximação das cadeias. Se o polímero possui uma estrutura uniforme, as zonas de junção são favorecidas e os géis obtidos são rígidos e quebráveis. Por outro lado, se à cadeia regular for introduzido algum novo elemento estrutural periodicamente ou ao acaso, gerando uma irregularidade estrutural, o gel formado será mais elástico (Durand, 1991). A dissociação destas zonas de junção necessita de uma energia significativamente maior do que a disponível pelo movimento Browniano, o que confere estabilidade e resulta na formação de uma rede entrecruzada (Morris, 1984).

A presença de ligações cruzadas não-covalentes dificulta enormemente a descrição das propriedades físicas destas redes devido ao fato de que o número e a posição destas ligações podem variar com a temperatura e com o tempo. A reversibilidade dos géis físicos deve-se à natureza das interações envolvidas, entretanto esta reversibilidade é freqüentemente associada a fenômenos de histerese (Roos-Murphy, 1991).

As propriedades funcionais dos polissacarídeos solúveis em água são largamente aplicadas na indústria. Como polissacarídeos geleificantes utilizados industrialmente pode-se citar os polissacarídeos de algas marinhas (agarose, carragenana, alginatos), de plantas (pectina, amilose) e microbianos (curdlana, gelana) (Dea, 1993). Porém, para a otimização do seu emprego industrial tornou-se necessário desenvolver métodos que permitissem prever a relação entre a estrutura e a função destes polímeros através do conhecimento da conformação adotada pelos mesmos (Dea, 1987). Entre os métodos físico-químicos mais utilizados nesta avaliação estão as técnicas reológicas.

#### 2. Reologia

A reologia é o ramo da Física que estuda a deformação e o fluxo de materiais, apresentando um vasto campo de aplicação na área analítica e no desenvolvimento de produtos (Schott, 1992).

Com a finalidade de melhor analisar o comportamento reológico de soluções e géis de polissacarídeos é interessante considerar duas situações extremas e ideais: a dos sólidos elásticos perfeitos (segundo Hooke) e a dos líquidos viscosos perfeitos (segundo Newton). A diferenciação destes estados pode ser feita avaliando-se a reação dos mesmos frente à aplicação de forças externas (F) por unidade de superfície (A), ou seja, à pressão exercida sobre o material (P).

$$P = \frac{F}{A}$$
(1)

É necessário fazer uma distinção entre as pressões normais e tangenciais à superfície sobre as quais atuam, como mostra a Figura 1.



Figura 1. Diferentes tipos de pressões (P) normais e tangenciais aplicadas sobre um elemento de superfície (A) (H.M. Nussenzveig, 1981)

Na situação (a) o bloco suspenso por um fio do teto exerce sobre um elemento de superfície do teto uma pressão P normal de tração, devido a sua massa. Em (b) o bloco

apoiado no chão exerce sobre um elemento de superfície do mesmo uma pressão **P'** também normal, de **compressão**. Em (c) o bloco que está colado entre duas paredes e exerce sobre os dois elementos da superfície de contato do bloco com a cola, as pressões tangenciais  $P_1 e P_2$ , as quais são chamadas de pressões ou tensões de **cisalhamento** ("shear stress"). Estas últimas tenderiam a produzir um deslizamento de camadas adjacentes da cola, umas sobre as outras, ou seja, uma deformação ("strain"). As reações de mesma intensidade e sentido contrário à massa do bloco que causa o deslizamento, pela cola solidificada, equilibrariam o bloco, sustentando-o entre as paredes (H.M. Nussenzveig, 1981).

A diferença fundamental entre sólidos e líquidos está na forma de responder às pressões tangenciais (Courraze e Groosiord, 1991):

Uma substância é sólida se, submetida a uma pressão constante que não provoque a sua ruptura, tender a um estado de equilíbrio estático, de repouso, onde a deformação permanece constante. Segundo Hooke, assim que uma pressão é aplicada, instantaneamente nasce uma deformação proporcional à pressão. Por outro lado, se a pressão for anulada, imediatamente a deformação se anula, sendo esta deformação elástica instantânea e recuperável.

Uma substância é líquida se, submetida à uma pressão constante, não atinge jamais um estado de equilíbrio estático, sua deformação aumenta de maneira constante e o fluido escoa indefinidamente. Se a pressão é anulada em um determinado instante, a deformação permanece constante e igual ao valor que o material possuía naquele momento. A deformação é, portanto, irrecuperável. O líquido viscoso newtoniano "lembra" de toda pressão imposta anteriormente.

Um fluido, ao contrário de um sólido, não pode equilibrar uma pressão tangencial de cisalhamento, por menor que ela seja. Na Figura (1c), enquanto a cola ainda está fluida, ela escorre ao longo das paredes sob a ação da massa do bloco e somente quando se solidifica pode equilibrar as forças tangenciais exercidas pelo bloco. As pressões de compressão são as únicas sob as quais os líquidos se recuperam e podem resistir sem apresentar deformação.

#### 2.1. Viscosidade

Imaginado, hipoteticamente, que o fluido seja formado por lâminas ou camadas distintas e adjacentes (Figura 2), durante o escoamento surgem pressões tangenciais entre estas camadas, resultantes das interações moleculares, tipicamente interações de van der Waals, denominadas de "atrito viscoso". Considerando várias camadas de fluido, contidas entre duas placas planas paralelas, de área A e altura L (Figura 2), se a placa superior for puxada para a

direita, sob ação de uma força constante F, ela se desloca com velocidade constante v de modo que a resistência viscosa do fluido é igual e contrária a F. A camada de fluido imediatamente em contato com a placa permanece em repouso em relação a esta (Streeter, 1977; Eisberg e Lerner, 1985), deslocando-se também com uma velocidade v, no instante inicial. A placa inferior e o fluido em contato com ela permanecem em repouso. Porém, em função das interações moleculares existentes, imediatamente desenvolve-se um fluxo dirigido para a placa inferior fixa, ou seja, para a região onde o fluido encontra-se ainda em repouso. O gradiente de fluxo faz com que, camada após camada, o fluido seja movimentado até ser atingida a lâmina em contato com a placa inferior, que permanecerá em repouso, por aderência. A partir deste instante, a velocidade da placa superior e o fluxo permanecerão constantes, estabelecendo o perfil de velocidades (gradiente) ao longo da seção transversal do espaço compreendido entre as placas.



Figura 2. Representação de um fluido entre duas placas planas paralelas de área A e distância L sendo a superior, puxada com uma força F constante e se deslocando com velocidade v (H.M. Nussenzveig, 1981)

Este escoamento é chamado de laminar porque o fluido se desloca em camadas ou lâminas planas e paralelas, que deslizam umas sobre as outras sem que haja transferência de massa. Considerando a velocidade relativa de cada camada,  $dv (dv = dx/dt \text{ cm.s}^{-1})$  em relação à sua altura relativa em (dy cm) forma-se um gradiente de velocidade durante o deslizamento, também conhecido como velocidade de cisalhamento ("shear rate"), designado pelo símbolo  $\dot{\gamma}$ . Conforme a equação (2), a unidade desta grandeza é então, s<sup>-1</sup>.

$$\dot{\gamma} = \frac{dv (cm.s^{-1})}{dy (cm)}$$
(2)

Um fluido real opõe resistência ao deslizamento relativo de camadas adjacentes. A intensidade desta resistência, denominada viscosidade ( $\eta$ ), pode ser medida, sendo dependente da variação da velocidade relativa de deformação.

#### 2.2. Fluido newtoniano

Segundo Newton, a força tangencial (**F**, N), por unidade de área (**A**, m<sup>2</sup>), ou a pressão tangencial ou de cisalhamento ( $\tau$ , Pa), necessária para manter o deslizamento, é proporcional à deformação relativa, ou seja, à velocidade relativa ou de cisalhamento  $\dot{\gamma}$ , multiplicada pelo coeficiente de viscosidade  $\eta$ , o qual representa a resistência do fluido ao deslocamento.

$$\tau = \frac{\eta}{dy} \frac{dv}{dy} \qquad (3) \qquad \tau = \eta \dot{\gamma} \qquad (4)$$

A viscosidade absoluta de um fluido é, portanto, uma medida da sua resistência interna à deformação (Hughes e Brighton, 1974), proporcionada pelas forças de coesão internas do fluido. Um aumento de temperatura diminui rapidamente estas forças, fazendo com que a viscosidade também diminua (Vennard e Street, 1978).

A viscosidade dos líquidos simples ou puros, que consistem de pequenas moléculas, ou de soluções onde o soluto é uma molécula pequena, depende unicamente de sua composição, temperatura e pressão. Ela aumenta lentamente com a pressão e rapidamente ao diminuir a temperatura. No caso das soluções, a viscosidade aumenta geralmente com a concentração do soluto. Estes fluidos seguem a lei de Newton, de proporcionalidade direta entre a pressão e a velocidade de cisalhamento, de tal modo que a sua viscosidade independe destes fatores, sendo representada pela tangente do ângulo formado pela curva de fluxo com o eixo horizontal, representado na Figura 2, cuja inclinação é constante nas diferentes faixas de pressão e velocidade de cisalhamento. Conforme a equação (5), a unidade da viscosidade absoluta é, portanto, Pa.s.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}(s^{-1})}$$
(5)

7

A viscosidade é uma propriedade reológica básica que caracteriza o comportamento de escoamento dos sistemas líquidos. Esta propriedade apresenta-se como uma importante qualidade de aceitabilidade organoléptica de produtos industrializados (Glicksman, 1982).

#### 2.3. Fluidos não-newtoniano

Nas soluções poliméricas diluídas, as moléculas de soluto estão bem separadas e assim não interagem significativamente, porém com o aumento da concentração aumenta a possibilidade de choques entre as partículas, as quais podem interagir, fazendo com que estes sistemas apresentem um comportamento não-newtoniano. Nestes sistemas a viscosidade é uma função de estado, refletindo agora, a "mecânica" existente entre as moléculas (Wilkinson, 1960).

Nestes fluidos a viscosidade pode variar de acordo com outros fatores além da temperatura e pressão, tais como a velocidade de cisalhamento e o tempo de escoamento. Esta viscosidade aparente não pode portanto, ser extrapolada para outras situações que não as empregadas experimentalmente para sua medida.

## 2.3.1. Comportamentos de fluxo independentes do tempo de aplicação da pressão de cisalhamento

O comportamento dos fluidos não-newtonianos, independentes do tempo de aplicação da pressão de cisalhamento é ilustrado na Figura 3 (Fox e McDonald, 1988).



Figura 3. Pressão de cisalhamento (a) e viscosidade (b) em função da velocidade de cisalhamento

#### Pseudoplasticidade

Nos fluidos não-newtonianos pseudoplásticos, também denominados fluidos com viscosidade estrutural, a viscosidade não é constante, mantendo-se temperatura e composição constantes, conforme exige a Lei de Newton, mas sim diminui quando se aumenta a velocidade de cisalhamento. Ou seja, o fluido escoa mais facilmente conforme sofre uma agitação mais rápida. A velocidade de deslizamento, ou cisalhamento, aumenta mais rapidamente do que a tensão de cisalhamento, resultando em uma curva de fluxo convexa, conforme indica a Figura (3a). A viscosidade aparente para estes fluidos varia para cada valor de velocidade ou pressão de cisalhamento (Figura 3b).

As causas do fluxo pseudoplástico são a ruptura progressiva da estrutura tridimensional do meio líquido quando aumenta a velocidade de cisalhamento e a reconstrução desta estrutura por meio do movimento browniano. Nas soluções poliméricas o emaranhado de macromoléculas e a imobilização de solvente por este emaranhado promovem a estrutura tridimensional. Em solução aquosa as cadeias poliméricas apresentam-se sob forma enovelada, não compacta, aproximadamente esférica, penetrada por água que permanece mecanicamente aprisionada dentro da estrutura, a qual é cercada por uma camada de água de hidratação (Figura 4a). Ao aplicar uma pressão de cisalhamento, um movimento laminar unidirecional superpõe-se ao movimento arbitrário das moléculas. As cadeias de polímeros tendem a separar-se e alinhar-se na direção do fluxo (Figura 4b), diminuindo a viscosidade (Schott, 1992). Segundo alguns autores, este processo é reversível, após cessada a pressão de cisalhamento, o sistema retorna à sua característica original (Glicksman, 1982).



Figura 4. Cadeia emaranhada de polímeros em repouso, com forma esférica (a) e sob ação de cisalhamento, alinhada à direção de fluxo (b) (Schott, 1992)

Para a maioria dos fluidos pseudoplásticos, nota-se que quando a velocidade de cisalhamento é extremamente alta, as partículas estão completamente alinhadas e há uma interação desprezível entre elas, fazendo com que o fluido apresente um comportamento próximo ao newtoniano, com valores constantes de viscosidade à medida que aumenta ainda mais a velocidade de cisalhamento (Figura 3b).

Em velocidades de cisalhamento muito baixas, menores do que 1 s<sup>-1</sup>, a velocidade de separação e o alinhamento das cadeias de polímeros é insignificante, quando comparada com a velocidade de enovelamento, distribuição ao acaso das cadeias e agregação das moléculas produzida pelo movimento browniano (Schott, 1992). Por isto a estrutura tridimensional não se altera significativamente sob ação do cisalhamento e o sistema apresenta um fluxo newtoniano, com valores aproximadamente constantes e elevados de viscosidade até valores críticos de cisalhamento. A partir de um valor crítico de velocidade de cisalhamento o fluido passa a apresentar um comportamento pseudoplástico. A extensão deste último comportamento é variável e depende da natureza do polímero e das condições de análise (Krumel e Sarkar, 1975).

#### Dilatância

Um fluido não-newtoniano **dilatante** apresenta um comportamento oposto ao dos pseudoplásticos, isto é, a viscosidade aumenta com a velocidade de cisalhamento (Figura 3b). Este comportamento manifesta-se nas dispersões concentradas de partículas que não apresentam tendência em associar-se, sempre que a quantidade de líquido presente não seja muito maior do que a necessária para preencher os espaços vazios entre as partículas. Quando estas suspensões concentradas são agitadas lentamente há líquido apenas para lubrificar o deslizamento das partículas entre si e a viscosidade é baixa. Se são agitados com rapidez as partículas se chocam e agrupam-se ao invés de deslizarem umas sobre as outras (Schott, 1992). Por outro lado, com o aumento da velocidade de cisalhamento, as partículas exigem um espaço maior para o movimento e, se houver líquido disponível para preencher os novos espaços, o fluido dilata-se.

A areia úmida oferece pouca resistência ao fluxo lento, porém endurece e apresenta maior resistência quando agitada rapidamente. Entre os sistemas que apresentam este comportamento estão também as suspensões de amido, goma arábica, óxido de titânio e as
suspensões com alto teor de sólidos, de modo geral (Fox e McDonald, 1988; Glicksman, 1982; Schott, 1992).

#### Plasticidade

Os materiais plásticos, também chamados semi-sólidos, não fluem quando submetidos a baixas pressões de cisalhamento, menores do que um valor crítico, porém sofrem deformações reversíveis como os sólidos elásticos. Quando o valor crítico de pressão ("yield stress") é atingido, o fluido escoa, comportando-se como um fluido newtoniano. Estes fluidos são chamados de **fluidos de Bingham** (Figura 3a). Entre os exemplos destes fluidos estão as pastas, suspensões ou géis de argila, géis de polímeros orgânicos como gelatina, pectina, ágar e metilcelulose, lama de perfuração, tinta à óleo, dentifrícios, chocolate (Fox e McDonald, 1988; Schott, 1992).

# 2.3.2. Comportamentos de fluxo dependentes do tempo de aplicação da pressão de cisalhamento

Para os fluidos não-newtonianos cujo comportamento reológico é dependente do tempo de cisalhamento, a viscosidade é uma função, não somente da velocidade de cisalhamento, mas também do tempo de aplicação da tensão.

## Tixotropia

Se a velocidade de restauração das uniões entre as cadeias poliméricas pelo movimento browniano é mais lenta do que a velocidade de ruptura destas ligações pelo deslizamento, a viscosidade diminui inclusive quando o sistema esta sob velocidade de cisalhamento constante, à medida em que os agregados de partículas ou o grau de emaranhamento macromolecular reduz-se progressivamente. Estes fluidos são classificados como sendo **tixotrópicos**, e apresentam uma curva típica de histerese, ou seja, para um mesmo valor de velocidade e tensão de cisalhamento, aplicados em instantes distintos de tempo (Figura 5), o fluido apresenta viscosidades diferentes. Partindo de uma velocidade de cisalhamento mínima e aumentando-a progressivamente a viscosidade diminui até alcançar-se um valor máximo de velocidade e tensão de cisalhamento quando inicia-se a redução gradativa do cisalhamento, até retornar à condição inicial. Nestes fluidos não há tempo suficiente para que o movimento ao acaso das cadeias regenere completamente a estrutura original e o fluido será menos viscoso ao retornar ao valor mínimo de  $\dot{\gamma}$  em relação aos mesmos valores de cisalhamento impostos durante o aumento da  $\dot{\gamma}$ . Desta forma a tixotropia pode ser quantitativamente determinada pela área da curva de histerese (Bauer e Collins, 1967; Schott, 1992).



Figura 5. Curva de fluxo mostrando o fenômeno de histerese de um fluido tixotrópico (Laba, 1993)

# Reopexia

Nos fluidos **reopéticos**, de maneira semelhante a um fluido dilatante, há um aumento de viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento. Entretanto, a viscosidade aumenta com o tempo de cisalhamento, mesmo a uma velocidade de cisalhamento constante (Bauer e Collins, 1967; Schott, 1992)

# 2.3.3. Viscoelasticidade

Todos os materiais reais apresentam, em graus variáveis, propriedades viscoelásticas. Seu comportamento assemelha-se ao de um sólido elástico perfeito e ao de um líquido viscoso newtoniano (Graessley, 1984; Courraze e Groosiord, 1991).

Quando um trabalho mecânico é aplicado a um corpo sólido perfeito, durante a deformação, este armazena todo o trabalho como energia chamada de energia elástica. Quando o trabalho, ou força externa, é removido, o sólido perfeito volta à sua forma original. Este

retorno é denominado recuperação elástica. Um corpo líquido não possui forma preferencial e, no caso de um líquido perfeito, a pressão aplicada depende unicamente da velocidade de cisalhamento. Nos líquidos newtonianos, o trabalho mecânico gasto para produzir a deformação é dissipado instantaneamente, sob a forma de calor (Vinogradow e Malkin, 1984; Graessley, 1984).

O material é descrito como viscoelástico quando, em suas propriedades mecânicas, parte da energia é armazenada e outra parte é dissipada como calor, ou seja, apresenta ambas as características, de sólido e líquido. Quando em equilíbrio e submetido a uma pressão, responde de dois modos sobrepostos. Inicialmente o material exibe uma resposta elástica. Isto ocorre em um intervalo de tempo relativamente curto após a aplicação da pressão, chamado tempo de relaxamento. Durante este tempo o trabalho aplicado é armazenado, sob a forma de energia elástica. Se a pressão for removida, o corpo tende a recuperar sua forma original. Porém, esta recuperação é incompleta devido à manifestação da característica viscosa do material. Se a tensão for mantida além do período de relaxamento, o material escoa como um líquido viscoso e a energia fornecida pelo trabalho é dissipada na forma de calor.

A causa deste comportamento em soluções poliméricas deve-se ao fato que as longas cadeias, em elevadas concentrações, enovelam-se ao acaso e atuam como uma rede elástica quando submetidas a pressões por um curto intervalo de tempo. Ao retirar a pressão recuperase a forma original com uma pequena deformação permanente. Se o material polimérico permanece sob pressão aplicada durante um tempo cada vez maior, as cadeias se separam progressivamente. Os segmentos de cadeia deslizam uns sobre os outros e o sistema flue, dissipando a energia de uma forma irrecuperável e somente uma pequena quantidade de energia é recuperada quando cessa a pressão (Morris, 1984; Graessley, 1984; Schott, 1992).

Um fluido viscoelástico pode simultaneamente apresentar características reológicas não-newtonianas do tipo pseudoplástica e tixotrópica, dependendo das condições às quais é submetido. As suas propriedades reológicas dependem da história precedente, logo, o comportamento reológico não pode ser caracterizado pela simples relação entre pressão e velocidade de cisalhamento, sendo necessária a inclusão de derivadas destas grandezas em relação ao tempo (Vinogradow e Malkin, 1984).

# 2.4. Relação entre a viscosidade e a concentração

A viscosidade de sistemas poliméricos aumenta rapidamente com a concentração, em virtude das interações intermoleculares e das formas de entrelaçamento (Graessley, 1984; Menjivar, 1986). É possível distinguir, em geral, três domínios de concentração, conforme a Figura (6).



Figura 6. Representação esquemática do arranjo das moléculas em solução nos regimes diluído (a), semi-diluído(b) e concentrado (c) (Menjivar, 1986)

Para as soluções diluídas, pode-se considerar que o comportamento de uma macromolécula é independente das outras que a cercam. Para soluções mais concentradas, o movimento de cada molécula é perturbado pela presença das outras. Os entrelaçamentos entre as cadeias aparecem nas concentrações mais elevadas. A concentração crítica (c\*) é a concentração que separa o regime diluído do regime semi-diluído e corresponde à ocupação total do volume disponível para o polímero, sem que haja entrelaçamento das cadeias. Acima deste valor crítico (c\*) o entrelaçamento é significativo (Graessley, 1984; Menjivar, 1986).

## Soluções diluídas

No regime diluído, onde o fluido apresenta comportamento newtoniano, pode-se determinar a viscosidade relativa da solução, a qual representa a razão entre a viscosidade da solução e a do solvente:

$$\eta_{\text{ relativa}} = \frac{\eta_{\text{ solução}}}{\eta_{\text{ solvente}}}$$
(6)

A partir desta determinação pode-se calcular a viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) da solução, que representa a viscosidade devido à presença do polímero, dividida pela viscosidade do solvente puro:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta_{solução} - \eta_{solvente}}{\eta_{solvente}} = \eta_{relativa} - 1$$
(7)

A viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) é a razão entre a viscosidade específica e a concentração da solução:

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{c}$$
(8)

No regime diluído as dimensões das cadeias ou o volume hidrodinâmico de uma cadeia isolada, podem ser caracterizados através da determinação da viscosidade intrínseca da solução, [η].

A viscosidade intrínseca depende de algumas variáveis como a massa molecular, estrutura química e conformação das moléculas, da qualidade do solvente, temperatura e, por vezes, da velocidade de cisalhamento. Este parâmetro é determinado a partir da representação gráfica (Figura 7) da relação de Huggins pela extrapolação da viscosidade reduzida, expressa em função da concentração em polímero (c), à concentração nula.

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = k_{H} c[\eta]^{2} + [\eta]$$
(9)

onde [ $\eta$ ] corresponde ao coeficiente linear da reta e  $k_H$  representa o coeficiente angular. Sendo  $k_H$  a constante de Huggins, cujo valor depende da qualidade do solvente e da conformação das moléculas (Tager, 1978; Richards, 1980).



Figura 7. Determinação gráfica da viscosidade intrínseca (Tager, 1978)

Os solventes são classificados em bons e maus de acordo com a extensão de afinidade termodinâmica pelo polímero. Sob o ponto de vista termodinâmico os bons solventes são aqueles nos quais ocorre grande diminuição na energia livre de Gibbs (G) ou no potencial químico de cada componente ( $\mu_i$ ), ou seja, no estado final os parâmetros G e  $\mu_i$  de cada componente são menores do que no estado inicial e a solução apresenta menor energia livre do que a soma das energias livres dos componentes isoladamente, indicando uma boa interação. Nos maus solventes as interações com polímeros são acompanhadas por uma pequena variação na energia livre. Finalmente o solvente  $\theta$  seria aquele no qual não ocorre modificação na energia livre dos componentes quando em mistura, as moléculas do polímero e do solvente não apresentam interação (Tager, 1978).

Para polímeros flexíveis, o valor de  $k_{\rm H}$  é compreendido entre 0,3 e 0,4 em bons solventes e entre 0,5 e 0,8 em solventes  $\theta$ . Esta constante pode tornar-se bastante elevada no caso de interações intermoleculares (como na presença de agregados) ou de interações eletrostáticas. Valores inferiores a 0,3 são observados quando a solução polimérica é submetida a altas velocidades de cisalhamento, geralmente maiores do que 2 000 s<sup>-1</sup> (Huggins, 1942; Kraemer, 1942; Tager, 1978).

A relação de Huggins é valida para cada polímero individualmente, obtendo-se curvas únicas para um dado polímero nas quais a viscosidade da solução se relaciona com o produto  $c[\eta]$  apresentando um valor crítico de concentração (c\*), com uma quebra nítida na inclinação

da curva, Acima da qual ocorre a sobreposição das moléculas, da ordem de  $[\eta]^{-1}$  (Rinaudo, 1993).

O parâmetro de recobrimento, c[ $\eta$ ] ("dimensionless coil overlap parameter") pode ser definido como sendo a medida do volume de polímero na solução. Este parâmetro é independente do tipo e da massa molecular do polímero e assume valores próximos a 4 para a maioria dos polissacarídeos neutros ou carregados em conformação enovelada (Morris, 1984). Os únicos polissacarídeos enovelados que mostram desvio deste comportamento são as galactomananas, com valores de c[ $\eta$ ]  $\approx$  2,5, cuja possível explicação seria o aumento do entrelaçamento físico nestes polímeros (Morris *et al.*, 1981; Morris, 1995, Ganter *et al.*, 1992).

#### 2.5. Relação entre a viscosidade intrínseca e a massa molecular

A viscosidade intrínseca de um polímero apresenta uma proporcionalidade direta com a sua massa molecular. Esta relação constitui a base do método viscosimétrico para avaliação da massa molecular viscosimétrica média (M<sub>v</sub>) de um polímero, a partir da equação de Mark-Houwink (Tager, 1978):

$$[\eta] = k M_v^a \tag{10}$$

onde k e "a" são constantes que variam em função da natureza do solvente, da temperatura e da estrutura química do polímero. Para a maioria dos polímeros lineares flexíveis, o valor de "a" pode variar entre 0,5 e 0,8. A rigidez da molécula contribui para valores superiores a 0,8 (Weill, 1984).

Em soluções de polieletrólitos, não somente a  $[\eta]$  como também os valores de k e "a" dependem da concentração iônica total ou força iônica presente na solução polimérica (Rabin, 1988; Cohen *et al.*, 1988). No caso de polieletrólitos, a viscosidade reduzida aumenta consideravelmente com a diluição, o que torna impossível a extrapolação à concentração nula, para obtenção da viscosidade intrínseca (Figura 8a). Isto se deve ao aumento das repulsões eletrostáticas entre os sítios carregados da macromolécula pela remoção dos contra-íons que contribuiam para a blindagem das cargas do polímero, com a diluição. Disso resulta uma expansão da cadeia, no sentido de minimizar a energia livre eletrostática, que se traduz por um aumento na viscosidade reduzida (efeitos eletroviscosos) (Richards, 1980; Gravanis, 1985). Devido a este fato, a  $[\eta]$  de polieletrólitos deve ser determinada apenas em soluções salinas,

afim de reduzir as repulsões intra- e intermoleculares e tornar as dimensões de uma molécula de polieletrólito equivalente à de um polímero não-iônico (Morris, 1979; Mitchell, 1979).



concentração de polieletrólito

Figura 8. Mudança da viscosidade reduzida de um polieletrólito na ausência (a) e na presença(b) de sal externo em função da concentração de polieletrólito (Richards, 1980)

#### 2.6. Medidas Reológicas

As operações fundamentais em todos os testes reológicos são a aplicação de uma força sobre o material sob investigação e a medida de sua deformação ou, de modo equivalente, aplicar uma deformação e medir a pressão (resistência) do material.

Através de espectroscopia mecânica, uma técnica que preenche a lacuna entre a reologia de soluções e a reologia de géis, pode-se realizar medidas reológicas dinâmicas. Para um sólido elástico perfeito, onde a pressão ("stress") é diretamente proporcional à deformação ("strain"), a deformação oscilatória imposta e a pressão gerada pela amostra em resistência à deformação estão exatamente em fase. Para um líquido newtoniano, por outro lado, a pressão é máxima na metade do ciclo (onde a deformação líquida é nula mas a taxa de deformação é grande) e cai para zero nos extremos de oscilação (onde a deformação é grande mas a amostra é estacionária). Neste caso deformação e pressão estão exatamente fora de fase.

Para os sistemas reais, de polissacarídeos, cujo comportamento situa-se entre estes dois extremos, o grau do caráter sólido e líquido pode ser quantificado. A proporção de pressão em

fase com a deformação aplicada é o módulo elástico (G'), enquanto que o parâmetro correspondente para a resposta fora de fase é o módulo viscoso (G"), os quais são expressos com a unidade de pressão, pascal (Pa). A energia usada na deformação de um sólido elástico é recuperada com o retorno da amostra ao seu estado original, enquanto que para um líquido newtoniano não há recuperação e a energia é perdida. Por este motivo G' e G" são considerados também como módulos de estocagem e de perda, respectivamente. A resposta global da amostra pode ser caracterizada pelo módulo complexo,  $|G^*|$ .

$$|\mathbf{G}^*| = (\mathbf{G}^{*2} + \mathbf{G}^{*2})^{1/2}$$
(11)

A velocidade angular ( $\omega$ ), expressa em rad/s, pode ser considerada como o análogo da velocidade de cisalhamento ( $\gamma$ ). Deste modo, assim como a viscosidade absoluta era calculada pela razão entre pressão e velocidade de cisalhamento, a viscosidade dinâmica complexa,  $\eta^*$ , pode ser deduzida a partir da resposta do material à deformação ou pressão imposta e a velocidade angular:

$$\eta^* = \frac{G^*}{\omega} \tag{12}$$

As variações de G', G" e  $\eta^*$  com a velocidade angular fornecem importantes informações para a caracterização da escala de tempo das interações moleculares em sistemas poliméricos. Além disso, estas medidas reológicas podem ser aplicadas para ambos os sistemas sólido ou líquido-assemelhados, monitorando processos tais como a formação e a fusão de géis físicos formados por polissacarídeos. Se a amplitude de oscilação for suficientemente pequena (por exemplo, dentro do limite elástico da amostra), estes experimentos podem ser efetuados sem perturbar de modo significativo o processo sob investigação.

Para um sólido elástico, temos: G' = G\* e G" = 0 Para um líquido newtoniano: G' = 0 e G" =  $\eta^*$ 

Neste contexto, é importante a identificação da região de comportamento viscoelástico linear da amostra, isto é, as condições nas quais existe uma relação linear entre a deformação sofrida e a pressão imposta ao material. Todos os materiais apresentam um comportamento linear, com a condição de que as deformações sofridas sejam suficientemente pequenas, sem que haja modificação de sua estrutura microscópica. A transição para um regime não-linear a partir de um determinado valor de deformação é acompanhada por uma modificação estrutural (Courraze e Grosiord, 1991).

No caso dos géis, se a amostra sofre uma deformação constante por um longo período de tempo, a pressão necessária para manter esta deformação constante irá gradualmente diminuir (relaxamento da pressão), e, ao ser anulada a deformação, a pressão original da amostra será recuperada parcialmente. Por outro lado, se uma pressão finita é aplicada, a deformação resultante aumentará gradativamente, com uma recuperação novamente parcial da deformação inicial. Este comportamento pode ser compreendido em termos do rearranjo gradual da rede estrutural para acomodar a deformação aplicada através da dissociação de junções intercadeias pré-existentes e sua substituição por novas interações (Morris, 1984; Morris, 1995).

Em uma curta escala de tempo, o comportamento de géis com ligações cruzadas nãocovalentes se aproxima do esperado para uma rede permanente. A Figura (9a) mostra o espectro mecânico típico (G', G" e  $\eta$ \* em função da freqüência) para um gel de polissacarídeo. O módulo elástico (G') é muito maior do que o módulo viscoso (G") durante a faixa de freqüência testada, onde ocorre uma resposta predominantemente sólido-assemelhada. Ambos os módulos são independentes da freqüência de oscilação, como esperado para uma rede elástica. A viscosidade dinâmica ( $\eta$ \*) diminui linearmente com o aumento da freqüência (Roos-Murphy, 1987; Morris, 1995).

Na Figura (9b), no início do processo de geleificação, o comportamento de fluxo assemelha-se ao de um líquido. Assim que a reticulação do sistema aumenta, G' aumenta mais rapidamente do que G". Em um certo ponto as curvas se cruzam. O ponto de geleificação situa-se aproximadamente neste cruzamento (Tung e Dynes, 1982).

A Figura (9c) mostra o espectro mecânico de uma solução diluída típica de polissacarídeo. A viscosidade dinâmica ( $\eta^*$ ) apresenta uma pequena variação com a freqüência, num comportamento essencialmente newtoniano na faixa de freqüência utilizada, e o módulo de perda (G") é significativamente mais alto do que o módulo elástico (G'), especialmente nos menores valores de freqüência. Em altas freqüências a movimentação interna dos segmentos de cadeia torna-se mais importante e G' aproxima-se de G".



Figura 9. Freqüência de oscilação em função de G'(-x-), G" (- -) e  $\eta^*$  (----) para: (a) gel forte; (b) rede emaranhada ou gel fraco; (c) solução diluída (Morris, 1984)

## 3. Polissacarídeos de origem vegetal

Em muitas sementes, os tecidos de reserva da parede celular (endospermas e cotilédones) são espessados e contêm um depósito de polissacarídeo, os quais são mobilizados após germinação. Os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) de sementes são estruturalmente similares aos componentes hemicelulósicos ou pécticos da matriz da parede celular (parede primária e secundária) de tecidos vegetativos. Os polímeros de reserva de sementes, tais como galactomananas, glucomananas e mananas apresentam uma marcante semelhança estrutural com as hemiceluloses, glucomanana e galactoglucomanana das madeiras de angi-e gimnospermas. Com base nas evidências estruturais e na similaridade das enzimas envolvidas na quebra dos PRPCs e no "turnover" da parede celular, tem-se inferido sobre uma ligação evolucionária entre os PRPCs de sementes e os polissacarídeos não-celulósicos de paredes celulares primária e secundária de outros tecidos vegetais, que não os de sementes (Reid e Edwards, 1995).

Diferentes componentes macromoleculares da parede celular tem sido, no curso da evolução, adaptados ao papel de reserva em sementes de diferentes espécies. Entretanto, as

razões para a adaptação e a retenção destes polímeros não parece relacionar-se com suas propriedades nutritivas mas especialmente com propriedades como materiais. Eles contribuem para a organização e sobrevivência da semente, permitindo a germinação do embrião com um rápido desenvolvimento, até que a existência autotrófica possa ser estabelecida (Reid e Edwards, 1995). A semente contém como materiais de reserva nutritiva óleos, proteínas ou carboidratos na forma de amido ou um dos PRPCs (Bewley e Black, 1978). Os três primeiros são estocados intracelularmente no citoplasma, enquanto que os PRPCs são estocados fora da célula, na parede celular ou matriz extracelular.

Existem claras evidências de que as propriedades mecânicas destes últimos estão relacionadas com o sucesso da germinação e que a sua seleção no curso da evolução das plantas tenha sido influenciado mais por fatores reológicos do que nutricionais (Taiz, 1984; Reid, 1989). O endosperma que contém estes polissacarídeos é bastante rígido, devido ao grau de cristalinidade dos polímeros (Kooiman, 1960), fornecendo proteção ao embrião contra danos mecânicos e contribuindo para o sucesso da dispersão das sementes (Reid, 1989).

As mananas, glucomananas e galactomananas de sementes são utilizadas na forma pura para fins comerciais. Atualmente as aplicações industriais destes polímeros estão baseadas na exploração de suas propriedades reológicas.

## 3.1. Galactomananas

#### 3.1.1. Estrutura química

As galactomananas de sementes apresentam como estrutura genérica uma cadeia principal de unidades D-manopiranosil unidas entre si por ligações  $\beta(1\rightarrow 4)$ , com substituições em O-6 por unidades simples D-galactopiranosil ligadas  $\alpha(1\rightarrow 6)$  (Figura 10).



Figura 10. Estrutura genérica de galactomananas: manose (M), galactose (G)

O laboratório de química de macromoléculas vegetais do Departamento de Bioquímica da UFPR caracterizou a estrutura de galactomananas de sementes de mais de 30 espécies, sendo que em algumas delas foi elucidada a estrutura fina do polissacarídeo. Entre elas, a de *Mimosa scabrella* (Ganter, 1988, 1991), *Stryphnodendron barbatimam* (Leitner, 1991), *Senna multijuga* (Recchia, 1992), *Schizolobium amazonicum* (Petkowicz, 1993), *Schizolobium parahybae* (Zawadzki-Baggio, 1994), *Cassia fastuosa* (Tavares, 1994) e *Apuleia leiocarpa* (Lucyszyn, 1994), todas nativas e com alto rendimento em galactomanana relativamente às sementes, em torno de 30 % (m/m), comparável ao rendimento das galactomananas importadas. Foram realizados estudos reológicos preliminares destas espécies, sendo que o comportamento de fluxo e demais propriedades reológicas da galactomanana de *Mimosa scabrella*, estão estabelecidos (Ganter *et al.*, 1992).

