

GISELE ELIANE PERISSUTTI



**Galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham e Proteínas do Leite:
Análise da Interação entre os Biopolímeros**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2002

GISELE ELIANE PERISSUTTI

**Galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham e Proteínas do Leite:
Análise da Interação entre os Biopolímeros**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA
2002

Galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham e Proteínas do Leite:
Estudo da Interação entre os Biopolímeros

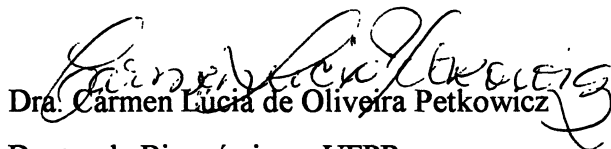
Gisele Eliane Perissutti

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



Dr. Miguel Daniel Nosed (Orientador)

Depto. de Bioquímica – UFPR



Dra. Carmen Lucia de Oliveira Petkowicz

Depto. de Bioquímica – UFPR



Dra. Carén Vargas G. Rechia

Depto. de Física e Química – USP (Ribeirão Preto)



Dra. Cintia Mara Ribas de Oliveira

UNICENP



Dra. Leila Beltrami

Instituto de Física – USP (São Carlos)

Curitiba, 17 de dezembro de 2002.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Parte desta Tese foi desenvolvida no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais – UFPR, sob orientação da Profª. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter.

Pouco conhecimento faz com que as criaturas sintam-se orgulhosas.

Muito conhecimento, com que sintam-se humildes.

É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias baixam-na para a Terra, sua mãe.”

Leonardo da Vinci

Aos meus pais Geraldo e Mafalda, meus maiores exemplos, dedico esta Tese.

Ao meu pai, exemplo de humildade, bondade, honestidade, coragem e caráter, a melhor pessoa, que nesta vida tive o prazer de conhecer.

À minha mãe, exemplo de luta, perseverança, abnegação e fé, a pessoa mais forte que já conheci.

Obrigada por serem meus guias neste caminho que é a vida, e por me ensinarem todos os dias como ser uma pessoa melhor.

A vocês, todo o meu amor e agradecimento.

“ Onde estou, tu também estás,
E aonde vou, tu és a razão para eu voltar.”

Beethoven

Agradecimentos

À Deus, pela oportunidade única de desenvolver esta lenta elaboração da inteligência e sentimento, perseverança, paciência, e coragem, através de inumeráveis existências, como hóspedes na Terra, para a assunção da alma à Divindade.

Aos meus irmãos Gerson Luiz Perissutti, pelo estímulo e carinho, e Adriano Fabrício Perissutti, pela amizade, companheirismo, pelos ótimos momentos juntos e auxílio, todo o meu amor, admiração e agradecimento.

Às minhas cunhadas Joanira Coelho Perissutti, pelos conselhos, auxílio e amizade, sempre ouvindo meus desabaços e dúvidas, e ajudando a resolver meus problemas (obrigada por tudo!) e Nicole Mansilla, pela doçura, carinho, conselhos e amizade sincera.

À Barbara Coelho Perissutti, minha bonequinha, que com seus olhinhos brilhantes e seu jeitinho doce torna a minha vida mais feliz, agradeço por sua existência, e que Deus te ilumine sempre, com muito amor.

Ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá, pela orientação, consideração, confiança, apoio e amizade durante as fases mais difíceis de minha vida, mostrando que o respeito se adquire através da humildade, todo o meu agradecimento e admiração.

À Profa. Dra. Joana Léa Meira Silveira Ganter, pela orientação na primeira fase deste Doutorado, consideração, apoio e amizade desde meu ingresso na Iniciação Científica até a metade deste Doutorado, meu sincero agradecimento.

À Profa. Dra. Fany Reicher, pela oportunidade, paciência, exemplo de dedicação, colaboração e pelos conselhos que me fizeram rever muitos pontos de minha vida, me ajudando a enfrentar os obstáculos com coragem e humildade, muito obrigada.

À Profa. Dra. Tania M. B. Bresolin, pela orientação na fase inicial deste trabalho e pelas

sugestões e auxílio na discussão dos resultados do para a publicação do artigo, meu agradecimento.

À Profª. Dra. Leila M. Beltrami, do Laboratório de Biofísica Molecular e Espectroscopia do Instituto de Física da Universidade de São Carlos – USP, pela acolhida em seu laboratório e discussões dos resultados de dicroísmo circular, e acima de tudo pela confiança, doçura, amizade e respeito, todo o meu carinho e admiração.

À Profª. Dra. Dorly de Freitas Buchi, do Departamento de Biologia Celular – UFPR, por tudo !!! Pelo auxílio nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão, pela confiança, doçura, amizade, respeito, carinho e conselhos, você é uma pessoa muito especial! Obrigada por ter entrado em meu caminho.

À Profª. Dra. Daura Regina Eiras Stofella, do Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR, pelo auxílio nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão, pela doçura, carinho, presteza e conversas agradáveis, meu sincero agradecimento e admiração.

Ao Dr. Michel Milas do (Centre de Recherches sur les Macromolécules Vegetales (CERMAV) - França), pelo auxílio na correção e discussão dos resultados para a publicação do artigo.

À Profª. Dra. Ruth J. G. Schadeck, do Departamento de Biologia Celular – UFPR, pelo auxílio nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão, pelo carinho, presteza e companheirismo, meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro, do Departamento de Biologia Celular – UFPR, pelo auxílio nos experimentos, e empréstimo de reagentes para microscopia eletrônica de transmissão, meu agradecimento.

Ao Prof. Dr. Phillip A. J. Gorin, pela paciência em cada pedido de auxílio para a compra de material, despesas de viagem e para correção dos textos em inglês, pela correção dos relatórios e banca interna desta tese, pelo bom humor todos os dias, e, principalmente,

pelo exemplo de dedicação à pesquisa, meu muito obrigada.

À Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski, do Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Química da UFPR, pelas correções do projeto de doutorado, e relatórios, e principalmente pela consideração, carinho, preocupação, disponibilidade, auxílio e conselhos nos momentos de incerteza, angústia e dificuldades durante a decisão pela finalização desta tese, minha admiração, carinho e agradecimento.

Ao Prof. Dr. José Domingos Fontana, do Laboratório de Biotecnologia e Bioquímica de Biomassa do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo auxílio, carinho, preocupação, conselhos e conversas que foram muito importantes na decisão pela finalização deste trabalho, e também pelo exemplo de caráter e dedicação ao trabalho, todo o meu carinho, respeito e admiração. Muitíssimo obrigada !!

À Profa. Dra. Maria Eugênia Rabello Duarte, pela acolhida em seu laboratório, e sobretudo, pela confiança, conselhos, amizade, respeito, todo o meu carinho e admiração.

Ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica da UFPR, pelo apoio e confiança durante este período.

Às Profas. Dras. Maria Eliane Merlin e Liu Un Rigo, pela participação na banca e pela correção do projeto de qualificação para o Doutorado.

Às Profas. Dras. Eliana B. B. Carneiro e Cármen Lúcia de Oliveira Petkowicz, pelo auxílio, carinho, estímulo e companheirismo. À Cármen pela participação na correção da tese (em tempo recorde !), dedicação e paciência, meu sincero agradecimento.

Às Profas. Dras. Juliana Maurer Menestrina e Selma Faria Zawadzki-Baggio, pelo carinho e conversas agradáveis, compreensão e amizade durante todo este tempo, um grande beijo.

Ao Prof. Dr. Alberto Tadeu Martins Cardoso, pelo empréstimo do sistema de peneiras

sob encaixe, pelo seu bom humor, amizade e solicitude sempre, meu agradecimento.

À amiga Luciane Lazarini (sem palavras!), minha irmã por escolha, fiel e companheira em todas as situações, por você existir ! Com muito amor, agradeço tudo o que vivemos nesta caminhada.

Às amigas Fabiola Regina Stevan e Larissa da Bortolli Chiamolera, anjos que apareceram em minha vida, imprescindíveis em todos os momentos, não tenho palavras para agradecer. Para vocês, todo o meu amor, carinho e agradecimento.

Às amigas Andréia Ticiane Pires de Carvalho e Ana Paula Busato, pelos momentos em que pudemos compartilhar nossas alegrias, angústias e conquistas, e principalmente, pela amizade inestimável, em qualquer situação, com muito amor e carinho.

Às amigas Fabiane Fortes, Fabíola Iagher, Keli Cristina Maier Voitunick, Mariana de Sá Carneiro e Vanessa Pankiv, pela amizade sincera em todos os momentos.

Aos queridos amigos Adriano Vinicius Soares (Adrianinho), Adriano Gonçalves Viana, Angela Okazaki, Ana Cristina Facundo Brito, Caroline Mellinger, Cesar Augusto Tischer, Cíntia Mara Ribas de Oliveira, Clarice Oaki Akanu, Guilherme Sasaki, Heloisa Morgado Sais, Juan Carlo Sabbi, Marcia Rubia da S. Melo, Renato Bochicchio e Silvia Schaefer, pelo carinho, compreensão, e amizade sincera. Todos vocês ocupam um lugar especial em meu coração.

Aos queridos amigos “Insaciáveis”: Alessandro (Lenda), Alexandre, Fabio (B1), Fabio (B2), Gustavo, Marino, Rafael (Coruja), Rafael (Teo), Rodrigo, Tiago, Marcos (Tinho) e Luciane, meus companheiros de final de semana, pelos bons momentos juntos e companhia sempre agradável, proporcionando momentos muito felizes e descontraídos, todo o meu amor para vocês.

Aos queridos amigos Alexandre Fleury de Freitas, Eduardo Luiz Voight, Fabio Cuéllar, Jean Patrick Cauduro, João Armando Brancher e Juliano Camargo, pela companhia e

conversas agradáveis, amizade sincera e auxílio, emprestando sempre o ombro nos momentos difíceis e compartilhando todos os momentos de minha vida, um grande beijo a vocês.

Às queridas amigas de São Carlos Ana Carolina Rodrigues, Andressa Machado, Daiane Hansen, Isabel Moraes, Patrícia Campana e Patrícia Siqueira, obrigada por me acolherem tão bem, e de uma maneira especial, fazerem parte desta etapa da minha vida, todo o meu carinho e agradecimento.

Aos amigos Daniele Persike, Gladis Anne Majczak, Guilhermina Noletto, Rilton Alves de Freitas, e Sandra Martin, pela amizade e companheirismo durante este período.

Aos Amigos do Laboratório de Química de Carboidratos de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica – UFPR, Allan Guilherme Gonçalves, Diogo Ricardo Bazan Ducatti, Flavia Cristina Jastale Pinto, Juliana E. F. Cassolato, Marco André Cardoso, Paula Cristina de Sousa Faria, Rosiane Guetter Mello Zibetti e Sergio Donizeti Ascêncio pela acolhida, incentivo, amizade sincera, ombro amigo, brincadeiras e pelo convívio harmonioso, principalmente durante o período mais difícil deste Doutorado, todo o meu amor e carinho para vocês!

À amiga Mariana Piemonte, com quem sempre pude contar em vários momentos, pelo carinho, amizade, apoio e sinceridade, muitíssimo obrigada!

Às amigas que passaram pelo Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais, Anat Reicher Feldman, Eloisa Visuete, Juliana Margarida Martins, Tania Mara Mora e Vanessa Gomes Alves Borges, pela amizade, auxílio e estímulo.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, nas pessoas de Matilde Machado de Oliveira, Rosi Kugler e Vera Regina F. Pianteki, por todo o auxílio nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão, pelo carinho e presteza, meu sincero agradecimento.

À Sra. Ivone Zonta de Araújo, pela simpatia, conversas nos corredores, preocupação e convívio diário, que foram importantes durante todo este período, meu sincero agradecimento.

À Secretária da Pós-Graduação em Bioquímica da UFPR, D. Marilza Lamour pelas brincadeiras e conselhos, além de seu bom humor.

À Secretária do Departamento de Bioquímica da UFPR, Nancy P. C. de Albuquerque, por todo o auxílio, amizade e colaboração.

Às bibliotecárias da Biblioteca de Ciências Biológicas - UFPR, Telma, Izabella, Ruth e Mariza, pela atenção e cooperação.

A todos os alunos do Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica da UFPR, pelo convívio diário e desabafo nos corredores, compartilhando além das dificuldades, angústias e desafios, as alegrias e as conquistas deste período.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que esta tese fosse realizada.

Ao CNPq e PRONEX-CARBOIDRATOS, pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de tabelas	xvi
Lista de figuras	xvii
Lista de símbolos, siglas e abreviauras	xxiv
Resumo.....	xxviii
Abstract.....	xxix
1. Introdução.....	1
1.1. Galactomananas vegetais.....	2
1.1.1. <i>Mimosa scabrella</i> Bentham	5
1.2. Interações galactomanana-proteína	6
1.2.1. Mecanismos de interação envolvidos.....	8
1.3. Leite e seus constituintes	12
1.4. Metodologia utilizada na análise de interações poliméricas.....	15
1.4.1. Técnicas reológicas	19
1.4.1.1. Aplicação da viscosimetria no estudo de interações poliméricas	20
1.4.1.2. Medidas dinâmicas.....	21
1.4.1.2.1. Aplicação de medidas dinâmicas no estudo de interações poliméricas.....	25
1.4.2. Dicroísmo circular (DC).....	28
1.4.2.1. Aplicação de dicroísmo circular na análise de interação polimérica	32
1.4.3. Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)	35
1.4.3.1. Aplicação de cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) na análise de interação polimérica	41
2. Objetivos	44
2.1. Objetivo geral.....	44

2.2. Objetivos específicos	44
3. Materiais e métodos	45
3.1. Métodos gerais.....	45
3.1.1. Obtenção das sementes.....	45
3.1.2. Extração dos polissacarídeos de <i>M. scabrella</i>	45
3.1.3. Purificação dos polissacarídeos	46
3.1.4. Determinação da granulometria dos polissacarídeos	46
3.1.5. Preparação das soluções de caseína	47
3.2. Métodos químicos e físico-químicos	47
3.2.1. Hidrólise ácida total da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	47
3.2.2. Redução	47
3.2.3. Acetilação	48
3.2.4. Dosagem de açúcar total da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	48
3.2.5. Dosagem de proteínas da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	49
3.2.6. Desproteínização das galactomananas por coluna de Florisil	49
3.2.7. Desproteínização das galactomananas por adição de NaCl	49
3.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	50
3.2.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições não desnaturantes (nativa).....	50
3.2.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	52
3.2.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	52
3.3. Métodos reológicos.....	53
3.3.1. Preparo das misturas galactomanana-proteína.....	53
3.3.1.1. Análise da interação entre galactomananas e proteínas do leite por ciclos de temperatura	54
3.3.1.2. Comportamento dinâmico	54
3.4. Métodos cromatográficos e espectroscópicos.....	55
3.4.1. Cromatografia líquido-gasosa (g.l.c.).....	55
3.4.2. Dicroísmo circular.....	55

3.4.3. Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)	56
3.4.3.1. Análises de homogeneidade das amostras.....	57
3.4.3.2. Determinação do dn/dc das amostras.....	58
3.4.3.3. Gráfico de Zimm das amostras	59
4. Resultados e discussão	60
4.1. Obtenção e purificação da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	60
4.2. Análise do conteúdo protéico das galactomananas.....	63
4.3. Análise reológica dos sistemas polissacarídeo-proteína.....	65
4.3.1. Análise reológica das amostras por ciclos de temperatura.....	67
4.3.2. Análise do comportamento viscoelástico das misturas galactomanana e proteínas do leite	68
4.4. Análise por dicroísmo circular das misturas galactomanana e proteínas do leite.....	76
4.4.1. Análise por dicroísmo circular da galactomananas isoladas	77
4.4.2. Análise por dicroísmo circular das caseínas isoladas	78
4.4.3. Análise por dicroísmo circular das misturas galactomanana-proteína.....	79
4.4.4. Efeito da granulometria das galactomananas nas análises por dicroísmo circular	85
4.4.5. Efeito dos ciclos de temperatura nas análises por dicroísmo circular.....	87
4.5. Eletroforese dos sistemas polissacarídeo-proteína.....	91
4.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	92
4.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das amostras	93
4.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	101
4.6.1. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das amostras de polissacarídeo e proteína isoladas	102
4.6.2. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das misturas polissacarídeo-proteína.....	105

4.7. Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS).....	113
4.7.1. Análises de homogeneidade dos polímeros isolados	114
4.7.2. Análises de homogeneidade das misturas polissacarídeo-proteína.....	119
4.7.3. Determinação do dn/dc	126
4.7.4. Gráfico de Zimm	130
5. Conclusões.....	146
6. Referências bibliográficas.....	149
7. Anexos	171

Lista de tabelas

TABELA 1: Quantidade dos componentes (em mL) para o gel de corrida nas eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas e desnaturantes (SDS-PAGE).	51
TABELA 2: Quantidade dos componentes (em mL) para o gel concentrador nas eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas e desnaturantes (SDS-PAGE). 51	
TABELA 3: Conteúdo protéico das galactomananas de sementes de <i>M. scabrella</i> e das galactomananas comerciais de guar e alfarroba nativas e purificadas.....	63
TABELA 4: Parâmetros de oscilação obtidos para o sistema galactomanana de <i>M. scabrella</i> e proteínas do leite a 1 Hz e diferentes temperaturas.	72
TABELA 5: Valores mínimos e inversão entre os valores negativos para positivos (cruzamento) nos espectros de dicroísmo circular das galactomananas, caseína total e frações purificadas de caseína (α , β e κ) e das diferentes misturas galactomanana-caseína estudadas.	84
TABELA 6: Valores mínimos e inversão entre os valores negativos para positivos (cruzamento) nos espectros de dicroísmo circular das misturas galactomanana de <i>M. scabrella</i> -caseína com diferentes granulometrias de galactomanana.	86
TABELA 7: Valores mínimos e inversão entre os valores negativos para positivos (cruzamento) nos espectros de dicroísmo circular das misturas galactomanana de <i>M. scabrella</i> ou goma guar e caseína em experimentos de temperatura.....	89
TABELA 8: Valores de dn/dc , massa molar calculada, raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) e grau de polidispersão das amostras homogêneas (unimodais) submetidas às análises do dn/dc e homogeneidade, em comparação com os dados obtidos para galactomananas de <i>M. scabrella</i> em outros trabalhos.....	130
TABELA 9: Valores da variação do índice de refração da luz com relação à concentração dos polissacarídeos presente nas soluções (dn/dc), massa molar (M_w), raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) e segundo coeficiente virial (A_2) das amostras de <i>M. scabrella</i> , caseína total e frações purificadas (α , β e κ)-caseína e das misturas galactomanana-caseína. ..	134
TABELA 10: Valores do segundo coeficiente virial cruzado obtido para as amostras isoladas de <i>M. scabrella</i> , caseína total e frações purificadas (α , β e κ)-caseína e das misturas galactomanana-caseína.....	135

Lista de figuras

Figura 1: Modelo proposto para a estrutura das micelas de caseína em solução (adaptado de Clark e Ross-Murphy, 1987).....	14
Figura 2: Escalas de tempo e distância molecular, macromolecular e supramolecular e técnicas utilizadas como sondas (Clark e Ross-Murphy, 1987).....	16
Figura 3: Respostas das amostras em testes oscilatórios em fase e fora de fase. a) deformação em função do tempo, b) comportamento de um sólido elástico, c) líquido viscoso, e d) material viscoelástico (adaptado de Vélez-Ruiz e Cánovas, 1997).....	23
Figura 4: Comportamento dinâmico de sistemas de polissacarídeos. a) gel forte, b) gel fraco, e c) solução diluída (adaptado de Morris, 1995).....	24
Figura 5: a) Luz plano polarizada resolvida em duas componentes circulares à direita (R) e à esquerda (L). b), c) e d) Ao passar pela amostra que absorve diferentemente as duas componentes, R e L terão tamanhos diferentes. Se a componente R é menos intensa que L, o vetor campo elétrico tem a resultante elíptica mostrada na figura acima (Sun, 1994).	30
Figura 6: Espectro de dicroísmo circular (banda dicróica) (Sun, 1994).....	32
Figura 7: Espectro de dicroísmo circular de proteínas, observando-se os três tipos básicos de conformação que estas podem apresentar em solução (α -hélice, β -pregueada e desordenada).....	33
Figura 8: Modelo de espalhamento Rayleigh (adaptado de Sun, 1994).....	35
Figura 9: Gráfico de Zimm (Sun, 1994).....	38
Figura 10: Determinação da massa molar (M_w) e do segundo coeficiente virial (A_2) (adaptado de Sun, 1994).....	39
Figura 11: Fluxograma de obtenção da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	62
Figura 12: Análise por ciclos de temperatura (25 – 75 °C e 75 – 10 °C) do sistema galactomanana de <i>M. scabrella</i> 10 g/L: leite desnatado.....	68
Figura 13: Análise do comportamento viscoelástico das misturas entre a galactomanana de <i>M. scabrella</i> na concentração 10 g/L e leite desnatado na temperatura de 25 °C sem aquecimento.....	70
Figura 14: Análise do comportamento viscoelástico das misturas entre a galactomanana de <i>M. scabrella</i> na concentração 10 g/L e leite desnatado na temperatura de 25 °C após	

aquecimento.....	70
Figura 15: Análise do comportamento viscoelástico das misturas entre a galactomanana de <i>M. scabrella</i> na concentração 10 g/L e leite desnatado na temperatura de 65 °C após aquecimento.....	71
Figura 16: Análise do comportamento viscoelástico das misturas entre a galactomanana de <i>M. scabrella</i> na concentração 10 g/L e leite desnatado na temperatura de 75 °C após aquecimento.....	71
Figura 17: Espectro de dicroísmo circular das galactomananas isoladas.	78
Figura 18: Espectro de dicroísmo circular das proteínas isoladas (caseína total, e frações α , β e κ -caseína).....	79
Figura 19: Espectro de dicroísmo circular das misturas contendo galactomanana de goma guar e caseína total.....	81
Figura 20: Espectro de dicroísmo circular das misturas contendo galactomanana de alfarroba e caseína total.	81
Figura 21: Espectro de dicroísmo circular das misturas contendo galactomanana de <i>M. scabrella</i> nativa e caseína total.	83
Figura 22: Espectro de dicroísmo circular das misturas contendo galactomanana de <i>M. scabrella</i> purificada e caseína total.....	83
Figura 23: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de <i>M. scabrella</i> (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliácridamida em condições não desnaturantes (PAGE nativo), revelada por azul de Coomassie. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras.....	94
Figura 24: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de <i>M. scabrella</i> (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliácridamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), revelada por azul de Coomassie. M_w = marcador de massa molar. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras; as setas horizontais indicam os padrões de massa molar utilizados, e as setas na diagonal representam as bandas principais.....	96
Figura 25: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de <i>M. scabrella</i> (G), caseína	

- total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE nativo), revelada por nitrato de prata. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras..... 97
- Figura 26: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE nativo), revelada por reativo de ácido periódico-Schiff. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras..... 98
- Figura 27: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (SDS-PAGE), revelada por nitrato de prata. M_w = marcador de massa molar. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras; as setas horizontais indicam os padrões de massa molar utilizados, e as setas na diagonal representam as bandas principais..... 99
- Figura 28: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (SDS-PAGE), revelada por revelada por reativo de ácido periódico-Schiff para a presença de carboidratos. M_w = marcador de massa molar. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras; as setas horizontais indicam os padrões de massa molar utilizados, e as setas na diagonal representam as bandas principais..... 100
- Figura 29: Micrografia da galactomanana de *M. scabrella* (2 g/L) obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 50000 vezes. A = agregados, G = galactomanana. 103
- Figura 30: Micrografia da caseína total (3 g/L) obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 50000 vezes. A = agregados, C = caseína, E = espaço entre as micelas..... 103
- Figura 31: Micrografia da fração α -caseína (3 g/L) obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 50000 vezes. A = agregados, C = caseína, E = espaço

entre as micelas.....	104
Figura 32: Micrografia da fração β -caseína (3 g/L) obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 25000 vezes. C = caseína. E = espaço entre as micelas.	104
Figura 33: Micrografias das misturas galactomanana de <i>M. scabrella</i> -caseína, nas proporções 2:3, 10:3 e 2:30 (figuras a, b e c, respectivamente), obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 50000 vezes. A = agregados. C = caseína. E = espaço entre as micelas, G = galactomanana.....	106
Figura 34: Micrografias das misturas galactomanana de <i>M. scabrella</i> - α -caseína, nas proporções 2:3, 10:3 e 2:30 (figuras a, b e c, respectivamente), obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 25000 (figuras b e c) e 50000 vezes. Figura d imagem ampliada da figura b. A = agregados. C = caseína. E = espaço entre as micelas, G = galactomanana.....	107
Figura 35: Micrografias das misturas galactomanana de <i>M. scabrella</i> - β -caseína, nas proporções 2:3, 10:3 e 2:30 (figuras a, b e c, respectivamente), obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 25000 (figuras b e c) e 50000 vezes. A = agregados, C = caseína, E = espaço entre as micelas, G = galactomanana.....	109
Figura 36: Micrografias das misturas galactomanana de <i>M. scabrella</i> - κ -caseína, nas proporções 2:3, 10:3 e 2:30 (figuras a, b e c, respectivamente), obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 25000 e 50000 vezes (figuras d e e). A = agregados. C = caseína, E = espaço entre as micelas, G = galactomanana.....	110
Figura 37: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de <i>M. scabrella</i> na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.....	115
Figura 38: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da caseína total na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.....	115
Figura 39: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração α -caseína na	

concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.....	116
Figura 40: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração β -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.....	117
Figura 41: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.....	117
Figura 42: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da caseína e suas frações (α , β e κ -caseína) na concentração 1 mg/mL. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).	118
Figura 43: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da mistura galactomanana de <i>M. scabrella</i> -caseína total na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.	120
Figura 44: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da interação galactomanana de <i>M. scabrella</i> -caseína. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).	120
Figura 45: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da mistura galactomanana de <i>M. scabrella</i> - α -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.....	121
Figura 46: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da interação galactomanana de <i>M. scabrella</i> - α -caseína. As linhas cheias representam o detector de	

espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).	122
Figura 47: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da mistura galactomanana de <i>M. scabrella</i> - β -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.....	123
Figura 48: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da interação galactomanana de <i>M. scabrella</i> - β -caseína. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).	123
Figura 49: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da mistura galactomanana de <i>M. scabrella</i> - κ -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.....	124
Figura 50: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da interação galactomanana de <i>M. scabrella</i> - κ -caseína. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).	125
Figura 51: Gráfico da massa molar versus o volume de eluição (V_e) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de <i>M. scabrella</i> . A linha vermelha em negrito representa o detector de espalhamento de luz laser (LS), e a linha mais delgada representa o detector de índice de refração (RI).	127
Figura 52: Gráfico da massa molar versus o volume de eluição (V_e) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína. A linha vermelha em negrito representa o detector de espalhamento de luz laser (LS), e a linha mais delgada representa o detector de índice de refração (RI).	128
Figura 53: Gráfico da massa molar cumulativa obtido por cromatografia de exclusão estérica	

acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	128
Figura 54: Gráfico de Zimm obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	131
Figura 55: Gráfico de Zimm obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da caseína total.....	132
Figura 56: Gráfico de Debye obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	137
Figura 57: Gráfico de Debye obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína.....	138
Figura 58: Gráfico de raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) versus volume de eluição (V_e) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de <i>M. scabrella</i> . As linhas contínuas em vermelho representam o detector de espalhamento de luz, e as linhas pontilhadas, o detector de índice de refração.	139
Figura 59: Gráfico de raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) versus volume de eluição (V_e) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína. As linhas contínuas em vermelho representam o detector de espalhamento de luz, e as linhas pontilhadas, o detector de índice de refração.	139
Figura 60: Gráfico de raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) versus massa molar (M_w) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de <i>M. scabrella</i>	140
Figura 61: Gráfico de raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) versus massa molar (M_w) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína.	141

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas

α_s - fração α -caseína sensível ao cálcio

ΔR_0 - diferença entre o fator de Rayleigh (R_0) da solução e do solvente

ϵ - absorvidade molar

η - viscosidade

$[\eta]$ - viscosidade intrínseca

η^* - viscosidade dinâmica complexa

η_{rel} - viscosidade relativa

η_{sp} - viscosidade específica

θ - ângulo de espalhamento do feixe de luz

θ' - elipticidade molar

δ - ângulo de fase

λ - comprimento de onda

λ_0 - comprimento de onda da luz incidente

γ - deformação

ω - frequência

τ - tensão de cisalhamento

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

τ_0 - amplitude de tensão de cisalhamento

γ_0 - amplitude de deformação

τ_1 - tempo de relaxamento longitudinal

τ_2 - tempo de relaxamento transversal

αC - α -caseína

βC - β -caseína

κC - κ -caseína

A_2 - segundo coeficiente virial

$A_{2(1)}$ - segundo coeficiente virial do solvente

$A_{2(2)}$ - segundo coeficiente virial da proteína isolada

$A_{2(3)}$ - segundo coeficiente virial do polissacarídeo isolado
 $A_{2(23)}$ - segundo coeficiente virial da mistura polissacarídeo-proteína
 A_{po-po} - segundo coeficiente virial do polissacarídeo isolado
 A_{pr-po} - segundo coeficiente virial da mistura polissacarídeo-proteína
 A_{pr-pr} - segundo coeficiente virial da proteína isolada
 APS - persulfato de amônio
 BSA – soro albumina bovina
 c^* - concentração crítica
 C - concentração do polímero
 CMC - carboximetilcelulose
 CT – caseína total
 C_{∞} - razão característica
 ^{13}C -RMN - ressonância magnética nuclear de carbono-13
 d - deslocamento químico
 d_{eg} - dipólo elétrico
 D_2O - óxido de deutério
 DC - dicroísmo circular
 DL_{50} - dose letal 50% oral
 dn/dc - taxa de variação do índice de refração em relação à concentração
 DPPC - dipalmitoilfosfatidilcolina
 DSC - calorimetria diferencial de varredura
 DISAD/MS - Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Produtos Saneantes
 Domissanitários/ Ministério da Saúde
 E - campo elétrico
 EYPC - fosfatidilcolina
 g - campo magnético
 G - galactomanana
 G' - módulo de cisalhamento dinâmico elástico
 G'' - módulo de cisalhamento dinâmico viscoso
 G_{θ} - intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado
 G_0 - intensidade relativa correspondente ao feixe incidente
 G-CT – galactomanana: caseína total

G- α C - galactomanana: α -caseína
G- β C - galactomanana: β -caseína
G- κ C - galactomanana: κ -caseína
g.l.c. - cromatografia líquido-gasosa
H - campo magnético
HPSEC-MALLS - cromatografia de exclusão estérica acoplada a detector de espalhamento de luz em multiângulos
 1 H-RMN - ressonância magnética nuclear de próton
 I_0 - intensidade da luz que incide na cela
I - intensidade da luz ao deixar a cela
I(Q) - intensidade de luz espalhada
IR - infra-vermelho
 K^* - constante óptica
L - componentes circulares à esquerda
L' - comprimento de contorno
 L_p - comprimento de persistência
LBG - alfarroba
LD - leite desnatado
LI - leite integral
LPD - leite em pó desnatado
LS – detector de espalhamento de luz laser
M - massa da molécula
M : G - relação manose : galactose
MALLS - detector de espalhamento de luz em multiângulos
 m_{ge} - dipólo magnético
MET - microscopia eletrônica de transmissão
 M_L - massa molar monomérica
 M_w - massa molar ponderal média
n - índice de refração
 N_A - número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
p - dipólo oscilante
 P_θ - função de θ (considera as interferências entre as diferentes vibrações emitidas por

uma mesma partícula)

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

pI - ponto isoelétrico

r - distância ponta a ponta

R - componentes circulares à direita

R_θ - fator de Rayleigh

RI – detector de índice de refração

RMN - ressonância magnética nuclear

S^2 - extensão de movimentação interna

$\langle r_g^2 \rangle$ - raio de giro ao quadrado

$(\langle r_g^2 \rangle^{1/2})$ - raio de giro

SANS - detector de espalhamento de nêutrons em baixo ângulo

SDS - dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes

SEC - cromatografia de exclusão estérica

TEMED – N, N, N', N'- tetrametiletlenodiamina

T_g - temperatura de formação/fusão de gel

T_m - temperatura de transição conformacional

TRIS - (Triidroximetil)-aminometano

UHT - temperatura ultra alta (“ultra high temperature”)

UV - ultra-violeta

V_e – volume de eluição

Resumo

A interação polissacarídeo-proteínas do leite foi analisada por medidas reológicas, utilizando ciclos de temperatura e análises dinâmicas por varreduras de frequência, com um máximo nos valores de G' e G'' obtido na temperatura de 65 °C, e formação de uma estrutura mais viscoelástica, semelhante a um gel mais acentuado ($G'/G'' = 2,8$), em relação aos sistemas sem aquecimento (25 °C) (solução viscosa) ($G'/G'' = 0,4$), e após aquecimento (gel fraco) ($G'/G'' = 2,7$). Através destas análises, pode-se sugerir uma possível sinergia, devido a mudanças nas propriedades reológicas no sistema, em relação ao sistema composto por galactomanana-leite desnatado sem aquecimento. Nos espectros de dicroísmo circular para as misturas galactomanana-caseína total, observou-se uma variação significativa na intensidade do sinal e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos. Para as misturas contendo α , β e κ -caseína, observou-se que as frações com κ -caseína apresentaram uma maior variação na intensidade dos sinais no espectro de DC, seguida pelas frações β e α -caseína. Através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), para as misturas galactomanana-caseína total ou frações α , β e κ -caseína, a adição do polissacarídeo faz com que ocorra uma retração das partículas da proteína, com um aumento nos espaços, de onde a galactomanana é excluída. Alterações na microestrutura foram observadas após a adição da galactomanana, com separação de fases em altas concentrações de um dos biopolímeros, com maiores diferenças na ordem β , κ , α -caseína. A cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) foi utilizada para a determinação da massa molar, forma e análise da interação entre os biopolímeros. Galactomanana- α -caseína e galactomanana- β -caseína apresentaram um perfil semelhante ao sistema galactomanana-caseína. A mistura galactomanana- κ -caseína apresentou-se diferente das demais, mas foram observadas para todas as misturas diferenças quanto à intensidade e deslocamento dos sinais em relação aos biopolímeros isolados, demonstrando uma possível interação, obtendo-se maior interação entre a galactomanana e as frações purificadas da caseína na ordem κ -caseína, α -caseína e β -caseína, respectivamente.

Abstract

The interaction of polysaccharide with milk protein was analyzed using rheological methods, namely temperature cycles and dynamic analysis by frequency sweeps, with a maximum value of G' e G'' at a temperature of 65 °C, formed was of a more viscoelastic and accentuated gel-like structure ($G'/G'' = 2,8$), in relation to non-heated systems (25 °C) (viscous solution) ($G'/G'' = 0,4$) and after heating (weak gel) ($G'/G'' = 2,7$). Through these analyses, a possible synergy might be suggested, due to changes in the rheological properties when compared with galactomannan-skim milk without heating. In the circular dichroism spectra (CD) for the mixtures of galactomannan with whole casein, a significant variation in the signal intensity and wavelength shift for the minimal peaks was observed. For the mixtures with α , β e κ -casein, the κ -casein fractions gave rise to a greater intensity of the signals in the CD spectrum variation, followed by the β and α -casein fractions. Using transmission electronic microscopy (TEM), the galactomannan-whole casein mixtures or α , β e κ -casein fractions, the polysaccharide addition caused a protein particle retraction, with an increase of the spaces, where the galactomannan was excluded. Microstructure modifications were observed after galactomannan addition, with phase separation at high concentrations of one or others of the biopolymers, with the highest differences occurring in the order β , κ , α -casein. Size exclusion chromatography coupled to multiangle laser light scattering detectors (HPSEC-MALLS) was used for the determination of molecular weight, shape and interaction analysis. Galactomannan- α -casein and galactomannan- β -casein mixtures presented a similar profile to the galactomannan-whole casein system. The galactomannan- κ -casein mixture was different from the other fractions, but were observed in all the mixtures, differences intensity and signals shift compared with the biopolymers alone. This indicates a possible interaction, with a higher one between the galactomannan and purified casein fractions, in the order κ -casein, α -casein and β -casein.

Introdução

1. Introdução

Os polissacarídeos são polímeros constituídos por unidades monossacarídicas, unidas covalentemente por ligações glicosídicas, e de todas as substâncias orgânicas existentes, são os mais abundantes e amplamente distribuídos na natureza (Aspinall e Whyte, 1964; Aspinall, 1969).

São empregados principalmente na indústria alimentícia para conferir um aumento na viscosidade das soluções e auxiliar na formação de géis não covalentes, na estabilização de emulsões ou floculação de materiais dispersos, como quelantes, ligantes e impermeabilizantes, devido a características tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade hidrofílica (Sanderson, 1981). São derivados de fontes naturais, principalmente vegetais, não apresentam risco significativo à saúde associado ao seu uso em alimentos e podem apresentar vantagens no desenvolvimento da qualidade nutricional e de textura (Lillford e Norton, 1992; Sanderson, 1998).

Estes hidrocolóides podem ser usados em conjunto com outros componentes alimentícios para elaborar produtos com adequada qualidade, baixa caloria e isentos de gordura (Glicksman, 1991; Dickinson, 1995; Walter, 1998).

A maioria dos agentes formadores de gel utilizados pela indústria alimentícia em um amplo grau de aplicações são polissacarídeos e, recentemente, a extensão de seu uso está aumentando rapidamente pela demanda de alimentos mais convenientes e versões com baixo conteúdo em gordura dos produtos tradicionais (Oakenfull, 1998). Então, a química de carboidratos é de grande importância em estudos da relação entre a estrutura e as propriedades físico-químicas e funcionais (solubilidade, capacidade de enovelamento, viscosidade, formação de gel, coagulação, adesão, propriedades emulsificantes e de formação de espuma) destes biopolímeros. Formulações de alimentos, geralmente, contêm misturas de hidrocolóides desempenhando funções estruturais (Sanderson, 1981; Roller e Dea, 1992; Chronakis e Kasapis, 1993; Kasapis e Morris, 1993; Chronakis *et al.*, 1996; Manoj *et al.*, 1996; Zasytkin *et al.*, 1997; Walter, 1998; Schorsch *et al.*, 1999a e 1999b).

Além do amido, o polissacarídeo mais utilizado como fonte energética e agente espessante, outras gomas como galactomananas (guar e alfarroba), carragenanas, carboximetilcelulose (CMC) e xantana são também utilizadas. A escolha de um agente

espassante baseia-se, principalmente, nas propriedades reológicas e na estabilidade que o mesmo fornece à fase aquosa (Drohan *et al.*, 1997; Sanderson, 1998).

1.1. Galactomananas vegetais

As galactomananas vegetais são macromoléculas constituídas de uma cadeia principal de unidades β -D-manopiranosídicas ligadas glicosidicamente (1 \rightarrow 4), possuindo ramificações laterais de unidades de α -D-galactopiranosose em O-6 (Dea e Morrison, 1975). Ocorrem como polissacarídeos de reserva do endosperma de sementes, particularmente em espécies das famílias Mimosaceae (Leguminosae), Caesalpiniaceae e Fabaceae (Dea *et al.*, 1972; Dea e Morrison, 1975).

Destacam-se entre os polissacarídeos de reserva vegetal, pelas suas propriedades viscosantes e emulsificantes, pois apresentam altos rendimentos, que variam de 15 a 38% da massa seca da semente. Sua quantidade armazenada depende do tamanho relativo do endosperma (Whistler e Saarnio, 1957; Aspinall e Whyte, 1964).

Apesar das análises químicas destes polissacarídeos de sementes terem iniciado no fim do século XIX, em sementes de *Ceratonia siliqua*, atualmente galactomananas de inúmeras espécies vêm sendo estudadas, mas somente três são utilizadas para a produção em nível industrial: *Ceratonia siliqua* (alfarroba), com relação manose:galactose (M:G) de 4:1, *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) (M:G 1,5:1) e *Caesalpinia spinosa* (goma tara) (M:G = 3:1) (Chudzikowski, 1971; Dea e Morrison, 1975; Soni e Bose, 1985; Herald, 1986b; Kaup *et al.*, 1991; Garcia-Ochoa e Casas, 1992; Maier *et al.*, 1993, Kroeger *et al.*, 1993).

Estes polissacarídeos apresentam menor custo, quando comparados com a carragenana ou xantana, e interações sinérgicas com estes polímeros oferecem a possibilidade de novas funcionalidades com grande importância industrial (Zhan *et al.*, 1993).

A mais importante característica das galactomananas, principalmente na indústria de alimentos, é a sua capacidade de modificar as propriedades reológicas das soluções aquosas. Estes biopolímeros apresentam soluções altamente viscosas em baixas concentrações. São empregados como espessantes, formadores de gel quando em sinergia com outros biopolímeros, emulsificantes, estabilizantes, floculantes, ligantes e impermeabilizantes

(Whistler e Smart, 1953; Elfak *et al.*, 1977).

São adicionadas a uma variedade de produtos como sopas, molhos, maioneses, embutidos, queijos, geléias, sucos, iogurtes, pães, bebidas alcoólicas e alimentos congelados (Dea e Morrison, 1975; Kroger, 1976; Staub e Ali, 1982; Enriquez *et al.*, 1989; Neukon, 1989).

Diferenças estruturais entre as galactomananas, como a relação manose:galactose (M:G), por exemplo, afetam as propriedades funcionais destes biopolímeros. As galactomananas apresentam diferentes relações M:G. Tais variações dependem da fonte biológica e do método de extração utilizado (Enriquez *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2000; Chaubey e Kapoor, 2001; Fischer *et al.*, 2001).

As galactomananas utilizadas comercialmente, alfarroba e guar, apresentam relação M:G de 3,5:1 e 1,5:1, respectivamente, com cadeias laterais de galactose distribuídas de forma randômica, capazes de formar interações inter e intramoleculares e sinérese com relação a outras gomas alimentares. O guar apresenta, pela maior quantidade de unidades de galactose, maior solubilidade em água fria. As unidades de galactose são responsáveis pela solubilidade do polímero, ao passo que as unidades de manose pertencentes à cadeia principal estão relacionadas com a massa molar (Whistler e Daniel, 1985).

Petkowicz *et al.* (1998), através de estudos de modelagem molecular de galactomananas com diferentes graus de substituição (1:1, 2:1, 3:1 e 4:1), observou que o conteúdo de galactose e o padrão de distribuição destas unidades (ao acaso, alternado ou em blocos), afetam a conformação das galactomananas. Estes autores utilizaram cálculos teóricos de parâmetros que fornecem uma descrição quantitativa do tamanho ou dimensão da cadeia, como o comprimento de persistência (L_P), o raio de giro ($\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$), a razão característica (C_∞) e a distância ponta a ponta (r), simulando a substituição de unidades galactosil com diferentes padrões de distribuição na cadeia principal de manana, observando como esta substituição afeta a flexibilidade e comprimento espacial da cadeia.

Os resultados observados indicam que a inserção de unidades de galactose induzem uma importante diminuição do comprimento de cadeia calculada quando comparada com a cadeia de manana pura, com valores de razão característica (C_∞) variando de 47, para a manana pura, a 35, para uma galactomanana com um grau de substituição 5 (M:G 5:1). Para altos graus de substituição, porém, não se observou uma dependência do conteúdo de galactose, com valores de C_∞ próximos a 30, indicando um limite de contração da cadeia (Petkowicz *et al.*, 1998).

A influência da distribuição das cadeias laterais (alternada, em blocos ou ao acaso) foi analisada utilizando-se galactomananas com relações M:G 2:1 e 3:1, e ambas mostraram padrões semelhantes. No entanto o grau de flexibilidade aumentou na seguinte ordem: unidades alternadas > unidades distribuídas ao acaso > unidades em blocos (Petkowicz *et al.*, 1998). Estes autores observaram uma concordância entre os cálculos teóricos e os valores experimentais (espalhamento de luz e viscosimetria) sugerindo que ambos, métodos e estratégias usadas para a modelagem das galactomananas, descrevem corretamente o comportamento conformacional das cadeias.

Entre os polissacarídeos estudados pelo grupo de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, destaca-se a galactomanana de *M. scabrella*, que é composta por uma cadeia principal β -D-(1 \rightarrow 4) manopiranosídica, com 90% das unidades substituídas em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosose. Sua relação M:G e sua viscosidade intrínseca foram determinadas por Ganter (1988), com valores de 1,1:1 e $[\eta] = 890 \text{ mL/g}$, respectivamente, para a solução aquosa diluída de galactomanana de *M. scabrella* a 25 °C, caracterizando-a como um biopolímero altamente ramificado (Ganter, 1991; Ganter *et al.*, 1992a, 1992b, 1993, 1995 e 1997).

Lucyszyn (1994) realizou testes toxicológicos de dose letal 50% oral (DL₅₀) para a galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham e verificou que este polissacarídeo apresentava DL₅₀ em ratos em doses superiores a 6g/kg, enquadrando-se como produto fitossanitário da classe IV (segundo portaria n. 04 – DISAD/MS de abril de 1980), ou seja, praticamente atóxico. A DL₅₀ é a dose única (em miligramas) da substância administrada via oral, por quilograma de peso do animal, que causa a morte de 50% dos animais testados em até 14 dias após sua administração (Lucyszyn *et al.*, 2000).

O uso de fontes alternativas oriundas de espécies nativas para a produção de galactomananas vem sendo estudado pelo Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná há mais de dez anos, com a elucidação da estrutura e propriedades reológicas destas galactomananas. Ganter e Reicher (1999) realizaram estudos sobre a estrutura química e propriedades reológicas de galactomananas de diferentes espécies da família Mimosaceae (*M. scabrella* var. *aspericarpa*, *M. flocculosa*, *M. taibensis* e *M. bimucronata*) através de técnicas de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (¹³C-RMN), cromatografia de exclusão estérica de espalhamento de luz (“light scattering”) acoplada a detector de espalhamento de luz em multiângulos (HPSEC-MALLS) e

determinação da viscosidade em baixos valores de cisalhamento. Os autores observaram que não houve diferenças significativas entre as galactomananas das quatro espécies de *Mimosa* em relação ao grau de substituição por unidades de galactose (M:G \approx 1,1:1) e espectros de ^{13}C -RMN, mas através da cromatografia de exclusão estérica (HPSEC-MALLS) e análise da viscosidade observaram diferenças nas massas molares e propriedades reológicas das quatro espécies, em comparação com a galactomanana de *M. scabrella*.

Considerando a estrutura e propriedades reológicas além da disponibilidade deste recurso natural, as galactomananas das diferentes espécies estudadas no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais – UFPR apresentam potencial para o uso industrial. Além da galactomanana de *M. scabrella*, as de outras espécies, com diferentes períodos de produção de sementes (*M. scabrella* = novembro a março, *M. bimucronata* = abril a julho e *M. flocculosa* = julho a outubro) (Carvalho, 1994), podem prover sementes para a produção de galactomananas, de relação M:G semelhante, durante todo o ano. Como a solubilidade das galactomananas é dependente do grau de substituição por unidades de galactose (Dea, 1987), estes biopolímeros apresentam como vantagem sobre as galactomananas comerciais (guar e alfarroba) uma maior solubilidade em água (Ganter e Reicher, 1999).

1.1.1. *Mimosa scabrella* Bentham

A *M. scabrella* é uma planta leguminosa da família Mimosaceae, popularmente conhecida como bracatinga, perenifólia, com altura variando de 10 a 18 metros (Lorenzi, 1992; Carvalho, 1994). As árvores apresentam crescimento rápido além de extraordinária capacidade de regeneração natural, com florescimento a partir de oito meses de idade. O início efetivo de produção de sementes ocorre a partir de três anos de idade (Inoue *et al.*, 1984). A área de ocorrência natural se dá no sul do Estado de Minas Gerais (MG), no leste e sul de São Paulo (SP), no nordeste do Rio de Janeiro (RJ), no sul e centro-sul do Paraná (PR), no leste e sul de Santa Catarina (SC) e no nordeste do Rio Grande do Sul (RS). É uma espécie pioneira, e destaca-se por colonizar terrenos nus ou áreas degradadas, por via de suas sementes. Possui uma longevidade de até 25 anos (Carvalho, 1994). A bracatinga é considerada uma das espécies de crescimento inicial mais rápido do sul do Brasil. Na região

metropolitana de Curitiba-PR, a produtividade anual média em rotação de sete anos é estimada em 12,5 a 15 m³/ha. sob regeneração natural (Carvalho, 1994).

1.2. Interações galactomanana-proteína

Além do uso isolado, os polissacarídeos podem interagir com outros biopolímeros tais como proteínas. Muitos estudos têm se concentrado na investigação do mecanismo destas interações (Dickinson e Euston, 1991; Dickinson, 1995 e 1998; Zasytkin *et al.*, 1997; Walter, 1998; Antonov *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 1999a, 1999b e 1999c; Garti *et al.*, 1999; Schorsch *et al.*, 1999a e 1999b; Rayment *et al.*, 1998 e 2000).

A combinação entre biopolímeros tem sido comercialmente explorada quanto à possibilidade de interações sinérgicas, realçando certas características reológicas que permitam aperfeiçoar determinadas qualidades desejáveis para o produto industrializado e freqüentemente reduzir custos de fabricação (Williams e Phillips, 1995).

Como as dispersões de polissacarídeos geralmente apresentam viscosidades maiores que as constituídas por proteínas, espera-se que a relação polissacarídeo-proteína além de modificar a solubilidade, modifique também a viscosidade das suas misturas (Schmitt *et al.*, 1998). São necessárias mais pesquisas para o entendimento de como a funcionalidade dos complexos polissacarídeo-proteína podem ser totalmente otimizadas em formulações de ingredientes e alimentos sujeitos a uma ampla variação de condições de processamento (Dickinson, 1998; Roberts *et al.*, 2000).

As principais vantagens para o uso de complexos polissacarídeo-proteína são, em primeiro lugar, sua natureza biológica, permitindo seu uso em produtos com limitado potencial alérgico, em segundo lugar, estas macromoléculas são inteiramente biodegradáveis, o que torna estes complexos atraentes particularmente a dois campos industriais: a indústria de alimentos e a de cosméticos (Schmitt *et al.*, 1998).

Durante as últimas três décadas, observou-se um crescente interesse em misturas contendo proteínas e polissacarídeos. Com isto ocorreu um aumento do número de hidrocolóides usados como aditivos em alimentos, como por exemplo a xantana, gelana, proteínas concentradas ou isoladas de soja e do soro do leite, β -lactoglobulina, glúten, além

do desenvolvimento de novos métodos de processamento, como aquecimento em microondas, extrusão termoplástica e tratamentos com alta pressão (Zasytkin *et al.*, 1997; Datta e Deeth, 1999; Paquin, 1999).

Os dois principais tipos de polímeros alimentares encontrados em emulsões óleo em água são os polissacarídeos e as proteínas, e alguns produtos contêm ambos os tipos de macromolécula (Dickinson e Euston, 1991; Dickinson, 1995; Dickinson, 1998; Oakenfull, 1998). As soluções polissacarídeo-proteína são, normalmente, mais eficientes como estabilizadores de emulsão do que os biopolímeros individuais, na substituição de gordura (agentes responsáveis pelo aroma, sabor e textura), além de outros usos como purificação macromolecular, microencapsulação e síntese de biomateriais (enxertos artificiais e filmes comestíveis) (Dickinson, 1995; Zasytkin *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 1998).

Galactomananas vêm sendo utilizadas como substitutos de gordura em sorvetes com baixo teor de gordura e queijos macios em versões “light”. A galactomanana de alfarroba, em particular, fornece uma textura desejável única, que acredita-se ser resultado de uma formação de complexo entre a galactomanana com polímeros da caseína do leite (Herald, 1986a).

Reações de vários hidrocolóides com leite desnatado e com proteínas de leite purificadas foram estudadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) e centrifugação. Das gomas testadas, somente a carragenana, furcelana (κ -carragenana parcialmente sulfatada) e alginato alteraram o padrão eletroforético das proteínas. As misturas das galactomananas de guar e/ou alfarroba com leite desnatado produziram um sedimento (“overnight” a 4 °C), entretanto apresentaram resistência à sedimentação por centrifugação. O precipitado sedimentado apresentou-se como uma substância fluida, comparado com as misturas carragenana-leite desnatado. De modo semelhante, as galactomananas causaram a sedimentação da caseína, sugerindo uma ligação muito fraca entre os biopolímeros (Grindrod e Nickerson, 1968). Devido aos resultados mais significativos terem sido em relação à interação das proteínas do leite com outros polissacarídeos, a literatura não apresentou investigações mais detalhadas sobre a interação galactomanana-proteínas do leite até a meados da década de 80.

Atualmente, emulsões com baixo conteúdo em gordura estão sendo desenvolvidas através da utilização de sistemas alternativos contendo proteínas e polissacarídeos em combinação com vários métodos (microprecipitação e microparticulação) para ligar partículas de gordura dispersas, dando origem a emulsões que teoricamente podem conter pouco ou

nenhum conteúdo em gordura (Chronakis e Kasapis, 1993; Dickinson, 1995; Schmitt *et al.*, 1998; Walter, 1998). A técnica de microprecipitação resulta da formação de um complexo de coacervação (precipitação) entre polissacarídeos e proteínas em sistemas diluídos através do ajuste de pH dos complexos. A microparticulação consiste em uma microprecipitação seguida por uma fragmentação mecânica dos complexos para diminuir seu tamanho e obter um produto homogêneo (Schmitt *et al.*, 1998).

1.2.1. Mecanismos de interação envolvidos

A estabilidade total e a textura dos colóides em alimentos depende não somente das propriedades funcionais de biopolímeros individuais, mas também da natureza e da força das interações polissacarídeo-proteína. Algumas destas propriedades poderiam ser melhor elucidadas se a estrutura dos complexos fosse bem conhecida (Schmitt *et al.*, 1998; Nishinari *et al.*, 2000). Dependendo da estrutura química dos biopolímeros e das condições em solução (temperatura, pH, força iônica, massa molar, razão polissacarídeo-proteína, carga dos biopolímeros), estas interações podem ser atrativas ou repulsivas, fracas ou fortes, específicas ou não específicas (Dickinson e Galazka, 1992; Dickinson, 1993; Delben e Stefancich, 1998; Schmitt *et al.*, 1998). De um modo geral, a interação entre polissacarídeos e proteínas pode se dar de três maneiras: associação forte, fraca ou nenhuma associação.

Interações atrativas fortes podem ocorrer entre proteínas positivamente carregadas e polissacarídeos aniônicos, especialmente em baixa força iônica. Interações atrativas fracas podem ocorrer em proteínas não carregadas ou carregadas negativamente e polissacarídeos neutros ou carregados. Em qualquer sistema particular, a interação polissacarídeo-proteína pode mudar de uma rede repulsiva para uma rede atrativa, e vice-versa, mudando-se as condições de temperatura, pH ou força iônica (Dickinson, 1993).

A força de complexação de um sistema polissacarídeo-proteína depende também da distribuição de grupos ionizáveis na superfície da proteína, facilidade de desenovelamento da sua estrutura nativa, flexibilidade e densidade de carga do polissacarídeo (Dickinson, 1998).

Além dos parâmetros químicos, o controle da formação de complexos polissacarídeo-proteína é dado por parâmetros físicos e mecânicos como temperatura, velocidade de

cisalhamento, tempo e pressão os quais podem afetar a formação e a estabilidade destes complexos (Matsudomi *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1998; Dickinson e James, 2000).

A formação de complexo entre proteínas do leite e polissacarídeos carregados se dá, principalmente, como resultado de interações eletrostáticas, mas isto não significa que os polímeros devem apresentar cargas opostas para ocorrer associação. É bem estabelecido que as interações atrativas polissacarídeo-proteína podem ser funcionalmente eficientes em valores de pH bem acima do ponto isoelétrico da proteína, especialmente para polissacarídeos altamente sulfatados (Dickinson, 1998; Dickinson e James, 2000; Maroziane e de Kruif, 2000).

Dada a importância das interações eletrostáticas, os parâmetros físico-químicos que afetam tais interações como pH, força iônica, densidade de carga do polissacarídeo, concentração do polissacarídeo e relação polissacarídeo-proteína têm influência significativa na formação destes complexos (Schmitt *et al.*, 1998). Além disso, a neutralização de carga pelos contra-íons pode ocorrer. Em baixa força iônica, a concentração do contra-íon tem somente um pequeno efeito na coacervação, e o número de cargas presentes no polímero é suficiente para permitir interações eletrostáticas. Ao contrário, em alta concentração de sal, a carga global dos biopolímeros é reduzida pela interação com os contra-íons, resultando em uma diminuição da atração eletrostática entre as macromoléculas (Schmitt *et al.*, 1998).

Maroziane e de Kruif (2000), em estudos sobre a interação pectina-caseína através de técnicas viscosimétricas e de espalhamento de luz, observaram, em $\text{pH} = 6,7$, uma floculação-depleção da micela de caseína. Este mecanismo envolve a exclusão das cadeias de pectina do espaço entre as partículas coloidais (micelas de caseína), que induz a uma interação de atração efetiva entre as partículas coloidais. Se a atração é forte o suficiente, uma separação de fases ocorre.

Antonov *et al.* (1999), em estudos da interação entre sistemas compostos por goma guar e caseína, apresentam, como hipótese de um possível mecanismo de interação entre estas biomoléculas, a existência de um pequeno número de grupos funcionais carregados positivamente nas moléculas de guar, e a formação de complexo poderia ser devida a uma interação iônica fraca entre a caseína carregada negativamente ($\text{pH} > \text{pI}$) e o guar carregado positivamente, que enfraquece em presença de sal. Os autores ainda comentam que estes complexos não podem ser formados quando a carga da caseína é positiva ($\text{pH} < \text{pI}$), e numa situação onde o $\text{pH} = \text{pI}$, estes biopolímeros podem se dissociar quando a força iônica é

desprezível. Estes grupos funcionais carregados positivamente presentes no guar citados por Antonov *et al.* (1999) podem se tratar de proteínas associadas à cadeia do polissacarídeo, que estão influenciando a interação polissacarídeo-proteína.

Sierakowski *et al.* (2002) estudaram o comportamento de adsorção de galactomananas oxidadas (*Cassia fastuosa* e *Leucaena leucocephala*) e sua interação com a soro albumina bovina (BSA) através de medidas elipsométricas, e observaram uma forte influência do pH sobre a interação dos biopolímeros. Segundo estes autores, em pH = 4,0, existe um máximo na quantidade adsorvida, causada pela forte atração eletrostática entre o BSA e as galactomananas oxidadas. Todavia, nenhum efeito da força iônica sobre a adsorção foi observado. A galactomanana oxidada de *L. leucocephala* foi um substrato mais atrativo para o BSA, indicando que interações favoráveis entre os grupos carboxila e os segmentos de BSA atuam no processo de adsorção.

Khokhlov e Nyrkova (1992) observaram em misturas contendo cadeias neutras e polieletrólitos fracamente carregados que a presença de mesmo uma pequena fração de cargas em um polímero leva, em muitos casos, a um substancial aumento na compatibilidade entre as biomoléculas. O aumento da compatibilidade é também observado para a mistura de moléculas rígidas e flexíveis se um ou ambos os componentes carregam alguma fração de carga.

A galactomanana de *M. scabrella* apresenta um conteúdo protéico de aproximadamente 5% e 2,6% estimados pelos métodos de Hartree (1972) e Peterson (1977), respectivamente (Perissutti, 1999). Bresolin *et al.* (1996 e 1997) sugerem que este conteúdo protéico presente nas amostras da galactomanana de *M. scabrella* deve-se a uma ligação carboidrato-proteína, que pode ser iônica, covalente ou por adsorção.

Estudos de géis compostos pela mistura galactomanana-xantana discutem que a presença deste conteúdo protéico ligado à galactomanana de *M. scabrella* apresenta uma contribuição à força iônica total da solução, e o aumento do conteúdo de proteínas, que depende da pureza e concentração da galactomanana, aumenta conseqüentemente a temperatura de transição conformacional (T_m) da xantana. (Bresolin, 1998; Bresolin *et al.*, 1999).

Os sistemas polissacarídeo neutro-proteína parecem mostrar uma fraca associação em baixas forças iônicas e em valores de pHs diferentes do pI da proteína (Dickinson e Euston, 1991; Grinberg e Tolstoguzov, 1997). Alguns autores sugerem que os sistemas com misturas

de polissacarídeos neutros apresentam duas fases somente em condições de força iônica $> 0,09-0,2$ (Woodside *et al.*, 1966; Antonov *et al.*, 1987). Antonov *et al.* (1999), usando espalhamento de luz, dicroísmo circular (DC), velocidade de sedimentação, viscosimetria e análises em diferentes solventes, mostraram que, para o sistema caseína e guar, houve separação de fases somente em forças iônicas acima de $0,09 - 0,2$ mol/L. No entanto, não foi excluída a possibilidade de formação de complexos proteína-polissacarídeo em fase única.

Goff *et al.* (1999) examinaram a influência estrutural das gomas guar e alfarroba em soluções de sacarose e em soluções sacarose-leite em pó desnatado. Após o congelamento e flutuação de temperatura, foi avaliada a influência no controle da recristalização do gelo nestas soluções por microscopia de fluorescência (através de uma sonda contendo um corante fluorescente (isotiocianato de rodamina), que se liga covalentemente ao guar e à alfarroba). Estes autores observaram que, na solução de sacarose, não houve nenhuma diferença no crescimento dos cristais de gelo entre a solução não estabilizada e a que apresentou alfarroba, todavia, aquela que continha o guar ofereceu uma maior proteção contra o crescimento dos cristais de gelo.

Como o grau de incompatibilidade é influenciado pela qualidade do solvente, é possível passar de uma completa compatibilidade para uma compatibilidade limitada pelo aumento da qualidade do solvente, que é controlada por mudanças no pH, força iônica e temperatura (Schorsch *et al.*, 1999b)

Schorsch *et al.* (1999a e 1999b) observaram uma separação de fases em sistemas contendo galactomanana de guar e alfarroba em soluções de sacarose-proteínas do leite, indicando uma incompatibilidade termodinâmica entre o sistema polissacarídeo-proteína.

A mistura de galactomanana de *M. scabrella*-leite em pó desnatado ($10:100$ g/L) em água e soluções salinas (NaCl e CaCl₂) foi investigada por Perissutti *et al.* (Perissutti, 1999; Perissutti *et al.*, 2000) através de experimentos reológicos estáticos (curvas de viscosidade e testes de “creep and recovery”) e oscilatórios (medida da característica sólida e viscosa, G' e G'', respectivamente). Os resultados apontaram um efeito sinérgico, que foi destruído pela adição de NaCl na concentração de $0,01$ e $0,1$ mol/L, em concordância com resultados obtidos utilizando-se galactomanana de guar por Antonov *et al.* (1999). Somente na presença de CaCl₂ $0,01$ mol/L, a interação foi favorecida, provavelmente devido à influência deste sal sobre as micelas de caseína do leite (Perissutti *et al.*, 2000).

Normalmente, polissacarídeos lineares são mais incompatíveis com proteínas que os

polissacarídeos ramificados, provavelmente devido ao fato destes últimos estarem na forma de “random coil” e serem menores que os seus homólogos lineares com o mesmo grau de polimerização (Tsvetkov *et al.*, 1964). Quanto menor o tamanho das macromoléculas, maior é a concentração de ligações e menor a incompatibilidade (Tompa, 1956; de Gennes, 1979).

Em estudos prévios realizados pelo grupo de Química de Carboidratos Vegetais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (Lucyszyn, 1994; Lucyszyn *et al.*, 2000), observou-se que, na formulação de pudim, com a substituição de amido por galactomanana de *M. scabrella*, ocorreu um aumento na viscosidade do sistema que continha leite em comparação ao mesmo em solução aquosa. Foi observado também que o sistema contendo galactomanana na formulação causou uma diminuição da sinérese em relação ao produto comercial. Esta diminuição da sinérese é uma importante propriedade em produtos comerciais, como pudins e sorvetes, que são estocados geralmente por longos períodos e devem manter suas características originais, sem a liberação indesejável de água. Testes sensoriais de análise descritiva quantitativa e de escala Hedônica realizados para os pudins mostraram que os com sabor baunilha, contendo substituição de amido por galactomanana em até 2,5%, foram aceitos pelo painel sensorial, e que pudins elaborados com 1% de substituição por galactomanana apresentaram médias superiores nos parâmetros aroma e textura em relação aos produtos comerciais.

1.3. Leite e seus constituintes

Apesar do leite apresentar a aparência de um simples líquido, sua estrutura é muito complexa e não conhecida totalmente. O conhecimento das características físico-químicas deste fluido biológico é necessário para a melhor compreensão das mudanças que ocorrem durante o processamento e as propriedades de produtos intermediários e finais derivados do leite (Vélez-Ruiz e Cánovas, 1997).

Os componentes do leite são classificados em sete grupos: proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais, pigmentos, vitaminas e enzimas, e componentes variados. Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma solução complexa de sais, lactose e outros componentes orgânicos hidrofílicos menores, em que as proteínas do soro, micelas corpusculares de caseína

e glóbulos de gordura são dispersos (Meyer, 1960).

Estes constituintes interagem de diferentes maneiras, dando origem a diferentes microestruturas, dependendo do processo de manufatura aplicado para elaborar cada produto derivado, e estas controlam as propriedades físico-químicas tais como a viscosidade, elasticidade, textura, susceptibilidade à sinérese, firmeza e espalhamento (Vélez-Ruiz e Cánovas, 1997).

Os componentes mais importantes do leite são as proteínas e os lipídeos, e suas modificações físico-químicas afetam a estrutura e o comportamento global dos derivados. Os lipídeos são compostos principalmente por triacilgliceróis, apesar de existirem também pequenas quantidades de fosfolipídeos e esteróis (Meyer, 1960).

As proteínas possuem a capacidade de formar um gel composto por uma matriz protéica contendo caseína como elemento estrutural principal, e também componentes adicionais (proteínas do soro do leite, glóbulos de gordura, bactérias do ácido láctico e outros ingredientes) (Vélez-Ruiz e Cánovas, 1997).

A caseína é a proteína presente em maior quantidade na forma de partículas globulares chamadas micelas, que são compostas por submicelas unidas por pontes de fosfato de cálcio (figura 1), e apresenta três frações denominadas α_s (α_{s1} e α_{s2}), β e κ -caseína. Estas frações diferem entre si por suas massas molares, taxa de migração em campo elétrico e conteúdo em fósforo, estando presentes nas submicelas na proporção 4:3:1 (Meyer, 1960, Clark e Ross-Murphy, 1987). As frações da caseína bovina são não globulares e têm pouca estrutura secundária ou terciária regulares para serem rompidas. A fração β -caseína em solução adota uma conformação próxima a um emaranhado ao acaso e não mostra nenhuma transição entre 30 e 100 °C.

A κ -caseína, apesar de estar presente em uma pequena porcentagem, é um constituinte altamente significativo, conhecido por promover estabilidade às micelas contra agregação (Clark e Ross-Murphy, 1987).

As micelas de caseína constituem uns dos mais importantes componentes do leite, e que tornam possível formular uma variedade de produtos com características muito diferentes, variando de líquidos (leite evaporado) e semi-líquidos (iogurtes) para semi-sólidos (queijo). A habilidade da caseína em interagir com proteínas do soro do leite, agregar e hidrolisar sob os efeitos de baixo pH e aquecimento, e presença de enzimas proteolíticas são as mais importantes propriedades do leite na produção de laticínios (Kalab, 1985). A importância da

caseína na indústria de laticínios e em muitos produtos alimentares está em suas propriedades funcionais, dentre as quais seu papel emulsificador, que é resultado de uma combinação de diversos fatores: alta massa molar, grande flexibilidade molecular e forte caráter hidrofóbico.

A caseína pode existir em diferentes estados em solução aquosa, variando de pequenas macromoléculas dissolvidas em um comportamento de emaranhado, até partículas coloidais com 300 nm de tamanho. Em produtos lácteos comerciais, a proteína ocorre tanto como agregado (micelas), quanto como camadas emulsificantes na superfície coloidal.

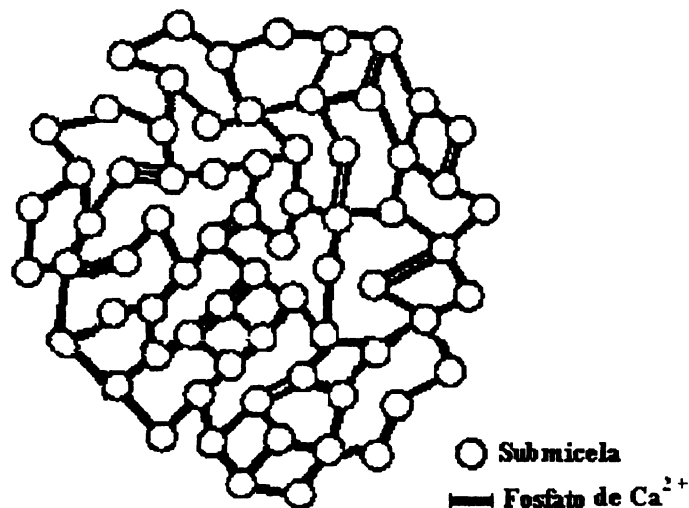


Figura 1: Modelo proposto para a estrutura das micelas de caseína em solução (adaptado de Clark e Ross-Murphy, 1987).

O fenômeno de agregação das moléculas de caseína em baixos valores de pH ($\text{pH} \approx 4,6$) não ocorre somente por condições de diminuição da carga das micelas, mas por um processo que envolve mudanças na estrutura original destas. Quando o pH diminui do valor normal do pH do leite ($\text{pH} \approx 6,6$), o material inorgânico (fosfato de cálcio amorfo) dentro da estrutura da micela dissolve-se, e alguns dos componentes da proteína também tornam-se solubilizados. Como o pH continua a cair, uma seqüência complexa de eventos ocorre, finalizando com a reagregação da parte protéica do sistema, e formação de novas partículas de

proteína floculada em uma rede particulada em grumos.

As proteínas do soro do leite representam cerca de 20% do conteúdo de proteínas contidas no leite desnatado. Estas proteínas não são precipitadas pela acidificação em pH 4,6 e podem ser separadas em duas frações denominadas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina (Meyer, 1960).

No leite processado, enzimas, gases, minerais, vitaminas, agentes emulsificantes, acidulantes e microrganismos são constituintes secundários adicionados ou desenvolvidos durante o processo de manufatura e podem promover interações com os componentes primários (Vélez-Ruiz e Cánovas, 1997).

1.4. Metodologia utilizada na análise de interações poliméricas

Pesquisas na área de alimentos são necessárias para o conhecimento das propriedades reológicas e seu relacionamento com a microestrutura dos alimentos. As técnicas reológicas em conjunto com técnicas como microscopia eletrônica, cristalografia, ressonância magnética nuclear (RMN), dicroísmo circular (DC) e espalhamento de luz podem fornecer informações importantes sobre as propriedades funcionais dos alimentos (Payens, 1971; Ashton *et al.*, 1975; Kalab e Emmons, 1975; Clark e Ross-Murphy, 1987; Aguilera e Kessler, 1989; Aguilera e Kinsella, 1991; Clark, 1991; Horne, 1991; Hart *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1997; Delben e Stefancich, 1998; Kapoor *et al.*, 1998; Newman e Hemmingson, 1998, Goff *et al.*, 1999; de Kruif e Tuinier, 1999).

As técnicas físicas aplicadas para o estudo dos géis de biopolímeros podem ser divididas naquelas que essencialmente examinam os detalhes da ligação cruzada a nível molecular, e aquelas que sondam a grandes distâncias (figura 2). Os métodos espectroscópicos, incluindo infra-vermelho, espectroscopia de Raman e RMN, e métodos quirópticos (rotação óptica (ORD) e DC) são sondas que operam essencialmente sobre moléculas, e podem fornecer informações imprescindíveis sobre a estrutura molecular do complexo polissacarídeo-proteína. Distâncias sensivelmente maiores, isto é, > 10 nm, com variação de 10 – 2000 nm, são tipicamente avaliadas por técnicas de Raio-X, DC, infra-vermelho (IR) e HPSEC-MALLS com detectores de espalhamento de nêutrons em baixo

ângulo (SANS). Todas estas técnicas são muito sensíveis e podem detectar pequenas variações na estrutura do biopolímero (Schmitt *et al.*, 1998). Acima da escala de distância de 2000 nm, atuam as sondas estruturais, incluindo microscopia óptica e eletrônica, e medidas mecânicas (análises reológicas) que, essencialmente, monitoram a continuidade da rede sobre dimensões macroscópicas (sondas supramoleculares) (Clark e Ross-Murphy, 1987).

A maioria dos experimentos referentes à determinação da estrutura dos complexos polissacarídeo-proteína são baseados em técnicas de investigação indiretas. O espalhamento de luz, por exemplo, é utilizado para caracterizar o tamanho dos complexos, mas pode ser utilizado, juntamente com outras técnicas como a calorimetria diferencial de varredura (DSC), para dar informações sobre a possível estrutura dos complexos (Schmitt *et al.*, 1998).

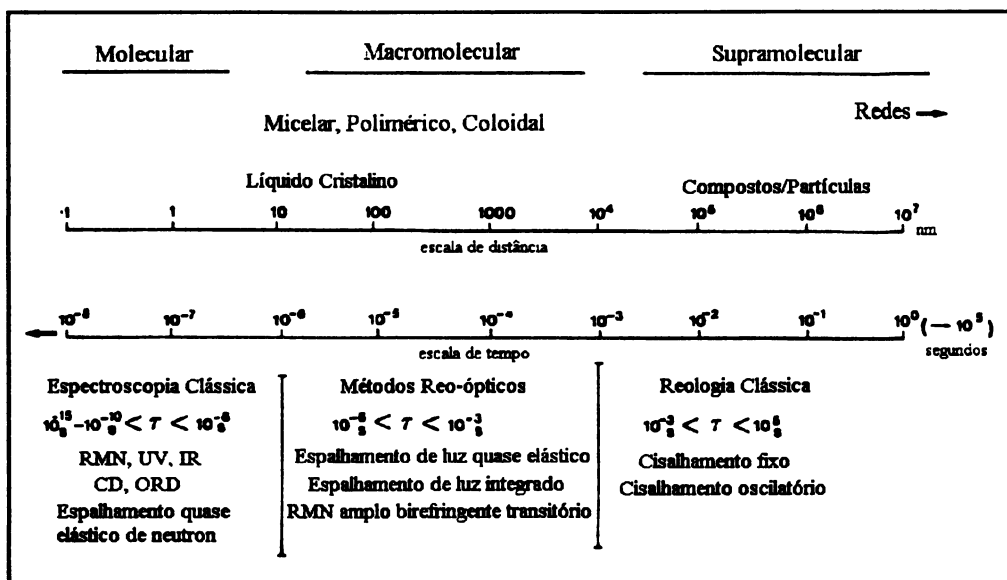


Figura 2: Escalas de tempo e distância molecular, macromolecular e supramolecular e técnicas utilizadas como sondas (Clark e Ross-Murphy, 1987).

Estudos de relaxamento de próton através de RMN de hidrogénis e fibras alimentares têm sido reportados recentemente na literatura. Paradossi *et al.* (1997) estudaram o comportamento de relaxamento das moléculas de água dentro de um sistema constituído por quitosana-ciclodextrina através de experimentos de tempos de relaxamento longitudinal (τ_1) e transversal (τ_2) por ressonância magnética nuclear de próton (¹H-RMN), e verificaram que o

estudo das propriedades da água envolta na matriz do gel pode fornecer informações comparativas de algumas propriedades relevantes do sistema, como por exemplo as interações da rede com a água. Neste estudo, observou-se que os géis de quitosana-ciclodextrina são formados por ligações covalentes cruzadas, com dois tipos de água com diferentes modos de relaxamento presentes na rede. Ambos os tipos de água (moléculas de água ligadas ao gel e moléculas de água confinadas nos poros do gel) submetem-se a uma troca de prótons com a matriz e a energia do processo é regulada por interações do tipo pontes de hidrogênio (Paradossi *et al.*, 1997). Estes autores salientam que se pode fazer uma correlação direta entre as medidas de relaxamento e as propriedades estruturais dos géis em estudo. O relaxamento longitudinal τ_1 pode ser considerado como um parâmetro empírico que reflete o estado do solvente na matriz do gel. Um valor assintótico de $\tau_1 \approx 2,5$ s à temperatura ambiente é característico de uma massa de água. Qualquer valor de τ_1 menor que o assintótico é um indicativo de uma heterogeneidade no meio em que a água é confinada. O relaxamento transversal τ_2 oferece uma análise mais detalhada em termos de processos de transferência nuclear, fornecendo informações sobre as interações gel-solvente. A rede do gel é caracterizada por um mecanismo de relaxamento transversal de dois componentes relativos a meios estruturalmente diferentes compostos por moléculas de água, indicados pelos tempos de relaxamento τ_2 , estudados em uma variação de temperatura de 4 a 50 °C. Entre 4 e 18 °C, o intercâmbio entre os prótons da matriz e da água prevalece em interações dipolares inter e intramoleculares da água confinada nos poros da rede do gel, resultando em uma marcada mudança na inclinação de τ_2 com a temperatura (Paradossi *et al.*, 1997).

Hricovini *et al.* (1997) realizaram estudos de relaxamento através de ^{13}C -RMN de uma glicosaminoglicana com estrutura $\rightarrow 4$)- β -D-GlcA(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc(1 \rightarrow de *E. coli* K5, que oferece a possibilidade de produção de compostos como heparina e heparana-sulfato através de modificação química e enzimática. Estes autores observaram, através de medidas de relaxamento heteronuclear em três campos magnéticos diferentes, que a movimentação global da K5 em solução aquosa é anisotrópica, e a presença de ácido glucurônico nesta molécula resulta numa estrutura mais rígida, diferente de outras glicosaminoglicanas, confirmado pelos valores do parâmetro de ordenamento (S^2 – extensão de movimentação interna), revelando movimentações internas mais limitadas para o polissacarídeo.

Newman e Hemmingson (1998) estudaram a interação molecular entre goma de

alfarroba e celulose através da análise dos espectros de ^{13}C -RMN e dos tempos de relaxamento das amostras, utilizando quatro critérios para esta análise: 1) respostas relativas à polarização cruzada e seqüências de excitação de pulso único, 2) mudanças nos deslocamentos químicos dos sinais assinalados para a galactomanana, 3) mudanças nas constantes de tempo de relaxamento dos spins de próton para a galactomanana, e 4) alargamento dos sinais de RMN assinalados para a celulose. Através dos experimentos de tempo de relaxamento, os autores observaram uma diferença de oito vezes no tempo de relaxamento τ_1 da mistura galactomanana-celulose em relação à galactomanana isolada para o sinal 102 ppm (referente ao C1 da galactomanana), indicando ambientes muito diferentes. Os valores de τ_1 encontrados para 89 ppm (referente à celulose) são muito similares aos do sinal 102 ppm, podendo ser explicados em termos de difusão de spin de próton entre a celulose e a galactomanana aderida. Nesta situação, a magnetização em ambos os domínios torna-se depletada em taxas similares durante a medida de τ_1 (Newman e Hemmingson, 1998). Segundo estes autores, tal interação parece envolver a maioria das unidades manosil da cadeia principal da manana (70% aproximadamente), mas não as unidades de galactosil.

Goff *et al.* (1999) estudaram os sistemas galactomanana de alfarroba e guar com proteínas do leite em soluções contendo sacarose após o congelamento, e em ciclos de temperatura (18 a 10°C) através de microscopia de fluorescência, utilizado-se um corante fluorescente (isotiocianato de rodamina) que ligou-se à galactomanana. Foi observado que a galactomanana de alfarroba produziu uma estrutura em rede semelhante a um gel ao redor dos cristais de gelo, que se tornava cada vez mais distinta com a repetição dos ciclos de temperatura. Esta rede não era evidente quando se utilizou a goma guar no sistema. A análise das imagens da distribuição do tamanho dos cristais de gelo mostrou que a alfarroba fornecia maior resistência à recristalização que a goma guar.

Nos sistemas contendo sacarose e leite em pó desnatado, foram observados os mesmos perfis, mas com um aumento menor do tamanho dos cristais de gelo do que nos sistemas sem leite em pó, e ambas as galactomananas promoveram uma separação de fases do sistema (Goff *et al.*, 1999).

A adição de carragenana ao sistema galactomanana-proteína do leite resultou em uma redução na extensão da separação de fases anteriormente observada, mas as soluções contendo carragenana apresentavam maior recristalização. Os autores sugerem que a redução na recristalização observada com a adição das galactomananas de alfarroba e guar resultou da

formação de uma rede contínua de polímero e heterogeneidade estrutural na fase não congelada (Goff *et al.*, 1999).

Schorsch *et al.* (1999b), em estudos de sistemas galactomanana de alfarroba-proteínas do leite contendo sacarose, através de microscopia confocal, microscopia eletrônica de transmissão, técnicas reológicas e espalhamento de luz laser em multiângulos, observaram que, a uma temperatura de 5 °C e pH \approx 6,8, as micelas de caseína são altamente incompatíveis com a galactomanana de alfarroba. As micelas de caseína, que são negativamente carregadas em condições normais, parecem não se agregar, como resultado do processo de separação de fases.

Ferragut e Chirald (1996) estudaram a microestrutura de sistemas contendo leite em pó desnatado e galactomanana de alfarroba em emulsões óleo-em-água com baixo teor de gordura, e através dos resultados obtidos pelas análises reológicas e de MET, observaram que a interação entre galactomanana-proteína de leite reflete um efeito de sinergismo na construção da estrutura da emulsão, relacionado com sua consistência. Os autores ainda comentam que a presença de sal parece ter um papel importante, provavelmente favorecendo a associação macromolecular, pela neutralização dos grupos iônicos das proteínas, ou diminuição do conteúdo de água disponível para a hidratação do polímero.

Estas interações podem ser responsáveis pelo estabelecimento de uma rede de polissacarídeo-proteína na fase aquosa, e nas multicamadas interfaciais na superfície das gotículas. A flocculação de gotículas e micelas de caseína podem também apresentar um importante papel nas propriedades reológicas e estruturais das emulsões (Ferragut e Chirald, 1996).

Tendo em vista o exposto acima, as técnicas utilizadas para o estudo da interação polissacarídeo-proteína estão descritas nos itens a seguir.

1.4.1. Técnicas reológicas

Reologia é a ciência da deformação e comportamento de fluxo da matéria, e está relacionada com a tensão que age sobre um corpo e a resultante deformação causada. As propriedades físico-químicas dos polissacarídeos, entre elas a massa molar, grau de

hidratação, interação intra e intermolecular, bem como a temperatura, pH e presença de íons, alteram a reologia das soluções (Krumel e Sarkar, 1975).

Para fluidos simples, o estudo da reologia envolve a medida da viscosidade, sendo que esta depende primeiramente da temperatura e eventualmente da pressão hidrostática. A maioria dos polímeros apresentam um comportamento dinâmico que situa-se entre o caráter elástico e viscoso, sendo denominados viscoelásticos (Tager, 1978; Ferry, 1980; Schramm, 1994).

1.4.1.1. Aplicação da viscosimetria no estudo de interações poliméricas

A análise de curvas de fluxo é uma poderosa ferramenta para o estudo de sistemas poliméricos líquidos, fornecendo informações importantes sobre a presença de interações ao se fazer a comparação do comportamento de fluxo dos sistemas isolados e de suas misturas. É possível, ainda, utilizar inúmeras variações nas condições do sistema como mudanças no pH, força iônica, temperatura, composição individual e total, avaliando-se o seu impacto no comportamento do sistema, permitindo inferir conclusões sobre a presença e a natureza das interações.

Antonov *et al.* (1999), através de curvas de fluxo, observaram no sistema caseinato de sódio-goma guar que houve uma diferença significativa nos valores de viscosidade absoluta da mistura em relação à solução de galactomanana isolada. O comportamento de “shear thinning” das duas amostras é idêntico, mas a mistura mostra um platô Newtoniano inicial apreciavelmente maior que a solução de goma guar isolada. Através das análises reológicas e do emprego de outras técnicas como espalhamento de luz, DC, velocidade de sedimentação e análises em diferentes solventes, estes autores concluíram que há formação de complexos proteína-polissacarídeo com ligações fracas, as quais poderiam ser destruídas pelo aumento da força iônica.

Kök *et al.* (1999) em estudos sobre a comparação entre a composição e as propriedades reológicas durante o processamento térmico da alfarroba crua e refinada, utilizando-se um reômetro equipado com uma célula de alta pressão observaram que, na alfarroba crua, a fração particulada provavelmente continha uma glicoproteína com um alto teor de arabinose

($\approx 40\%$) e o sobrenadante constituído de uma galactomanana com relação M:G de 3,7:1. Através da análise de viscosidade com variação da temperatura, foi observado que, apesar da viscosidade inicial da alfarroba crua ser menor que a alfarroba refinada, ambas as amostras mostraram aumento na viscosidade após 45 °C, com valores máximos na temperatura de 65 °C. Uma forte dependência da temperatura para a alfarroba purificada, em comparação com a alfarroba crua, também foi observada, confirmando que existem diferenças no grau de degradação destas amostras, o que se acredita ser resultado da presença de materiais na amostra não purificada que protejam a galactomanana contra a degradação. Os autores sugeriram que o componente protéico pode desempenhar um importante papel, pois os aminoácidos são conhecidos por serem efetivos na captura de radicais livres envolvidos no processo de degradação a pH neutro (Pilnik e McDonald, 1968; Bradley e Mitchell, 1988).

As propriedades reológicas das misturas galactomanana (G) de *M. scabrella* com relação M:G 1,1:1 (Ganter *et al.*, 1993) com leite desnatado (LD) e leite integral (LI) foi investigado (Perissutti, 1999). As curvas de viscosidade para a mistura de galactomanana (1 a 20 g/L) e amostras de leite, mostraram o início do comportamento pseudoplástico em concentrações menores (2 g/L) do que as soluções de galactomanana isolada (3,6 g/L).

Também foi observado um aumento na viscosidade ($\dot{\gamma} = 10 \text{ s}^{-1}$) para 300 e 500 mPa.s para G:LD e G:LI, respectivamente, na mistura contendo galactomanana (10 g/L), enquanto a solução aquosa nesta mesma concentração em galactomanana apresentou uma viscosidade de 100 mPa.s, e nas amostras de leite isoladas, 2 mPa.s sugerindo uma interação galactomanana-proteína.

1.4.1.2. Medidas dinâmicas

As medidas dinâmicas também permitem estudar com profundidade os domínios viscoelásticos, separando caráter elástico de viscoso, que ocorrem em soluções poliméricas concentradas (Ferry, 1980).

Nas medidas dinâmicas ou oscilatórias, a solução é submetida a uma tensão ou deformação senoidal oscilatória aplicada ao material, no decorrer do tempo, a uma dada

freqüência. Em geral existe uma diferença de fase entre a tensão e a deformação oscilatória resultante. Se a deformação varia com o tempo, então a tensão correspondente pode ser representada como a soma de dois componentes, um em fase com a deformação e o outro 90° fora de fase (Mitchell, 1984).

Para os sistemas de polissacarídeos, o grau de caráter sólido e líquido pode ser quantificado (figura 3). A razão tensão em fase/deformação aplicada é chamada módulo de cisalhamento elástico (G'), enquanto que o parâmetro correspondente para a resposta fora de fase é chamada módulo de cisalhamento viscoso (G''), os quais são expressos em unidade de tensão, pascal (Pa). O módulo de cisalhamento G' está relacionado com as medidas de elasticidade ou energia armazenada por ciclo de deformação senoidal. É relativo ao caráter sólido do polímero. O módulo de cisalhamento G'' relaciona-se com a energia dissipada ou perdida como calor por ciclo de deformação, e é relativo ao caráter líquido do polímero (Tager, 1978; Ferry, 1980; Mitchell, 1984; Morris, 1995).

Para um sólido perfeitamente elástico toda a energia é estocada, conseqüentemente a tensão e a deformação estão em fase, e G'' é igual a zero (figura 3b). Para um líquido que não possui propriedades elásticas, toda a energia é dissipada, G' é igual a zero, e a tensão e a deformação estão defasadas (fora de fase) em 90° (figura 3c) (Mitchell, 1984).

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

$$G'(\omega) = \tau_0 / \gamma_0 \cdot \cos \delta \quad \text{Equação 1}$$

$$G''(\omega) = \tau_0 / \gamma_0 \cdot \sin \delta \quad \text{Equação 2}$$

$$G''(\omega) / G'(\omega) = \tan \delta \quad \text{Equação 3}$$

onde:

G' = módulo de cisalhamento dinâmico elástico

G'' = módulo de cisalhamento dinâmico viscoso

τ_0 = amplitude de tensão

γ_0 = amplitude de deformação

δ = ângulo de fase

Em compostos que exibem um comportamento viscoelástico (figura 3d), a deformação depende da tensão aplicada e do tempo em que esta tensão é aplicada. Se as deformações envolvidas são pequenas, então a razão entre tensão e deformação é independente da magnitude da deformação, e o comportamento é chamado viscoelástico linear (Mitchell, 1984).

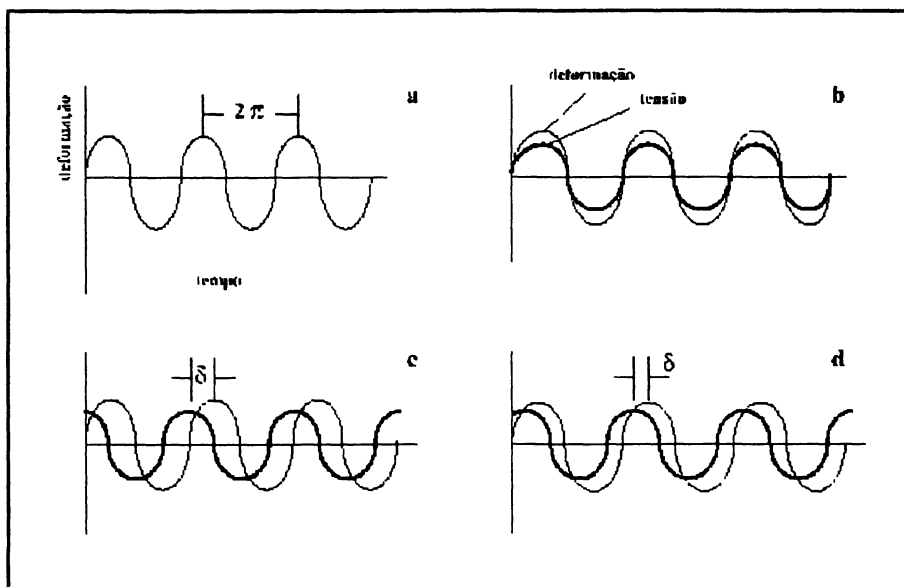


Figura 3: Respostas das amostras em testes oscilatórios em fase e fora de fase. a) deformação em função do tempo, b) comportamento de um sólido elástico, c) líquido viscoso, e d) material viscoelástico (adaptado de Vélez-Ruiz e Cánovas, 1997).

Os sistemas de polissacarídeos podem ser classificados de acordo com a figura 4. Na figura 4a, encontra-se o espectro mecânico (dependência de G' , G'' e η^* da frequência) para

um típico gel de polissacarídeo, cujo módulo de cisalhamento elástico é muito maior que o módulo de cisalhamento viscoso, mostrando uma resposta predominantemente sólida, e ambos os módulos são paralelos entre si, e essencialmente independentes da variação da frequência, o que é esperado para uma rede elástica. A viscosidade dinâmica diminui abrupta e linearmente com o aumento da frequência (Morris, 1995).

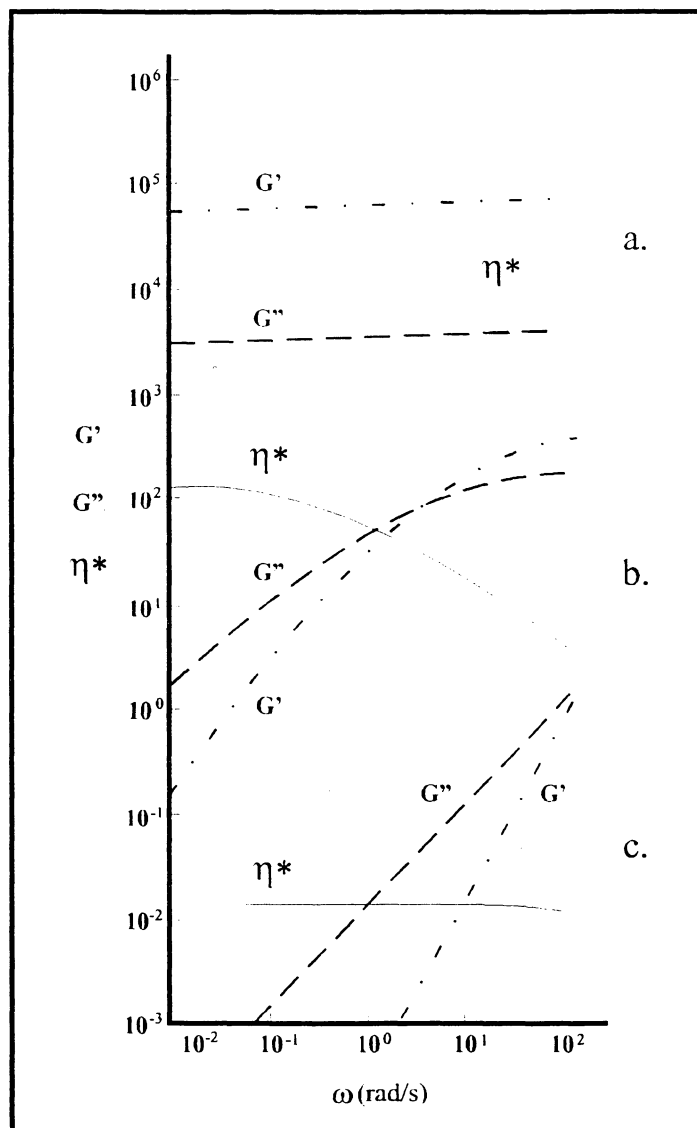


Figura 4: Comportamento dinâmico de sistemas de polissacarídeos. a) gel forte, b) gel fraco, e c) solução diluída (adaptado de Morris, 1995).

A figura 4b mostra uma estrutura de gel fraco ou solução concentrada. O módulo G'' é maior que o módulo G' em baixas frequências de oscilação, e a viscosidade dinâmica é essencialmente independente da frequência (Newtoniano). Em altas frequências, o seu comportamento aproxima-se ao de um gel, em que os módulos G' e G'' tornam-se independentes da frequência, a resposta elástica (G') predomina sobre o fluxo viscoso (G''), e a viscosidade dinâmica decresce. Em elevados valores de frequência, os emaranhados intercadeia não têm tempo suficiente para dissociarem-se dentro do período de oscilação, a rede comporta-se como um gel com ligação cruzada, enquanto que, em baixas frequências, as cadeias têm tempo suficiente para dissociarem-se e fluírem (Morris, 1995).

A figura 4c apresenta uma estrutura típica de uma solução viscosa ou diluída de polissacarídeos. A viscosidade dinâmica complexa mostra uma pequena variação com a frequência (comportamento essencialmente Newtoniano), e o módulo G'' é significativamente maior que o módulo G' , principalmente em baixos valores de frequência (Morris, 1995).

1.4.1.2.1. Aplicação de medidas dinâmicas no estudo de interações poliméricas

Hart *et al.* (1992) estudaram géis formados por misturas polissacarídeo-proteína de κ -carragenana com caseína total e frações purificadas da caseína (α , β e κ), através de DC e medidas reológicas no sistema oscilatório (deformação de 1,5% e frequência de 0,7 Hz). A adição de κ -caseína (0,5%) no sistema contendo carragenana e cloreto de cálcio causa um aumento significativo em G' , dando origem a uma estrutura de gel termo-reversível. Os sistemas contendo carragenana e caseína total, e as frações α e β -caseína também apresentaram interações formadoras de gel, entretanto mais fracas que as do sistema carragenana e κ -caseína.

Manoj *et al.* (1996) estudaram o sistema maltodextrina-caseinato de sódio através de medidas de oscilação dinâmica com pequena deformação, perfis de taxa de aquecimento controlados, espectros mecânicos, varredura de deformação com grandes valores de deformação e análise de tensão transitória, para caracterizar as propriedades viscoelásticas dos géis. A dependência da concentração, razão viscoelástica, e perfis de fusão dos módulos

elástico e viscoso para as amostras de maltodextrinas concentradas, sugerem um gel de biopolímero altamente agregado. Por outro lado, as partículas de caseinato de sódio formam um sólido “pastoso” a baixas temperaturas, com um componente altamente viscoso, que sob aquecimento moderado reverte-se em um corpo líquido. A mistura dos polímeros resulta em um sistema composto, cuja inversão de fase (de rede contínua da maltodextrina com inclusões protéicas descontínuas para uma dispersão de caseinato suspendendo as partículas de maltodextrina) é determinada pela razão entre as massas dos dois componentes da mistura.

Cui *et al.* (1995) realizaram experimentos em sistemas contendo galactomanana de alfarroba e polissacarídeos da mostarda amarela através de técnicas reológicas oscilatórias, observando interações sinérgicas nas misturas com proporções de 1:1 e 1:9 dos dois polímeros respectivamente. Os polissacarídeos presentes na mostarda que apresentavam interação com a galactomanana consistiam em uma cadeia principal composta por β -D-glucana com ligação glicosídica (1 \rightarrow 4), que adota uma estrutura rígida-ordenada, possível responsável pela interação observada.

Sánchez *et al.* (1995) estudaram a capacidade de ligação à água e o tempo de hidratação de várias gomas alimentares, através de técnicas reológicas, e observaram que a goma xantana foi a que apresentou maior capacidade de ligar-se à água (232 mL/g), seguida pela goma guar (40 mL/g), e alginato de sódio (25 mL/g). O alginato de propileno glicol e a alfarroba foram os que apresentaram as menores capacidades (15 e 11,6 mL/g), respectivamente. A proteína de soja mostrou sinergismo com a goma xantana, guar e alfarroba através do aumento dos coeficientes de consistência. Quando a proteína de soja interagiu com a mistura xantana-galactomanana de guar (1:1), observou-se um aumento sinérgico no coeficiente de consistência, todavia quando se utilizou uma mistura entre xantana-galactomanana de alfarroba observou-se uma interação antagônica, com diminuição das propriedades de gel do sistema.

Sudhakar *et al.* (1996) estudaram a incorporação de galactomananas de alfarroba e de guar (0 a 0,2%) a pastas de amido de milho e de *Amaranthus paniculatus* (5%), em formulações de sobremesas lácteas e pudins, observando modificações nas propriedades reológicas, com aumento da viscosidade quando aquecidas em amilógrafo Brabender, indicando um efeito sinérgico que é maior para a galactomanana de guar que para a de alfarroba. Estes autores comentam que o guar é um polissacarídeo não iônico, com ramificações alternadas de galactose que inibem a formação de pontes de hidrogênio

intramoleculares, mantendo a molécula em uma conformação estendida, podendo interagir com as moléculas de amilose através de pontes de hidrogênio. Isto resulta em uma conformação que aumenta o grau de pseudoplasticidade.

Uma explicação similar foi dada para o efeito da alfarroba no índice de comportamento de fluxo. O índice de consistência aumenta com a incorporação tanto de guar, quanto de alfarroba, e este fato é atribuído ao sinergismo (Sudhakar *et al.*, 1996).

Chen *et al.* (2001) estudaram o sistema composto por misturas alfarroba- κ -carragenana através de técnicas de reologia dinâmica, e testes de compressão em analisador de textura, para a determinação da relação ótima entre as duas gomas, e observaram que a galactomanana interage com a κ -carragenana na forma potássio mais efetivamente que nas formas cálcio ou sódio. Numa concentração total de polímeros de 1%, o gel formado por κ -carragenana-alfarroba apresentou uma maior tensão para ruptura quando de 30 a 40% de galactomanana foi adicionada.

Pai e Khan (2002) estudaram a reologia de misturas contendo xantana-goma guar modificada enzimaticamente. As galactomananas modificadas apresentavam um maior (33,6%) e menor (25,2%) conteúdo em galactose, respectivamente, que a goma guar nativa (39,1%), e foram comparadas com misturas alfarroba-xantana. A mistura contendo guar modificado com maior conteúdo em galactose apresentou um enfraquecimento de seu caráter viscoelástico, e os módulos G' e G'' não são afetados por mudanças na temperatura ou força iônica do sistema. Na mistura contendo guar modificado com menor conteúdo em galactose, a extensão do sinergismo aumentava com o aumento da temperatura. Os resultados obtidos confirmam as teorias sobre a influência do conteúdo em galactose na interação entre os sistemas galactomanana-xantana.

Análises reológicas dinâmicas, para avaliar a interação entre as misturas galactomanana (10 e 20 g/L) e LD ou LI, foram realizadas (Perissutti, 1999) e mostraram uma resposta viscosa na faixa de frequência de 10^{-2} a 10 Hz, com valores de G'' maiores do que os valores de G' em baixas frequências, e uma interseção dos módulos em frequências mais elevadas, para as misturas na concentração 20 g/L, indicando um comportamento de gel fraco ou solução concentrada, a 25 °C. Através das varreduras de frequência das misturas G:LD e G:LI em concentrações de galactomanana de 10 e 20 g/L, foi observado que a mistura G:LI mostrou um perfil semelhante ao da mistura G:LD, porém com maiores valores de G' e G'' e um comportamento viscoelástico mais acentuado em relação à galactomanana isolada em

solução aquosa (Ganter *et al.*, 1992b), que apresenta um comportamento típico de um solução diluída, na mesma concentração.

1.4.2. Dicroísmo circular (DC)

A luz plano polarizada é a luz que oscila em um único plano. Ela pode ser decomposta em componentes plano polarizados à direita e à esquerda. Se os dois componentes não são iguais em amplitude, tem-se a luz elipticamente polarizada (Sun, 1994).

Se a intensidade de absorção (A) é usada como uma função de orientação do plano de polarização, tem-se o fenômeno chamado dicroísmo circular. Como no caso dos índices de refração, para uma substância opticamente inativa, as intensidades dos componentes circularmente polarizados à direita ou à esquerda são iguais, e para substâncias opticamente ativas eles são diferentes. A diferença $\Delta\varepsilon$ é expressa por (Sun, 1994):

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

Equação 4

onde:

ε = absortividade molar ((L/cm).mol⁻¹)

ε_L = componente circularmente polarizado à esquerda

ε_R = componente circularmente polarizado à direita

$\Delta\varepsilon$ varia com o comprimento de onda (λ) e pode ser positivo ou negativo, ou igual a zero quando o cromóforo está em um meio não quiral. A curva de $\Delta\varepsilon$ versus o comprimento de onda para uma transição óptica simples tem a forma de um sino, similar à curva de absorção na espectroscopia. A força da banda, determinada pelo fator $m_{ge}.d_{eg}$, que é produto dos momentos de transição dos dipólos elétricos (d_{eg}) e magnéticos (m_{ge}) associados com a transição campo magnético (g) \leftrightarrow campo elétrico (E), no cromóforo considerado (Tobias,

1987; Sun, 1994).

A espectropolarimetria baseia-se no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais (ou assimétricos). O feixe de luz circularmente polarizado, consiste de 2 feixes plano-polarizados ortogonais a 90° e fora de fase, que passando por uma substância assimétrica, são absorvidos e interagem diferentemente com a luz devido à absorvidade intrínseca dos diferentes compostos (figura 5).

O dicroísmo circular mede diferença entre a absorção das componentes polarizadas à esquerda e à direita (ΔA), segundo a lei de Beer-Lambert-Bouguer, que define a absorbância como:

$$A = \log_{10} (I_0/I) \quad \text{Equação 5}$$

$$\Delta A = A_e - A_d = \log_{10} (I_0/I_e) - \log_{10} (I_0/I_d) = \log_{10} (I_e/I_d) \quad \text{Equação 6}$$

$$A = \epsilon C l$$

onde:

I_0 = intensidade da luz que incide na cela

I = intensidade da luz ao deixar a cela

d = direita

e = esquerda

C = oncentração da solução

l = caminho óptico

O DC é geralmente medido como um raio dicróico, que é a relação das densidades ópticas de uma banda de absorção em direção à luz polarizada (paralela sobre perpendicular) para uma direção específica na amostra, e mais especificamente, os raios dicróicos dependem do ângulo θ' . A tangente de θ' é a razão do eixo menor (b) e o eixo maior (a) da elipse que é definida por (Sun, 1994):

$$\theta' = \text{tg}^{-1} \frac{b}{a} \quad \text{Equação 7}$$

onde:

θ' = elipticidade molar (grau.cm²/d mol)

a = eixo maior da elipse

b = eixo menor da elipse

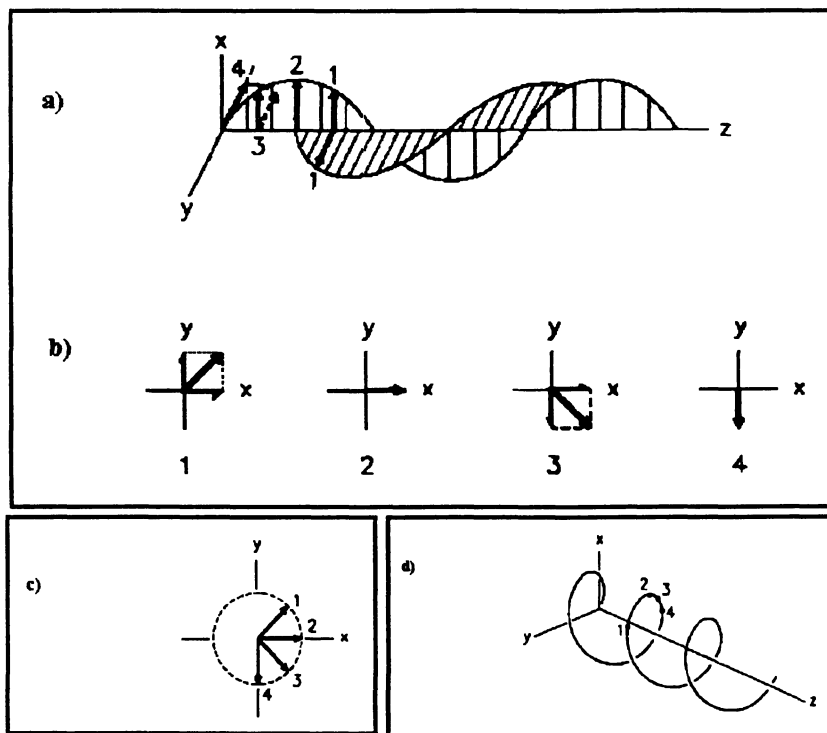


Figura 5: a) Luz plano polarizada resolvida em duas componentes circulares à direita (R) e à esquerda (L). b), c) e d) Ao passar pela amostra que absorve diferentemente as duas componentes, R e L terão tamanhos diferentes. Se a componente R é menos intensa que L, o vetor campo elétrico tem a resultante elíptica mostrada na figura acima (Sun, 1994).