## 3.1.2. Relação entre a estrutura química e as funções biológicas

As galactomananas da ordem *Fabales (Mimosaceae, Caesalpinaceae e Fabaceae)* de diferentes grupos taxonômicos diferem em seus graus de substituição por galactose e são encontradas relações manose/galactose (M/G) entre 1,1 (altamente substituída) e 5,0 (pouco substituída) (Dea e Morrison, 1975). A relação M/G parece ser geneticamente controlada. Em geral as galactomananas menos substituídas são obtidas de sementes de espécies mais primitivas (*Caesalpinaceae*) e as moderada ou altamente substituídas, de espécies mais avançadas (*Fabaceae*). Zawadzki-Baggio (1994) realizou estudos preliminares de biossíntese de galactomananas de sementes das espécies *Trigonella foenum-greaecum, Cyamopsis tetragonolobus* e *Senna occidentalis*, que apresentam galactomananas com diferentes relações M/G. Os resultados "*in vitro*" mostraram diferentes afinidades das enzimas particuladas obtidas dos endospermas das referidas espécies pelos substratos [<sup>14</sup>C]GDP-manose e UDP-galactose, porém os polímeros sintetizados nestas condições apresentaram ao final a mesma relação M/G, com diferente padrão de distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia principal. Estes resultados podem sugerir que a regulação da biossíntese seja realizada por fatores ausentes na simulação "*in vitro*".

O alto grau de substituição por galactose é necessário para prevenir a agregação das cadeias de galactomanana o que poderia levar à sua insolubilidade. Durante a embebição da semente a água entra rapidamente no endosperma da parede celular, constituído por galactomanana, provocando um entumescimento. Este evento permite proteger o embrião da

dessecação se a semente for submetida a uma condição de posterior ausência de água (Reid e Bewley, 1979).

No estado seco os endospermas de sementes de leguminosas, ricos em galactomananas, são duros e compactos. Em muitos casos eles são quebráveis, com uma aparência vítrea. Este endosperma, o qual é anatomicamente interposto entre o embrião e a testa ou casca da semente, adere à testa mas pode ser mecanicamente separado do embrião. No caso da preparação comercial da galactomanana de guar esta operação de separação em endosperma+testa e embrião é realizada facilmente (Whistler e Hymowitz, 1979).

## 3.1.3. Propriedades físico-químicas e utilização industrial

A maioria das aplicações práticas destes polissacarídeos deve-se à sua capacidade de alterar as propriedades físicas da água, conferindo alta viscosidade a soluções ou criando coesivas redes intramoleculares quando em associação com outros polissacarídeos (Morris, 1995). As galactomananas exploradas comercialmente são especialmente as de sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*, com M/G  $\approx$  1,6), de rápido crescimento e cultivo anual sendo atualmente cultivada nos E.U.A. e também as de alfarrobo conhecida como "carob" ou "locust bean gum" (Ceratonia siliqua L., com M/G  $\approx$  3,5), nativa do sul da Europa (Dea e Morrison, 1975). Além da goma tara, também conhecida como "huarango" ou "guarango" (*Caesalpinea spinosa* (Mol.) Kuntze, com relação M/G  $\approx$  3), nativa do norte da África e da América do Sul, especialmente do Peru (Maier et al., 1993). O principal uso destes polissacarídeos ocorre na indústria alimentícea, especialmente em produtos lácteos, géis de sucos de frutas, produtos em pó (sobremesas e pudins), produtos de panificação (glacês e misturas para tortas), produtos dietéticos, branqueadores de café, formulações lácteas para bebês, condimentos, molhos e sopas, carnes enlatadas ou congeladas. Este espectro de aplicações é comparável ao de pectinas de frutas as quais, no entanto, não são utilizadas nas categorias de condimentos e carnes (Reid e Edwards, 1995).

Estes polímeros tem outras aplicações, incluindo o uso na indústria cosmética (Gibbons, 1963), em papelaria promovendo aumento da força de papel molhado (Chrisp, 1969), na indústria têxtil, como espessante para tinturas, em minérios, como agente floculante; na indústria petroquímica, como agente de fraturação e auxiliar na perfuração (Seaman, 1980); na impermeabilização de explosivos (Yancik *et al.*, 1972); na liberação controlada de fármacos (Nurnberg e Rettig, 1974; Baveja *et al.*, 1991), como coagulante no tratamento da água (Goldstein *et al.*, 1973; Leschziner e Cerezo, 1970). Além disso a goma guar é usada na

terapia de diabetes *mellitus* como auxiliar para o tratamento, por propiciar uma redução no pico de concentração sanguínea de glicose que ocorre após a ingestão de alimentos (Reynolds, 1989).

## 3.1.4. Contaminantes fenólicos

O termo fenólico abrange uma grande faixa de metabólitos secundários encontrados em plantas que possuem em comum um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxil. Estes compostos são solúveis em água devido à sua frequente associação com açúcares, formando glicosídeos. Entre os compostos fenólicos de ocorrência natural, os flavonóides formam o maior grupo, porém fenóis monocíclicos simples, fenilpropanóides e quinonas existam em número considerável. Muitos grupos importantes de materiais poliméricos presentes em plantas, como as ligninas, melaninas e taninos, são polifenóis (Harborne, 1984).

Enquanto a função de algumas classes de compostos fenólicos é bem estabelecida, como a estrutural das ligninas e a de antocianinas como pigmentos, o papel biológico de outras classes permanece em debate. Os flavonóides, por exemplo, têm importância no controle da regulação do crescimento em algumas plantas (Galston, 1969) e seus efeitos contra insetos (Isman e Duffey, 1981) sugere uma importância como fator natural de resistência. A família *Leguminosae* é particularmente rica em flavonóides e estes compostos podem ser utilizados em sua classificação quimiotaxonômica (Hegnauer e Grayer-Barkmeijer, 1993).

#### 4. Polissacarídeos de origem microbiana

## 4.1. Xantana

#### 4.1.1. Estrutura primária e secundária

A estrutura primária da xantana (Figura 11) consiste de uma cadeia celulósica principal de unidades D-glucopiranosil unidas por ligações  $\beta(1\rightarrow 4)$  e substituída em O-3, a cada unidade alternada de glucose, por uma cadeia lateral composta de um trissacarídeo. A cadeia lateral consiste de um ácido glucurônico entre duas unidades D-manopiranosil. A unidade de manose terminal pode ser substituída em O-4 e O-6 por um grupamento piruvato. Um grupo *O*-acetil esta freqüentemente presente em O-6 da unidade de manose interna (Melton *et al.*, 1976;

Jansson *et al.*, 1975; Stankowski *et al.*, 1993). A proporção de acetil e grupos piruvato é determinada pela cepa e por condições pós-fermentação (Slonecker e Jeanes, 1962).



Figura 11. Estrutura genérica da xantana. Unidades de: glucose não-substituída (**a**), glucose substituída (**b**), manose interna com substituinte acetil (**c**), ácido glucurônico (**d**) e manose externa com substituição por grupo piruvato (**e**)

Esta ramificação em O-3 parece ser um fator crítico no controle da conformação do polímero (Milane e Wang, 1992; Milane e Narasaiah, 1990). Moorhouse *et al.* (1977) e Milane e Wang (1990), através de difração de raios-X, mostraram que, no estado sólido (fibras estiradas), a xantana forma uma estrutura helicoidal com simetria do tipo  $5_1$  com uma distância molecular repetida de 4,7 nm. Existem evidências de que esta estrutura corresponda à conformação ordenada em solução (Morris *et al.*, 1977). Tem sido sugerido que a cadeia lateral pode associar-se à cadeia principal helicoidal e estabilizar a estrutura em hélice (Moorhouse *et al.*, 1977; Okuyama *et al.*, 1980).

Devido à presença de grupamentos carregados, a xantana apresenta-se como um polieletrólito. Este nome deriva da contração entre polímero e eletrólito e é empregado para indentificar macromoléculas que contenham grupos ionizáveis. Quando dissolvidos em solventes polares, como a água, os polieletrólitos se dissociam em macroíons polivalentes (poli-íons) e íons de baixa massa molecular de sinal oposto, os contra-íons ou íons compensadores. Estes compostos apresentam propriedades relacionadas com a sua natureza macromolecular bem como à natureza eletrolítica. Pela interferência mútua dessas propriedades resulta um comportamento específico das soluções de polieletrólitos. Portanto, é necessário distinguir as soluções de polieletrólito com e sem sal externo, pois a adição de um

grande excesso de sal externo leva a redução dos efeitos da carga específica e, até certo grau a uma recuperação das propriedades de macromoléculas neutras (Katchalsky *et al.*, 1966).

A estrutura secundária da goma xantana em solução aquosa apresenta uma transição conformacional induzida pela temperatura, onde as cadeias laterais dobram e associam-se à cadeia principal por meio de ligações não-covalentes, em baixas temperaturas, passam para uma estrutura desordenada, na qual as cadeias laterais projetam-se para fora da cadeia principal. Esta transição ocorre em uma dada temperatura ("melting point temperature" –  $T_m$ ), a qual é influenciada por: força iônica da solução, natureza do eletrólito, (Rees, 1972; Holzwarth, 1976; Morris *et al.*, 1977; Norton *et al.*, 1984), pH (Milas e Rinaudo, 1981), massa molecular, bem como, em menor grau, pelo conteúdo de acetil e piruvato (Paradossi e Brant, 1982).

A temperatura na qual esta transição ocorre,  $T_m$ , tem sido estudada através de várias técnicas. Estudos de rotação óptica (Holzwarth, 1976; Morris *et al.*, 1977; Morris, 1977) mostraram uma mudança acentuada na atividade óptica durante aquecimento e resfriamento. Estas transições estão associadas a modificações na conformação da cadeia principal do polissacarídeo. Espectros de dicroísmo circular (Morris *et al.*, 1977; Morris, 1977) mostraram duas bandas de absorção, atribuídas aos grupamentos *O*-acetil e carboxil (Figura 11). A banda de acetil mostra uma acentuada mudança durante aquecimento e resfriamento o que não é observado na banda referente a carboxil. Esta modificação na banda de dicroísmo circular do *O*-acetil sugere que a manose interna da cadeia lateral, que contém este substituinte, dobra-se, associando-se à hélice no estado ordenado, durante o resfriamento (Morris *et al.*, 1977).

Estudos de ressonância magnética nuclear (NMR) também mostram a presença de uma transição conformacional da xantana durante aquecimento e resfriamento (Morris *et al.*, 1977; Gamini *et al.*, 1991). O alargamento da linha dos picos relativos aos prótons do metill dos grupos acetil e piruvato em experimentos de <sup>1</sup>H-NMR durante resfriamento, evidencia a ligação da cadeia lateral na conformação ordenada (Morris *et al.*, 1977). Estudos mais recentes de <sup>13</sup>C-NMR demonstraram que, durante aquecimento, as unidades de açúcar das cadeias laterais tornam-se móveis antes que isso ocorra com as unidades da cadeia principal (Gamini *et al.*, 1991). Além destes estudos, o fenômeno da transição conformacional da xantana foi avaliado por calorimetria (Holzwarth, 1976), medidas de viscosidade (Holzwarth, 1976; Milas e Rinaudo, 1979; Milas e Rinaudo, 1986) e espalhamento de luz (LS) (Milas e Rinaudo, 1979; Norton *et al.*, 1984).

A adoção de uma estrutura ordenada (helicoidal) pode tornar o polímero mais rígido e muitas evidências experimentais sugerem uma maior rigidez local para a estrutura de xantana (Dintzis *et al.*, 1970; Morris, 1977; Whitcomb e Macosko, 1978). Os valores de viscosidade para xantana são maiores em comparação com polímeros solúveis similares, derivados da celulose (Rinaudo e Milas, 1978), sugerindo uma estrutura estendida mais rígida para xantana.

Entretanto, apesar de vários resultados citados na literatura, existem controvérsias quanto ao número de cadeias envolvidas (se é uma hélice simples ou dupla) e a natureza de sua formação. As evidências que favorecem o modelo de hélice simples são as seguintes: i) não parece haver uma mudança significativa na massa molecular durante resfriamento e transição da estrutura desordenada ("coil") para a ordenada (hélice), embora a massa molecular possa aumentar em baixas temperaturas, possivelmente devido à agregação intermolecular (Morris, 1977; Hacche *et al.*, 1987); ii) a transição conformacional monitorada por NMR e rotação óptica apresenta sinais largos e insensíveis à concentração do polímero, favorecendo um processo intramolecular de primeira-ordem (Morris *et al.*, 1977). Além disso, dados recentes de microscopia eletrônica estão de acordo com modelo de hélice simples.

Milas e Rinaudo (1986) sugeriram que a xantana pode apresentar-se sob três diferentes conformações:

Figura 12. Conformações da xantana: nativa (I), desnaturada (II) e desordenada (III)

As formas I e II estariam ordenadas, segundo critérios de rotação óptica, e a forma III, desordenada. A estrutura nativa (I) é a forma presente no meio de cultura, que não tenha sido submetida a aquecimento ou diluída em condições de baixa força iônica, a qual seria uma hélice simples, estabilizada por fortes interações das cadeias laterais com a cadeia principal. Tais interações seriam rompidas através de aquecimento ou diminuição da força iônica gerando a forma III, acima da T<sub>m</sub>, a qual seria desordenada, em processo irreversível. Com o subsequente resfriamento e/ou aumento da força iônica seria estabelecido um padrão alternativo de interações entre as cadeias laterais e a cadeia principal e a xantana se reordenaria em uma estrutura mais estendida, originando a forma II, de forma reversível. Os estados I e II exibem diferentes viscosidades, sendo que a xantana desnaturada (II) é mais viscosa do que a nativa (I), mesmo sem diferenças na massa molecular indicando ausência de hidrólise da cadeia

principal. Os autores interpretaram os resultados como um comportamento de hélices simples para ambas as conformações ordenadas, embora o padrão de interação cadeia lateral-cadeia principal seja distinto nos dois casos.

Alguns autores propuseram, através de análises de espalhamento de luz (LS) e viscosidade intrínseca, que a estrutura desordenada consiste de emaranhado dimerizado, o qual permanece com alguns segmentos em dupla-hélice (Hacche *et al.*, 1987, Liu *et al.*, 1987).

Por outro lado, os argumentos em favor da dupla hélice citam o seguinte: 1) resultados de microscopia eletrônica mostram a separação de moléculas rígidas de xantana em feixes únicos, mais flexíveis (Stokke et al., 1986); 2) a técnica de microscopia por tunelamento (Morris e McMaster, 1991) foi usada para gerar imagens da xantana (Miles et al., 1991) e a periodicidade ao longo da estrutura helicoidal parece indicar uma dupla hélice, bem como análises por técnicas de LS (Sato et al., 1984a), sedimentação e viscosidade (Sato et al., 1984b; 1984c; Sho et al., 1986); 3) Sato et al. (1985) e Liu e Norisuye (1988) observaram o comportamento da xantana e mediram sua massa molecular em diferentes solventes. Estes autores demonstraram que no caso da massa molecular  $\leq 3.10^5$ , o polímero apresenta-se na forma de emaranhado flexível em cadoxeno [tris(etilenodiamina) dihidroxido de cádmio] e como bastão rígido em 10 e 100 mM de NaCl. Se a massa molecular for maior do que este valor apresenta-se como um emaranhado vermicular em NaCl. A massa molecular medida em NaCl foi o dobro do que em cadoxeno. Estes resultados sugerem que a xantana é uma dupla hélice, a qual pode dissociar-se completamente em dois feixes em cadoxeno; 4) Chazeau et al. (1995), analisando amostras de xantana, através de cromatografia de exclusão estérica (SEC), sugerem que a xantana seja sintetizada como uma hélice ordenada simples (NX), mas após a primeira desnaturação (DX) da conformação nativa ordenada, uma conformação em dupla hélice seria estabilizada (RX), conforme Figura 13. Já que não foi observado aumento na massa molecular durante este processo, os autores sugerem um provável dobramento da cadeia.



Figura 13. Diferentes conformações da xantana em solução: xantana nativa (NX); xantana desordenada (DX); xantana renaturada (RX)

Milas *et al.* (1996), através de investigação por SEC acoplada com detectores viscosimétrico e de espalhamento de luz, confirmam que a distribuição de massa na xantana nativa (NX) e renaturada (RX) (correspondendo às conformações I e II de Milas e Rinaudo, 1986) é virtualmente idêntica. Porém, a forma renaturada é mais rígida do que a nativa, com um comprimento de persistência-  $L_p$  (o qual indica a distância de contorno da molécula para a qual ainda persiste a influência de orientação da primeira ligação entre as unidades) de 100 nm e 30 nm, respectivamente. Sendo que a massa por unidade comprimento (M/L) da forma renaturada (200 Da/Å) é aproximadamente o dobro da nativa (98 Da/Å). Estes autores sugerem uma conformação em hélice simples para NX e dupla-hélice para RX, em concordância com Chazeau *et al.* (1995), ou alternativamente que ambas as estruturas sejam hélices simples, porém de algum modo a forma RX seja mais enovelada, aumentando M/L e a rigidez, embora a estereoquímica da xantana argumente contra esta possibilidade.

Até o presente as evidências experimentais favorecem as proposições para o modelo da dupla hélice. Porém, persiste a necessidade de explicar os resultados dos estudos de cinética, a ausência de mudança na massa molecular durante a transição hélice-emaranhado, e a insensibilidade da transição à concentração (reação unimolecular). É necessário demonstrar como a dissociação ou associação de uma estrutura em dupla-hélice pode manifestar-se em processo de primeira-ordem, com associações intramoleculares (Morris, 1995).

### 4.2. Papel biológico

A produção e a secreção de polímeros são considerados fenômenos normais no crescimento bacteriano, porém o seu papel biológico não é totalmente elucidado (Sutherland, 1972). Dentre as funções estabelecidas está a proteção contra agressões promovidas por

fagócitos, bacteriófagos, anticorpos ou mesmo antibióticos (Read e Costerton, 1987). A forma de resistência fornecida pelos polissacarídeos pode ser na participação da cápsula que protege a célula contra anticorpos específicos ou fagos (Baltimore e Mitchell, 1980), ou formando um muco em torno da célula e constituindo uma barreira física contra as diferentes agressões (Schwartzmann e Boring, 1971). Outra função importante é a representada pela adesão bacteriana na superfície de colonização, graças à formação de um biofilme constituído por uma rede polissacarídica que sustenta fisicamente as células bacterianas (Characklis, 1989). A produção deste filme é muito vantajosa para as bactérias que podem captar mais facilmente os elementos nutritivos de seu meio ambiente natural (Characklis *et al.*, 1989). Tem sido demonstrado uma relação direta entre a produção de exopolissacarídeos e o crescimento bacteriano (Read e Costerton, 1987).

## 4.3. Propriedades e interesse industrial

Os polissacarídeos bacterianos oferecem uma fonte regular de biopolímeros com novas e reprodutíveis propriedades químicas e físicas. As desvantagens são os altos custos dos programas de triagem, de produção e as dificuldades na obtenção de sua liberação para o uso em alimentos, o que é não somente oneroso mas requer justificativa para a necessidade de introduzir um novo polímero na formulação, bem como comprovar a segurança de seu uso.

A xantana é secretada extracelularmente por uma variedade de bactérias do gênero *Xanthomonas*, sendo produzido comercialmente pela espécie *Xanthomonas campestris* (Harada, 1992). Este polissacarídeo foi isolado em 1959 nos E.U.A. e suas propriedades reconhecidas e publicadas por Jeanes *et al.* (1961), sendo produzida pela primeira vez em quantidades comerciais pela Kelco-AIL em 1961 (Baird *et al.*, 1983).

A goma xantana vem sendo estabelecida comercialmente como um aditivo em alimentos e devido às suas propriedades originais, como acentuada pseudoplasticidade, a qual permite gerar elevados valores de viscosidade, relativamente insensíveis ao pH, temperatura e força iônica, tem propiciado outras aplicações. É o polissacarídeo de origem microbiana mais utilizado com um consumo de cerca de 20 000 toneladas ao ano nos EUA (Yalpani, 1987). Este polímero tem aprovação pela "Food and Drugs Administration" (FDA) para uso em alimentos desde 1969 (Morris, 1995). É utilizado em formulações farmacêuticas orais e tópicas e produtos cosméticos e é, geralmente, considerada como não-tóxica ou não-irritante nos níveis empregados como excipiente (Wade e Weller, 1994). As doses de DL<sub>50</sub> para ratos e cães

é de 45g/kg e 20g/kg, respectivamente, não tendo sido observada toxicidade, mudança nos órgãos internos ou mortalidade (FAO/WHO, 1986). A ingestão diária de xantana estimada como aceitável pela "World Health Organization" (WHO) é de até 10 mg/kg de massa corpóreo (Godet, 1973).

A principal utilização da xantana deve-se ao fato que, quando dispersa em água quente ou fria, a solução aquosa resultante apresenta uma característica fortemente viscoelástica, ou seja, em baixas velocidades de cisalhamento exibe grandes valores de viscosidade e em velocidade de cisalhamento progressivamente maiores a viscosidade é reduzida. Este comportamento é reversível e os valores iniciais de viscosidade são restaurados ao reduzir o cisalhamento (Sanderson, 1982). Combinando adequadamente a concentração do polímero e a força iônica da solução, é possível gerar altos valores de viscosidade que são relativamente insensíveis ao pH, temperatura e força iônica. Portanto, mesmo em baixas concentrações de polímero, este pode ser utilizado como espessante em soluções aquosas (Morris, 1995). Este comportamento de diminuição reversível da viscosidade permite a manipulação e o controle de processos tais como pulverização, bombeamento e espalhamento.

Embora exiba propriedades do tipo "gel fraco" em baixas velocidades de cisalhamento, o que a torna apta a atuar como um agente suspensor, estabilizando emulsões, a xantana não forma géis verdadeiros em nenhuma concentração ou temperatura (Milane e Wang, 1990). Estas propriedades são atribuídas a tênues associações de cadeias ordenadas, as quais dissociam-se rapidamente sob cisalhamento (Roos-Murphy *et al.*, 1983). Milas *et al.* (1990) descreveram uma solução de xantana (acima de 3g/L) como sendo um sistema clássico de polímeros emaranhados.

Além das aplicações diretas em alimentos, são citados usos na estabilização de suplementos de alimentação bovina, de herbicidas agrícolas, fungicidas e fertilizantes. A xantana pode conceder interessantes propriedades reológicas à preparações de dentifrícios. O controle do tamanho de gotículas em "sprays" pode permitir o monitoramento do processo de pulverização de preparações agrícolas. Finalmente, a xantana tem sido aprovada para uso em embalagens de papel e papelão para alimentos (Morris, 1995).

#### 5. Interação entre polissacarídeos

## 5.1. Função biológica

A espécie Xanthomonas campestris representa um microrganismo patogênico, o qual é responsável por doenças de várias plantas como feijão, ervilha, couve e algodão. A ligação específica ou "reconhecimento" demonstrado entre polissacarídeos bacterianos extracelulares e galactomananas, típicos componentes da parede celular vegetal, pode sugerir uma etapa na relação patógeno-hospedeiro (Morris *et al.*, 1977). Dea *et al.* (1977) demonstraram que a interação não é restrita a galactomananas, mas ocorre também, em diferentes graus, com outros polissacarídeos que apresentam uma cadeia principal com ligações  $\beta(1\rightarrow 4)$ , os quais são característicos de parede celular de plantas, isto inclui glucomananas, a própria cadeia de celulose e também quitina e quitosana. Morris *et al.* (1977) sugerem que os polissacarídeos extracelulares poderiam representar um "gancho molecular" para reconhecer o sítio no qual a bactéria se instalaria.

# 5.2. Interesse industrial

A combinação entre polímeros tem sido comercialmente explorada com sucesso quando podem ocorrer interações sinérgicas, realçando certas características reológicas que permitam aperfeiçoar determinadas qualidades desejáveis para o produto industrializado e, freqüentemente, reduzir custos de fabricação. A fim de maximizar as vantagens no uso destes sistemas tem sido realizado uma razoável quantidade de pesquisa nos últimos 20 anos. Muito esforço está sendo despendido no sentido de conhecer a natureza da sinergia e identificação dos mecanismos envolvidos. Estes estudos estimularam consideráveis debates e as interações entre polímeros permanecem como motivo de controvérsia (Williams e Phillips, 1995).

## 5.3. Aspectos físico-químicos

A associação entre xantana e galactomananas apresenta-se como um interessante modelo de estudo, uma vez que ambos os polissacarídeos não são geleificantes quando isolados. Sob determinadas condições a mistura destes polímeros pode levar à formação de gel. É necessário, portanto, conhecer alguns aspectos a respeito da mistura de diferentes polissacarídeos.

De uma forma genérica podem ser observados três tipos de comportamento em soluções contendo dois diferentes polímeros, dependendo da natureza destes polímeros (Wlliams e Phillips, 1995):

- a. incompatibilidade, a qual resulta na formação de duas camadas líquidas de polímero cada uma enriquecida com um ou outro polímero,
- b. compatibilidade, resultando em completa miscibilidade e a formação de uma fase homogênea simples,
- c. associação, a qual resulta em co-precipitação dos polímeros na forma de um sólido coacervado ou, em algumas instâncias, à formação de um gel.

Cairns *et al.* (1987, 1991), através de difração de raios-X, microscopia eletrônica e experimentos usando fluorescência propuseram que em um sistema de gel misto (formado por dois polissacarídeos de natureza distinta), a estrutura do gel pode apresentar-se sob quatro diferentes formas (Figura 14): a) uma rede polimérica única proveniente da associação de um único polissacarídeo, que contém o segundo polissacarídeo; b) rede interpenetrada, formada por geleificação independente de cada polímero; c) fases separadas, rede formada pela separação e subsequente geleificação dos dois polissacarídeos; d) rede acoplada formada pela ligação intermolecular entre os dois polímeros.



Figura 14. Modelos esquemáticos para redes de géis binários de polímeros (Cairns et al., 1987)

#### 5.4. Mecanismos de interação

A interação sinérgica entre xantana e galactomananas foi apontada pela primeira vez por Rocks (1971). Desde então diversas propostas sobre o mecanismo de tal associação têm sido discutidas na literatura, contribuindo para o seu entendimento, porém algumas questões permanecem em debate.

## Estrutura química da galactomanana

A estrutura química da galactomanana desempenha um papel importante em sua capacidade de formar géis em mistura com xantana. Inicialmente foi observada a influência do conteúdo de galactose na galactomanana e, posteriormente, a distribuição das unidades galactosil ao longo da cadeia principal do polissacarídeo.

Rocks (1971) publicou a ocorrência da formação termorreversível de gel na mistura de xantana com a galactomanana de alfarrobo, não observando o mesmo resultado com a galactomanana de guar. Embora o autor não tenha determinado a relação manose/galactose (M/G) das amostras, o mesmo observou que a proporção de galactose na goma guar é bastante superior ao da galactomanana de alfarrobo, sugerindo um modelo de interação do tipo chave-fechadura, com a quebra das ligações durante aquecimento.

Morris *et al.* (1977, 1980) e Dea e Morrison (1975) analisaram o sistema xantanagalactomanana e notaram que havia formação de géis firmes quando formados com galactomanana de alfarrobo (M/G  $\approx$  4). Segundo estes autores a interação diminuiu com o aumento do conteúdo de galactose da galactomanana e o alfarrobo foi mais efetivo do que a goma tara (M/G  $\approx$  3) e o guar (M/G  $\approx$  2).

Dea *et al.* (1977) observaram um aumento da temperatura de formação/fusão do gel com o aumento da concentração total de polissacarídeos, independentemente da proporção de xantana ou galactomanana na mistura. Embora a temperatura de geleificação para os géis preparados com alfarrobo (M/G  $\approx$  3,5) ou tara (M/G  $\approx$  3) tenham sido similares, os géis mistos com tara foram substancialmente mais fracos.

Estes autores (Dea *et al.*, 1977) analisaram a interação dos sistemas xantana:galactomananas de tara e de guar (M/G < 2) através de rotação óptica. Os valores de desvio da luz polarizada pela galactomanana de tara não sofrem modificação durante ciclos de temperatura (20-100 °C), mas com a xantana ocorre uma acentuada modificação, indicando a formação de uma estrutura ordenada (helicoidal) durante o resfriamento. A mistura de ambos

os polissacarídeos também apresentou a modificação nos valores de rotação óptica, porém sofrendo um deslocamento para temperaturas maiores em cerca de 10 °C. Os autores sugeriram então uma estabilização da hélice da xantana promovida pela galactomanana de tara. Os géis formados com a goma de alfarrobo apresentaram resultados similares, porém os dados de rotação óptica abaixo da temperatura de formação do gel não foram reprodutíveis. A goma guar também deslocou a temperatura da mudança de rotação óptica em + 10 °C. Entretanto, em baixas temperaturas o perfil foi idêntico ao da xantana sozinha, consistente com a ausência da formação de uma rede de gel. A fim de explicar todas as evidências experimentais, os autores propuseram um mecanismo de geleificação que envolve a ligação de regiões "lisas" da cadeia principal da galactomanana com a hélice ordenada da xantana, explicando, portanto o aumento da reatividade da galactomanana com o menor conteúdo de galactose (Figura 15).



Figura 15. Representação esquemática da interação da hélice da xantana com as regiões nãosubstituídas da galactomanana (Dea *et al.*, 1977)

McCleary (1979) estudou a interação de xantana com galactomananas de diferentes conteúdos de galactose, utilizando os viscosímetros Brockfield e Brabender. De modo geral, a interação diminuiu com o aumento do grau de substituição das galactomananans, em concordância com as observações de Rees (1972), Dea e Morrison (1975), Dea *et al.* (1977) e Morris *et al.* (1977, 1980), porém a galactomanana de *Leucaema leucocephala*, que possuia um conteúdo de galactose semelhante ao do guar (M/G  $\approx$  1,6), apresentou uma reatividade inesperada com a xantana. McCleary mostrou que 25% da cadeia desta galactomanana apresentava unidades alternadas de manose substituídas. O autor sugeriu que a galactomanana não necessitaria de longas regiões não substituídas da cadeia principal e que mesmo as regiões substituídas, nas quais as unidades de galactose estivessem posicionadas em um único lado da cadeia, poderiam interagir com a xantana, modificando o modelo de interação anteriormente proposto para acomodar as suas observações (Figura 16).



Figura 16. Representação esquemática da interação de cadeias ordenadas de xantana (X) com o lado não-substituído das cadeias de galactomanana (G) para galactomananas com regiões não-substituídas e alternadamente substituídas (McCleary, 1979)

McCleary *et al.* (1981) deram continuidade a este estudo analisando o efeito da presença da xantana na hidrólise da galactomanana de alfarrobo (M/G  $\approx$  3,5) pela  $\beta$ -D-mananase. Quando as soluções de galactomanana e de xantana foram misturadas a 25 °C antes de equilibrar a 15 °C para as condições de hidrólise, a velocidade e o grau de hidrólise pela enzima foram similares aos da galactomanana isolada. Entretanto, se os dois polissacarídeos fossem misturados a 80 °C, resfriados a 2 °C, antes de equilibrar a 15 °C, a presença da xantana retardou significativamente a velocidade de hidrólise, embora não tenha afetado a extensão da mesma. O aquecimento parece ter permitido a interação entre os polímeros, prejudicando a ação enzimática. Os autores concluíram que somente uma pequena proporção das regiões não-substituídas ao longo da cadeia principal da goma de alfarrobo estariam envolvidas na formação da zona de junção, ou que a associação tenha sido dinâmica e as regiões envolvidas na interação seriam susceptíveis ao ataque da enzima quando a associação fosse desfeita.

McCleary e Neukom (1982), McCleary *et al.* (1984) estudaram a associação da xantana com goma guar enzimaticamente hidrolisada a fim de obter amostras com diferentes conteúdos de galactose. Embora a mistura de xantana (5 g/L) e o guar nativo (10 g/L), contendo M/G = 1,6, não tenha geleificado após aquecimento a 120 °C, sob pressão e resfriamento, as amostras de guar hidrolisadas, com M/G de 2,6 - 6,7 geleificaram. A força do gel aumentou com o decréscimo de galactose na galactomanana. Ao comparar a amostra de guar contendo semelhante grau de substituição do que a galactomanana de alfarrobo (M/G  $\approx$  3,3), os autores observaram resultados similares, porém não idênticos. Este comportamento foi

atribuído à distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia principal das diferentes galactomananas.

#### Estrutura química da xantana

Com o objetivo de compreender o mecanismo de interação foi analisada a estrutura química da xantana, com relação ao seu conteúdo em grupamentos acetil e piruvato. Rees (1972) e Dea e Morrison (1975) observaram que a interação do sistema xantana:galactomanana de alfarrobo foi acentuada na ausência de substituintes acetil da cadeia da xantana.

Tako et al. (1984) estudaram a interação entre a xantana nativa e desacetilada e a goma de alfarrobo (M/G = 4,4), por meio de medidas reológicas. A interação da goma de alfarrobo com a forma desacetilada da xantana foi mais eficiente, em concordância com Rees (1972) e Dea e Morrison (1975). Os autores concluíram que a desacetilação tornaria a xantana mais flexível, acentuando sua capacidade para interagir com a galactomanana. Foi observada uma diminuição no módulo de elasticidade (G') da mistura xantana nativa:galactomanana de alfarrobo, em presenca de uréia (4 M), sugerindo que ligações de hidrogênio estariam envolvidas na interação. O G' também diminui em presença de NaCl e MgCl<sub>2</sub> a 0,1%, indicando que a dissociação entre os polímeros poderia ser ocasionada por repulsão iônica da cadeia lateral carregada da xantana devido aos íons Na<sup>+</sup> ou Mg<sup>+2</sup>. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que a interação ocorreria com xantana na conformação helicoidal 51, de acordo com um modelo chave-fechadura (Figura 17). As cadeias laterais da xantana estariam inseridas nos segmentos não-substituídos adjacentes da cadeia principal da galactomanana, a qual adotaria uma conformação estendida, 21. De acordo com este modelo a xantana poderia associar-se com duas ou mais moléculas de galactomanana, o que justificaria o máximo valor de G' encontrado na proporção 1:2 (Tako et al., 1984). A interação intermolecular estaria ocorrendo com a formação de ligação de hidrogênio entre os grupos metil da xantana e os oxigênios da goma de alfarrobo, e forças eletrostáticas de atração entre cátions presentes como contra-íons dos grupos carregados da xantana e oxigênio da galactomanana, conforme Figura 18 (Tako e Nakamura, 1986).



Figura 17. Representação esquemática da interação de xantana (X) com galactomanana (G). Em (a) a interação incompleta pode ocorrer devido à maior rigidez na estrutura proporcionada pelas associações dos grupos acetil das cadeias laterais da xantana com a cadeia principal da galactomanana. Em (b) interação após desacetilação, promovendo maior flexibilidade à estrutura (Tako *et al.*, 1984)

Em estudos análogos com o sistema xantana:goma guar (M/G = 2), Tako e Nakamura (1985, 1986) não observaram geleificação a 25 °C, com uma concentração total de polímeros de 2 g/L, como haviam observado para o caso da mistura xantana:goma alfarrobo (M/G  $\approx$  4). De forma similar, a xantana desacetilada promoveu valores significativamente maiores no módulo de elasticidade da mistura. Os autores sugeriram que as unidades galactosil da goma guar poderiam impedir a inserção da cadeia lateral carregada das moléculas de xantana dentro da cadeia principal das moléculas de goma guar.

Tako (1991a, 1991b) investigou a interação de amostras de xantana nativa, desacetilada, despiruvatada e desacetilada/despiruvatada com galactomanana. Todas as amostras de xantana formaram gel com a goma de alfarrobo (M/G = 4,4), porém a xantana desacetilada produziu um gel mais forte em relação às demais. Na interação com a goma tara (M/G = 3,4) obteve-se valores de G' menores do que com alfarrobo, a despeito de ambas as galactomananas apresentarem um conteúdo relativamente pequeno de galactose. Este resultado foi atribuído não somente à distribuição de unidades de galactose ao longo da cadeia principal das galactomananas, mas também à quebra das ligações de hidrogênio em temperatura ambiente. O efeito sinérgico aumentou na seguinte ordem: xantana desacetilada > desacetilada/ despiruvatada > nativa. Estes autores reiteraram a sugestão da existência de um

ligação específica entre a cadeia lateral da xantana e a cadeia principal da galactomanana e concluíram que a unidade de manose interna da cadeia lateral da xantana (oxigênio hemiacetal) poderia interagir com aquela de manose adjacente do alfarrobo (OH-2) via ligações de hidrogênio (Figura 18).