A relação entre θ' e $\Delta\epsilon$ é dada por:

$$\Delta\epsilon = (1/C l)\Delta A \quad \text{Equação 8}$$

Desta forma, temos:

$$\theta'(\text{rad}) \approx \text{tg}(\theta') = (|\epsilon_c| - |\epsilon_d|) / (|\epsilon_c| + |\epsilon_d|) \quad \text{Equação 9}$$

$$[\exp(-A_c/2) - \exp(-A_d/2)] / [\exp(-A_c/2) + \exp(-A_d/2)] \quad \text{Equação 10}$$

Expandindo as exponenciais, ignorando os termos de menor ordem e convertendo em graus, temos:

$$\theta'(\text{graus}) = 180 \cdot \ln 10 \cdot \Delta A / 4\pi \quad \text{Equação 11}$$

Esta elipticidade é proporcional ao CD de forma que:

$$\theta' = 32,98 \Delta A \quad \text{Equação 12}$$

Por razões históricas, a concentração era medida em $\text{g}/100 \text{ cm}^3$, a elipticidade molar era medida em $\text{grau} \cdot \text{cm}^2/\text{g}$. Para corrigir estas unidades temos que multiplicar a equação anterior por 100.

$$[\theta'] = 100 \cdot 32,98 \cdot (\Delta \epsilon) \quad \text{Equação 13}$$

Em experimentos de DC, a luz circularmente polarizada é utilizada, e o espectro pode ser obtido somente se uma assimetria molecular intrínseca prevalecer. Nesta situação, a luz circularmente polarizada à esquerda ou à direita pode ser absorvida em diferentes extensões por um polímero cromóforo, e o equipamento mede esta diferença em absorvidade como uma quantidade positiva ou negativa, e expressa-a em função do comprimento de onda (figura 6) (Clark e Ross-Murphy, 1987).

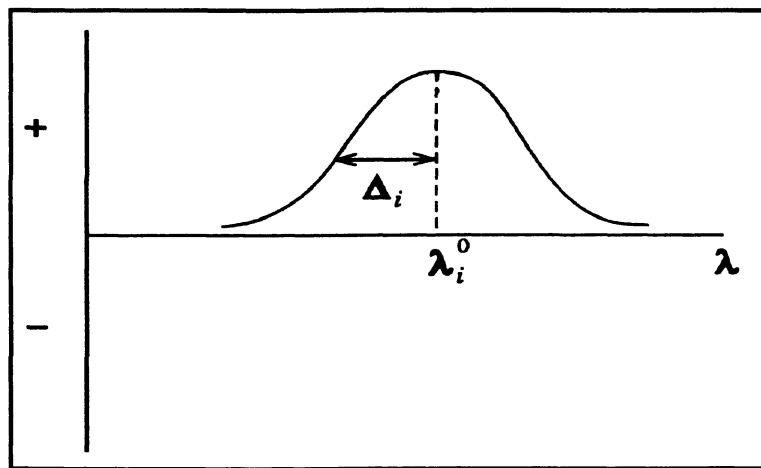


Figura 6: Espectro de dicroísmo circular (banda dicroica) (Sun, 1994).

Através da figura 7, pode-se observar o espectro de dicroísmo circular de proteínas, em que é possível diferenciar os três tipos básicos de conformação que estas podem apresentar em solução (α -hélice, β -pregueada e desordenada).

1.4.2.1. Aplicação de dicroísmo circular na análise de interação polimérica

O dicroísmo circular é extensivamente empregado no estudo estrutural de biopolímeros, mas não de polímeros sintéticos, devido aos polímeros biológicos serem na maioria opticamente ativos, enquanto que os sintéticos não o são.

No estudo da conformação dos biopolímeros, a importância particular do efeito do DC é que uma contribuição do cromóforo no espectro é sensivelmente determinada pelo seu meio

molecular e, em particular, pela assimetria do seu meio. Em parte, todavia, a força rotacional irá depender da configuração das unidades formadoras do polímero e das orientações de suas unidades na vizinhança. Aplicações de espectroscopia de DC no campo de formação de gel de biopolímeros são comuns, e este método tem sido extensivamente aplicado para monitorar a formação de rede em proteínas e polissacarídeos (Clark e Ross-Murphy, 1987).

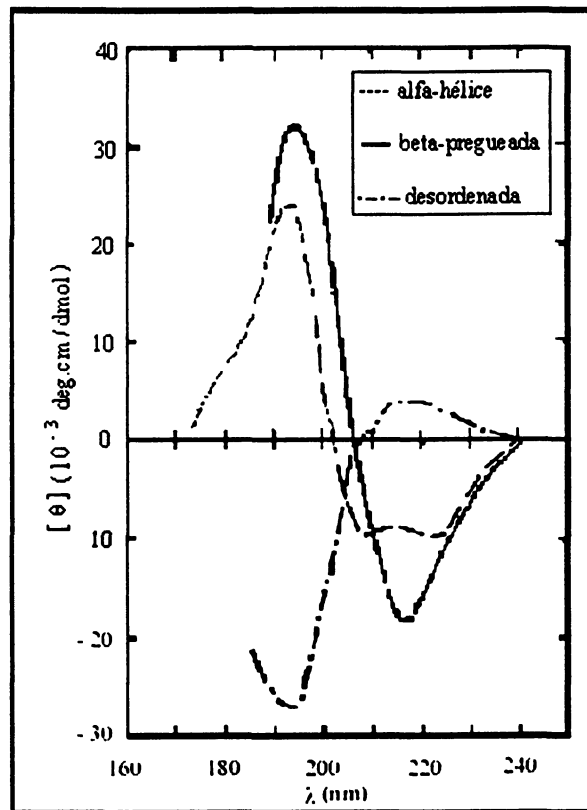


Figura 7: Espectro de dicroísmo circular de proteínas, observando-se os três tipos básicos de conformação que estas podem apresentar em solução (α -hélice, β -pregueada e desordenada).

Hart *et al.* (1992), em estudos de géis formados por misturas polissacarídeo-proteína contendo κ -carragenana, caseína total e frações purificadas da caseína (α , β e κ) por dicroísmo circular, verificaram a capacidade da carragenana em alterar a conformação da κ -caseína, mas não das frações α e β -caseína (devido à turbidez destes sistemas). A adição de polissacarídeos aniônicos perturbou significativamente o DC da caseína. Foram realizados

experimentos em que foi adicionado ao sistema cloreto de cálcio e observado que a presença de íons cálcio favorece a interação específica entre carragenana e κ -caseína. Através dos experimentos de DC, os autores concluíram que o sistema contendo carragenana e caseína na presença de íons cálcio apresenta interação eletrostática específica, que é reduzida a elevadas temperaturas, devido à carragenana tornar-se conformacionalmente desordenada (Hart *et al.*, 1992).

Delben e Stefancich (1998) estudaram a interação entre o sistema constituído por polissacarídeos como a carboximetilcelulose (CMC) e uma glucana modificada (glucana glutamato) com a ovalbumina através de técnicas reológicas, DC, absorção em ultra-violeta e calorimetria diferencial de varredura, as misturas foram aquecidas a 60 °C. Os autores observaram interação entre o sistema glucana glutamato-ovalbumina tanto em baixas como em altas temperaturas, com formação de um complexo. O sistema CMC-ovalbumina apresentou separação de fases a 25°C resultante de uma limitada compatibilidade termodinâmica entre os biopolímeros quando há um excesso de ovalbumina, e, através dos experimentos de calorimetria, pôde-se observar que em altas temperaturas há uma interação entre CMC-ovalbumina, quando em excesso de CMC.

Antonov *et al.* (1999) utilizaram espectros de DC, além de espalhamento de luz, curvas de fluxo e diagramas de fase para investigar a interação entre os sistemas compostos pela goma guar e caseinato de sódio ou β -caseína. Estes autores observaram que os espectros de DC da β -caseína na região de UV a pH = 5,6 e força iônica $I = 0,008$ (utilizando-se tampão K_2HPO_4) são caracterizados por um efeito negativo, com o mínimo do pico a 200 nm, correspondendo a uma estrutura desordenada. O guar apresentou um espectro na região de UV com uma característica banda dicróica simples, com pico positivo aproximadamente a 203 nm. Já a mistura galactomanana- β -caseína resultou em uma diferença no espectro de DC da proteína em uma grande variação de concentrações de galactomanana utilizadas. Os resultados mostraram que o complexo galactomanana- β -caseína causa a quebra de uma pequena quantidade da estrutura secundária apresentada pela proteína. Através das técnicas citadas, estes autores evidenciaram uma interação atrativa fraca entre o sistema galactomanana- β -caseína observando a formação de associações, e levantam uma hipótese de que este complexo possivelmente é estabilizado pelas cargas negativas da caseína e alguns grupos funcionais positivamente carregados ligados à molécula do polissacarídeo neutro.

1.4.3. Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)

Em 1869, Tyndall estudou o fenômeno de espalhamento por partículas em solução coloidal e demonstrou que se a luz incidente é polarizada, o espalhamento é visível em somente um único plano. Somente após 1944, Debye sugeriu que a medida da intensidade do espalhamento de luz poderia ser utilizada para determinar a massa molar de uma macromolécula em soluções diluídas e a possibilidade de determinar seu tamanho e sua forma. Desde então, o espalhamento de luz tem se tornado uma importante ferramenta no estudo do comportamento de polímeros em solução (Sun, 1994).

A luz é uma forma de radiação eletromagnética. As propriedades de um campo eletromagnético podem ser expressas por dois vetores: uma força de campo elétrico (E) e uma força de campo magnético (H). Estas duas forças de campo estão relacionadas de acordo com as equações de Maxwell. O espalhamento é melhor descrito em termos de três fatores: luz incidente, partícula (macromolécula), que serve como um dipólo oscilante, e luz espalhada (figura 8) (Sun, 1994).

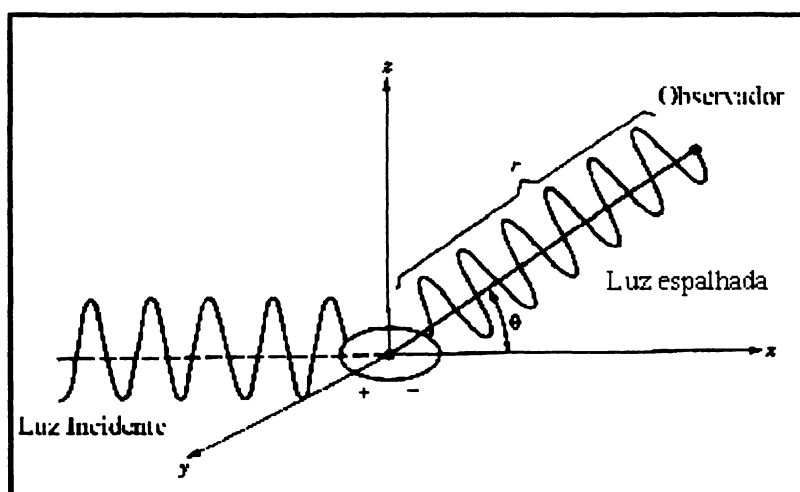


Figura 8: Modelo de espalhamento Rayleigh (adaptado de Sun, 1994).

Como a luz incidente atinge a molécula, a distribuição dos elétrons na molécula é distorcida, resultando na polarização, que passa a agir como um dipólo oscilante (p) (Sun,

1994). A intensidade do espalhamento de luz em qualquer ângulo depende do comprimento de onda da luz incidente, do tamanho e da forma das partículas espalhadas, e das propriedades ópticas dos espalhadores, tanto quanto do ângulo de observação (Hiemenz e Rajagopalan, 1997).

O espalhamento de luz pode ser classificado em estático ou dinâmico, dependendo de como a intensidade é medida. No espalhamento de luz estático, a intensidade total média de tempo é medida em função do ângulo de espalhamento, onde a massa e a dimensão linear característica de uma partícula podem ser determinados. Em contraste, no espalhamento de luz dinâmico, a variação temporal é medida e representada, geralmente, através de uma função de auto-correlação de intensidade. Os coeficientes de difusão das partículas, tamanho e distribuição de tamanho podem ser deduzidos através destas medidas (Hiemenz e Rajagopalan, 1997).

A massa molar ponderal média (M_w) dos polissacarídeos pode ser determinada através do método de espalhamento. Um aspecto muito importante nesta determinação é a necessidade que as moléculas estejam suficientemente afastadas umas das outras para que sejam tratadas como fontes independentes. Esta necessidade é justificada para gases, mas para líquidos, as moléculas estão estreitamente juntas o suficiente para que ocorra uma interferência entre as ondas emitidas de diferentes centros. As amostras são preparadas em soluções diluídas e filtradas em filtros de até 0,1 μm para minimizar o efeito de agregados (Hiemenz e Rajagopalan, 1997).

Pode-se efetuar a medida do espalhamento do feixe luminoso em função da concentração do polímero e do ângulo de espalhamento, calculando-se a massa molar ponderal média através da relação:

$$K^*C(1 + \cos^2\theta) / \Delta R_\theta = (1 / M_w + 2 A_2C + \dots) P_\theta^{-1} \quad \text{Equação 14}$$

onde:

K^* = constante óptica $(2\pi^2 n^2 / \lambda_0^4 N) / (dn/dc)^2$

C = concentração do polímero

θ = ângulo de espalhamento do feixe de luz

R_θ = fator de Rayleigh

ΔR_θ = diferença entre o fator de Rayleigh (R_θ) da solução e do solvente

M_w = massa molar ponderal média

A_2 = segundo coeficiente virial

P_θ = função de θ (considera as interferências entre as diferentes vibrações emitidas por uma mesma partícula)

n = índice de refração do solvente (no comprimento de onda λ_0)

λ_0 = comprimento de onda da luz incidente

N_A = número de Avogadro

dn/dc = taxa de variação do índice de refração em relação à concentração

O fator de Rayleigh (R_θ) pode ser calculado através da seguinte equação:

$$R_\theta = G_\theta D / G_0 \sigma' l' \quad \text{Equação 15}$$

onde:

G_θ = intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado

G_0 = intensidade relativa correspondente ao feixe incidente

D, σ', l' = constantes do aparelho

O termo R_θ é o fator de Rayleigh. O excesso de luz espalhada pelo solvente multiplicado pela distância entre o centro espalhador e o detetor, sobre a intensidade incidente e o volume da célula iluminada pelo laser é observado pelo detetor; P_θ é a função de espalhamento, e mostra como a luz espalhada varia com os ângulos; A_2 é o segundo coeficiente virial (termo termodinâmico que mostra a interação entre o solvente e o soluto); dn/dc é a variação do índice de refração da solução do material analisado com a variação de sua concentração; e $\langle r_g^2 \rangle$ é o raio de giro ao quadrado médio, relativo à distribuição de massa da molécula.

Através da análise de espalhamento de luz estático, pode-se calcular a massa molar média (M_w) e o segundo coeficiente virial (A_2) do polímero, estabelecendo para estes sistemas o gráfico de Zimm (figura 9), que é a relação entre K^*C/R_θ (eixo y) $kC + \sin^2(\theta/2)$ (eixo x), a partir de uma dupla extrapolação a ângulo zero ($\theta = 0$) e concentração zero ($C = 0$) (Sun, 1994; Antonov *et al.*, 1999).

$$\lim_{c \rightarrow 0, \theta \rightarrow 0} K^*C(1 + \cos^2\theta) / \Delta R_\theta = 1/M_w + 2A_2C \quad \text{Equação 16}$$

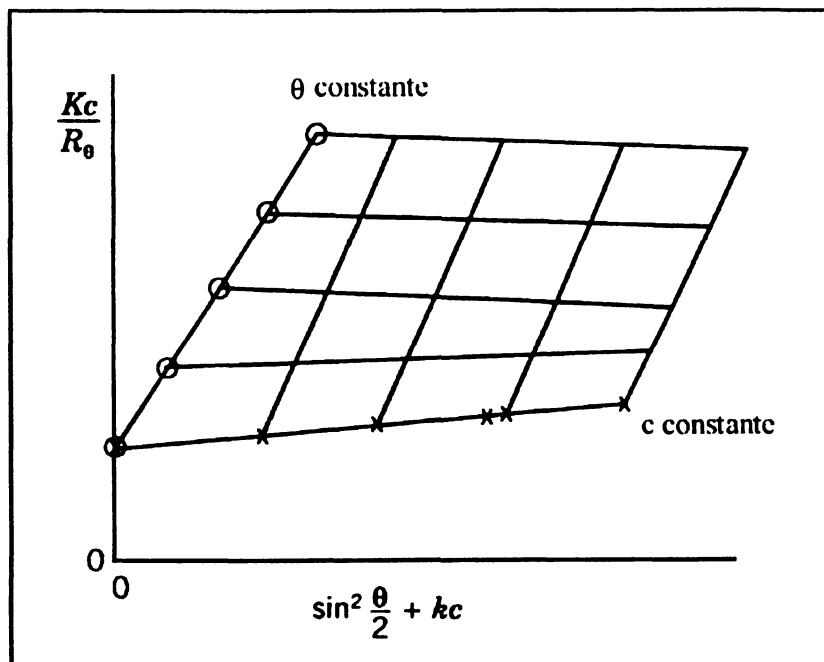


Figura 9: Gráfico de Zimm (Sun, 1994).

A partir da inclinação da curva resultante da extrapolação a ângulo zero ($\theta = 0$), determina-se o segundo coeficiente virial (A_2) (figura 10):

$$\lim_{\theta \rightarrow 0} K^*C(1 + \cos^2\theta) / \Delta R_\theta = 1/M_w + 2A_2C \quad \text{Equação 17}$$

A partir da inclinação da curva resultante da extrapolação a concentração zero ($C = 0$) determina-se a massa molar (M_w) (figura 10):

$$\lim_{c \rightarrow 0} K^*C(1 + \cos^2 \theta) / \Delta R_\theta = 1/M_w + 2A_2C \quad \text{Equação 18}$$

A partir da determinação experimental da relação entre o raio de giro e a massa molar é possível prever a forma geométrica da partícula e as conformações assumidas para a cadeia macromolecular, além da previsão de uma macromolécula linear ou ramificada. Deve-se ressaltar que o desenvolvimento desta técnica veio trazer muitos avanços na análise estrutural de macromoléculas (Reed, 1995b e 1996; Wyatt, 1993).

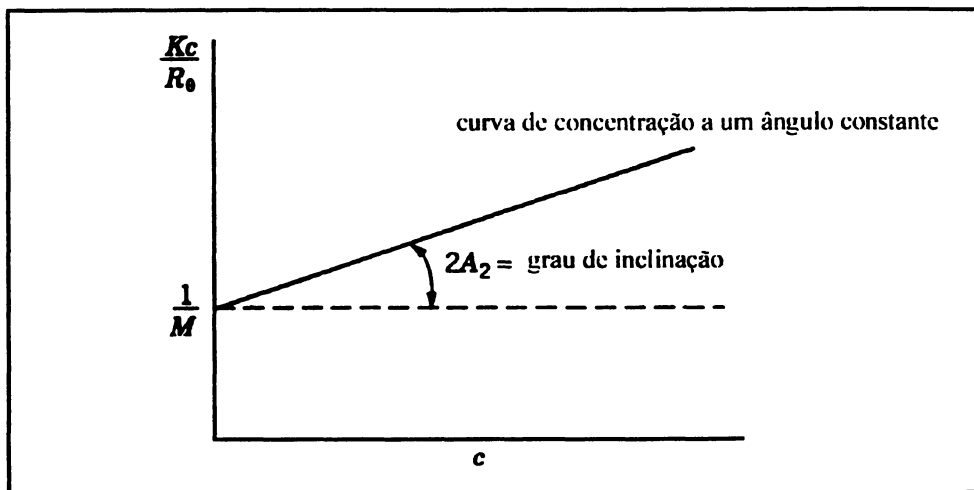


Figura 10: Determinação da massa molar (M_w) e do segundo coeficiente virial (A_2) (adaptado de Sun, 1994).

Um parâmetro acessível que está intimamente relacionado com a natureza da interação polissacarídeo-proteína em soluções diluídas é o segundo coeficiente virial (A_{pr-po}) que é determinado em experimentos de cromatografia de exclusão estérica estática. Os valores negativos ($A_{pr-po} < 0$) e positivos ($A_{pr-po} > 0$) do segundo coeficiente virial são indicativos de interações em rede atrativa e repulsiva, respectivamente. O comportamento termodinâmico de

uma solução polissacarídeo-proteína depende dos valores relativos de A_{pr-po} , A_{pr-pr} e A_{po-po} , em que as quantidades de A_{pr-pr} e A_{po-po} são os coeficientes viriais da proteína e do polissacarídeo puros, representando as contribuições termodinâmicas das interações proteína-proteína e polissacarídeo-polissacarídeo, respectivamente (Dickinson, 1998).

Através da equação 12, o segundo coeficiente virial da proteína ($A_{2(2)}$), do polissacarídeo ($A_{2(3)}$) e do sistema contendo a mistura polissacarídeo-proteína ($A_{2(23)}$) podem ser calculados. O segundo coeficiente virial, relativo ao sistema polissacarídeo-proteína ($A_{2(23)}$), caracteriza a interação mútua das duas macromoléculas, e é calculado através da inclinação da dependência da concentração linear da razão $K^*(C_2 + C_3)/[\Delta R^{(c)}_{\theta=0}]$, de acordo com a equação 13 (Antonov *et al.*, 1999):

$$\frac{K^*(C_2 + C_3)}{[\Delta R^{(c)}_{\theta=0}]} = \frac{1}{v_2^2 M_2 X_2 + v_3^2 M_3 X_3} + \frac{2v_2^2 M_2^2 X_2^2 A_{2(12)} + 2v_2 v_3 M_2 M_3 X_2 X_3 A_{2(23)} + v_3^2 M_3^2 X_3^2 A_{2(13)}}{(v_2^2 M_2 X_2 + v_3^2 M_3 X_3)^2} (C_2 + C_3)$$

Equação 18

onde:

1 – relativo ao solvente

2 – relativo à proteína

3 – relativo ao polissacarídeo

K^* = constante óptica $2\pi^2 n_1^2 / N\lambda^4$

n_1 – índice de refração do solvente

N_A – número de Avogadro

λ - comprimento de onda da luz incidente no vácuo

M_w – massa molar

v – incremento no índice de refração

C – concentração (g/mL)

X – frações de massa

$[\Delta R^{(c)}_{\theta=0}]$ – excesso de espalhamento de luz a ângulo zero

A_2 – segundo coeficiente virial

Com o aprimoramento das técnicas de cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (HPSEC), foi possível utilizar a técnica de espalhamento de luz com multiângulos (MALLS) acoplada ao sistema, o que permite a realização de experimentos para comprovação de teorias relativas a técnica de espalhamento de luz, sendo considerada hoje a única técnica para análise da massa molar de macromoléculas solúveis em água evitando erros pela adsorção ou exclusão eletrostática. Geralmente são utilizados como rotina um refratômetro diferencial e um detetor de espalhamento de luz evitando, nestas condições, o uso da calibração universal. O detetor de ultravioleta pode ser adaptado no caso de análise de proteínas. Polarímetros podem ser utilizados na análise de polímeros opticamente ativos, e também o detetor de fluorescência, para polímeros marcados com marcadores fluorescentes (Wyatt, 1993).

Para monitorar as características viscosimétricas do polímero durante a eluição no sistema HPSEC-MALLS, é possível adicionar um detetor viscosimétrico. Alguns trabalhos descritos na literatura relatam a obtenção da $[\eta]$ e as constantes de Mark-Houwink **a** e **b** ($[\eta] = a M_w^b$) (Bahary e Jilani, 1993). Viscosímetros capilares simples e outros hidráulicos acoplados à ponte de Wheatstone podem ser adaptados ao sistema. Segundo Reed (1995b e 1996), a velocidade de cisalhamento imposta no sistema HPSEC-MALLS deve ser monitorada para evitar a determinações em que as macromoléculas assumam um comportamento pseudoplástico.

HPSEC-MALLS permite também a determinação da presença de agregados que eluídos a baixos volumes de eluição, fornecem uma intensidade de luz difundida elevada (Rinaudo, 1993). Este método é considerado por estes autores como o único método válido para caracterizar o comportamento em solução de polissacarídeos de elevada massa molar.

1.4.3.1. Aplicação de cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) na análise de interação polimérica

Santos *et al.* (1997) estudaram sistemas polissacarídeo-fosfolípido através de técnicas

de espalhamento de luz estático e dinâmico e microscopia eletrônica para a caracterização estrutural e uso terapêutico como sistemas de liberação de drogas ou formulações de vacinas, através da quebra de um gel de maltodextrina com ligação cruzada. Através das técnicas acima citadas, estes autores observaram que os fragmentos apresentam a forma esférica, e como resultado da adição de fosfolipídeos dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e fosfatidilcolina (EYPC), ao microgel, bicamadas concêntricas multilamelares são formadas ao redor do core de polissacarídeo. Todavia, o efeito do DPPC no tamanho das partículas espalhadas (associação microgel/lipídeo) parece mais pronunciado, e está relacionado com a fluidez da bicamada: uma bicamada mais fluida, tal como a formada por EYPC, poderia ser capaz de fornecer mais firmeza à superfície do poro do microgel.

De Kruif e Turnier (1999) estudaram a interação de um exo-polissacarídeo de *Lactococcus lactis* sub-espécie *cremoris* com proteínas do soro do leite em sistemas não formadores de gel. A interação entre este exo-polissacarídeo com componentes do leite é relevante na consistência de produtos fermentados. Os autores prepararam partículas coloidais de proteínas do soro do leite com um raio de 27 ± 3 nm, utilizando-se pH neutro e uma força iônica de 0,1 mol/L, e analisaram as amostras por espalhamento de luz, viscosidade, diagramas de fase e varredura de neutrons em pequeno ângulo. Em baixas concentrações do exo-polissacarídeo a mistura era estável, mas, em altas concentrações, o sistema mostrava separação de fases.

Através dos experimentos de espalhamento de luz, observou-se que as amostras apresentavam um pico típico de espalhamento, a intensidade na qual aumenta e a posição da intensidade máxima de espalhamento move-se para menores valores de Q (vetor de espalhamento de onda) com o tempo. Como Q é uma escala inversa do comprimento, um máximo em baixos valores de Q significa que os agregados são criados durante a separação de fase. Os autores concluíram que as misturas exo-polissacarídeo-proteína do soro do leite exibem um comportamento segregativo próprio de interações tipo depleção. Estas interações induzem uma atração efetiva entre as partículas da proteína do soro, que é proporcional ao tamanho e à concentração do exo-polissacarídeo. A atração aumenta a viscosidade do sistema, e se ela for suficientemente forte, o sistema tende a separar-se em duas fases: uma rica em exo-polissacarídeo e outra rica em proteína do soro (de Kruif e Turnier, 1999).

Viebke (1995) estudou o sistema composto por misturas entre galactomanana de alfarroba ou guar, e kappa (κ) e iota (ι) -carragenana através de técnicas de cromatografia de

exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz em multiângulos, e observou que, sob estas condições, a carragenana forma associações com sua própria molécula, e isto aumenta a interação com outros polímeros (Morris, 1990). Foi observado que a κ -carragenana se associou com a alfarroba, mas não com a goma guar, e a ι -carragenana não mostrou nenhum sinal de associação com as duas galactomananas.

Schorsch *et al.* (1999a e 1999b) observaram uma separação de fases em sistemas contendo galactomanana de guar e alfarroba em soluções de sacarose-proteínas do leite, através de técnicas de espalhamento de luz estático, diagramas de fase e microscopia confocal, indicando uma incompatibilidade termodinâmica entre o sistema polissacarídeo-proteína.

Teoricamente, um aumento na massa molar dos biopolímeros leva a uma diminuição da compatibilidade em solução por diminuição da entropia combinatorial da mistura (Schmitt *et al.*, 1998).

Antonov *et al.* (1999) utilizaram espalhamento de luz para investigar a interação entre o sistema goma guar-caseinato de sódio ou β -caseína, e evidenciaram uma interação atrativa fraca entre o sistema galactomanana- β -caseína observando a formação de associações. Este complexo, possivelmente, é estabilizado pelas cargas negativas da caseína e alguns grupos funcionais positivamente carregados ligados à molécula do polissacarídeo neutro.

Tendo em vista a necessidade de investigações mais aprofundadas quanto ao mecanismo de interação polissacarídeo-proteína, bem como um melhor entendimento da funcionalidade destes complexos nas formulações de produtos alimentícios para o presente trabalho foi escolhido como modelo galactomananas de uma espécie nativa: *M. scabrella* e proteínas do leite (caseínas α , β e κ).

Deve-se salientar, ainda, que, atualmente, as galactomananas utilizadas na indústria alimentícia são providas por meio de importação, o que estimula a buscas de novas fontes alternativas para uma potencial aplicação.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o mecanismo de interação da galactomanana presente em sementes de *M. scabrella* e galactomananas comerciais de guar e alfarroba com leite desnatado, caseína total e frações de caseína purificadas (α , β e κ), baseada em estudos reológicos, de dicroísmo circular, microscopia eletrônica de transmissão e cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos.

2.2. Objetivos específicos

- Obter e purificar a galactomanana de *M. scabrella*.
- Purificar as galactomananas comerciais de goma guar e alfarroba.
- Analisar o comportamento reológico de misturas da galactomanana de *M. scabrella* com leite desnatado por ciclos de temperatura e varreduras de frequência.
- Investigar o mecanismo de interação e o tipo de ligação existente entre galactomananas e proteínas do leite, em misturas contendo caseína total e frações purificadas de caseína (α , β e κ), através de técnicas reológicas, dicroísmo circular, microscopia eletrônica de transmissão e cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos.

Materials e
Métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Métodos gerais

3.1.1. Obtenção das sementes

As sementes *M. scabrella* foram fornecidas pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP), provenientes de povoamentos naturais da região de Bocaiúva do Sul, tendo sido colhidas em dezembro de 1997.

3.1.2. Extração dos polissacarídeos de *M. scabrella*

As sementes de *M. scabrella* (50 g) foram moídas em moinho WILEY, utilizando-se peneiras de 2 e 1 mm, sucessivamente.

A inativação enzimática do material moído foi realizada utilizando-se 500 mL de água destilada fervente em microondas na potência alta num tempo de 2 minutos, seguido da adição de 500 mL de água destilada gelada à solução. Em seguida foi realizada extração aquosa à temperatura ambiente por um período de quatro horas, sob constante agitação.

O material extraído foi centrifugado em centrífuga HITACHI Himac CR21E por 15 minutos, a 20000 x g em temperatura de 20 °C, para a retirada preliminar dos resíduos da semente. O sobrenadante foi novamente centrifugado por 60 minutos, a 20000 x g em temperatura de 20 °C para a retirada total dos resíduos da semente.

O sobrenadante da centrifugação foi, então, precipitado com a adição de um volume de etanol comercial, sob agitação vigorosa e constante, centrifugado a 20000 x g por 5 minutos, a 20 °C.

O precipitado resultante foi submetido a tratamentos sucessivos com etanol (70% a 100% v/v) e centrifugação por 5 minutos, a 20000 x g, numa temperatura de 20 °C.

3.1.3. Purificação dos polissacarídeos

Para o processo de purificação das galactomananas das sementes de *M. scabrella* e das galactomananas comerciais de guar e alfarroba foram realizadas extrações em soluções aquosas de NaCl 0,1 mol/L à temperatura ambiente por um período de quatro horas, sob constante agitação, para a precipitação de possíveis contaminantes protéicos.

As galactomananas comerciais de goma guar e alfarroba (Sigma) foram solubilizadas em água destilada à temperatura ambiente, utilizando-se o mesmo procedimento descrito para a galactomanana de *M. scabrella*, para que as impurezas provenientes das sementes fossem eliminadas.

O material extraído sofreu o mesmo processo de centrifugação, precipitação e tratamentos sucessivos um gradiente de etanol (70% a 100% v/v) como descrito no item 3.1.2., para que as galactomananas purificadas fossem isoladas.

3.1.4. Determinação da granulometria dos polissacarídeos

Para analisar o efeito da granulometria das galactomananas das sementes de *M. scabrella* e das galactomananas comerciais de goma guar e alfarroba, utilizou-se um homogeneizador “Omni Macro Homogenizer” (15 AMP/ 60 Hz) modelo 17505 do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) – Universidade Federal do Paraná, por um tempo de 5 minutos, na velocidade oito ciclos por segundo, seguido de um peneiramento em um sistema de peneiras em série com encaixe, com a seguinte numeração: 3, 4, 100 e 200 “mesh”. As peneiras foram previamente pesadas em balança analítica, e após o peneiramento dos polissacarídeos, estas eram novamente pesadas para a determinação do peso das galactomananas retidas em cada peneira.

3.1.5. Preparação das soluções de caseína

As amostras de caseína total e frações purificadas da caseína (α , β e κ) (Sigma), utilizadas para os experimentos de dicroísmo circular, foram solubilizadas sob agitação em tampão fosfato de potássio 0,008 mol/L (pH 7,0), em concentrações que variavam de 0,025 a 0,2 g/L, à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos.

3.2. Métodos químicos e físico-químicos

3.2.1. Hidrólise ácida total da galactomanana de *M. scabrella*

A galactomanana (1 mg) foi solubilizada em água destilada (1 mL), e a este material solúvel, foi acrescido 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 mol/L, deixando-o hidrolisar em tubos hermeticamente fechados em banho a 100 °C por 5 horas (Adams, 1965).

Após a hidrólise, o excesso de TFA foi removido por evaporação em capela à temperatura ambiente.

3.2.2. Redução

As frações submetidas à hidrólise ácida total foram reduzidas com boroidreto de sódio (NaBH_4), à temperatura ambiente, por aproximadamente 24 horas (Wolfrom e Thompson, 1963a). O excesso do agente redutor foi decomposto e a remoção dos íons sódio (Na^+) foi realizada pela adição da resina trocadora de cátions na forma ácida Lewattit S-100 (H^+) até pH = 7,0. As soluções foram filtradas a vácuo e evaporadas em rotaevaporador (40 °C). Ao balão de evaporação foi adicionado metanol para a retirada de ácido bórico, por meio de

formação de tetraborato de metila, um composto volátil na temperatura de evaporação. O sistema foi novamente evaporado em rotaevaporador. Esta operação foi repetida três vezes. Assim, os monossacarídeos constituídos por um grupo funcional aldeído, passam a ser álcoois com a adição de 2 átomos de hidrogênio na extremidade da molécula, denominados alditóis.

3.2.3. Acetilação

Após a redução da amostra, esta foi submetida ao processo de acetilação. À mistura de alditóis foram adicionados 1 mL de piridina e 1 mL de anidrido acético, em tubo hermeticamente fechado, e o sistema deixado em capela à temperatura ambiente, por 24 horas (Wolfrom e Thompson, 1963b).

A reação de esterificação foi interrompida pela adição de gelo, para a degradação do excesso de anidrido acético, e os produtos acetilados foram extraídos da solução pela adição de 3 mL de clorofórmio. O excesso de piridina presente na fase clorofórmica do sistema foi eliminado através de sucessivas aplicações de soluções aquosas de sulfato de cobre (CuSO_4) 5% e água destilada, alternadamente (formando um complexo azul escuro, o sulfato de piridina, que passa para a fase aquosa e é eliminado).

A fase clorofórmica contendo os acetatos de alditóis foi coletada e levada à secura para análise em cromatografia líquido-gasosa (g.l.c.) (item 3.4.1.).

3.2.4. Dosagem de açúcar total da galactomanana de *M. scabrella*

As determinações de açúcar total das galactomananas e das misturas galactomanana-proteína do leite foram feitas pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), em comprimento de onda de 490 nm, utilizando-se como solução padrão mistura de soluções de D-manose e D-galactose 1:1 (v/v) (Sigma), para a obtenção de uma curva de calibração. A sensibilidade deste método é de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.5. Dosagem de proteínas da galactomanana de *M. scabrella*

As dosagens dos componentes protéicos das galactomananas de *M. scabrella* e das galactomananas comerciais de guar e alfarroba nativas e purificadas foram realizadas através dos métodos de Hartree (1972) e Peterson (1977), utilizando-se os comprimentos de onda de 650 e 750 nm, respectivamente em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys™ (SPECTRONIC INSTRUMENTS – USA). A sensibilidade destes métodos é de 10 a 100 µg/mL.

3.2.6. Desproteínização das galactomananas por coluna de Florisil

Para a purificação das galactomananas de *M. scabrella* e das galactomananas comerciais de guar e alfarroba, foi utilizada uma coluna de Florisil (silicato de magnésio ativado) (Sigma) eluída em água bidestilada para a retirada de possíveis contaminantes de origem protéica por adsorção, e também um sistema em “batch” contendo as galactomananas e o Florisil, sendo monitorada por dosagem de proteínas através do método de Peterson (1977).

3.2.7. Desproteínização das galactomananas por adição de NaCl

As galactomananas de *M. scabrella* e das galactomananas comerciais de guar e alfarroba foram solubilizadas em uma solução de NaCl 0,1 mol/L para a retirada de possíveis contaminantes de origem protéica.

3.2.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

3.2.8.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições não desnaturantes (nativa)

O gel de corrida (gel separador) e o gel concentrador (“stacking gel”) foram preparados em concentrações de 10 e 4%, respectivamente, conforme as tabelas 1 e 2, para a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas e desnaturantes (SDS-PAGE).

O tampão de corrida utilizado foi TRIS ((triidroximetil)-aminometano)-glicina pH = 8,3 (24 mmol/L TRIS e 192 mmol/L glicina); o tampão da amostra foi TRIS-HCl 0,5 mol/L, pH = 6,8, contendo glicerol 10% e azul de bromofenol 0,5%.

As concentrações das amostras aplicadas no gel foram de 100 µg/20 µL para a galactomanana e 20 µg/20 µL para a caseína. Para as misturas galactomanana-caseína total e frações purificadas (α -caseína, β -caseína e κ -caseína), foi utilizado um volume de 50 µL de solução de galactomanana e 50 µL de solução de caseína, agitando-se por 2 minutos, e deixando a solução em repouso por 1 hora.

Quanto à montagem dos géis, dois géis foram confeccionados: um para coloração para proteína e outro para coloração para polissacarídeo. O gel permite a aplicação de 10 “spots” (20 µL de amostra em cada poço).

As colorações utilizadas foram “Coomassie blue” R-250 para a identificação de proteínas (St. Groth *et al.*, 1963), nitrato de prata (AgNO₃) para carboidratos (Wray *et al.*, 1981) e reativo ácido periódico-Schiff para carboidratos (Silva Junior, 2001).

Os géis foram colocados em um suporte e inseridos em uma cuba de eletroforese. Esta foi preenchida com o tampão de corrida (pH = 8,3), e ligada em uma fonte com voltagem constante de 200 V / 150 mA / 30 W, até o corante atingir o final do gel de separação. O tempo médio de corrida foi de 40 minutos.

TABELA 1: Quantidade dos componentes (em mL) para o gel de corrida nas eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas e desnaturantes (SDS-PAGE).

Composto	PAGE (mL)	SDS-PAGE (mL)
Água destilada	5,00	4,00
Acrilamida 30% + bis-acrilamida 1%	2,80	3,30
(Triidroximetil)-aminometano (TRIS) 1,5 mol/L (pH = 8,8)	2,10	2,50
Dodecilsulfato de sódio (SDS) 10%	-	0,10
Persulfato de amônio (APS) 10%	0,09	0,09
N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina (TEMED)	0,01	0,01
	10 mL	10 mL

TABELA 2: Quantidade dos componentes (em mL) para o gel concentrador nas eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas e desnaturantes (SDS-PAGE).

Composto	PAGE (mL)	SDS-PAGE (mL)
Água destilada	1,80	1,80
Acrilamida 30% + bis-acrilamida 1%	0,39	0,39
TRIS 0,5 mol/L (pH = 6,8)	0,78	0,75
SDS 10%	-	0,03
APS 10%	0,027	0,027
TEMED	0,003	0,003
	3 mL	3 mL

3.2.8.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

O procedimento para a eletroforese em SDS-PAGE é similar ao descrito para a eletroforese em PAGE nativa (item 3.2.8.1.), com algumas modificações no preparo dos géis (tabelas 1 e 2) e dos tampões, com a utilização de SDS para condições desnaturantes, e β -mercaptoetanol no tampão de corrida, além de um marcador de massa molar (PHARMACIA-BIOTECH), contendo as seguintes massas:

α -Lactoalbumina bovina - $M_w = 14.200$ Da

Anidrase carbônica - $M_w = 29.000$ Da

Albumina ovo - $M_w = 45.000$ Da

Albumina bovina - $M_w = 66.000$ Da

Inibidor de tripsina - $M_w = 97.400$ Da

3.2.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a realização dos experimentos de MET, foram utilizadas soluções contendo os biopolímeros isolados (galactomanana de *M. scabrella* e caseína total e as frações purificadas (α , β e κ -caseína) como controles, e misturas galactomanana-caseína em diferentes relações polissacarídeo-proteína, a fim de se observar uma interação entre estes componentes. Todas as amostras foram preparadas em duplicata.

Para o preparo de solução de polissacarídeo, uma solução de galactomanana de *M. scabrella* (2 g/L) foi preparada em NaCl 0,25 mol/L à temperatura ambiente, pH = 7,0 sob agitação, durante o período de 1 hora.

Tanto a caseína total, quanto suas frações purificadas (3 g/L) foram dispersas em NaCl 0,25 mol/L à temperatura ambiente, pH = 7,0, sob agitação e, então, sonicadas por 8 minutos a 50 W.

A mistura polissacarídeo-proteína foi preparada em três diferentes concentrações, numa

relação em g/L de galactomanana-caseína de 2:3, 10:3 e 2:30, respectivamente.

As amostras foram depositadas em uma tela (grade) de cobre de espessura 200 “mesh” com uma película de parlódio sobre a tela, e então secas sob vácuo à temperatura ambiente, e para o contraste, as telas foram expostas a uma solução aquosa saturada de acetato de uranila ($C_4H_6O_6U \cdot 2H_2O$) (2% m/m) ao abrigo da luz, e lavadas com uma pequena quantidade de água milli-Q. Em seguida as amostras foram secas em papel absorvente, colocadas em placas de Petri sobre uma camada de parafilme, e secas em estufa a vácuo à temperatura ambiente por 3 horas. As telas foram depositadas em um porta telas para o armazenamento.

As amostras foram submetidas a análise em microscópio eletrônico JEM-1200 EX II JEOL, utilizando os seguintes aumentos 25000, 50000 e 100000 vezes, respectivamente.

3.3. Métodos reológicos

As análises reológicas foram determinadas em um reômetro HAAKE RS 75 Rheostress acoplado a um termocirculador DC5B3 e banho termostaticado HAAKE K15, em temperatura constante de 25° C, em sistema estático e dinâmico, utilizando-se o sensor cone-placa com um diâmetro do cone 60 mm e ângulo de 2° (C60/2°). A determinação da inércia dos sensores foi realizada para descontar os valores das forças centrífuga e centrípeta geradas durante os experimentos no equipamento. Todas as análises reológicas foram feitas em triplicata, com amostras preparadas diariamente para evitar contaminação.

3.3.1. Preparo das misturas galactomanana-proteína

Para a análise reológica, as misturas foram preparadas a partir de galactomanana de *M. scabrella*, por adição de galactomanana na concentração 10 g/L ao leite comercial desnatado ultrapasteurizado pelo sistema UHT (“ultra high temperature”) da marca BATAVO (Indústria e Cooperativa Batavo S.A.).

No sistema de ultrapasteurização, o leite é aquecido a 140 °C por 4 segundos, em

seguida resfriado a 20 °C e envasado numa embalagem à vácuo. Este processo garante as qualidades nutritivas e naturais do produto por um período de 180 dias à temperatura ambiente, desde que a embalagem permaneça intacta.

As amostras em pó foram pesadas em balança analítica, e as misturas feitas num volume total de 10 mL.

As misturas sofreram um processo de agitação magnética por um período de cerca de 4 horas à temperatura ambiente para a completa solubilização, e permaneceram em repouso antes dos ensaios reológicos.

3.3.1.1. Análise da interação entre galactomananas e proteínas do leite por ciclos de temperatura

Para a análise da influência da temperatura sobre o comportamento reológico das amostras, medidas reológicas de ciclos de temperatura no sistema estático foram utilizadas. No módulo estático, para a análise dos ciclos de temperatura, a amostra foi submetida a uma variação de temperatura de 25 a 75 °C, num intervalo de 2 minutos, e em seguida um decréscimo de temperatura de 75 a 10 °C num intervalo de aproximadamente 3 °C/minuto, pelo tempo de aproximadamente 15 minutos. Para tal análise utilizou-se o reômetro citado no item 3.3., acoplado a um sistema de controle de temperatura Peltier (TC81). As análises foram realizadas no período de resfriamento.

Para determinar a precisão do método, as análises foram realizadas em triplicatas (três amostras por dia em três dias diferentes) e o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV), foram calculados.

3.3.1.2. Comportamento dinâmico

Para avaliar o comportamento viscoelástico das amostras, foram realizadas análises de varredura de frequência no sistema dinâmico ou oscilatório.

As respostas elásticas (G') e viscosas (G'') do material foram avaliadas, utilizando-se

baixos valores de deformação (γ) conforme as varreduras de tensão (10^{-2} a 10 Pa) em frequência de 1 Hz, realizadas em experimentos anteriores (Perissutti, 1999), para a determinação da região viscoelástica linear das amostras, ou seja, a região onde os módulos elástico e viscoso permanecem constantes com a variação da deformação, indicando que não ocorre perturbação significativa na estrutura do polímero. A deformação escolhida dentro da faixa viscoelástica linear das amostras para as análises do comportamento dinâmico foi de 7%, e as análises dinâmicas por varreduras de frequência foram feitas numa amplitude de 10^{-2} a 10 Hz.

3.4. Métodos cromatográficos e espectroscópicos

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

A cromatografia líquido-gasosa foi realizada em um cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890 Series II, com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 2,0 mL/minuto, a 220 °C, e a temperatura do detector e do injetor de 250 °C, para a análise quantitativa e qualitativa da fração polissacarídica. O aparelho estava equipado com uma coluna capilar (0,25 mm x 30 m), modelo DB-210, com espessura de filme de 0,25 μ m. Através do g.l.c. foram identificados e quantificados os monossacarídeos presentes na amostra na forma de acetato de alditol (ver itens 3.2.2. e 3.2.3).

3.4.2. Dicroísmo circular

Os espectros de DC das amostras foram obtidos através de um espectropolarímetro JASCO J-700, em faixa de comprimento de onda entre 190 e 260 nm, com uma cubeta cilíndrica com 1 mm de caminho óptico, termostalizada. Cada espectro foi obtido após a

acumulação de 16 medidas.

As concentrações das proteínas e das misturas foram checadas através da análise da densidade óptica (D.O.) das amostras no comprimento de onda 280 nm em espectrofotômetro HITACHI, modelo U-2001.

Os espectros de DC foram obtidos em uma escala de grau de elipticidade molar [θ']. Para a análise, foi usado o software JASCO J-700 (versão 1.20, 1997), que permite o tratamento dos espectros obtidos a tratamento através de transformada de Fourier para a redução dos ruídos presentes.

Para analisar o efeito da temperatura sobre a interação galactomanana-caseína, utilizaram-se as galactomananas de *M. scabrella* e guar na concentração 2,5 mg/mL e caseína total ou κ -caseína na concentração 0,2 mg/mL, com ciclos de aquecimento e resfriamento realizados por meio de um banho de água circulante, numa faixa de temperatura de 25 a 75 °C.

O método foi utilizado para observar a possível formação de associações moleculares entre galactomanana (concentrações que variaram de 0,05 a 5 mg/mL) e caseína total ou frações purificadas de caseína (α , β e κ) solubilizadas sob agitação em tampão fosfato de potássio 0,008 mol/L (pH 7,0) em concentrações que variaram de 0,025 a 0,2 mg/mL. Os espectros foram coletados em diferentes temperaturas (25 a 75 °C) a fim de se observar modificações conformacionais dos biopolímeros.

3.4.3. Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)

A análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) foi realizada utilizando um equipamento composto por um computador acoplado a um cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) contendo um forno com 4 colunas de ultrahidrogel (WATERS) com diferentes limites de exclusão, colocadas em série, ordenadas do maior limite de exclusão para o menor (7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 Da, respectivamente), uma bomba peristáltica Waters 515 (WATERS), um injetor, um recipiente para solvente, e dois diferentes detectores:

detector de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS) modelo DAWN DSP (WYATT Technologies) com 18 ângulos, acoplados em série, e detector diferencial de índice de refração (RI) Waters 2410 (WATERS).

O solvente utilizado como eluente no equipamento foi uma solução contendo nitrito de sódio (NaNO_3) 0,1 mol/L e azida de sódio (NaN_3) 200 ppm. A solução salina foi filtrada em sistema de filtração SARTORIUS, com membranas de acetato de celulose 0,22 μm (MILLIPORE) antes de ser submetida ao sistema de fluxo do equipamento, com um fluxo de 0,6 mL/minuto, sob uma pressão de 920 psi a 25 °C (monitorado através da bomba peristáltica).

As amostras isoladas de galactomanana, caseína total e frações purificadas da caseína, e as misturas galactomanana-caseína foram solubilizadas na mesma solução salina descrita anteriormente, em uma concentração de 1 mg/mL.

Para uma completa análise das amostras, três experimentos foram realizados no equipamento: teste de homogeneidade das amostras, cálculo do dn/dc , e confecção do gráfico de Zimm para a determinação da massa molar (M_w), raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) e segundo coeficiente virial (A_2).

A determinação exata dos valores pode ser realizada por análise informatizada eletrônica através da equação de Rayleigh-Debye-Gans. O programa Astra for Windows (WYATT TECHNOLOGY) foi empregado para o monitoramento dos detectores de índice de refração e espalhamento de luz.

3.4.3.1. Análises de homogeneidade das amostras

Para a análise de homogeneidade, devem estar conectados em série: o cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), a bomba peristáltica, o injetor, as colunas, e os detectores de luz laser em multiângulos (MALLS) DAWN-DSP e de índice de refração (RI) Waters 2410.

O equipamento foi ligado cerca de 1,5 h antes da análise, e o fluxo do solvente foi aumentado para 0,6 mL/min em um “loop” de 500 μL .

As amostras foram solubilizadas na solução salina nitrito de sódio-azida de sódio na

concentração 1 mg/mL, filtrada em membrana de acetato de celulose 0,22 μm (MILLIPORE) alguns minutos antes da análise. As injeções das amostras foram realizadas num tempo de 80 minutos.

Com a homogeneidade verificada e obtendo-se uma amostra unimodal (homogênea), é possível determinar o dn/dc para, então, calcular sua massa molar.

3.4.3.2. Determinação do dn/dc das amostras

Para a análise do dn/dc , necessita-se de uma configuração diferente do equipamento, em que a amostra não passa pelas colunas e pelo DAWN DSP. No dia anterior ao experimento, devem estar desconectados as colunas e o detector de luz laser em multiângulos (MALLS) DAWN-DSP, restando somente o detector de índice de refração (RI) Waters 2410, para que as amostras sejam analisadas.

A determinação exata dos valores é realizada através de análise informatizada eletrônica. O programa Astra (WYATT TECHNOLOGY) monitora o detector de índice de refração, uma vez que para esta análise é necessária uma informação correta da massa injetada, para que na análise do gráfico deva-se assumir 100% de massa recuperada.

Para a realização dos experimentos, o fluxo foi mantido em 0,1 mL/min, em um “loop” de 200 μL .

Foram analisadas as soluções isoladas de galactomanana, caseína e frações purificadas da caseína, bem como as misturas galactomanana-caseína. Para tanto, foram preparadas sucessivas diluições dos sistemas por adição do solvente puro, mantendo-se constante e igual a um a razão entre os dois constituintes macromoleculares, permitindo a operação em condições diluídas. As amostras foram preparadas em 5 concentrações diferentes (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL) em solução de nitrito de sódio-azida de sódio, atingindo a concentração máxima de 1 mg/mL. Esta concentração pode variar de acordo com a amostra, tendo como fator limitante a sensibilidade do detector de RI. Em seguida, estas foram filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45 μm (MILLIPORE), minutos antes da análise.

3.4.3.3. Gráfico de Zimm das amostras

Para a determinação da massa molar, deve-se fazer o gráfico de Zimm, e para isto devem ser desconectados, no dia anterior ao experimento, as colunas e o detector de índice de refração (RI) Waters 2410, restando somente o detector de luz laser (LS) DAWN-DSP, para análise das amostras. O fluxo foi mantido em 0,1 mL/min, em um “loop” de 200 μ L.