Figura 18. Possíveis sítios de ligação para interações específicas da D-manose entre a xantana desacetilada e a goma de alfarrobo: (....) ligações de hidrogênio; (- - -) interações eletrostáticas (Tako, 1991b)

Este modelo, entretanto, parece ter pouca base em evidências experimentais e incorporou algumas características improváveis, como a participação dos grupamentos metil dos substituintes acetil em ligação de hidrogênio (Goycoolea *et al.*, 1995).

Cheetham e Mashimba (1988) também observaram que a remoção dos grupamentos piruvato da xantana levou a uma estabilização da conformação ordenada, evitando a geleificação em água mesmo após aquecimento. Eles observaram que a xantana desacetilada mostrou uma tendência reduzida para adquirir a conformação ordenada, não geleificando com a goma de alfarrobo, quando misturado a frio, somente após aquecimento.

Shatwell *et al.* (1991a) prepararam misturas de xantana:goma de alfarrobo (M/G = 4,3), na proporção de 1:2, por agitação (5 min) a 85 °C, seguido de aquecimento a 110 °C, sob pressão por 5 min. Experimentos oscilatórios de baixa deformação com variação de temperatura, mostraram que o módulo de elasticidade aumentava significativamente entre 40 e 50 °C, dependendo da natureza da xantana. A maioria das amostras de xantana formaram géis

fortes porém duas amostras, uma com alto conteúdo de grupos acetil e outra com uma pequena proporção de unidades manosil terminal na cadeia lateral, associado a um baixa massa molecular, produziram géis fracos. A desacetilação das amostras com alto teor de acetil resultou em significativo aumento da resistência dos géis formados com esta amostra, em concordância com os resultados de Dea *et al.* (1977) e Tako *et al.* (1984).

Shatwell *et al.* (1991a) argumentaram que poderia haver 3 maneiras do grupo acetil inibir a associação intermolecular: (a) impedimento estérico direto; (b) supressão das forças de atração, particularmente de ligações de H e (c) influência na formação da estrutura ordenada, uma vez que o grupo acetil parece estabilizar a hélice da xantana que se forma na temperatura de transição conformacional. Eles sugerem que a ausência de unidades manosil terminal da cadeia lateral da xantana também poderia proporcionar géis fracos e que a cadeia lateral poderia apresentar um papel importante na interação. Eles discutem entretanto, que o baixa massa molecular da amostra de xantana utilizada poderia também ser um fator contribuinte para o resultado.

Utilizando experimentos semelhantes para o sistema xantana:goma de guar (M/G = 1,8), Shatwell *et al.* (1991b) demostraram valores de G' menores em comparação com a mistura feita com goma de alfarrobo. O sistema apresentava características reológicas mais semelhante a uma rede emaranhada do que um gel, embora amostras de xantana com baixo teor de acetil conduziram a características do tipo gel, indicando uma fraca associação intermolecular. Estudos de rotação óptica da mistura de uma amostra de xantana altamente acetilada (7,7 %, fração molar) com a goma guar mostraram uma composição do perfil individual de cada um dos polissacarídeos. Quando a xantana foi desacetilada detectou-se um comportamento diferente sugerindo a possibilidade de existir uma fraca interação com a goma guar. Entretanto, os autores observaram que a precipitação de um ou ambos os polímeros a baixas temperaturas como resultado de incompatibilidade mútua não poderia ser descartada. Posteriormente, eles sugerem que uma fraca interação poderia ocorrer entre as próprias moléculas de xantana, uma vez que este processo estaria sendo favorecido após a desacetilação.

#### Conformação da xantana

Dea *et al.* (1977) propuseram um mecanismo de geleificação envolvendo a ligação da manana da cadeia principal da galactomanana com a hélice ordenada da xantana (Figura 15).

Cairns *et al.* (1986, 1987) e Morris (1992) avaliaram a interação da xantana com as gomas de alfarrobo (M/G = 3,6) e tara (M/G = 3), por difração de raios-X. Novos padrões de difração foram obtidos para os géis mistos, evidenciando a existência de interações específicas, quando a mistura foi aquecida a 95 °C (acima da temperatura de transição conformacional da xantana) e então resfriada. Quando as soluções de xantana e alfarrobo foram aquecidas separadamente a 95 °C e resfriadas a 25 °C antes da mistura (xantana na conformação helicoidal no momento da mistura) não houve geleificação. Quando a mistura foi aquecida em presença de CaCl<sub>2</sub> (que desloca a temperatura de transição conformacional da xantana para valores acima de 100 °C) não ocorreu a formação de gel.

Cairns *et al.* (1986) sugeriram que o modelo proposto por Dea *et al.* (1977) estava incorreto e que seria necessário desnaturar a hélice da xantana para ocorrer a interação. Os autores comentam que o modelo proposto seria consistente com os estudos de degradação enzimática feitos por McCleary (1979) e McCleary e Neukom (1982), que mostraram uma maior velocidade de hidrólise nas soluções de xantana e goma de alfarrobo aquecidas após a mistura. A análise dos padrões de raios-X indicaram um espaçamento interplanar de 0,52 nm, o qual é equivalente ao avanço axial por unidade de repetição, característico da celulose e manana. Uma série de esquemas foram apresentados para ilustrar o mecanismo de ligação proposto (Figura 19).



Figura 19. Representações esquemáticas de possíveis ligações entre a cadeia principal da xantana (X) e galactomanana (G). Em (a) com as regiões não-substituídas da galactomanana;
(b) com a galactomanana substituída ao acaso; (c) com a galactomanana substituída em resíduos alternados de manose; (d) estrutura em sanduíche (Cairns *et al.*, 1986)

Morris (1992) e Browsey *et al.* (1988) obtiveram resultados semelhantes através de difração de raios-X em estudos do sistema xantana:glucomanana. Morris (1990) argumentou contra as conclusões de Cairns *et al.* (1986, 1987) e Browsey *et al.* (1988). Segundo o primeiro, uma vez que os experimentos de rotação óptica haviam demonstrado que somente a forma helicoidal da xantana estava presente nos géis mistos e que não haviam sido detectadas diferenças no grau de formação de hélice na xantana em presença ou ausência de galactomanana, seria razoável assumir que a forma helicoidal estaria envolvida na formação das zonas de junção. Ele ainda observou que os experimentos realizados pelos citados autores não foram conclusivos, uma vez que o processo de mistura a frio poderia destruir a rede do gel formado.

A fim de verificar a influência da conformação da xantana na interação com a goma de alfarrobo (M/G  $\approx$  5), Cheetham e Mashimba (1988) isolaram frações de xantana solúveis em água fria (AF) e em água quente (AQ), procedendo a uma série de estudos. Eles sugeriram que a diferença entre as duas amostras seria a dissolução preferencial a frio de hélices simples, parcialmente desordenadas enquanto que, em água quente haveria uma maior proporção de formas desordenadas, mais solúveis. A capacidade de formar gel para as duas amostras foi praticamente idêntica. Os autores comentaram que, uma amostra de xantana parcialmente dializada, mais ordenada (AF) não formou gel com a galactomanana de alfarrobo em temperatura ambiente, enquanto que a amostra exaustivamente dializada, mais desordenada (AQ) promoveu geleificação. A partir de vários experimentos nos quais a xantana e a goma de alfarrobo foram misturadas sob condições diversas, eles concluíram que seria necessário ao menos um grau parcial de desordem nas moléculas de xantana para permitir a interação.

Estes autores (Cheetham e Mashimba, 1988) apresentaram possíveis modelos para as zonas de junção formada entre a xantana e a galactomanana de alfarrobo (Figura 20), segundo o modelo proposto por Cairns *et al.* (1986) e Browsey *et al.* (1988) com a cadeia de galactomanana, substituída somente em uma face, entre duas de xantana, em uma conformação desordenada. As cadeias laterais da xantana estariam arranjadas em uma distância repetida de 0,52 nm, como observada por Cairns *et al.* (1986).



Figura 20. Modelo para as zonas de junção entre a xantana (X) e galactomanana (G). O sentido das cadeias é indicado por setas. As cadeias de galactomanana estariam substituídas somente em uma face (triângulos sólidos). Uma substituição completa da galactomanana (mais os triângulos pontilhados), não seria acomodado neste modelo (Cheetham e Mashimba, 1988).

Milane e Wang (1990), usando modelagem molecular mostraram que a xantana pode adotar uma estrutura tipo celulósica em hélice com simetria tipo  $2_1$ , argumentando que a xantana poderia adotar esta conformação ao interagir com a galactomanana, ao contrário de Perez e Vergelati (1987) os quais propuseram que a ligação da cadeia lateral em O-3 de cada unidade alternada de glucose destruiria a possibilidade da formação da estrutura estendida  $2_1$ .

Cheetham e Mashimba (1991) investigaram a interação xantana:goma de alfarrobo (M/G = 5,2) usando polarimetria. Foram obtidas curvas sigmoidais para a xantana isolada e na mistura durante aquecimento e resfriamento. Não foram encontrados deslocamentos significativos de temperatura nas curvas da xantana em presença ou ausência de galactomanana, em concordância com as observações de Tako (1991a, 1991b) que havia encontrado perfis idênticos acima de 25 °C para xantana isolada ou na mistura com goma de alfarrobo, conflitando com os resultados de Dea *et al.* (1977).

A magnitude da rotação óptica em altas temperaturas foi aproximadamente a mesma em todos os sistemas, mas variações ocorreram em baixas temperaturas para os sistemas individuais e foram atribuídas a diferentes graus de ordem nas cadeias de xantana. Foi concluído que na temperatura ambiente a xantana apresentou uma estrutura mais desordenada em presença do alfarrobo do que isolada, o que tornou-se mais evidente após aquecimento. Estes autores concluíram que as regiões da xantana não envolvidas nas zonas de junção rapidamente adotaram uma estrutura ordenada ao resfriar, em concordância com o ponto de vista de Cairns *et al.* (1986). Cheetham e Mashimba (1988) mostram uma descrição mais detalhada do modelo anteriormente proposto, argumentando que com a xantana na conformação 2<sub>1</sub>, as cadeias laterais estenderiam-se perpendicularmente à cadeia principal, possibilitando a formação de ponte de hidrogênio entre a cadeia principal celulósica da xantana e a adjacente cadeia principal da galactomanana. Este modelo também envolveu possíveis interações hidrofóbicas de grupos C-H nas cadeias, aumentando a estabilidade das zonas de junção.

Mannion *et al.* (1990, 1992) prepararam géis mistos de xantana e galactomanana de alfarrobo (10 g/L de concentração total), em 100 mM de NaCl, pela mistura na temperatura ambiente, utilizando a goma comercial de alfarrobo e suas frações obtidas de acordo com a temperatura mínima na qual a polímero alcançou solubilidade em água. As frações apresentaram relação M/G crescente, de 2,9-5,3, à medida em que a temperatura da água foi aumentada. Em todos os casos, o módulo de elasticidade máximo foi obtido em uma proporção de aproximadamente 1:1 (xantana:galactomanana), sendo 4 vezes maior do que para a xantana isolada, havendo pouco influência da relação M/G sobre o G' dos géis. Os resultados mostram que uma fração de galactomanana com M/G de 2,9 apresentou um valor máximo de G' de  $\approx$  1000 Pa, enquanto que a fração com M/G de 5,3 teve um valor máximo de G' de aproximadamente 1200 Pa.

Os autores atribuíram este resultado à uma auto-agregação nas galactomananas de maior relação M/G, diminuindo o número de sítios disponíveis para ligação com a xantana se os mesmos sítios estivessem envolvidos. Alternativamente, poderia ocorrer um rompimento insuficiente das hélices da xantana e conseqüente redução no número de sítios de ligação disponíveis. Os autores argumentam que, nestas condições de temperatura e força iônica, a xantana estaria sob forma helicoidal e que a interação detectada não estaria ocorrendo de acordo com o mecanismo proposto por Cairns *et al.* (1986). As misturas foram aquecidas a 60°C (abaixo da temperatura de transição conformacional da xantana). Os valores de G' aumentaram levemente no caso das frações de baixa relação M/G mas aumentaram significativamente nas frações de galactomanana menos substituídas.

Mannion *et al.* (1992) argumentam que o aquecimento da mistura abaixo da temperatura de fusão da hélice da xantana poderia conduzir a uma mistura mais completa dos polímeros e facilitar associações que não seriam possíveis em baixas temperaturas. Eles sugerem ainda o envolvimento de um duplo processo de interação, onde um tipo de interação

ocorreria com a xantana na conformação ordenada, em temperatura ambiente, e outro com as regiões desordenadas da xantana, geradas em temperaturas significativamente mais baixas do que a  $T_m$  podendo ser esperada uma heterogeneidade conformacional para a xantana nestas condições.

Williams *et al.* (1991a, 1991b) investigaram a interação da xantana com glucomanana e goma de alfarrobo usando calorimetria diferencial de varrredura (DSC), espectroscopia de ressonância spin eletrônico (ESR) e técnicas reológicas. Os experimentos de oscilação em baixas taxas de deformação mostraram uma mudança brusca no módulo de elasticidade em 61-63 °C para a mistura xantana-glucomanana (12 g/L de concentração total), correspondendo à geleificação. Os ensaios calorimétricos mostraram um pico exotérmico correspondente à transição conformacional ordem-desordem da xantana em temperatura de 57 °C para a curva de resfriamento e de 59 °C para a curva de aquecimento. O início da transição nas curvas de resfriamento ocorreu a 62-66 °C, correspondendo aproximadamente à temperatura de geleificação obtida nos experimentos reológicos.

Williams et al. (1991b), em experimentos de ESR, com a mistura 3:2 g/L (xantana:glucomanana) mostraram a presença de um componente anisotrópico, em aproximadamente 62 °C (temperatura na qual ocorreu a geleificação), indicativo da restrita mobilidade dos segmentos durante o resfriamento. Enquanto que na ausência de xantana as linhas do espectro permanecem estreitas, indicando uma alta mobilidade dos segmentos de glucomanana. Usando experimentos de marcação de "spins", as moléculas de xantana, em presença da glucomanana, apresentaram um leve deslocamento de aproximadamente 6 °C na T<sub>m</sub> para temperaturas mais elevadas, em concordância com os resultados publicados por Dea et al. (1977), e o mais importante é que a transição (detectada por DSC a 57 °C) ocorreu imediatamente antes da associação com a glucomanana e geleificação. Em presença de NaCl a 40 mM, a transição conformacional da xantana é deslocada para uma temperatura de aproximadamente 83 °C enquanto a geleificação ocorreu em 42 - 45 °C. Segundo os autores estes resultados lançam algumas dúvidas sobre o envolvimento de cadeias desordenadas de xantana como proposto por Cairns et al. (1986) e Cheetham e Mashimba (1988). Williams et al.(1991b) sugeriram que a glucomanana interagiu com as moléculas de xantana em ambas conformações: na presença de sal a interação ocorre com as cadeias ordenadas da xantana a 42°C, enquanto em água a interação ocorreu predominantemente com a conformação desordenada da xantana gerando um gel mais estável o qual se forma a 57 °C.
Para o caso da interação da xantana com galactomanana de alfarrobo (os autores não citam o valor M/G) os experimentos em DSC indicaram que o pico exotérmico observado durante o resfriamento, devido ao processo de geleificação, ocorreu na mesma temperatura (49°C) em água e em 40 mM de NaCl. Os autores observam que esta temperatura é menor do que a temperatura de transição conformacional da xantana em ambos os solventes e propõem que as moléculas de galactomanana de alfarrobo devem interagir com as cadeias ordenadas da xantana, em água e em NaCl 40 mM (Williams *et al.*, 1991a).

Lopes *et al.* (1992) estudaram a interação da goma xantana com a goma guar em baixas temperaturas (menores do que 15 °C), em água e 20 mM de NaCl, através da medida de viscosidade em baixas velocidades de cisalhamento. Eles observaram que a xantana, que havia sido obtida a partir do meio de cultura, estaria sob a forma desordenada em água mas ordenada em presença da referida concentração de sal, a 25 °C. Em presença de 20 mM de NaCl foi observado um pequeno efeito sinérgico, o qual tornava-se mais pronunciado em água. Embora a viscosidade relativa de ambos os polissacarídeos isolados decrescesse linearmente acima de 30°C, os valores para a mistura (1:1) não mostraram linearidade, sendo este efeito atribuído à associação intermolecular. A temperatura crítica de geleificação (ou agregação) da mistura foi maior em água (22-24 °C) do que em sal (15 °C), demonstrando uma interação mais fraca com a conformação ordenada do que com a desordenada.

Zhan *et al.* (1993) estudaram a interação xantana:goma de alfarrobo (cuja relação M/G não foi determinada) por medidas reológicas e rotação óptica. Para uma mistura 2,5:2,5 (g/L) a geleificação ocorreu a 46-50 °C e não variou com a força iônica, em concordância com Williams *et al.* (1991a). Os autores prepararam uma série de misturas contendo diferentes concentrações de eletrólitos para variar a temperatura de transição conformacional da xantana. As soluções foram preparadas em temperaturas abaixo e acima da T<sub>m</sub>. Todas as misturas resultaram em gel, contrariamente a alguns resultados previamente publicados por Cairns *et al.* (1986) e Browsey *et al.* (1988), sendo que os géis mais fortes resultaram dos sistemas onde a xantana possuía maior grau de desordem. Foi sugerido que a ligação envolvia sequências desordenadas ao longo da cadeia da xantana, em concordância com as sugestões de Cheetham *et al.* (1989) e que não seria necessário, como publicado previamente (Cairns *et al.*, 1986 e Browsey *et al.*, 1988) que a xantana estivesse completamente desordenada.

Lundim e Hermansson (1995) estudaram as propriedades viscoelásticas e a estrutura supramolecular de géis formados entre a xantana e duas amostras de galactomananas de alfarrobo com relações M/G de 3 e 5, usando medidas oscilatórias de baixa deformação e microscopia eletrônica. Os autores propuseram um modelo em rede no qual os feixes de xantana seriam conectados por ligações formadas por sequências não substituídas de galactomanana (Figura 21). Quando a mistura foi aquecida acima da  $T_m$  da xantana, a interação entre os polímeros foi competitiva já que, quando os agregados de xantana são formados, durante o resfriamento, as galactomananas mais substituídas são excluídas destes agregados e ligam-se somente à superfície dos feixes de xantana. Quando misturados em temperatura ambiente, as galactomananas menos substituídas poderiam ligar-se à superfície da xantana da mesma forma que as mais substituídas, resultando em uma interação mais fraca para ambos os sistemas, em concordância com as sugestões de Mannion *et al.* (1992).



Figura 21. Modelo esquemático para a interação de xantana-galactomanana de alfarrobo em nível supermolecular. (a) rede formada pelos feixes de xantana os quais são interconectados na superfície por regiões curtas da cadeia principal da galactomanana mais substituída, (b) interconexão por regiões mais longas da cadeia principal da galactomanana menos substituída (Lundim e Hermansson, 1995)

Goycoolea *et al.* (1995) compararam os dois principais modelos de interação até então propostos para a interação com a xantana e galacto(gluco)manana: o modelo onde a hélice  $5_1$ da xantana estaria participando da zona de junção e o modelo que envolve a cadeia celulósica da xantana em uma conformação estendida  $2_1$  na ligação com o co-sinérgico. Usando experimentos reológicos de oscilação e DSC os autores empregaram diferentes concentrações de eletrólitos e desacetilação de amostras de xantana, afim de modificar a  $T_m$  da mesma na interação com galactomanana de alfarrobo (M/G  $\approx$  3,5) e glucomanana (G/M  $\approx$  2). Goycoolea *et al.* (1995) observaram a ocorrência da geleificação da mistura de xantana com a glucomanana em 30 mM KCl a 60 °C, bem abaixo da  $T_m$  (73 °C) e com a xantana desacetilada em 10 mM KCl ( $T_m = 39$  °C), a geleificação também ocorreu a 60 °C, temperatura acima do ponto de transição conformacional da xantana isolada. Os autores argumentam que poderiam existir regiões desordenadas da xantana em temperaturas abaixo da  $T_m$  ou de porções ordenadas em temperaturas acima da  $T_m$ , para explicar o efeito da interação. Porém, sugeriram que não é necessário invocar o envolvimento de estruturas que existiriam em concentrações ínfimas e sugerem que as junções heterotípicas (entre diferentes polissacarídeos) teriam uma energia livre menor do que os estados de competição, e sua adoção poderia ser esperada independentemente da preferência conformacional da xantana na ausência de seu cosinérgico. Na interação com a goma de alfarrobo a temperatura de geleificação apresenta-se numa faixa mais larga, menos cooperativa, entretanto o módulo de elasticidade é cerca de 3 vezes maior do que para a glucomanana, o que é consistente com a presença de sítios de ligação mais curtos na primeira.

Williams e Phillips (1995) sugerem que a interação envolva cadeias ordenadas de xantana, embora observem que são necessárias evidências experimentais para sustentar esta afirmação. Segundo a interpretação destes autores, que fizeram uma revisão dos principais trabalhos publicados sobre o tema, as moléculas de xantana tornar-se-iam ordenadas a fim de reduzir o contato polímero-solvente, diminuindo a energia interfacial total do sistema. Na ausência de eletrólitos a xantana poderia se autoassociar para reduzir a energia interfacial, ou se a manana estiver presente (proveniente da galacto ou glucomanana), ocorreria uma competição entre a autoassociação da xantana e associação xantana-manana. Esta última poderia ser favorecida uma vez que a manana não apresenta cargas.

Chandresakaran e Radha (1997) com bases experimentais em padrões de difração de raios-X, sugeriram diferentes arranjos moleculares através de técnicas de modelagem molecular para o complexo xantana:goma de guar (M/G = 1,7), o qual poderia adotar uma conformação celulósica, com uma hélice 2<sub>1</sub> e um passo de 1,03 nm, apresentando uma razoável concordância com os dados de Milane e Wang (1990) para a xantana isolada. Alternativamente, os autores sugeriram uma estrutura helicoidal, semelhante à da hélice 5<sub>1</sub> da xantana no estado sólido, com um passo de hélice de 4,74 nm, sendo ambos os modelos estereoquimicamente aceitáveis com possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias principais (O-6 da manose não-substituída do guar com O-6 ou O-3 da glucose não-substituída da xantana), entre as cadeias laterais (O-3 da galactose do guar com O-3 do ácido

glucurônico da xantana; O-4 da galactose do guar com o O do grupo acetil da unidade manosil interna da xantana) ou entre cadeia principal-cadeia lateral dos polissacarídeos (O-6 da manose não-substituída do guar com o O do grupo acetil da unidade manosil interna da cadeia lateral da xantana) (vide posições na Figura 11).

Os dois modelos teriam uma simetria coaxial, na qual uma hélice seria a xantana e a outra a galactomanana, em combinações paralela ou antiparalela dos dois polissacarídeos. Os autores observaram que as misturas xantana:galactomanana foram preparadas pelo aquecimento a 95 °C para permitir a fusão das estruturas preferenciais iniciais de cada componente, facilitando a formação de uma nova estrutura para o complexo, durante o resfriamento. Os possíveis arranjos para o primeiro modelo (tipo celulósico) seriam válidos somente se a dupla hélice  $5_1$  da xantana fosse separada em duas cadeias celulósicas intermediárias de modo que cada uma delas pudesse associar-se com uma cadeia de galactomanana, estruturalmente semelhante. A viabilidade do segundo modelo estaria relacionada com a capacidade da galactomanana em adotar a estrutura helicoidal  $5_1$ , semelhante à hélice da xantana. Nas interações envolvendo o segundo modelo, as moléculas apresentam-se mais próximas do que nos arranjos do primeiro modelo (Chandresakaran e Radha,1997).

Craig *et al.* (1997) analisaram a interação do sistema xantana:goma de alfarrobo (7:3g/L), em água, usando análise de textura, termorreologia e calorimetria. Os autores realizaram experimentos antes e após aquecer a mistura a diferentes temperaturas e encontraram duas transições conformacionais a 30 e 60 °C, que uniram-se numa única transição conformacional a 74 °C, após ciclos de aquecimento para a xantana isolada (10 g/L). Estas transições foram diminuídas ou suprimidas em presença da galactomanana. Porém, não há concordância entre os dados obtidos por calorimetria e reológicos onde um máximo de viscosidade para a xantana foi observado a 45 °C, atribuído pelos autores à quebra de agregados da xantana, seguido pela transição conformacional. Os resultados mostram um aumento na resistência dos géis após o aquecimento a 70 ou 80 °C, sem diferença significativa do máximo de temperatura as quais os géis foram submetidos, sugerindo a existência de uma temperatura crítica, acima da qual não ocorram maiores efeitos do tratamento térmico sobre as características do gel.

# Massa molecular dos polissacarídeos

Cheetham et al. (1986) e Cheetham (1987) usaram cromatografia de gel permeação (GPC) para estudar a interação entre a xantana e uma série de amostras de galactomanana de alfarrobo (M/G  $\approx$ 5) as quais foram despolimerizadas por  $\beta$ -D-mananase. Uma mistura de galactomanana de alfarrobo com massa molecular de 350 000 a 1 g/L e xantana a 1 g/L foi aquecida a 60 °C e então resfriada a 25 °C. A solução resultante apresentou-se mais viscosa do que os polímeros isolados, porém não formou gel. Os perfis de eluição obtidos mostraram que a intensidade do pico atribuído ao alfarrobo foi significativamente diminuída e um material de maior massa molecular, assumido como sendo o complexo xantana:goma de alfarrobo, foi eluído com o volume morto. Aumentando a proporção xantana: goma de alfarrobo para a taxa de 2:1 houve o completo desaparecimento do pico da galactomanana. Com outros experimentos em diferentes proporções dos dois polissacarídeos, foi concluído que uma molécula de xantana (com massa molecular de  $2,5 \times 10^6$ ) seria capaz de ligar-se a 14 moléculas de galactomanana. A investigação com várias amostras de goma de alfarrobo com diferentes massas moleculares revelou um decréscimo da interação com a diminuição da massa molecular, indicando que a despolimerização reduziu o tamanho das regiões de interação ao longo da cadeia de galactomanana. Em trabalho posterior Cheetham e Punruckvong (1989), realizando estudos com amostras de xantana despolimerizada obtiveram resultados similares.

# Concentração e proporção dos polímeros

Rocks (1971) observou que partes iguais (em massa) de xantana e goma de alfarrobo, quando aquecidos juntos em uma concentração tão pequena quanto 1 g/L, em água, geleificaram durante o resfriamento. Concentrações de 10 g/L formaram géis firmes e cortáveis. Este autor observou que, quando a concentração total de goma foi mantida constante a variação da proporção de um ou outro polissacarídeo não apresentou uma modificação significativa na força do gel, desde que pelo menos 20% de cada polissacarídeo estivesse presente na mistura. Entretanto, géis contendo maiores proporções de xantana apresentaram maior estabilidade frente à força iônica, pH e calor.

Dea e Morrison (1975) observaram a formação de géis firmes e elásticos na interação xantana:galactomanana de alfarrobo em concentrações totais maiores que 5 g/L, sendo que a proporção ótima de foi de  $\approx$  1:3. Morris *et al.* (1980) encontraram uma proporção ótima de

1:10 para a sistema xantana:goma guar, com valores de viscosidade relativa correspondendo aproximadamente ao dobro do valor para os polissacarídeos isolados.

Cuvelier e Launay (1988) estudaram a interação entre xantana e goma de alfarrobo (M/G = 2,8) em baixas concentrações (0,05 - 0,1 g/L), a 100 mM NaCl usando baixas velocidades de cisalhamento. Após submeter a mistura a um tempo de repouso eles demonstraram a existência de uma estrutura tipo gel fraco (superagregados), dependente da velocidade de cisalhamento. A ocorrência de uma forte afinidade intercadeias é sugerida, em detrimento de um mecanismo baseado em incompatibilidade termodinâmica. Os autores ressaltam a importância dos experimentos na elucidação da eficiência destas misturas em baixas concentrações para a utilização como agentes suspensores ou estabilizantes em produtos alimentícios líquidos.

Mannion *et al.* (1990, 1992) estudaram o sistema xantana:galactomanana de alfarrobo em uma concentração de 10 g/L a 100 mM de NaCl, com a mistura na temperatura ambiente, sem aquecimento. Em todos os casos, o módulo de elasticidade máximo foi obtido em uma proporção de aproximadamente 1:1 (xantana:galactomanana), sendo 4 vezes maior do que para a xantana isolada.

Tako (1991a, 1991b) observaram geleificação a 2 g/L para o sistema xantana:galactomanana de alfarrobo, na temperatura ambiente, porém a mistura xantana:goma guar não apresentou o mesmo efeito nesta concentração. O valor máximo de G' foi obtido na proporção xantana:goma guar 2:1 ao contrário do sistema com goma de alfarrobo (1:2).

Doublier e Llamas (1991) estudaram a interação da xantana com goma de alfarrobo e de guar usando várias técnicas reológicas. Os autores não citaram os valores de M/G para as galactomananas. Eles encontraram um pronunciado efeito da xantana nas propriedades reológicas das misturas mesmo quando a xantana estava presente em proporções muito baixas (1% do total), em concentração total de 5 g/L e 7 g/L para as misturas com goma de alfarrobo e guar, respectivamente. Uma vez que este efeito foi o mesmo para o alfarrobo e o guar os autores argumentam que o mesmo mecanismo estaria envolvido e que os modelos propostos até então não poderiam explicar a interação xantana:galactomanana. Como as propriedades descritas são similares ao comportamento da xantana sozinha os autores sugerem uma explicação baseada em incompatibilidade, onde cada molécula seria excluída do volume ocupado pelo outro polímero.

Williams et al. (1991a, 1991b), usando métodos calorimétricos (DSC), espectroscópicos (ESR) e reológicos, sugeriram que estas técnicas evidenciaram uma ligação

específica entre os polissacarídeos (xantana:galacto(gluco)manana). Os autores observaram que a entalpia do processo de geleificação variou com a proporção relativa dos polímeros, com o valor máximo obtido a  $\approx 1:1$  (xantana:galacto(gluco)manana),em uma concentração total de 12 e 20 g/L para os sistemas xantana:glucomanana e xantana:goma de alfarrobo, respectivamente, coincidindo com a proporção que apresentou o valor máximo de força de gel. Williams *et al.* (1991b) encontraram uma transição brusca de G' na temperatura de 61-63 °C, correspondendo a formação de gel, para o sistema xantana:glucomanana. Esta transição mostrou-se independente da proporção de polisaccarídeo e repetiu-se nos experimentos de DSC.

Lopes *et al.* (1992), usando medidas de viscosidade com baixas velocidades de cisalhamento ("low shear") avaliaram diferentes proporções de xantana:goma guar, em uma concentração total de 0,5 g/L, em água e 10 mM de NaCl. Na presença de sal o efeito sinérgico foi praticamente nulo, enquanto que em água a forte interação revelou uma proporção ótima de  $\approx$  0,2:0,3 (g/L) de xantana:goma guar,

Zhan *et al.* (1993) estudaram a interação xantana:goma de alfarrobo por medidas reológicas e rotação óptica. Para uma mistura 2,5:2,5 (g/L) a geleificação ocorreu a 46-50 °C, independente da força iônica.

Goycoolea et al. (1995) avaliaram a influência da composição xantana: glucomanana nos resultados reológicos e calorimétricos das misturas. Os autores utilizaram a menor concentração polimérica possível que permitisse a obtenção de resultados confiáveis (xantana de 0,8-4 g/L e glucomanana de 0,1-10 g/L), variando a concentração de um polissacarídeo e mantendo a do outro fixa. Foi encontrada uma temperatura de formação/fusão do gel a 60 °C para ambos os sistemas xantana: glucomanana e aproximadamente xantana:galactomanana de alfarrobo. Como os valores de entalpia do processo de geleificação e o G' apresentaram dependência da composição, alcançando valores máximos na presença de uma determinada concentração dos dois componentes (≈1:1), independente da concentração total, os autores concluiram que existe uma ligação estequiométrica envolvida no processo de interação e não um mecanismo de exclusão proveniente da incompatibilidade entre os polímeros.

# **CAPÍTULO II - Objetivos**

# **CAPÍTULO II - Objetivos**

# 1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho consiste na investigação da interação entre a xantana e as galactomananas de sementes de *Mimosa scabrella* Bentham (bracatinga) e *Schizolobium parahybae* (Vellozo) Blake (guapuruvu), visando contribuir na elucidação do seu mecanismo.

# 2. Objetivos específicos

# 2.1. Galactomananas

- 2.1.1. Obtenção e caracterização das galactomananas de Mimosa scabrella Bentham (bracatinga) e Schizolobium parahybae (Vellozo) Blake (guapuruvu) a partir da extração das semente e do endosperma, respectivamente.
- 2.1.2. Análise de moléculas acompanhantes do polissacarídeo como proteínas e compostos fenólicos.

# 2.2. Xantana

2.2.1. Obtenção, separação, purificação e caracterização da xantana a partir do meio de cultura; purificação e caracterização de amostras de xantana comerciais.

# 2.3. Xantana:galactomananas

2.3.1. Avaliação da interação entre a xantana e as galactomananas através de métodos reológico, quiróptico, termoanalítico, condutométrico e cromatográfico

# **CAPÍTULO III - Materiais e Métodos**

# **CAPÍTULO III - Materiais e métodos**

# 1. Métodos Gerais

#### 1.1. Obtenção das sementes de Mimosa scabrella Bentham

As sementes de *Mimosa scabrella* Bentham foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), tendo sido colhidas no ano de 1989 na região de Cruz Machado (PR).

# 1.2. Extração e separação da galactomanana de M. scabrella

As sementes (50 g) foram moídas em moinho Wiley, utilizando-se peneiras de 2 e 1 mm, sucessivamente. Em seguida foi adicionado ao material moído 400 mL de água destilada fervente e realizada a inativação enzimática através de ebulição por 10 min (Cardoso, 1995), sob agitação manual constante. Esta dispersão foi imediatamente resfriada a 25 °C pela adição de 600 mL de água gelada, sob banho de gelo. A extração aquosa da galactomanana estendeu-se por 4 h, em temperatura ambiente, sob agitação mecânica. Em seguida foi realizada centrifugação a 2 000 g por 15 min que gerou um sobrenadante e um sedimento. Ao sobrenadante foi adicionado etanol 50% (v/v), sob forte agitação mecânica, até ocorrência de precipitação. O precipitado resultante foi separado da mistura etanólica por centrifugação e lavado com concentrações crescentes de etanol (70-100 % v/v), 100 mL de cada vez, sob agitação por 10 min. Em seguida o polissacarídeo foi seco em estufa à vácuo, a 30°C, por 24h.

#### 1.3. Obtenção das sementes de Schizolobium parahybae (Vellozo) Blake

As sementes de *Schizolobium parahybae* (Vellozo) Blake foram colhidas no *Campus* da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, no município de São Leopoldo (RS).

# 1.4. Extração e separação da galactomanana do endosperma de S. parahybae

A galactomanana de *S. parahybae* (Vell.) Blake foi obtida a partir do endosperma das sementes (500 g), as quais foram submetidas a fervura em água destilada durante 30 min, permanecendo em contato com a água por mais 72 h, em temperatura ambiente, para proceder ao entumescimento das mesmas. Foi utilizado tolueno como conservante. As sementes foram então abertas, com auxilio de um bisturi, separando-se o endosperma dos demais componentes.

O endosperma foi seco, moído e submetido a extração aquosa conforme descrito acima, porém procedendo-se a uma única extração por 4 h.

#### 1.5. Extração dos compostos fenólicos

As sementes moídas de *M. scabrella* foram submetidas à análise de compostos fenólicos. Após inativação enzimática, extração e centrifugação, conforme descrito no item 1.2, antes da precipitação do polissacarídeo com álcool, o extrato aquoso foi dividido em 2 partes iguais. Uma das porções foi acidificada com HCl 1 M até pH 2 e submetida à extração com 3 volumes de acetato de etila. As fases superiores, de acetato de etila, foram coletadas e evaporadas em evaporador rotativo. O resíduo foi retomado com 2 mL de metanol, dando origem à Fração 1. A segunda porção foi submetida à precipitação com etanol, enxaguada e seca conforme descrito. O polissacarídeo representa então a Fração 2.

A Fração 2 foi submetida à detecção "in situ" da presença de fenólicos conjugados ao polímero, através das técnicas a) azul de *O*-toluidina e b) fluoroglucinol-HCl (Sander, 1987). O polissacarídeo (10 mg) foi solubilizado em 20 mL de água destilada, sob agitação mecânica por 12h. Esta solução (900  $\mu$ L) foi colocada em placa de toque e misturada com 100  $\mu$ L de cada solução reagente (azul de *O*-toluidina 0,1 % (m/m) e fluoroglucinol, solução saturada em HCl 20 % (v/v)). A técnica foi monitorada usando padrões positivos de ácido salicílico 1%, ácido cumárico a 1%, e papel (sem tratamento químico). Foi realizado o controle negativo pela mistura de água com os reagentes. A observação foi realizada em lupa.

Esta Fração 2 também foi submetida à hidrólise alcalina, a fim de romper as possíveis ligações do tipo éster entre o componente fenólico e o polissacarídeo. Neste caso, 200 mg do polissacarídeo foram solubilizados em 20mL de água destilada, com agitação por 24 h. À solução foi adicionado NaOH até concentração final de 0,5 M, sob atmosfera de N<sub>2</sub>, realizando o borbulhamento lento do gás por 10 min no interior da solução alcalina de polissacarídeo. Esta solução, em tubo de hidrólise rosqueado, foi mantida a 80 °C por 30 min, em banho de água. Após resfriar por 1 h em temperatura ambiente, foi realizada a acidificação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M até pH 2 e a solução ácida foi submetida à extração com 3 volumes de acetato de etila. Os extratos de acetato de etila foram evaporados em evaporador rotativo e o resíduo foi retomado em 2 mL de metanol.

# 1.6. Separação e purificação da xantana a partir do meio de cultura

Um litro de meio de cultura de goma xantana (P100, Rhône Poulenc,-Melle, França) foi diluído com solução salina (concentração final de aproximadamente 10 mM de NaC)l, a fim de preservar a estrutura nativa (Milas e Rinaudo, 1986). O material insolúvel foi removido por centrifugação a 20 000 g por 2 h e o sobrenadante filtrado, sob pressão, por membranas de nitrato de celulose, em gradiente de porosidade de 8; 3; 1,2; 0,8; 0,45 e 0,2  $\mu$ m. Ao filtrado foi adicionado, sob agitação, NaCl (20 g/L). A xantana, na forma de sal sódico foi precipitada pela adição de etanol (50% v/v) e submetida a sucessivas lavagens, com misturas etanol:água de 70:30 a 100:0 (v/v), como descrito para as galactomananas, removendo o sal adicionado. A xantana purificada foi seca em estufa à vácuo, na temperatura ambiente por 24 h. O teor de umidade foi avaliado conforme item 3.3.1.

### 1.7. Purificação da xantana a partir de amostras comerciais

Amostras de xantana comercial (Sigma Chemical C.O. e Keltrol T; Kelco Division Merck e C.O. Inc.) foram purificadas através de dissolução em meio salino (20 g/L de NaCl), seguido de centrifugação a 20 000 g por 1 h. A xantana, na forma de sal sódico foi precipitada pela adição de etanol (50% v/v) e submetida a sucessivas lavagens, com misturas etanol:água de 70:30 a 100:0 (v/v), como descrito para as galactomananas, removendo o sal adicionado. A xantana purificada foi seca em estufa à vácuo, na temperatura ambiente por 24 h. O teor de umidade foi avaliado conforme item 3.3.1.

# 1.8. Preparo das soluções dos polissacarídeos isolados e de suas misturas

# 1.8.1. Soluções de xantana neutra (forma sódica), galactomananas e suas misturas

Para a dissolução dos polímeros isolados ou em mistura, foi utilizada água purificada (química e microbiologicamente) e NaCl (Merck). O teor de umidade dos polissacarídeos foi levado em consideração e a concentração em carboidrato foi monitorada pelo método fenolsulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). A dissolução dos polímeros em diferentes forças iônicas (água, 2, 5, 10, 20 e 100 mM de NaCl), nas diversas concentrações utilizadas no trabalho, foram realizadas por 14 h, em temperatura ambiente, sob agitação mecânica. A mistura dos polissacarídeos foi realizada segundo diferentes metodologias: a) adequados volumes das soluções de polissacarídeos isolados foram misturados após o rápido aquecimento de ambas as soluções a 80 °C, com adaptação de um condensador, para evitar evaporação do solvente, mantendo-se o aquecimento por 10 min, sob agitação mecânica, seguido de mais 10 min a 25 °C. As amostras permaneceram em repouso por12 h a 4 °C antes dos ensaios reológicos. As soluções de polissacarídeos isolados foram submetidas ao mesmo tratamento antes de serem diluídas com adequadas quantidades de solvente. Obtiveram-se amostras com concentração total de 1 ou 2 g/L de polissacarídeo, em diferentes proporções relativas de xantana:galactomanana (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4) e soluções de polissacarídeos isolados de concentrações crescentes (0 a 1 ou 2 g/L).

b) os polissacarídeos foram misturados na forma de pó antes da dissolução, adicionados em quantidade adequada de solvente, permanecendo sob agitação mecânica, a 25 °C por 14 h, sem aquecimento.

# 1.8.2. Soluções de xantana na forma ácida (H<sup>+</sup>), galactomananas e suas misturas

A xantana na forma ácida foi obtida pela mistura de solução aquosa (2 g/L) de xantana neutra (forma sódica) com uma resina trocadora de íons na forma ácida (Amberlite IRN 77). A forma ácida da resina foi obtida através da passagem de 100 mL de HCl 1 M pela coluna contendo a resina (com uma vazão lenta, gota a gota). Em seguida a resina foi lavada com 2-3 L de água destilada e desionizada até que a condutividade alcançasse um valor igual ao da água utilizada. A mistura da solução de xantana com a resina foi agitada manualmente, com freqüência, durante 30 min, seguida de filtração em filtro sinterizado, a operação foi repetida por 3 vezes, misturando o filtrado a uma nova porção de resina, tomando-se o cuidado de não adicionar água ao processo a fim de manter a concentração inicial de xantana. Em seguida foi adicionada uma igual quantidade de solução aquosa de galactomanana, na mesma concentração a fim de obter uma mistura de polissacarídeos na proporção de 1:1 (g/L). As soluções de polissacarídeos isolados (1 g/L) foram obtidas pela adição de iguais quantidades de polímeros (H<sup>+</sup> xantana ou galactomanana) e água.

# 2. Métodos químicos

#### 2.1. Determinação do conteúdo de carboidratos e proteínas

O conteúdo de carboidratos das amostras foi determinado utilizando-se o método de

Dubois *et al.* (1956), utilizando-se como uma mistura de padrões de D-manose e D-galactose (Sigma) na mesma proporção que a presente nas galactomananas de *M. scabrella* e *S. parahybae*, determinada por GLC. A concentração de fenol utilizada na detecção destes monossacarídeos foi de 40 mg/mL. A curva-padrão foi construída com 5 concentrações (10-80  $\mu$ g/mL), em triplicata. A amostra, em concentração de 50  $\mu$ g/mL, também foi analisada em triplicata. Após a adição dos reagentes os tubos permaneceram 10 min na temperatura ambiente e mais 20 min a 30 °C, ao abrigo da luz. Em seguida os valores de absorbância foram lidos em espectrofotômetro Digimed modelo DME-21, no comprimento de onda de 490 nm.

A quantificação de proteínas presente nas amostras de polissacarídeos foi determinada através do método de Bradford, modificado (Kresze, 1983), usando a soro albumina bovina (Sigma) como referência, de acordo com a sensibilidade dos métodos (20-100 μg/mL) realizando a leitura em 595 nm. Foi utilizado o espectrofotômetro Ultrospec III (Pharmacia LKB). Cada concentração também foi medida em triplicata. A curva-padrão foi refeita a cada análise e a leitura medida entre 2 e 10 min após a adição do reagente.

# 2.2. Purificação das galactomananas de M. scabrella

A galactomanana de M. scabrella foi submetida a diferentes métodos de desproteinização: a) complexação com cobre (Sugui, 1994); b) hidrólise alcalina (Lopes et al., 1994); c) hidrólise enzimática e d) dissolução em elevada força iônica (Bresolin et al., 1996). a) A uma solução aquosa (250 mL) a 10 % (m/v) deste polissacarídeo foram acrescentados 125 mL de uma mistura de partes iguais dos reagentes de Fehling, A e B (Furniss, 1989). O reagente de Fehling A consiste na dissolução de cristais de sulfato de cobre (34,64 g) em água, com algumas gotas de ácido sulfúrico diluído, com o volume completado para 500 mL com água destilada. O reagente B consiste de hidróxido de sódio (60 g) e de tartarato de sódio e potássio (173 g), dissolvidos em 500 mL de água destilada. Após a adição da mistura destes reagentes o sistema permaneceu em repouso por 18 h (4 °C), para garantir a precipitação do polímero. O sobrenadante foi separado por centrifugação. O precipitado foi lavado (2 vezes) para remover o excesso de hidróxido de sódio. Os sobrenadantes da lavagem foram removidos por centrifugação. O polissacarídeo precipitado foi descomplexado com resina Lewatite S-100 (H+) em meio aquoso, e a galactomanana voltou à forma solúvel após a retirada dos cátions cobre. A resina foi recuperada por filtração e o filtrado (solução de polissacarídeo purificado) foi precipitado pela adição de etanol 50 % (v/v), sendo após enxaguado com concentrações crescentes de etanol (70-90 %, v/v) e submetido à secagem a 30 °C por 24 h.

b) A galactomanana foi submetida à hidrólise alcalina a 80 °C por 3 min, pela adição de 100 mM de NaOH, conforme Lopes *et al.* (1994), precipitada com etanol, enxaguada e seca, conforme item a.

c) A galactomanana que sofreu hidrólise alcalina, foi ainda submetida à hidrólise enzimática, utilizando-se uma protease inespecífica (Alcalase, Novo Nordisk). Para tanto, a galactomanana (2 g/L) foi misturada a igual volume da enzima (2,4 AU/g) em tampão fosfato 100 mM, pH 5, sendo mantida a 55 °C por 6 h, em agitador orbital. O controle em paralelo, consistiu numa solução do polissacarídeo em tampão, sem a presença da enzima. A reação foi interrompida pela adição de 2 volumes de TCA 10% (v/v), em banho de gelo; o polissacarídeo foi centrifugado, precipitado, enxaguado com etanol e seco, conforme item a.

d) A galactomanana (2 g/L) em NaCl 1 M foi agitada por 12 h, precipitada, enxaguada com etanol e seca, conforme item a.

Os polímeros obtidos (itens a,b,c e d) foram ressolubilizados em solução salina (150 mM de NaCl) e os conteúdos protéicos foram determinados pelo método de Bradford modificado (Kresze, 1983).

# 2.3. Detecção de fenólicos

A Fração 1 e a Fração 3, foram submetidas à testes de detecção de a) compostos fenólicos totais; b) flavonóides e c) taninos (Sander, 1987).

a) Para a detecção de fenólicos totais, misturou-se 200  $\mu$ L do extrato metanólico das frações 1 e 2 a gotas de KOH 3% (m/v), ou FeCl<sub>3</sub> 1 % (m/v) ou FeCl<sub>3</sub> 1 % + KFe(CN)<sub>6</sub> 1 %, em placa de toque. Utilizaram-se como substâncias positivas ácido gálico, resorcinol e papel (sem tratamento químico). O controle negativo usado foi o metanol.

b) Para a detecção de flavonóides utilizou-se a reação da cianidina. Neste caso misturaram-se 2 mg de sal de Mg em pó a 200  $\mu$ L do extrato metanólico das frações 1 e 2 e em seguida gotejado HCl concentrado. A substância positiva utilizado foi quercetina 0,5% (m/v) e a negativa foi o metanol.

c) Para o teste de detecção de taninos foi adicionado, a 600  $\mu$ L do extrato metanólico das frações 1 e 2, 500  $\mu$ L de NaCl 2 % (m/v). Como houve a formação de um precipitado, a suspensão foi filtrada por papel de filtro. Ao filtrado adicionaram-se 500  $\mu$ L de solução de gelatina a 10 % (m/v). A esta solução foi adicionado gotas de FeCl<sub>3</sub> 1 % (m/v) + KFe(CN)<sub>6</sub>

1%. Como substâncias positivas foram utilizados ácido tânico e ácido gálico a 1% (m/v). O metanol foi utilizado como controle negativo.

# 2.4. Hidrólise ácida total, redução e acetilação das galactomananas

As galactomananas foram hidrolisadas com ácido trifluoracético 1 M por 4 h, em banho de água fervente, em tubos hermeticamente fechados (Adams, 1965; Aspinall, 1982; Bierman, 1989), o hidrolisado foi evaporado em relógio de vidro, na capela. Os produtos resultantes foram ressuspensos em água e reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) (Wolfrom e Thompson, 1963a), em temperatura ambiente, por 2 h. O excesso do agente redutor foi decomposto e os cátions Na<sup>+</sup> foram removidos pela adição de resina trocadora de cátions na forma ácida (Lewatit S-100). Após filtração por algodão o filtrado foi evaporado até a secura. Em seguida foi realizada a retirada do ácido bórico formado pela adição de metanol e evaporação em evaporador rotativo, na forma de borato de tetrametila. Os alditóis resultantes foram então acetilados (Wolfrom e Thompson, 1963b) pela adição de uma mistura de piridina: anidrido acético (1:1 v/v), por 16 h. O processo de esterificação foi interrompido pela adição de gelo moído e os produtos acetilados foram extraídos da solução pela adição de clorofórmio. A piridina residual permanece na fase clorofórmica e foi retirada por sucessivas lavagens com solução de sulfato de cobre 5% em água, o sulfato de piridina passa para a fase aquosa, permitindo a sua remoção. Os acetatos de alditóis resultantes foram analisados por cromatografia gasosa (GLC).

#### 3. Métodos físicos

# 3.1. Métodos ópticos e espectroscópicos

# 3.1.1. Ressonância magnética nuclear de carbono-treze (<sup>13</sup>C-NMR)

A análise espectroscópica de <sup>13</sup>C-NMR foi realizada com soluções de galactomananas (10 mg/mL) em água deuterada (D<sub>2</sub>O), em tubo de 0,5 cm de diâmetro, previamente submetidas a breve sonicação em aparelho Branson B2 a 150 W. Os espectros de <sup>13</sup>C-NMR foram obtidos com um espectrômetro Bruker AC-400 a 75 MHz acoplado a transformador de Fourier, a 80 °C com desacoplamento completo de próton. A janela espectral foi de 200 ppm, sendo que os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) relativo à ressonância do

4,4-dimetil 4-silopentano-sulfonato de sódio, usado como padrão interno ( $\delta = 0$ ).

# 3.1.2. Ressonância magnética nuclear de próton (<sup>1</sup>H- NMR)

O teor de grupos acetil e piruvato das amostras de xantana foi determinado através de <sup>1</sup>H-NMR (Rinaudo *et al.*, 1983). O espectro parcial de <sup>1</sup>H-NMR foi obtido a partir de soluções de xantana (5 mg/mL) dissolvida em acetato de sódio 5 mM (em D<sub>2</sub>O) a 85 °C. Foram acumulados 64 varreduras com tempo de repetição de 15 s e uma janela espectral de 1125 Hz. O teor de acetato e piruvato foi expresso como um número médio por cadeia lateral, usando-se o acetato de sódio (5 mM) como padrão interno (Lambert, 1983; Lambert e Rinaudo, 1985).

A partir da altura dos sinais obtidos para os grupos acetato e piruvato do polímero, e do padrão interno (referência), pode-se deduzir o número de grupos acetato (A) e piruvato (B), por grama de polímero:

$$A = \frac{h_a}{h_r} \cdot \frac{c_r}{c_p}$$
(3)

$$B = \frac{h_p}{h_r} \cdot \frac{c_r}{c_p}$$
(14)

onde, h<sub>a</sub>, h<sub>p</sub> e h<sub>r</sub> representam as alturas (em cm), calculadas pelas curvas de integração, dos picos de acetato, piruvato e padrão interno, respectivamente; c<sub>p</sub> e c<sub>r</sub> correspondem a concentração de xantana (g/L) e a concentração da referência (acetato de sódio, em M).

A partir destes resultados calcula-se X e Y, os quais representam o número de grupos acetato e piruvato, respectivamente, por unidade monomérica da xantana:

$$X = \frac{829. A}{1 - (92. B - 42. A)}$$
(15)

$$Y = \frac{B(829 + 42.X)}{1 - 92.B}$$
(16)

sendo que, 829 representa a massa molecular da unidade repetitiva do polímero em ausência de substituintes, 42 e 92 correspondem a massa molecular dos grupos acetil e piruvato, respectivamente.

## 3.1.3. Medidas quirópticas

As técnicas quirópticas foram utilizadas a fim de relacionar a atividade óptica com as mudanças conformacionais das macromoléculas. Os estudos de atividade óptica dos polissacarídeos isolados e de suas misturas foram realizados através de técnica polarimétrica e por dicroísmo circular.

# 3.1.3.1. Polarimetria

A análise da atividade óptica das galactomananas foi realizada em polarímetro automático Acatec PDA 8200, aferido com placa de quartzo, a 20 °C, em 589 nm. A leitura foi feita utilizando-se um tubo de 2 dm de caminho óptico, nas condições acima. Os valores experimentais do ângulo de desvio da luz monocromática plano-polarizada,  $\alpha$  (°), fornecidos pelo aparelho, foram utilizados para o cálculo da rotação óptica específica, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> das soluções, conforme a equação (Ewing, 1972).

$$[\alpha]_{\rm D} = \frac{\alpha}{\rm L. \ c}$$
(17)

onde L = comprimento do caminho óptico (dm)

c = concentração da solução (g/mL)

Os biopolímeros são opticamente ativos devido à assimetria dos substituintes dos átomos de carbono de suas unidades. Porém a atividade óptica dos biopolímeros difere daquela de seus produtos hidrolizados, isto é, sua atividade não é simplesmente a soma das atividades de suas unidades assimétricas. A razão de sua atividade óptica está na assimetria da conformação. Portanto, a ocorrência das interações cromóforo-cromóforo em uma conformação assimétrica dá origem à atividade óptica por mecanismos diferentes daqueles descritos para cromóforos simples. Este fato faz da polarimetria uma ferramenta apropriada para o estudo da conformação molecular de alguns polissacarídeos.

Foi determinado a rotação óptica específica,  $[\alpha]$ , das soluções de xantana, galactomananas e de suas misturas, em diferentes concentrações de polímero (0,1–1 g/L) e forças iônicas (água, 2, 5, 10 e 100 mM de NaCl), em função da temperatura. Foi utilizado para tal um comprimento de onda de 365 nm, em um polarímetro Perkin-Elmer, modelo 241,

usando uma célula de 1 dm de caminho óptico, termostatizada. Os ciclos de aquecimento e resfriamento foram realizados por meio de um banho de água circulante Haake F3 com um programador modelo PG10, em uma velocidade de 0,4 °C/min, numa faixa de 10 a 90 °C.

# 3.1.3.1.1. Monitoramento polarimétrico da temperatura de transição conformacional (T<sub>m</sub>) da xantana

A transição conformacional, bem como a sua temperatura  $(T_m)$  foram estudadas através da variação da rotação óptica  $\alpha$  (°) em função da temperatura, conforme descrito no parágrafo anterior. Utilizaram-se soluções poliméricas de diversas forças iônicas a fim de controlar a temperatura de transição conformacional da xantana.

O estudo da variação de  $\alpha$  em função da temperatura permitiu caracterizar a transição conformacional da xantana, determinando a T<sub>m</sub>, cujo valor corresponde à temperatura no ponto de inflexão da curva de  $\alpha$  em função da temperatura (Milas e Rinaudo, 1986).

# 3.1.3.2. Dicroísmo circular

O fundamento desta técnica baseia-se no fato de que as moléculas opticamente ativas podem interagir de diferentes formas com os componentes opostos do feixe de luz planopolarizada, conforme Figura 22.



Figura 22. Efeito de amostra opticamente ativa sobre a luz linearmente polarizada. (a) luz incidente linearmente polarizada; (b) luz emergente elipticamente polarizada; (c) resolução da

luz linearmente polarizada em componentes polarizados circularmente à esquerda e à direita; (d) efeito de amostra opticamente ativa sobre os dois componentes circularmente polarizados (Cantor e Schimmel, 1980)

O campo elétrico da luz plano-polarizada pode ser considerado uma composição de dois componentes com rotação em sentidos opostos (circularmente polarizado à esquerda e à direita) e o feixe plano-polarizado representa a soma dos vetores destes componentes. Quando o meio é opticamente inativo ambos os componentes são igualmente retardados e o feixe emerge do meio polarizado no mesmo plano do feixe incidente. Se o meio é opticamente ativo os componentes são retardados de maneira diferente devido aos diferentes índices de refração do meio para a luz circularmente polarizada à esquerda (n<sub>e</sub>) e à direita (n<sub>d</sub>). Como resultado desta birrefringência circular ( $\Delta n = n_e \cdot n_d$ ), o feixe emerge ainda plano-polarizado mas com o plano de polarização inclinado por um ângulo  $\alpha$ , o qual pode ser calculado:

$$\alpha = \frac{1800}{\lambda} L \Delta n \tag{18}$$

onde L é o comprimento do caminho óptico em dm,  $\lambda$  o comprimento de onda em cm e  $\alpha$  a rotação óptica do meio, a qual é positiva quando o plano de polarização é girado no sentido horário em relação ao plano do feixe incidente (dextrorrotação) e negativa quando a inclinação é no sentido anti-horário (levorrotação).

Se o meio absorve uma fração da radiação, um meio opticamente ativo pode mostrar um segundo efeito físico o qual surge devido à absorção desigual da luz polarizada circularmente à esquerda e à direita. Como resultado deste efeito o feixe emerge elipticamente polarizado (Figura 22-d), pois, na combinação dos dois componentes, a amplitude de cada um é diferente. A elipticidade,  $\psi$ , do feixe emergente é dada por::

$$\psi = \frac{1800}{\lambda} L \Delta A \tag{19}$$

onde  $\Delta A = A_L - A_R$ , a diferença entre o coeficiente de absortividade para a luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Este efeito é chamado de dicroísmo circular (CD) (Wood, 1988).

Uma molécula assimétrica, por exemplo, helicoidal, com um passo de hélice definido,

apresenta um sentido preferencial de polarização, o sentido do seu passo. Deste modo, interage diferentemente com a luz polarizada circularmente à esquerda e à direita (Cantor e Schimmel, 1980).

Os espectros de CD das amostras foram medidos com um dicrógrafo Jobin-Yvon III, em faixa de 200-300 nm, com uma célula de 1 mm de caminho óptico, termostatizada. Cada espectro foi obtido após acumulação de 10 medidas. Os ciclos de temperatura foram realizados como descrito acima para a polarimetria.

A transição conformacional da xantana durante resfriamento pode ser acompanhada através de dicroísmo circular (Morris *et al.*, 1977). Em temperatura ambiente o espectro desta amostra apresenta duas bandas, um pico a cerca de 205 nm e uma depressão em aproximadamente 220 nm (Figura 23).



Figura 23. Dependência do dicroísmo circular em relação à temperatura (10, 30, 50, 70 e 80 °C) para solução de xantana. A amplitude do pico e da depressão mudam com o aquecimento, o pico diminui e a depressão aumenta em tamanho, diminuindo os valores de comprimento de onda de absorção mínimo e máximo (Morris et al., 1977)

Ambas as amplitudes variam com aquecimento. O pico diminui linearmente em altura, em contraste, a amplitude da depressão aumenta, mostrando uma forma sigmoidal, similar à observada em polarimetria, com um deslocamento para comprimentos de onda menores. A depressão é atribuída principalmente aos grupos *O*-acetil porque o mesmo diminui significativamente em tamanho pela des-*O*-acetilação da amostra. As mudanças no espectro de CD da banda do grupamento *O*-acetil, com o aquecimento são devidas à unidade manosila interna da cadeia lateral, contendo este substituinte, que dobra-se e liga-se à cadeia principal, com a formação da hélice, durante resfriamento (Morris *et al.*, 1975; 1977; Milas e Rinaudo, 1979).

Neste trabalho foram analisadas amostras de xantana sódica ou na forma ácida (H<sup>+</sup>) e parcialmente neutralizada (1 g/L), amostras de galactomananas (1 g/L) e misturas de xantana:galactomananas (1:1 g/L). Foram utilizadas variadas concentrações de NaCl (0-10 mM) a fim de controlar a  $T_m$  da xantana. Os espectros foram coletados em diversas temperaturas a fim de observar as modificações conformacionais da xantana, e representam a média de 10 determinações.

#### 3.1.4. Refratômetro diferencial

O índice de refração (n) de um solvente geralmente muda se um soluto é dissolvido nele. O incremento do índiçe de refração diferencial (dn/dc) é a mudança no índice de refração de um solvente com a mudança da concentração do soluto e é dado por:

$$dn/dc = \frac{n_{solução} - n_{solvente}}{c}$$
(20)

onde c é a concentração da solução, em g/mL, resultando em dn/dc em mL/g (Wood, 1988).

O dn/dc, utilizado para o cálculo da massa molecular das galactomananas e das amostras de xantana, foi determinado através da leitura do índice de refração diferencial entre a solução da amostra em diferentes concentrações e o solvente, em um refratômetro diferencial Brice-Phoenix, em um comprimento de onda de 546 nm. O dn/dc representa o coeficiente angular formado pela reta obtida de: índice de refração diferencial *versus* concentração.

# 3.2. Métodos Reológicos

A avaliação reológica da interação entre a xantana e as galactomananas *de S. parahybae* e *M. scabrella* foi realizada por meio de dois tipos de reômetros, o tipo cilindro-coaxial e o tipo cone-placa. A viscosidade intrínseca dos polímeros isolados foi determinada em viscosímetro capilar e pelo método de cromatografia de exclusão estérica (SEC).

# 3.2.1. Viscosímetro rotacional cilindro-coaxial (sistema Searle)

As amostras preparadas conforme ítem (1.8.1a) foram avaliadas em aparelho Brookfield modelo LV DVIII 7, equipado com geometria ULA, em faixa de gradiente de cisalhamento ( $\gamma$ ) de 10 a 350 s<sup>-1</sup>, a 20 °C. Cujo esquema de funcionamento é ilustrado na Figura 24.



Figura 24. Representação do viscosímetro rotacional cilindro-coaxial, sistema Searle, onde o cilindo externo é fixo e o cilindro interno é rotatório (Laba, 1993)

A solução cuja viscosidade se quer determinar, encontra-se entre duas superfícies, a do cilindro externo, fixo, e a do cilindro interno, rotatório, em geometria coaxial. Ao cilindro interno é imposta uma velocidade de rotação bem definida ( $\omega$ ), a qual imprime um movimento ao líquido. Este, por sua vez, transmite o movimento à superfície do cilindro fixo externo, devido à sua força de atrito interno, tentando arrastá-la. O torque aplicado pela amostra à

segunda superfície permite determinar a viscosidade do líquido, conhecendo-se a velocidade de cisalhamento imposta a qual é definida pela rotação do cilindro interno, móvel.

Ao contrário do viscosímetro capilar, onde a velocidade e a pressão de cisalhamento dependem do tempo de escoamento, com valores de  $\gamma$  relativamente elevados (cerca de 1 000 s<sup>-1</sup>), este equipamento permite o controle da velocidade de cisalhamento, trabalhando em um faixa de 1-1000 s<sup>-1</sup>, dependendo das características da amostra. Estes valores de velocidade de cisalhamento nem sempre permitem analisar as amostras de comportamento pseudoplástico no primeiro platô newtoniano, ou seja na região onde a viscosidade independe da velocidade de cisalhamento. A comparação da viscosidade entre as amostras faz-se então em relação a um determinado valor de velocidade de cisalhamento.

# 3.2.2. Viscosímetro rotacional oscilatório (tipo cone-placa)

Para as soluções mais concentradas, preparadas conforme descrito no ítem (1.8.1b), foi utilizado o reômetro de pressão de cisalhamento controlada, oscilatória ao longo de tempo, com geometria do tipo cone-placa, o Carri-Med, modelo CS 50. Este equipamento permite analisar o comportamento viscoelástico das amostras, através de medidas reológicas dinâmicas. Nesta técnica a amostra, normalmente colocada entre uma placa e um cone (Figura 25), é submetida a uma pressão de cisalhamento sinusoidal ao longo do tempo, de pequena amplitude.



Figura 25. Geometria do viscosímetro cônico-plano onde R é o raio do cone (cm),  $\theta$  é o ângulo do cone (°) e  $\omega$  a velocidade angular (rad/s) (Schott, 1992)

Esta técnica permite uma sensibilidade superior àquelas obtidas por medições com os mesmos dispositivos (cônico-plano) em reômetros comuns, de velocidade de cisalhamento controlada. A resposta elástica (G') e viscosa (G'') do material pode ser avaliada, trabalhandose em baixas taxas de deformação, sem perturbar significativamente a rede intermolecular formada.

Os cones utilizados possuem diâmetros de 2, 4 e 6 cm e ângulo de 4°. Os experimentos foram realizados em faixa de freqüência de 0,1 a 5 Hz após a identificação da região viscoelástica linear, em variadas faixas de deformação. A temperatura foi controlada por circulação de água termostatizada com regulação efetuada por efeito "Peltier". Foram utilizados cones equipados com uma cobertura metálica e uma camada de silicone para limitar o efeito de evaporação do solvente durante os ciclos de temperatura. O aparelho é comandado por sistema informatizado Rheo 1000 C.

# 3.2.3. Viscosímetro capilar (tipo Ubbelohde)

A viscosidade intrínseca [η] dos polímeros, em concentrações de 0,2 a 1,0 mg/mL (regime diluído), foi determinada em viscosímetro capilar modelo Ubbelohde, a 20 °C, em banho termostatizado Fanem-Unitemp. Os valores de viscosidade foram calculados utilizandose a equação de Hagen-Poiseuille (Champetier e Monnerie, 1969):

$$\eta = \frac{\pi r^4 \Delta P t}{8V}$$
(21)

onde r é o raio do capilar;  $\Delta P$  a diferença de pressão nas extremidades do capilar; t o tempo de escoamento e V o volume.

Os tempos de escoamento foram cronometrados e as medidas consideradas válidas foram aquelas onde ao menos duas medidas consecutivas não variaram entre si mais do que 1%. Foram feitas médias de 3 medições independentes (Pharmacopoea Helvetiae, 1995).

Comparando-se os tempos de escoamento para o solvente (t<sub>o</sub>) e para as soluções (t), mantendo-se os demais parâmetros constantes calcularam-se os valores de  $\eta_{rel} = t/t_o$ . A partir deste valor calculou-se a viscosidade específica ( $\eta_{rel} - 1$ ) e reduzida ( $\eta_{sp}/c$ ) e, finalmente a viscosidade intrínseca, através da extrapolação da  $\eta_{red}$  à concentração zero:

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \eta_{red}$$
(22)

onde c é a concentração em g/mL.

#### 3.3. Métodos termoanalíticos

#### 3.3.1. Perda por dessecação

A secagem das amostras a 100 °C foi realizada, até que duas pesagens consecutivas não diferissem em mais de 0,5 mg por grama de amostra massa constante (Farmacopéia Brasileira, 1998). A pesagem foi realizada em balança eletrônica analítica, com sensibilidade para 0,1 mg, em triplicata.

#### **3.3.2.** Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Praticamente todos os eventos físicos ou químicos são acompanhados de efeitos térmicos mais ou menos importantes. Quando um material sofre mudança de estado físico, como por exemplo, a gelificação, uma quantidade de calor será absorvido ou liberado, resultando em mudança de entalpia do sistema. O objetivo dos sistemas térmicos diferenciais é registrar a diferença entre as mudanças de entalpia sofridas pela amostra e uma referência inerte (que não sofra nenhum evento térmico na faixa utilizada, não-reativo e com condutividade térmica similar à da amostra), quando ambos são submetidos a um mesmo ciclo de temperatura. Na análise térmica diferencial (DTA) clássica, quando um evento térmico de  $\Delta$ H positivo, como uma fusão, ocorre na amostra, a temperatura da mesma, Ta, será retardada em relação à da referência, Tr, a qual segue o programa de aquecimento. Se o resultado dos termopares,  $\Delta$ T = Ta-Tr, é registrada contra Tr, o resultado será uma inflexão, mostrando a variação da temperatura. Se o processo for endotérmico ( $\Delta$ H negativo, como uma oxidação) a resposta será na direção oposta.

Na DSC as junções termopares são ligadas às bases dos suportes e não diretamente na amostra ou material de referência. Esta configuração tem a vantagem de que o sinal resultante é menos dependente das propriedades térmicas da amostra, mas a resposta é menor. Neste método a amostra e o material de referência são mantidos na mesma temperatura. A diferença de energia no fornecimento independente para a amostra e referência é então registrada contra o programa de temperatura. Os eventos térmicos na amostra aparecem como desvios da linha de base da curva de DSC, na direção endo- e exotérmica, dependendo se mais ou menos energia foi fornecida para a amostra em relação à referência. Enquanto que a DTA possibilita o registro de um sinal diferencial térmico, com a DSC é possível a determinação quantitativa do fenômeno (United States Pharmacopeia, 1990; Charsley, 1992; Brown, 1988).

A análise DSC foi realizada em um microcalorímetro Setaram, modelo DSC III equipado com 2 células de 1 cm<sup>3</sup>, uma célula de referência (contendo o solvente) e outra de medida (contendo a amostra). As duas células continham a mesma quantidade de produto (cerca de 0,8 mL). Os ciclos de aquecimento e resfriamento foram feitos com velocidades de 0,4 ou  $0,2 \, ^{\circ}C/min$ .

# 3.4. Métodos cromatográficos

# 3.4.1. Cromatografia líquido-gasosa (GLC)

A relação M/G das galactomananas foi determinada através da análise dos alditóis acetato (ítem 2.4) usando um cromatógrafo a gás modelo HP 5890 S II, com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2,0 mL/min, a 220 °C sendo que a temperatura do detector e do injetor de 250 °C. O aparelho estava equipado com coluna capilar (0,25 mm di x 30 m), modelo DB-210, com espessura de filme de 0,25  $\mu$ m.

# 3.4.2. Cromatogafia de exclusão estérica (SEC) acoplado a multidetectores

# 3.4.2.1. Determinação da massa molecular ( $M_w$ ) e raio de giro ( $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ ) e viscosidade intrínseca ([ $\eta$ ])

A massa molecular média (M<sub>w</sub>) dos polissacarídeos foi determinada através do método dinâmico de espalhamento de luz no Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales - CERMAV, Grenoble, França (Billmeyer, 1962). As soluções em água (galactomananas) ou em NaCl 10 mM (xantana) em concentração de 1,5 mg/mL foram filtradas através de membranas de acetato de celulose (Millipore), com tamanho de poro de 0,2 μm, sob pressão. Em seguida foram injetados em cromatógrafo de exclusão estérica modelo 150 C ALC/GPC Waters (Milford, Massachusets), com um detector de índice de refração diferencial modelo Waters, um detector de espalhamento laser em multiângulos, o qual permite medir a intensidade dos

feixes espalhados em diferentes ângulos, modelo Dawn DSP-F, Wyatt Technology (Saint Barbara, California) e um viscosímetro capilar (construído no CERMAV, Tinland *et al.*, 1988), acoplados em série. O eluente utilizado foi uma solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> 100 mM com NaN<sub>3</sub> 0,5 mg/mL, com fluxo de 1 mL/min e uma pressão de 35 bar. Foram usadas duas colunas de gelpermeação Shodex OH-pack B 804 (limite de exclusão...) e B 805 (Showa Denko, Tokyo), em série. O experimento foi realizado a 30 °C.

Os detectores de índice de refração e espalhamento de luz permitem a extrapolação gráfica da concentração e da massa molecular, respectivamente. O detector de viscosidade, acoplado aos dois precedentes, permite acoplar, a cada traçado de concentração e massa molecular a viscosidade intrínseca correspondente.

A determinação exata dos valores é realizada através de análise informatizada eletrônica. Os programas ASTRA-PC PS1 3,02 e EASI 7,02 (Wyatt Technology) monitoram os detectores de índice de refração e espalhamento de luz. O detector de viscosidade é monitorado através de um programa desenvolvido no CERMAV (Tinland *et al.*, 1988). Através dos cromatogramas pode-se calcular a massa molecular média (M<sub>w</sub>).

Para cada amostra pode efetuar-se uma medida da espalhamento do feixe luminoso em função da concentração em polímero e em função do ângulo. A relação que permite calcular a massa molecular média, é:

$$\frac{Kc(1+\cos^2\theta)}{\Delta R\theta} = (1/M_w + 2 A_2 C + ...)P^{-1}(\theta)$$
(23)

onde K =  $(2\pi^2 n^2 / \lambda o^4 N) / (dn/dc)^2$ 

n = índice de refração do solvente no comprimento de onda  $\lambda o$ 

 $\lambda o =$  comprimento de onda da luz incidente

N = número de Avogadro

dn/dc = taxa de variação do índice de refração com a concentração

c = concentração do polímero

- $\theta$  = ângulo do feixe de luz espalhado
- $A_2$  = segundo coeficiente Virial
- P ( $\theta$ ) = função de  $\theta$  que leva em consideração as interferências entre as diferentes vibrações emitidas por uma mesma partícula.

 $\Delta R_{\theta}$  = diferença entre o  $R_{\theta}$  da solução e o  $R_{\theta}$  do solvente.

 $R_{\theta}$  = fator de Rayleigh, calculado através da seguinte equação:

$$R_{\theta} = \frac{G_{\theta} \cdot D}{Go \cdot \sigma' \cdot l'}$$
(24)

onde  $G_{\theta}$  é a intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado, Go, a intensidade relativa correspondente ao feixe incidente; D,  $\sigma$ ' e l' são constantes do aparelho.