Foram analisadas as soluções isoladas de galactomanana, caseína e frações purificadas da caseína, e as misturas galactomanana-caseína, fazendo-se sucessivas diluições dos sistemas por adição do solvente puro, mantendo-se constante e igual a um a razão entre os dois constituintes macromoleculares, permitindo a operação em condições diluídas.

As amostras foram preparadas em várias concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL), dependendo da amostra, em solução de nitrato de sódio-azida de sódio e filtradas em membrana de 0,22 μ m (MILLIPORE), minutos antes da análise. Há uma relação entre os dados coletados pelo sistema DAWN-DSP e os parâmetros moleculares derivados.

***Resultados e
Discussão***

4. Resultados e discussão

O estudo da composição e estrutura química dos polissacarídeos de espécies vegetais nativas vem sendo desenvolvido no Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais da Universidade Federal do Paraná há mais de vinte anos. Dentre os polissacarídeos estudados, destacam-se as galactomananas, que estão presentes no endosperma das sementes, com função estrutural (captação de água, evitar ressecamento) e de reserva.

As galactomananas obtidas através de sementes de *M. scabrella* (bracatinga) já foram estudadas previamente quanto a sua estrutura química, aplicação e propriedades reológicas (Ganter, 1988; Ganter, 1991; Ganter *et al.*, 1991, 1992a, 1992b, 1993, 1995, 1997 e 1999; Lucyszyn, 1994; Sugui, 1994; Cardoso, 1995; Bresolin *et al.*, 1996, 1997 e 1998; Bresolin, 1998).

Estes polissacarídeos apresentam rendimentos de aproximadamente 30% (m/m), comparáveis aos das galactomananas produzidas comercialmente, e podem servir como fontes alternativas para a substituição de galactomananas comerciais, que são importadas.

O presente trabalho investigou os sistemas constituídos por misturas entre polissacarídeos e proteínas, utilizando-se galactomananas presentes no endosperma de sementes de *M. scabrella*, em comparação com as galactomananas comerciais de guar e alfarroba, e leite desnatado, caseína total e frações purificadas de caseína (α , β e κ), a fim de avaliar uma possível interação entre estes biopolímeros. Para tal propósito, a estratégia experimental compreendeu estudos reológicos, dicroísmo circular, microscopia eletrônica de transmissão e cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos.

4.1. Obtenção e purificação da galactomanana de *M. scabrella*

Após o processo de moagem, as galactomananas sofreram inativação enzimática por aquecimento, para evitar a degradação dos polissacarídeos por enzimas (hidrolases e transferases). A inativação enzimática foi realizada em microondas no tempo de 2 minutos.

A obtenção da galactomanana, ilustrada no fluxograma da figura 11, consiste na extração aquosa à temperatura ambiente e centrifugação do material para a separação dos resíduos das sementes e de possíveis estruturas agregadas, que podem influenciar nas propriedades reológicas dos polímeros, garantindo que os polissacarídeos obtidos apresentem qualidade adequada sob o ponto de vista físico-químico, com estruturas primárias e secundárias preservadas (Akiyoshi *et al.*, 1993; Rinaudo, 1993).

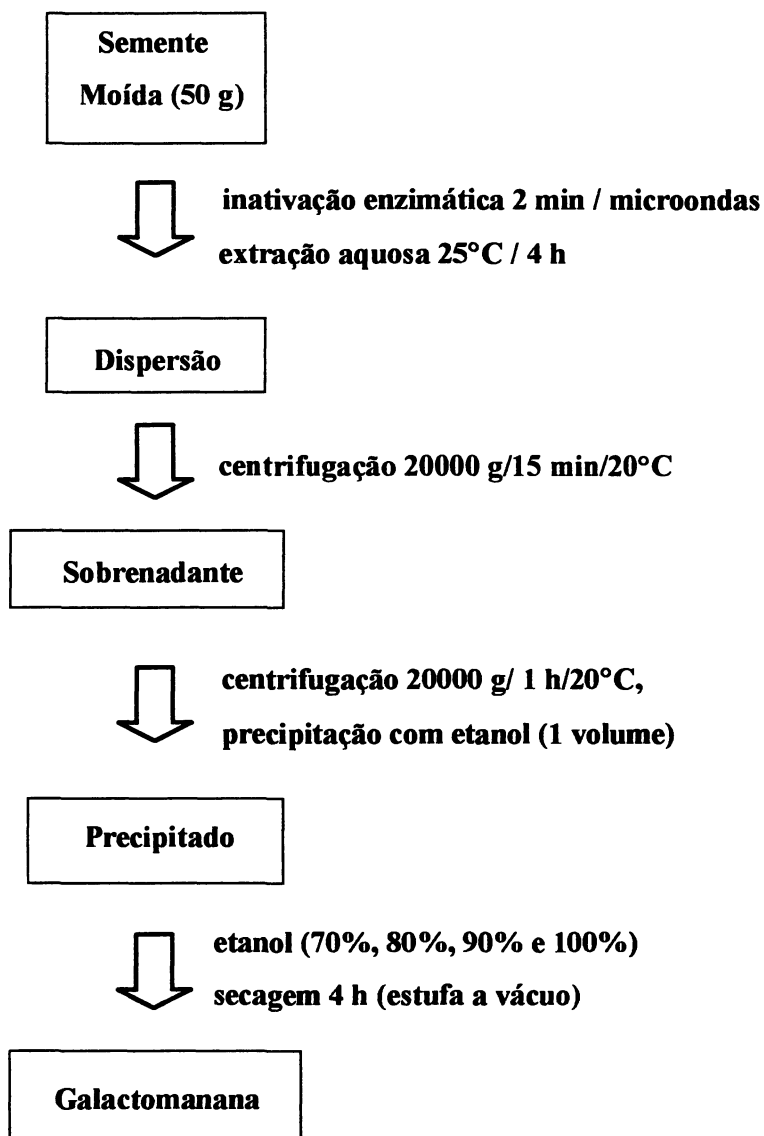
O processo de separação dos polímeros em meio aquoso envolve a utilização de etanol (agente desidratante) para a precipitação das macromoléculas. O material precipitado foi centrifugado e submetido a concentrações crescentes de etanol (70 a 100%) para que o polissacarídeo fosse purificado e estivesse livre da presença de água ou do contato com o ar, que poderiam promover o escurecimento do mesmo, devido, provavelmente, à presença de compostos fenólicos provenientes da semente (Cardoso, 1995; Bresolin, 1998).

A galactomanana foi levada imediatamente à secura em estufa a vácuo à temperatura ambiente, obtendo-se um rendimento de 20%.

A galactomanana obtida através de inativação enzimática em microondas foi submetida à hidrólise ácida total e, após redução e acetilação, os derivados na forma de acetato de alditol foram analisados por g.l.c. para a determinação de sua composição monossacarídica e relação M:G. Comprovou-se que esta apresentava como monossacarídeos principais manose e galactose em razão 1,1:1, em concordância com os resultados obtidos por Ganter (1988).

O processo de inativação enzimática das galactomananas em microondas em diferentes tempos foi investigado anteriormente (Perissutti, 1999) para a escolha de uma condição ideal de inativação, que não alterasse as propriedades físicas e o comportamento em solução das amostras. A análise foi realizada através de curvas de comportamento de fluxo das amostras de galactomanana na concentração 1g/L, mostrando que o tempo de inativação de 2 minutos era o tempo ideal para este processo de inativação enzimática, tendo em vista que não houve alteração significativa nas viscosidades absolutas entre os tempos 2 a 8 minutos. Somente a galactomanana que sofreu inativação por 10 minutos em microondas teve seu valor de viscosidade absoluta diminuído, indicando degradação da amostra devido ao tempo de inativação.

Figura 11: Fluxograma de obtenção da galactomanana de *M. scabrella*



4.2. Análise do conteúdo protéico das galactomananas

Além da composição monossacarídica presente nos polissacarídeos isolados das sementes, foi investigada a presença de conteúdo protéico das amostras de galactomanana de *M. scabrella* e das galactomananas comerciais de guar e alfarroba nativas e purificadas.

As dosagens de proteínas foram realizadas pelos métodos de Hartree (1972) e Peterson (1977), obtendo-se as seguintes percentagens em proteína, de acordo com a tabela 3.

TABELA 3: Conteúdo protéico das galactomananas de sementes de *M. scabrella* e das galactomananas comerciais de guar e alfarroba nativas e purificadas.

Método	Conteúdo protéico (% m/m)					
	<i>M. scabrella</i> nativa	<i>M. scabrella</i> purificada	Goma guar nativa	Goma guar purificada	Alfarroba nativa	Alfarroba purificada
Hartree ^a	4,1	2,3	1,2	1,2	1,8	1,8
Peterson ^b	2,6	1,4	1,2	1,9	1,9	2,6

^a Hartree, 1972; ^b Peterson, 1977

Pode-se observar através da tabela 3 que não houve variação no conteúdo protéico das galactomananas comerciais de guar e alfarroba, que sofreram um processo de extração aquosa normal (nativas) das que foram extraídas em NaCl 0,1 mol/L para a precipitação dos contaminantes de origem protéica (purificadas) através da dosagem de proteínas pelo método de Hartree. A variação encontrada no conteúdo protéico observada através da dosagem de proteínas pelo método de Peterson deve-se à precipitação pelo SDS. Somente a galactomanana de *M. scabrella* teve seu conteúdo protéico diminuído após o processo de purificação, de 4,1% para 2,3% pelo método de Hartree, e de 2,6% para 1,4% pelo método de Peterson.

A variação encontrada entre as percentagens de proteína da amostra das diferentes galactomananas pelos métodos empregados pode ser melhor compreendida tendo em vista que através do método de Hartree, uma modificação do método de Lowry para dosagem de proteínas, pode-se fazer a dosagem de proteínas e também de compostos fenólicos presentes na amostra. O método de Peterson, também é uma modificação do método de Lowry, mas utiliza SDS para a precipitação do material protéico da amostra, eliminando possíveis contaminantes que possam interferir nos resultados, sendo portanto, este método mais confiável.

A presença de um componente protéico em galactomananas de origem vegetal já foi observada anteriormente, e mesmo após diversos tratamentos como extração com solventes orgânicos, complexação com cobre, hidrólise alcalina, dissolução em elevada força iônica e hidrólise enzimática, permanecem na amostra (Ganter, 1988; Leitner, 1991; Rechia, 1992; Petkowicz, 1993; Zawadzki-Baggio, 1994; Sugui, 1994; Bresolin *et al.*, 1996; Bresolin, 1998). Este conteúdo protéico presente nas amostras da galactomanana de *M. scabrella* sugere uma ligação carboidrato-proteína, que pode ser iônica, covalente ou por adsorção (Bresolin *et al.*, 1996).

Para a purificação das galactomananas de *M. scabrella* quanto à redução do teor protéico, uma coluna de Florisil (silicato de magnésio ativado) (Sigma) foi utilizada, eluindo-se as amostras em água bidestilada para a retirada de possíveis contaminantes de origem protéica por adsorção, monitorada por dosagem de proteínas através do método de Peterson (1977).

Apesar de serem consideradas como contaminantes ou impurezas, as proteínas associadas a polissacarídeos são responsáveis pela atividade interfacial (Anderson, 1986; Gaonkar, 1991). Garti *et al.*, (1997) verificaram que após a purificação de amostras comerciais de galactomanana de “fenugreek”, com conteúdo protéico variável (50 a 100 g/kg), através de uma coluna de Florisil, houve uma drástica redução do conteúdo de proteínas (de 60 g/kg na goma nativa para um conteúdo de proteínas de 8 g/kg na goma purificada), mas a goma purificada não apresentou nenhuma atividade de superfície. Na realização de experimentos de pré-aquecimento (60 °C por 2 horas) da goma bipurificada para testar a proteína que não havia sido removida, não foram observadas diferenças significativas no comportamento da goma, antes e após o tratamento, sugerindo que: a) os polímeros proteináceos associados não são afetados (desnaturados) pelo processo de aquecimento, b) a

proteína não está associada quimicamente ao polissacarídeo, ou c) a proteína não apresenta caráter surfactante.

Através dos experimentos realizados com a galactomanana de *M. scabrella* não foi possível uma redução do teor protéico das amostras, tendo em vista a ligação das galactomananas à matriz da coluna (Florasil), impossibilitando a separação da proteína contaminante, mesmo quando utilizado um sistema em “batch”.

4.3. Análise reológica dos sistemas polissacarídeo-proteína

Após a caracterização química dos polissacarídeos, procedeu-se a análise reológica das soluções de galactomanana de *M. scabrella* e de suas misturas em leite desnatado.

Tendo em vista que os níveis permitidos para o uso das gomas guar e alfarroba na indústria de laticínios no Brasil são de 5 g/L, e nos Estados Unidos, estes níveis podem variar entre 8 e 20 g/L, respectivamente (Baird, 1993), foi escolhida a concentração de 10 g/L para a galactomanana de *M. scabrella* para as análises nos sistemas estático e dinâmico.

Considerando-se o comportamento pseudoplástico da galactomanana de *M. scabrella* em solução aquosa em concentrações acima de 3,6 g/L (Ganter, 1991), em estudos anteriores (Perissutti, 1999; Perissutti *et al.*, 2000) foram analisados os comportamentos de fluxo das galactomananas em solução aquosa em concentrações que variavam de 1 a 20 g/L, verificando a influência da velocidade de cisalhamento nos valores de viscosidade absoluta do polímero, e utilizando-as como referência para comparação com os sistemas galactomanana-proteína em sistemas contendo leite desnatado, leite integral e leite em pó desnatado, e observou-se que as soluções aquosas de galactomanana nas concentrações 5, 10 e 20 g/L apresentaram comportamento pseudoplástico, com valores de viscosidade absoluta de 18, 100 e 1000 mPa.s, respectivamente em $\dot{\gamma} = 10 \text{ s}^{-1}$. Estes resultados estão de acordo com os valores previamente obtidos (Ganter, 1991).

As misturas entre galactomanana e leite desnatado nas concentrações 5, 10 e 20 g/L apresentaram um comportamento pseudoplástico, com valores de viscosidade absoluta de 40, 300 e 2000 mPa.s em velocidade de cisalhamento de 10 s^{-1} , respectivamente. Para as misturas

contendo galactomanana e leite integral em concentrações de 3, 5, 10 e 20 g/L, as soluções apresentaram um comportamento pseudoplástico, com viscosidade absoluta de 30, 100, 500 e 2000 mPa.s, respectivamente.

Considerando-se que a viscosidade absoluta do leite desnatado e integral é de 2 mPa.s, e as viscosidades absolutas das galactomananas em solução aquosa nas mesmas concentrações (5, 10 e 20 g/L) apresentaram valores de 18, 100 e 1000 mPa.s, sugere-se uma possível interação sinérgica entre as galactomananas nas concentrações 3, 5, 10 e 20 g/L e os leites desnatado e integral (Perissutti, 1999; Perissutti *et al.*, 2000 e 2002).

Carlson *et al.* (1962), em sistemas contendo goma guar e leite desnatado, evidenciaram um aumento significativo da viscosidade absoluta da mistura, sem que houvesse separação de fases, observando um efeito sinérgico. Outros autores também comentam a existência de interação entre sistemas contendo galactomananas e leite (Ambrose, 1935; Mitchell *et al.*, 1992), confirmando os resultados obtidos, mas não há estudos mais aprofundados sobre o comportamento reológico estático e dinâmico destes sistemas, o que torna importante a complementação destes, para identificar o mecanismo de interação entre tais biopolímeros.

A interação entre galactomanana e leite integral mostrou-se mais efetiva que a interação entre galactomanana e leite desnatado. Xu *et al.* (1992) observaram que a adição de lipídeos no sistema contendo carragenana e leite em pó desnatado aumentava a força do gel e diminuía a $tg \delta$, sugerindo que além de apresentarem função preenchedora, contribuem moderadamente nas propriedades físicas do gel.

Considerando os resultados obtidos anteriormente (Perissutti, 1999; Perissutti *et al.*, 2001), pode-se sugerir que a interação entre galactomanana e leite integral é devida, provavelmente, à presença de uma maior quantidade de lipídeos, que podem interagir com os polissacarídeos e/ou proteínas do sistema, conforme já descrito na literatura (Aguilera e Kinsella, 1991; Xu *et al.*, 1992).

Perissutti (1999) e colaboradores (2002), a fim de investigar a interação polissacarídeo-proteína com menor interferência de outros componentes no sistema, tais como lipídeos, utilizaram misturas entre galactomanana e leite desnatado, utilizando-se leite em pó desnatado, em diferentes concentrações, para avaliar a influência do leite nas misturas entre galactomanana e proteína. As concentrações de galactomanana utilizadas para as análises foram 10 e 20 g/L, e as de leite em pó desnatado variaram de 25 a 200 g/L. Através destas análises pôde-se observar que a mistura galactomanana-leite em pó desnatado na

concentração 100 g/L em leite em pó (qualitativamente e quantitativamente semelhante ao leite *in natura*), apresentou viscosidades superiores (700 e 2500 mPa.s) às dos sistemas galactomanana-leite desnatado (300 e 2000 mPa.s), para ambas as concentrações em galactomanana analisadas, respectivamente, em velocidade de cisalhamento de 10 s^{-1} . Este efeito de interação sinérgica pode ser atribuído ao sistema reconstituído para o leite em pó.

Antonov *et al.* (1999), através de curvas de fluxo, observaram no sistema caseinato de sódio-goma guar que houve uma diferença significativa nos valores de viscosidade absoluta da mistura em relação à solução de goma guar isolada. O comportamento de “shear thinning” das duas amostras é idêntico, mas a mistura caseinato-guar mostra um platô Newtoniano inicial apreciavelmente maior que a solução de goma guar isolada. Através das análises reológicas e do emprego de outras técnicas como espalhamento de luz, dicroísmo circular, velocidade de sedimentação e análises em diferentes solventes, estes autores concluíram que há formação de complexos proteína-polissacarídeo com ligações fracas, as quais poderiam ser destruídas pelo aumento de força iônica.

Bourriot *et al.* (1999a) observaram que a viscosidade e as propriedades viscoelásticas da suspensão de caseína foi muito menor que a viscosidade da solução de galactomanana de guar. Todavia, as propriedades da mistura galactomanana de guar-caseína foram comparadas às da galactomanana isolada na mesma concentração, e pode-se observar que a adição de caseína ocasiona claramente mudanças dramáticas no comportamento do polissacarídeo, evidenciando um efeito sinérgico. Em concentrações de caseína de 3%, observa-se um comportamento tixotrópico para a mistura polissacarídeo-proteína. Os autores concluem através dos experimentos reológicos que a adição de caseína faz com que haja uma transição no sistema de uma solução macromolecular para um sistema sensivelmente estruturado (Bourriot *et al.*, 1999a).

4.3.1. Análise reológica das amostras por ciclos de temperatura

A interação galactomanana de *M. scabrella*-proteínas do leite foi também analisada por medidas reológicas, utilizando ciclos de temperatura, para um melhor entendimento das condições de interação. As misturas foram preparadas à temperatura ambiente, aquecidas até

75 °C em um tempo de 2 minutos e então resfriadas a 10 °C, conforme descrito no item 3.3.1.1.. Foi possível observar através deste experimento (figura 12), um máximo nos valores de G' e G'' aproximadamente a 65 °C, sendo este efeito reversível. Durante o resfriamento, na temperatura de 10 °C, os sistemas mostraram uma diminuição nos valores de G' . Todavia, a 25 °C, após o aquecimento, os valores de G' são maiores que os valores encontrados para o sistema a 25 °C sem aquecer, mostrando uma melhor interação após o aquecimento, provavelmente devido à desnaturação da proteína do leite e reorganização do sistema contendo galactomanana após o resfriamento.

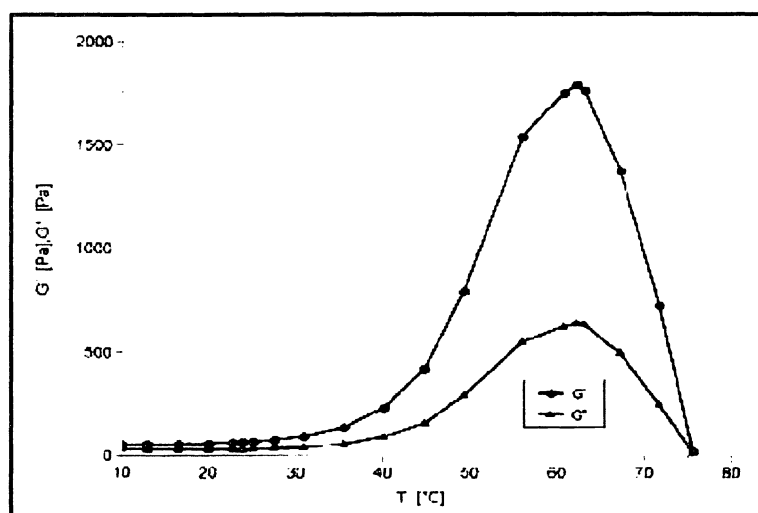


Figura 12: Análise por ciclos de temperatura (25 – 75 °C e 75 – 10 °C) do sistema galactomanana de *M. scabrella* 10 g/L: leite desnatado.

4.3.2. Análise do comportamento viscoelástico das misturas galactomanana e proteínas do leite

Os processos de resfriamento a 10 °C dos sistemas resultaram em uma diminuição de G' , mas, a 25 °C após aquecimento, os valores de G' são maiores que os do sistema a 25 °C sem aquecimento (controle), demonstrando um caráter mais elástico após o aquecimento, provavelmente devido à reorganização da associação após o resfriamento. Para confirmar este comportamento, a mistura galactomanana 10 g/L e leite desnatado, foi submetida a varreduras

de frequência a 25 °C antes e após aquecimento (figuras 13 e 14, respectivamente), e nas temperaturas de 65 (figura 15) e 75 °C (figura 16).

Tendo em vista as análises reológicas para a determinação da região viscoelástica linear das amostras de galactomanana de *M. scabrella* em solução aquosa, e de suas misturas em leite desnatado e integral realizadas no sistema dinâmico oscilatório em trabalhos anteriores (Perissutti, 1999; Perissutti *et al.*, 2002) através de varreduras de tensão, para verificar as tensões nas quais as amostras comportavam-se dentro de uma faixa viscoelástica linear (relacionando-se com os módulos de cisalhamento elástico e viscoso (G' e G'') das amostras, na frequência 1 Hz), observou-se que a galactomanana em solução aquosa, (concentrações 10 e 20 g/L), apresentou regiões lineares em uma ampla faixa de tensão (10^{-2} a 10^2 Pa). As misturas entre galactomanana (5, 10 e 20 g/L) e leite desnatado ou integral apresentaram um perfil diferente das soluções de galactomanana em solução aquosa nas mesmas concentrações, em que os módulos G' e G'' apresentam valores maiores, e mais próximos entre si, quando comparados.

Com o aumento da tensão imposta às amostras, ocorreu um progressivo aumento na deformação apresentada, e, conseqüentemente, uma diminuição nos valores G' e G'' . Os valores de deformação utilizados em análises reológicas de polissacarídeos geralmente variam entre 1 e 10% (Chronakis e Kasapis, 1993; Hember e Morris, 1995; Chronakis *et al.*, 1996; Bresolin *et al.*, 1996 e 1998; Schorsch *et al.*, 1997; Ridout *et al.*, 1998). Estes valores não devem exceder a 10%, para garantir a integridade da amostra e a validade das análises. Com base no que foi citado, foi escolhido o valor de deformação 7% para dar continuidade aos experimentos, tendo em vista que, nesta deformação, as amostras apresentaram um valor constante dos módulos G' e G'' , dentro do comportamento viscoelástico linear.

Para analisar o comportamento viscoelástico das misturas entre galactomananas de *M. scabrella* e leite desnatado, através dos módulos G' e G'' em diferentes temperaturas (25 °C sem aquecer, 25, 65 e 75 °C após aquecimento), foi escolhida a concentração 10 g/L. As análises dinâmicas por varreduras de frequência foram feitas numa amplitude de 10^{-2} a 10 Hz, na deformação 7%. Os resultados obtidos estão demonstrados nas figuras 13, 14, 15 e 16 e sumarizados, utilizando-se a frequência de 1 Hz, para comparação dos valores de G' e G'' , na tabela 4. Para determinar a precisão do método, as análises foram realizadas em triplicatas, e o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) foram calculados.

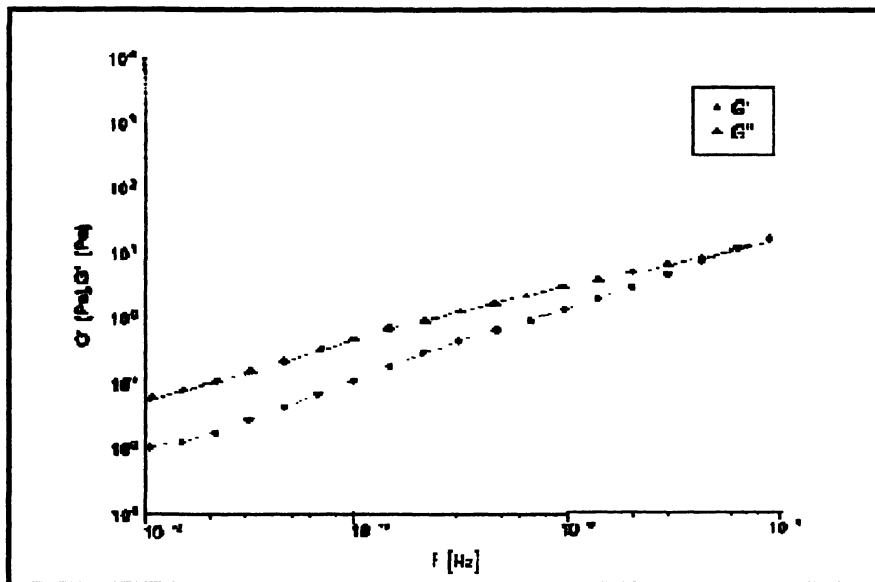


Figura 13: Análise do comportamento viscoelástico das misturas entre a galactomanana de *M. scabrella* na concentração 10 g/L e leite desnatado na temperatura de 25 °C sem aquecimento.

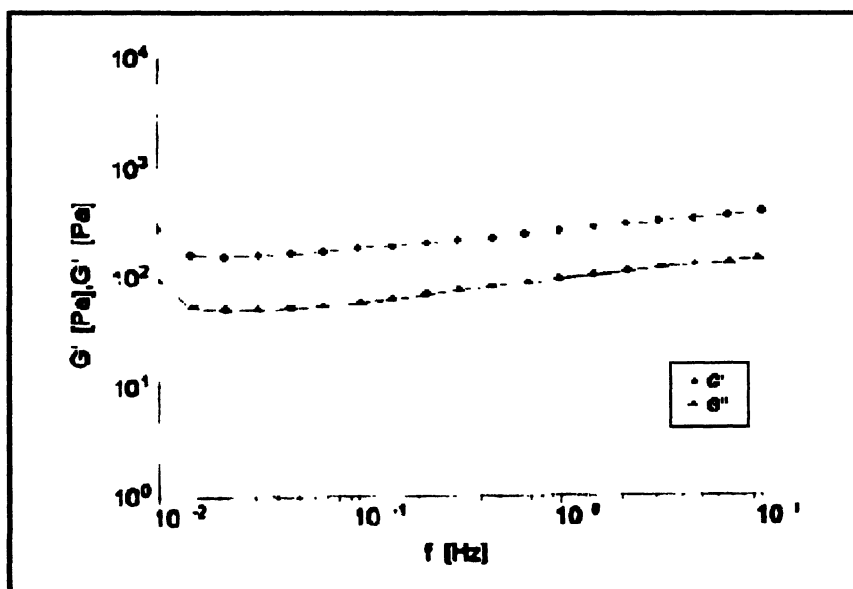


Figura 14: Análise do comportamento viscoelástico das misturas entre a galactomanana de *M. scabrella* na concentração 10 g/L e leite desnatado na temperatura de 25 °C após aquecimento.

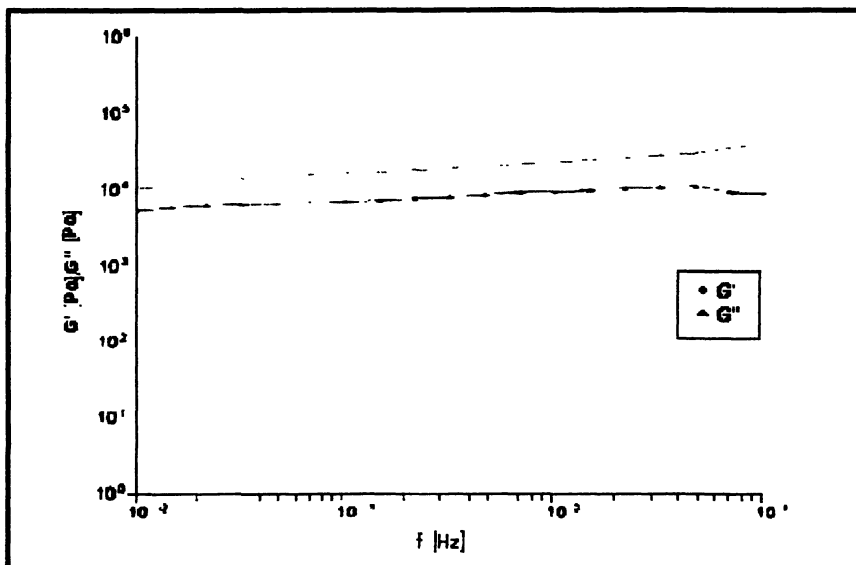


Figura 15: Análise do comportamento viscoelástico das misturas entre a galactomanana de *M. scabrella* na concentração 10 g/L e leite desnatado na temperatura de 65 °C após aquecimento.

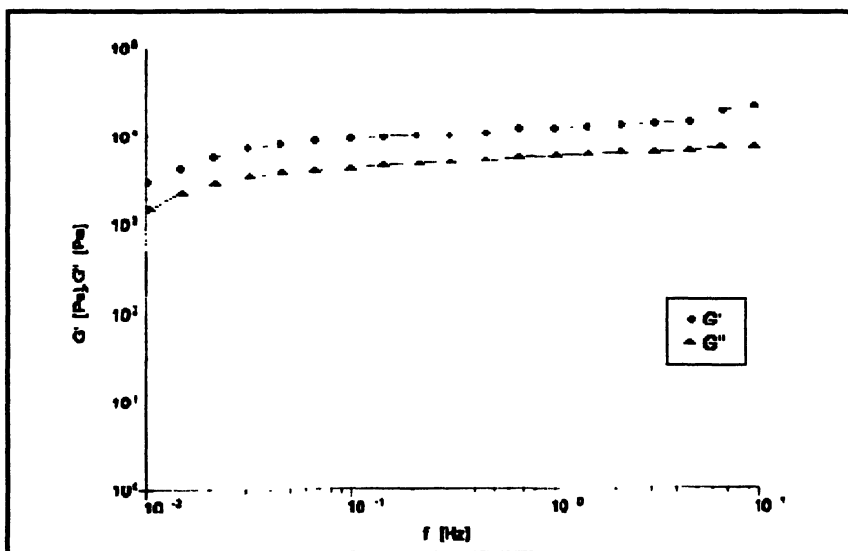


Figura 16: Análise do comportamento viscoelástico das misturas entre a galactomanana de *M. scabrella* na concentração 10 g/L e leite desnatado na temperatura de 75 °C após aquecimento.

A figura 13 representa a análise do comportamento viscoelástico das misturas galactomanana de *M. scabrella* (10 g/L) e leite desnatado na temperatura de 25 °C sem aquecimento. Pode-se observar que o módulo viscoso (G'') é superior ao módulo elástico (G') em quase toda a escala de frequência (10^{-2} a 10 Hz), o que indica um caráter viscoso, e apresenta uma inversão dos módulos G' e G'' em frequências mais elevadas, com valor de 10 Pa, na frequência de 5 Hz.

Os sistemas mostraram uma transição de uma solução concentrada a 25 °C sem aquecimento (G'' é superior a G' em baixas frequências, com uma inversão dos módulos em altas frequências) para uma estrutura mais elástica a 25 °C após aquecimento (G' superior a G'' independente da frequência). A 65 °C ocorre a formação de uma estrutura mais sólida, semelhante a 25 °C após aquecimento, apesar dos valores absolutos de G' e G'' serem superiores na temperatura de 65 °C.

Através da análise das figuras 14, 15 e 16 e tabela 4, pode-se observar que o módulo G' é superior ao módulo G'' em toda a escala de frequência (10^{-2} a 10 Hz) e estes se apresentam paralelos, indicando um aumento do caráter viscoelástico com o aumento da temperatura, em relação ao controle (figura 13), alcançando um máximo para G' e G'' na temperatura de aproximadamente 65 °C (figura 15), em que o sistema demonstra um comportamento semelhante a um gel mais acentuado ($G'/G'' = 2,8$), em concordância com a figura 12.

TABELA 4: Parâmetros de oscilação obtidos para o sistema galactomanana de *M. scabrella* e proteínas do leite a 1 Hz e diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	G' (Pa)*	G'' (Pa)*	G'/G''
25 (sem aquecer)	0,98 (18,3%)	2,32 (9,4%)	0,4
75	11725 (3,0%)	5395 (10,9%)	2,2
65	19780 (11,6%)	7069 (13,5%)	2,8
25 (após aquecimento)	237 (6,9%)	87 (4,8%)	2,7

* G' - módulo elástico; G'' - módulo viscoso; o coeficiente de variação (%) está indicado entre parênteses

A 25 °C, após aquecimento (figura 14), o material apresenta-se mais viscoelástico, semelhante a um gel fraco ($G'/G'' = 2,7$), em comparação com o sistema sem aquecer ($G'/G'' = 0,4$) (figura 13), o que indica que a interação entre os biopolímeros é favorecida pelo aquecimento. Esta informação é importante para elucidar o mecanismo de interação entre polímeros para uma aplicação industrial de sistemas onde as formulações são submetidas a ciclos de temperatura, especialmente em produtos alimentícios.

As condições de processamento de materiais na indústria podem causar modificações em suas propriedades. Neste caso, o aquecimento conduz a um comportamento mais viscoelástico. A relação G'/G'' em um alimento pode definir a sensação correspondente na boca quando um produto é consumido. Substâncias com altos valores de G'/G'' conduzem a uma sensação mais elástica, enquanto que baixos valores de G'/G'' produzem uma sensação cremosa (Petri, 2000).

Lucyszyn *et al.* (2000), em estudos de formulação de um pudim utilizando água ou leite, e galactomanana de *M. scabrella* como substituto para o amido, observaram um aumento de viscosidade para a mistura de pudim com o aumento da temperatura de 50 para 90 °C. Na formulação contendo água, um pequeno aumento de viscosidade foi observado (7 e 21% para a substituição de 5 e 10% do amido por galactomanana, respectivamente), comparando-se com o produto comercial. Todavia, formulações contendo leite apresentaram maiores viscosidades com o aumento do conteúdo em galactomanana (11, 22, 35 e 105% para a substituição de amido de 1; 2,5; 5 e 10% por galactomanana, respectivamente).

Através de dados da literatura, alguns autores afirmam que a caseína pode apresentar interações atrativas com polissacarídeos como por exemplo com galactomanana (Ambrose, 1935; Grindrod e Nickerson, 1968; Mitchell *et al.*, 1992; Antonov *et al.*, 1999) e carragenana (Pilnik e Rombouts, 1985; Morris, 1991; Hart *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Drohan *et al.*, 1997), e interações repulsivas (fases separadas) com polissacarídeos como amilopectina, dextrana, pectina, carboximetilcelulose, alginato de sódio, goma arábica, xantana, maltodextrina, succinoglicana e dextrana sulfato (Dickinson e Euston, 1991; Manoj *et al.*, 1996; Grinberg e Tolstoguzov, 1997).

Antonov *et al.* (1999) em estudos da interação entre sistemas compostos por goma guar e caseína apresentam como hipótese de um possível mecanismo de interação entre estas biomoléculas a existência de um pequeno número de grupos funcionais carregados positivamente nas moléculas do guar (provavelmente devido a proteínas associadas ao

polissacarídeo), que formam um complexo com a caseína carregada negativamente ($\text{pH} > \text{pI}$), graças a interações iônicas fracas, que sofrem redução em presença de sal.

Recentemente, alguns autores discutem a sinergia do sistema galactomanana-caseína como sendo resultado de um fenômeno de separação de fases, e utilizam a MET como ferramenta para analisar o mecanismo de interação entre as biomoléculas (Bourriot, 1999a e 1999b; Tuinier *et al.*, 2000).

Bourriot *et al.* (1999a e 1999b) através de técnicas de reologia, microscopia confocal e análise de diagramas de fase, para elucidar a interação físico-química e caracterizar o comportamento de fase das misturas, mostraram a existência de duas fases que coexistem no sistema, contendo principalmente micelas de caseína (30 g/L), enquanto que a outra é rica em goma guar (2 g/L). Em contraste, sistemas contendo guar (2 g/L) e caseína (3 g/L) apresentam somente uma única fase. Medidas reológicas mostraram um processo de separação de fases em sistemas contendo guar (0,3 g/L) e caseína (65 g/L) na fase inferior (rica em proteína) das misturas dos biopolímeros, em comparação com a suspensão de caseína (65 g/L) e misturas guar (0,3 e 2 g/L)-caseína (30 e 65 g/L) (Bourriot *et al.*, 1999a).

Estes autores sugerem que a mistura tende à separação de fases provavelmente devido a mecanismos de depleção-floculação. As micelas de caseína são frequentemente partículas esféricas. A agregação pode ser induzida pela presença de um polímero, como sugerido por Asakura e Oosawa (1954 e 1958) para o caso geral de esferas rígidas na presença de macromoléculas.

A adição de polissacarídeos ao leite pode resultar em separação de fases na fase rica em polissacarídeo, se a concentração de polissacarídeo excede certa concentração (Grinberg e Tolstoguzov, 1997).

Tuinier *et al.* (2000), em estudos sobre misturas de goma guar nativa e despolimerizada com micelas de caseína, usando uma combinação de cromatografia de exclusão e espalhamento de luz, observaram que a concentração do polímero na região limite de fase aumenta com a diminuição do comprimento de cadeia (isto é importante para alcançar uma alta viscosidade enquanto mantém uma suspensão estável). A separação de fases das misturas polissacarídeo-proteína é frequentemente devida a interações segregativas entre estes polímeros, e um sistema relativamente simples contendo somente dois biopolímeros é preferido para uma melhor compreensão destas interações.

Bourriot *et al.* (1999b) comentam que os dados reológicos mostraram uma transição de

comportamento de uma solução macromolecular para um sistema levemente estruturado, quando a caseína foi adicionada às soluções de galactomananas de guar e alfarroba.

Schorsch *et al.* (1999a e 1999b) observaram o fenômeno de separação de fases para o sistema galactomanana de guar e alfarroba em soluções de sacarose-proteínas do leite, indicando uma incompatibilidade termodinâmica entre o sistema.

Langendorff *et al.* (1999 e 2000), através de medidas reológicas e diagramas de fase, estudando misturas carragenana-leite e utilizando goma guar como controle experimental, observaram que o guar na concentração 0,05 g/L não apresentava efeito sobre o tamanho das partículas, confirmando que este polissacarídeo não absorve as micelas de caseína.

Para que estes sistemas hidrocolóide-leite sejam devidamente explorados, deve-se levar em consideração alguns aspectos inerentes ao comportamento de tais sistemas. Em primeiro lugar, os hidrocolóides não são apenas espécies de polímeros presentes em produtos lácteos; juntamente com as proteínas presentes no leite (caseína e proteínas do soro do leite) estão dissolvidos na fase aquosa e formam um sistema pseudoternário (solução de polieletrólitos polissacarídeo-proteína-água). Estas soluções de polieletrólitos ternários apresentam cargas oriundas das unidades monoméricas (aminoácidos versus monossacarídeos carboxilados, sulfatados ou não substituídos) em um solvente comum (Syrbe *et al.*, 1998). A interação entre polímeros frequentemente leva à formação de complexos ou separação de fases, enquanto que a miscibilidade simples é uma exceção (Antonov *et al.*, 1979a, 1979b e 1979c).

Em segundo lugar, a maioria dos produtos lácteos contem grandes quantidades de partículas coloidais, cujas superfícies são de uma natureza proteínica. Os efeitos de adsorção ou não adsorção de polissacarídeos nestas superfícies devem ser considerados para o entendimento do comportamento dos sistemas lácteos contendo hidrocolóides (Syrbe *et al.*, 1998). Disto pode-se concluir que as soluções ternárias de biopolímeros aquosos estão entre os sistemas de polímeros mais complexos: proteínas naturais e polissacarídeos são sistemas multicomponentes, compostos de diferentes unidades monoméricas em várias seqüências, e frequentemente, polidispersas.

A presença de outro polímero favorece a redução do número de configurações possíveis; para emaranhados a probabilidade de um polímero adaptar-se no domínio de outro diminui de forma exponencial com o aumento do comprimento da cadeia. Como resultado, as macromoléculas em solução tendem a permanecerem afastadas umas das outras, o que leva à mútua exclusão do volume acessível para os seus centros de massa. O efeito de exclusão é

mais importante para cadeias rígidas e estendidas (xantana) que para macromoléculas ramificadas ou estruturas compactas (proteínas globulares). A interpenetração das cadeias diminui com a concentração do polímero e alcança um limite menor em moléculas poliméricas não sobrepostas do que em grande diluição. Quando duas soluções binárias de polímeros são colocadas juntas, nenhuma das espécies de polímero encontra muito espaço adicional livre para ocupar, mesmo em baixas concentrações, gerando três tipos de situações: incompatibilidade, coacervação complexa, ou miscibilidade (Syrbe *et al.*, 1998).

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, e em estudos anteriores (Perissutti, 1999; Perissutti *et al.*, 2002), em conjunto com os dados da literatura, pode-se sugerir uma possível sinergia entre galactomananas de *M. scabrella* e proteínas do leite, principalmente a caseína, devido a mudanças nas propriedades reológicas no sistema dinâmico, através de varreduras de frequência e ciclos de temperatura, em relação ao sistema composto por galactomanana-leite desnatado sem aquecimento. Todavia, outros autores sugerem que outras forças, tais como interações hidrofóbicas, possam estar presentes nestes sistemas, e o fenômeno de separação de fases, todavia, não pode ser descartado.

4.4. Análise por dicroísmo circular das misturas galactomanana e proteínas do leite

Para uma avaliação mais aprofundada do comportamento da caseína em sua mistura com a galactomanana, foram desenvolvidas análises por dicroísmo circular, uma vez que esta técnica permite a observação de mudanças conformacionais da caseína.

Os espectros de DC das amostras foram realizados no Laboratório de Biofísica Molecular e Espectroscopia do Instituto de Física da Universidade de São Carlos – USP, em colaboração com a Profª. Dra. Leila Beltramini.

Os ciclos de aquecimento e resfriamento foram realizados por meio de um banho de água circulante, numa faixa de temperatura de 25 a 75 °C, observando-se uma possível formação de associações moleculares entre galactomanana e caseína total e frações purificadas de caseína (α , β e κ). Na ausência de associação entre os biopolímeros, o espectro apresenta-se semelhante aos espectros das soluções dos componentes individuais isolados na

mesma concentração que as misturas, enquanto que uma mudança no espectro de dicroísmo circular pode indicar uma possível interação.

4.4.1. Análise por dicroísmo circular da galactomananas isoladas

Para a análise de DC das galactomananas de *M. scabrella* nativa e *M. scabrella* purificada, goma guar e alfarroba purificadas isoladas utilizou-se a concentração de 2,5 mg/mL dos polissacarídeos em tampão fosfato de potássio 0,008 mol/L e observou-se que as galactomananas não apresentaram contribuição no espectro de DC, coerente com a ausência de grupamentos cromóforos do polímero, conforme se observa na figura 17.

Não houve uma diferença significativa nos valores mínimos obtidos para as diferentes galactomananas. Para a goma guar purificada, observou-se uma banda de valor mínimo de $-0,85$ em um comprimento de onda (λ) de 222,09 nm, com uma inversão de valores negativos para positivos em 199,67 nm. Para a alfarroba purificada, observou-se um mínimo de $-0,63$ em 225,53 nm, e inversão de valores negativos para positivos em 201,43 nm; para a *M. scabrella* nativa observou-se um mínimo de $-0,83$ em 223,94 nm, com uma inversão de valores em 195,93 nm; e para a galactomanana de *M. scabrella* purificada observou-se um mínimo de $-0,65$ em 219,72 nm, e inversão de valores em 194,34 nm.

Como as galactomananas são polissacarídeos neutros, estes não deveriam apresentar nenhum sinal no espectro de DC, mas observa-se para todas as galactomananas analisadas a presença de sinais negativos no gráfico, possivelmente oriundos de contaminantes protéicos presentes nestas amostras, que mesmo em pequenas concentrações, alteram o perfil da amostra no espectro de DC. Os sinais positivos presentes nos comprimentos de onda (λ) entre 190 e 200 nm são devidos provavelmente à presença de polifenóis contaminantes que interferem na assimetria da molécula, e puderam ser detectados devido à alta sensibilidade deste método, que é uma ferramenta indispensável na análise da estrutura secundária de proteínas.

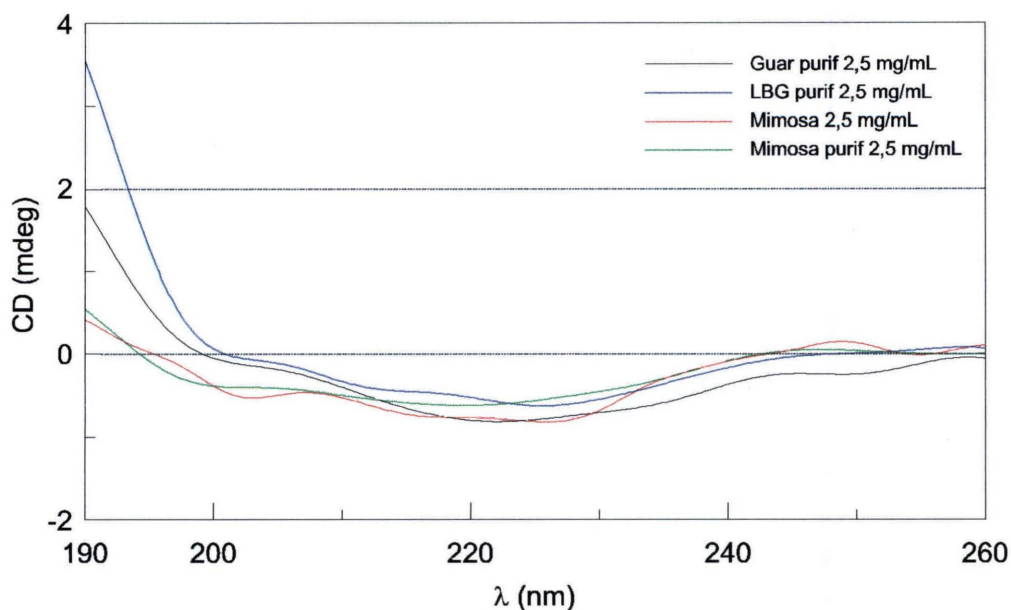


Figura 17: Espectro de dicroísmo circular das galactomananas isoladas.

O espectro de DC observado para a galactomanana de *M. scabrella* nativa mostra-se semelhante ao espectro da galactomanana realizado por Bresolin *et al.* (1996) em misturas galactomanana de *M. scabrella*-xantana. Estes autores comentam que a proteína associada à galactomanana tem provavelmente uma conformação em folha β -pregueada antiparalela.

4.4.2. Análise por dicroísmo circular das caseínas isoladas

A caseína total e frações purificadas de caseína (α , β e κ) foram analisadas na concentração de 0,2 mg/mL em tampão fosfato de potássio 0,008 mol/L, conforme a figura 18, e foi observado que todos os espectros apresentaram-se semelhantes, típicos de uma estrutura não ordenada (estrutura randômica), com espectro de DC caracterizado por uma banda negativa em torno de 200 nm, devido à contribuição principal da estrutura em emaranhado.

Houve uma diferença significativa nos valores obtidos para os mínimos para a caseína e suas diferentes frações. Quanto aos valores obtidos para os mínimos, observou-se para a caseína total uma banda de valor mínimo de $-6,96$ em um comprimento de onda (λ) de

201,09 nm; para a α -caseína observou-se um mínimo de $-8,05$ em 201,76 nm, para a β -caseína observou-se um mínimo de $-14,37$ em 200,04 nm e para a κ -caseína um mínimo de $-7,35$ em 201,09 nm. O espectro da β -caseína mostrou-se similar aos espectros citados na literatura (Caessens *et al.*, 1999).

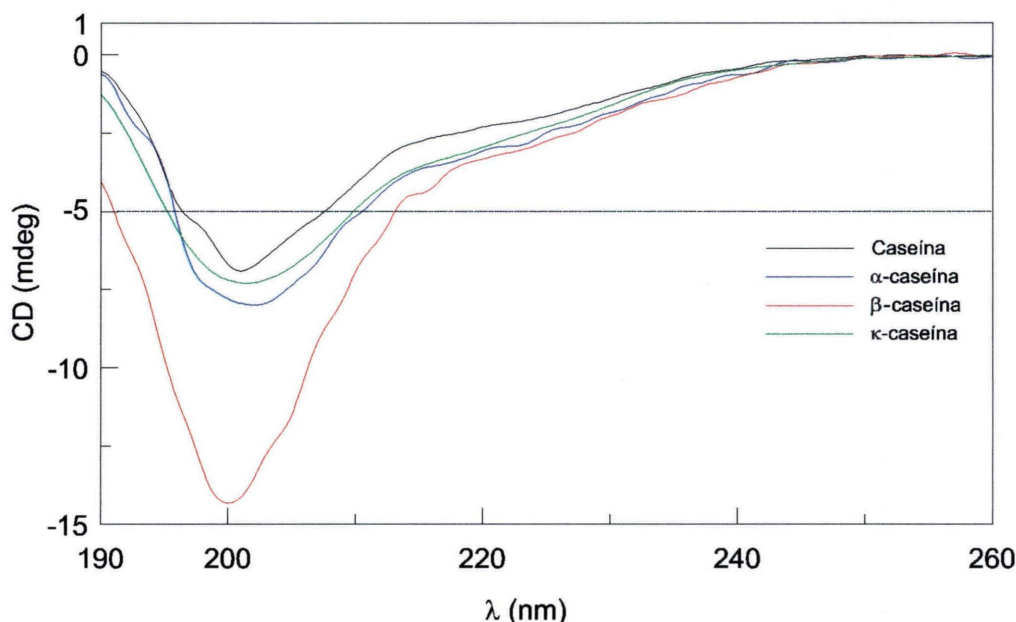


Figura 18: Espectro de dicroísmo circular das proteínas isoladas (caseína total, e frações α , β e κ -caseína).

4.4.3. Análise por dicroísmo circular das misturas galactomanana-proteína

Para avaliar de uma maneira mais completa se mudanças conformacionais ocorrem quando a galactomanana e a caseína são misturadas, fez-se o estudo de dicroísmo circular em diferentes concentrações de galactomanana de *M. scabrella* (0,05; 0,5; 1 e 5 mg/mL) mantendo-se a mesma concentração em caseína total (0,2 mg/mL) e também variando a concentração em caseína total (0,025; 0,05 e 0,1 mg/mL) mantendo-se a mesma concentração de galactomanana (2,5 mg/mL). Para uma melhor análise dos espectros de DC, foi plotada a soma dos espectros individuais dos dois biopolímeros (galactomanana + caseína) em uma curva denominada teórica (referente à ausência de interação entre os biopolímeros), realizada pelo software do equipamento. Uma diferença na intensidade dos sinais e/ou deslocamento

destes sinais entre as bandas obtidas através das análises e os espectros teóricos calculados pelo “software” para a soma dos dois biopolímeros, indica uma possível interação devida à alteração da estrutura secundária da proteína.

Através destes experimentos, observaram-se variações na intensidade do sinal de DC e nos deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos das amostras, e foram escolhidas a galactomanana e a caseína nas concentrações 2,5 e 0,2 mg/mL, respectivamente, como condições ideais para a continuidade dos experimentos.

Para as misturas entre as galactomananas de *M. scabrella* nativa e *M. scabrella* purificada, goma guar e alfarroba purificadas, utilizou-se a mesma concentração empregada nos experimentos com os biopolímeros isolados e observou-se que ocorreu uma variação no espectro de DC em relação aos obtidos para as galactomananas e as caseínas isoladamente, coerente com uma mudança conformacional no sistema. Estas variações no espectro de DC foram tanto de intensidade de espectro quanto de deslocamento dos picos mínimos observados para as misturas, sendo um indicativo de interação entre as duas espécies macromoleculares.

Uma variação significativa nos valores obtidos para os mínimos das diferentes misturas foi observada, conforme as figuras 19, 20, 21 e 21 e tabela 5. Para as misturas contendo galactomanana de guar purificada e caseína total (figura 21), observou-se uma banda de valor mínimo de $-10,49$ em um comprimento de onda de $201,09$ nm; ocorrendo uma variação significativa na intensidade do sinal de DC. Nas misturas contendo as frações purificadas da caseína, observou-se uma banda de valor mínimo de $-8,12$ em $201,76$ nm para a α -caseína, $-13,26$ em $200,60$ nm para a β -caseína e $-9,69$ em 202 nm para a κ -caseína. Para as frações purificadas da caseína, observou-se uma maior variação na intensidade do sinal de DC e um deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos nas misturas contendo a fração κ -caseína, em relação aos biopolímeros isolados. Para a fração α -caseína não houve uma variação significativa no espectro de DC.

Para as misturas contendo galactomanana de alfarroba purificada e caseína total (figura 20), observou-se uma banda de valor mínimo de $-11,06$ em um comprimento de onda de $201,76$ nm; ocorrendo como para a goma guar uma variação significativa na intensidade do sinal de DC, mas também ocorreu um deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos. Nas misturas contendo as frações purificadas da caseína, observou-se uma banda de valor mínimo de $-8,30$ em $202,15$ nm para a α -caseína, $-13,42$ em $199,24$ nm para a

β -caseína e $-9,75$ em $201,49$ nm para a κ -caseína. De modo semelhante às misturas contendo goma guar, para as frações purificadas da caseína, observou-se uma maior variação na intensidade do sinal de DC e um pequeno deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos nas misturas contendo a fração κ -caseína, em relação aos biopolímeros isolados.

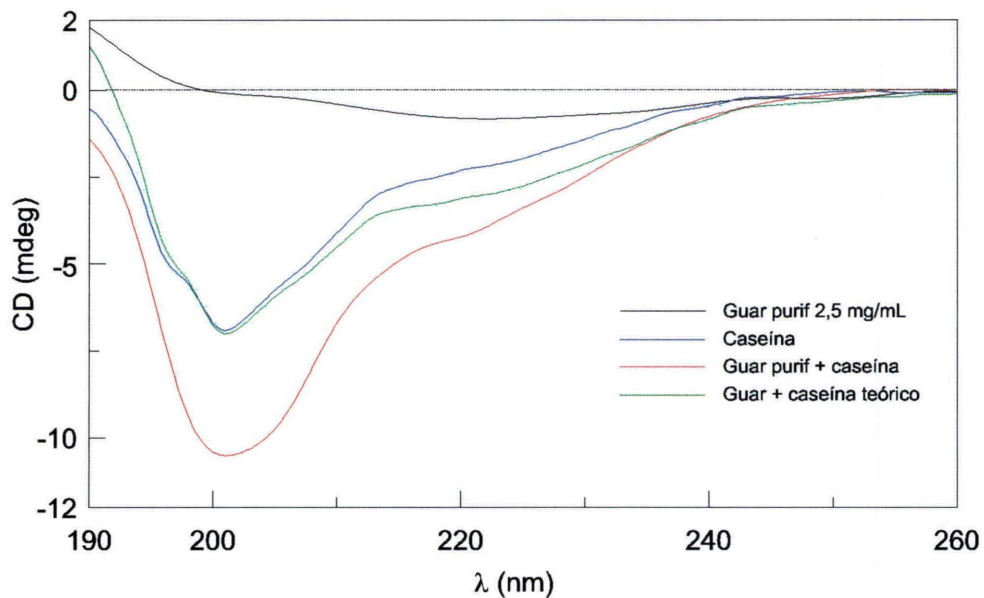


Figura 19: Espectro de dicroísmo circular das misturas contendo galactomanana de goma guar e caseína total.

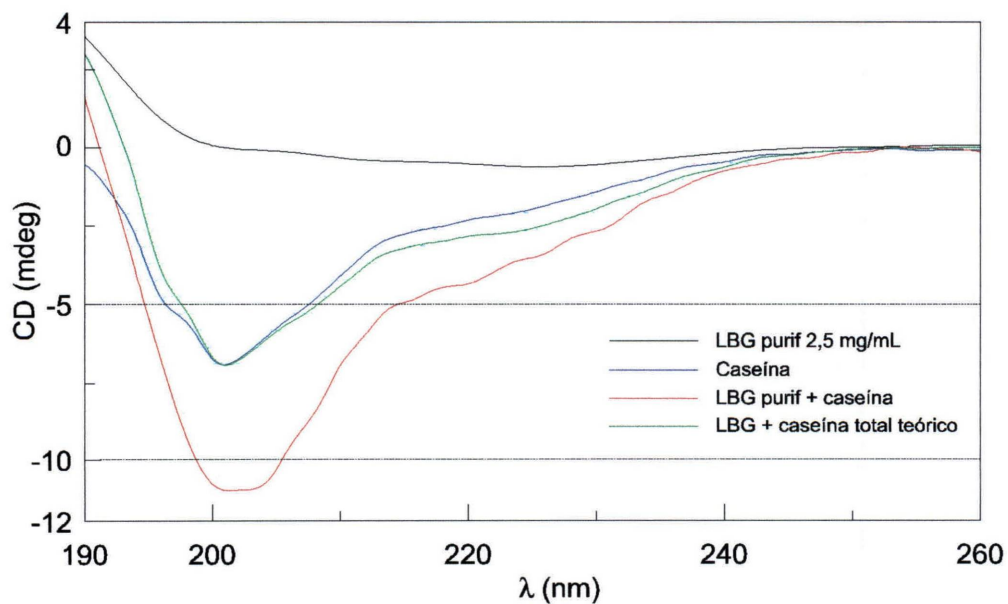


Figura 20: Espectro de dicroísmo circular das misturas contendo galactomanana de alfarroba e caseína total.

Para as misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* nativa e caseína total (figura 21), observou-se uma banda de valor mínimo de $-10,29$ em um comprimento de onda de $201,87$ nm; semelhante ao que ocorreu para as gomas comerciais de guar e alfarroba, uma variação significativa na intensidade do sinal de DC e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos foi observada. Nas misturas contendo as frações purificadas da caseína, observou-se uma banda de valor mínimo de $-8,85$ em $201,23$ nm para a α -caseína, $-12,89$ em $199,51$ nm para a β -caseína e $-10,00$ em $200,30$ nm para a κ -caseína.

No caso das misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* purificada e caseína total (figura 22), observou-se uma banda de valor mínimo de $-10,65$ em um comprimento de onda de $200,43$ nm. Nas misturas contendo as frações purificadas da caseína, observou-se uma banda de valor mínimo de $-8,85$ em $200,04$ nm para a α -caseína, $-14,29$ em $199,77$ nm para a β -caseína e $-9,46$ em $200,17$ nm para a κ -caseína. Para ambas as misturas contendo galactomananas de *M. scabrella* nativa e *M. scabrella* purificada com as frações de caseína, verificou-se que as frações que continham κ -caseína apresentaram uma maior variação na intensidade dos sinais no espectro de DC, seguida pela fração β -caseína e, por último, a fração α -caseína.

Em géis formados por misturas de κ -carragenana com caseína total ou frações purificadas da caseína (α , β e κ) por DC, Hart *et al.* (1992) observaram que a carragenana altera a conformação da κ -caseína no espectro de DC, em relação aos sistemas contendo somente os biopolímeros isolados. Para as misturas contendo carragenana e a fração α -caseína, os autores não observaram uma alteração no espectro de DC em relação aos biopolímeros isolados, e para as misturas contendo a fração β -caseína não se pode obter um espectro de DC devido à turbidez do sistema.

Antonov *et al.* (1999) investigaram a interação entre os sistemas guar e caseinato de sódio ou β -caseína, através de análises de espectros de DC, espalhamento de luz, curvas de fluxo e diagramas de fase, e observaram que os espectros de DC da β -caseína na região de UV a pH 5,6 e força iônica $I = 0,008$, são caracterizados por um efeito negativo, com um mínimo em 200 nm, correspondendo a uma estrutura desordenada, semelhante à observada neste trabalho. O guar apresentou um espectro na região de UV com uma banda dicróica simples característica, com pico positivo aproximadamente em 203 nm. Já a mistura galatomanana- β -caseína resultou em uma diferença no espectro de DC da proteína em uma

grande variação de concentrações de galactomanana utilizadas. Os resultados de DC mostram que a formação do complexo guar- β -caseína causa um pequeno rompimento na estrutura secundária da proteína. Com estes resultados, os autores mostram a existência de uma interação atrativa fraca entre o sistema, com a formação de associações, levantando uma hipótese de que este complexo é possivelmente estabilizado pelas cargas negativas da caseína e alguns grupos funcionais positivamente carregados ligados à molécula da galactomanana.

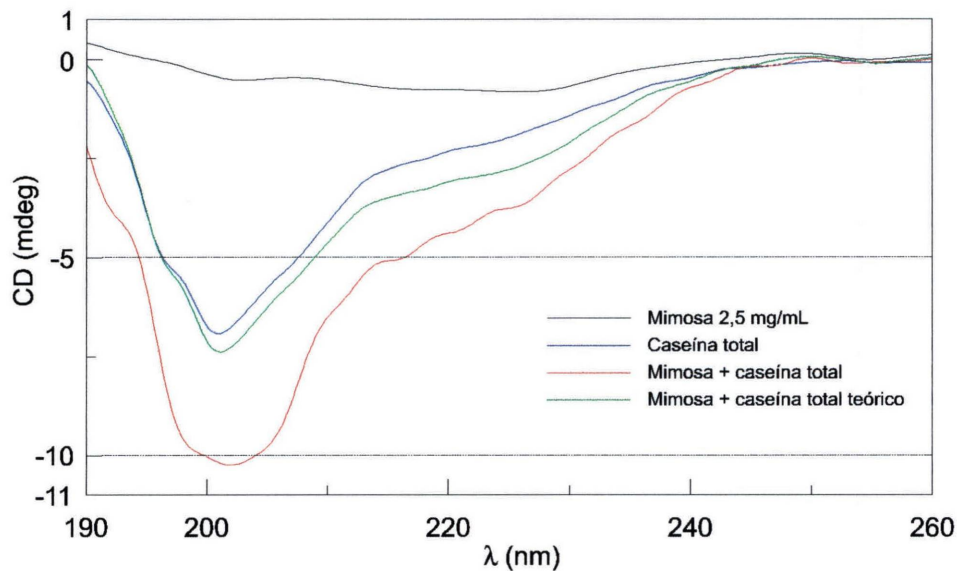


Figura 21: Espectro de dicroísmo circular das misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* nativa e caseína total.

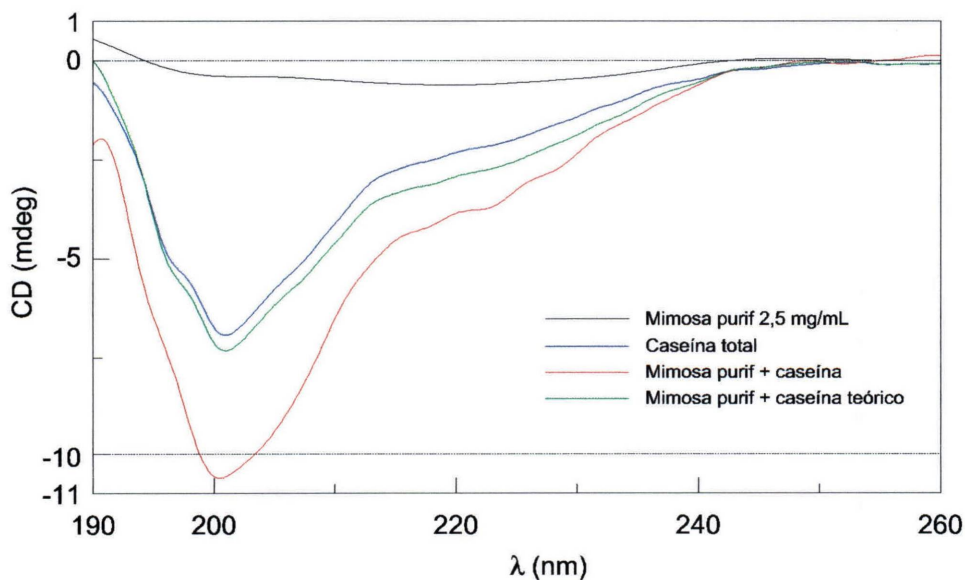


Figura 22: Espectro de dicroísmo circular das misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* purificada e caseína total.

TABELA 5: Valores mínimos e inversão entre os valores negativos para positivos (cruzamento) nos espectros de dicroísmo circular das galactomananas, caseína total e frações purificadas de caseína (α , β e κ) e das diferentes misturas galactomanana-caseína estudadas.

Sistema	Mínimo		Cruzamento
	DC (md _{eg})	λ (nm)	λ (nm)
Galactomanana			
Guar purificado	-0,85	222,09	199,67
Alfarroba purificada	-0,63	225,53	201,43
<i>M. scabrella</i> nativa	-0,83	223,94	195,93
<i>M. scabrella</i> purificada	-0,65	219,72	194,34
Caseína			
Caseína total	-6,96	201,09	-
α -caseína	-8,05	201,76	-
β -caseína	-14,37	200,04	-
κ -caseína	-7,35	201,09	-
Misturas galactomanana-caseína total			
Guar purificado + caseína total	-10,49	201,09	-
Alfarroba purificada + caseína total	-11,06	201,76	191,16
<i>M. scabrella</i> nativa + caseína total	-10,29	201,87	-
<i>M. scabrella</i> purificada + caseína total	-10,65	200,43	-
Misturas galactomanana-α-caseína			
Guar purificado + α -caseína	-8,12	201,76	191,30
Alfarroba purificada + α -caseína	-8,30	202,15	191,88
<i>M. scabrella</i> nativa + α -caseína	-8,85	201,23	-
<i>M. scabrella</i> purificada + α -caseína	-8,85	200,04	-
Misturas galactomanana-β-caseína			
Guar purificado + β -caseína	-13,26	200,60	-
Alfarroba purificada + β -caseína	-13,42	199,24	-
<i>M. scabrella</i> nativa + β -caseína	-12,89	199,51	-
<i>M. scabrella</i> purificada + β -caseína	-14,29	199,77	-
Misturas galactomanana-κ-caseína			
Guar purificado + κ -caseína	-9,69	202	-
Alfarroba purificada + κ -caseína	-9,75	201,49	-
<i>M. scabrella</i> nativa + κ -caseína	-10,00	200,30	-
<i>M. scabrella</i> purificada + κ -caseína	-9,46	200,17	-

4.4.4. Efeito da granulometria das galactomananas nas análises por dicroísmo circular

Para verificar se a granulometria causava algum efeito sobre a interação galactomanana-caseína no espectro de DC, utilizou-se a galactomanana de *M. scabrella* na concentração 2,5 mg/mL retida na peneiras de malha 100 e 200 e caseína total ou β -caseína na concentração 0,2 mg/mL.

As amostras com diferentes granulometrias também foram testadas quanto ao tempo de solubilização, não apresentando diferenças entre si ou com amostras não peneiradas.

Os valores mínimos e inversão entre os valores negativos para positivos (cruzamento) nos espectros de dicroísmo circular das misturas galactomanana de *M. scabrella*-caseína com diferentes granulometrias de galactomanana estão listados na tabela 6.

Para a galactomanana de *M. scabrella* retida na peneira de malha 100, observou-se uma banda de valor mínimo de $-0,93$ em um comprimento de onda de $220,77$ nm, semelhante ao que ocorreu para a galactomanana sem peneirar ($-0,83$; $\lambda = 223,94$ nm), ocorrendo uma variação na intensidade do sinal de DC, e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos. Nas misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* retida na peneira de 100 e caseína total, observou-se uma banda de valor mínimo de $-7,60$ em um comprimento de onda de $199,77$ nm, ocorrendo uma variação significativa na intensidade do sinal de DC e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos observados em relação a mistura galactomanana-caseína total sem peneirar ($-10,29$; $\lambda = 201,87$ nm). Nas misturas contendo β -caseína, observou-se uma banda de valor mínimo de $-10,32$ em $199,64$ nm, onde também foi observada uma variação na intensidade do sinal de DC para os picos mínimos em relação à mistura galactomanana- β -caseína sem peneirar ($-12,89$; $\lambda = 199,51$ nm).

Para a galactomanana de *M. scabrella* retida na peneira de malha 200, observou-se uma banda de valor mínimo de $-0,88$ em um comprimento de onda de $223,15$ nm, semelhante ao que ocorreu para a galactomanana sem peneirar ($-0,83$; $\lambda = 223,94$ nm), não ocorrendo uma variação na intensidade do sinal de DC, e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos. Nas misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* retida na peneira de malha 200 e caseína total, observou-se uma banda de valor mínimo de $-6,88$ em um

comprimento de onda de 200,04 nm, ocorrendo uma variação significativa na intensidade do sinal de DC e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos observados, em relação à mistura galactomanana-caseína total sem peneirar ($-10,29$; $\lambda = 201,87$ nm). Nas misturas contendo β -caseína, observou-se uma banda de valor mínimo de $-9,22$ em 201,49 nm, e uma variação na intensidade do sinal de DC e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos em relação à mistura galactomanana- β -caseína sem peneirar ($-12,89$; $\lambda = 199,51$ nm).

TABELA 6: Valores mínimos e inversão entre os valores negativos para positivos (cruzamento) nos espectros de dicroísmo circular das misturas galactomanana de *M. scabrella*-caseína com diferentes granulometrias de galactomanana.

Sistema	Mínimo		Cruzamento
	DC (md_{eg})	λ (nm)	λ (nm)
Galactomanana			
<i>M. scabrella</i> peneira malha 100	-0,93	220,77	201,57
<i>M. scabrella</i> peneira malha 200	-0,88	223,15	205,04
Misturas galactomanana-caseína total			
<i>M. scabrella</i> peneira malha 100 + caseína total	-7,60	199,77	-
<i>M. scabrella</i> peneira malha 200 + caseína total	-6,88	200,04	-
Misturas galactomanana-β-caseína			
<i>M. scabrella</i> peneira malha 100 + β -caseína	-10,32	199,64	-
<i>M. scabrella</i> peneira malha 200 + β -caseína	-9,22	201,49	-

Através destes experimentos, pode-se observar que a granulometria da galactomanana interferiu nos espectros de DC das misturas galactomanana-caseína total e galactomanana- β -caseína, provavelmente devido a uma mudança conformacional observada para as misturas

contendo galactomananas com diferentes granulometrias. Estas mudanças conformacionais podem estar contribuindo para uma melhor interação do sistema polissacarídeo-proteína.

4.4.5. Efeito dos ciclos de temperatura nas análises por dicroísmo circular

Para analisar o efeito da temperatura sobre a interação galactomanana-caseína no espectro de DC, utilizaram-se as galactomananas de *M. scabrella* nativa e de guar purificada na concentração 2,5 mg/mL e caseína total ou κ -caseína na concentração 0,2 mg/mL, com ciclos de aquecimento e resfriamento realizados por meio de um banho de água circulante, numa faixa de temperatura de 25 a 75 °C.

Inicialmente foram avaliadas as mudanças conformacionais sofridas pelos biopolímeros isolados, utilizando-se a galactomanana de *M. scabrella* em ciclos de aquecimento de 25 a 75 °C, com intervalos de 10 em 10 °C, a galactomanana de guar purificada em ciclos de aquecimento de 25 a 75 °C, com intervalos de 20 em 20 °C, caseína total em ciclos de aquecimento de 25 a 75 °C, com intervalos de 10 em 10 °C e κ -caseína em ciclos de aquecimento de 25 a 75 °C, com intervalos de 20 em 20 °C. Para os ciclos de resfriamento utilizaram-se as galactomananas e as caseínas em ciclos de 75 a 25 °C, com intervalos de 10 em 10 °C para a mistura galactomanana de *M. scabrella*-caseína total, e ciclos de resfriamento de 65 a 25 °C, com intervalos de 20 em 20 °C (65, 45 e 25 °C) para as misturas galactomanana de *M. scabrella*- κ -caseína, galactomanana de guar purificada-caseína total e galactomanana de guar purificada- κ -caseína.

Os valores mínimos e inversão entre os valores negativos para positivos (cruzamento) nos espectros de DC das misturas galactomanana de *M. scabrella* e guar-caseína em experimentos de temperatura estão listados na tabela 7.

Para a galactomanana de *M. scabrella* isolada, os valores observados para as bandas de valor mínimo nas diferentes temperaturas, mostraram que ocorre uma variação na intensidade do sinal de DC, e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos, principalmente a partir da temperatura de 55 °C.

Nos espectros de DC da galactomanana de guar purificada na temperatura de 25 °C, não foram observadas variações nas bandas do polissacarídeo com a variação de temperatura.

Em relação aos resultados obtidos para a caseína total isolada, observou-se uma variação tanto na intensidade do sinal de DC quanto no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos.

Para a κ -caseína, foi utilizada a banda da temperatura de 25 °C, com valores de $-7,35$ em $\lambda = 201,09$ nm para os experimentos de DC envolvendo ciclos de temperatura, por não serem observadas variações significativas nas bandas da proteína nas diferentes temperaturas.

Nas misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* e caseína total, observaram-se bandas de valor mínimo em comprimentos de onda distintos para as diferentes temperaturas, ocorrendo uma grande variação na intensidade do sinal de DC a partir da temperatura de 35 °C que se manteve praticamente estável até 55 °C, e novamente uma grande variação na intensidade do sinal a partir da temperatura de 65 °C. Os deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos sofreram uma pequena variação a partir da temperatura de 35 °C (até 55 °C), e uma grande variação a partir da temperatura de 65 °C.

No ciclo de resfriamento das misturas galactomanana de *M. scabrella*-caseína total, ocorreu uma grande variação na intensidade do sinal de DC, mas uma pequena variação nos deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos (exceto na temperatura de 35 °C).

Quantos às misturas contendo galactomanana de *M. scabrella*- κ -caseína, observou-se uma grande variação na intensidade do sinal de DC a partir da temperatura de 65 °C. Os deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos sofreram uma pequena variação a partir da temperatura de 65 °C.

No ciclo de resfriamento das misturas galactomanana de *M. scabrella*- κ -caseína, houve uma grande variação na intensidade do sinal de DC a partir da temperatura de 45 °C, mas uma pequena variação nos deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos.

Nas misturas contendo galactomanana de guar purificada-caseína total, houve uma grande variação na intensidade do sinal de DC a partir da temperatura de 35 °C, que se manteve praticamente estável até 65 °C, e novamente uma grande variação na intensidade do sinal na temperatura de 75 °C. Os deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos sofreram uma pequena variação com a temperatura.

TABELA 7: Valores mínimos e inversão entre os valores negativos para positivos (cruzamento) nos espectros de dicroísmo circular das misturas galactomanana de *M. scabrella* ou goma guar e caseína em experimentos de temperatura.

Sistema	Mínimo		Cruzamento
	DC (md _r)	λ (nm)	λ (nm)
Galactomanana			
<i>M scabrella</i> 25 °C	-0,83	223,94	195,93
<i>M scabrella</i> 35 °C	-0,88	226,32	207,85
<i>M scabrella</i> 45 °C	-0,85	229,62	207,60
<i>M scabrella</i> 55 °C	-0,75	230,64	210,46
<i>M scabrella</i> 65 °C	-0,78	227,58	206,61
<i>M scabrella</i> 75 °C	-0,70	225,32	200,54
Caseína			
Caseína total 25 °C	-6,96	201,09	-
Caseína total 35 °C	-7,26	201,21	-
Caseína total 45 °C	-6,40	202,57	-
Caseína total 55 °C	-7,10	202,57	-
Caseína total 65 °C	-5,93	202,34	-
Caseína total 75 °C	-5,50	201,21	-
Misturas galactomanana-caseína total aquecimento			
<i>M scabrella</i> + caseína total 25 °C	-10,29	201,87	-
<i>M scabrella</i> + caseína total 35 °C	-5,19	200,17	-
<i>M scabrella</i> + caseína total 45 °C	-5,06	200,04	-
<i>M scabrella</i> + caseína total 55 °C	-5,47	200,69	-
<i>M scabrella</i> + caseína total 65 °C	-1,78	221,17	192,36
<i>M scabrella</i> + caseína total 75 °C	-1,37	228,83	198,93
Guar + caseína total 25 °C	-10,49	201,09	-
Guar + caseína total 45 °C	-8,17	202,28	191,86
Guar + caseína total 65 °C	-8,56	201,76	191,24
Guar + caseína total 75 °C	-7,39	202,81	193,59
Misturas galactomanana-caseína total resfriamento			
<i>M scabrella</i> + caseína total 65 °C	-2,27	201,88	191,49
<i>M scabrella</i> + caseína total 55 °C	-4,31	201,36	-
<i>M scabrella</i> + caseína total 45 °C	-2,80	201,88	191,12
<i>M scabrella</i> + caseína total 35 °C	-1,58	225,92	194,71
<i>M scabrella</i> + caseína total 25 °C	-1,76	202,41	192,48
Guar + caseína total 65 °C	-7,07	200,83	191,36
Guar + caseína total 45 °C	-9,29	200,96	190,49
Guar + caseína total 25 °C	-7,00	200,57	-
Misturas galactomanana-κ-caseína aquecimento			
<i>M scabrella</i> + κ-caseína 25 °C	-10,00	200,30	-
<i>M scabrella</i> + κ-caseína 45 °C	-9,22	199,24	-
<i>M scabrella</i> + κ-caseína 65 °C	-5,98	202,54	195,33
<i>M scabrella</i> + κ-caseína 75 °C	-8,75	200,69	191,74
Guar + κ-caseína 25 °C	-9,69	202	-
Guar + κ-caseína 45 °C	-8,60	202,68	190,99
Guar + κ-caseína 65 °C	-7,21	202,81	192,97
Guar + κ-caseína 75 °C	-6,89	204,00	193,35
Misturas galactomanana-κ-caseína resfriamento			
<i>M scabrella</i> + κ-caseína 65 °C	-8,48	202,68	192,34
<i>M scabrella</i> + κ-caseína 45 °C	-8,01	200,17	-
<i>M scabrella</i> + κ-caseína 25 °C	-3,27	200,83	-
Guar + κ-caseína 65 °C	-7,02	204,00	192,85
Guar + κ-caseína 45 °C	-7,33	201,76	191,86
Guar + κ-caseína 25 °C	-7,09	201,89	-

No ciclo de resfriamento das misturas galactomanana de guar e caseína total, não houve uma variação na intensidade do sinal de DC (exceto na temperatura de 45 °C), sem variação nos deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos.

Nas misturas contendo galactomanana de guar- κ -caseína, a observação das bandas de valor mínimo mostrou uma variação na intensidade do sinal de DC a partir da temperatura de 35 °C. Os deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos não sofreram variação (exceto na temperatura de 75 °C).

No ciclo de resfriamento das misturas galactomanana de guar- κ -caseína, não ocorreu uma variação significativa na intensidade do sinal de DC com o resfriamento, entretanto foi observada uma pequena variação nos deslocamentos no comprimento de onda para os picos mínimos a partir da temperatura de 45 °C.

Observando-se as diferenças nos valores da intensidade do sinal e nos deslocamentos no comprimento de onda de DC para os picos mínimos com os ciclos de aquecimento e resfriamento, verifica-se que a galactomanana de guar é mais estável que a de *M. scabrella*, tanto nas misturas com a caseína total quanto nas com κ -caseína, devido a uma menor variação nos espectros, quando as misturas são submetidas a estes ciclos de temperatura, em comparação com os espectros das misturas a 25 °C. Esta maior estabilidade pode tanto ser devida à diferença na relação manose:galactose entre estas galactomananas: a goma guar apresenta uma relação de 1,5:1 (menos substituída), enquanto que a de *M. scabrella* apresenta uma relação de 1,1:1 (mais substituída), quanto aos diferentes conteúdos em proteínas que estas galactomananas apresentam, e que poderiam interferir na interação polissacarídeo-proteína, (goma guar purificada apresenta um conteúdo protéico de 1,2 e 1,9%, e a galactomanana de *M. scabrella* um conteúdo protéico de 4,1 e 2,6% estimado pelos métodos de Hartree (1972) e Peterson (1977), respectivamente). Este maior conteúdo em proteínas na galactomanana de *M. scabrella* pode ser responsável pelas diferenças observadas nos espectros da DC, causando uma maior instabilidade ao sistema.

Silva-Lucca *et al.* (1999) em estudos de lectina KM+ de sementes de *Artocarpus integrifolia* por técnicas de DC, cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência (SEC) e medidas termodinâmicas e de fluorescência, observaram que somente após uma incubação por 60 minutos a 60 - 65 °C, e, pH extremamente básico, foram capazes de induzir mudanças conformacionais observadas por DC e medidas de fluorescência.

4.5. Eletroforese dos sistemas polissacarídeo-proteína

A eletroforese é um método relacionado à migração de partículas carregadas em um determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. O emprego da eletroforese é mais notado no fracionamento e caracterização de aminoácidos, peptídeos, proteínas, incluindo lipó e glicoproteínas, nucleotídeos, ácidos carboxílicos e outras substâncias de relevância biológica, que podem apresentar cargas em função do pH do meio. A relação entre a carga e a massa molar para migrantes de formas similares é determinante de seus comportamentos eletroforéticos (Silva Júnior, 2001).

Para haver chance de migração é preciso desequilibrar, eletricamente, duas regiões extremas de um meio contendo eletrólitos, onde esteja dissolvida ou dispersa uma substância com potencial para migrar. Uma solução tampão é estabelecida para fornecer uma diferença de potencial entre dois eletrodos ligados aos terminais de uma fonte de corrente contínua e dispostos em dois compartimentos, catódico e anódico, contendo ambos (Silva Júnior, 2001).

O meio físico de separação, igualmente tamponado, se comunica através de suas extremidades com as soluções tampão dos eletrodos, fechando assim o circuito elétrico. A corrente elétrica, ao passar pelo meio, conduzida pelos pequenos íons presentes em solução, dá ensejo ao deslocamento (Silva Júnior, 2001).

O meio onde está dissolvida ou dispersa a partícula é determinante de sua carga final e de seu volume molecular, desde que nos arredores da partícula estejam a água, alguns co-íons e contra-íons que podem se associar à partícula. O pH do meio influencia a quantidade de carga superficial que uma partícula pode ter. Por outro lado, a força iônica do meio deve ser de tal ordem que permita uma migração e não um efeito de resistência. A partícula que migra é, em verdade, uma resultante da interação entre a partícula principal e suas partículas vizinhas (Silva Júnior, 2001).

4.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida é a técnica mais utilizada para a análise de proteínas, pois apresenta como principais vantagens o alto poder de resolução, pela migração das proteínas de acordo com seus tamanhos, de acordo com sua relação massa molar/carga (géis de poliacrilamida em condições não desnaturantes ou nativas (PAGE)).

Em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), esta determinação é uma consequência da ligação uniforme das partes hidrofóbicas das proteínas com o dodecilsulfato de sódio (SDS), conduzindo a um aumento exagerado de cargas negativas das proteínas, tornando-as, praticamente, indistinguíveis do ponto de vista de carga (apresentam a mesma carga residual total), e migrem somente pela diferença entre as massas molares que apresentam, resultando em uma relação constante massa molar/carga, e permitindo a determinação de suas massas molares.

O agente redutor β -mercaptoetanol, ao romper as pontes dissulfeto presentes em boa parte das proteínas, torna o acesso do SDS mais facilitado às partes mais internas das proteínas, além de contribuir para a separação de cadeias polipeptídicas mantidas por esta ligação covalente.

Descontinuidades são introduzidas na porosidade dos géis, na composição química e no pH das soluções tampão que constituem cada gel, assim como na composição e pH da solução tampão presente nas câmaras anódica e catódica. O contra-íon relativo às formas migrantes é formado pela base orgânica TRIS, que está presente em concentrações diferentes nas soluções tampão dos géis e nas câmaras contendo os eletrodos. As soluções tampão dos géis são formadas por TRIS-HCl, enquanto que as das câmaras anódica e catódica são formadas por TRIS-glicina. Assim o efeito concentrador verificado nas bandas protéicas e polissacarídicas permite arrumá-las na forma de discos diminutos, bem estreitas, umas sobre as outras, em ordem decrescente de suas mobilidades líquidas, conferindo uma grande resolução entre elas (Silva Júnior, 2001).

No sistema clássico de eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida, os componentes químicos presentes são os íons glicinato, cloreto, proteínatos e TRIS. Os três primeiros migram para o ânodo, enquanto que o último migra para o cátodo. Antes de dar-se início à eletroforese, os íons presentes no tampão dos eletrodos (pH = 8,3) são o glicinato e o

TRIS, e os íons cloreto e novamente o TRIS presentes nos géis de separação (pH = 6,8). As proteínas, em princípio de pI ácidos, são dissolvidas na solução tampão de pH = 6,8, e colocadas sobre o gel de separação. Tão logo comece a eletroforese e a corrente elétrica flua nos sistemas de géis, haverá uma arrumação iônica no gel de separação, liderada pelo ion cloreto, seguido dos íons protéicos e finalizada pelo ion glicinato. Tal ordenação no gel de pH = 6,8 (que tem um efeito concentrador) é decorrente da manutenção de uma fronteira móvel finíssima entre os dois íons cloreto e glicinato, onde se encaixam as proteínas. Esta fronteira é mantida graças a uma relação constante entre as concentrações da glicina e do cloreto, e para isto as proteínas devem apresentar mobilidades líquidas menores que as do ion cloreto e maiores que do ion glicinato (Silva Júnior, 2001).

Quando as proteínas chegam ao gel fracionador, elas já estão separadas ou resolvidas, e têm sua separabilidade ampliada em função dos efeitos peneiradores deste gel e da modificação do pH do meio, que é bem maior no gel empilhador. Nesta situação, os íons glicinato, por estarem em pH bem próximo ao pK de seu grupamento amino, sobrepõem, na corrida, os íons protéicos e se alinham atrás dos íons cloreto, deixando as proteínas para trás.

Em princípio, as proteínas já resolvidas, ao chegarem ao gel fracionador, apresentam suas mobilidades aumentadas por entrarem em um pH superior àquele do gel de empilhamento.

4.5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) das amostras

A homogeneidade e massa molar das amostras de galactomanana, caseína e das misturas galactomanana-caseína foram investigadas por PAGE, SDS-PAGE e por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS).

A figura 23 mostra o perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella*, caseína total e frações purificadas (α , β e κ -caseína) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE nativo), revelada por azul de Coomassie para a presença de proteínas. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras.

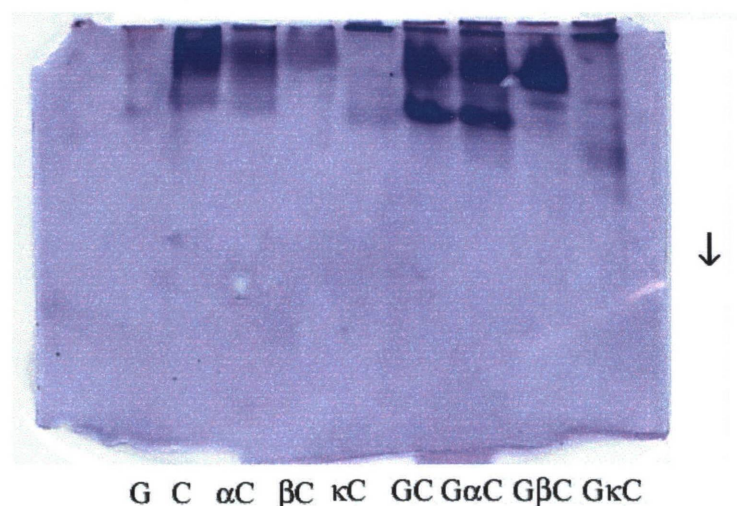


Figura 23: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE nativo), revelada por azul de Coomassie. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras.

Através da análise do perfil eletroforético que mostra a migração das amostras de acordo com sua relação massa/carga, pode-se observar que a galactomanana de *M. scabrella* (G) apresentou coloração negativa por azul de Coomassie, indicando a ausência de conteúdo protéico, entretanto as determinações colorimétricas indicam que esta galactomanana apresenta um conteúdo protéico de 4,1 e 2,6% (m/m), determinados pelos métodos de Hartree (1972) e Peterson (1977), respectivamente. Estes derivados protéicos são provenientes da semente, que mesmo após o processo de purificação, permanecem presentes como contaminantes. A ausência de coloração positiva para proteínas pelo azul de Coomassie talvez se deva à baixa concentração utilizada de galactomanana (100 μ g/20 μ L), que não permitiu a observação das proteínas contaminantes por este método.

A caseína total (C) e suas frações α -caseína (α C), β -caseína (β C) e κ -caseína (κ C) coraram-se intensamente pelo azul de Coomassie (exceto a amostra κ -caseína), apresentando 3 bandas protéicas, onde a primeira e a terceira bandas foram mais intensas.

Nas misturas galactomanana-caseína total (GC) e galactomanana-frações purificadas da

caseína (α , β e κ), $G\alpha C$, $G\beta C$ e $G\kappa C$, respectivamente, não se observaram diferenças nas bandas protéicas em relação à caseína total isolada, quanto à intensidade de coloração, nem em relação ao padrão de migração das proteínas, mantendo-se inalteradas. Através desta técnica não foi possível observar se a presença de galactomanana nestas misturas altera de alguma forma a estrutura da caseína, interferindo na intensidade de coloração das bandas ou no padrão de migração desta, devido à baixa concentração utilizada de galactomanana no experimento (100 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$), o que não permitiu a observação e uma possível interação.

A figura 24 mostra o perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella*, caseína total e frações purificadas (α , β e κ -caseína) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), revelada por azul de Coomassie para a presença de proteínas.

Neste perfil eletroforético, observa-se a migração das amostras de galactomanana, proteína (caseína e frações) e de suas misturas de acordo com suas relações de massa molar, uma vez que a utilização de SDS em géis de poliacrilamida (condições desnaturantes) faz com que as partes hidrofóbicas das proteínas liguem-se ao SDS, conduzindo a um aumento exagerado de cargas negativas das proteínas, tornando-as, praticamente, indistinguíveis do ponto de vista de carga (apresentam a mesma carga residual total), e migrem somente pela diferença entre as massas molares.

Além do SDS, o β -mercaptoetanol (agente redutor) rompe as pontes dissulfeto presentes em boa parte das proteínas, facilita o acesso do SDS às partes mais internas das proteínas, e contribui para a separação de cadeias polipeptídicas.

Através da figura 24, pode-se observar que a galactomanana de *M. scabrella* (G) apresentou coloração negativa por azul de Coomassie (confirmando os resultados da figura 23), com ausência de conteúdo protéico.

Os dados referentes à caseína total (C) e suas frações α -caseína (αC), β -caseína (βC) e κ -caseína (κC), também confirmam os resultados obtidos na figura 23, onde estas proteínas coraram-se intensamente pelo azul de Coomassie, apresentando diversas bandas num total de 8 (sendo 3 bandas protéicas mais intensas, com exceção da fração βC com somente 2 bandas principais). Através da comparação com os padrões de massa molar aplicados juntamente com estas amostras, pode-se estimar a massa molar de algumas bandas apresentadas por estas proteínas.

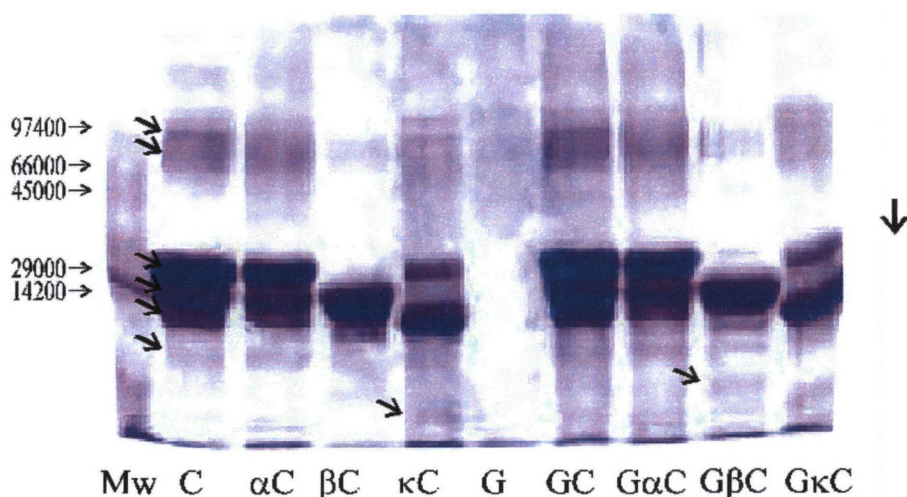


Figura 24: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), revelada por azul de Coomassie. M_w = marcador de massa molar. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras; as setas horizontais indicam os padrões de massa molar utilizados, e as setas na diagonal representam as bandas principais.

Nas misturas galactomanana-caseína total (GC) e galactomanana-frações purificadas da caseína (α , β e κ), $G\alpha C$, $G\beta C$ e $G\kappa C$, respectivamente, não se observaram diferenças nas bandas protéicas em relação à caseína total isolada, quanto à intensidade de coloração, nem em relação ao padrão de migração das proteínas, mantendo-se inalteradas.

Através do perfil eletroforético mostrado na figura 25, pode-se observar o padrão de migração das amostras de galactomanana, proteína (caseína e frações) e de suas misturas de acordo com suas relações massa/carga (PAGE nativo), coradas com nitrato de prata, o que revelou para a galactomanana de *M. scabrella* (G) coloração positiva, específica para carboidratos.

A caseína total (C) e suas frações α -caseína (α C), β -caseína (β C) e κ -caseína (κ C) coraram-se pelo nitrato de prata, indicando uma possível contaminação das amostras por lactose.

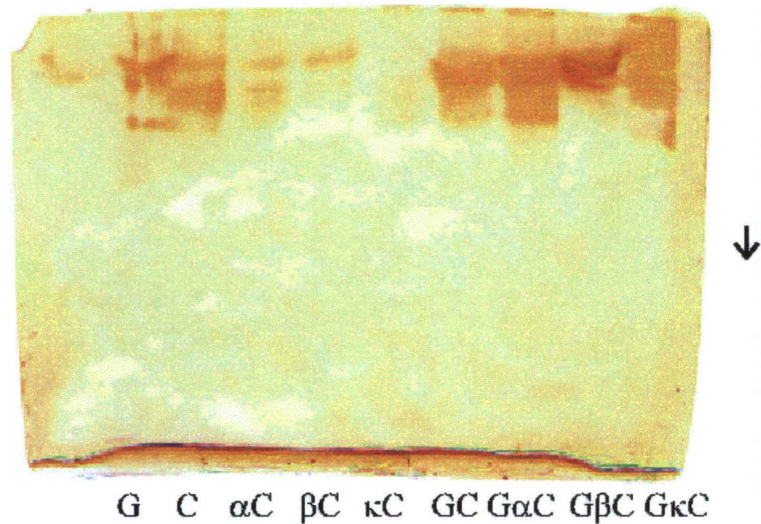


Figura 25: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE nativo), revelada por nitrato de prata. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras.

Nas misturas galactomanana-caseína total (GC) e galactomanana-frações purificadas da caseína (α , β e κ), $G\alpha C$, $G\beta C$ e $G\kappa C$, respectivamente, observaram diferenças na intensidade de coloração em relação aos polímeros isolados, com bandas mais intensas devido à presença das 2 macromoléculas. Em relação ao padrão de migração das proteínas, não foi possível observar mudanças no perfil eletroforético, permanecendo as bandas inalteradas em relação aos biopolímeros isolados. Através desta técnica também não foi possível observar se a presença de galactomanana nestas misturas altera de alguma forma a estrutura da caseína, interferindo na intensidade de coloração das bandas ou no padrão de migração desta.

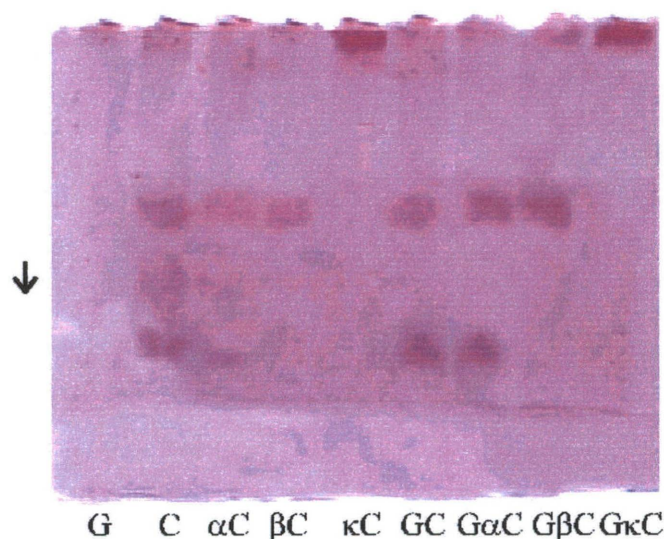


Figura 26: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE nativo), revelada por reativo de ácido periódico-Schiff. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras.

Através do perfil eletroforético mostrado na figura 26 pode-se observar o padrão de migração das amostras de galactomanana, proteína (caseína e frações) e de suas misturas de acordo com suas relações massa/carga (PAGE nativo), em que a galactomanana de *M. scabrella* (G) não apresentou coloração positiva por reativo de ácido periódico-Schiff, talvez pela baixa concentração utilizada no experimento (100 μ g/20 μ L), que não permitiu a observação. A caseína total (C) e suas frações α C e β C coraram-se pelo reativo de ácido periódico-Schiff (exceto a fração κ C, que corou muito pouco), indicando uma possível contaminação das amostras por lactose. Nas misturas galactomanana-caseína total (GC) e galactomanana-frações purificadas da caseína (α , β e κ), G α C, G β C e G κ C, respectivamente, não foi possível observar diferenças na intensidade de coloração em relação aos polímeros isolados, nem em relação ao padrão de migração das bandas de proteínas.

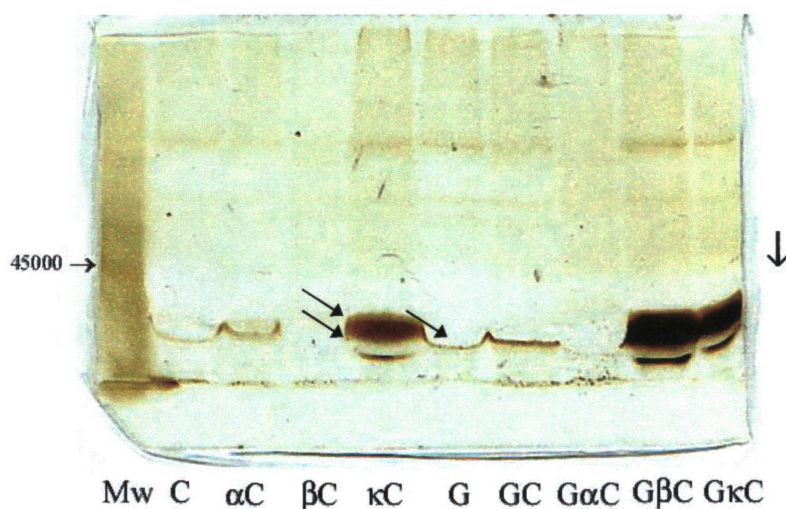


Figura 27: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (SDS-PAGE), revelada por nitrato de prata. M_w = marcador de massa molar. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras; as setas horizontais indicam os padrões de massa molar utilizados, e as setas na diagonal representam as bandas principais.

Através do perfil eletroforético mostrado na figura 27, pode-se observar o padrão de migração das amostras de galactomanana, proteína (caseína e frações) e de suas misturas de acordo com suas relações de massa molar (SDS-PAGE), onde galactomanana de *M. scabrella* (G) apresentou banda com pouca coloração positiva pelo reativo de nitrato de prata, talvez pela baixa concentração utilizada no experimento (100 μ g/20 μ L), que não possibilitou a observação. A caseína total (C) e suas frações α C, β C e κ C coraram-se pelo reativo de nitrato de prata; as frações caseína total, α C e β C apresentaram uma banda principal, enquanto que a fração κ C apresentou duas bandas, indicando novamente uma possível contaminação das amostras por lactose. As bandas coradas pelo reativo de ácido periódico-Schiff apresentaram uma massa molar menor que 45000 Da, referente à massa molar da albumina bovina, (cora-se positivamente por este reativo devido à presença de unidades de manose).

Nas misturas galactomanana-caseína total (GC) e galactomanana-frações purificadas da caseína (α , β e κ), G α C, G β C e G κ C, respectivamente, não foi possível observar diferenças na intensidade de coloração em relação aos polímeros isolados, nem em relação ao padrão de

migração das bandas de proteínas.

A figura 28 mostra o perfil eletroforético de migração das amostras de galactomanana, proteína (caseína e frações) e de suas misturas de acordo com suas relações de massa molar (SDS-PAGE). Observa-se que a galactomanana de *M. scabrella* (G) não apresentou coloração positiva por reativo de ácido periódico-Schiff, talvez pela baixa concentração utilizada no experimento (100 µg/20 µL), que não possibilitou a observação de coloração.

A caseína total (C) e suas frações α C, β C e κ C coraram-se pelo reativo de ácido periódico-Schiff; as frações caseína total e α C apresentaram 2 bandas principais, enquanto que as frações β C e κ C apresentaram 1 única banda, provavelmente devido a uma possível contaminação das amostras pela lactose.

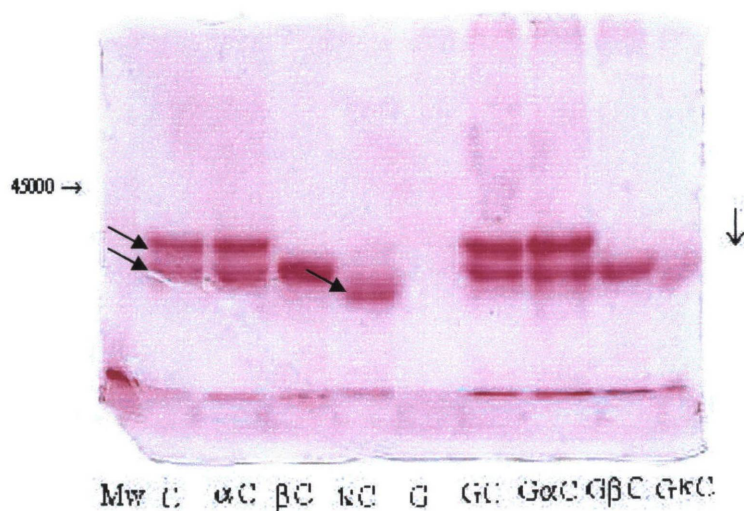


Figura 28: Perfil eletroforético das amostras de galactomanana de *M. scabrella* (G), caseína total (C), frações purificadas α -caseína (α C), β -caseína (β C), κ -caseína (κ C) e das misturas galactomanana-caseína, em gel com 10% de poliacrilamida em condições não desnaturantes (SDS-PAGE), revelada por reativo de ácido periódico-Schiff para a presença de carboidratos. M_w = marcador de massa molar. A seta vertical indica o sentido de migração das amostras; as setas horizontais indicam os padrões de massa molar utilizados, e as setas na diagonal representam as bandas principais.

Confirmando os dados anteriores, as bandas coradas pelo reativo de ácido periódico-

Schiff apresentaram uma massa molar menor que 45000 Da. Nas misturas galactomanana-caseína total (GC) e galactomanana-frações purificadas da caseína, G α C, G β C e G κ C, novamente não foi possível verificar diferenças na intensidade de coloração em relação aos polímeros isolados, nem em relação ao padrão de migração das bandas de proteínas.

4.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os experimentos de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) – Universidade Federal do Paraná (UFPR), em colaboração com as Professoras Daura Regina Eiras Stofella e Dorly de Freitas Buchi, do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) e Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), respectivamente.

Para a realização dos experimentos de MET, foram utilizadas soluções contendo os biopolímeros isolados (galactomanana de *M. scabrella*, caseína total e frações α , β e κ -caseína) como controles, e misturas galactomanana-caseína e frações purificadas em diferentes relações polissacarídeo-proteína a fim de se observar a interação entre estes componentes.

A técnica utilizada para esta análise, descrita no item 3.2.9., foi desenvolvida a partir de uma metodologia citada por Akiyoshi *et al.* (1993) para estudo de polissacarídeos (pululana) através de MET. Em geral, nas análises realizadas com misturas de biopolímeros, para o preparo da amostra, emprega-se a técnica do emblocamento da mistura polissacarídeo-proteína, onde há o encapsulamento da amostra em gel de ágar, fixação com tetróxido de ósmio, desidratação, congelamento e corte em fragmentos através de ultramicrotomo para posterior análise. Esta técnica, além de trabalhosa e de difícil realização, exige várias etapas para o preparo da amostra, e existem muitas variáveis que podem interferir no resultado do experimento. Na metodologia empregada no presente trabalho, foi feita a mistura dos biopolímeros, com deposição em uma grade de cobre contendo uma película de parlódio, exposição a uma solução de acetato de uranila para contraste, e secagem em estufa à vácuo à temperatura ambiente, sem a necessidade de congelamento do material, com poucas variáveis, reprodutível, e com a obtenção de ótimas imagens.

4.6.1. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das amostras de polissacarídeo e proteína isoladas

As amostras isoladas de galactomanana de *M. scabrella* e caseína total e frações α , β e κ -caseína foram analisadas em microscópio eletrônico, utilizando-se acetato de uranila como contraste, obtendo-se as figuras representadas a seguir.

Na figura 29, está representada a eletromicrografia obtida para a galactomanana de *M. scabrella* que apresentou um aspecto muito semelhante às soluções de outras galactomananas comerciais analisadas pela técnica convencional de encapsulamento (Bourriot *et al.*, 1999a e 1999b; Goff *et al.*, 1999; Pellegrino *et al.* 1999; Schorsch *et al.*, 1999a e 1999b), mostrando-se geralmente distribuída de maneira uniforme (homogênea) sobre a tela, com a presença de agregados em algumas regiões, observados através de uma maior coloração com o contraste, confirmando que esta técnica pode ser utilizada para a análise de biopolímeros, por apresentar maior praticidade e rapidez em relação à técnica tradicional, pois apresenta poucas variáveis além de boa resolução.