Zimm (Tager, 1978) propôs um método gráfico no qual coloca-se a parte esquerda da equação (23) em função do Kc + sen<sup>2</sup>( $\theta$ /2), resultando em um diagrama de dupla extrapolação, para c = 0 e  $\theta$  = 0, representado na Figura 26.



Figura 26. Diagrama de Zimm (Tager, 1978)

São realizadas medidas de  $R_{\theta}$  para soluções de várias concentrações a diferentes ângulos ( $\theta$ ) na faixa de 30-150° e o gráfico da relação de (Kc/ $R_{\theta}$  . 10<sup>6</sup>) com a concentração é plotado para vários ângulos de  $\theta$ , neste caso os valores de concentração são multiplicados por uma constante arbitrária.

A partir deste diagrama, pode-se deduzir a massa molecular média, Mw, pela

extrapolação à ângulo e concentração nulos:

$$\lim_{c \to 0, \theta \to 0} \operatorname{Kc} (1 + \cos^2 \theta) / \Delta R_{\theta} = \frac{1}{M_{w}}$$
(25)

A partir da inclinação da curva resultante das extrapolações à ângulo nulo, determinase o segundo coeficiente Virial,  $A_2$ :

$$\lim_{\theta \to 0} \operatorname{Kc} (1 + \cos^2 \theta) / \Delta R_{\theta} = \frac{1}{-++2A_2c}$$

$$M_{w}$$
(26)

E a partir da inclinação à origem da curva resultante das das extrapolações à concentração nula, o raio de giro ("radius of gyration"),  $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ :

$$\lim_{c \to 0} \operatorname{Kc} (1 + \cos^2 \theta) / \Delta R_{\theta} = \frac{1}{M_{w}} + (16\pi^2 / 3\lambda 0^2) n^2 (\langle S^2 \rangle / M_{w}) \operatorname{sen}^2 \theta / 2$$
(27)

Para cada Fração eluída, obtêm-se, por espalhamento de luz, a massa molecular média e o raio de giro. Estes dois valores são calculados pelo método de Zimm (Tager, 1978). O programa EASI permite fazer automaticamente estes cálculos e a obtenção das massas moleculares em número (Mn) e em massa (M<sub>w</sub>) para cada amostra, bem como a função:

$$< S^{2} >^{1/2} = f(M)$$
 (28)

Por viscosimetria, obtêm-se a viscosidade intrínseca. Durante a eluição a viscosidade relativa é calculada graças a um manômetro colocado nas extremidades do capilar. A relação entre a diferença pressão no capilar pela passagem do polímero, e a diferença de pressão devido à passagem do solvente permite a obtenção da viscosidade relativa:

$$\eta_{\rm rel} = \Delta P \text{ amostra} / \Delta P \text{ solvente}$$
<sup>(29)</sup>

Conhecendo a concentração (c) do polímero pelos resultados da refratometria, calculase a viscosidade reduzida:  $\eta_{red} = (\eta_{rel} - 1)/c$ 

Extrapolando esta viscosidade à concentração nula, determina-se a viscosidade intrínseca, [ŋ].

# 3.4.2.2. Determinação do comprimento de persistência (L<sub>p</sub>)

Se as dimensões das cadeias não são perturbadas pelo efeito de volume excluído, somente dois parâmetros são suficientes para caracterizar as suas dimensões, o comprimento de contorno (L) e o comprimento de persistência ( $L_p$ ). O  $L_p$  é a medida de contorno da cadeia sobre a qual ainda existe uma influência da orientação da primeira ligação monomérica. Quanto maior for o seu valor, mais rígida é a cadeia. O comprimento de contorno, L, é dado por:

$$L = \frac{M_w}{M_L}$$
(31)

onde M<sub>L</sub> é a massa molar monomérica por unidade de comprimento.

 $O < S^2 > ^{1/2}$  de uma cadeia é a segunda medida comum das dimensões médias de polímeros e para aqueles nos quais as unidade monomérica apresentam valores similares de massa molecular entre si. O raio de giro é definido como a distância média de uma unidade do centro de massa da cadeia. Esta grandeza pode ser prevista através do modelo de Benoit e Doty (1953), a qual pode ser resumida em casos onde L >>> L<sub>p</sub> com a cadeia assumindo uma conformação semi-rígida:

$$< S^{2} >^{1/2} = \frac{L \cdot L_{p}}{3}$$
 (32)

Esta relação (equação 32), permite calcular  $< S^2 >^{1/2}$  em função da massa molecular, em diferentes forças iônicas, para cada valor de  $L_p$  através de programa computacional (CERMAV). Os valores experimentais de  $< S^2 >^{1/2}$  são obtidos a partir do gráfico de Zimm (Figura 26), onde resulta da inclinação da linha de concentração zero em função do ângulo (Billmeyer, 1971). A curva experimental é comparada com as várias curvas teóricas e a curva que melhor se sobrepõe aos valores experimentais indica qual é o valor de  $L_p$  para a amostra.

# 3.5. Métodos eletrométricos

# 3.5.1. Potenciometria

As determinações de pH foram realizadas em potenciômetro Micronal, B-374, na temperatura ambiente.

# 3.5.2. Condutometria

A neutralização da forma ácida da xantana isoladamente ou em mistura com galactomanana foi realizada com soluções de LiOH ou KOH, em concentração de 400 mM monitorando-se processo com um condutivímetro Tacussel CD 78, equipado com eletrodo de platina. A solução a ser neutralizada foi submetida a agitação mecânica constante em célula termostatizada por banho de água circulante Haake FS, nas temperaturas de 15 e 30 °C.

# **CAPÍTULO IV - Resultados e Discussões**

# **CAPÍTULO IV - Resultados e discussões**

A estrutura química de galactomananas, nativas, de origem vegetal tem sido estudada há cerca de 10 anos pelo Laboratório de Química de Macromoléculas Vegetais, do Departamento de Bioquímica da UFPR. Tais polissacarídeos apresentaram rendimentos comparáveis aos das galactomananas produzidas comercialmente (~30 % m/m). Entre as galactomananas de estrutura química previamente elucidada foram selecionadas duas, a galactomanana de Schizolobium parahybae (Vellozo) Blake (Zawadzki-Baggio, 1994) e a galactomanana de Mimosa scabrella Bentham (Ganter, 1988; Ganter et al., 1993). A primeira apresenta uma relação M/G = 3, semelhante ao da goma de alfarrobo (M/G  $\approx$  3,5) e ao da goma tara (M/G ≈3), comercialmente utilizadas. A última apresenta uma estrutura altamente substituída com relação M/G = 1.1, tendo seu comportamento de fluxo e propriedades reológicas previamente analisadas (Ganter, 1991; Ganter et al., 1992) e apresentando-se como um modelo mais substituído que a goma guar (M/G  $\approx$  1.6), de grande emprego industrial. Existem poucas galactomananas com grau de substituição semelhante ao da M. scabrella, descritas na literatura, como as de Lotus (M/G = 1,02), lucerne (M/G = 1,13) e "red clover" (M/G = 1,15) (Sharman et al., 1978). Entretanto, estudos de interações sinérgicas com tais polímeros não foram realizados.

Estas galactomananas podem servir como uma alternativa às galactomananas utilizadas comercialmente, importadas, na associação com xantana. Esta associação apresenta-se como um modelo de estudo interessante, uma vez que ambos os polissacarídeos não são geleificantes quando isolados, permitindo o estudo das condições de interação e de seu mecanismo, fundamental na implementação e potencialização de sua utilização industrial, bem como auxiliar na compreensão da interação de outros sistemas semelhantes.

# 1. Obtenção das sementes

# 1.1. Mimosa scabrella Bentham

# Sinonímia botânica: Mimosa bracaatinga Hoehne (Carvalho, 1994)

O crescimento da *M. scabrella* Bentham (bracatinga) é indiferente às condições físicas do solo, apresentando rápido desenvolvimento mesmo em solos fracos e erodidos. É uma árvore exclusiva das matas de pinhais, principalmente de associações secundárias (Lorenzi, 1949).

Apresenta ocorrência natural no Brasil, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Rotta e Oliveira, 1981). O florescimento ocorre durante um longo período do ano (Figura 27), porém, com maior intensidade a partir de junho até setembro e a frutificação, de novembro a março. A floração (Figura 28) e a frutificação iniciam a partir de 2 anos do plantio (Carvalho, 1994). Os frutos, vagens, contêm pequenas sementes, com cerca de 6 mm de comprimento e 3 mm de largura (Figura 29). Cada árvore produz, em média, 1 kg de sementes por ano (Bianchetti, 1981).

A bracatinga é importante para a produção de lenha e carvão. A área de bracatingal representa 500 milhões de m<sup>2</sup> na região metropolitana de Curitiba, correspondendo a 6% da área total desta região (Mazuchowski e Laurent, 1990).



Figura 27. Bracatingal [Embrapa, município de Colombo (PR)]


Figura 28. Ramos floridos de M scabrella



Figura 29. Flor, fruto e semente de M. scabrella

# 1.2. Schizolobium parahybae (Vellozo) Blake

Sinonímia botânica: *Cassia parahyba* Vellozo, *Schizolobium excelsum* Vogel, *Schizolobium parahybum* Blake (Carvalho, 1994).

Sua nomenclatura foi recentemente corrigida por Rodrigues (1997), o binômio ortograficamente correto do guapuruvu é *Schizolobium parahybae* e não *S. parahyba* ou *S. parahybum*. O *S. parahybae* (Vellozo) Blake (guapuruvu) é uma árvore de grande porte

(Figura 30), típica da zona da mata atlântica, com distribuição desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (Lorenzi, 1949; Corrêa, 1984; Carvalho, 1994). Floresce de julho a dezembro com frutos maduros de março a outubro. A floração e a frutificação iniciam entre 6 a 8 anos, em plantios. Produz anualmente sementes grandes (Figura 31), com 2 a 3 cm de comprimento e 1,5 a 2 cm de largura (Carvalho, 1994), possibilitando o isolamento mecânico do endosperma.



Figura 30. S. parahybae (Vellozo) Blake (Lorenzi, 1949)



Figura 31. Sementes de S. parahybae (Lorenzi, 1949)

# 2. Obtenção e caracterização dos polissacarídeos

A galactomanana de *M. scabrella* Benth. foi extraída, separada e purificada de acordo com o fluxograma abaixo (Figura 32):

Figura 32. Fluxograma de obtenção de galactomanana de Mimosa scabrella Benth



secagem 24 h baixa pressão

A galactomanana de *S. parahybae* foi extraída a partir do endosperma ao invés da semente total como no caso da bracatinga, sendo extraída, separada e purificada de modo semelhante à esta.

Na obtenção de polissacarídeos a partir de fontes vegetais ou microbianas é necessário a adoção de certas precauções no sentido de preservar sua estrutura primária e secundária. A detecção de agregados (segmentos emaranhados) em biopolímeros tem sido publicada (Lin et al., 1978). Tais estruturas influenciam nas propriedades reológicas dos polímeros com implicações importantes em suas aplicações biotecnológicas (Akiyoshi et al., 1993). Com o objetivo de obter polissacarídeos que apresentem qualidade adequada sob o ponto de vista físico-químico, como boa dissolução em solventes aquosos e ausência de formação de estruturas agregadas, é importante realizar um processo de filtração e/ou centrifugação do extrato aquoso de polissacarídeo antes de proceder sua separação do meio pela adição de etanol. A proporção de etanol utilizado também é importante, uma baixa proporção de álcool em água deve ser utilizada a fim de evitar a co-precipitação de proteínas ou pequenas moléculas. A forma de secagem dos polissacarídeos influencia nas características dos mesmos, pois a eliminação completa de água da matriz polimérica pode conduzir à formação de agregados irreversíveis (Rinaudo, 1993). Ghosh et al. (1990) demonstraram a formação de uma grande proporção de agregados de hialuronato de origem bacteriana ao submeter o polissacarídeo ao processo de liofilização. Estas formas foram retiradas da solução mediante filtração em membranas de 0,22 µm de tamanho de poro (Ghosh et al., 1990; Reed et al., 1991) e 0,05 µm para polímeros como heparina e 6-sulfato de condroitina (Peitzsch et al., 1992; Ghosh et al., 1992).

O procedimento clássico para obtenção de polissacarídeos a partir de tecidos vegetais consiste na extração aquosa dos mesmos a partir do material finamente pulverizado, após a inativação enzimática por solventes orgânicos ou aquecimento. O processo de separação dos polímeros do meio aquoso compreende a utilização de etanol como agente desidratante das macromoléculas e sua conseqüente insolubilização.

Com o objetivo de minimizar a formação de agregados e avaliar a co-precipitação de proteínas, foi verificada a influência da concentração de etanol (Tabela 2) na mistura etanol:água utilizada no processo de separação do polissacarídeo do meio aquoso, conforme Figura (32).

etanol % (v/v)	proteína % (m/m) <sup>a</sup>	rendimento polissacarídeo % (m/m)
50	3,9	16
67	3,8	17
75	4,3	17
80	5,0	19

Tabela 2. Variação da concentração de proteína na galactomanana de bracatinga, após precipitação com etanol

<sup>a</sup> Bradford, modificado (Kresze, 1983)

A presença de proteínas na galactomanana é demonstrada na Tabela 2. Este teor mostra uma correlação com a concentração de etanol empregado na separação do polissacarídeo. Apesar do rendimento em massa ser menor, optou-se pela utilização da concentração de etanol de 50 % (v/v) no processo de obtenção das galactomananas, pois a presença de cargas provenientes de contaminantes protéicos pode exercer alguma influência nos experimentos reológicos.

## 2.1. Caracterização das galactomananas

As galactomananas obtidas (Figura 32) foram analisadas e algumas de suas propriedades químicas e físico-químicas estão listadas abaixo (Tabela 3):

Tabela	3. Análise	das ga	lactomananas
--------	------------	--------	--------------

fonte	M/G <sup>a</sup>	umidade % <sup>b</sup>	$\left[\alpha\right]^{D}_{20}$	$[\eta]_{25}^{c}$ (mL/g)	M <sub>w</sub> <sup>c</sup>	$L_{p} (nm)^{c}$
M. scabrella	1,1	10	+77	740	1,4 . 10 <sup>6</sup>	$10 \pm 1$
S. parahybae	3,0	12	+32	1.280	1,35. 10 <sup>6</sup>	

<sup>a</sup> obtido por GLC e <sup>13</sup>C-NMR; <sup>b</sup> por gravimetria, até massa constante, em triplicata;

<sup>c</sup> usando SEC, acoplada com espalhamento de luz

A estrutura química das galactomananas, analisada por GLC e <sup>13</sup>C-NMR, correspondeu à estrutura genérica com uma cadeia principal de unidades D-manopiranosil unidas entre si por ligação  $\beta(1\rightarrow 4)$ , com substituições em O-6 por unidades D-galactopiranosil, ligadas  $\alpha(1\rightarrow 6)$ . Os resultados acerca do grau de substituição das galactomananas de *M. scabrella* e *S.*  *parahybae* estão em concordância com publicações anteriores (Ganter *et al.*, 1993; Zawadzki-Baggio, 1994) e estes polissacarídeos foram selecionados para investigar sua interação com a xantana em função de suas diferentes relações M/G. A galactomanana de guapuruvu apresenta uma quantidade maior de regiões não-substituídas e estaria mais apta a interagir com a xantana, conforme trabalhos anteriores (Dea *et al.*, 1977; Morris *et al.*, 1977) enquanto que na galactomanana de bracatinga praticamente todas as unidades de manose da cadeia principal apresentam substituição por unidades de galactose. A caracterização estrutural destas galactomananas, em publicações anteriores (Ganter *et al.*, 1992; Ganter *et al.*, 1993) sugeriu uma distribuição ao acaso dos grupos D-galactosil ao longo da cadeia principal, consistente com a estrutura dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida (Ganter *et al.*, 1995).

Os polissacarídeos não foram excessivamente secos, mantendo um teor de substâncias voláteis de cerca de 10% (m/m). Tais valores foram levados em consideração no cálculo das concentrações, além da determinação do conteúdo de carboidratos (Dubois *et al.*, 1956).

As rotações ópticas específicas são fortemente influenciadas pelo conteúdo de galactose, como foi demonstrado por Noble *et al.* (1986), adotando valores mais positivos com o aumento do grau de substituição. Os resultados apresentados na Tabela 3 confirmam o maior grau de substituição para a galactomanana de bracatinga, a qual apresentou valores mais positivos de  $[\alpha]_D^{20}$  em relação à galactomanana de guapuruvu, menos substituída. Tais valores estão em concordância com os resultados previamente publicados (Ganter *et al.*, 1993).

A massa molecular e a viscosidade intrínseca foram determinados por SEC acoplada a multidetectores. Este método possibilita a determinação de valores absolutos da massa molecular média (M<sub>w</sub>) (Billmeyer, 1962) sendo considerado um método válido para caracterizar polissacarídeos em uma larga faixa de massas moleculares (Rinaudo, 1993). O perfil de eluição das galactomananas é mostrado abaixo, indicando a ausência de agregados moleculares (Figuras 33 e 34):



Figura 33. Perfil de eluição da galactomanana de *M. scabrella*, determinado através de SEC, usando detectores de espalhamento de luz (LS) e índice de refração (RI) e viscosimétrico (VIS)



Figura 34. Perfil de eluição da galactomanana de *S. parahybae*, determinado através de SEC, usando detectores de espalhamento de luz (LS) e índice de refração (RI)

A viscosidade intrínseca também foi determinada através de viscosímetro capilar Ubbelohde, a 25 °C, resultando em valores semelhantes, de 720 mL/g para a galactomanana de bracatinga e 1160 mL/g para a galactomanana de guapuruvu. Os valores de viscosidade intrínseca encontrados são valores normais para as galactomananas e estão em concordância com a literatura. Doublier e Launay (1981) encontraram um valor  $[\eta]^{25}$ , através de viscosímetro capilar de 675 mL/g para uma amostra de galactomanana de guar (M/G  $\approx$  1,6), com massa molecular de 1,2 x 10<sup>6</sup>. Ganter *et al.* (1992) determinou um valor de  $[\eta]^{25}$  de 900 mL/g para a galactomanana de bracatinga, determinado através de aparelho Low Shear, em baixas velocidades de cisalhamento. Os valores obtidos por viscosimetria capilar foram menores e tal fato pode ser atribuído aos elevados valores médios de velocidade de cisalhamento no viscosímetro capilar, cerca de 1 800 s<sup>-1</sup> (Milas *et al.*, 1996). Mesmo trabalhando em regime diluído, o fluxo destes polímeros pode ser do tipo "shear thinning" e o viscosímetro capilar deve ser utilizado com precaução (Robinson *et al.*, 1982).

Apesar das galactomananas estudadas apresentarem valores semelhantes de massa molecular média, a galactomanana de *S. parahybae* mostrou um valor mais elevado de [ $\eta$ ]. Por possuir uma maior relação M/G esta última pode apresentar uma maior possibilidade de agregação, já que este fenômeno surge da associação lateral entre segmentos moleculares nãosubstituídos da cadeia principal (McCleary e Neukom, 1982). No entanto, a análise por espalhamento de luz não demonstra a presença de tais estruturas (Figura 34). Esta galactomanana apresenta um menor valor de massa molar monomérica ( $M_L$ ) em relação à galactomanana de bracatinga, uma vez que possui menor número de unidades galactosil. Este fato poderia resultar em diferenças nas dimensões das cadeias que implicariam na [ $\eta$ ]. Tal influência necessita de maiores investigações.

A galactomanana de bracatinga foi investigada com relação às dimensões das cadeias (raio de giro,  $\langle S^2 \rangle$  e comprimento de persistência, L<sub>p</sub>). A rigidez local da cadeia é caracterizada pelo L<sub>p</sub>, permitindo através de sua determinação, prever as dimensões da cadeia. Os dados calculados de  $\langle S^2 \rangle$  em função de M<sub>w</sub> foram comparados com os valores determinados experimentalmente por SEC. O valor de L<sub>p</sub> para o polímero foi encontrado através da curva de melhor sobreposição dos dados calculados com os experimentais, no gráfico de raio de giro ( $\langle S^2 \rangle$ ) em função da massa molecular.

O valor de  $L_p$  encontrado foi de 10 ± 1 nm para a galactomanana de bracatinga, conforme Figura 35 (Petkowicz *et al.*, 1997). Ganter e Reicher (1998) encontraram o mesmo

valor de  $L_p$  para a galactomanana de *Mimosa flocculosa*, cuja relação M/G é semelhante ao da *M. scabrella*. As galactomananas geralmente apresentam um valor de  $L_p$  de aproximadamente 10 nm (Robinson *et al.*, 1982), enquanto polímeros mais rígidos como a xantana, welana ou succinoglucana apresentam valores de  $L_p$  maiores que 30 nm (Morris *et al.*, 1981).



Figura 35. Comparação entre os valores de raio de giro teórico e experimental em função da massa molecular: — relação teórica (equação 30) para  $L_p = 10$  nm; • e x dados experimentais para duas amostras de galactomanana de *M. scabrella* (Petkowicz *et al.*, 1997)

### 2.1.1. Investigação do componente protéico

As galactomananas de *S. parahybae* e *M. scabrella* apresentaram aproximadamente 1,5 e 4,0 % (m/m) de conteúdo protéico, respectivamente. Estes dados são consistentes com o grau de pureza na obtenção dos polissacarídeos, uma vez que a primeira é isolada diretamente do endosperma, não apresentando contaminantes solúveis provenientes da casca, a qual é mecanicamente retirada. Devido ao seu reduzido tamanho, a galactomanana de *M. scabrella* foi extraída a partir das sementes inteiras moídas.

A presença de componente protéico em galactomananas vegetais tem sido observada em trabalhos anteriores e um residual protéico permanece nas amostras, mesmo após tratamentos de diferentes naturezas, como extração com solventes orgânicos (Staub, 1983): 2,5% (Ganter, 1988), 3% (Leitner, 1991), 1% (Recchia, 1992), 2% (Petkowicz, 1993), 3,8% (Zawadzki-Baggio, 1994); complexação com cobre (Furniss, 1989): 2,4-5,5% (Sugui, 1994); hidrólise alcalina (Lopes *et al.*, 1995); dissolução em elevada força iônica e hidrólise enzimática: 2,3 e 0,8 %, respectivamente (Bresolin *et al.*, 1996).

A galactomanana de *M. scabrella* foi submetida a diversos tratamentos com o objetivo de eliminar proteína, porém, um residual protéico permaneceu na amostra, conforme os resultados da Tabela 4.

 Tabela 4. Conteúdo de proteína da fração de galactomanana de M. scabrella

 após diferentes métodos de purificação

método	proteína (% m/m) <sup>a</sup>
complexação com cobre	1,0
hidrólise alcalina	1,5
1 M NaCl	2,3
hidrólise enzimática <sup>b</sup>	0,8

<sup>a</sup> Bradford modificado (Kresze, 1983); <sup>b</sup> após tratamento alcalino

Apesar de haver uma diminuição no conteúdo protéico das amostras de galactomanana, não foi possível a sua eliminação completa. Estes resultados sugerem a não preponderância de um único tipo de ligação entre proteína-carboidrato, a qual pode ser iônica, covalente ou por adsorção (Bresolin *et al.*, 1996). Ganter (1989), Petkowicz (1993), Leitner (1991) e Recchia (1992), após purificação e passagem de galactomananas por coluna de permeação em gel, observaram a eluição concomitante de proteína junto com o polissacarídeo, sugerindo a ocorrência de uma ligação covalente. Embora não tenha sido comprovado, alguns autores sugerem que as galactomananas possam ser peptideoglucanas (Mazzini e Cerezo, 1982). Estes autores observaram que mesmo após eliminação de proteínas não-complexadas de galactomananas de sementes de *Gleditsia triacanthos*, pela passagem em coluna de troca iônica, estes polissacarídeos ainda continham proteínas.

É conhecido o papel de glicoproteínas relacionado com a patogênese, quando associada a elementos estruturais da parede celular, tais como aquelas ricas em hidroxiprolinas (Bol, 1990). Este fenômeno representa a expressão de um mecanismo de proteção contra patógenos. Por outro lado, algumas proteínas parecem apresentar papéis funcionais, por exemplo, como oxidases, responsáveis pela impregnação da parede com fenólicos.

## 2.1.2. Investigação dos compostos fenólicos na galactomanana de M. scabrella

A purificação das galactomananas é realizada mediante adição de concentrações crescentes de etanol e posteriormente é realizada a sua secagem. Durante estes processos, em escala laboratorial, ocorre freqüentemente uma reação de escurecimento do polissacarídeo. Esta característica não é atrativa do ponto de vista do uso industrial e este problema potencializou-se na obtenção da mesma em escala piloto (Cardoso, 1995; Ganter *et al.*, 1997). Dentre as possíveis causas para tal escurecimento, transparece a impregnação daquela matriz por compostos fenólicos. Tais estruturas, metabólitos secundários de reconhecidas funções de caráter estrutural e aleloquímico (Bol, 1990; Hegnauer *et al.*, 1993), poderiam estar presentes no polissacarídeo isolado.

As frações nas quais foi investigada a presença de componentes fenólicos são as seguintes:

A Fração 2 (Figura 36), submetida ao teste de compostos fenólicos "*in situ*" com a finalidade de detectar possíveis grupamentos fenólicos conjugados ao polissacarídeos, do tipo lignina, apresentou resultado negativo. Com o reagente azul de *O*-toluidina, não desenvolveu a coloração verde turquesa, que seria indicativo da presença de lignina. O teste com fluoroglucinol também foi negativo, não desenvolvendo a coloração avermelhada (Harborne, 1984), da mesma forma que o controle negativo, enquanto que as substâncias-controle positivo desenvolveram as citadas colorações.

Figura 36. Fluxograma de obtenção das frações 1e 2



A Fração 2 foi hidrolisada, originando a Fração 3 (Figura 37), para permitir a detecção de compostos fenólicos livres, após rompida a ligação com a matriz polissacarídica, segundo o fluxograma abaixo:





A Fração 1 e a Fração 3, retomadas com 2 mL de metanol, foram submetidos a testes de detecção de a) compostos fenólicos totais; b) flavonóides e c) taninos (Sander, 1987) e apresentaram os seguintes resultados:

Tabela 5. Detecção de compostos fenólicos totais

Extrativos e referências	Fração 1	Fração 3	ácido gálico	resorcinol	papel
cor original	incolor	incolor	amarelo	amarelo	branco
após KOH 3%	idem	idem	marron	idem	idem
após FeCl₃ 1%	idem	idem	cinza	cinza	idem
após FeCl <sub>3</sub> 1%	verde	verde	azul	azul	verde
+ KFe(CN) <sub>6</sub> 1%					

Neste teste, o desenvolvimento da coloração verde-azul indica a presença de fenólicos. Após a hidrólise da fração 2 e conseqüente liberação do componente fenólico, eventualmente presente, este foi extraído com acetato de etila e o extrato submetido à detecção de fenólicos totais (tabela 5). Utilizou-se metanol como controle negativo, o qual permaneceu com a coloração dos reagente.

Tabela 6. Detecção de flavonóides

extrativos e referências	Fração 1	Fração 3	quercetina
cor original	incolor	incolor	incolor
após adição Mg <sup>+2</sup> + HCl	incolor	incolor	vermelha

Este teste é apropriado para a detecção de estruturas do tipo 2-fenil-1, benzopiran-4ona, enquanto as auronas, chalconas e isoflavonas não desenvolvem coloração. A coloração vermelha indica a presença de flavonóides. O controle negativo (metanol) permaneceu incolor após a adição dos reagentes e a amostra (frações 1 e 3) apresentou resultado negativo para a citada classe de flavonóides (tabela 6).

Tabela 7. Detecção de taninos

Extrativos e referências	Fração 1	Fração 3	ácido tânico	ácido gálico
cor original	incolor	incolor	vermelho	incolor
após NaCl 2%	ppt.	ppt.	límpido	límpido
após gelatina 1%	límpido	límpido	ppt.	ppt.
após FeCl <sub>3</sub> 1%	verde	verde	azul	azul
+ KFe(CN) <sub>6</sub> 1%				

A precipitação pela adição de NaCl deve-se à presença de macromoléculas (polissacarídeos) que tornam-se insolúveis pela modificação da concentração da solução. A precipitação pela gelatina indica a presença de taninos. Pela adição de FeCl<sub>3</sub>  $1\% + KFe(CN)_6$  1% detecta-se a presença de compostos fenólicos. O controle negativo (metanol) permaneceu límpido e incolor mediante a adição dos reagentes. A amostra apresentou resultado negativo para taninos (Tabela 7).

Os testes preliminares qualitativos permitiram a detecção de compostos fenólicos tanto na solução aquosa de polissacarídeo (Fração 1), quanto após a hidrólise alcalina da solução aquosa do polissacarídeo (Fração 3). Este resultado sugere que os referidos compostos estejam ligados ao polissacarídeo por ligação do tipo éster, rompida pela hidrólise alcalina e podem participar do processo de escurecimento dos extrativos vegetais.

Membros da ordem *Fabales*, antiga família *Leguminosae*, contêm flavonas e flavonóis (ex: campferol), chalconas e 2,3-dihidroflavonoides (ex: flavononas), além de isoflavonóides e rotenóides. Os isoflavonóides (mais freqüentes nesta família), constituem característica importante na classificação quimiotaxonômica destas plantas (Hegnauer e Grayer-Barkmeijer, 1993). A detecção da presença de tais compostos, e a elucidação de suas estruturas químicas e funções biológicas na *M. scabrella* demandam de investigações mais detalhadas, as quais serão desenvolvidas futuramente.

# 2.2. Obtenção, purificação e caracterização da xantana

Nos experimentos iniciais de análise dos sistemas binários, xantana:galactomananas, realizados em aparelho Brookfield, foi utilizada uma amostra de xantana comercial (Sigma), a fim de proceder a uma análise exploratória acerca do perfil de interação da mesma com as duas galactomananas selecionadas. Esta amostra de xantana comercial apresentou um aspecto granular fino, amarelado. Após a purificação o polímero adquiriu um aspecto fibroso, esbranquiçado, com rendimento de cerca de 70 % (m/m). Este tratamento visou eliminar resíduos de células bacterianas e a recuperação deste polissacarídeo na forma pura de sal sódico (Lopes *et al.*, 1989).

Posteriormente, em etapa mais avançada do trabalho, foi utilizada uma amostra de xantana a partir do meio de cultura (Rhône-Poulenc). A técnica utilizada para separação da xantana do meio de cultura (ítem 1.6 de material e métodos) visou a preservação da estrutura nativa (Milas e Rinaudo, 1986) e esta amostra foi utilizada para os experimentos de calorimetria, medidas quirópticas e reológicas em regime dinâmico, permitindo assim analisar o comportamento da amostra nativa em comparação com a forma renaturada na interação com as galactomananas.

As amostras de xantana utilizadas foram caracterizadas quanto ao teor de acetato e piruvato, viscosidade intrínseca, massa molecular e temperatura de transição conformacional. Os resultados estão listados na Tabela 8:

Tabela	8.	Caracteriza	ção das	amostras o	de	xantana
--------	----	-------------	---------	------------	----	---------

xantana	$[\eta]^{25a}$	$M_w^{a}$	T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup>	acetato/piruvato
	(mL/g)			(mol/mol) <sup>c</sup>
Sigma (renaturada)	3 850	$3,5 \times 10^6$	62	0,21/0,20
Rhône-Poulenc (nativa)	2 700	5,5 x 10 <sup>6</sup>		0,75/0,50
Rhône-Poulenc (renaturada)	4 030	1,5 x 10 <sup>6</sup>		nd

<sup>a</sup> valores obtidos usando SEC com detector de espalhamento de luz, viscosidade e índice de refração; <sup>b</sup> determinada por polarimetria com uma solução de 0,4 g/L de xantana, em 10 mM NaCl ; <sup>c</sup> determinado por <sup>1</sup>H-NMR (Rinaudo *et al.*, 1983), resultados em fração molar por unidade repetitiva da xantana; nd, não determinado

A xantana Sigma, obtida a partir da purificação do produto comercial, apresenta a forma renaturada (Chazeau *et al.*, 1995) devido ao tratamento térmico empregado pela indústria na etapa de recuperação da goma a partir do meio de cultura, visando principalmente a obtenção de um produto de viscosidade elevada. Esta amostra apresentou um valor de viscosidade intrínseca maior que a amostra de xantana Rhône-Poulenc, a qual está sob a conformação nativa, de acordo com a técnica de separação do polímero do meio de cultura, apesar da última apresentar valor de massa molecular maior.

A conformação renaturada da xantana Rhône-Poulenc mostrou um valor menor de massa molecular em relação à mesma amostra na conformação nativa. Esta diminuição de massa pode ser atribuída à existência de quebras na cadeia principal, as quais foram reveladas após o aquecimento da amostra. Milas e Rinaudo (1986) realizaram experimentos com xantana parcialmente despolimerizada e sugeriram que fortes interações das cadeias laterais com a cadeia principal podem mascarar a existência de clivagem na estrutura covalente da cadeia principal. Porém, a [η] desta conformação foi mais elevada. Tal fato pode ser atribuído à maior rigidez da conformação renaturada.

Analisando as duas formas ordenadas da xantana: antes de sofrer tratamento térmico (nativa) e após aquecimento a uma temperatura acima da  $T_m$  seguido de resfriamento (renaturada), Milas e Rinaudo (1986) observaram valores de viscosidade maiores para a segunda conformação, mesmo sem diferença significativa na massa molecular de ambas. Houve também um acréscimo na extensão da cadeia renaturada, com valores de  $L_p = 40$  e 73 nm, para a conformação nativa (N) e renaturada (R), respectivamente. A maior rigidez da conformação

R em relação à N foi atribuída ao rearranjo do padrão de interação das cadeias laterais com a cadeia principal, durante o resfriamento, estabilizando uma conformação mais estendida. Milas *et al.* (1996), determinaram valores de  $L_p = 30$  e 100 nm para as formas N e R, respectivamente, sendo que a massa monomérica (M<sub>L</sub>) foi o dobro para a segunda. Estes autores sugerem que a xantana R seja uma dupla-hélice, enquanto que a N seja uma hélice simples.

A determinação da temperatura de transição conformacional ( $T_m$ ) da xantana é de fundamental importância na interpretação dos resultados de interação desta molécula com as galactomananas. A  $T_m$  pode ser determinada por diferentes técnicas como: rotação óptica (Holzworth, 1976; Morris, 1977; Morris *et al.*, 1977; Dea *et al.*, 1977), dicroísmo circular (Morris, 1977; Morris *et al.*, 1977), ressonância magnética nuclear (Morris *et al.*, 1977; Gamini *et al.*, 1991), calorimetria (Holzworth, 1976; Williams *et al.*, 1991a; Goycoolea *et al.*, 1995), medidas de viscosidade (Holzworth, 1976; Milas e Rinaudo, 1979; 1986; Goycoolea *et al.*, 1995) e espalhamento de luz (Milas e Rinaudo, 1979; Norton *et al.*, 1984), com boa correlação entre as técnicas.

A  $T_m$  da amostra de xantana Sigma foi determinada por rotação óptica, conforme a Figura 38, para a amostra Rhône-Poulenc. Quando aquecida, a xantana apresenta uma transição na atividade óptica quando a rotação óptica ( $\alpha$ ) é plotada com a temperatura. A  $T_m$ corresponde aproximadamente à temperatura na qual a inclinação da curva é maior, ou mais exatamente ao ponto de inflexão da derivada segunda da curva ajustada. Em baixas temperaturas (menores valores de  $\alpha$ ), a conformação das moléculas é ordenada, enquanto que o platô, em temperaturas elevadas (maiores valores de  $\alpha$ ), corresponde à conformação desordenada.



Figura 38. Determinação da T<sub>m</sub> da xantana (Rhône-Poulenc) a 1 g/L 5 mM de NaCl

A partir do valor de  $T_m$ , determinado para a xantana Sigma, em 10 mM de NaCl (62 °C) foi estabelecido o valor do aquecimento prévio do polissacarídeo na mistura com as galactomananas para a análise viscosimétrica no aparelho Brookfield. Foi escolhido o valor de 80 °C, acima da  $T_m$  (na concentração usada em sua determinação), a fim de assegurar a interação com a conformação desordenada da xantana, mesmo em concentrações mais elevadas. Segundo Cairns *et al.* (1986), esta conformação interage mais efetivamente com a galactomanana.

Para a xantana Rhône-Poulenc a  $T_m$  foi determinada em diversas condições de força iônica, através de duas diferentes técnicas: rotação óptica (Figura 38) e calorimetria (Figura 39).



Figura 39. Determinação da  $T_m$  da xantana (Rhône-Poulenc) em concentração de 4 g/L, em 10 mM de NaCl. Resfriamento a 0,2 °C/min

Os valores de  $T_m$  para esta amostra estão listados na Tabela 9.

Tabela 9. Determinação da temperatura de transição conformacional  $(T_m)$  da xantana (Rhône Poulenc) através de calorimetria e polarimetria.