A eletromicrografia da caseína total (figura 30) apresentou um aspecto muito semelhante aos resultados descritos na literatura (Bourriot *et al.*, 1999a e 1999b; Goff *et al.*, 1999; Pellegrino *et al.* 1999; Schorsch *et al.*, 1999a e 1999b) para as soluções desta proteína analisadas pela técnica convencional de encapsulamento, mostrando-se geralmente distribuídas de maneira uniforme sobre a tela, na forma de partículas esféricas, fundidas ou agregadas entre si. Este arranjo em micelas e a formação de um esqueleto de proteína criam espaços livres onde estas biomoléculas estão inseridas. As micelas de caseína estão organizadas em entidades supramoleculares grandes que podem ser consideradas como partículas esféricas. Elas estão cobertas pela κ -caseína, que as estabiliza em uma suspensão através de repulsões estéricas e eletrostáticas; esta superfície impede polímeros neutros de adsorverem-se nas micelas. Uma dispersão contendo caseína micelar é mais próxima a uma suspensão particulada do que a uma solução macromolecular (Bourriot *et al.*, 1999a).

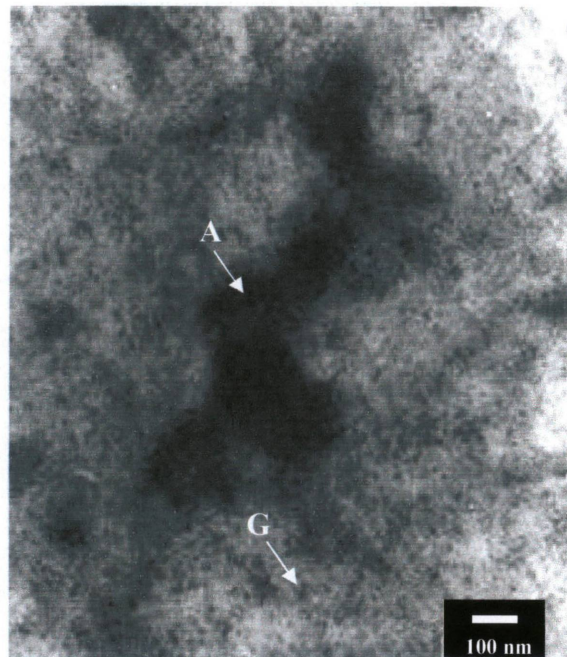


Figura 29: Micrografia da galactomanana de *M. scabrella* (2 g/L) obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 50000 vezes. A = agregados, G = galactomanana.

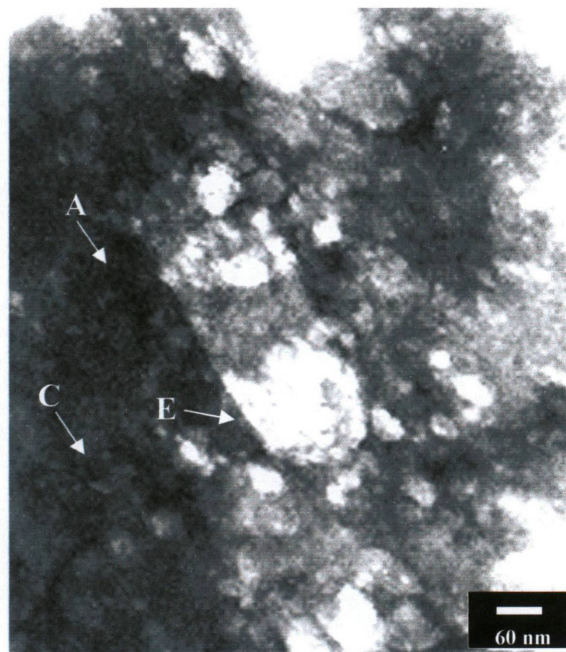


Figura 30: Micrografia da caseína total (3 g/L) obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 50000 vezes. A = agregados, C = caseína, E = espaço entre as micelas.

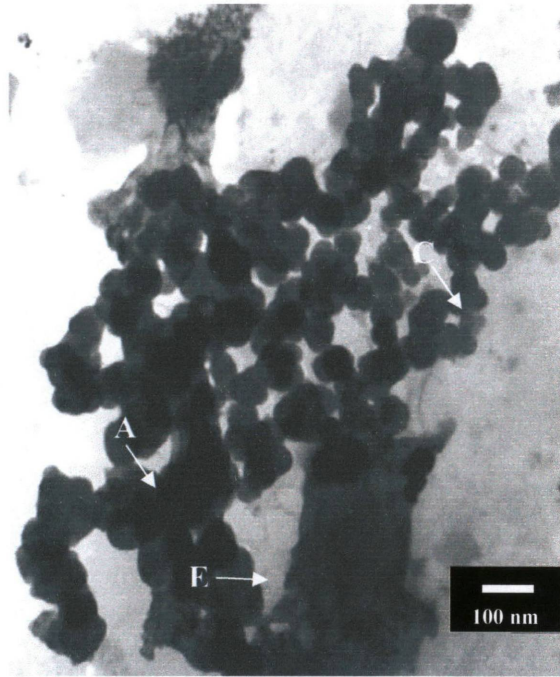


Figura 31: Micrografia da fração α -caseína (3 g/L) obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 50000 vezes. A = agregados, C = caseína, E = espaço entre as micelas.

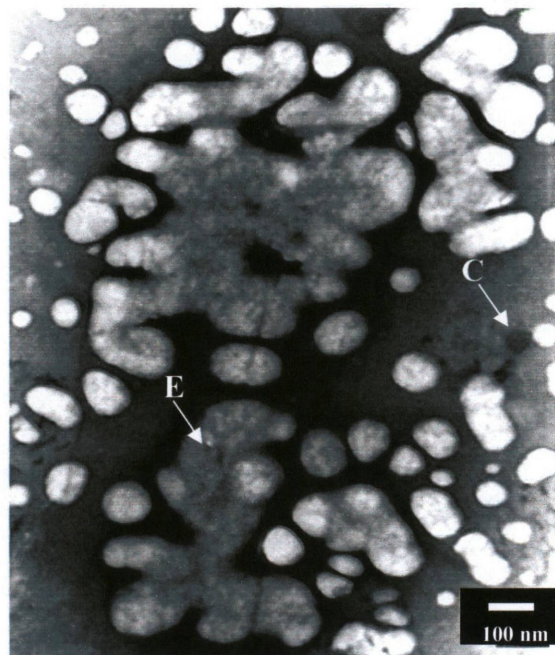


Figura 32: Micrografia da fração β -caseína (3 g/L) obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 25000 vezes. C = caseína, E = espaço entre as micelas.

As eletromicrografias das frações α e β -caseína (figuras 31 e 32) também apresentaram um aspecto muito semelhante aos resultados descritos na literatura (Bourriot *et al.*, 1999a e 1999b; Goff *et al.*, 1999; Pellegrino *et al.* 1999; Schorsch *et al.*, 1999a e 1999b) para as soluções de caseína, mostrando-se distribuídas de maneira uniforme sobre a tela, na forma de partículas esféricas, entretanto apresentaram-se menos fundidas ou agregadas entre si que a caseína total. Na fração β -caseína (figura 32) podem ser observados grandes espaços entre as micelas de caseína, e pouca formação de agregados.

Pellegrino *et al.* (1999) observaram a β -caseína por microscopia eletrônica de transmissão, e relataram que esta fração apresenta partículas esféricas com um diâmetro de aproximadamente 10 nm para monômeros, e cerca de 34 nm para polímeros com um mínimo grau de polimerização. Devido a sua natureza anfifílica, a β -caseína forma micelas com um denso core hidrofóbico ao redor de uma concha hidrofílica de densidade muito menor.

4.6.2. Análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das misturas polissacarídeo-proteína

As eletromicrografias das misturas polissacarídeo-proteína, com as mesmas proporções entre os biopolímeros, foram realizadas pela técnica descrita anteriormente. As misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* e caseína total ou as frações purificadas (α , β e κ), podem ser visualizadas nas figuras 33, 34, 35 e 36. A comparação destas figuras com aquelas obtidas para os polímeros isolados, permite observar que a adição do polissacarídeo desencadeia uma retração das partículas de caseína, havendo um aumento nos espaços entre as partículas da proteína, e a galactomanana é excluída.

Na figura 33a, está representada a micrografia da mistura galactomanana-caseína total, na proporção de polissacarídeo-proteína de 2:3, ou seja, os dois biopolímeros estão numa proporção semelhante na mistura. Pode-se observar que a galactomanana está dispersa ao redor da proteína, mostrando um aspecto homogêneo, semelhante aos resultados obtidos por outros autores com galactomananas comerciais (Bourriot *et al.*, 1999a e 1999b; Goff *et al.*, 1999; Schorsch *et al.*, 1999a 1999b). Na figura 33b, a proporção de polissacarídeo é maior

que a de proteína (10:3), e pode-se observar que os espaços entre as micelas aumentaram, havendo uma maior retração das partículas de caseína, com uma maior separação das micelas, e uma diminuição dos agregados protéicos. Na figura 33c, com uma alta proporção de proteína em relação à de polissacarídeo (2:30), pode-se observar que as partículas de caseína apresentam uma maior agregação, apresentando maiores espaços entre as micelas, e tornando o sistema heterogêneo, mostrando uma separação de fases, confirmando os resultados obtidos por Bourriot *et al.* (1999a e 1999b), Goff *et al.* (1999) e Schorsch *et al.* (1999a e 1999b).

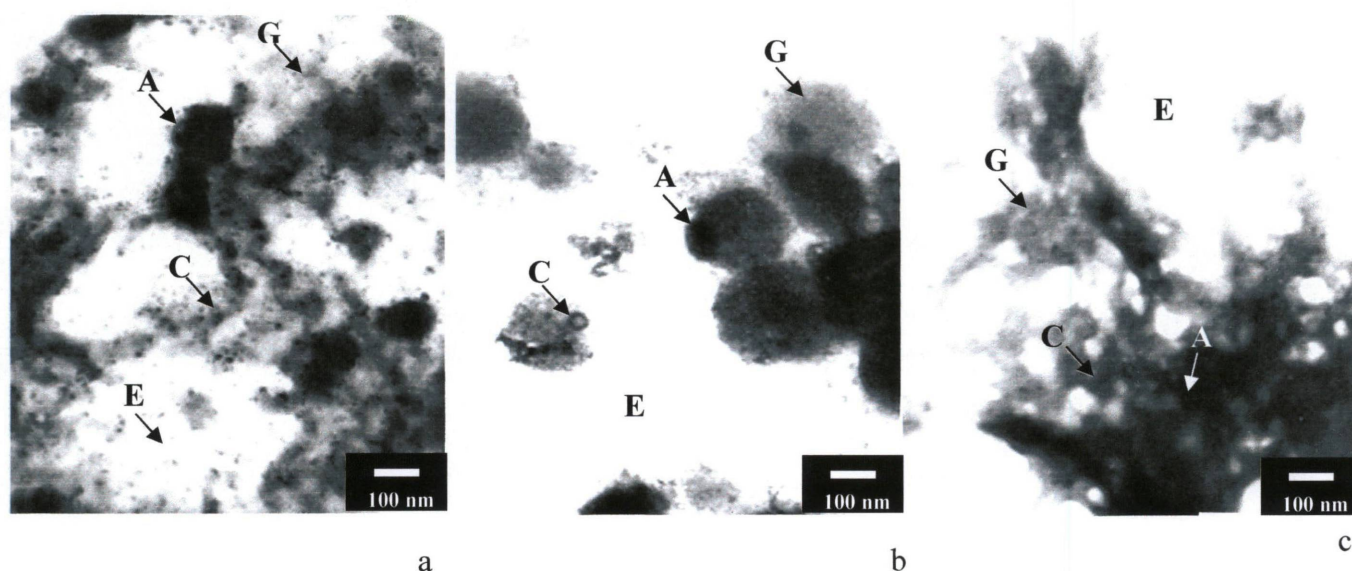


Figura 33: Micrografias das misturas galactomanana de *M. scabrella*-caseína, nas proporções 2:3, 10:3 e 2:30 (figuras a, b e c, respectivamente), obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 50000 vezes. A = agregados, C = caseína, E = espaço entre as micelas, G = galactomanana.

Em altas concentrações dos biopolímeros, o sistema apresenta-se heterogêneo, havendo separação de fases, enquanto que em baixas concentrações das duas espécies macromoleculares (proporção 2:3), não se observa este fenômeno, ou seja, o sistema permanece homogêneo.

Quando as cadeias da galactomanana são adicionadas à suspensão de caseína, estas são excluídas dos espaços entre as micelas, fornecido por uma concentração suficientemente alta

de caseína. A barreira energética pode, então, ser cruzada, levando à agregação das micelas. Os flocos de caseína podem tender a se auto agregar e formar uma rede, que poderia constituir a fase contínua do sistema (Bourriot *et al.*, 1999a). Isto explica o aumento da viscosidade do meio e a mudança nas propriedades viscoelásticas observadas.

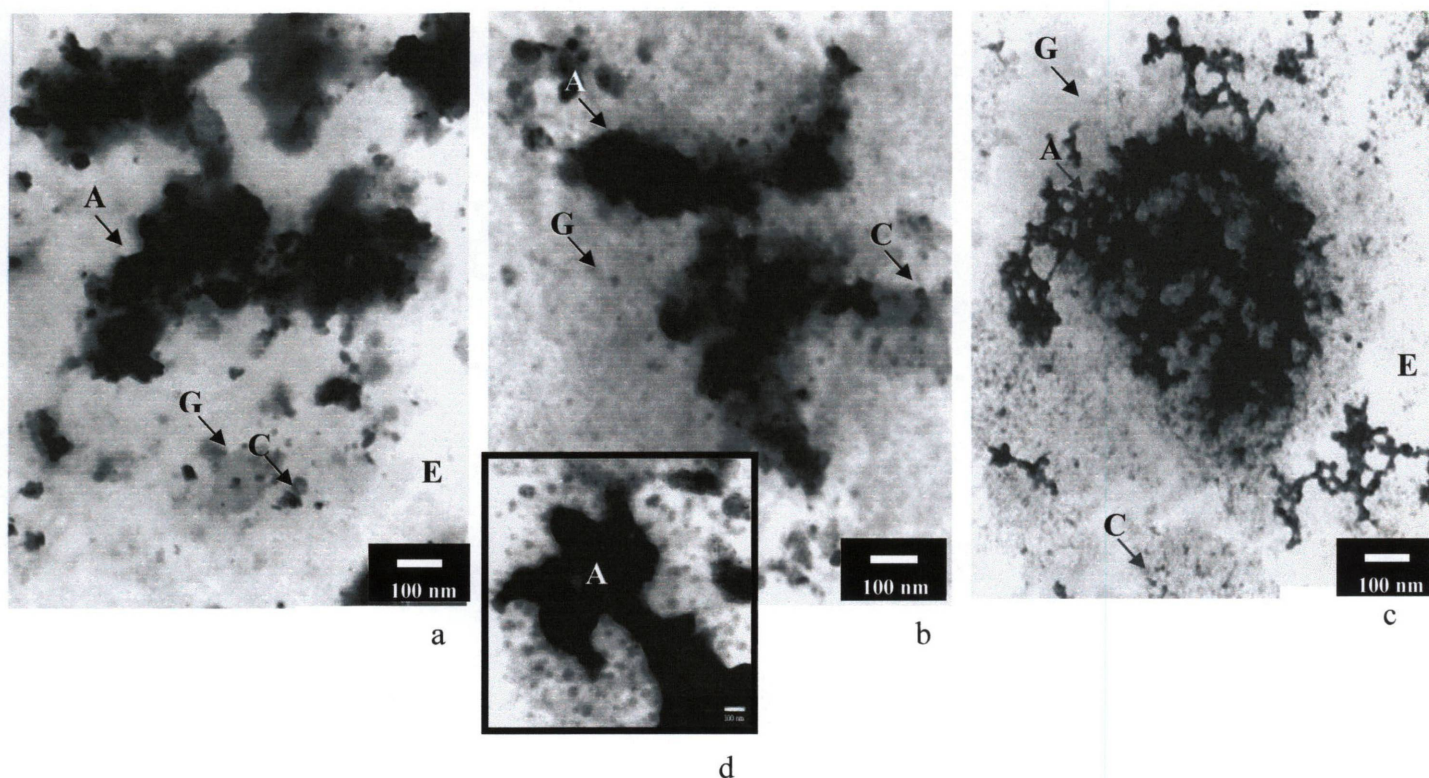


Figura 34: Micrografias das misturas galactomanana de *M. scabrella*- α -caseína, nas proporções 2:3, 10:3 e 2:30 (figuras a, b e c, respectivamente), obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 25000 (figuras b e c) e 50000 vezes. Figura d imagem ampliada da figura b. A = agregados, C = caseína, E = espaço entre as micelas, G = galactomanana.

Bourriot *et al.* (1999a) realizaram experimentos de microscopia confocal em sistemas contendo galactomanana de guar sonicada-caseína, e observaram que nestes sistemas em que a galactomanana possui uma massa molar menor, ela ocupa um volume menor em relação à galactomanana nativa, além disso, a exclusão desta galactomanana é menos extensa, resultando numa diminuição da agregação das partículas de caseína em concentrações

semelhantes.

Considerando que a galactomanana de *M. scabrella* é um polímero com grande massa molar, e altamente ramificado, espera-se que a agregação das partículas de caseína seja maior nos sistemas em estudo no presente trabalho, que a agregação observada por Bourriot *et al.* (1999a).

Em outro trabalho, Bourriot *et al.* (1999b) comenta que as misturas galactomanana-caseína exibiam um comportamento de separação de fases a partir de uma certa concentração dos biopolímeros. Através da construção de diagramas de fase foi estabelecido um mapa de estado para as misturas de acordo com a sua composição. As coordenadas do ponto crítico foram determinadas como sendo 0,8% de caseína e 0,09% de goma guar. Para o ponto de rendimento (menor concentração que leva à separação de fases) foi estabelecida a concentração total de 0,4%, onde a concentração de guar é de 18 g/L e a de caseína 22 g/L.

Com relação à mistura galactomanana- α -caseína (figura 34), pode-se observar que, quando a proporção dos dois componentes é semelhante (figura 34a), as partículas de caseína apresentam-se agregadas, envoltas pelo polissacarídeo. Com o aumento da concentração de polissacarídeo até a proporção 10:3 (figura 34b e 34d), observa-se que as partículas de caseína apresentam um tamanho menor, indicando que a galactomanana interfere no sistema, diminuindo a agregação das micelas. Quando a proporção de caseína aumenta na proporção 2:30 (figura 34c), observa-se que ocorre uma maior agregação das micelas de caseína.

Na figura 35, observa-se a mistura galactomanana- β -caseína, cujo perfil apresenta-se diferente daquele encontrado para os sistemas contendo caseína total e α -caseína. Com a proporção semelhante dos dois biopolímeros (2:3) (figura 35a), pode-se observar uma distribuição homogênea das partículas de caseína e de galactomanana, inclusive com a formação de alguns agregados, mas em menor quantidade que os formados nos experimentos anteriores (figuras 33a e 34a), onde a mesma proporção polissacarídeo era mantida, confirmando o aumento observado nos valores de viscosidade e diferenças nos espectros de dicróismo circular. À medida que a concentração de galactomanana aumenta (proporção 10:3) (figura 35b), observa-se que o polissacarídeo permanece entre as partículas de β -caseína, mas a agregação das micelas parece maior que na figura 35a, indicando que um aumento na concentração de um dos biopolímeros pode levar a um aspecto heterogêneo do sistema. Na figura 35c, quando há um aumento na concentração de proteína (2:30), pode-se observar um aumento no fenômeno de agregação das partículas de caseína, e um aumento nos espaços

entre as micelas, evidenciando um sistema ainda mais heterogêneo que o da figura 35b, com separação de fases entre as duas espécies macromoleculares. No sistema constituído por galactomanana- κ -caseína, também pode-se observar uma diferença no comportamento dos dois biopolímeros em relação às misturas contendo caseína total e α -caseína, mas menos homogêneo que o sistema contendo β -caseína.

Pode-se observar através das figuras 36a e 36d que o polissacarídeo permanece ao redor das partículas de κ -caseína, com menor formação de agregados que nos experimentos em que a proporção de polissacarídeo foi mantida (figuras 33a e 34a). À medida que a concentração de polissacarídeo aumenta (proporção 10:3) (figuras 36b e 36e), pode-se observar que ocorre um aumento dos espaços entre as micelas de caseína, indicando ocorrer uma retração do sistema, onde, provavelmente, o polissacarídeo é excluído dos espaços entre as partículas de caseína, ocorrendo segregação dos dois biopolímeros.

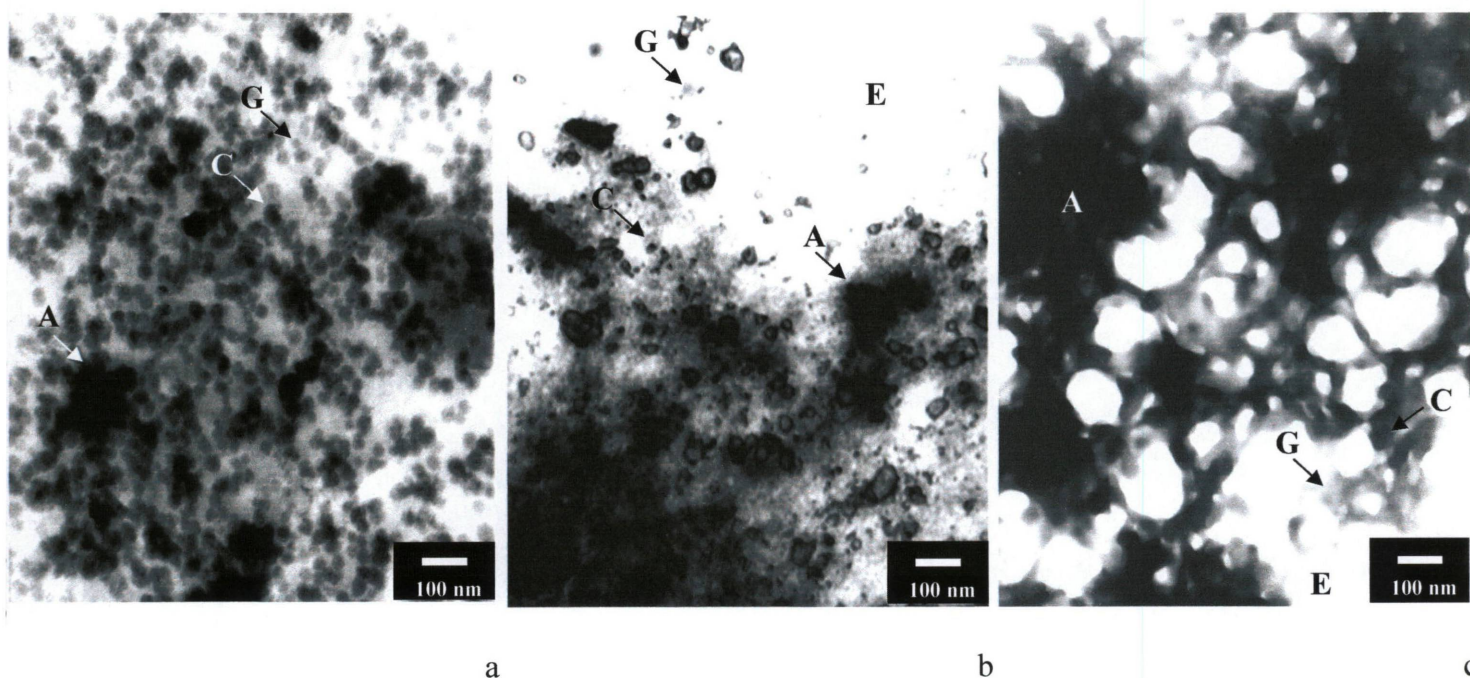


Figura 35: Micrografias das misturas galactomanana de *M. scabrella*- β -caseína, nas proporções 2:3, 10:3 e 2:30 (figuras a, b e c, respectivamente), obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 25000 (figuras b e c) e 50000 vezes. A = agregados, C = caseína, E = espaço entre as micelas, G = galactomanana.

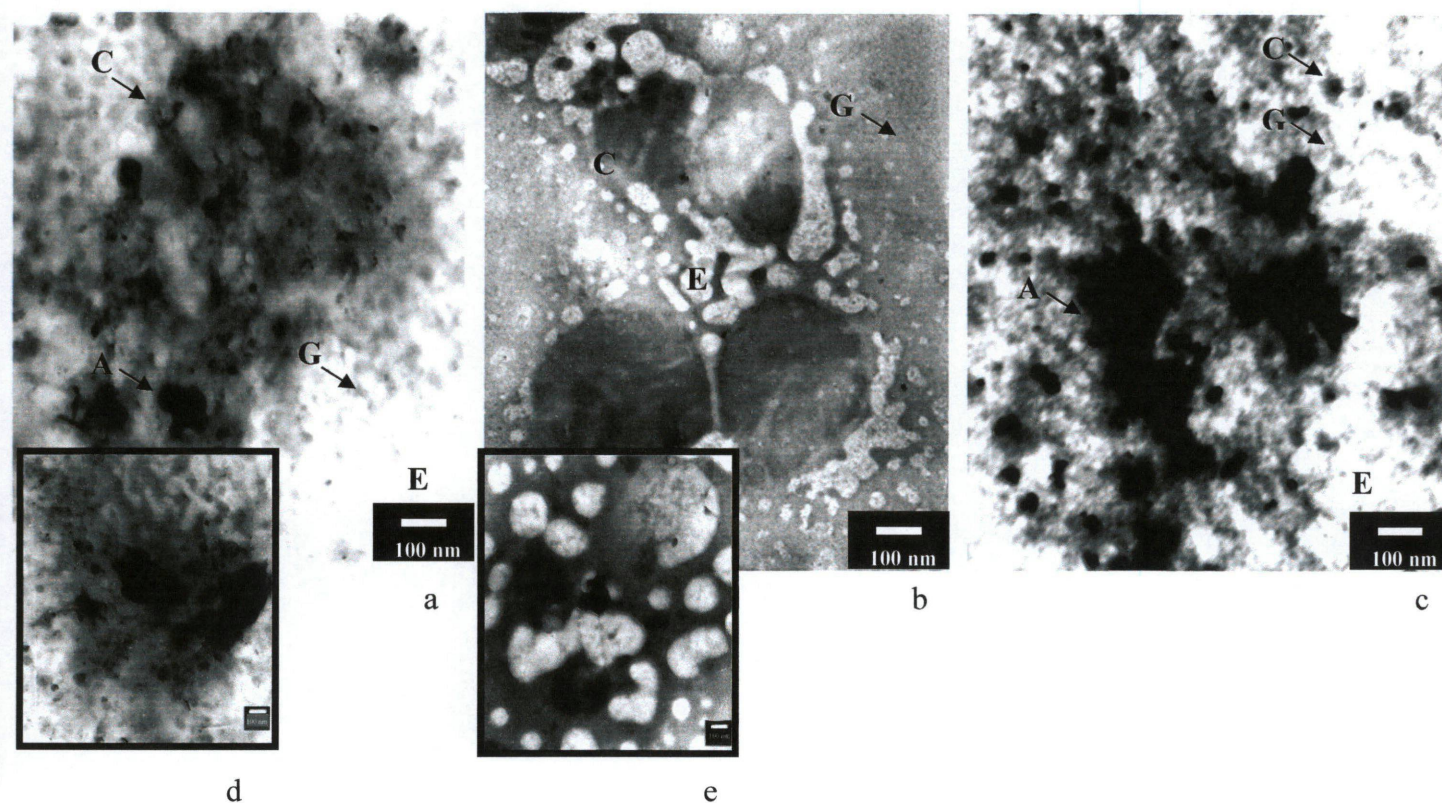


Figura 36: Micrografias das misturas galactomanana de *M. scabrella*- κ -caseína, nas proporções 2:3, 10:3 e 2:30 (figuras a, b e c, respectivamente), obtida por microscopia eletrônica de transmissão em um aumento de 25000 e 50000 vezes (figuras d e e). A = agregados, C = caseína, E = espaço entre as micelas, G = galactomanana.

Aumentando-se a concentração de proteína (proporção 2:30) (figura 36c), observa-se que ocorreu uma diminuição no fenômeno de separação de fases conforme as figuras 36b e 36e, e a presença do polissacarídeo, em menor proporção que a proteína, parece atuar entre as micelas, diminuindo a heterogeneidade, apesar de ainda poderem ser observados os agregados protéicos. Este comportamento diverso do que ocorreu para os outros sistemas na mesma proporção das duas macromoléculas talvez explique o aumento da viscosidade e a diferença dos espectros de dicroísmo circular observados.

Ferragut e Chirald (1996) estudaram a microestrutura de sistemas contendo leite em pó desnatado e galactomanana de alfarroba, em emulsões óleo-em-água com baixo teor de gordura, e através dos resultados obtidos pelas análises reológicas e de microscopia eletrônica de transmissão, observaram que a interação entre galactomanana-proteína de leite reflete um

efeito de sinergismo na construção da estrutura da emulsão, relacionado com sua consistência.

Em estudos realizados por Goff *et al.* (1999) para sistemas contendo galactomananas de alfarroba e guar com proteínas do leite em soluções contendo sacarose, após o congelamento, e em ciclos de temperatura através de microscopia de fluorescência, foi observado que a galactomanana de alfarroba produziu uma estrutura em rede semelhante a um gel ao redor dos cristais de gelo, que se tornava cada vez mais distinta com a repetição dos ciclos de temperatura, entretanto esta rede não era evidente quando os autores utilizaram a goma guar. A análise das imagens da distribuição do tamanho dos cristais de gelo mostrou que a alfarroba fornecia maior resistência à recristalização que a goma guar. Para os sistemas contendo sacarose e leite em pó desnatado, os mesmos autores obtiveram resultados semelhantes, porém com um aumento menor do tamanho dos cristais de gelo. Os autores sugerem que a habilidade de formar crio-géis, ou interações intermoleculares com proteínas, causa aumentos localizados na concentração (evidenciados através da separação de fases), são pré-requisitos para a falta de efetividade na recristalização dos cristais de gelo.

Schorsch *et al.* (1999b) realizaram estudos de sistemas galactomanana de alfarroba-proteínas do leite contendo sacarose, através de microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão, técnicas reológicas e espalhamento de luz laser em multiângulos. Estes autores observaram a uma temperatura de 5 °C e pH = 6,8, as micelas de caseína são altamente incompatíveis com a galactomanana de alfarroba. As micelas de caseína, que são negativamente carregadas em condições normais, parecem não se agregar como resultado do processo de separação de fases.

Sanchez *et al.* (2000) estudaram a microestrutura de géis formados pelo sistema xantana-galactomanana de alfarroba-leite desnatado induzido por meio ácido, através de diferentes técnicas de microscopia (microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz e contraste de fase), observaram que o diâmetro aparente das partículas de caseína e seus poros não se alteraram com a presença dos polissacarídeos, todavia, nos sistemas contendo leite desnatado ácido-galactomanana de alfarroba alguns detalhes revelaram que a estrutura em rede das partículas de caseína mudou. A rede pareceu mais heterogênea, com cadeias mais grossas e agregados maiores, além do diâmetro aparente dos poros ter aumentado (de 2 para 10 μm), revelando um tipo de contração da rede da caseína, as quais conferem um aumento na conectividade das partículas de caseína, diminuindo sua habilidade de fusão ou adesão.

A explicação sobre a microestrutura do gel de leite desnatado na presença de galactomanana de alfarroba ou xantana pode ser obtida analisando-se interações repulsivas entre polissacarídeos e proteínas que predominam sobre as interações atrativas, dando margem a uma mútua exclusão de volume acessível para os seus centros de massa (Syrbe *et al.*, 1998). A separação de fases tipo segregativa, onde ocorre uma concentração preferencial de proteínas em uma fase, e de polissacarídeos em outra, é usualmente chamada de incompatibilidade termodinâmica.

A incompatibilidade termodinâmica em pH maior que 5,5 entre proteínas do leite (caseinato de sódio ou proteínas do soro do leite) e polissacarídeos (xantana ou galactomanana de alfarroba), é geralmente muito pronunciada (Grindrod e Nickerson, 1968; Grinberg e Tolstoguzov, 1997).

No caso de sistemas contendo misturas de micelas de caseína com polissacarídeos não adsorvidos, a quebra da mistura é principalmente causada por um mecanismo de depleção-floculação, do que por incompatibilidade termodinâmica (Garnier *et al.*, 1995; Syrbe *et al.*, 1998; Bourriot *et al.*, 1999a, 1999b e 1999c; Schorsch *et al.*, 1999a e 1999b; Tuinier e de Kruif, 1999; Tuinier *et al.*, 2000).

Bourriot *et al.* (1999a) observaram através de experimentos reológicos, que a adição de caseína faz com que haja uma transição no sistema de uma solução macromolecular para um sistema sensivelmente estruturado, porém, nas análises dos experimentos de microscopia confocal, os autores concluem que este comportamento está relacionado ao fenômeno de separação de fases.

Os autores ainda comentam que, quando partículas esféricas estão envolvidas no fenômeno de separação de fases, esta separação pode ser oriunda de um fenômeno de depleção-floculação, pois a incompatibilidade termodinâmica implica em exclusão de volume entre as espécies poliméricas, o que requer que as macromoléculas tenham sido individualizadas e conseqüentemente solubilizadas, minimizando a energia livre do sistema.

No fenômeno de depleção-floculação, a estabilidade de uma suspensão particulada é diminuída pela adição de um polímero. Este fenômeno explica como uma dispersão de partículas pode ser floculada pela exclusão de uma molécula de polímero do espaço entre as esferas próximas. Este mecanismo foi inicialmente descrito por Asakura e Oosawa (1954 e 1958) para o caso de esferas rígidas na presença de macromoléculas. O resultado é uma diferença na concentração do polímero entre as regiões nos espaços inter-partículas e do lado

de fora (ao redor das partículas). A pressão osmótica da solução polimérica é maior que a da zona excluída contendo o solvente, então as partículas são empurradas juntas devido à força osmótica atrativa adicional gerada entre as partículas. Esta força depende do tamanho e forma das moléculas poliméricas, e cálculos do potencial de interação podem permitir a descrição teórica destes mecanismos com base na energia potencial total, combinando atração, repulsão eletrostática, repulsão estérica e depleção da atração (Bourriot *et al.*, 1999a). A confirmação de que as partículas estão fracamente floculadas pode ser obtida dissolvendo-se uma amostra agregada, com retorno a um sistema de fase única, pois a floculação é um processo reversível. Isto reflete a fraqueza das forças inter-partícula, o que é esperado para o mecanismo de depleção-floculação (Bourriot *et al.*, 1999a e 1999b). Os flocos formados na fase contínua do sistema (partículas de caseína), induzidos pela presença da galactomanana na mistura, aumentaram a viscosidade do meio, todavia, a rede pode ser facilmente rompida sob cisalhamento porque as interações entre os flocos não são covalentes, levando ao aparecimento de um comportamento tixotrópico descrito pelo autores.

4.7. Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS)

O conhecimento da estrutura química dos polissacarídeos e suas propriedades em soluções são fatores determinantes na sua produção e aplicabilidade. A única técnica que permite a caracterização de polissacarídeos em ampla faixa de massas molares e a conseqüente análise da estereo-regularidade é a cromatografia de exclusão estérica acoplada a espalhamento de luz em multiângulos (HPSEC-MALLS) e detector de índice de refração. A análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) foi realizada para determinar a homogeneidade das amostras e analisar a interação entre a galactomanana de *M. scabrella* e a caseína total, bem como suas frações purificadas.

Para uma completa análise da possível interação entre as amostras, três experimentos foram realizados no equipamento: teste de homogeneidade de cada amostra isolada e das misturas galactomanana-caseína, cálculo do dn/dc para as amostras que apresentaram-se

homogêneas, e confecção do gráfico de Zimm para a determinação da massa molar (M_w), raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) e segundo coeficiente virial (A_2) destas amostras.

4.7.1. Análises de homogeneidade dos polímeros isolados

A galactomanana de *M. scabrella* foi analisada na concentração 1 mg/mL obtendo-se o cromatograma da figura 37. Através desta figura, observa-se que a galactomanana apresenta um único pico ou sinal referente aos dois detectores, sendo considerada unimodal ou homogênea. Os picos observados pelo detector de índice de refração em aproximadamente 67 minutos são referentes ao solvente nitrito-azida de sódio.

A caseína total e suas frações α , β e κ -caseína foram analisadas na mesma concentração (1 mg/mL), obtendo-se os cromatogramas das figuras 38, 39, 40 e 41.

Através da figura 38, observa-se que a caseína total apresenta três picos ou sinais referentes ao detector de espalhamento de luz laser, o primeiro pico com o tempo de retenção de aproximadamente 37 minutos, o segundo pico, maior e mais alargado com tempo de retenção de 55 minutos, e o terceiro pico, menor, com tempo de retenção de 66 minutos. Este perfil é coerente com a composição da caseína total em frações α , β e κ -caseína, em proporções de 3:4:1, respectivamente, com diferenças de massas molares, padrões de migração, de hidrofobicidade e solubilidade. Quanto ao detector de índice de refração, aparecem dois pequenos sinais, nos tempos de retenção de 53 e 55 minutos. Através destes detectores pode-se observar que a caseína total apresenta-se heterogênea. Os picos observados pelo detector de índice de refração em aproximadamente 69 minutos são referentes ao solvente nitrito-azida de sódio. Este padrão heterogêneo observado para a caseína total pode ser devido ao fenômeno de agregação das partículas que constituem as micelas da proteína, mas também pode ser resultado da presença de contaminantes como a lactose, por exemplo.

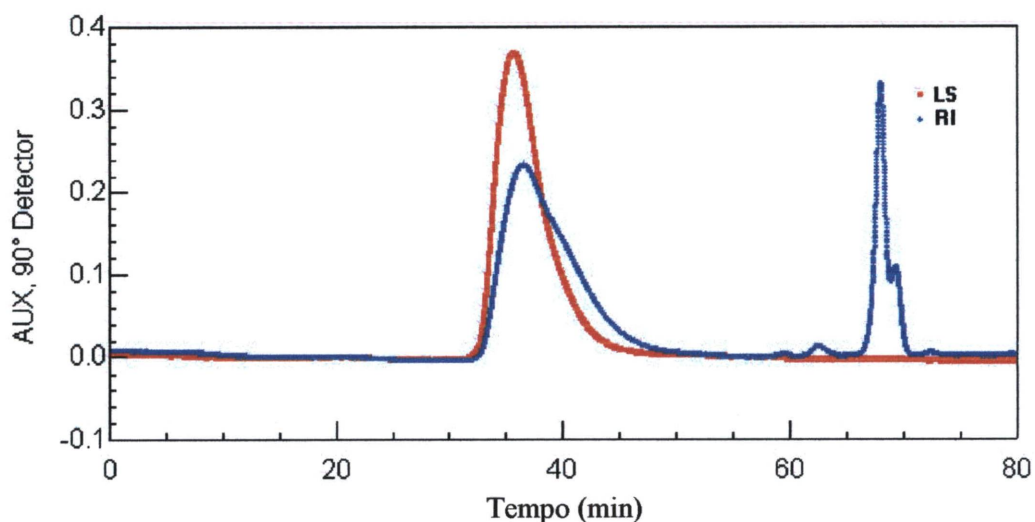


Figura 37: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de *M. scabrella* na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

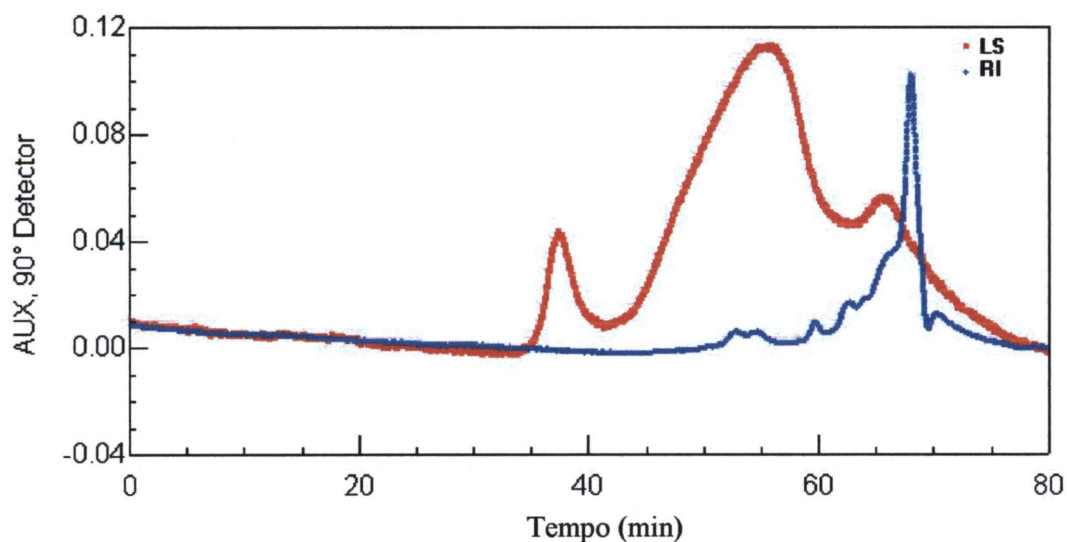


Figura 38: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da caseína total na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

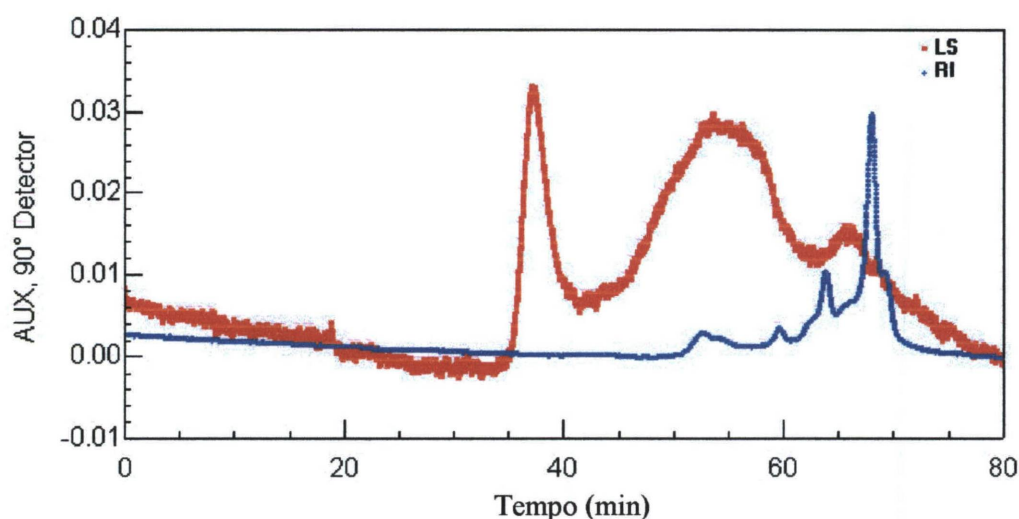


Figura 39: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração α -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

Através da figura 39, observa-se que a α -caseína apresenta três picos ou sinais referentes ao detector de espalhamento de luz laser, e dois pequenos sinais referentes ao detector de índice de refração, com o primeiro pico (maior), e o segundo pico (menor), apresentando-se heterogênea e similar ao espectro da caseína total, com os mesmos tempos de retenção.

Através da figura 40, observa-se que a β -caseína apresenta também três picos ou sinais referentes ao detector de espalhamento de luz laser, com o primeiro pico maior que o apresentado pela caseína total e fração α -caseína, e o segundo pico e terceiro picos menores que nas amostras anteriores (figura 38 e 39). Através do detector de índice de refração, pode-se observar a presença de dois sinais maiores que os observados para a caseína total e α -caseína, apresentando-se heterogênea e similar ao espectro da caseína total.

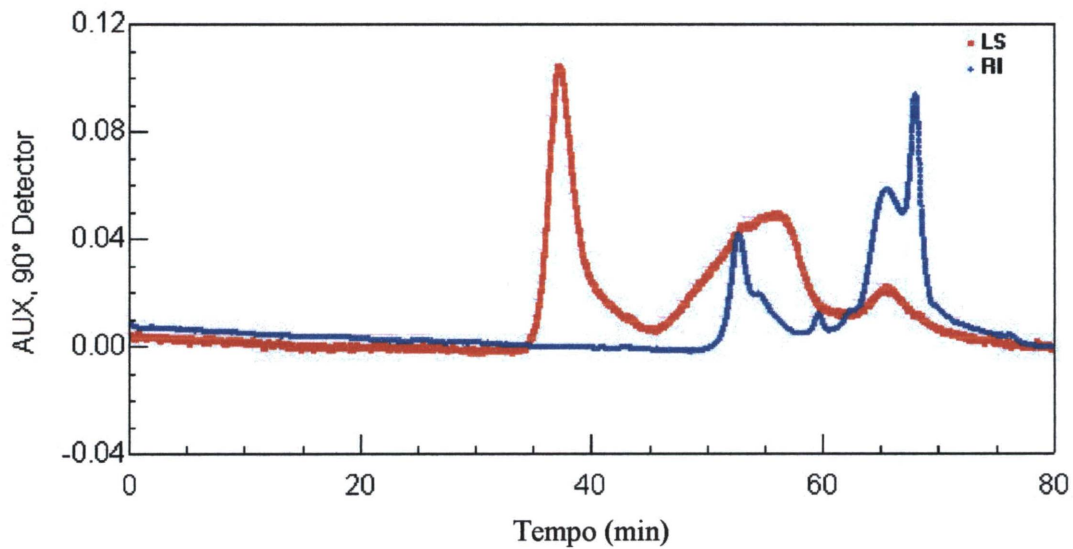


Figura 40: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração β -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

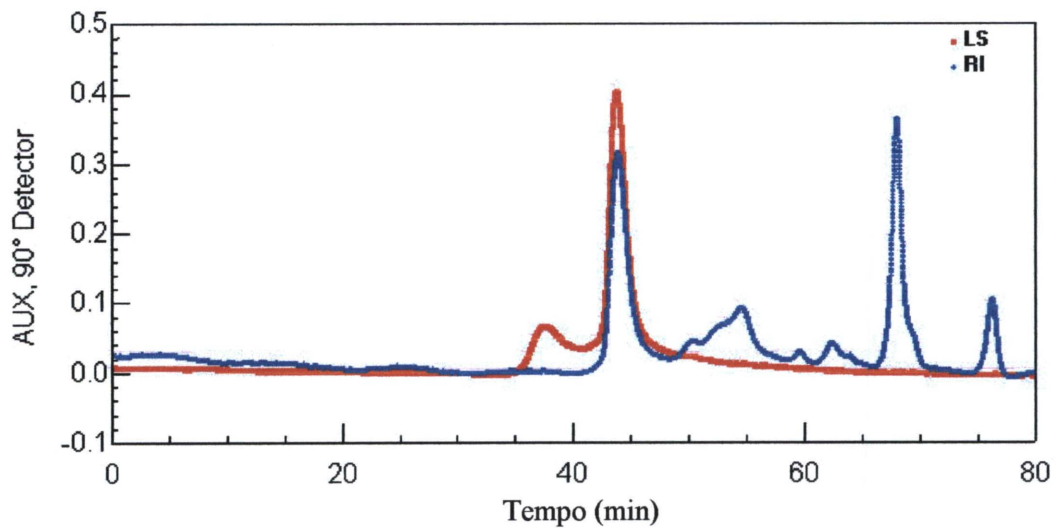


Figura 41: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

Na figura 41, observa-se que a κ -caseína apresenta dois picos ou sinais referentes ao detector de espalhamento de luz laser, sendo o primeiro pico menor e o segundo pico maior, e mais estreito nos tempos de retenção de 37 e 43 minutos, respectivamente. Quanto ao detector de índice de refração, se observa três sinais nos tempos de 43, 50 e 55 minutos, respectivamente, sendo o primeiro pico maior e mais estreito, e os outros dois picos menores, com o espectro apresentando-se mais homogêneo que o das outras frações da caseína (α e β -caseína), e diferente da caseína total, conforme pode ser observado na figura 42. Pelo fato desta amostra se apresentar mais homogênea que as outras frações da caseína, foi feita a análise para o cálculo do dn/dc desta fração.

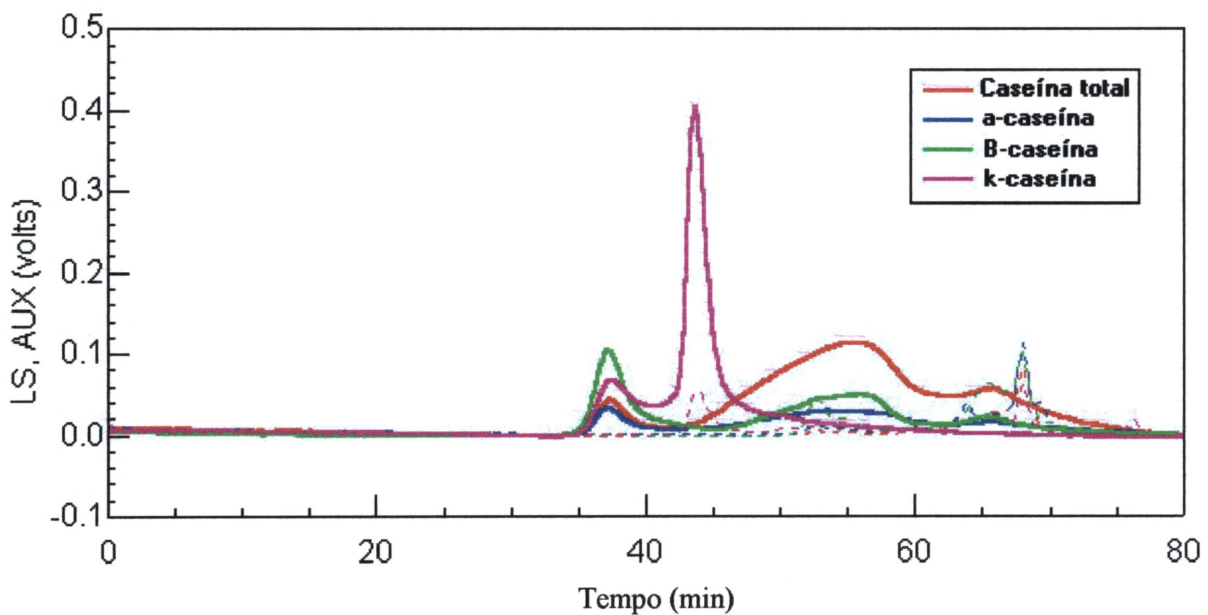


Figura 42: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da caseína e suas frações (α , β e κ -caseína) na concentração 1 mg/mL. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).

Na figura 42, foram plotados os cromatogramas da caseína total e de suas frações α , β e κ -caseína, para a comparação. Pode-se observar que o espectro da caseína total e das frações α e β -caseína são similares, quanto aos tempos de retenção, diferindo apenas quanto à

intensidade do sinal, e o espectro da κ -caseína apresenta o primeiro pico no mesmo tempo de retenção das outras frações, com a presença de um segundo pico (maior) que não aparece nos espectros das frações anteriores.

4.7.2. Análises de homogeneidade das misturas polissacarídeo-proteína

Na literatura, vários trabalhos relatam a utilização de análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) para a determinação das propriedades de sistemas contendo misturas de biopolímeros (Payens, 1971; Santos *et al.*, 1997; de Kruif e Tuinier, 1999), correlacionando caracterização estrutural e conformação das moléculas, para o desenvolvimento de novos produtos, tanto na área alimentícia, quanto farmacêutica.

Para analisar as misturas galactomanana-proteína, estas foram misturadas, na concentração 1 mg/mL, mantendo constante a razão entre os dois constituintes macromoleculares (1:1).

A mistura galactomanana-caseína total e suas frações α , β e κ -caseína (1 mg/mL) foram analisadas, obtendo-se os cromatogramas das figuras 43, 45, 47 e 49.

Através da figura 43, observa-se que a mistura galactomanana-caseína apresenta um pico ou sinal principal referente ao detector de espalhamento de luz laser, e dois picos referentes ao detector de índice de refração, similar ao espectro da galactomanana, mas com a presença nestes sinais de um ombro em aproximadamente 45 minutos, referente, provavelmente, à caseína presente na mistura. Os picos observados pelo detector de índice de refração em aproximadamente 67 minutos são referentes ao solvente nitrato-azida de sódio.

A análise dos espectros também foi feita através do programa Astra 4.50, comparando-se as misturas com os polímeros isolados, observando se havia uma diferença entre os espectros das amostras isoladas e das misturas, em relação tanto ao deslocamento dos sinais como na intensidade dos mesmos, conforme se pode observar através das figuras 44, 46, 48 e 50.