	T <sub>m</sub> (°C)				
condições iônicas	(DSC) <sup>a</sup>	rotação óptica <sup>b</sup>			
água		12 <sup>c</sup>			
NaCl 2 mM		17,5°			
NaCl 5 mM	43	37			
NaCl 10 mM	51	48			
NaCl 20 mM	62	58			
NaCl 100 mM	>90	>90			

<sup>a</sup> xantana a 4 g/L, durante resfriamento a 0,2 °C/min, <sup>b</sup> xantana a 1 g/L, durante resfriamento a 0,4 °C/min; <sup>c</sup> Milas e Rinaudo, 1979, --- não determinado

Estes resultados mostram que a temperatura de transição conformacional da xantana é sensível à concentração de eletrólitos, conforme descrito previamente (Holzwarth, 1976; Milas e Rinaudo, 1979) apresentando um comportamento típico de polieletrólitos (Anable *et al.*, 1994). Com o aumento da força iônica ocorre uma estabilização da conformação ordenada,

devido ao efeito de blindagem das cargas, diminuindo as repulsões intramoleculares e elevando a temperatura de fusão da hélice.

Os valores de  $T_m$  são independentes da concentração polimérica (Morris *et al.*, 1977), portanto a diferença entre os valores apresentadas na Tabela 9, determinados a 1 e 4 g/L através de polarimetria e DSC, respectivamente, são explicados pela própria contribuição do polímero no aumento da força iônica com o aumento da concentração em xantana, em concordância com os dados publicados por Milas e Rinaudo (1979).

O conhecimento dos valores de  $T_m$ , para cada condição selecionada, permitiu o monitoramento da conformação da xantana, auxiliando na interpretação dos resultados de interação com as galactomananas.

Considerando a influência dos grupos acetil e piruvato nas propriedades físico-químicas da xantana e no comportamento sinérgico com outros polissacarídeos (Rees, 1972; Dea e Morrison, 1975; Tako *et al.*, 1984; Tako e Nakamura, 1986), a composição destes substituintes foi determinada. Os resultados mostram que 75 % das ramificações da molécula de xantana Rhône-Poulenc apresentam grupamento acetil e 50 % possuem grupos piruvato. Uma amostra de xantana (Shell) analisada por Milas *et al.* (1986) apresentou resultado semelhante: 75 % de acetil e 40 % de piruvato.

De um modo geral, o teor de grupamentos acetila na xantana comercial é superior ao teor em grupos piruvato. Porém, o mesmo varia de acordo com a cepa produtora e com as condições pós-fermentação (Sandford *et al.*, 1977; 1978). Smith *et al.* (1981) propuseram que os substituintes piruvato promovem maior associação polímero-polímero devido à maior afinidade em relação à associação polímero-solvente, especialmente quando estes grupamentos estão presentes em concentrações acima de um valor crítico (> 0,31). Estes autores atribuem a capacidade da *Xanthomonas campestris* em modificar o grau de substituintes piruvato do polissacarídeo em função de mudanças nas condições do meio de fermentação como um possível mecanismo de controle na reologia do polímero, importante para a sobrevivência da bactéria. Trabalhando com amostras livres de acetato e/ou piruvato, Tako *et al.* (1984) e Cheetham e Mashimba (1988), observaram que a remoção dos grupos piruvato da xantana levou à estabilização da conformação ordenada, enquanto que a xantana livre de acetato apresentou uma tendência reduzida em formar hélice.

## 3. Análise reológica do sistema xantana (Sigma):galactomananas

Após a caracterização química e físico-química dos polissacarídeos procedeu-se a análise reológica da xantana, galactomananas e de suas misturas. Inicialmente, serão apresentados os resultados avaliados no aparelho Brookfield, realizados com a amostra comercial de xantana (Sigma).

### 3.1. Comportamento de fluxo dos polissacarídeos isolados

Considerando o comportamento pseudoplástico dos polímeros, inicialmente foi verificada a influência da velocidade de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) nos valores de viscosidade absoluta ( $\eta$ ) em várias concentrações de polímero a fim de encontrar as condições experimentais que permitam analisar as soluções no platô newtoniano (Figura 3b), onde a viscosidade independe da velocidade de cisalhamento. Os reogramas ( $\eta$  em função de  $\dot{\gamma}$ ), para os polissacarídeos isolados foram determinadas em uma faixa de concentração de 0,1 a 1,5 g/L para as galactomananas de *M. scabrella* e *S. parahybae*, em água, e em 100 mM NaCl para a xantana, nas mesmas concentrações, numa faixa de 10<  $\dot{\gamma}$  < 350 s<sup>-1</sup>.

Não foi observada dependência da viscosidade em relação aos valores de  $\dot{\gamma}$  (s<sup>-1</sup>) testados para nenhuma das soluções de galactomananas, confirmando resultados prévios em que uma faixa mais ampla de velocidades de cisalhamento foi estudada (10<sup>-2</sup> <  $\dot{\gamma}$  < 2000 s<sup>-1</sup>) (Ganter *et al.*, 1992). Estes autores observaram que para concentrações inferiores a 3,6 g/L as soluções de galactomanana de *M. scabrella* apresentaram comportamento newtoniano, em toda a faixa de  $\dot{\gamma}$  testada. A concentração crítica c[ $\eta$ ] para esta galactomanana foi de 2,6 (Ganter *et al.*, 1992). Kapoor *et al.* (1994), estudando o comportamento de fluxo para a galactomanana de *Cassia nodosa* Buch.-Hem., com relação M/G = 3,5, observaram comportamento newtoniano para concentrações inferiores a 2 g/L (10<sup>-3</sup> <  $\dot{\gamma}$  < 10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>), com valor de c[ $\eta$ ] = 2,5 ± 0,5. Para a maioria dos hidrocolóides enovelados randomicamente, como é o caso das galactomananas, os valores de c[ $\eta$ ] encontram-se na faixa de 2,5-4 (Morris *et al.*, 1981).

Para a xantana, o comportamento newtoniano na mesma faixa de  $\dot{\gamma}$  foi obtido somente em concentrações menores do que 0,4 g/L. A partir desta concentração a solução mostrou uma transição para um comportamento pseudoplástico, apresentando uma diminuição da viscosidade com o aumento do cisalhamento. Este comportamento deslocou-se para valores

cada vez menores de  $\gamma$  à medida que a concentração foi aumentada, conforme descrito por Milas *et al.* (1990). Devido a uma limitação de sensibilidade do aparelho não foi possível executar as medidas em velocidades de cisalhamento menores para todas as soluções poliméricas. O valor de 70 s<sup>-1</sup> foi escolhido, por conveniência experimental, como aquele que proporcionou a melhor estabilidade nas medidas de viscosidade para os valores de  $\dot{\gamma}$  e concentração de polímero utilizados e o efeito negligenciável de  $\dot{\gamma}$  sobre os valores de viscosidade (Figuras 43 e 44).

# 3.2. Influência do grau de substituição da galactomanana na interação entre os polissacarídeos

Escolhidas as condições experimentais, foram então realizadas medidas de viscosidade dos polissacarídeos isolados e de suas misturas, comparando-se o comportamento da solução de xantana com cada uma das soluções das galactomananas de *M. scabrella* e de *S. parahybae*, em água e 10 mM de NaCl, com diferentes concentrações de polissacarídeos (1 e 2 g/L). A viscosidade específica foi relacionada com a concentração relativa de cada polissacarídeo utilizado na mistura binária para um valor de  $\dot{\gamma} = 70 \text{ s}^{-1}$ .

Os valores de viscosidade específica das soluções de xantana são bastante superiores aos da galactomanana como mostra a Figura 40. A viscosidade específica esperada para a mistura, calculada a partir dos dados das soluções poliméricas isoladas, mostrou-se menor do que os misturas contendo diferentes proporções de valores experimentais para as xantana:galactomanana, indicando interação sinérgica entre os polissacarídeos, mesmo para a galactomanana em questão, altamente substituída (M/G = 1,1). Os resultados mostram a influência da conformação de xantana no aumento de viscosidade, o qual, supõem-se refletir a interação intermolecular. A xantana está em conformação desordenada em água, conforme determinado por polarimetria com a solução isolada mas ordenada em NaCl 10 mM, na temperatura experimental (20 °C).



Figura 40. Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas, préaquecidos a 80 °C, em uma concentração total de 1 g/L, em água e 10 mM de NaCl. Valores medidos a 70 s<sup>-1</sup> em 20 °C; galactomanana de *M. scabrella* em água e em sal ( $\blacksquare$ ); xantana em água ( $\blacktriangle$ ) em em sal ( $\Delta$ ); misturas xantana:galactomanana em água ( $\blacklozenge$ ) e em sal ( $\bigcirc$ ); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de interação (---)

Quando foi empregado NaCl 10 mM foi observado um pequeno efeito sinérgico (Figura 40), comparando-se com os resultados em água, apesar de, em ambos os casos, as soluções terem sido aquecidas acima da  $T_m$  da xantana. Estes resultados sugerem que, durante o resfriamento, a xantana retomou sua conformação helicoidal, em detrimento da interação com a galactomanana. Também pode ser observado que o valor máximo de viscosidade corresponde a uma proporção xantana:galactomanana (x:g) de 0,8:0,2 (g/L). O aumento relativo de viscosidade para este caso foi de aproximadamente 20%, comparando-se os valores experimentais e calculados.



Figura 41. Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas, préaquecidas a 80 °C, em concentração total de 2 g/L, em água. Valores medidos a 70 s<sup>-1</sup> em 20 °C; galactomanana de *M. scabrella* ( $\blacksquare$ ); xantana ( $\blacktriangle$ ); misturas xantana:galactomanana ( $\bullet$ ); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de interação (---)

Em uma concentração total de 2 g/L, em água (Figura 41), uma maior interação foi observada (aumento de viscosidade específica de  $\approx$  50%, comparando-se os valores experimentais e calculados) e o máximo de sinergia ocorreu em uma proporção x:g de 1,5:0,5 (g/L) ou 3:1. Estes resultados refletem uma interação entre os polissacarídeos inesperada considerando-se o alto conteúdo de galactose da galactomanana de *M. scabrella*.

McCleary (1979) propôs dois modelos esquemáticos para a interação entre galactomanana e xantana, envolvendo as manoses livres do primeiro. Um dos modelos envolvia a interação com as regiões não-substituídas da galactomanana e o outro não exigia necessariamente longos segmentos de galactomanana não-substituídas, mas sim regiões onde todas as unidades galactosil estivessem voltadas para um dos lados da cadeia principal, permitindo também o envolvimento da "face" não-substituída da galactomanana na zona de junção com a xantana. Este modelo foi concebido para explicar a interação significativa entre a

xantana e a galactomanana de guar (M/G = 1,6). Verifica-se porém, que mesmo uma galactomanana quase totalmente substituída como a utilizada neste trabalho (M/G = 1,1) também apresentou interação com a xantana.



Figura 42. Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas, préaquecidos a 80 °C, em uma concentração total de 1 g/L, em água e 10 mM de NaCl. Valores medidos a 70 s<sup>-1</sup> em 20 °C; galactomanana de *S. parahybae* em água e em sal ( $\blacksquare$ ); xantana em água ( $\blacktriangle$ ) em sal ( $\Delta$ ); misturas xantana:galactomanana em água ( $\bullet$ ) e em sal ( $\bigcirc$ ); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de interação (---)

A Figura 42 mostra a interação da xantana com a galactomanana de *S. parahybae* (M/G = 3), em uma concentração total de 1 g/L, em água e NaCl 10 mM. As soluções de polissacarídeos isolados foram pré-aquecidas a 80 °C antes da mistura e os valores de viscosidade foram registrados a 20 °C, com uma  $\dot{\gamma}$  de 70 s<sup>-1</sup>, de forma idêntica à da Figura 41.

Um forte aumento de viscosidade foi observado neste sistema, comparado com as misturas com galactomanana de *M. scabrella*. Estes resultados estão em concordância com a influência do grau de substituição da cadeia de manana, proposto previamente (Dea *et al.*, 1977; Morris *et al.*, 1977), no qual as galactomananas menos substituídas apresentam maior capacidade de interação com a xantana.

Um efeito máximo de sinergia foi observado em água quando a proporção de mistura x:g foi de 1:1, com um aumento relativo de cerca de 3,5 vezes nos valores de viscosidade específica experimentais, mas o efeito varia levemente em uma larga faixa de proporções (de 4:1 a 1:3). Resultados similares foram encontrados para uma concentração total de 2 g/L, em água. Por outro lado, uma drástica diminuição do efeito sinérgico foi observado na presença de sal externo (Figura 42), devido, provavelmente, à modificação conformacional da xantana na concentração salina utilizada.

## 3.3. Efeito da temperatura na interação dos polissacarídeos

A fim de obter informações sobre o papel da temperatura na interação da xantana e da galactomanana de *M. scabrella*, uma nova série de experimentos foi realizada pela mistura dos polissacarídeos na temperatura ambiente, em água (Figura 43), com a medida da viscosidade absoluta realizada a 20 °C, a 70 s<sup>-1</sup>.



Figura 43. Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas (preparadas a 25 °C), em uma concentração total de 2 g/L, em água. Valores medidos a 70 s<sup>-1</sup> em 20 °C; galactomanana de *M. scabrella* ( $\blacksquare$ ); xantana ( $\blacktriangle$ ); misturas xantana:galactomanana de *M. scabrella* ( $\blacksquare$ ); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de interação (---)

Quando a mistura dos polímeros foi preparada a 25 °C o sistema mostrou um menor efeito sinérgico quando comparado com as misturas preparadas a 80 °C, em água (Figura 41). Em ambas as condições as moléculas de xantana estão igualmente em uma conformação desordenada, segundo critérios de rotação óptica ( $T_m \approx 12$  °C, em água, Tabela 9). As diferenças observadas não podem ser explicadas com base na transição conformacional. A diminuição da viscosidade das soluções poliméricas com o aquecimento pode estar contribuindo para a sinergia quando a mistura é resfriada, em comparação com a mistura não aquecida.

A mistura contendo galactomanana de *S. parahybae*, em uma concentração total de 2 g/L, em água, preparada a 25 °C, apresenta um efeito sinérgico menor (Figura 44) em comparação com a mesma mistura previamente aquecida, porém, o aumento de viscosidade experimental é ainda significativamente elevado em comparação com o valor calculado, mostrando que a interação neste sistema apresenta uma menor dependência da temperatura. O maior aumento relativo de viscosidade específica na mistura a 80 °C e a 25 °C foi de cerca de 4 vezes o valor calculado, com valores absolutos maiores no segundo caso.



Figura 44. Viscosidade específica de soluções de polissacarídeos isolados e suas misturas (preparado a 25 °C), em uma concentração total de 2 g/L, em água. Valores medidos a 70 s<sup>-1</sup> a 20 °C; galactomanana de *S. parahybae* ( $\bullet$ ); xantana ( $\blacktriangle$ ); misturas xantana:galactomanana ( $\blacksquare$ ); valores calculados para as misturas assumindo a ausência de interação (---)

### 3.4. Tixotropia das misturas de polissacarídeos

A fim de demonstrar a formação de uma rede entre a xantana e a galactomanana de *M*. *scabrella*, o sistema foi submetido a experimentos reológicos com medida de viscosidade mediante diversos ciclos crescentes e decrescentes de velocidade de cisalhamento de  $10-100s^{-1}$ , em uma temperatura de 20 °C, com concentrações totais de 1 e 2 g/L, em água (Figura 45).



Figura 45. Viscosidade absoluta em função da velocidade de cisalhamento para a solução de xantana:galactomanana de *M. scabrella* (x:g 1:3), a 20 °C, em uma concentração total de 2 g/L, em água. Soluções pré-aquecidas a 80 °C: primeiro ciclo de cisalhamento ( $\bullet$ ); segundo ciclo após 120 min (O)

A presença de histerese não foi observada em 1 g/L, em nenhuma proporção x:g testada. Em 2 g/L, um substancial comportamento tixotrópico foi obtido em uma proporção x:g de1:3 para o primeiro ciclo de experimento reológico (Figura 45). Durante o segundo ciclo, após 120 min de repouso, a histerese é menos marcante, provavelmente devido à quebra de uma estrutura do tipo gel-fraco pelo cisalhamento durante a primeira etapa. Estes resultados comprovam a existência da interação intermolecular, uma vez que os polissacarídeos isolados, na mesma concentração, não apresentam tal comportamento nas condições testadas.

Comparando a dependência da viscosidade com o gradiente de cisalhamento no sistema de galactomanana de *S. parahybae*, um comportamento tixotrópico similar foi observado para todas as proporções testadas. A Figura 46 mostra um comportamento tixotrópico mais acentuado para a concentração total de 2 g/L em comparação com 1 g/L, em uma proporção x:g de 1:2.



Figura 46. Viscosidade absoluta em função da velocidade de cisalhamento para a solução de xantana:galactomanana de *S. parahybae* (x:g 1:2), a 20 °C, , em água. Amostra pré-aquecida a 80 °C: concentração total de 2 g/L(O); e 1 g/L ( $\bullet$ )

Este resultado sugere um aumento da interação quando as concentrações dos polímeros aumentam e está em concordância com o resultado anterior para a galactomanana de *M. scabrella* (Figura 40 e 41). O efeito do tempo de cisalhamento na viscosidade é particularmente importante na faixa de baixas velocidades de cisalhamento ( $\dot{\gamma} < 60 \text{ s}^{-1}$ ), onde os valores de viscosidade para um determinado valor de  $\dot{\gamma}$  são bastante diferentes nos ramos crescente e decrescente do ciclo.

Os resultados experimentais obtidos demonstram uma interação sinérgica entre xantana e ambas as galactomananas investigadas. Levando em consideração a distribuição das unidades galactosil ao longo da cadeia principal da galactomanana de *S. parahybae*, a qual apresenta

regiões não substituídas, a magnitude das interações estão em concordância com os modelos previamente descritos (Dea *et al.*, 1977; Morris *et al.*, 1977; Cairns *et al.*, 1986; Cheetham *et al.*, 1986). Porém, a interação com a galactomanana de *M. scabrella*, a qual é altamente substituída, não pode ser interpretada usando os modelos previamente descritos. O modelo de zonas de junção para a galactomanana de guar (moderadamente substituída, M/G = 1,6) proposta por McCleary (1979) seria, portanto, a explicação que mais se aproximaria da elucidação deste fenômeno, porém, a aplicabilidade do referido modelo para a galactomanana de *M. scabrella* (altamente substituída) não se adapta perfeitamente (Bresolin *et al.*, 1997).

### 4. Análise físico-química do sistema xantana (Rhône-Poulenc):galactomananas

Os estudos abordados até esta etapa do trabalho indicaram uma interação sinérgica da xantana com as galactomananas de *M. scabrella* e *S. parahybae*. Porém, estes resultados não forneceram informações sobre o mecanismo de tal interação. Com a finalidade de aprofundar o conhecimento deste fenômeno, relacionando-o com a conformação da xantana, foram realizados experimentos utilizando uma amostra de xantana nativa (Rhône-Poulenc), obtida a partir do meio de cultura, cujos valores de T<sub>m</sub> foram determinados em diferentes forças iônicas, conforme a Tabela 9.

Para estudar mais detalhadamente o mecanismo de interação xantana:galactomanana foi analisado especialmente o sistema com a galactomanana de *S. parahybae*, a qual apresentou um efeito sinérgico mais pronunciado na mistura com xantana (Bresolin *et al.*, 1997). Os resultados mais significativos foram então repetidos para a galactomanana de *M. scabrella*, no sentido de avaliar a influência da relação M/G.

### 4.1. Determinação da região de comportamento viscoelástico linear

Previamente a todas as análises realizadas em regime oscilatório (Carri-Med CS 50), foi efetuada a determinação da região de comportamento linear das amostras nos menores valores de freqüência de oscilação. A deformação (%) sofrida pelo material mediante valores crescentes de torque (força x deslocamento, N.m) foi medida (Figura 47).



Figura 47. Variação de G', G" em função do aumento de deformação, a 1 Hz, 25 °C, para o sistema xantana:galactomanana de *S. parahybae* 4:2 g/L, 10 mM NaCl

A região de deformação onde os valores de G' e G" permaneceram constantes, apesar do aumento da força correspondeu à região de comportamento linear. A partir destes resultados selecionou-se o valor de deformação de 7% para os experimentos de varredura em freqüência e temperatura. Esta análise foi realizada previamente a todos os ensaios realizados no Carri-Med, sempre que alguma condição foi alterada (concentração, freqüências de oscilação, temperatura ou força iônica).

# 4.2. Seleção da proporção xantana: galactomanana

Optou-se pela utilização de uma concentração fixa de xantana (4 g/L) e a adição de concentrações crescentes de galactomanana de S. parahybae (conforme item 1.8.1b de

materiais e métodos), a fim de avaliar a influência da galactomanana nas propriedades do gel formado com a xantana. O perfil dos géis formados pelas misturas x:g com a xantana em uma concentração de 2 g/L foi semelhante aos das misturas onde utilizou-se o dobro da concentração, porém, os valores de G' e G" foram relativamente baixos. A proporção que resultou em uma taxa mais elevada de G'/G" foi a de 4:2 g/L (xantana: galactomanana) e esta proporção permitiu a melhor visualização do fenômeno de geleificação. Concentrações maiores de galactomanana aumentam o caráter líquido da mistura e "mascaram" a visualização da temperatura na qual ocorre um aumento brusco de G' devido à formação do gel.

### 4.3. Influência da temperatura

Com a finalidade de observar a temperatura na qual ocorre a geleificação  $(T_g)$  do sistema a mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* 4:2 g/L, em presença de 5 mM NaCl, foi aquecida rapidamente (2 min) no próprio equipamento e após permanecer 1 min a 80 °C foi resfriada até 10 °C com uma velocidade de 1 °C/min, com uma freqüência de oscilação de 1 Hz e uma taxa de deformação de 7 % (Figura 48).



Figura 48. Variação do módulo elástico (G)' e módulo viscoso (G''), durante resfriamento a 1°C/min, para a mistura de xantana:galactomanana de *S. parahybae* (4:2 g/L) em 5 mM de NaCl, 1 Hz, 7% deformação

Este sistema apresentou uma curva típica com um aumento inicial de G' a aproximadamente 45 °C, durante o resfriamento, atribuído à transição conformacional desordem-ordem da xantana, cujo valor de  $T_m$  quando isolada foi de aproximadamente 43 °C (conforme Tabela 9). Morris *et al.* (1977) observaram que a xantana sofre uma queda brusca na viscosidade relativa durante o aquecimento, atribuindo este fato à quebra da hélice. Goycoolea *et al.* (1995) também encontraram um pequeno aumento de G' acompanhando a transição conformacional da xantana através de DSC.

Pode-se observar um segundo aumento de G', muito pronunciado a aproximadamente 25°C, o qual corresponde à temperatura de formação do gel (Tg), com o G' cerca de 6 vezes maior do que o G". Há uma grande diferença na temperatura de formação do gel encontrada em comparação com os resultados descritos na literatura (Dea et al., 1977; Williams et al., 1991a; Zhan et al., 1993; Goycoolea et al., 1995). Zhan et al. (1993) encontraram valores de T<sub>g</sub> de aproximadamente 50 °C, para a mistura xantana:goma de alfarrobo 2,5:2,5 g/L, através do método de queda de bola. Williams et al. (1991a) observaram um aumento de G' para o sistema xantana:glucomanana, a 12g/L, durante resfriamento, porém, em temperatura mais elevada, de cerca de 60 °C. A mesma temperatura de formação de gel (≈ 60 °C) para o sistema xantana desacetilada: glucomanana 1:1 g/L, em concentrações totais de 1-4 g/L, em 10 mM de KCl, foi observada por Goycoolea et al. (1995), através de experimentos reológicos e de DSC. Estes autores observaram que o processo de geleificação também iniciou a cerca de 60 °C para o sistema xantana desacetilada:goma de alfarrobo, na mesma força iônica, nas proporções de 1:0,3, 1:1 e 1:6 g/L. A interação encontrada em nosso trabalho parece ser menos estável, porém, mais cooperativa de que as observadas a 60 °C. Usualmente as modificações nas propriedades reológicas induzidas pelas interações que ocorrem a 25 °C são mascaradas pelas interações estabilizadas a 60 °C e pela presença de excesso de galactomanana. Como exemplo, Goycoolea et al. (1995) observaram uma exoterma a 25 °C, para o sistema xantana desacetilada:goma de alfarrobo (1:0,3 g/L, 10 mM KCl), contudo, os autores relacionaram este fato à transição desordem-ordem de cadeias excedentes de xantana que não haviam interagido com a galactomanana, a despeito de um aumento perceptível de G' nesta temperatura (25 °C), o qual pode ser observado durante o resfriamento desta solução no experimento reológico. Em nosso trabalho, como as misturas foram preparadas a temperatura ambiente (< 30 °C), as

interações que ocorrem a 60 °C não podem ser estabilizadas e a solução permanece fluida, permitindo a formação de interações a 25 °C.

Este experimento foi repetido para a xantana (4 g/L) e para a galactomanana (2 g/L) isoladamente, nas mesmas condições utilizadas para a mistura. Não foi observada formação de gel para os polissacarídeos isolados, a xantana apresenta somente um aumento discreto de G' que se inicia em aproximadamente 45 °C (Figura 49). A galactomanana isoladamente produz uma solução viscosa cujos valores de G' são extremamente baixos, ainda menores do que para a xantana isolada.



Figura 49. Variação do módulo elástico (G)' e módulo viscoso (G'') durante resfriamento a 1°C/min para a xantana 4g/L, em 5 mM de NaCl, 1 Hz, 7% deformação

A comparação do reograma da mistura com aquele dos polissacarídeos isolados, mostra a magnitude da interação sinérgica entre os polissacarídeos.

A galactomanana de *M. scabrella* em mistura com a xantana apresentou um perfil reológico levemente distinto (Figura 50). O aumento de G' relativo à geleificação do sistema, ocorreu em uma temperatura inferior ( $\approx 20$  °C) ao observado para a mistura com a galactomanana de *S. parahybae*.



Figura 50. Variação do módulo elástico (G)' e módulo viscoso (G"), durante resfriamento a 1°C/min G' para a mistura de xantana:galactomanana de *M. scabrella* (4:2 g/L) em 5 mM de NaCl, 1 Hz, 7% deformação

# 4.4. Influência da força iônica

Através da modificação na força iônica do meio, foi modificada a temperatura de transição conformacional da xantana (Tabela 9). A influência desta variável em relação ao comportamento reológico da mistura foi avaliada, para uma mesma proporção xantana:galactomanana de *S. parahybae* (4:2 g/L), em diferentes concentrações de NaCl (Figura 51). Conhecendo a temperatura de formação de gel, promoveu-se o aquecimento das diferentes misturas a 80 °C, seguido de seu resfriamento nas mesmas condições do experimento anterior.



Figura 51. Influência da temperatura sobre G' para as misturas de xantana:galactomanana de *S. parahybae* (4:2 g/L), em diferentes concentrações de NaCl, aquecidas a 80°C seguido por resfriamento a 1 °C/min, a 1 Hz, 7 % de deformação

A temperatura de formação das zonas de junção entre os dois polímeros ( $T_g$ ) é independente da força iônica do meio, em aproximadamente 25 °C. Estes resultados estão em concordância com publicações anteriores (Zhan *et al.*, 1993) a respeito da independência da  $T_g$  com relação à força iônica. Zhan *et al.* (1993) observaram que os valores de  $T_g$  para a mistura xantana:goma de alfarrobo 2,5:2,5 g/L não variou na faixa de 0-40 mM de NaCl.

A interpretação a respeito da conformação da xantana no momento da interação com a galactomanana é discutida por muitos autores. Neste experimento a temperatura de 80 °C é superior à temperatura de transição conformacional para todas as condições de força iônica utilizadas, com exceção a de 100 mM de NaCl. No entanto verificou-se a geleificação em todos os casos, porém, houve um decréscimo do módulo dinâmico (G') da mistura com o aumento da força iônica. Tako *et al.* (1984) observaram efeito semelhante na adição de NaCl e MgCl na mistura xantana:galactomanana de alfarrobo (0,7:1,3 g/L). Estes autores atribuíram a dissociação dos polímeros à repulsão das cadeias laterais da xantana, devido à presença de Na<sup>+</sup> e Mg<sup>++</sup>.

Por outro lado houve um aumento na viscoelasticidade dinâmica da xantana isolada
pela adição de sal, conforme Tabela 10. Anable *et al.* (1994) demonstraram que o G' da xantana aumenta na presença de sal em relação à solução em água sem adição de eletrólitos. Este efeito também foi observado por Tako *et al.* (1984) e deve-se ao aumento da resposta elástica na estrutura ordenada. A estabilidade da conformação ordenada é diretamente dependente da força iônica, entre outros fatores, conduzindo a uma maior rigidez da molécula e ao aumento da viscosidade ao comparar-se polissacarídeos estereorregulares, como a escleroglucana, com polímeros sintéticos (Rinaudo e Milas, 1987).

Tabela 10. Valores de G' e G" para a xantana a 4 g/L em diferentes concentrações de NaCl

força iônica	G' (Pa) a 10 °C	G" (Pa) a 10 °C
água pura	3,2	1,9
5 mM NaCl	3,8	1,7
10 mM NaCl	4,5	1,8

Lopes *et al.* (1992) atribuem a maior sinergia da interação entre xantana e guar em água em relação à mistura em 10 mM de NaCl ao efeito de blindagem do polieletrólito em presença de sal, manutenção de sua conformação ordenada e conseqüentemente menor interação. Estes autores trabalharam em baixas temperaturas (10-30 °C), nas quais a  $T_m$  da xantana em 10 mM de NaCl não foi alcançada. Conforme observado por Cairns *et al.* (1986) soluções misturadas em condições nas quais a hélice de xantana estava presente (como baixa temperatura e/ou alta concentração de sal) permaneceram fluidas mas resultaram em géis coesivos após o aquecimento para uma temperatura na qual a xantana foi convertida em uma estrutura desordenada seguido de resfriamento.

A fim de avaliar a interação com as diferentes conformações da xantana, em presença de moléculas sob conformação ordenada e desordenada promoveu-se o aquecimento das misturas, com novas soluções que não sofreram nenhum tratamento térmico, até a temperatura de 35 °C, superior à T<sub>g</sub> ( $\approx$ 25 °C). Esta temperatura é superior à T<sub>m</sub> da xantana em água e 2 mM NaCl (T<sub>m</sub>  $\approx$  12 e 17,5 °C, respectivamente), e inferior à T<sub>m</sub> da xantana nas demais concentrações salinas. Nesta temperatura (35 °C), as cadeias de xantana estão desordenadas em água e 2 mM NaCl mas ordenadas, pelo menos parcialmente, para as concentrações maiores de sal.



Figura 52. Influência da temperatura sobre G' para a mistura de xantana:galactomanana de *S. parahybae* (4:2 g/L), em diferentes concentrações de NaCl, aquecidas a 35 °C seguido por resfriamento com 1 °C/min, a 1 Hz, 7 % de deformação

Conforme mostra a Figura 52, a interação ocorre em todos os casos. Os valores de G' foram 10, 5,5, 3, 2,5 e 2,5 vezes maiores do que G" para as misturas em água pura, 2, 5, 10 e 100 mM de NaCl,. Respectivamente, a 10 °C (Tabela 11).

Tabela 11. Módulo de elasticidade para a mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* (4:2 g/L), em diferentes forças iônicas

	100	10	5	2	água
G' a 10 °C após aquecer a 35 °C	16,5	23,8	34,1	55,4	127,8
G' a 10 °C após aquecer a 80 °C	20,3	32,6	48	67	153,9

Força iônica (mM NaCl)

Não houve a formação de gel firme em todas as condições, somente nos casos onde foi alcançada a  $T_m$  da xantana. Observou-se novamente um aumento da força do gel com a diminuição da força iônica. Em água pura e 2 mM NaCl a interação parece ocorrer com as cadeias desordenadas da xantana uma vez que a  $T_m$  é menor do que a  $T_g$ . Para as demais

concentrações de sal a xantana apresenta principalmente a conformação ordenada a 35 °C, porém, a interação ocorreu mesmo nestes casos. Estes resultados sugerem uma maior interação com a conformação desordenada da xantana e provavelmente com os segmentos desordenados de xantana que existem mesmo quando a T<sub>m</sub> da xantana não foi alcançada. Estes resultados estão em concordância com a literatura. Zhan et al. (1993) observaram uma formação de gel independente da concentração de sal (10, 20 e 40 mM de NaCl) para a mistura xantana: goma de alfarrobo 2,5:2,5 (g/L). Entretanto, estes autores submeteram as soluções a aquecimento a 85 °C com posterior resfriamento. Este procedimento pode ter facilitado a interação com as cadeias desordenadas da xantana, geradas pelo aquecimento acima da T<sub>m</sub>. Eles mostraram que a força do gel tornou-se significativamente maior com o aumento da temperatura de preparo da mistura, sugerindo que a natureza dos géis é determinada pelo nível de desordem induzido nas moléculas de xantana antes da mistura. Cheetham e Mashimba (1988) observaram que, enquanto uma amostra de xantana parcialmente dialisada (mais ordenada) não formou gel com a goma de alfarrobo em temperatura ambiente, uma amostra completamente dialisada (menos ordenada) geleificou. Estes autores concluíram que foi necessário que a xantana estivesse pelo menos parcialmente na conformação desordenada a fim de associar-se com a galactomanana.

# 4.5. Análise calorimétrica

A técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi utilizada para caracterizar as mudanças de estado (geleificação e fusão do gel) nos sistemas xantana:galactomananas, preparados conforme item 1.8.1b (materiais e métodos). A Figura 53 mostra um exemplo de termograma, com o fluxo de calor em função da temperatura, obtido para a mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* 4:2 (g/L), em presença de NaCl (10 mM). Além da xantana (4 g/L) e da galactomanana (2 g/L) isolados, na mesma força iônica. A análise foi realizada aquecendo-se a mistura a 80 °C e o gráfico registra o resfriamento.



Figura 53. Termograma de 1- galactomanana de *S. parahybae* (2 g/L); 2- xantana (4 g/L) e 3-mistura x:g 4:2 (g/L), em 10 mM de NaCl, durante resfriamento a 0,2 °C/min

A galactomanana não apresentou contribuição no experimento de DSC, por ser um polímero neutro, que não sofre uma acentuada transição conformacional mediante aquecimento ou resfriamento. A xantana isolada (curva 2) mostrou um pico exotérmico a cerca de 50 °C, o qual corresponde à temperatura de transição conformacional desordem-ordem, com uma mudança de entalpia ( $\Delta$ H) de 10 J. g<sup>-1</sup> de xantana (pico A).

A mesma transformação (pico A) foi observada para a mistura xantana:galactomanana 4:2 (g/L), com  $\Delta$ H de 9,2 J.g<sup>-1</sup> de xantana, indicando a transição conformacional da xantana na mistura, a despeito da interação com a galactomanana. Contudo, observou-se um segundo pico exotérmico (pico B, com 2,0 J.g<sup>-1</sup> de xantana), em temperatura mais baixa, correspondendo à formação do gel (T<sub>g</sub>), a aproximadamente 25 °C. O pico B apareceu na mesma temperatura na qual foi observado um aumento brusco no módulo de elasticidade nos experimentos reológicos. Observa-se que, em ambos os efeitos térmicos (pico A e B) ocorre um processo semelhante, ou seja, se no pico A está ocorrendo um ordenamento das moléculas de xantana,

provavelmente no pico B uma transformação de mesma natureza esteja ocorrendo, com menor intensidade.

A temperatura de transição conformacional da xantana praticamente não sofreu alteração significativa em presença da galactomanana, ao contrário dos resultados publicados por Dea *et al.* (1977). Estes autores observaram, por experimentos de rotação óptica, que a presença de galactomanana (goma tara, M/G = 3,5 g/L) aumentou a T<sub>m</sub> da xantana (5 g/L) em aproximadamente 10 °C. Uma possível explicação destes autores seria a presença de sal ou outras espécies iônicas na galactomanana utilizada. A galactomanana de *S. parahybae*, extraída a partir do endosperma isolado, apresenta um alto grau de pureza, com teores de proteína em torno de 1,5 %. Além disso não foi utilizado sal em sua extração e purificação.

No caso da mistura de xantana com a galactomanana de *M. scabrella*, x:g 4:2 (Figura 54), o termograma confirmou o valor para a  $T_g$  desta mistura ( $\approx 20$  °C), observado no reograma (Figura 50) abaixo daquele observado para a galactomanana de *S. parahybae*. Foi observado também um aumento na  $T_m$  da xantana (45 °C), de cerca de 2 °C na mistura com a galactomanana de *M. scabrella*, em relação à xantana isolada.



Figura 54. Termograma da mistura xantana:galactomanana de *M. scabrella* (4:2 g/L), em 5mM de NaCl, durante resfriamento a 0,2 °C/min

O aumento da  $T_m$  da xantana em presença desta galactomanana, contrariamente ao efeito da galactomanana de *S. parahybae*, deve-se provavelmente ao fato da primeira

apresentar um maior conteúdo protéico (~4 % m/v) com aumento da força iônica total do meio e conseqüente estabilização da hélice da xantana.