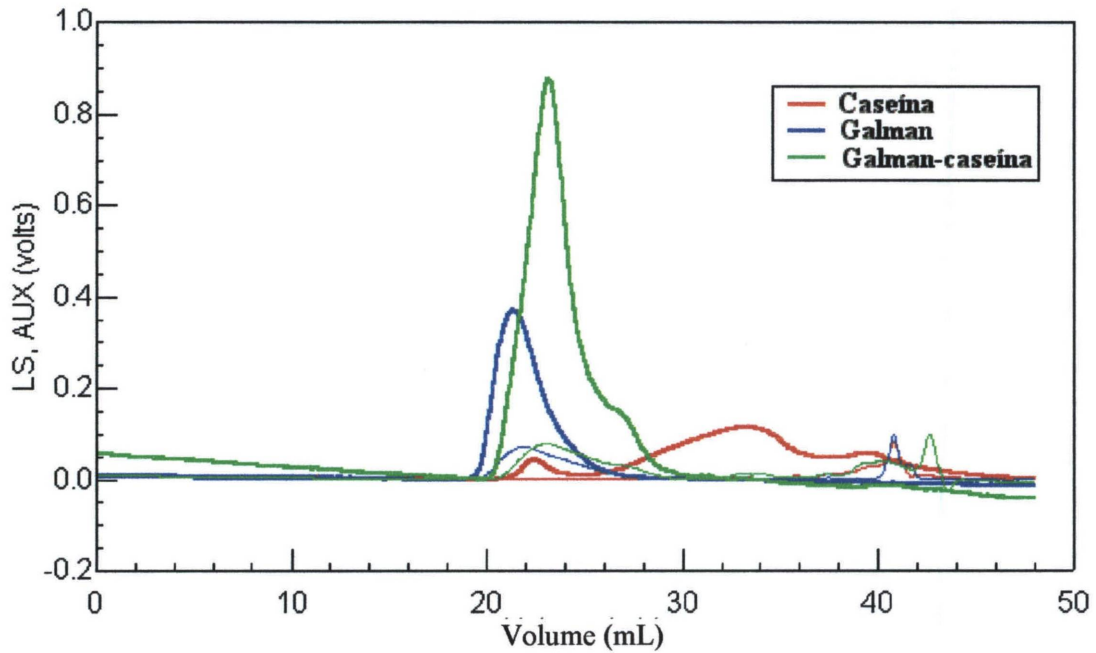


Figura 43: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da mistura galactomanana de *M. scabrella*-caseína total na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

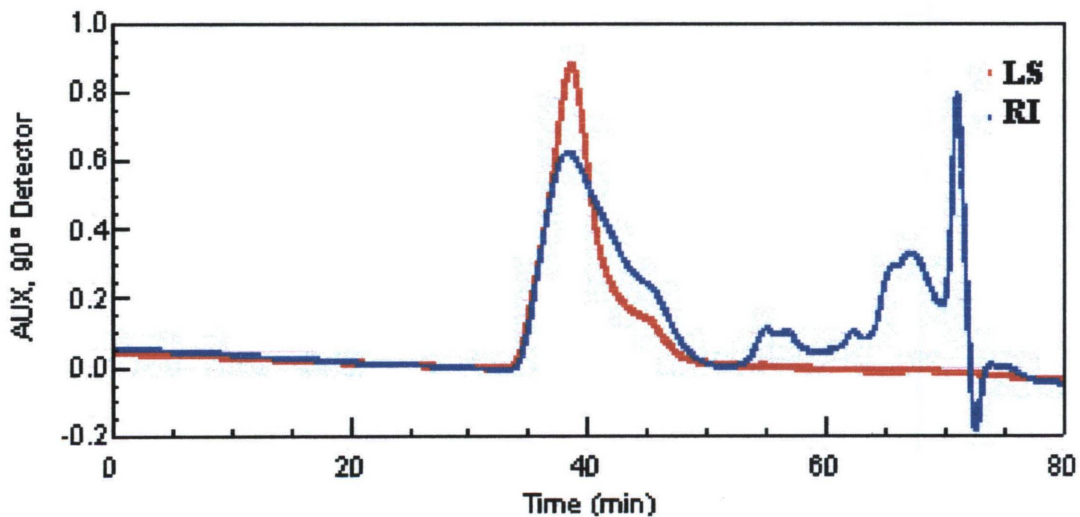


Figura 44: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da interação galactomanana de *M. scabrella*-caseína. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).

Através do cromatograma da figura 44, pode-se observar os espectros dos biopolímeros isolados e da mistura galactomanana-caseína. O espectro da mistura galactomanana-caseína apresenta um aumento na intensidade do pico e um deslocamento do mesmo em relação aos biopolímeros isolados, demonstrando uma possível interação, devido a uma alteração na conformação dos biopolímeros presentes na mistura.

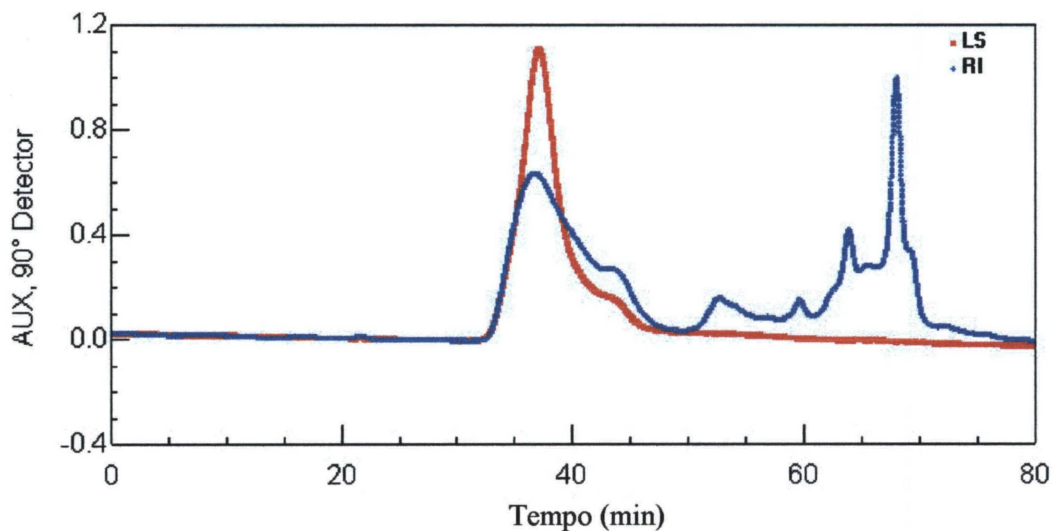


Figura 45: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da mistura galactomanana de *M. scabrella*- α -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

Através da figura 45, observou-se que a mistura galactomanana- α -caseína apresenta um perfil semelhante à mistura galactomanana-caseína, contendo um único pico ou sinal principal, referente ao detector de espalhamento de luz laser, em aproximadamente 37 minutos, com a presença de um ombro maior que o observado para a caseína total, em aproximadamente 45 minutos, referente, provavelmente, à fração α -caseína presente na mistura. No detector de índice de refração, observa-se também um pico principal, em aproximadamente 37 minutos, contendo também um ombro, no mesmo tempo de retenção observado pelo detector de espalhamento de luz, e um pico menor em 53 minutos. Através do programa Astra 4.50 obteve-se os cromatogramas dos biopolímeros isolados e da mistura

galactomanana- α -caseína, conforme a figura 46. Através destes cromatogramas, observa-se os espectros dos biopolímeros isolados e da mistura galactomanana- α -caseína. O espectro da mistura apresenta um aumento na intensidade do pico e um deslocamento do mesmo em relação aos biopolímeros isolados, demonstrando uma possível interação, devido a uma alteração na conformação dos biopolímeros presentes na mistura.

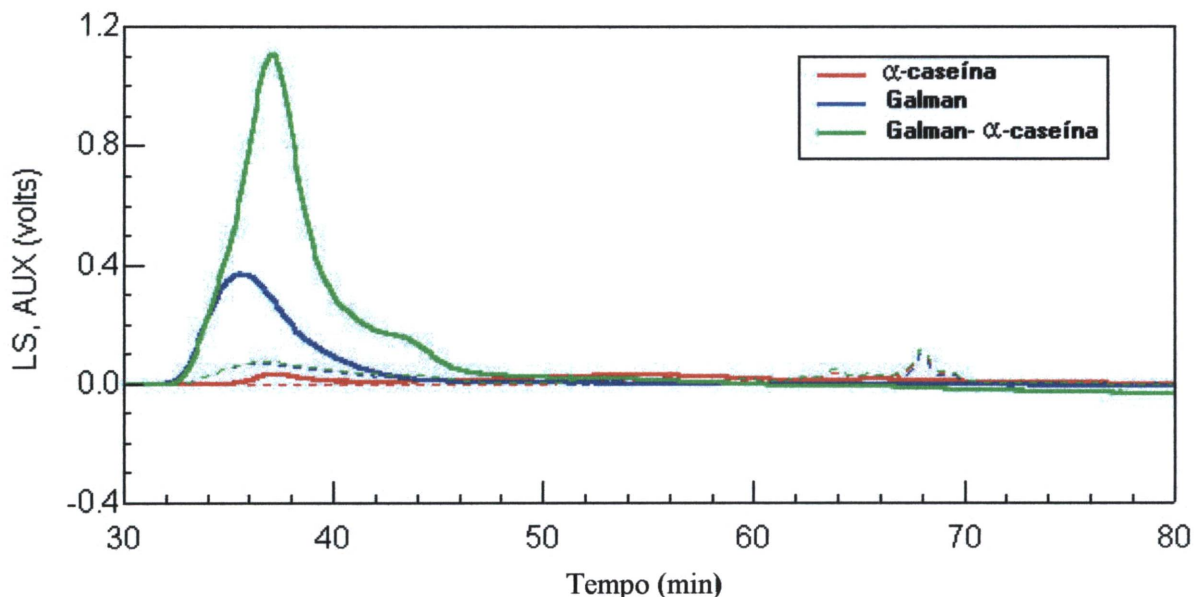


Figura 46: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da interação galactomanana de *M. scabrella*- α -caseína. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).

Através da figura 47, avaliou-se que a mistura galactomanana- β -caseína também apresenta um perfil semelhante à mistura galactomanana-caseína, contendo um único pico ou sinal principal referente ao detector de espalhamento de luz laser, no tempo de retenção de 35 minutos, e dois picos referentes ao detector de índice de refração, nos tempos de 37 e 53 minutos, respectivamente, sendo o primeiro pico mais alargado e apresentando um ombro, referente à fração β -caseína presente na mistura. Os sinais observados pelo detector de índice de refração a partir do tempo de retenção de 53 minutos representam contaminantes da amostra (possivelmente lactose).

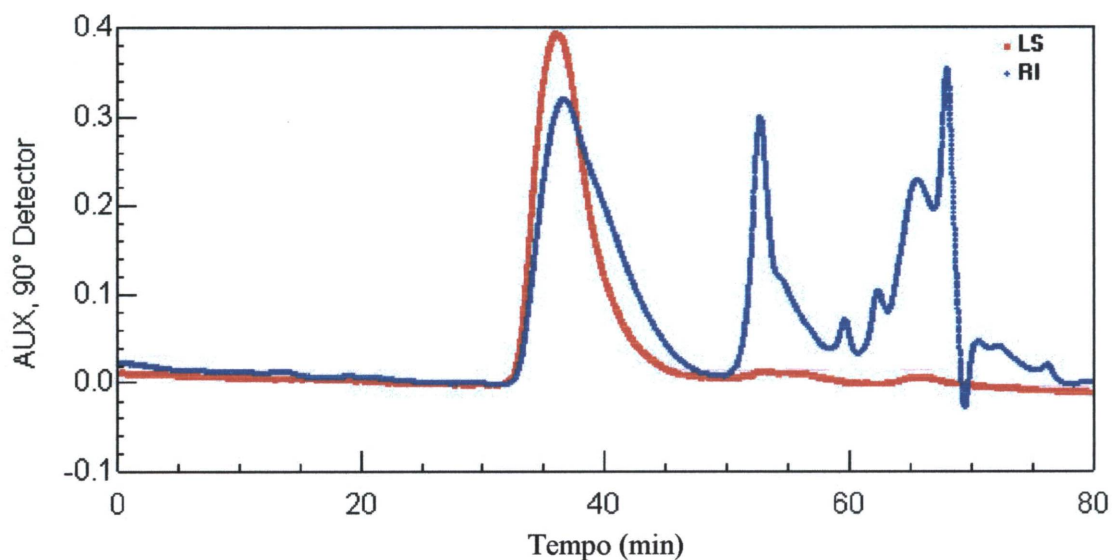


Figura 47: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da mistura galactomanana de *M. scabrella*- β -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

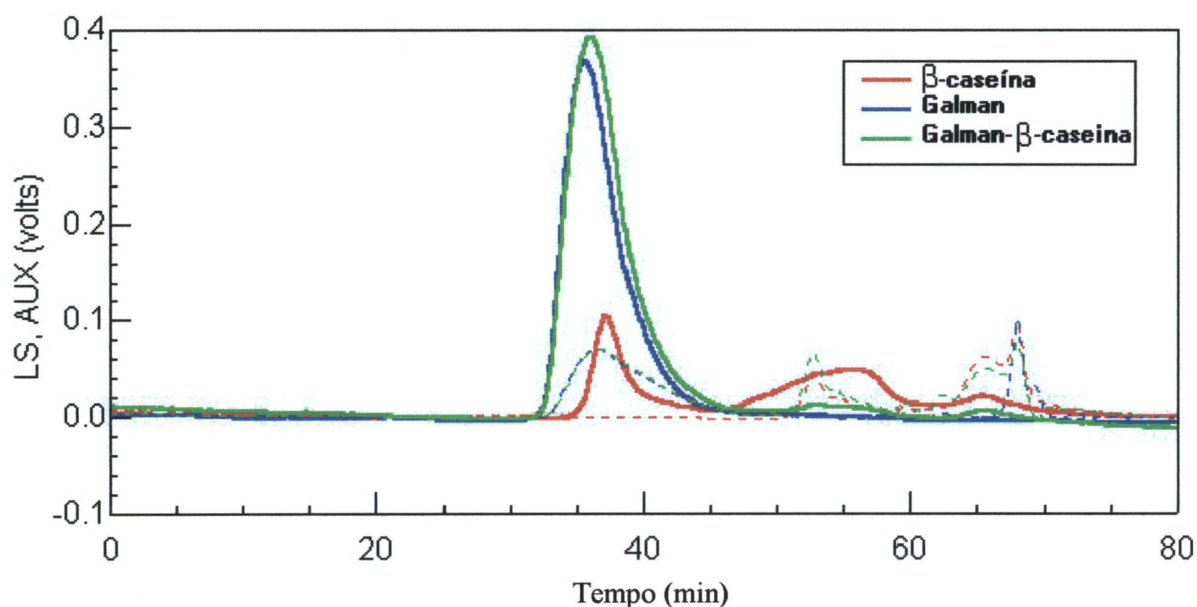


Figura 48: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da interação galactomanana de *M. scabrella*- β -caseína. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).

Na figura 48, pode-se observar os espectros dos biopolímeros isolados e da mistura galactomanana- β -caseína. Neste caso, o espectro da mistura apresenta um pequeno aumento na intensidade do pico e pouco deslocamento do mesmo em relação aos biopolímeros isolados, demonstrando também uma possível interação, por alteração da conformação dos biopolímeros presentes na mistura.

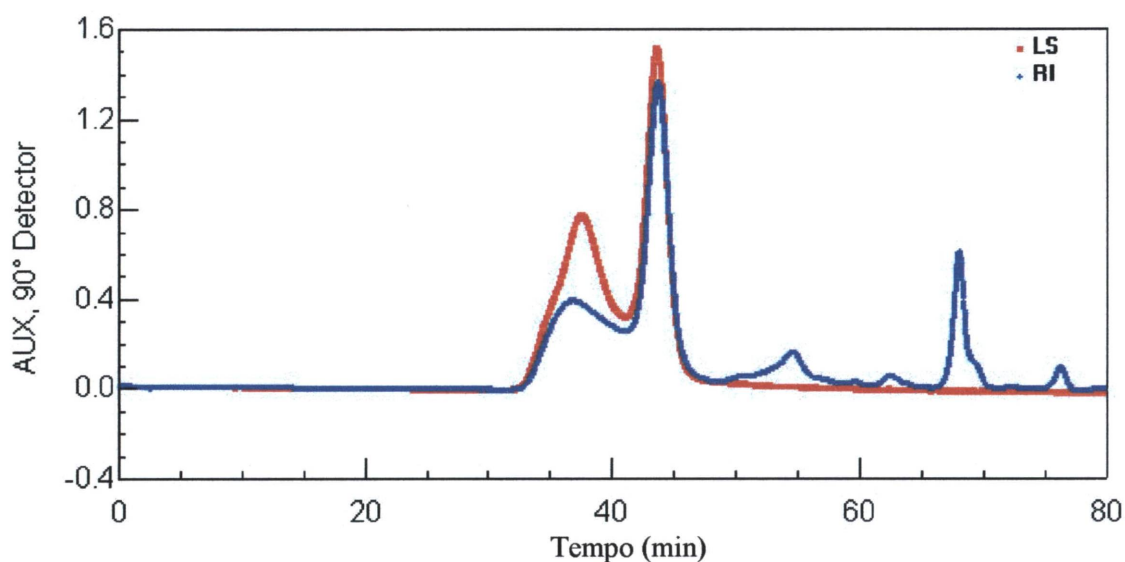


Figura 49: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da mistura galactomanana de *M. scabrella*- κ -caseína na concentração 1 mg/mL. LS - detector de espalhamento de luz laser; RI - detector de índice de refração.

A figura 49 evidenciou que a mistura galactomanana- κ -caseína apresenta um perfil diferente dos vistos anteriormente para as outras misturas, contendo dois picos ou sinais principais referentes ao detector de espalhamento de luz laser, em aproximadamente 37 e 43 minutos, e dois sinais principais e um pico menor referentes ao detector de índice de refração, em aproximadamente 36, 43 e 55 minutos, sendo o segundo pico maior, referente aos dois biopolímeros presentes na mistura.

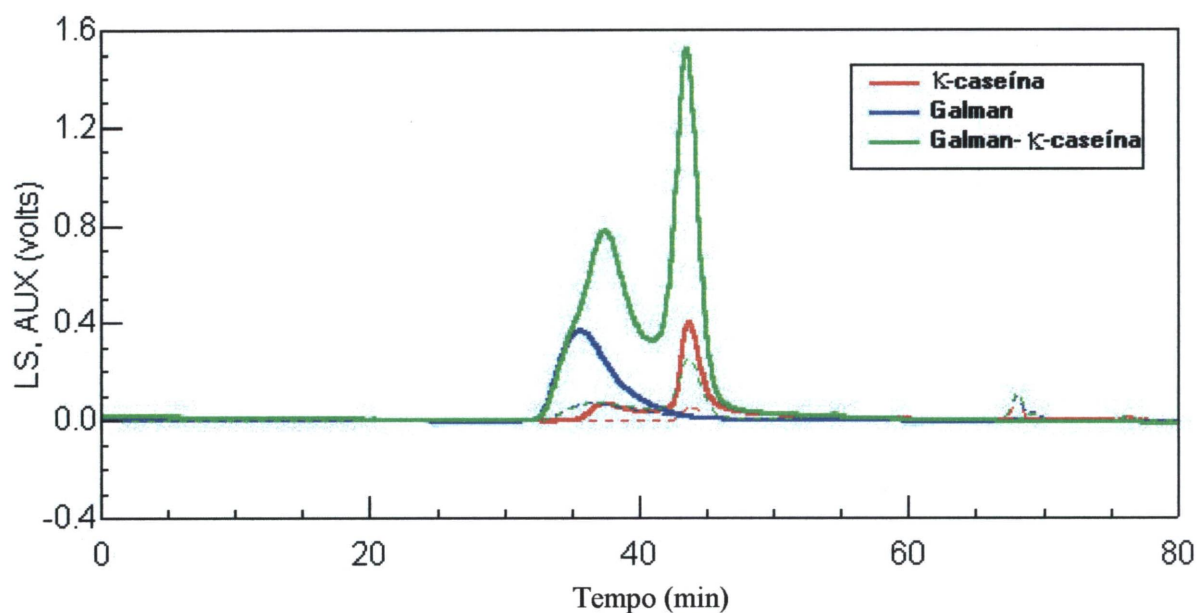


Figura 50: Análise por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da interação galactomanana de *M. scabrella*- κ -caseína. As linhas cheias representam o detector de espalhamento de luz (LS), e as linhas pontilhadas representam o detector de índice de refração (RI).

Através dos cromatogramas da figura 50, pode-se observar os espectros dos biopolímeros isolados e da mistura galactomanana- κ -caseína. O espectro da mistura em questão apresenta um aumento na intensidade do pico e um deslocamento do mesmo em relação aos biopolímeros isolados, demonstrando uma possível interação, devido a mudanças na conformação dos constituintes macromoleculares presentes na mistura.

Observando-se todos os espectros anteriormente obtidos pode-se sugerir uma interação entre a galactomanana e a caseína, levando-se em consideração o aumento na intensidade dos picos e o deslocamento dos mesmos em relação aos biopolímeros isolados, obtendo-se maior interação entre a galactomanana de *M. scabrella* e as frações purificadas da caseína na ordem κ -caseína, α -caseína e β -caseína, respectivamente, e estão de acordo com os resultados obtidos através dos experimentos de DC, e dados reológicos obtidos em trabalhos anteriores (Perissutti, 1999 e Perissutti *et al.*, 2002), que sugerem uma interação galactomanana-frações da caseína na ordem, β , κ , α -caseína.

Nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão realizados no presente trabalho, também pôde-se observar alterações na microestrutura das amostras quando se

adiciona galactomanana às frações purificadas da caseína, havendo maiores diferenças nas microestruturas das misturas na ordem β , κ , α -caseína, o que confirma os resultados obtidos.

4.7.3. Determinação do dn/dc

A determinação de dn/dc (variação do índice de refração de uma determinada solução com a variação de sua concentração) é necessária para a determinação correta dos valores de massa molar ponderal média das amostras. Foram analisadas as soluções isoladas de galactomanana, e a fração purificada κ -caseína, que se apresentou mais homogênea que as outras frações.

O valor do dn/dc obtido para a galactomanana foi de 0,146 mL/g, e, através dos gráficos de homogeneidade, estabeleceu-se a massa molar calculada com sendo $3,45 \times 10^6$ g/mol e o grau de polidispersão de 2,18, indicando ser um polímero polidisperso. Estes valores estão listados na tabela 6.

Para a amostra da fração κ -caseína, obteve-se um valor de dn/dc de 0,129 mL/g, e, através dos gráficos de homogeneidade, estabeleceu-se a massa molar calculada de $1,77 \times 10^7$ g/mol e grau de polidispersão de 1,07 (listados na Tabela 6), sendo este valor considerado como de um polímero monodisperso.

Com os valores de dn/dc , obtêm-se a massa molar calculada e o grau de polidispersão dos biopolímeros através do gráfico de homogeneidade. Além destes valores, as relações entre a massa molar e o volume de eluição (V_e), e massa molar cumulativa das amostras podem ser obtidas, conforme os gráficos das figuras 51, 52, 53 e 54.

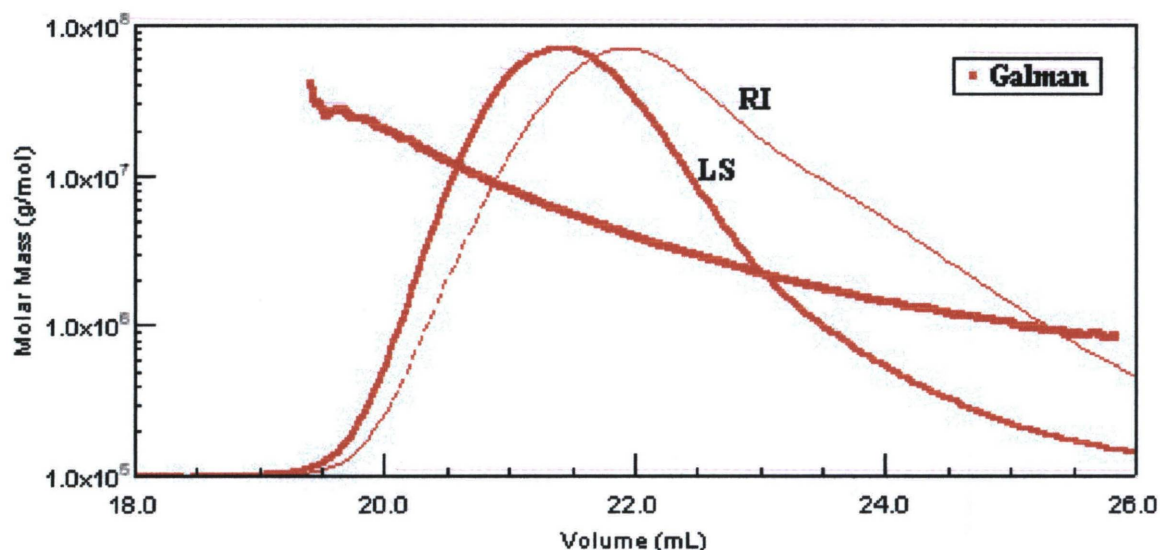


Figura 51: Gráfico da massa molar versus o volume de eluição (V_e) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de *M. scabrella*. A linha vermelha em negrito representa o detector de espalhamento de luz laser (LS), e a linha mais delgada representa o detector de índice de refração (RI).

Na figura 51, está representado o gráfico da massa molar versus o volume de eluição obtido por HPSEC-MALLS par a fração κ -caseína. A reta obtida através do gráfico demonstra que a massa molar da galactomanana decresce com o volume de eluição, onde a maior fração correspondente à amostra situa-se no volume de aproximadamente 22 mL, tendo em vista o detector de índice de refração, e a maior distribuição de massa molar no volume 21,5 mL aproximadamente, de acordo com o detector de espalhamento de luz laser em multiângulos.

A amostra de κ -caseína (figura 52) apresenta dois picos: um pequeno pico com maior massa molar e um pico maior com menor massa molar. A reta obtida através do gráfico (referente ao pico principal da amostra) demonstra que a massa molar da κ -caseína decresce com o volume de eluição. A maior fração correspondente à amostra e a maior distribuição de massa molar situam-se no volume de aproximadamente 26,3 mL, tendo em vista os detectores de índice de refração e de espalhamento de luz laser em multiângulos.

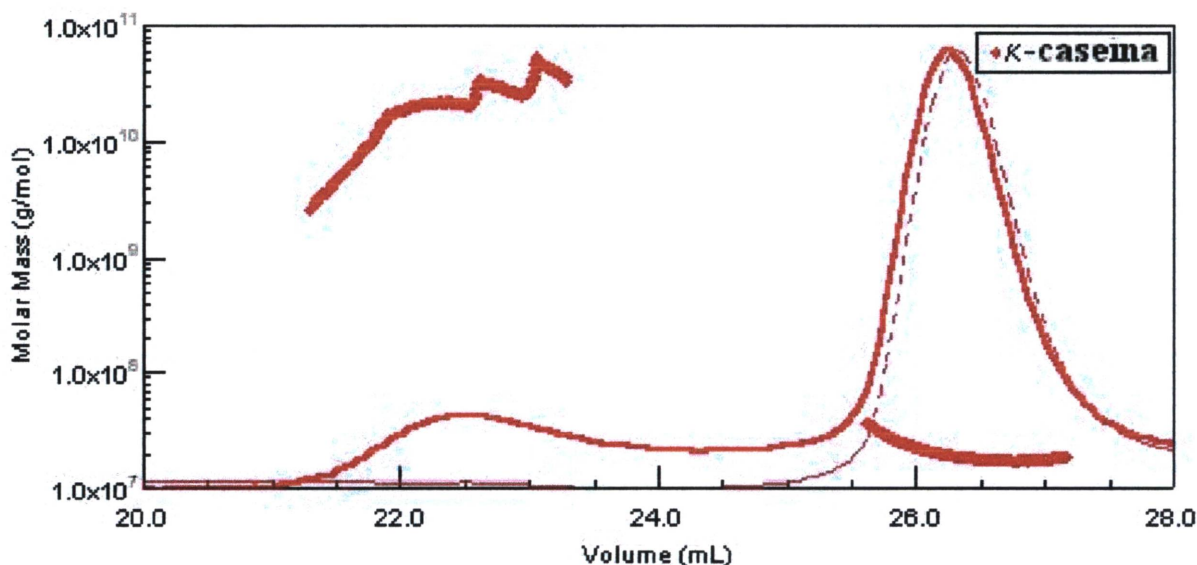


Figura 52: Gráfico da massa molar versus o volume de eluição (V_e) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína. A linha vermelha em negrito representa o detector de espalhamento de luz laser (LS), e a linha mais delgada representa o detector de índice de refração (RI).

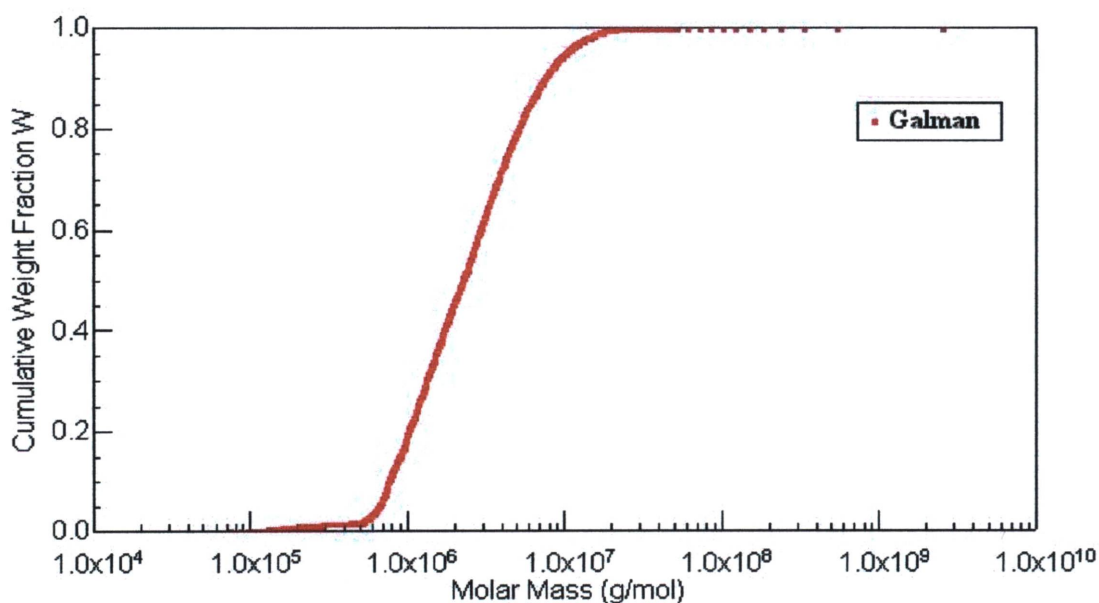


Figura 53: Gráfico da massa molar cumulativa obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de *M. scabrella*.

Pode-se observar, através da figura 53, o gráfico da massa molar cumulativa da galactomanana de *M. scabrella*, em que a molécula do polissacarídeo apresenta uma pequena variação de massa molar, de aproximadamente 2×10^5 a 2×10^7 g/mol. Para a amostra de κ -caseína, pôde-se observar que a molécula apresenta uma maior variação da massa molar que a galactomanana de *M. scabrella*, com valores de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ a 6×10^{10} g/mol.

Na tabela 8 foram comparados os dados de HPSEC-MALLS da galactomanana de *M. scabrella* do presente trabalho com dados obtidos por outros autores (Ganter *et al.*, 1992b e 1995; Bresolin, 1998; Bresolin *et al.* 1999; Ganter e Reicher, 1999; Sabbi, 2000), e pôde-se observar que os valores de dn/dc da galactomanana de *M. scabrella* variam de 0,115 a 0,146 mL/g, onde estas variações devem-se a diferenças nos métodos de extração empregados. A massa molar também obteve uma certa variação, entretanto os valores encontram-se muito próximos: de $0,93 \times 10^6$ a $3,45 \times 10^6$ g/mol, demonstrando concordância. Os valores de raio de giro ao quadrado, que expressa o raio hidrodinâmico da molécula, variaram de 55,8 a 80 nm.

Sabbi (2001), em experimentos de análise do tempo de sonicação em soluções de galactomanana de diferentes espécies, observou através de análises do raio de giro ao quadrado e do gráfico de massa cumulativa, a distribuição de massa das amostras, a quebra da molécula pela diminuição da massa molecular, sendo mais nítida esta diferença a partir do tempo de 60 minutos. Através da análise comparativa do raio de giro ao quadrado versus a massa molecular da galactomanana de *M. scabrella*, foi possível para este autor observar o aumento da flexibilidade molecular com o aumento do tempo de sonicação. Através de uma análise comparativa com os dados obtidos por este autor, pode-se observar uma semelhança em relação aos valores de M_w e do $\langle r_g^2 \rangle$ da galactomanana de *M. scabrella*.

TABELA 8: Valores de dn/dc , massa molar calculada, raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) e grau de polidispersão das amostras homogêneas (unimodais) submetidas às análises do dn/dc e homogeneidade, em comparação com os dados obtidos para galactomananas de *M. scabrella* em outros trabalhos.

Amostras	dn/dc (mL/g)	M_w^d (g/mol)	$\langle r_g^2 \rangle^c$ (nm)	Grau de Polidispersão ^d
κ -caseína	0,129	$1,77 \times 10^7$	25,2	$1,07 \pm 0,069$
Galactomanana <i>M. scabrella</i> *	0,146	$3,45 \times 10^6$	55,8	$2,18 \pm 0,273$
Galactomanana <i>M. scabrella</i> ¹	0,135	$1,15 \times 10^6$	73	-
Galactomanana <i>M. scabrella</i> ²	-	$1,40 \times 10^6$	80	-
Galactomanana <i>M. scabrella</i> ^{3, a}	0,115	$0,93 \times 10^6$	68,9	-
Galactomanana <i>M. scabrella</i> ^{3, b}	0,115	$1,10 \times 10^6$	66,6	-

¹ Bresolin *et al.* 1999; ² Bresolin, 1998; ³ Sabbi, 2000; ^a antes da purificação; ^b após purificação com NaCl 0,2 mol/L (Ganter *et al.*, 1992b e 1995; Ganter e Reicher, 1999); ^c obtido através do gráfico de Debye; ^d obtido através do gráfico de homogeneidade; * presente trabalho.

4.7.4. Gráfico de Zimm

Para a determinação da massa molar, raio de giro ao quadrado e segundo coeficiente virial, utilizou-se o gráfico de Zimm. Foram analisadas as soluções isoladas de galactomananas, caseína e frações purificadas, e misturas galactomanana-caseína.

Através das figuras 54 e 55, pode-se observar o gráfico de Zimm para a galactomanana de *M. scabrella* e para a caseína total, respectivamente. Os pontos em verde indicam as diferentes concentrações da amostra e os pontos em vermelho os diferentes ângulos empregados na construção do gráfico. Para isto faz-se a derivatização da equação simplificada do espalhamento de luz segundo Debye-Rayleigh-Ganz (equação 14) e atribuindo valores ao gráfico de Zimm .

A reta em vermelho indica a concentração nula, a reta em verde indica o ângulo nulo.

Ao considerar a concentração nula (reta vermelha) na inclinação da reta com a interseção ao eixo y, o valor de $\langle r_g^2 \rangle$ é obtido. E ao considerar o ângulo nulo (reta verde) na inclinação da reta com a interseção ao eixo y, o valor de A_2 é obtido (equação 17). Considerando-se a dupla extrapolação (concentração e ângulo nulos) obtêm-se a massa molar ($1/M_w$) (equação 16).

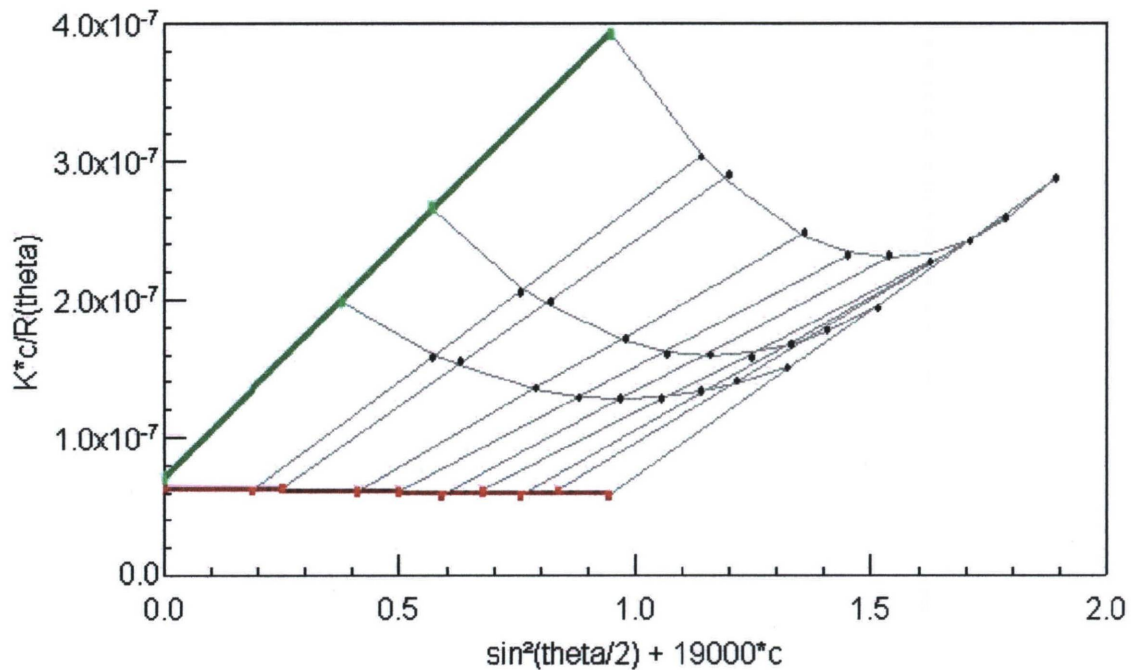


Figura 54: Gráfico de Zimm obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de *M. scabrella*.

Um parâmetro acessível que está intimamente relacionado com a natureza da interação polissacarídeo-proteína em soluções diluídas é o segundo coeficiente virial (A_{pr-po}) que é determinado em experimentos de cromatografia de exclusão estérica estática. Os valores negativos ($A_{pr-po} < 0$) e positivos ($A_{pr-po} > 0$) do segundo coeficiente virial são indicativos de interações em rede atrativa e repulsiva, respectivamente. O comportamento termodinâmico de uma solução polissacarídeo-proteína depende dos valores relativos de A_{pr-po} , A_{pr-pr} e A_{po-po} , em que as quantidades de A_{pr-pr} e A_{po-po} são os coeficientes viriais da proteína e do polissacarídeo puros, representando as contribuições termodinâmicas das interações proteína-proteína e polissacarídeo-polissacarídeo, respectivamente (Dickinson, 1998).

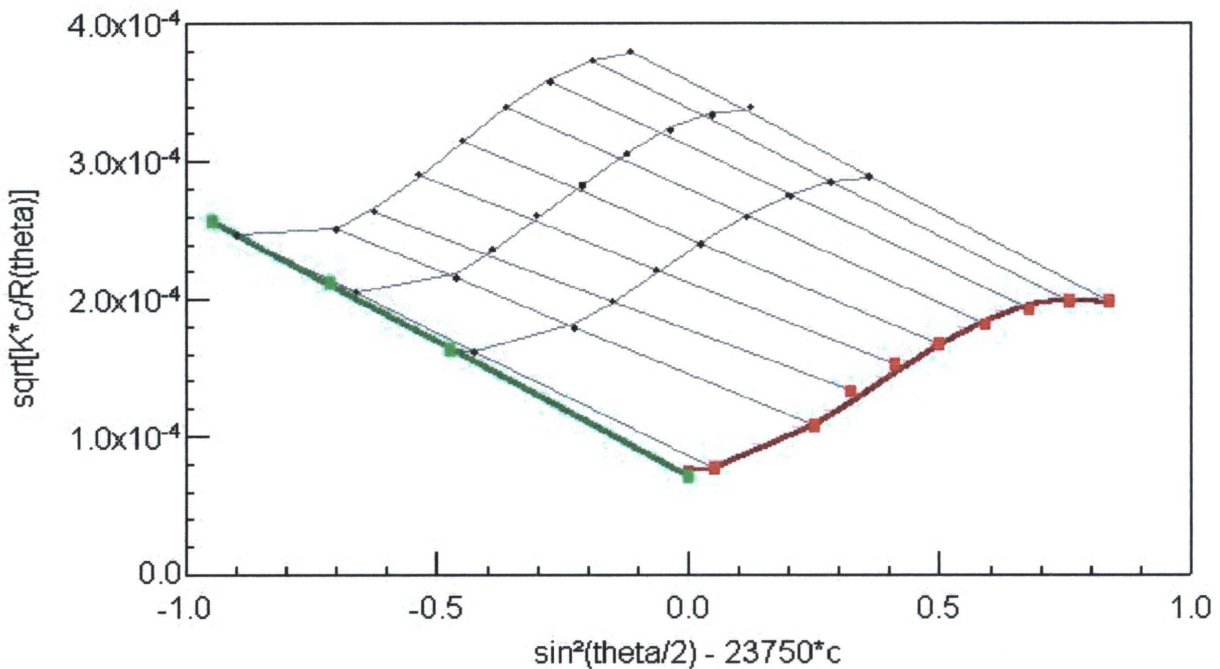


Figura 55: Gráfico de Zimm obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da caseína total.

O segundo coeficiente virial refere-se ao contato das moléculas do polímero entre si (proteína com proteína, polissacarídeos com polissacarídeo), e o segundo coeficiente virial cruzado caracteriza o contato de diferentes moléculas poliméricas (proteína com polissacarídeo) (Syrbe *et al.*, 1998).

Valores positivos do segundo coeficiente virial indicam um aumento no potencial químico das espécies poliméricas, ou seja, um aumento na contribuição à energia livre da solução: a aproximação de um polímero repele o outro. Valores negativos do segundo coeficiente virial indicam atração polimérica (Syrbe *et al.*, 1998).

O valor de massa molar encontrado para a galactomanana de *M. scabrella* ($3,45 \times 10^6$ g/mol para a massa molar calculada, e $1,50 \times 10^7$ g/mol obtido através do gráfico de Zimm (tabela 9), está próximo aos valores encontrados na literatura para outras galactomananas (entre 2×10^8 e $0,5 \times 10^9$ g/mol) (Schorsch *et al.*, 1999b), e o valor do segundo coeficiente virial (A_{po-po} ou $A_{2(3)}$) é de $3,23 \times 10^{-3}$ mol.mL/g².

Os valores de massa molar e segundo coeficiente virial (A_{pr-pr} ou $A_{2(2)}$) encontrados para a caseína total e suas frações α , β e κ -caseína, bem como os valores obtidos do segundo coeficiente virial cruzado para as misturas galactomanana-caseína (A_{pr-po} ou $A_{2(23)}$) estão

listados na tabela 9.

De acordo com o exposto anteriormente, o segundo coeficiente virial da proteína ($A_{2(2)}$), do polissacarídeo ($A_{2(3)}$) e do sistema contendo a mistura polissacarídeo-proteína ($A_{2(23)}$) podem ser calculados. O segundo coeficiente virial, relativo ao sistema polissacarídeo-proteína ($A_{2(23)}$), caracteriza a interação mútua das duas macromoléculas, e é calculado através da inclinação da dependência da concentração linear da razão $K^*(C_2 + C_3)/[\Delta R^{(c)}_{\theta=0}]$, de acordo com a equação 18 (Antonov *et al.*, 1999).

O valor do A_2 igual a zero indica uma interação nula entre os dois constituintes macromoleculares e a característica de um solvente ideal (solvente θ). Se A_2 for maior que zero é indicação de estabilidade ou repulsões entre os biopolímeros analisados, e de um bom solvente para o polímero em análise. Um A_2 menor que zero indica atração/aglomeração podendo ocorrer precipitação do polímero, ou interação entre os biopolímeros analisados, e de um solvente pobre para o polímero em análise.

A magnitude relativa do segundo coeficiente virial pode ser relacionada com o comportamento de misturas ternárias de biopolímeros (Antonov *et al.*, 1979a, 1979b e 1979c). A separação de fases é postulada (a uma concentração de polímero suficiente) quando o segundo coeficiente virial cruzado (A_{pr-po} ou $A_{2(23)}$) ao quadrado for maior que a multiplicação dos segundos coeficientes viriais da proteína e do polissacarídeo isolados ($(A_{pr-po})^2 > A_{pr-pr} \times A_{po-po}$), isto é, se o contato entre as moléculas do polissacarídeo e da proteína é mais repulsiva (incompatibilidade, favorecendo a auto-associação sobre associação cruzada), ou atrativa o suficiente (coacervação, associação cruzada fortemente favorecida sobre a auto-associação) comparada ao contato médio entre as moléculas do polissacarídeo e da proteína por eles mesmos (Syrbe *et al.*, 1998).

Nos sistemas polissacarídeo-proteína do presente trabalho, os valores obtidos para o segundo coeficiente virial cruzado e sua relação com a multiplicação dos valores de A_2 dos biopolímeros isolados estão listados na tabela 10.

TABELA 9: Valores da variação do índice de refração da luz com relação à concentração dos polissacarídeos presente nas soluções (dn/dc), massa molar (M_w), raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) e segundo coeficiente virial (A_2) das amostras de *M. scabrella*, caseína total e frações purificadas (α , β e κ)-caseína e das misturas galactomanana-caseína.

Amostras isoladas	M_w (g/mol)	A_2 (mol.mL/g ²)
Galactomanana <i>M. scabrella</i>	$1,50 \times 10^7$	$3,23 \times 10^{-3}$
Caseína total	$1,85 \times 10^8$	$3,32 \times 10^{-4}$
α -caseína	$6,30 \times 10^8$	$4,28 \times 10^{-4}$
β -caseína	$2,04 \times 10^8$	$1,09 \times 10^{-4}$
κ -caseína	$3,70 \times 10^8$	$1,02 \times 10^{-4}$
Misturas galactomanana-caseína		
Galactomanana-caseína	$3,07 \times 10^8$	$1,28 \times 10^{-4}$
Galactomanana- α -caseína	$7,78 \times 10^8$	$4,87 \times 10^{-5}$
Galactomanana- β -caseína	$7,00 \times 10^9$	$1,54 \times 10^{-4}$
Galactomanana- κ -caseína	$6,76 \times 10^8$	$1,82 \times 10^{-4}$

TABELA 10: Valores do segundo coeficiente virial cruzado obtido para as amostras isoladas de *M. scabrella*, caseína total e frações purificadas (α , β e κ)-caseína e das misturas galactomanana-caseína.

Amostras isoladas	A_2	
	(mol.mL/g ²)	
Galactomanana <i>M. scabrella</i>	3,23 x 10 ⁻³	
Caseína total	3,32 x 10 ⁻⁴	
α -caseína	4,28 x 10 ⁻⁴	
β -caseína	1,09 x 10 ⁻⁴	
κ -caseína	1,02 x 10 ⁻⁴	
Misturas galactomanana-caseína	$(A_2(p_r - p_o))^2$	$A_{2(p_o)} \cdot A_{2(p_r)}$
	(mol.mL/g ²) ²	(mol.mL/g ²) ²
Galactomanana-caseína	1,64 x 10 ⁻⁸	1,07 x 10 ⁻⁶
Galactomanana- α -caseína	2,37 x 10 ⁻⁹	1,38 x 10 ⁻⁶
Galactomanana- β -caseína	2,37 x 10 ⁻⁸	3,52 x 10 ⁻⁷
Galactomanana- κ -caseína	3,31 x 10 ⁻⁸	3,29 x 10 ⁻⁷

Segundo a tabela 10, pode-se observar que os valores do segundo coeficiente virial cruzado ao quadrado para todas as misturas galactomanana-caseína apresentam-se menores que os valores encontrados para a multiplicação dos valores do segundos coeficientes viriais dos biopolímeros isolados, demonstrando que o fenômeno de separação de fases não está ocorrendo nestes sistemas. Esta interpretação sobre o mecanismo de separação de fases baseado nos valores do segundo coeficiente virial falha quando se extrapola este comportamento para sistemas concentrados.

Pavlovskaia *et al.* (1993) observaram que o segundo coeficiente virial de uma mistura composta por globulina de *Vicia faba* e dextrana mudava de positivo para negativo quando a força iônica do tampão fosfato utilizado (pH = 8,0) foi diminuída de 0,1 para 0,01 mol/L,

concluindo-se que em baixas forças iônicas, os pontos isoeletricos destes biopolímeros podem mostrar compatibilidade termodinâmica induzida por uma interação atrativa.

Schorsch *et al.* (1999b) em estudos de sistemas galactomanana de alfarroba- proteínas do leite contendo sacarose, observaram que o segundo coeficiente virial das misturas sem alfarroba vai de um valor positivo ($15 \times 10^{-9} \text{ mol.cm}^3/\text{g}^2$) a um valor próximo de zero com a adição de 0,05% (m/m) da alfarroba, ou a valores negativos com a adição de 0,1% (m/m) de polissacarídeo. Isto demonstra que a qualidade do solvente é claramente mudada com a adição de galactomanana, de um solvente relativamente bom para um solvente ruim, levando a uma separação de fases no sistema.

A habilidade das técnicas de espalhamento de luz em determinar um parâmetro relacionado ao tamanho da molécula é de grande importância para a conformação molecular.

O raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) é definido como a distância média de uma unidade ao centro de massa da cadeia, e depende da distribuição interna de massa da molécula e não uma medida da geometria externa da mesma. Para certas moléculas lineares, $\langle r_g^2 \rangle$ é proporcional ao quadrado do diâmetro principal da molécula (volume hidrodinâmico) (Wyatt, 1993).

$$\langle r_g^2 \rangle^{1/2} = f(M) \quad \text{Equação 19}$$

ou

$$\langle r_g^2 \rangle^{1/2} = L \cdot L_p / 3$$

$$L' = M_w / M_L \quad \text{Equação 20}$$

onde:

M = massa da molécula

L' = comprimento de contorno

L_p = comprimento de persistência

M_w = massa molar

M_L = massa molar monomérica

O raio de giro ($\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$) é proporcional ao tamanho geométrico das moléculas lineares, então um gráfico duplo log do raio de giro ao quadrado versus a massa molar (M_w) permite a extração de tais informações, uma vez que $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ é obtido pela inclinação da reta obtida por este gráfico (Wyatt, 1993). Para moléculas esféricas, $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ é proporcional ao centro de massa ao cubo. A média de $M_w - \langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ para um conjunto de amostras com distribuição de massas relativamente estreita permite um gráfico onde os valores formam uma linha, cuja inclinação é cerca de 0,333; para moléculas em forma de bastão (rígidas) é igual a um, e para emaranhados (“random coil”), a inclinação varia entre 0,5 e 0,6.

Para a obtenção do raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) das amostras, pode-se fazer a análise através do gráfico de Zimm ou obtê-lo através do gráfico de Debye, que é construído a partir da análise de homogeneidade.

No gráfico de Debye, obtém-se uma linha reta para polímeros com $\langle r_g^2 \rangle$ menor que 50 nm. O ponto onde há a interceptação do eixo y, fornece o valor inverso da massa molar ($1/M_w$), e a inclinação da reta fornece o $\langle r_g^2 \rangle$. Na figura 56, está indicado o gráfico de Debye para a galactomanana de *M. scabrella*. Através deste gráfico, pôde-se calcular o raio de giro ao quadrado para a amostra de galactomanana, conforme na tabela 8, com valor de 55,8 nm.

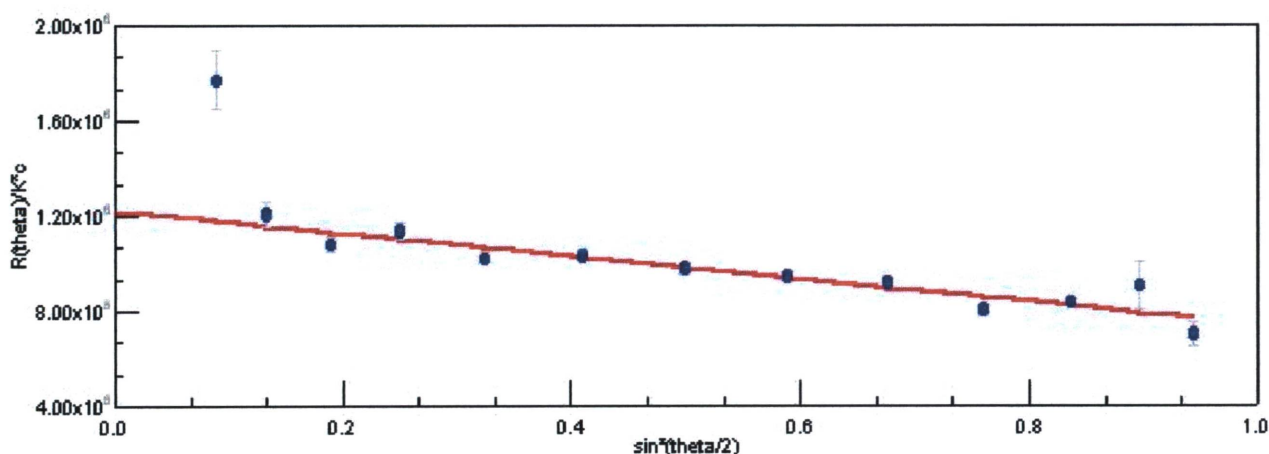


Figura 56: Gráfico de Debye obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de *M. scabrella*.