Para observar a influência da concentração de galactomanana de *M. scabrella* na  $T_m$  da xantana foram realizados experimentos com as proporções xantana:galactomanana 4:4 e 4:6 (g/L), conforme Figuras 55 (a e b), respectivamente.



Figura 55. Termograma da mistura xantana:galactomanana de *M. scabrella*, em 5 mM de NaCl, durante resfriamento a 0,2 °C/min: (a) x:g 4:4 g/L; (b) x:g 4:6 g/L

Observou-se o aumento na  $T_m$  da xantana, a qual passou de 45 °C (x:g 4:2 g/L) para 52 °C (x:g 4:4 g/L) e para 55 °C (x:g 4:6 g/L), porém, a temperatura de geleificação permaneceu inalterada ( $\approx 21$  °C), confirmando a influência da entidade iônica na conformação da xantana. A galactomanana de *S. parahybae* não apresentou tal efeito, em concentrações similares, com os valores de  $T_m$  da xantana praticamente inalteráveis mediante o aumento de concentração de galactomanana. Com relação à entalpia dos processos, observou-se aumento durante a  $T_m$  e diminuição durante a  $T_g$ , à medida que foi aumentada a concentração de galactomanana.

#### 4.6. Influência da concentração iônica na análise calorimétrica

As análises calorimétricas foram realizadas em presença de concentrações crescentes de NaCl para a mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* 4:2 (g/L), com o intuito de comparar os resultados de DSC com os dados reológicos. A Figura 56 mostra a independência

da temperatura de formação do gel ( $T_g = 25$  °C) com relação à concentração de sal.



Figura 56. DSC da mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* 4:2 g/L, em água, 5 e 10 mM de NaCl. Aquecimento a 0,2 °C/min

Estes resultados estão em concordância com as Figuras 51 e 52. Ao aumento da força iônica está associado o deslocamento da  $T_m$  da xantana para temperaturas mais elevadas, devido ao efeito de blindagem das cargas do polieletrólito e a diminuição das mudanças de entalpia durante a fusão do gel ( $\approx 25$  °C), à medida que as misturas são aquecidas. Durante o resfriamento o perfil das misturas é similar, porém, nos termogramas anteriores (Figura s 53-55) aparecem picos exotérmicos ao invés de endotérmicos, praticamente nas mesmas temperaturas, já que o processo neste caso é o de formação, e não fusão do gel, com liberação de energia.

Em água pura as interações ocorrem com as cadeias desordenadas da xantana uma vez que a  $T_m$  (12 °C) é menor do que a  $T_g$  (25 °C). Em presença de 5 mM de NaCl, a  $T_m$  ( $\approx$ 40

°C) é maior do que a  $T_g$ , mesmo assim um pico endotérmico, de fusão do gel, a 25 °C é observado. Em 10 mM de NaCl a diferença entre  $T_g$  e  $T_m$  é maior e a entalpia de fusão do gel é menor do que em 5 mM de NaCl. Estes resultados podem sugerir que, nestas duas últimas condições a interação com a galactomanana ocorreu com os segmentos desordenados de xantana, os quais devem estar presentes em menores proporções em 10 mM do que em 5 mM de NaCl.

Os valores de mudança de entalpia para a mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* 4:2 (g/L) em diferentes forças iônicas são apresentados na Tabela 12. Os valores de  $\Delta H$  para a T<sub>m</sub> da xantana isolada a 4 g/L são similares aos da T<sub>m</sub> na mistura com a galactomanana.

Tabela 12.  $\Delta$ H para a mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* 4:2 (g/L) em diferentes forças iônicas

	Pico A $(T_m)$	Pico B (T <sub>g</sub> )
água		24
5 mM NaCl	15,3	7,6
10 mM NaCl	13,9	2,6

Valores de entalpia em J.g<sup>-1</sup> de xantana, durante aquecimento a 0,2 °C/min

Os valores de entalpia dos picos A e B (Tabela 12) sugerem que as interações que ocorrem em B (água), durante a fusão das zonas de junção mistas, são mais fortes do que as interações xantana:xantana na  $T_m$  (pico A).

## 4.7. Efeito de ciclos de temperatura na interação dos polissacarídeos

Foram realizados ciclos de temperatura, monitorados por calorimetria e medidas reológicas de baixa oscilação com a finalidade de compreender o mecanismo de formação de gel entre a xantana e a galactomanana de *S. parahybae*. A Figura 57-(curva a) mostra que existe uma interação mesmo sem o aquecimento a temperaturas acima da  $T_m$  da xantana (Figura 57, curva b).



Figura 57. DSC da mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* 4:2 g/L, em 10 mM de NaCl. Resfriamento a 0,2 °C/min

Foi realizado o aquecimento de 10-35 °C, temperatura situada entre os picos A e B (Figura 48), ou seja, acima da temperatura de fusão do gel e abaixo da temperatura de transição conformacional da xantana, com o subsequente resfriamento, por duas vezes. Em seguida, a mistura foi aquecida até 80 °C, a fim de ultrapassar a temperatura de transição conformacional da xantana, seguido pelo resfriamento até 10 °C. O comportamento da mistura mediante novo aquecimento a 35 °C foi novamente analisado após ter alcançado a  $T_m$  da xantana. Os valores de G' referem-se a temperatura de 10 °C e o  $\Delta$ H corresponde a mudança de entalpia durante a  $T_g$  (25 °C) (Tabela 13).

Tabela 13. Medidas de G' e determinações calorimétricas ( $\Delta$ H) para as misturas de xantana (x); galactomanana (g) de *S. parahybae* em 10 mM de NaCl (T<sub>m</sub>  $\approx$  50 °C) e 5 mM de NaCl (T<sub>m</sub>  $\approx$ 43 °C)

		10 mM NaCl			5 mM NaCl		
ciclos	x (4 g/L)	x:g (4:2 g/L)	x:g (4:2 g/L)	x:g (4:2 g/L)	x:g (4:2 g/L)		
	G' (Pa) <sup>a</sup>	G' (Pa) <sup>a</sup>	$\Delta H (J.g^{-1})^{b}$	G' (Pa) <sup>a</sup>	$\Delta H (J.g^{-1})^{b}$		
1°) 35-10 °C	5,0	25	0,5	37	15,5		
2°) 35-10 °C	5,1	24,5	0,3	35	13,5		
3°) 80-10 °C	4,9	54	1,9	56,4	47,4		
4°) 35-10 °C	5,2	36	0,75	48	33,2		
5°) 35-10 °C	4,9	34,5	0,4	45	28,2		

<sup>a</sup> Medidas reológicas a 10 °C, 1 Hz, 7 % deformação, durante resfriamento a 3 °C/min; <sup>b</sup> DSC, 25 °C ( $T_g$ , pico B), durante resfriamento a 0,2 °C/min, valores de  $\Delta H$  em J.g<sup>-1</sup> de xantana

O aquecimento da mistura a temperatura abaixo da  $T_m$  da xantana porém acima da temperatura de fusão do gel ( $T_g$ ), conforme ciclos 1 e 2, não promoveu aumento na interação entre os polissacarídeos. Alguns autores (Mannion *et al.*, 1992) observaram aumento na força do gel após o aquecimento de misturas de xantana e galactomanana de alfarrobo a 60 °C, temperatura inferior à  $T_m$  da xantana isolada ( $\approx$ 80°C), seguido pelo resfriamento, em relação à mistura em temperatura ambiente. Estes autores argumentaram que uma mistura mais completa dos polissacarídeos além do conseqüente fornecimento de energia com o aquecimento foram os fatores que facilitaram as interações cuja ocorrência não tenha sido possível na temperatura ambiente. Entretanto a literatura (Goycoolea *et al.*, 1995) mostrou interações entre xantana e galactomanana de alfarrobo, cuja temperatura de formação/fusão do gel ocorre a 60 °C. Provavelmente o aquecimento a 60 °C, seguido pelo resfriamento da mistura abaixo desta temperatura implicou na formação de zonas de junção entre os polissacarídeos, mesmo que a xantana não tenha sofrido completa desnaturação, como ocorre em nosso trabalho (ciclo 1), onde a mistura foi realizada a 25 °C, aquecida a 35 °C e resfriada a 10 °C, levando ao aparecimento da interação (Figura 57, curva a).

Quando a mistura foi aquecida acima da T<sub>m</sub> (ciclo 3), a interação aumentou, uma vez que ocorreu um aumento do conteúdo de segmentos desordenados de xantana, ou ainda a completa fusão das hélices da xantana, permitindo uma interação mais efetiva com a galactomanana, estruturalmente semelhante, conforme resultados apresentados por diversos autores (Cairns *et al.*, 1986; Browsey *et al.*, 1988; Cheetham *et al.*, 1986; 1987; Zhan *et al.*, 1993; Lundin e Hermansson, 1994) para a xantana e outras galactomananas. Chandresakaran e Radha (1997) analisaram a interação de xantana e goma guar por difração de raios-X, após promover o aquecimento da mistura a 95 °C. Estes autores argumentaram que o aquecimento da mistura favoreceu a fusão da estrutura inicial dos componentes e facilitou a formação de uma nova estrutura para o complexo durante o resfriamento. Porém, estes autores não realizaram experimentos com a mistura sem tratamento térmico, tomando como base a experiência de Cairns *et al.* (1986), os quais não observaram a formação de gel ou mudança nos padrões de raios-X em misturas não aquecidas.

Novos aquecimentos a 35 °C (ciclos 4 e 5) mostraram um decréscimo em  $\Delta$ H e G' em relação aos valores prévios (ciclo 3), porém, maiores do que os valores iniciais, mostrando que parte das interações formadas no ciclo anterior persistiram. A temperatura de 35 °C está situada entre T<sub>g</sub> e T<sub>m</sub> para esta mistura e aparentemente as interações que ocorreram a 25 °C foram eliminadas e os segmentos desordenados de xantana foram liberados. Porém, como 35 °C é uma temperatura menor do que a T<sub>m</sub>, estes segmentos progressivamente ordenam-se e o subsequente resfriamento abaixo da T<sub>g</sub> mostrou um decréscimo das interações entre xantana e galactomanana, devido à diminuição das regiões desordenadas da xantana.

### 4.8. Análises quirópticas

Com a finalidade de monitorar as mudanças conformacionais das moléculas durante a interação foram utilizadas análises de rotação óptica e dicroísmo circular.

# 4.8.1. Rotação óptica

A Figura 58 apresenta a rotação óptica em função da temperatura para a galactomanana de *S. parahybae*, a xantana e a mistura dos polissacarídeos. A rotação óptica da galactomanana não apresentou dependência da temperatura, conforme mostra a Figura 58. Este comportamento, consistente com a conformação de emaranhado ao acaso ("random coil")

foi evidenciado por Dea *et al.* (1977) para as gomas tara e guar. O aquecimento da xantana (Figura 58) apresentou uma curva sigmoidal típica, com aumento na rotação óptica, a qual apresentou valores mais positivos com o aumento da temperatura, representando a transição conformacional ordem-desordem da molécula (Milas e Rinaudo, 1986).

A xantana apresenta-se sob conformação desordenada em temperaturas elevadas (maiores que a  $T_m$ ) e ordenada em baixas temperaturas (menores que a  $T_m$ ). Nesta condição de força iônica, 10 mM de NaCl, a  $T_m$  encontrada foi de aproximadamente 48 °C.



Figura 58. Rotação óptica a 365 nm, 1 dm de caminho óptico, das soluções de galactomanana de *S. parahybae* 0,5 g/L; xantana 1 g/L e sua mistura (1:0,5 g/L), em 10 mM de NaCl

A mistura xantana: galactomanana (Figura 58) demonstrou a presença de dois eventos, o aumento da rotação óptica acima da  $T_m$ , de uma forma muito semelhante ao da xantana isolada, e um valor mínimo de rotação óptica em aproximadamente 25 °C, ausente em ambos os polissacarídeos isolados. Abaixo desta temperatura que coincide com a  $T_g$  encontrada nas análises reológicas e calorimétricas, os valores de rotação óptica não apresentam reprodutibilidade, provavelmente devido aos efeitos de tensão no gel (Dea *et al.*, 1977; Cheetham e Mashimba, 1991). Esta limitação impediu a análise em sistemas mais concentrados nos quais ocorreu a formação de gel.

Observou-se a ocorrência da diminuição na rotação óptica a 25 °C mesmo em sistemas onde a galactomanana estava presente em pequena quantidade (10 % da concentração

total), como na mistura xantana:galactomanana 0,9:0,1 g/L, em 5 mM de NaCl, conforme a Figura (59). Porém em maiores forças iônicas (100 mM de NaCl) este evento foi eliminado (dados não mostrados). Estes resultados sugerem a ocorrência de uma transição conformacional suplementar para as moléculas de xantana a 25 °C, provavelmente para uma estrutura mais ordenada, ou ordenada de uma forma distinta do que a que ocorre com a xantana isolada, uma vez que os valores de rotação óptica tornaram-se mais negativos.



Figura 59. Rotação óptica a 365 nm, 1 dm de caminho óptico, da mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae* 0,9: 0,1 g/L, em 5 mM de NaCl

#### 4.8.2. Dicroísmo circular (CD)

Com a finalidade de avaliar mais profundamente o comportamento da xantana, em sua mistura com a galactomanana foram desenvolvidas análises em dicroísmo circular uma vez que esta técnica permite revelar as mudanças conformacionais da xantana. Enquanto as transições observadas através da rotação óptica são associadas à mudanças de conformação da cadeia principal do polissacarídeo, as mudanças nas bandas de CD referem-se à mobilidade da unidade manosil interna da cadeia lateral da xantana, a qual contém o grupamento *O*-acetila (Morris *et al.*, 1977).

Como controle da conformação da xantana foram analisados os seguintes espectros em

CD para uma solução a 1 g/L de xantana em 10 mM de NaCl ( $T_m \approx 50$  °C, Tabela 9), a 15 °C obtendo-se o espectro que representa a conformação ordenada, e a 60 °C para obter o espectro da conformação desordenada, conforme Figura 60.



Figura 60. Espectro de dicroísmo circular da solução de xantana 1 g/L em 10 mM de NaCl a 15 °C (---) (estrutura ordenada, com  $\lambda$  máx. = 210 nm e  $\lambda$  mín. = 225 nm); a 60 °C (----) (estrutura desordenada, com  $\lambda$  máx. = 205 nm e  $\lambda$  mín. = 218 nm)

A conformação ordenada da xantana apresentou um pico com um valor de elipticidade máxima em 210 nm e um mínimo em 225 nm. A conformação desordenada apresentou uma elipticidade máxima em 205 nm e mínima em 218 nm. Houve portanto, para a conformação desordenada, um deslocamento da curva para comprimentos de onda menores, com uma diminuição na área do pico e um aumento na área da depressão, em relação à curva da conformação ordenada, em concordância com os resultados da literatura (Morris *et al.*, 1975; 1977; Milas e Rinaudo, 1979).

A galactomanana de *S. parahybae* não apresentou contribuição no espectro de CD (Figura 61), coerente com a ausência de grupamentos cromóforos no polímero.



Figura 61. Espectro de dicroísmo circular de solução de galactomanana de *S. parahybae* a 1 g/L, em água, a 20 °C

A Figura 62(a) mostra o espectro da xantana isolada, em água a 20 °C, típico para a conformação desordenada, compatível com a sua temperatura de transição conformacional, em torno de 17,5 °C (Tabela 9), mostrando que as moléculas estão desordenadas acima da  $T_m$ . Quando a xantana foi misturada com igual quantidade de galactomanana (1:1 g/L), sua conformação tornou-se ordenada, na mesma temperatura em que apresentou-se desordenada quando isolada, como mostra a Figura 62 (curva b).



Figura 62. Espectro de dicroísmo circular: (a---) solução de xantana 1 g/L em água a 20 °C (estrutura desordenada, com  $\lambda$  máx. = 205 nm e  $\lambda$  mín. = 218 nm); (b —) mistura xantana:galactomanana de *S. parahybae*1:1 g/L a 20 °C (estrutura ordenada, com  $\lambda$  máx. = 210 nm e  $\lambda$  mín. = 226 nm);

A fim de confirmar esta hipótese a mistura xantana:galactomanana 1:1 g/L foi analisada através de CD em temperaturas abaixo e acima da temperatura de geleificação, ou seja a 20 e a 30°C. A xantana isolada apresenta-se sob a conformação desordenada em ambas as situações, uma vez que estas temperaturas são maiores do que  $T_m$ . Porém, em presença da galactomanana, a xantana apresenta-se sob a forma ordenada a 20 °C (abaixo da  $T_g$ ) e desordenada a 30 °C (acima da  $T_g$ ), conforme Figura 63a. Estes resultados mostram que a transição conformacional da xantana a 25 °C, formando um complexo como mostrado pelo aumento de G' (Figura 48), foi induzida pela galactomanana e que a mesma torna-se ordenada após a formação do gel, abaixo de 25 °C (Figura 63b).





Figura 63b

Figura 63a. Termograma da mistura xantana:galactomanana de S. parahybae 4:4 g/L, em água, durante aquecimento a 0,2 °C/min;

Figura 63b. Espectro de dicroísmo circular da mistura xantana:galactomanana de S. parahybae1:1 g/L, em água: (---) a 20 °C (estrutura ordenada, com  $\lambda$  máx. = 210 nm e  $\lambda$  mín. = 225 nm); (----) a 30 °C (estrutura desordenada, com  $\lambda$  máx. = 207 nm e  $\lambda$  mín. = 220 nm)

Estes resultados confirmam que, em presença de sal (Figuras 51 e 52), quando a  $T_g < T_m$ , as interações observadas a 25 °C correspondem à interações entre a galactomanana e segmentos desordenados da xantana, que estejam presentes mesmo em temperaturas abaixo da  $T_m$  da xantana.

Com relação à galactomanana de M. scabrella, a modificação conformacional da

xantana pode ser observada também após a interação com este polímero, porém é menos evidente do que com a galactomanana de *S. parahybae*, conforme mostra a Figura 64.



Figura 64. Espectro de dicroísmo circular: (a) mistura xantana:galactomanana de *M. scabrella* 1:1 g/L a 20 °C (estrutura ordenada, com  $\lambda$  máx. = 211 nm e  $\lambda$  mín. = 226 nm); (b) solução de xantana 1 g/L em água a 20 °C (estrutura desordenada, com  $\lambda$  máx. = 205 nm e  $\lambda$  mín. = 218 nm)

# 4.9. Comportamento da interação em função do pH

A xantana, sob a forma ácida foi neutralizada com KOH na ausência e na presença de galactomanana de *S. parahybae*. A Figura 65, representa a curva típica de neutralização de ácido fraco para a xantana isolada.

Foram necessários 1,05 mL de KOH 0,4 M para a completa neutralização das moléculas de xantana, as quais encontram-se completamente dissociadas ( $\alpha = 1$ ). Volumes de base superiores a este representam um excesso, responsável pelo aumento da condutância a partir da completa dissociação, no ramo ascendente da curva.



Figura 65. Curva de neutralização da (H<sup>+</sup>)xantana a 1 g/L, 15 °C, com KOH 0,4 M

A xantana, sob a forma ácida e na ausência de sal externo, encontra-se ordenada pelo efeito de blindagem das cargas negativas e ausência de repulsão intramolecular. Durante a sua neutralização é conhecido que a mesma sofre uma transição conformacional, pH dependente, a partir da forma ácida (ordenada) para uma forma neutra (desordenada) (Milas e Rinaudo, 1981).

Esta modificação conformacional foi utilizada para estudar o comportamento da xantana na presença de galactomanana de *S. parahybae*. Neste caso, a conformação desordenada da xantana, obtida progressivamente à medida em que foi desenvolvida a neutralização, interagiu com as cadeias de galactomanana levando à formação de gel para um grau de neutralização ( $\alpha$ ) maior de que 0,8, conforme mostra a Figura 66.



Figura 66. G' em função do grau de neutralização ( $\alpha$ ) com KOH da mistura H<sup>+</sup>xantana:galactomanana de *S. parahybae* 1:1 g/L, a 15 °C, 1 Hz, 7% de deformação

Para confirmar se a xantana neutralizada tornou-se ordenada após a interação com a galactomanana foi analisado o espectro de CD para a xantana isolada (Figura 67) e na mistura com a galactomanana de *S. parahybae* (Figura 68) em diferentes graus de neutralização.



Figura 67. Espectro de dicroísmo circular da H<sup>+</sup>xantana 1 g/L, a 15 °C,  $\alpha = 0$  (com  $\lambda$  máx. = 233 nm e  $\lambda$  mín. = 210 nm),  $\alpha = 0.5$  (com  $\lambda$  máx. = 228 nm e  $\lambda$  mín. = 208 nm);  $\alpha = 1.0$  (com  $\lambda$  máx. = 221 nm e  $\lambda$  mín. = 206 nm)

A Figura 67 mostra uma estrutura ordenada para a xantana isolada na forma ácida ( $\alpha = 0$ ) e um progressivo aumento do grau de desordem na estrutura da xantana durante a neutralização.



Figura 68. Espectro de dicroísmo circular da H<sup>+</sup>xantana:galactomanana de *S. parahybae*1:1 g/L, a 15 °C,  $\alpha = 0$  (com  $\lambda$  máx. = 233 nm e  $\lambda$  mín. = 210 nm);  $\alpha = 1,0$  (com  $\lambda$  máx. = 230 nm e  $\lambda$  mín. = 210 nm)

Quando a neutralização foi completa ( $\alpha = 1$ ) a xantana apresentou uma conformação desordenada (Figura 67). Na mistura, em baixos graus de neutralização, a conformação da xantana corresponde à estrutura ordenada e a interação com a galactomanana é fraca como mostrado na Figura 66. Ao aumentar o grau de neutralização, os segmentos desordenados de xantana produzidos interagiram instantaneamente com a galactomanana para formar as zonas de junções nas quais os segmentos de xantana tornaram-se ordenados (Figura 68). Novamente estes resultados confirmam a forte interação entre a estrutura desordenada da xantana e a galactomanana, conduzindo ao ordenamento das cadeias de xantana.

# **CAPÍTULO V - Conclusões**

# **CAPÍTULO V - Conclusões**

A galactomanana extraída das sementes de *M. scabrella*, apresentou uma relação M/G de 1,1, rotação óptica específica  $[\alpha]_D^{20}$  de +77,  $[\eta]_{25}$  de 740 mL/g, M<sub>w</sub> de 1,4 x 10<sup>6</sup> e L<sub>p</sub> de 10  $\pm$  1 nm. A galactomanana extraída do endosperma de *S. parahybae* apresentou uma relação M/G de 3, rotação óptica específica  $[\alpha]_D^{20}$  de +32,  $[\eta]_{25}$  de 1 280 mL/g, M<sub>w</sub> de 1,35 x 10<sup>6</sup>.

O conteúdo protéico foi de 1,5 e 4 % (m/v) para as galactomananas de *S. parahybae* e *M. scabrella*, respectivamente. Mesmo com a utilização de variadas técnicas de purificação (complexação com cobre, aumento da força iônica, hidrólise alcalina e enzimática) a galactomanana de *M. scabrella* permaneceu com um residual protéico, indicando a nãopreponderância de um único tipo de ligação entre proteína-carboidrato, a qual pode ser covalente, iônica ou por adsorção.

Testes preliminares indicaram a presença de compostos fenólicos ligados à galactomanana de *M. scabrella*, com a possibilidade de estarem contribuindo para o escurecimento dos extrativos vegetais.

A amostra de xantana comercial (Sigma) apresentou  $M_w$  de 3,5 x 10<sup>6</sup>, viscosidade intrínseca de 3 850 mL/g e teores em grupos acetil e piruvato de 21 e 20 % (mol/mol), respectivamente. A temperatura de transição conformacional (T<sub>m</sub>), em 10 mM de NaCl foi de 62 °C.

A amostra de xantana extraída do meio de cultura (Rhône-Poulenc, conformação nativa) apresentou uma viscosidade intrínseca de 2 700 mL/g e massa molecular de 5,5 x  $10^6$ . Na conformação renaturada a [ $\eta$ ] foi de 4 030 mL/g para uma massa molecular de 1,5 x  $10^6$ . O teor de grupos acetil e piruvato foi de 75 e 50 % (mol/mol), respectivamente. Os valores de T<sub>m</sub> para esta amostra foram de 43, 51, 62 e >90 °C para soluções a 4 g/L, em 5, 10, 20 e 100 mM de NaCl, respectivamente.

O sistema xantana (Sigma):galactomanana de *M. scabrella* apresentou uma interação sinérgica, a 20 °C, com aumento relativo de 20 % na viscosidade para a proporção 0,8:0,2 g/L, em água e de 50 % nas mesmas condições na proporção 1,5:1 g/L, quando as amostras foram previamente aquecidas a 80 °C.

O sistema xantana (Sigma):galactomanana de *S. parahybae* apresentou um efeito sinérgico mais evidente, a 20 °C, com aumento na viscosidade de cerca de 250 %, em praticamente todas as proporções testadas (entre 0,8:0,2 e 0,2-0,8 g/L), em água. A interação

diminui drasticamente em presença de sal.

Para o sistema xantana (Sigma):galactomanana de *M. scabrella* o aquecimento a 80 °C foi mais importante do que para as misturas com galactomanana de *S. parahybae*, a qual mostrou 300 % de aumento na viscosidade, na concentração de 2 g/L em água.

A mistura xantana (Rhône-Poulenc):galactomanana de *S. parahybae*, 4:2 g/L apresentou uma curva típica de G" em função da temperatura, durante o resfriamento, com um aumento inicial de G' em torno da  $T_m$  da xantana e um segundo aumento, brusco e mais pronunciado a aproximadamente 25 °C, atribuído à formação do gel ( $T_g$ ). A mesma mistura com a galactomanana de *M. scabrella*, apresentou um valor de  $T_g$  em temperatura levemente inferior, a aproximadamente 20 °C, com valores de G' menores do que para o primeiro sistema. Provavelmente a interação com a segunda galactomanana é menos estável, necessitando de temperaturas menores para estabilizar as zonas de junção entre os polímeros.

A T<sub>g</sub> apresentou independência da força iônica para o sistema xantana (Rhône-Poulenc):galactomanana de *S. parahybae*, 4:2 g/L, ocorrendo sempre a aproximadamente 25 °C, em todas as concentrações de sal utilizadas (0, 2, 5, 10 e 100 mM de NaCl). A geleificação ocorreu em todos os casos, ocorrendo um decréscimo de G' com o aumento da força iônica. Estes dados foram confirmados por DSC, onde observou-se o aumento da T<sub>m</sub> da xantana com a força iônica e a diminuição da mudança de entalpia correspondente a T<sub>g</sub>.

Ciclos de temperatura no sistema xantana (Rhône-Poulenc):galactomanana de *S. parahybae*, 4:2 g/L, com a xantana na conformação nativa, através de experimentos reológicos e por DSC, confirmaram a existência de interação entre os polímeros mesmo sem o aquecimento da mistura acima da T<sub>m</sub> da xantana. Ciclos de aquecimento na faixa de 10-35 °C (antes e após a formação do gel) não promoveram aumento na interação. Porém a interação tornou-se mais pronunciada após o aquecimento acima da T<sub>m</sub>, medida através de G' a 10 °C e pela mudança de entalpia correspondente à T<sub>g</sub>. Novos ciclos (10-35 °C) após ultrapassada a T<sub>m</sub> mostraram um leve decréscimo na interação, porém ainda maiores que os iniciais.

O perfil de interação da galactomanana de *S. parahybae* com a xantana nas conformações nativa ou renaturada, monitorado por DSC, foi muito semelhante.

Estudos de rotação óptica mostraram uma diminuição na atividade óptica da mistura de xantana (Rhône-Poulenc):galactomanana de *S. parahybae*, 1:0,5 g/L, 10 mM de NaCl, com um desvio mínimo a 25 °C, indicando uma mudança conformacional, não apresentada pelos polímeros isolados. Este evento tornou-se mais pronunciado na concentração de 5 mM de

NaCl, mesmo em presença de uma pequena quantidade de galactomanana (0,9:0,1 g/L de xantana:galactomanana).

Através de dicroísmo circular (CD) observou-se uma conformação ordenada para a mistura xantana (Rhône-Poulenc):galactomanana de *S. parahybae*, 1:1 g/L, em água, abaixo da temperatura de formação de gel (20 °C) e desordenada acima da  $T_g$  (30 °C). A galactomanana não apresentou contribuição no espectro de CD e a xantana isolada (1 g/L), em água, apresentou a conformação desordenada em ambas as temperaturas (20 e 30 °C).

A conformação desordenada da xantana foi induzida por neutralização do polímero na forma ácida. Observou-se que, à medida que a H<sup>+</sup>xantana foi neutralizada, aumentou a interação com a galactomanana de *S. parahybae*, até a formação de gel quando atingiu-se a completa neutralização da H<sup>+</sup>xantana. A mudança conformacional foi monitorada por dicroísmo circular. Enquanto a xantana tornou-se desordenada com a progressão da neutralização, a mistura mostrou-se progressivamente mais ordenada com a neutralização da xantana.

Os resultados descritos fornecem evidências que mostram interações entre galactomananas e segmentos desordenados das cadeias de xantana. A presença de galactomanana induziu uma mudança conformacional da xantana para estado ordenado no complexo xantana:galactomanana quando, inicialmente, cadeias ou segmentos desordenados de xantana estavam presentes.

Exclui-se a possibilidade da estabilização de uma conformação ordenada para as cadeias de xantana, em presença de galactomanana, devida ao efeito de concentração da xantana em domínio de fases, induzido pela incompatibilidade entre os polímeros. Uma transição de entalpia foi encontrada em temperatura constante ( $T_g$ ), mesmo com valores de  $T_m$  maiores do que a  $T_g$ , ou seja, mesmo quando a xantana não atingiu a temperatura de transição conformacional. Este fato pode ser interpretado com base na presença de frações da cadeia de xantana que permanecem desordenados na  $T_g$ , mesmo quando a  $T_m$  não tenha sido alcançada e uma interação específica entre a xantana desordenada e as cadeias de galactomanana. À medida que aumenta a força iônica, o valor da  $T_m$  aumenta e a fração de segmentos que permanecem desordenados antes de atingir a  $T_m$  diminui, com um decréscimo na interação com a galactomanana. Exclui-se, portanto, que um aumento na concentração de xantana, induzido por uma possível incompatibilidade entre os dois polímeros seja a origem da mudança conformacional observada. Além disso, a mudança de entalpia por grama de xantana é maior

na presença de galactomanana, mostrando uma interação específica, quando comparada com a xantana isolada.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADAMS, G.A. Complete acid hydrolysis. Methods Carbohydr. Chem. New York, v. 5, p. 269, 1965.
- AKIYOSHI, K., DEGUCHI, S., MORIGUCHI, N., YAMAGUCHI, S. e SUNAMOTO, J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. Macromolecules. v. 26, p. 3062, 1993.
- ANABLE, P., WILLIAMS, P.A. e NISHINARI, K. Interaction in xanthan-glucomannan mixtures and the influence of electrolyte. Macromolecules. v. 27, 1994, p. 4204.
- ASPINALL, G.O. Isolation and fracionation of polysaccharydes. In: ASPINALL, G.O. The Polysaccharides. New York: Academic Press, 1982, p. 19.
- BAIRD, J.K., SANDFORD, P.A. e COTTRELL, I.W. Industrial applications of some new microbial polysaccharides. **Bio Technology**, v. 1, p. 778, 1983.
- BALTIMORE, R.S. e MITCHELL, M. Immunologic investigations of mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: Comparision of susceptibility to osonic antibody in mucoid and nonmucoid strains. J. Infect. Dis, v. 141, p. 238, 1980.
- BAUER, W.H. e COLLINS, E.A. Thixotropy and dilatancy. In: F.R. EIRICH. Rheology, Theory and Applications. New York: Academic Press, v. 4, 1967, p. 423.
- BAVEJA, S.K., RAO, K.V.R., ARORA, J., MATHUR, N.K. e VINAYAK, V.K. Chemical investigations of some galactomannan gum as matrix tablets for sustained drug delivery. Indian J. Chem., New Dehli, v. 30B, p. 133, 1991.
- BENOIT, H. e DOTY, P. J. Phys. Chem. v. 57. p. 958, 1953.
- BEWLEY, J.D. e BLACK, M. Physiology and Biochemical of Seeds, v. 1, Berlin: Springer, 1978.
- BIANCHETTI, A. Produção e tecnologia de sementes de bracatinga (Mimosa scabrella Benth.). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPESCTIVAS FLORESTAIS "BRACATINGA, UMA ALTERNATIVA PARA REFLORESTAMENTO", 4., 1981, Curitiba. Anais... Curitiba: EMBRAPA, 1981. p. 25.
- BIERMAN, C.J. Hydrolysis and other cleavage of glycosidic linkages. In: BIERMAN, C.J e McGINNIS, G.D. Analysis of carbohydrates by GLC and MS. Florida: CRC Press, 1989, p. 27.
- BILMEYER, Jr. F.M. Measurements of molecular weight and size. In: Textbook of polymer science. New York: John Wiley and Sons. 1962, p. 64.
- BILLMEYER, F.W.Jr. Textbook of Polymer Science. 2. ed. New York: John wiley and Sons. 1971, p. 83.

- BOL, J.F. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annu. Ver. Phytopathol. v. 28, p. 113, 1990.
- 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* Bentham. Latin American Applied Research. v. 26, p. 5, 1996.
- BRESOLIN, T.M.B., SANDER, P.C., REICHER, F., SIERAKOWSKI, M.R., RINAUDO, M. e GANTER, J.L.M.S. Viscometric studies on xanthan and galactomannan systems **Carbohydr. Polym.** v. 33, p. 131, 1997.
- BROWN, M.E. Introduction to Thermal Analysis: Tech. and Appl. London: Chapman and Hall, 1988, 211 p.
- BROWNSEY, G.J., CAIRNS, P., MILES, M.J. e MORRIS, V.J. Evidence for intermolecular binding between xanthan and the glucomannan konjac mannan. **Carbohydr. Res.**, v. 176, p. 329, 1988.
- CAIRNS, P., MILES, M.J. e MORRRIS, V.J. Intermolecular bonding of xanthan gum and carob gum. Nature, v. 322, p. 89, 1986.
- CAIRNS, P., MILES, M.J., MORRRIS, V.J. e BROWNSEY, G.J. X-Ray Fibre-Diffraction Studies of Synergistic, Binary Polysaccharide Gels. Carbohydr. Res., v. 160, p. 411, 1987.
- CANTOR, C.R. e SCHIMMEL, P.R. Biophys. Chem. New York: W.H. Freeman Comp., 1980.
- CARDOSO, A.T.M. Desenvolvimento do processo de obtenção de galactomanana em escala piloto a partir de sementes de bracatinga. Curitba, 1995. Dissertação de Mestrado, Departamento de Tecnologia Química-UFPR.
- CARPENTER, D.K. Colloids. In: N.M. BIKALES. Encyclopedia of Polymer Sc. Technol., New York: John Wiley and sons, 1968, v. IV, p. 16.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: Recomendações siviculturais, potencialidades e uso da madeira. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. Colombo: EMBRAPA-CNPF; Brasilia: EMBRAPA-SPI, 1994, 640 p.
- CHAMPETIER, G. e MONNERIE, L. Introduction à la chimie macromoléculaire. Paris: Masson et Cie. Ed., 1969, p. 313.
- CHANDRESAKARAN, R. e RADHA, A. Molecular modeling of xanthan: galactomannan interaction. Carbohydr. Polym., v. 32, p. 201, 1997.
- CHARACKLIS, W.G. In: CHARACKLIS, W.G. MARSHALL, K.C. Biofilm, Wiley Intersc. Pubilc, 1989, p. 195.

- CHARACKLIS, W.G., McFETTERS, G.A. e MARSHALL, K.C. In CHARACKLIS, W.G., MARSHAL, K.C. Biofilm, Wiley Intersc. Public., 1989, p. 341.
- CHARSLEY, E.L. Thermal Analysis Techniques and Application. In: E.L. CHARSLEY e S.B. WARRINGTON. Bodmin: Royal Soc. Chem., 1992, 296 p.
- CHAZEAU, L., MILAS, M. e RINAUDO, M. Conformations of xanthan in solution: analysis by steric exclusion chromatography. Int. J. Polymer Analysis & Characterization. v. 2, p. 21, 1995.
- CHEETHAM, N.W.H., McCLEARY, B.V., TENG, G., LUM, F e MARYANTO. Gel-Permeation Studies on Xanthan-Galactomannan Interactions. **Carbohydr. Polym.**, v. 6, p. 257, 1986.
- CHEETHAM, N.W.H. Xanthan-galactomannan interactions-a GPC study. In: STIVALA, S.S., CRESCENZI, V. e DEA, I.C.M. Industrial Polysaccharides, New York: Gordon and Breach Scientific Publ., 1987, p. 325.
- CHEETHAM, N.W.H. e MASHIMBA, E.N..M. Conformational aspects of xanthangalactomannan gelation. Carbohydr. Polym., v. 9, p. 195, 1988.
- CHEETHAM, N.W.H. e PUNRUCKVONG, A. Gel-permeation and optical rotation studies and xanthan-galactomannan interactions. **Carbohydr. Polym.**, v. 10, p. 129, 1989.
- CHEETHAM, N.W.H. e MASHIMBA, E.N..M. Conformational aspects of xanthangalactomannan gelation. further evidence from optical-rotation studies. Carbohydr. Polym., v. 14, p. 17, 1991.
- CHRISP, J.D. Galactomannan gum gels for explosive compositions and for textile or paper sizing. Chemical Abstract, v. 67, p. 92485w, 1969.
- CLARK, A.H. e ROOS-MURPHY, S.B. Biopolymers, Springer, 1987, p. 59.
- COHEN, J., PRIEL, Z. e RABIN, Y. Molecular weight dependence of viscosity in dilute polyelectrolyte solutions: the low salt limit. **Polymer Commun.**, v. 29, p. 235, 1988.
- CORRÊA, M.P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, p. 235.
- COURRAZE, G. e GROSSIORD, J.L. Initiation à la rhéologie 2. ed. Paris: Lavoisier, 1991, 272 p.
- CRAIG, D.Q.M., KEE, A., TAMBURIC, S. e BARNES, D. An investigation into the temperature dependence of the rheological synergy between xanthan gum and locust bean gum mixtures. J. Biomater. Sci. Polym. Edn., v. 8, p. 377, 1997.
- CUVELIER, G. e LAUNAY, B. Xanthan/carob interactions at very low concentration. Carbohydr. Polym., v. 8, p. 271, 1988.

- DEA, I.C.M. e MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannan, In Advances in Carbohydrates Chemical and Biochemical, v. 31, p. 241, 1975.
- DEA, I.C.M., MORRIS, E.R., REES, D.A., WELSH, E.J., BARNES, H.A. e PRICE, J. Association of like and unlike polysaccharides: Mechanism and specifity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems, **Carbohydr. Res.**, v. 57, p. 249, 1977.
- DEA, I.C.M. The role of structural modification in controlling polysaccharide functionality. In: YALPANI, M. Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications. Amsterdam: Elsevier Sciences, 1987, p. 207.
- DEA, I.C.M. Conformational origins of polysaccharide solution and gel properties. In: WHISTLER, R.L., BE MILLER, J.N. Industrial Gums: Polysaccharides and their Derivatives.3. ed., San Diego: Academic Press, 1993, p. 21.
- DINTZIS, F.R., BABCOCK, G.E. eROBIN, T. Studies on dilute solutions and dispersions of the polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydr. Res., v. 13, p. 257, 1970.
- DOUBLIER, J.L. e LAUNAY, B. Rehology of galctomannan solutions: comparative study of guar gum and locust bean gum. J. Texture Studies. v. 12, p. 151, 1981.
- DOUBLIER, J.L. e LLAMAS, G. Flow and Viscoelastic Properties of Mixed Xanthan Gum + Galactomannan System In: DICKINSON, E. Food Polymers, Gels and Colloids., Cambridge: R.S.C. Special Publication n° 82, 1991, p. 349.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. e SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., v. 28, p. 350, 1956.
- DURAND, D. Les Réseaux Macromoléculaires et les Gels. In: Cahiers du GFP, p. 121, 1991.
- EISBERG, R. e LERNER, L. Física Fundamentos e Aplicações, v. 2, São Paulo: McGrawl-Hill do Brasil, 1985.
- EWING, G.M. Polarimetria e dispersão óptico-rotatória. In: Métodos instrumentais de análise química. v. 1. São Paulo: Edgard Blucher. 1982, p. 189.
- FARMACOPÉIA Brasileira 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
- FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants. Twenty-ninth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Tech. Rep. Ser. Wld. Hlth. Org. 1986, n. 733.
- FOX, R.W. e McDONALD, A.T. Introdução à Mecânica dos Fluidos, 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

- FURNISS, B.S., HANNAFORD, A.J., SMITH, P.W.G. e. TATCHELL, A.R. Investigations and characterisation of organic compounds. In: VOGEL, A.I. Vogel's: textbook of practical organic chemistry: 5. Ed. London: Longman Scientific & Technical, 1989, p. 1225.
- GALSTON, A.W. Perspectives in Phytochemistry. London: Academic Press, 1969, p. 193.
- GAMINI, A., de BLEIJSER, J. e LEYTE, J.C. Physico-chemical properties of aqueous solution of xanthan. An NMR study. Carbohydr. Res., v. 220, p. 33, 1991.
- GANTER, J.L.M.S. Galactomanana de Sementes de Mimosa scabrella (Bracatinga), Curitiba, 1988. Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.
- GANTER, J.L.M.S. Estudo dos Carboidratos de Sementes de Mimosa scabrella (Bracatinga). Análise Estrutural dos Oligossacarídeos e Propriedades Reológicas da Galactomanana. Curitiba, 1991. Tese de Doutorado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.
- GANTER, J.L.M.S., MILAS, M., CORRÊA, J.B.C., REICHER, F. e RINAUDO, M. Study of solution properties of galacctomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. Carbohydr. Polym., v. 17, p. 171, 1992.
- GANTER, J.L.M.S., ZAWADZKI-BAGGIO, S.F., LEITNER, S.C., SIERAKOWSKI, M.R. e REICHER, F. Structural studies on galactomannans from Brazilian seeds. J. Carbohydr. Chem., v. 12, p. 753, 1993.
- GANTER, J.L.M.S., HEYRAUD, A., PETKOWICZ, C.L.O., RINAUDO, M. e REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced by mild acid hydrolysis. Int. J. Biol. Macromol., v. 17, p. 13, 1995.
- GANTER, J.L.M.S., CARDOSO, A.T.M., KAMINSKI, M. e REICHER, F. Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 21, p. 137, 1997.
- GANTER, J.L.M.S. e REICHER, F. Water-soluble galactomananans from seeds of *Mimosaceae spp.* Bioresearch Technol., submitted, 1998.
- GHOSH, S., LI, X., REED, C.E. e REED, W.F. Apparent persistence lengths and diffusion behaviour of high molecular weight hyaluronate. **Biopolymers**. v. 30, p. 1101, 1990.
- GHOSH, S., PEITZSCH, R.M. e REED, W.F. Aggregates and other particles as the origin of the "extraordinary" diffusional phase in polyelectrolyte solutions. Biopolymers. v. 32, p. 1105, 1992
- GIBBONS, R.A. Polydispersity. Nature, London, v. 200, p. 665, 1963.
- GLICKSMAN, M. Functional properties of hydrocolloids. In: GLICKSMAN, M. Food Hydrocolloids. Boca Raton: CRC, 1982, v.1, p. 47.

GODET, P. Fermentation of polysaccharide gums. Process Biochem., v. 8, p. 33, 1973.

- GOLDSTEIN, A.M., ALTER, E.N., SEAMAN, J.K. Guar gum. In: WHISTLER, R.L. Industrial Gums. New York: Academic Press, 1973, p. 303.
- GOYCOOLEA, F.M., RICHARDSON, R.K, MORRIS, E.R. e GIDLEY, M.J. Stoichiometry and conformation of xanthan in synergistic gelationn with locust bean gum or konjac glucomannan: Evidence for heterotypic binding. **Macromolecules**, v. 28, p. 8308, 1995.
- GRAESSLEY, W.W. Viscoelasticity and flow in polymer melts and concentrated solutions. In: **Physical Properties of polymers**. Washington: American Chemical Society, 1984, p. 97.
- GRAVANIS, G. Relation ente la structure moléculaire et les propriétés en solution d'un polysaccharide hydrosoluble. Tese de Doutorado do 3° ciclo. Université Scientifique et Médicale de Grenoble, 1985.
- HACCHE, L.S., WASHINGTON, G.E.e BRANT, D.A. Light scattering investigation of the temperature-driven conformation change in xanthan. Macromolecules, v. 20, p. 2179, 1987.
- HARADA, T. The story of research into curdlan and the bacteria producing it. Trend Glyco Sci. Glyco Technol., v. 4, p. 309, 1992.
- HARBORNE, J.B. Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 2. ed. London: Chapman and Hall, 1984, p. 37.
- HEGNAUER, R e GRAYER-BARKMEIJER, R.J. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: a chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**. v. 34, n 1, p. 3, 1993.
- HOLZWARTH, G. Conformation of the extracellular polysaccharide of *Xanthomonas* campestris. Biochemistry, v. 15, p. 4333, 1976.
- HUGHES, W.F. e BRIGHTON, J.A. Dinâmica dos Fluidos. São Paulo: McGraw-Hill, 1974,
- HUGGINS, M.L. Theory of solutions of high polymers. J. Amer. Chem. Soc., v. 64, p. 1712, 1942.
- ISMAN, M.B. e DUFFEY, S.S. Toxicity of tomato phenolic compounds to the fruitworm, *Heliothis zea*. Entomology Experimental et Applicata., v. 31, n° 4, p. 370, 1981.
- JEANES, A., PITTSLEY, J.E. SENTI, F.R. Polysaccharide B-1459: A new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. J. Appl. Polym. Sci., v. 5, p. 519, 1961.
- JANSSON, P.E., KENNE, L. e LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydr. Res., v. 45, p. 275, 1975.

- KAPOOR, V.P., MILAS, M., TARAVEL, F.R. e RINAUDO, M. Rheological properties of seed galactomannan from *Cassia nodosa* buch.-hem. Carbohydrate Polymers.v. 25, p. 79, 1994.
- KATCHALSKY, A., ALEXANDROWICZ, Z. e KEDEM, O. Polielectrolyte solution. In: CONWAY, B.E. e BARRADAS, R.G. Chemical physics of ionic solutions. New York: J. Wiley and Sons, 1966.
- KOOIMAN, P. X-ray Diffraction and monosaccharide composition in mannose-containing polysaccharides. from seeds, K. Ned. Akad. wet. C. v. 63, p. 634, 1960.
- KRAEMER, E.O. Ind. Eng. Chem., v. 30, p. 1712, 1942.
- KRESZE, G-B. Methods for protein determination. In: BERGMEYER, J. e GRAβL, M. Methods of enzymatic analysis. 3. ed., Weinheim: Verlac Chemie. V. III, p. 92, 1983.
- KRUMEL, K.L. e SARKAR, N. Flow properties of gums useful to the food industry. Food Technology, v. 29, p. 36, 1975.
- LABA, D. Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries. New York: Marcel Dekker. 1993, 426 p.
- LAMBERT, F. Caractérisation du xanthane en solution. Application a l'etude de la stabilité thermique. Tese de Doutorado do 3° Ciclo. Université Scientifique et Médicale de Grenoble, 1983.
- LAMBERT, F., RINAUDO, M. On the thermal stability of xanthan gum. Polymer. v. 26. p. 1549-1553, 1985.
- LEITNER, S.C.S. Estudo de Polissacarídeos da Semente de Stryphnodendron barbatimam (Barbatimão). Curitiba, 1991. Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.
- LESCHZINER, C. e CEREZO, A.S. The structure of a galactomannan from the seeds of *Gleditsia triacanthos*. Carbohydr. Res., Amsterdam, v. 15, p. 291-299, 1970.
- LIN, S.C., LEE, W.I. e SCHURR, J.M. Brownian motion of higly charged poy(L-lysene): efffects of salt and poyion concentratios. **Biopolymers**. v. 17, n° 4, p. 1041, 1978.
- LIU, W. e NORISUYE, T. Thermally induced conformation change of xanthan: interpretation of viscosity behaviour in 0.01 M aqueous sodium chloride. Int. J. Biol. Macromol., v. 10, p. 44, 1988.
- LIU, W., SATO, T., NORISUYE, T. e FUJITA, H. Thermally induced conformation change of xanthan in 0.01 M aqueous sodium chloride. Carbohydr. Res., v. 160, p. 267, 1987.
- LOPES, L. Caracterização viscosimétrica de misturas das gomas xantana e guar. Rio de Janeiro, 1989. Dissertação de mestrado-Instituto de Macromoléculas, UFRJ.

- LOPES, L., ANDRADE, C.T., MILAS, M. e RINAUDO, M. Role of conformation and acetylation of xanthan on xanthan-guar interaction. Carbohydr. Polym., v. 17, p. 121, 1992.
- LOPES, L., MILAS, M. e RINAUDO, M. Influence of the method of purification on some solution properties of wellan gum. Int. J. Biol. Macromol., v. 16, p. 253, 1994.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1949, 352 p.
- LUCYSZYN, N. Galactomananas: Novas Fontes do Biopolímero e Aplicações na Indústria Alimentícea. Curitiba, 1994. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química-Departamento de Tecnologia Química, UFPR.
- LUNDIM, L. e HERMANSSON, A.M. Supermolecular aspects of xanthan-locust bean gum gels Based on Rheology and Electron Microscopy. Carbohydr. Polym., v. 26, p. 129, 1995.
- MAIER, H., ANDERSON, M., KARL, C., MAGNUSON, K. e WHISTLER, R.L. Guar, Locust bean, tara and fenugreek gums. In: WHISTLER, R.L. e BeMILLER, J.N. Industrial Gums, Polysacchharides and their derivatives. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1993, p. 181.
- MANNING, G.S. The contribution of Aharon Katchalsky to polyelectrolyte science. In: SELEGNY, E. Polyelectrolytes. v. 1. Dordrecht, Holland: Reidel. 1974, p. 3-37.
- MANNION, R.O., MITCHELL, J.R., HARDING, S.E., LEE, N.E.e MELIA, C.D. A rheological investigation of some polysaccharide interactions. In: PHILLIPS, G.O., WEDLOCK, D.J. e WILLIAMS, P.A. Gums and Stabilizers for the Food Industry, v.5, Oxford: IRL, 1990, p. 451.
- MANNION, R.O., MELIA, C..D., LAUNAY, B., CUVELIER, G. HILL, S.E., HARDING, S.E. e MITCHELL, J.R. Xanthan/locust bean gum interaction at room temperature. Carbohydr. Polym., v. 19, p. 91, 1992.
- MAZZINI, M.N. e CEREZO, A.S. Galactomannan-protein complexes from the seed of *Gleditsia triacanthos*. **Anales Asoc. Quim. Argentina**. Buenos Aires. v. 70, p. 289, 1982.
- MAZUCHOWSKI, J.Z. e LAURENT, J.E. Plano de desenvolvimento agroflorestal e energético para a região metropolitana de Curitiba. PROJETO FAO-GCP/BRA/025/FRA. Convênio Brasil/Paraná-França-FAO, EMATER, 1990 (Documentos, 11).
- McCLEARY, B.V. Enzymic hydrolysis fine structure and gelling interaction of legume seed D-galactose-D-mannans. Carbohydr. Res., v. 71, p. 205, 1979.

- McCLEARY, B.V., AMADO, R., WAIBEL, R. e NEUKOM, H. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydr. Res.**, v. 92, p. 269, 1981.
- McCLEARY, B.V. e NEUKOM, H. Effect of Enzymic Modification on the Solution and Interactive Properties of Galactomannans. **Prog. Food Nutr. Sci.**, v. 6, p. 109, 1982.
- McCLEARY, B.V., DEA, I.C.M., WINDUST, J. e COOKE, D. Interaction properties of Dgalactose depleted guar galactomannan samples. Carbohydr. Polym., v. 4, p. 253, 1984.
- MELTON, L.D., MINDT, L. REES, D.A. e SANDERSON, G.R. Covalent structuree of the extracellular polysaccharides from *Xanthomonas campestris*: Evidence from partial hydrolysis studies. **Carbohydr. Res.**, v. 46, p. 245, 1976.
- MENJIVAR, J.A. Use of gelation theory to characterize metal cross-linked polymer gels. In: Water Soluble Polymers. ACS Advances in Chemistry Series, 213, 1986, p. 209.
- MILANE, R.P. e WANG, B. Molecular structures of xanthan and related polysaccharides. In: PHILLIPS, G.O, WILLIAMS, P.A. e WEDLOCK, D.J. Gums and Stabilisers for the Food Industry, v. 6,., Oxford: IRL Press, 1992, p. 541.
- MILANE, R.P., e NARASAIAH, T.V. X-Ray Diffraction studies of a variant of xanthan gum in which the side chain terminal mannose unit is absent. **Carbohydr. Polym.**, v. 12, p. 315, 1990.
- MILANE, R.P. e WANG, B. A. cellulose-like conformation accessible to the xanthan backbone and implications for xanthan synergism. **Carbohydr. Polym.**, v. 13, p. 57, 1990.
- MILAS, M. e RINAUDO, M. Conformation investigation of the bacterial polysaccharide xanthan. Carbohydr. Res., v. 76, p. 189, 1979.
- MILAS, M. e RINAUDO, M. Properties of xanthan gum in aqueous solution. Role of the conformational transition. Carbohydr. Res., v. 158, p. 191, 1986.
- MILAS, M. e RINAUDO, M. Investigation on conformational properties of xanthan in aqueous solutions. ACS Symposium Series. p. 25, 1981.
- MILAS, M., RINAUDO, M. e TINLAND, B. Role of the structure on the rheological behaviour of xanthan gum. In: PHILLIPS, G.O, WEDLOCK, D.J. e WILLIAMS, P.A. Gums and stabilisers for the food industry 3. London: Elsevier, 1986, p. 637.
- MILAS, M., RINAUDO, M., KNIPPER, M. e SCHUPPISER, J.L. Flow and viscosity properties of xanthan gum solution. Macromolecules, v. 23, p. 2506, 1990.
- MILAS, M., REED, W.F. e PRINTZ, S. Conformations and flexibility of native and re-natured xanthan in aqueous solutions. Int. J. Biol. Macromol., v. 18, p. 211, 1996.

- MILES, M.J., LEE, I. e ATKINS, E.D.T. Molecular resolution of polysaccharides by scanning tunneling microscopy. J. Vac. Sci. Technol., v. B2, p. 1206, 1991.
- MITCHELL, J.R. Rheology of polysaccharides solutions and gels. In: J.M.V. BLANSHARD E J.R. MITCHELL. Polysaccharides in Food. London: Butterworths, 1979, p. 51.
- MOORHOUSE, R., WALKINSHAW, M.D. e ARNOTT, S. Xanthan gum-molecular conformation and interactions. In: SANDFORD, P.A. e LASKIN, A. Extracellular Microbial Polysaccharides, Washington: ACS, 1977, p. 90.
- MORRIS, E.R., REES, D.A, SANDERSON, G.R. e THOM, D. Conformation and circular dichroism of uronic acid residues in glycosides and polysaccharides. J. Chem. Soc., Letchworth, England, Perkin Trans. 2, n. 13, p. 1418, 1975.
- MORRIS, E.R., REES, D.A., YOUNG, G., WALKINSHAW, M.D. e DARKE, E. Orderdisorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. a role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host., J. Mol. Biol., v. 110, p. 1, 1977.
- MORRIS, E.R. Molecular origin of xanthan solution properties. In: SANDFORD, P.A. e LASKIN, A. Extracellular Microbial Polysaccharide., Washington: ACS, 1977, p. 81.
- MORRIS, E.R. Polysaccharides structure and conformation in solution and gels. In: J.M.V. BLANSHARD E J.R. MITCHELL. Polysaccharides in Food. London: Butterworths, 1979, p. 15.
- MORRIS, E.R., REES, D.A., ROBINSON, G. e YOUNG, G. Competitive inibition of interchain interactions in polysaccharide systems. J. Molec. Biol., v. 138, p. 363, 1980.
- MORRIS, E.R., CUTLER, A.N., ROSS-MURPHY, S.B., REES, D.A. e PRICE, J. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. Carbohydr. Polym. v. 1, p. 5, 1981.
- MORRIS, E.R. Rheology of hydrocolloids In: G.O. PHILLIPS, D.J. WEDLOCK E P. A. WILLIAMS Gums and Stabilizers for the Food Industry, v. 2, Oxford: Pergamon Press, 1984, p. 57.
- MORRIS, E.R. In: HARRIS, P. Food Gels, Barking: Elsevier, 1990, p. 291.
- MORRIS, E.R. Polysaccharide rheology and in mouth perception. In: STEPHEN, A.M. Food Polisccharides and their Application, 1995, 654 p.
- MORRIS, V.J. e McMASTER, T.J. Molecular Microscopy-Probing Biological Structures. Trends Food Sci. Technol., v. 2, p. 80, 1991.
- MORRIS, V.J. Designing polysaccharides for synergistic interactions. In: PHILLIPS, G.O., WILLIAMS, P.A. e WEDLOCK, D.J. Gums and Stabilizers for the Food Industry, v. 6, 1992, p. 161.

- NOBLE, O., PEREZ, S., ROCHAS, C. e TARAVEL, F. Optical rotation of branched polysaccharides. Polym. Bull. v. 16. p. 175, 1986.
- NORTON, I.T., GOODALL, D.M., FRANGOU, S.A., MORRIS, E.R.e REES, D.A. Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. J. Mol. Biol., v. 175, p. 371, 1984.
- NURNBERG, E. e RETTIG, E. On the characterization of hydrocolloidal slow-release tablets, ilustrated for the example "Danaden<sup>R</sup> retard" tablets. **Drugs Made Ger.**, v. 17, p. 26, 1974.
- NUSSENZVEIG, H.M. Curso de Física Básica, v. 2, São Paulo: Edgard Blucher, 1981.
- OKUYAMA, K., ARNOTT, S., MOORHOUSE, R., WALKINSHAW, M.D., ATKINS, E.D.T. e WOLF-ULLISH, C.H. Fiber diffraction studies of bacterial polysaccharides. In: FRENCH, A.D. e GARDENER, K.D. Fiber Diffraction Methods, Washington: ACS, 1980, p. 411.
- PAOLETTI, S., CEZARO, A. e DELBEN, F. Thermally induced conformational transition of xanthan polysaccharide. Carbohydr. Res., v. 123, p. 173, 1983.
- PARADOSSI,G. e BRANT, D.A. Light scattering study of xanthan fractions in aqueous solution. Macromolecules, v. 15, p. 874, 1982.
- PAZUR, J.H. Neutral Polysaccharides. In: CHAPLIN, M.F. e KENNEDY, J.F. Carbohydrates Analysis: A Practical Approach, 2 ed., New York,: IRL Press, 1994, 324 p.
- PEREZ, S. e VERGELATI, C. Molecular modelling of the chain conformations. Int. J. Biol. Macromol., v. 9, n° 4, p. 211, 1987.
- PEITZSCH, R.M., BURT, M.J., REED, W.F. Macromolecules. v. 25, p. 806, 1992.
- PETKOWICZ, C.L.O., RINAUDO, M., MILAS, M., MAZEAU, K., BRESOLIN, T.M.B., REICHER, F., GANTER, J.L.M.S. Conformation of galactomannan experimental and modelling approaches. Macromolecules. submetido, 1997.
- PETKOWICZ, C.L.O. Biopolímeros da Semente de Schizolobium amazonicum (Pinho cuiabano): Galactomananas e Arabinanas. Curitiba, 1993. Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.
- PHARMACOPOEA Helvetica. 7. Ed. Berne: Département Fédéral de l'Intérieur, 1995, V.6.7.1.
- RABIN, Y. Viscosity of polyelectrolyte solutions. The generalized fuoss law. J. Polym. Sci., Polym. Lett., v. 26, p. 397, 1988.
- READ, R.R. e COSTERTON, J.J.W. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. Can. J. Microbiol., v. 33, p.1080, 1987.
- RECHIA, C.G.V. Estudo de Polissacarídeos da Semente de Senna multijuga, Curitiba, 1992. Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.
- REED, W. F., GHOSH, S., MEDJAHDI, G. e FRANÇOIS, J. Dependence of polyelectrolyte apparent persistence lengths, viscosity, and diffusion on ionic strength and linear charge density. **Macromolecules**. v. 24, p. 6189, 1991.
- REES, D.A. Shapely polysaccharides. Biochem. J., v. 126, p. 257, 1972.
- REID, J.S.G. e BEWLEY, J.D. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek. (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic leguminous seed, **Planta**, v. 147, p. 145, 1979.
- REID, J.S.G. Analysis of carbohydrate conferring hardness on seeds. In: LINSKENS, H.F e JACKSONS, J.F. Modern Methods of Plant Analysis, New series Plant Fibers, v 10, Berlin: Springer, 1989, p. 295.
- REID, J.S.G. e EDWARDS, M.E. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharide in seeds. Food Polysaccharide and Their Application, A.M. Stephen ed., New York: Marcel Dekker, 1995, 654 p.
- REYNOLDS, J.E.F. Guar gum. In: REYNOLDS, J.E.F. Martindale: The extra pharmacopoeia. 29 ed., London: The Pharmaceutical Press, 1989, p.391.
- RICHARDS, E.G. Polyelectrolytes. In: An introduction to the physical properties of large molecules in solution. New York: Cambridge University Press, 1980, p. 235.
- RINAUDO, M. e MILAS, M. Polyelectrolyte behaviour of a bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: comparison with carboxymethyl cellulose. **Biopolymers**, v. 17, p. 2663, 1978.
- RINAUDO, M., MILAS, M., LAMBERT, F. e VINCENDON, M. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR investigation of xanthan gum. Macromolecules, v. 16, p. 815, 1983.
- RINAUDO, M. e MILAS, M. On the properties of polysaccharides, relation between chemical structure and physical properties. In: YALPANI, M. Industrial Polysaccharides: Genetic Enginnering Structure, Property Relations and Applications. Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 217.
- RINAUDO, M. Polysaccharide characterization in relation with some original properties. Journal of Applied Polymer Science: Applied Polymer Symposium. v. 52, p. 11, 1993.

- ROBINSON, G., ROOS-MURPHY, S.B. e MORRIS, E.R. Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. Carbohydrate Research. v. 107, p. 17, 1982.
- ROCKS, J.K. Xanthan gum. Food Technol., v. 25, p. 22, 1971.
- RODRIGUES, W.A. Correção ortográfica no nome científico do Guapuruvu (*Schizolobium parahybae* (Vell.) S.F.Blake). Anais de Congresso. XLVIII Congresso Nacional de Botânica. 27 de julho a 01 de agosto de 1997, Crato (CE). p. 304.
- ROOS-MURPHY, S.B., MORRIS, V.J. e MORRIS, E.R. Molecular viscoelasticity of xanthan polysaccharide. Faraday Symp. Chem. Soc., v. 18, p. 115, 1983.
- ROOS-MURPHY, S.B. Concentration Dependence of Gelation Time. In: Dickinson, E. Food Polym. Gels and Colloids, Cambridge: RSC Special Public., n° 82, 1991, p. 357.
- ROTTA, E., OLIVEIRA, Y.M.M. Área de distribuição natural da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.). In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais
  "bracatinga, uma alternativa para reflorestamento", 4, 1981. Anais... Curitiba: EMBRAPA, 1981, p. 1-23.
- SANDER, P.C. Plantas medicinais de uso relatado em leucorréias. Porto Alegre (RS), 1987. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SANDERSON, G.R. The interactions of xanthan gums in food systems. Prog. Food Nutr. Sci., v.6, p. 77, 1982.
- SANDFORD, P.A., PITTSLEY, J.E., KNUTSON, C.A., WATSON, P.R., CADMUS, M.C. e JEANES, A. Variation in *Xanthamonas campestris* NRRL B-1459: Characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: SANDFORD, P.A e LASKIN, A. Extracellular Microbial Polysaccharides. Washington, DC.:ACS. 1977, p. 192.
- SANDFORD, P.A., WATSON, P.R. e KNUTSON, C.A. Separation of xanthan gums of differing pyruvate content by fractional precipitation. **Carbohydr. Res.** v. 63, p. 253, 1978.
- SATO, T., NORISUYE, T. e FUJITA, H. Double stranded helix of xanthan in dilute solution: evidence from light scattering. **Polym. J.**, v. 16, p. 341, 1984a.
- SATO, T., KOJIMA,S., NORISUYE, T. e FUJITA, H. Double stranded helix of xanthan in dilute solution: Further evidence. **Polym. J.**, v. 16, p. 423, 1984b
- SATO, T., NORISUYE, T. e FUJITA, H. Double stranded helix of xanthan: dimensional and hydrodynamic properties in 0.1 M aqueous sodium chloride. **Macromolecules**, v. 17, p. 2696, 1984c.
- SATO, T., NORISUYE, T. e FUJITA, H. Double stranded helix of xanthan: dissociation behaviour in mixtures of water and cadoxen. **Polym. J.**, v. 17, p. 729, 1985.

- SEAMAN, J.K. Guar gum & locust bean gum. In: Handbook of Water Soluble Gums and Resins. DAVIDSON, R.L. New York: Mc Graw-Hill, 1980.
- SCHWARTZMANN, S. e BORING, J.R., Infect. Immunol., v. 3, p.732, 1971.
- SCHOTT, H. Reologia. In: GENNARO, A.R. Remington: Farmacia, Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana, v. 2, 1992, p. 461.
- SHARMAN, W.R., RICHARDS, E.L. e MALCOLM, G.N. Hydrodynamic properties of aqueous solutions of galactomannans. **Biopolymers**. v. 17, p. 2817, 1978.
- SHATWELL, K.P., SUTHERLAND, I.W., ROSS-MURPHY, S.B. e DEA, I.C.M. Influence of the acetyl substituent on the Interaction of xanthan with plant polysaccharides I. xanthan-locust bean gum systems. **Carbohydr. Polym.**, v. 14, p. 29, 1991a.
- SHATWELL, K.P., SUTHERLAND, I.W., ROSS-MURPHY, S.B. e DEA, I.C.M. Influence of the acetyl substituent on the interaction of xanthan with plant polysaccharides II. xanthan-guar gum systems. **Carbohydr. Polym.**, v. 14, p. 115, 1991b.
- SHATWELL, K.P., SUTHERLAND, I.W., ROSS-MURPHY, S.B. e DEA, I.C.M. Influence of the acetyl substituent on the interaction of xanthan with plant polysaccharides III. xanthan-konjac mannan gum systems. **Carbohydr. Polym.**, v. 14, p. 131, 1991c.
- SHO, T., SATO, T. e NORISUYE, T .Viscosity behaviour and persistence length of sodium xanthan in aqueous sodium chloride. **Biophys. Chem.**, v. 25, p. 307, 1986.
- SLONECKER, J.H. e JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas* campestris NRRL B-1459. Part I: Constitution. Can. J. Chem., v. 40, p. 2066, 1962.
- SMITH, I.H., SYMES, K.C., LAWSON, C.J. e MORRIS, E.R. Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. Int. J. Biol. Macromol. v. 3, p. 129, 1981.
- STANKOWSKI, J.D., MUELLER, B.E. e ZELLER, S.G. Location of a second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. Carbohydr. Res., v. 241, p. 321, 1993.
- STOKKE, B.T., ELGASAETER, A. e SMIDSRØD, O. Electron microscopy study of singleand double-stranded xanthan. Int. J. Biol. Macromol., v. 8, p. 217, 1986.
- STREETER, V.L. Mecânica dos Fluidos. São Paulo: McGraw-Hill, 1977, p.
- STAUB, A.M. Removal of proteins. Sevag method. In: Meth. Carbohydr. Chem. New York: Academic Press, 1983, p. 98.
- SUGUI, J.A. Aplicação de galactomanana de *Mimosa scabrella* (bracatinga): interação com surfactantes e proteínas. Curitiba, 1994. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica, UFPR.

- SUTHERLAND, I.W. Bacterial exopolysaccharides. Adv. Microbiol. Physiol., v. 8, p.143, 1972.
- TAIZ, L. Plant cell expansion: regulation of cell wall mechanical properties, Ann. Rev. Plant Plysiol., v. 35, p. 585, 1984.
- TAGER, A. mechanical properties of polymer solutions of macromolecules. In: Physical Chemistry of Polymers. Moscou: Mir Publ., 2. ed., 1978, 652 p.
- TAKO, M. ASATO, A. e NAKAMURA, S. Rheological aspects of the internolecular interactions between xanthan and locust bean gum in aqueous media. Agricl Biol. Chem., v. 48, p. 2995, 1984.
- TAKO, M. e NAKAMURA, S. Synergistic interaction between xanthan and guar gum. Carbohydr. Res., v. 138, p. 207, 1985.
- TAKO, M. e NAKAMURA, S. D-mannose-specific interaction between xanthan and Dgalactose-D-mannan. FEBS Lett., v. 204, p. 33, 1986.
- TAKO, M. Synergistic interaction between deacetylated xanthan and galactomannan Carbohydr. Polym., v. 10, p. 619, 1991a.
- TAKO, M. Synergistic interaction between xanthan and tara-bean gum. Carbohydr. Polym., v. 16, p. 239, 1991b.
- TAVARES, G.A. Estrutura e Propriedades Físico-Química da Galactomanana de Sementes de Cassia fastuosa, Willd (Cassia). Curitiba, 1994. Dissertação de Mestrado em Bioquímica-Departamento de Bioquímica, UFPR.
- TINLAND, B. MAZET, J. e RINAUDO, M. Characterization of water-soluble polymers by multidetection size-exclusion chromatography. Makromol. Chem. v. 2, p. 69, 1988.
- TUNG, C.Y.M. e DYNES, P.J. J. Appl. Polym. Sc., v. 27, 1982, p. 569.
- **UNITED STATES PHARMACOPEIA XXII.** Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc., 1990, p. 1573.
- VENNARD, J.K. e STREET, R.L. Elementos de Mecânica dos Fluidos. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.
- VINOGRADOW, G.V. e MALKIN, A.Y. Basic concepts of rheology. In: Rheology of Polymers. Washington: American Chemical society, 1984, p. 97.
- WADE, A. e WELLER, P.J. Xanthan gum. In: WADE, A. e WELLER, P.J Handbook of **Pharmaceutical Excipients**. 2. Ed. London: The Pharmaceutical Press, 1994, p.562.
- WEILL, G. Relation between molecular structure and the viscosity in solution. International Workshop on Plant Polysaccharides, Structure and Function, Nantes: CNRS -INRA, Proceeedings, 1984, p. 113.

- WHISTLER, R.L. Factors Iinfluencing gum costs and applications. In: Industrial gums. 2. ed. New York: Academic Press, p. 2, 1973a.
- WHISTLER, R.L. Solubility of Polysaccharides and their Behaviour in Solution. In: Carbohydrates in Solution. ACS Advances in Chemistry Series, 117, p. 242, 1973b.
- WHISTLER, R.L. e HYMOWITZ, T. Guar: Agronomy, Production, Industrial Use and Nutrition. Purdue: Univ. Press, West Lafayette, IN, 1979.
- 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, California: Academic Press, p. 1, 1993.
- WHITCOMB, P.J. e MACOSKO, C.W. Rheology of xanthan gum. J. Rheol., v. 22, p. 493, 1978.
- WILKINSON, W.L. Non-Newtonian Fluids: Fluids mechanics, mixing, and heat transfer. London: Pergamon Press, 1960.
- WILLIAMS, P.A., CLEGG, S.M., DAY, D.H., PHILLIPS, G.O. e NISHINARI, K. Mixed gels formed with konjac mannan and xanthan gum. In DICKINSON, E. Food Polymers, Gels and Colloids, Cambridge: R.S.C. Special Publication, n° 82, 1991a, p. 339.
- WILLIAMS, P.A., DAY, D.H., LANGDON, M.J., PHILLIPS, G.O. e NISHINARI, K. Sinergistic interaction of xanthan gum with glucomannans and galactomannans. Food Hydrocoll., v. 4, p. 489, 1991b.
- WILLIAMS, P.A. e PHILLIPS, G.O. Interactions in mixed polysaccharide systems. In: STEPHEN, A.M. Food Polysaccharides and their Application, 1995, p. 463.
- WOLFROM, M.L. e THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. Methods Carbohydr. Chem. New York, v. 2, p. 65, 1963a.
- WOLFROM, M.L. e THOMPSON, A. Acetylation. Methods Carbohydr. Chem. New York, v. 2, p. 211, 1963b.
- WOOD, G.C. General physical methods. In: BECKETT, A.H. e STENLAKE, J.B. Practical pharmaceutical chemistry 4. ed. London: The Athlone Press, 1988, 602 p
- YALPANI, M. Comercial polysaccharides: Recent trends and developments. In M. YALPANI. Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering Property, Relations and Application. Amsterdam: Elsevier, v. 3, 1987, p. 311.
- YANCIK, J.J., SCHULZE, R.E. e RYDLUND, P.H. Blasting agents containing guar gum. Chem. Abstr., v. 76, p. 101828, 1972.
- ZHAN, D.F., RIDOUT, M.J., BROWNSEY, G.J. e MORRIS, V.J. Xanthan-locust bean gum interactions and gelation. Carbohydr. Polym., v. 21, p. 53, 1993.

ZAWADZKI-BAGGIO, S.F. Arabinana e Galactomanana de Schizolobium parahybum; Estudo de Biossíntese de Galactomananas. Curitiba, 1994. Tese de Doutorado em Bioquímica – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.