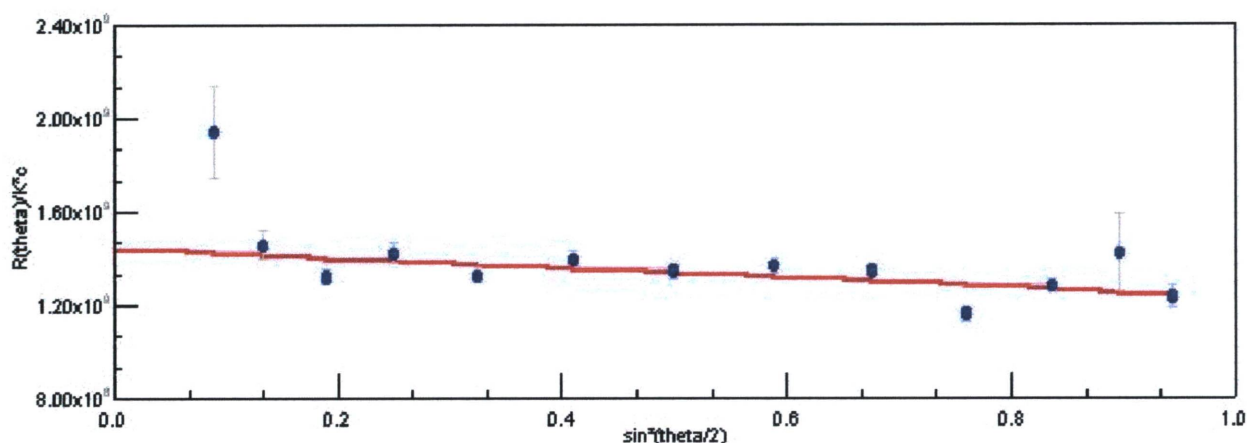


Figura 57: Gráfico de Debye obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína.

O gráfico de Debye obtido para a κ -caseína, está mostrado na figura 57. A partir deste gráfico foi efetuado o cálculo do raio de giro, com valor de 25,2 nm, conforme consta na tabela 8.

Como o raio de giro ao quadrado da galactomanana de *M. scabrella* apresenta um valor de 55,8 nm, pouco superior a 50 nm, pode-se observar na figura 56 a reta obtida, e nos pontos que não estão fazendo parte da reta, os ângulos podem ser descartados para o cálculo da massa molar, obtendo-se um valor bem mais preciso.

Para as amostras de galactomanana e κ -caseína, o raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) foi obtido através do gráfico de Debye (construído através da análise de homogeneidade), e as relações entre o raio de giro ao quadrado com o volume de eluição e M_w podem ser observados através das figuras 58, 59, 60 e 61.

Na figura 58, pela reta obtida para o gráfico do $\langle r_g^2 \rangle$ versus o volume de eluição, pode-se observar que raio de giro ao quadrado da amostra de galactomanana decresce com o volume de eluição.

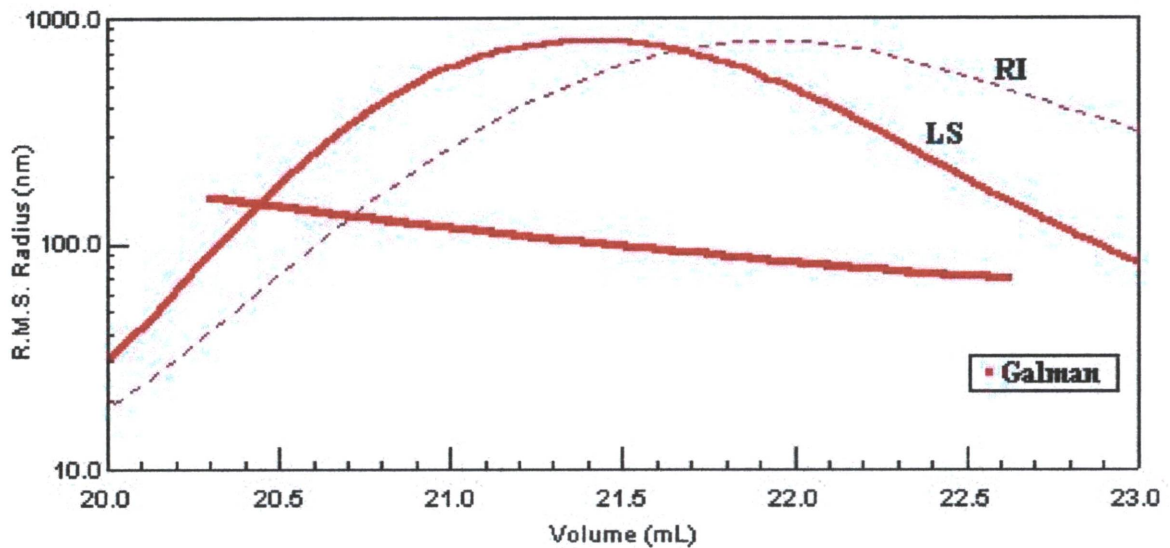


Figura 58: Gráfico de raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) versus volume de eluição (V_e) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de *M. scabrella*. As linhas contínuas em vermelho representam o detector de espalhamento de luz, e as linhas pontilhadas, o detector de índice de refração.

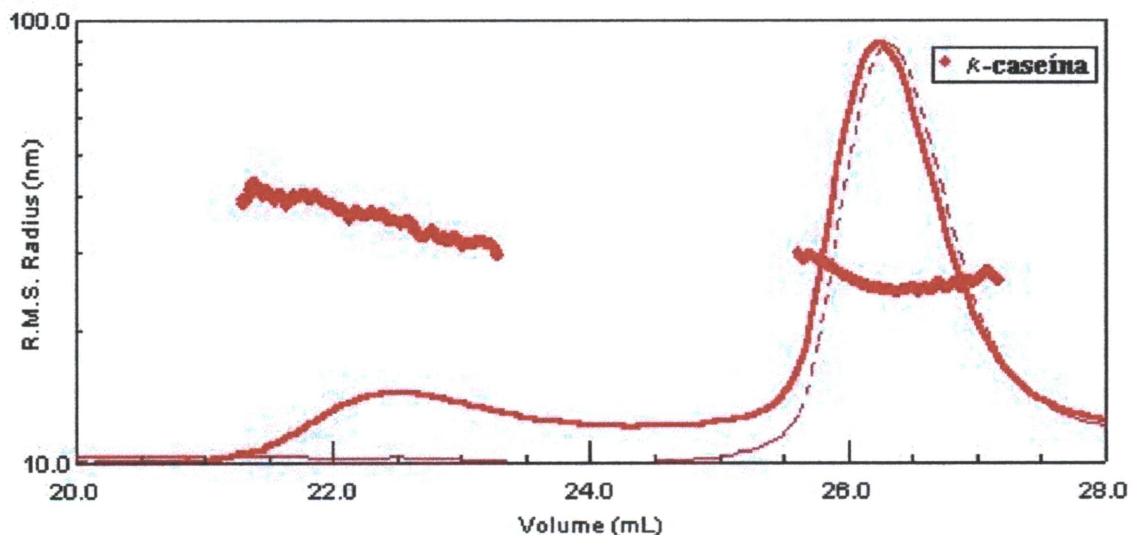


Figura 59: Gráfico de raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) versus volume de eluição (V_e) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína. As linhas contínuas em vermelho representam o detector de espalhamento de luz, e as linhas pontilhadas, o detector de índice de refração.

Na figura 59, a reta obtida para o gráfico do $\langle r_g^2 \rangle$ versus o volume de eluição, pode-se observar que o raio de giro ao quadrado da amostra de κ -caseína decresce com o volume de eluição, tanto para o pico com maior massa molar, quanto para o pico principal (com menor massa molar).

A possibilidade de relacionar $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ e massa molar para uma distribuição de massas de um dado polímero representa um significativo avanço na caracterização prática do polímero (Reed, 1995a), e também oferece uma oportunidade de entendimento para testar as teorias sobre os mecanismos de interação de uma maneira concisa.

Os gráficos em que podem ser plotados os valores de $\langle r_g^2 \rangle$ versus M_w fornecem informações sobre a conformação da molécula. Através da figura 60, pode-se observar um gráfico demonstra cujo raio de giro ao quadrado varia em função da massa molar do polímero, e os valores formam uma linha reta, cuja inclinação é cerca de 0,49 para a galactomanana de *M. scabrella*, caracterizando uma molécula mais flexível na forma de emaranhado (“random coil”).

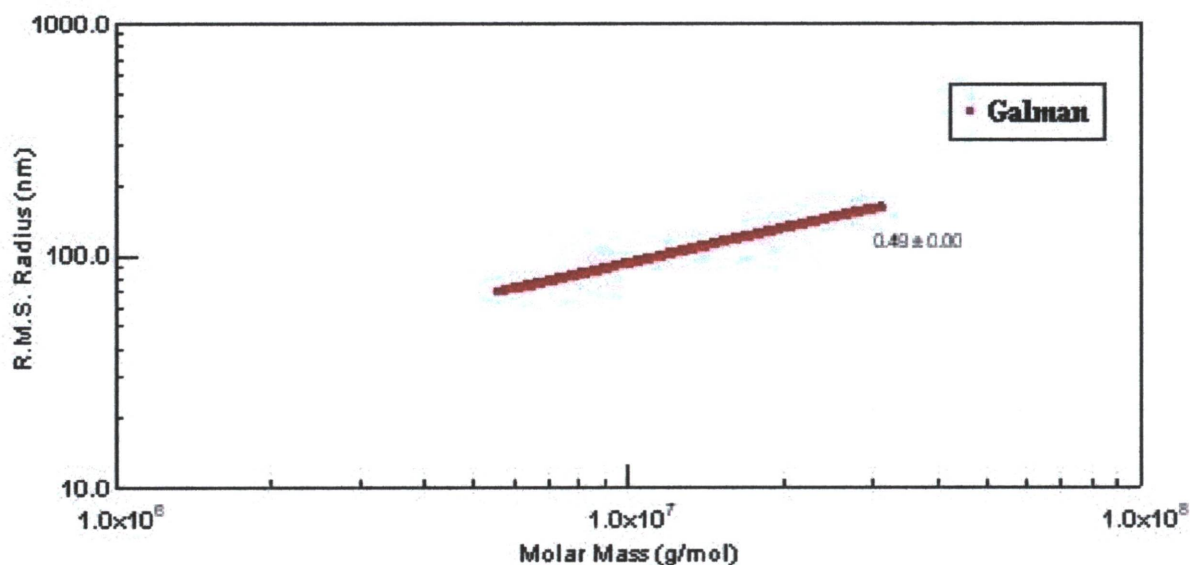


Figura 60: Gráfico de raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) versus massa molar (M_w) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da galactomanana de *M. scabrella*.

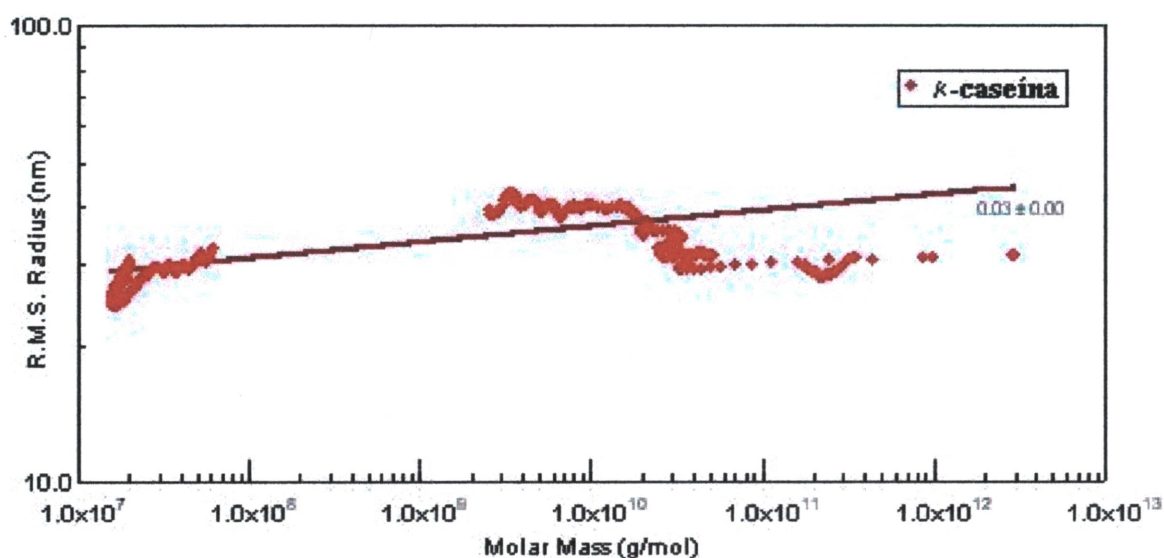


Figura 61: Gráfico de raio de giro ao quadrado ($\langle r_g^2 \rangle$) versus massa molar (M_w) obtido por cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (HPSEC-MALLS) da fração κ -caseína.

Analisando a figura 61, pode-se observar um gráfico cujos valores de $\langle r_g^2 \rangle$ versus M_w formam uma linha reta, onde o raio de giro ao quadrado varia pouco em função da massa molar, cuja inclinação é cerca de 0,03 para a κ -caseína, caracterizando uma molécula que apresenta uma forma esférica.

De Kruif e Tuinier (1999) em seus trabalhos (Tuinier e de Kruif, 1999) estudaram as interações entre um exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Lactococcus lactis* subespécie *cremoris* com proteínas do soro do leite (nativas e desnaturadas), em sistemas não formadores de gel, mas com mudanças nas propriedades em solução, através de estudos de cromatografia de exclusão estérica (SEC) acoplada a detectores de espalhamento de luz laser em multiângulos (MALLS), detectores de espalhamento de nêutrons em baixo ângulo (SANS) e viscosimetria capilar (Ubbelohde). Os autores observaram que em baixas concentrações do exopolissacarídeo, a mistura era estável, e em altas concentrações as misturas mostravam separação de fases. A viscosidade relativa da mistura foi maior que a solução do exopolissacarídeo isolado, indicando que a interação contribuiu para a força macroscópica sobre cisalhamento. Nos experimentos de espalhamento de luz, foi observado um pico de espalhamento típico, onde as amostras foram analisadas em tempos que variaram de 25 a 892 minutos após a mistura dos dois biopolímeros, avaliando-se a intensidade de luz espalhada ($I(Q)$) em função de uma separação de fases dos colóides da proteína do soro do leite. A

intensidade do pico aumentava em menores valores intensidade de luz espalhada à medida em que aumentava o tempo após a mistura, indicando que os agregados são formados durante a separação de fases. Com estes dados, os autores puderam concluir que as misturas exopolissacarídeo-proteína do soro do leite exibem um comportamento segregativo próprio das interações tipo depleção, que induzem a uma atração efetiva entre as partículas dos colóides agregados da proteína do soro, o que é proporcional ao tamanho e concentração do polissacarídeo, aumentando a viscosidade do sistema. Se a atração é forte o suficiente, o sistema tenderá a uma separação em duas fases: uma fase rica em proteína e outra em polissacarídeo (de Kruif e Tuinier, 1999; Tuinier e de Kruif, 1999).

Santos *et al.* (1997) estudaram a caracterização estrutural de sistemas contendo polissacarídeos, fosfolipídeos e colesterol por espalhamento de luz e MET. Os autores observaram que os fragmentos do gel de polissacarídeo obtidos por quebra da macromolécula através de extrusão por um homogeneizador, pareciam manter sua natureza gel. Como um resultado da adição de fosfolipídeos (com ou sem colesterol) os microgéis foram formados ao redor do polissacarídeo, como bicamadas multilamelares concêntricas. O polissacarídeo envolvido pela bicamada de lipídeos pode ser utilizado em sistemas para a liberação de drogas e/ou formulações de vacinas, pois são estáveis, não tóxicos, e seu tamanho e composição são facilmente controlados.

Beer *et al.* (1999) estabeleceram um método rápido para estabelecer as constantes na equação de Mark-Houwink-Sakurada, relacionando viscosidade intrínseca e massa molar das galactomananas de guar ($[\eta] = K \cdot M_w^a$). Os experimentos realizados para esta determinação foram a hidrólise ácida parcial e análise por cromatografia de exclusão estérica, empregando detectores de viscosidade e de espalhamento de luz, obtendo-se um grande número de amostras com grande variação de massa molar a serem analisadas. Os valores das constantes na equação de Mark-Houwink-Sakurada (a e K) foram de 0,72 e $5,13 \times 10^{-4}$, respectivamente, de acordo com os dados prévios encontrados na literatura.

Payens (1971) estudou a interação polissacarídeo-proteína através de misturas contendo κ -carragenana, caseína e frações α , β e κ -caseína (em solução salina simulando o comportamento eletroquímico do leite ultrafiltrado), através de experimentos de espalhamento de luz (espectrofotômetro acoplado com detector de espalhamento de luz em um ângulo de incidência de 45°), e viscosimetria capilar (Ubbelohde). O autor observou que a κ -carragenana interage especificamente com a fração κ -caseína formando um gel, já descrito

anteriormente por Grindrod e Nickerson (1968) e Hansen (1968), uma mudança no perfil de espalhamento das amostras em relação ao tempo de resfriamento, também observada nestes estudos, indicando uma transição sol-gel, e uma maior interação entre κ -carragenana com a fração κ -caseína, em relação à caseína total.

Roger *et al.* (2000) consideraram como as equações matemáticas utilizadas para a determinação da massa molar, grau de polidispersão, e conformação das moléculas podem ser aplicadas para duas α -glucanas lineares: amilose e pululana. O raio de giro para a amilose utilizando KOH como solvente é maior que utilizando água, mostrando uma expansão da molécula, com valores de $0,62 \pm 0,06$ nm e $0,52 \pm 0,02$ nm, respectivamente, e no gráfico da massa molar versus o volume de eluição foi observado que a amilose apresenta um maior volume hidrodinâmico em água que em KOH. Para a pululana a diferença entre os raios de giro entre os dois solventes é menor, com valores de $0,62 \pm 0,06$ nm em KOH e $0,58 \pm 0,07$ nm para a água, indicando que a pululana adota a mesma conformação em qualquer um dos dois solventes.

Antonov *et al.* (1999), em estudos da interação entre sistemas compostos por guar e caseína, apresentam como hipótese de um possível mecanismo de interação entre estas biomoléculas, a existência de um pequeno número de grupos funcionais carregados positivamente nas moléculas do guar, e a formação de complexo poderia ser devida a uma interação iônica fraca entre a caseína carregada negativamente ($\text{pH} > \text{pI}$) e o guar carregado positivamente, que enfraquece em presença de sal. Estes grupos funcionais carregados positivamente presentes no guar citados por Antonov *et al.* (1999) podem se tratar de proteínas associadas à cadeia do polissacarídeo, que estão influenciando a interação polissacarídeo-proteína. Através das técnicas citadas acima, estes autores evidenciaram uma interação atrativa fraca entre o sistema galactomanana- β -caseína observando a formação de associações, e os autores levantam uma hipótese de que este complexo possivelmente é estabilizado pelas cargas negativas da caseína e alguns grupos funcionais positivamente carregados ligados à molécula do polissacarídeo neutro.

Tuinier *et al.* (2000) estudaram a interação entre as micelas de caseína e goma guar despolimerizada, degradada em aquecimento em solução aquosa em pH baixo por uma combinação de cromatografia de exclusão estérica e espalhamento de luz. Misturas entre a goma guar degradada e a caseína levaram a uma separação de fases que originou-se pela

interação-depleção, levando a uma atração efetiva entre as micelas de caseína e o guar não adsorvido. A concentração do polímero no limite de fase aumenta com a diminuição do comprimento da cadeia do guar, devido a um aumento no espessamento da camada de depleção com aumento no raio de giro, que leva a uma diminuição do valor do segundo coeficiente virial.

O fenômeno de separação de fases foi indicado pela observação de uma fase superior que se torna clara, enquanto que a fase inferior torna-se altamente turbida (branca). A concentração de guar na fase superior foi analisada, e estava sempre mais alta do que se esperava para a distribuição homogênea, indicando que o guar é sempre concentrado na fase superior devido à interação segregativa (Tuinier *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos através dos experimentos reológicos, sugerem uma interação entre galactomananas de *M. scabrella* e a caseína, devido a mudanças nas propriedades reológicas no sistema. Estes dados são confirmados nos experimentos de MET, das misturas galactomanana-caseína total e frações purificadas da caseína (α , β e κ), a adição do polissacarídeo faz com que ocorra uma retração das partículas de caseína, havendo um aumento nos espaços entre as partículas da proteína, onde a galactomanana é excluída dos espaços entre as micelas, com alterações na microestrutura das amostras. O fenômeno de separação de fases ocorre quando se adiciona uma alta concentração de um dos biopolímeros, e maiores diferenças nas microestruturas podem ser observadas para as misturas na ordem β , κ , α -caseína, respectivamente.

Nas análises por DC realizadas para as misturas contendo galactomananas de *M. scabrella* com as frações de caseína, observou-se que as frações que continham κ -caseína apresentaram uma maior variação na intensidade dos sinais no espectro de DC, indicando uma maior interação com o polissacarídeo, seguida pela fração β -caseína e, por último, a fração α -caseína, entretanto através destas duas técnicas não foi possível observar se o fenômeno de separação de fases está ocorrendo.

Os resultados de HPSEC-MALLS através das análises de homogeneidade sugerem uma possível interação entre os sistemas, observando-se maiores diferenças para as frações purificadas na ordem κ , α e β -caseína, respectivamente, e estão são correspondentes aos encontrados por DC.

A comparação entre os resultados experimentais obtidos por diferentes métodos é importante no entendimento da relação entre a estrutura e o comportamento de formação de gel dos hidrocolóides, contribuindo para que novos produtos possam ser formulados através da combinação entre diferentes biopolímeros, aproveitando-se das características de interação entre os mesmos.

Conclusões

5. Conclusões

Tendo em vista os resultados apresentados, as conclusões do presente trabalho são:

- A interação polissacarídeo-proteínas do leite analisada por medidas reológicas, utilizando ciclos de temperatura, mostrou uma melhor interação após o aquecimento, provavelmente devido à desnaturação da proteína do leite e reorganização do sistema contendo galactomanana após o resfriamento.
- De acordo com os resultados obtidos através dos experimentos reológicos por ciclos de temperatura, pode-se sugerir uma possível sinergia entre galactomananas de *M. scabrella* e proteínas do leite, principalmente a caseína, devido a mudanças nas propriedades reológicas no sistema dinâmico, através de varreduras de frequência e ciclos de temperatura, em relação ao sistema composto por galactomanana-leite desnatado sem aquecimento.
- Através das análises por DC realizadas para as galactomananas de *M. scabrella* nativa e purificada, e galactomananas comerciais de guar e alfarroba nativas e purificadas não houve uma diferença significativa nos valores mínimos obtidos para as diferentes galactomananas.
- Através das análises por DC realizadas para a caseína total e frações purificadas de caseína (α , β e κ), foi observado que todos os espectros apresentaram-se semelhantes, típicos de uma estrutura não ordenada (randômica).
- Para as misturas contendo galactomanana de *M. scabrella* nativa e caseína total, observou-se uma banda semelhante a das gomas comerciais de guar e alfarroba, com variação significativa na intensidade do sinal de DC e no deslocamento no comprimento de onda para os picos mínimos.
- Para ambas as misturas contendo galactomananas de *M. scabrella* nativa e *M. scabrella* purificada com as frações de caseína, observou-se que as frações contendo κ -caseína

apresentaram uma maior variação na intensidade dos sinais no espectro de DC, seguida pela fração β -caseína e, por último, a fração α -caseína.

- Através dos experimentos de DC, pôde-se observar que a granulometria da galactomanana interferiu nos espectros das misturas galactomanana-caseína total e galactomanana- β -caseína, provavelmente devido a uma mudança conformacional. Estas mudanças conformacionais podem estar contribuindo para uma melhor interação do sistema polissacarídeo-proteína.

- Observando-se as diferenças nos valores da intensidade do sinal e nos deslocamentos no comprimento de onda de DC para os picos mínimos com os ciclos de aquecimento e resfriamento, observa-se que a galactomanana de goma guar é mais estável que a de *M. scabrella*, tanto nas misturas com caseína total, quanto com κ -caseína, devido a uma menor variação nos espectros quando submetidos a estes ciclos de temperatura em comparação com os espectros das misturas a 25 °C.

- Nos experimentos de MET, das misturas galactomanana-caseína total e frações purificadas da caseína (α , β e κ), a adição do polissacarídeo faz com que ocorra uma retração das partículas de caseína, havendo um aumento nos espaços entre as partículas da proteína, onde a galactomanana é excluída.

- Nos experimentos de MET realizados no presente trabalho, foi possível observar alterações na microestrutura das amostras quando galactomanana era adicionada às frações purificadas da caseína. Uma separação de fases ocorria quando uma alta concentração de um dos biopolímeros era acrescida, havendo maiores diferenças nas microestruturas das misturas na ordem β , κ , α -caseína.

- Através das análises de homogeneidade da galactomanana de *M. scabrella* por HPSEC-MALLS, observou-se que esta apresenta um único sinal referente aos detectores de índice de refração e de espalhamento de luz laser, sendo considerada unimodal ou homogênea.

- Através das análises de homogeneidade obtidas por HPSEC-MALLS, pode-se sugerir uma interação entre a galactomanana e a caseína, levando-se em consideração o aumento na

intensidade dos picos e o deslocamento dos mesmos em relação aos biopolímeros isolados, obtendo-se melhor interação entre a galactomanana e as frações purificadas da caseína na ordem κ -caseína, α -caseína e β -caseína, respectivamente.

- Observou-se que os valores do segundo coeficiente virial cruzado para todas as misturas galactomanana-caseína apresentam-se menores que os valores encontrados para a multiplicação dos valores dos segundos coeficientes viriais dos biopolímeros isolados, demonstrando que o fenômeno de separação de fases não está ocorrendo nestes sistemas.

Referências
Bibliográficas

6. Referências bibliográficas

ADAMS, G. A. Acid hydrolysis of weak linkages. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 01, p. 21-31, 1965.

AGUILERA, J. M.; KESSLER, H. G. Properties of mixed and filled-type dairy gels. **J. Food Sci.**, v. 54, n. 5, p. 1213-1217, 1989.

_____ ; KINSELLA, J. E. Compression strength of dairy gels and microstructural interpretation. **J. Food Sci.**, v. 56, n. 5, p. 1224-1228, 1991.

AKIYOSHI, K.; DEGUCHI, S.; MORIGUCHI, N.; YAMAGUCHI, S.; SUNAMOTO, J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. **Macromolecules**, v. 26, p. 3062-3068, 1993.

ALVES, M. M.; ANTONOV, Y. A.; GONÇALVES, M. P. On the compatibility of alkaline gelatin and locust bean gum in aqueous solution. **Food Hydrocol.**, v. 13, p. 77-80, 1999a.

_____ ; _____ ; _____. The effect of structural features of gelatin on its thermodynamic compatibility with locust bean gum in aqueous media. **Food Hydrocol.**, v. 13, p. 157-166, 1999b.

_____ ; _____ ; _____. The effect of phase viscosity ratio on the rheology of liquid two phase gelatin-locust bean gum systems. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 26, p. 333-336, 1999c.

AMBROSE, A. S. Extracting casein from milk. **Anales Chem. Abstracts**, v. 29, p. 2255, 1935.

ANDERSON, D. M. W. The amino acid composition and quantitative sugar-amino acid relationships in sequential Smith-degradation products from *Acacia polyacantha* gum. **Food Additives and Contaminants**, v. 3, p. 123-132, 1986.

ANTONOV, Y. A.; GRIMBERG, V. Y., TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic aspects of the compatibility of proteins and polysaccharides in aqueous media. Part I. Theoretical concepts of the decomposition of water-protein-polysaccharide systems into liquid phases. **Die Nahrung**, v. 23, p. 207-214, 1979a.

_____ ; _____ ; _____ . Thermodynamic aspects of the compatibility of proteins with polysaccharides in aqueous media. Part II. Phenomenology of the thermodynamic incompatibility of proteins with polysaccharides in aqueous media. **Die Nahrung**, v. 23, p. 597-610, 1979b.

_____ ; _____ ; _____ . Thermodynamic aspects of the compatibility of proteins with polysaccharides in aqueous media. Part III. Influence of the physical-chemical factors in the thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides. **Die Nahrung**, v. 23, p. 847-857, 1979c.

_____ ; PLETENKO, M. G.; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic compatibility of polysaccharides in aqueous media. **Vysokomolek**, part A, v. 29, p. 2482, 1987, em Russo.

_____ ; LEFEBVRE, J.; DOUBLIER, J. L. J. On the one-phase state of aqueous protein-uncharged polymer systems: casein-guar gum system. **Appl. Polym. Sci.**, v. 71, p. 471-482, 1999.

ASAKURA, S.; OOSAWA, F. On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. **J. Chem. Phys.**, v. 22, p. 1255-1256, 1954.

_____ ; _____ . Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. **J. Polymer Sci.**, v. 33, p. 183-192, 1958.

ASHTON, W. R.; JEFFERIES, M.; MORLEY, R. G.; PASS, G.; PHILLIPS, G. O.; POWER, D. M. Physical properties and applications of aqueous solutions of *Albizia zygia* gum. **J. Sci. Food. Agric.**, v. 26, p. 697-704, 1975.

ASPINALL, G. O.; WHYTE, J. N. C.; Polysaccharides of soy-beans. Part I: Galactomannans from the hulls. **J. Chem. Soc.**, p. 5058-5063, 1964.

_____. Gums and mucilages. **Adv. Carbohydr. Chem.**, v. 24, p. 333-379, 1969.

BAIRD, J. K. Industrial gums, polysaccharides and their derivatives. 3 ed. San Diego: Academic Press. 1993, p. 605-618.

BAHARY, W. S.; JILANI, M. Universal calibration assessment in aqueous gel permeation chromatography. **J. of Appl. Polym. Sci.**, v.48, n.9, 1993.

BEER, M. U.; WOOD, P. J.; WEISZ, J. A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. **Carbohydr. Polym.**, v. 39, p. 377-380, 1999.

BOURRIOT, S.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. L. Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein-guar gum mixtures. **Food Hydrocol.**, v. 13, p. 43-49, 1999a.

_____; _____; _____. Phase separation, rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures. **Int. Dairy J.**, v. 9, p. 353-357, 1999b.

_____; _____; _____. Micellar-casein- κ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. **Carbohydr. Polym.**, v. 40, p. 145-157, 1999c.

BRADLEY, T. D.; MITCHELL, J. R. The determination of the kinetics of polysaccharide thermal degradation using high temperature viscosity measurements. **Carbohydr. Polym.**, v. 9, p. 257-267, 1988.

BRESOLIN, T. M. B.; BELTRAMINI, L. M.; SANDER, P. C.; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Physicochemical aspects of the intermolecular interaction of the galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella* Benth. **Latin American App. Res.**, v. 26, p. 5,

1996.

____ ; SANDER, P. C.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Viscometric studies on xanthan and galactomannan systems. **Carbohydr. Polym.**, v. 33, p. 131-138, 1997.

____ . Propriedades físico-químicas de biopolímeros: xantana/galactomananas. Curitiba, 1998. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.,

____ ; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 23, p. 263-275, 1998.

____ ; _____ ; _____ ; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 26, p. 225-231, 1999.

CAESSENS, P. W. J. R.; DE JONGH, H. H. J.; NORDE, W.; GRUPPEN, H. The adsorption-induced secondary structure of β -casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties. **Biochim. et Biophys. Acta**, v. 1430, p. 73-83, 1999.

CARDOSO, A. T. M. Desenvolvimento do processo de obtenção de galactomanana em escala piloto a partir de semente de bracinga. Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CARLSON, W. A.; ZIEGENFUSS, E. M.; OVERTON, J. D. Food technology feature: compatibility and manipulation of guar gum. **Food Technol.**, v. 19, p. 50-54, 1962.

CARVALHO, P. E. R. Espécies florestais brasileiras. recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. EMBRAPA-CNPQ; SPI. Colombo: Brasil, 1994, p. 640.

CHAUBEY, M.; KAPOOR, V. P. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. **Carbohydr. Res.**, v. 332, p. 439-444, 2001.

CHEN, Y.; LIAO, M. L.; BOGER, D. V.; DUNSTAN, D. E. Rheological characterization of k-carrageenan/locust bean gum mixtures. **Carbohydr. Polym.**, v. 46, p. 117-124, 2001.

CHRONAKIS, I. S.; KASAPIS, S. Structural properties of single and mixed milk/soya protein system. **Food Hydrocol.**, v. 7, n. 6, p. 459-478, 1993.

_____ ; KASAPIS, S.; RICHARDSON, R. K. Small deformation rheological properties of maltodextrin-milk protein systems. **Carbohydr. Polym.**, v. 29, p. 137-148, 1996.

CHUDZIKOWSKI, R. J. Guar gum and its applications. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, n. 22, p. 43-60, 1971.

CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Adv. Polym. Sci.**, v. 83, p. 59-192, 1987.

_____. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. In: DICKINSON, E. Food polymers, gels and colloids. Cambridge: Royal Society of Chemistry, n. 82, 1991, p. 322-338.

CUI, W.; ESKIN, N. A. M.; BILIADERIS, C. G.; MAZZA, G. Synergic interactions between yellow mustard polysaccharides and galactomannans. **Carbohydr. Polym.**, v. 27, p. 123-127, 1995.

DATTA, N.; DEETH, H. C. High pressure of milk and dairy products. **Australian J. of Dairy Technol.**, v. 54, n. 1, p. 41-48, 1999.

DEA, I. C. M.; MC KINNON, A. A.; REES, D. A. Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which model cell wall cohesion: reversible changes in conformation and association of agarose, carrageenan and galactomannans. **J. Mol. Biol.**, v. 68, p. 153-172, 1972.

_____ ; MORRISON, A. Chemistry and interaction of seed galactomannans. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v.31, p. 241-312, 1975.

_____ . The role of structural modification in controlling polysaccharide functionality. In: YALPANI, M. Progress in Biotechnology 3. Industrial polysaccharides: genetic engineering, structure/properties, relations and applications. Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 207-216.

DE GENNES, P. G. Scaling concepts in polymer physics. Cornell University Press, New York, 1979, p. 98-127.

DE KRUIF, K.G; TUINIER, R. Whey protein aggregates and their interaction with exopolysaccharides. **Int. J. of Food Sci. and Technol.**, v. 34, p. 487-492, 1999.

DELBEN, F.; STEFANCICH, S. Interaction of food polysaccharides with ovalbumin. **Food Hydrocol.**, v. 12, n. 3, p. 291-299, 1998.

DICKINSON, E.; EUSTON, S. R. Stability of food emulsions containing both protein and polysaccharide. food polymers, gels and colloids; (E. Dickinson ed.); RSC Special Publication: Cambridge, n. 82, 1991, p. 132- 146.

_____ ; GALAZKA, V. B. Emulsion stabilization by protein-polysaccharide complexes. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. Gums and stabilizers for the food industry 6. Oxford: IRL Press, 1992, p. 351-362.

_____ . Protein-polysaccharide interactions in food colloids. In: DICKINSON, E.; WALSTRA, P. Food colloids and polymers: stability and mechanical properties. [S.l. : s.n.], 1993, p. 77- 93.

_____ . Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharide complexes. Food Polysaccharides and Their Applications. New York, 1995, p. 501-515.

_____ . Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide

interactions. **Trends in Food Sci. and Technol.**, v. 9, n. 10, p. 347-354, 1998.

_____. JAMES, J. D. Influence of high-pressure treatment on β -lactoglobulin-pectin associations in emulsions and gels. **Food Hydrocol.**, v. 14, p. 365-376, 2000.

DROHAN, D. D.; TZIBOULA, A.; Mc NULLI, D.; HORNE, D. S. Milk protein-carrageenan interactions. **Food Hydrocol.**, v. 11, n. 1, p.101-107, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ELFAK, A. M.; PASS, G; PHILLIPS, G. O.; MORLEY, R. G. The viscosity of dilute solutions of guar gum and locust bean gum with and without added sugars. **J. Sci. Food. Agric.**, v. 28, p. 895-899, 1977.

ENRIQUEZ, L. G.; HWANG, J. W.; HONG, G. P.; BATI, N. A.; FLICK, G. J. Plant and microbial food gums. In: CHARALAMBOUS, G.; DOXASTAKIS, G. Food emulsifiers: chemistry, technology, functional properties and applications. Amsterdam: Elsevier, 1989, p. 335-361.

FERRAGUT, V.; CHIRALD, A. Microstructure of oil-in-water low-fat emulsions containing skim milk powder and locust bean gum. **Liebensm. Wiss. und Technol.**, v. 29, n. 7, p. 648-653, 1996.

FERRY, J. D. Illustration of viscoelastic behavior of polymeric systems. In: _____. Viscoelastic properties of polymers. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1980, p. 33-55.

FISCHER, M.; REIMANN, S.; TROVATO, V.; REDGWELL, R. J. Polysaccharides of green arabica and robusta coffee beans. **Carbohydr. Res.**, v. 330, p. 93-101, 2001.

FLATLAND, A. Static and dynamic light scattering and other radiation scattering. In: Principles of colloid and surface chemistry. HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. 3rd ed., Marcel Dekker, Inc: New York, 1997, p. 193-245.

GANTER, J. L. M. S. Galactomanana de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga). Curitiba, 1988. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

_____. Estudos de carboidratos de sementes de *Mimosa scabrella* (bracatinga). Análise estrutural dos oligossacarídeos e propriedades reológicas da galactomanana . Curitiba, 1991, Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

_____ ; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F.; HEYRAUD, A.; RINAUDO, M. Low molecular weight carbohydrates from *Mimosa scabrella* seeds. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 29, n. 2, p. 139-146, 1991.

_____ ; MILAS, M.; RINAUDO, M. On the viscosity of sodium poly(styrene sulphonate), a flexible polyelectrolyte. **Polymers**, v. 33, n. 1, p. 113-116, 1992a.

_____ ; _____ ; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F.; RINAUDO, M. Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. **Carbohydr. Polym.**, v. 17, p. 171-175, 1992b.

_____ ; ZAWADZKI-BAGGIO, S. F.; LEITNER, S. C. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; REICHER, F. Structural studies on galactomannans from Brazilian seeds. **Carbohydr. Chem.**, v. 12, n. 6, p. 753-767, 1993.

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

_____.; CARDOSO, A. T. M.; KAMINSKI, M.; REICHER, F. Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 1, p. 137, 1997.

_____.; REICHER, F. Water-soluble galactomannan from seeds of *Mimosaceae* spp. **Biores. Technol.**, v. 68, p. 55-62, 1999.

GAONKAR, A. G. Surface and interfacial activities and emulsion characteristics of some food hydrocolloids. **Food Hydrocol.**, v. 5, p. 329-337, 1991.

GARCIA-OCHOA, F.; CASAS, J. A. viscosity of locust bean (*Ceratonia siliqua*) gum solutions. **J. Sci. Food Agric.**, v. 59, p. 97-100, 1992.

GARNIER, C.; SCHORSCH, C.; DOUBLIER, J. L. Phase separation in dextran/locust bean gum mixtures. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, p. 313-317, 1995.

GARTI, N.; MADAR, Z.; ASERIN, A.; STERNHEIM, B. Fenugreek galactomannans as food emulsifiers. **Liebism. Wiss. und Technol.**, v. 30, p. 305-311, 1997.

_____.; SLAVIN, Y.; ASERIN, A. *Portulaca oleracea* gum and casein interactions and emulsion stability. **Food Hydrocol.**, v. 13, n. 2, p. 127-138, 1999.

GLICKSMAN, M. Hydrocolloids and the search for the "oily grail". **Food Technol.**, p. 94-103, oct, 1991.

GOFF, H. D.; FERDINANDO, D.; SCHORSCH, C. Fluorescence microscopy to study galactomannan structure in frozen sucrose and milk protein solutions. **Food Hydrocol.**, v. 13, p. 353-362, 1999.

GRINBERG, V. Y. A.; TOLSTOGUZOV, V. B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocol.**, v. 11, n. 2, p. 145-158, 1997.

GRINDROD, J.; NICKERSON, T. A. Effect of various gums on skim milk and purified milk proteins. **J. Dairy Sci.**, v. 51, n. 6, p. 834-841, 1968.

HANSEN, P. M. T. Stabilization of α_s -casein by carrageenan. **J. Dairy Sci.**, v. 51, p. 92, 1968.

HART, R. J.; LYNCH, G.; DEA, I. C. M.; MORRIS, E. R. Manipulation and control of mixed polysaccharide/milk protein gels. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. Gums and stabilizers for the food industry 6. Oxford: IRL Press, 1992, p. 173-179.

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

HEMBER, M. W. N.; MORRIS, E. R. Solubility, solution rheology and salt-induced gelation of welan polysaccharide in organic solvents. **Carbohydr. Polym.**, v. 27, p. 23-36, 1995.

HERALD, C. T. Locust/carob bean gum. In: GLICKSMAN, M. Food hydrocolloids, Boca Raton: CRC Press, v. 3, 1986a, p. 161.

_____. Guar gum. In: GLICKSMAN, M. Food hydrocolloids, Boca Raton: CRC Press, v. 3, 1986b, p. 171-184.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. Principles of colloid and surface chemistry. 3rd ed., Chap. 5, New York: Marcel Dekker, Inc., 1997, p. 193-245.

HORNE, D. S. Light scattering studies of milk gel systems. In: DICKINSON, E. Food polymers, gels and colloids. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991, p. 404-414.

HRICOVÍNI, M.; GUERRINI, M.; TORRI, G.; CASU, T. B. Monitonal properties of *E. coli* polysaccharide K5 in aqueous solution analyzed by NMR relaxation measurements. **Carbohydr. Res.**, v. 300, p. 69-76, 1997.

INOUE, M. T.; RODERJAN, C. V.; KUNIYOSHI, Y. S. Projeto madeira do Paraná. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, (IBDF/SUDESUL/ Gov. Est. do Paraná, SEPL). Curitiba, 1984, p. 38-44.

KALAB, M.; EMMONS, D. B. Milk-gel structure. IV. Microstructure of yogurts in relation to the presence of thickening agents. **J. Dairy Res.**, v. 42, p. 453-458, 1985.

_____. Microstructure of dairy foods. II. Milk products based on fat. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 3234-3248, 1985.

KAPOOR, V. P.; TARAVEL, F. R.; JOSELEAU, J. P.; MILAS, M.; CHANZY, H.; RINAUDO, M. *Cassia spectabilis* DC seed galactomannan: structural, crystallographical and rheological studies. **Carbohydr. Res.**, v. 306, p. 231-241, 1998.

KASAPIS, S.; MORRIS, E. R. Phase equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems. part I: gelation of individual components. **Carbohydr. Polym.**, v.21, p. 243-248, 1993.

KAUP, S. M.; GREGUER, J. L.; LEE, K. Nutritional evolution with an animal model of cottage cheese fortified with calcium and guar gum. **J. Food Sci.**, v. 56, n. 3, p. 692-695, 1991.

KHOKHLOV, A. R.; NYRKOVA, I. A. Compatibility enhancement and microdomain structuring in weakly charged polyelectrolyte mixtures. **Macromolecules**, v. 25, p. 1493-1502, 1992.

KÖK, M. S.; HILL, S. E.; MITCHELL, J. R. A comparison of the rheological behavior of crude and refined locust bean gum preparations during thermal processing. **Carbohydr. Polym.**, v. 38, p. 261-265, 1999.

KROEGER, G.; BUSH, S. M.; WILHELM, I. Thermal stability of guar gum as a function of granule size. **Z. Lebensm. Unter Forsch.**, v. 196, n. 6, p. 540-546, 1993.

KROGER, M. Quality of yogurt. **J. Dairy Sci.**, v. 52, n. 2, p. 344-350, 1976.

KRUMEL, K. L.; SARKAR, N. Flow properties of gums useful to the food industry. **Food Technol.**, p. 36-44, Apr. 1975.

LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B.; MICHON, C.; PARKER, A.; DE KRUIF, C. G. Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature. **Food Hydrocol.** v. 13, p. 211-218, 1999.

_____ ; _____; MICHON, C., LAUNAY, B., PARKER, A., DE KRUIF, C. G. Effects of carrageenan type on the behavior of carrageenan/milk mixtures. **Food Hydrocol.**, v. 14, p. 273-280, 2000.

LEITNER, S. C. S. Estudo de polissacarídeos da semente de *Stryphnodendron barbatimam* (barbatimão). Curitiba, 1991. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LILLFORD, P. J.; NORTON, I. T. Food hydrocolloids: an end user's viewpoint. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. Gums and stabilizers for the food industry 6. Oxford: IRL Press, 1992, p. 3-15.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa-SP: Plantarum, 1992, p. 180.

LUCYSZYN, N. Galactomananas: novas fontes do biopolímero e aplicações na indústria alimentícia. Curitiba, 1994, Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

_____ ; REICHER, F.; GANTER, J. L. M. S. Galactomannan from *Mimosa scabrella* (bracatinga) as starch substitute in food formulation. Natural polymers and composites. Proceedings from the IIIrd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES- ISNaPol, and WORKSHOP ON PROGRESS IN PRODUCTION

AND PROCESSING OF CELLULOSIC FIBRES AND NATURAL POLYMERS, (2000 : São Paulo), 2000, p. 233-237.

MAIER, H.; ANDERSON, M.; KARL, C.; MAGNUSON, K. E WHISTLER, R. L. Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. In: WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. Industrial gums, polysaccharides and their derivatives. San Diego: Academic Press, 3. ed., 1993, p.181-226.

MANOJ, P.; KASAPIS, S.; CHRONAKIS, I. S. Gelation and phase separation in maltodextrin-caseinate systems. **Food Hydrocol.**, v. 10, n. 4, p. 407-420, 1996.

MAROZIENE, A.; DE KRUIF, C. G. Interaction of pectin and casein micelles. **Food Hydrocol.**, v. 14, p. 391-394, 2000.

MATSUDOMI, N.; INOUE, Y.; NAKASHIMA, H.; KATO, A.; KOBAYASHI, K. Emulsion stabilization by Maillard-type covalent complex of plasma protein with galactomannan. **J. of Food Sci.**, v. 60, n. 2, p. 265-269, 1995.

MEYER, L. H. Food chemistry. Reinhold organic chemistry and biochemistry textbook series. New York: Reinhold Publishing Corporation, chap. 8, 1960, p. 293-315.

MITCHELL, J. R. Rheological techniques. In: GRUENWEDEL, D. W.; WHITAKEN, J. R. Food analysis: principles and techniques. [S.l.] : Marcel-Dekker, Inc., 1984, p. 151-220.

_____ ; HILL, S. E.; JUMEL, K.; HARDING, S. E.; AIDOO, M. The use of anti-oxidants to control viscosity and gel strength loss on heating of galactomannan systems. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WEDLOCK, D. J. Gums and stabilizers for the food industry 6. Oxford: IRL Press, 1992, p. 303-310.

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

_____. Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: STEPHEN, A. M. Food polysaccharides and their applications. New York: DEKKER, M. Inc., 1995, p. 517-546.

MORRIS, V. J. Weak and strong polysaccharide gels. In: DICKINSON, E. Food polymers, gels and colloids. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1991, p. 310-321.

NEUKON, H. Galactomannans: properties and applications. **Liebensm. Wiss. und Technol.**, v. 22, p. 41-45, 1989.

NEWMAN, R. H.; HEMMINGSON, J. A. Interactions between locust bean gum and cellulose characterized by ^{13}C - NMR spectroscopy. **Carbohydr. Polym.**, v. 36, p. 167-172, 1998.

NISHINARI, K.; ZHANG, H.; IKEDA, S. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. **Current Opinian in Colloid &Interface Science**, v. 5, p. 195-201, 2000.

OAKENFULL, D. Gelling systems. In: XIXth INTERNATIONAL CARBOHYDRATE SYMPOSIUM, (1998 : San Diego). Anais. San Diego, 1998.

PAI, V. B.; KHAN, S. A. Gellation and rheology of xanthan/enzyme-modified guar blends. **Carbohydr. Polym.**, v. 49, p. 207-216, 2002.

PAQUIN, P. Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. **Int. Dairy J.**, v. 9, p. 329-335, 1999.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; CRESCENZI, V. ^1H -NMR relaxation study of a chitosan-cyclodextrin network. **Carbohydr. Res.**, v. 300, p. 77-84, 1997.

PAVLOVSKAYA, G. E.; SEMENOVA, M. G.; THZAPKINA, E. N.; TOLSTOGUZOV, V. B. The influence of dextran on the interfacial pressure of adsorbing layers of 11S globulin *Vicia faba* at the planar n-decane/aqueous solution interface. **Food Hydrocol.**, v. 7, p. 1-7, 1993.

PAYENS, T. A. J. Light scattering of protein reactivity of polysaccharides especially of carrageenans. **J. Dairy Sci.**, v. 55, n. 2, p. 141-150, 1971.

PELLEGRINO, L.; VAN BOEKEL, M. A. J. S.; GRUPPEN, H.; RESMINI, P.; PAGANI, M. A. Heat-induced aggregation and covalent linkages in β -casein model systems. **Int. Dairy J.**, v. 9, p. 255-260, 1999.

PERISSUTTI, G. E. Estudo da interação entre galactomanana de *Mimosa scabrella* Bentham e proteínas do leite. Curitiba, 1999, Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

_____ ; BRESOLIN, T. M. B.; GANTER, J. L. M. S. Influence of ionic strength on the interaction of galactomannan of *Mimosa scabrella* Bentham and skim milk. Natural polymers and composites. Proceedings from the IIIrd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NATURAL POLYMERS AND COMPOSITES- ISNaPol, and WORKSHOP ON PROGRESS IN PRODUCTION AND PROCESSING OF CELLULOSIC FIBRES AND NATURAL POLYMERS, (2000 : São Paulo), 2000, p. 101-107.

_____ ; _____ ; _____. Interaction of the galactomannan of *Mimosa scabrella* Bentham and milk proteins. **Food Hydrocol.s**, v. 16, p. 403-417, 2002.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977.

PETKOWICZ, C. L. O. Biopolímeros da semente de *Schizolobium amazonicum* (pinho cuiabano): galactomananas e arabinanas. Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

_____ ; REICHER, F.; MAZEAU, K. Conformation analysis of galactomannans: from oligomeric segments to polymeric chains. **Carbohydr. Polym.**, v. 37, p. 25-39, 1998.

PETRI, H. M. Reologia ajuda a determinar as propriedades dos alimentos. **Engenharia de Alimentos**, n. 30, p. 32-38, Ano 6, RPA editorial, 2000.

PILNIK, W.; McDONALD, R. A. The stability of some hydrocolloids. **Gordian**, v. 12, p. 531-535, 1968.

_____ ; ROMBOUTS, M. Polysaccharides and food processing. **Carbohydr. Res.**, v. 142, p. 93-105, 1985.

RAYMENT, P.; ROSS-MURPHY, S. B.; ELLIS, P. R. Rheological properties of guar galactomannan and rice starch mixtures. II. Creep measurements. **Carbohydr. Polym.**, v. 35, p. 55-63, 1998.

_____ ; _____ ; _____ . Effect of size and shape of particulate inclusions on the rheology of guar galactomannan solutions. **Carbohydr. Polym.**, v. 43, p. 1-9, 2000.

RECHIA, C. V. G. Estudo de polissacarídeos da semente de *Senna multijuga*. Curitiba, 1992. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

REED, W. F. Data evaluation for unified multi-detector size exclusion chromatography-molar mass, viscosity and radius of gyration distributions. **Macromol. Chem. Phys.**, v. 196, p. 1539-1575, 1995a.

_____ . Time-dependent light scattering from singly and multiply stranded linear polymers undergoing random and endwise scission. **J. Chem. Phys.**, v. 103 (17), p. 7576-7584, 1995b.

_____ . Time-dependent process in polyelectrolyte solutions. **Phys. Chem.**, v. 100, n. 6, p. 685-695, 1996.

RIDOUT, M. J.; BROWNSEY, G. J.; MORRIS, V. J. Synergistic interactions of acetan with carob or konjac mannan. **Macromolecules**, v. 31, p. 2539-2544, 1998.

RINAUDO, M. Polysaccharide characterization in relation with some original properties. **J. of App. Polym. Sci.: Applied Polymer Symposium**. v. 52, p. 11, 1993.

ROBERTS, S. A.; KASAPIS, S.; LÓPEZ, I. S. Textural properties of a model aqueous phase in low fat products. Part 2: Alginate/caseinate blends and three-component systems. **Int. J. of Food Sci. and Technol.**, v. 35, p. 227-234, 2000.

ROGER, P.; AXELOS, M. A. V.; COLONNA, P. SEC-MALLS and SANS studies applied to solution behavior of linear α -glucans. **Macromolecules**. v. 33, p. 2446-2455, 2000.

ROLLER, S.; DEA, I. C. M. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. **Crit. Ver. Biotechnol.**, Boca Raton, v. 12, n. 3, p. 261-277, 1992.

SABBI, J. C. Relatório de atividades do Programa Integrado de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) – CNPq. Caracterização molecular de galactomananas por HPSEC-MALLS. Curitiba, 2000. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

_____. Relatório de atividades do Programa Integrado de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) – CNPq. Estudo de galactomananas por HPSEC-MALLS/Ação do ultra-som sobre os polímeros. Curitiba, 2001. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SÁNCHEZ, V. E.; BARTHOLOMAI, G. B.; PILOSOFF, A. M. R. Rheological properties of food gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction. **Liebensm. Wiss. und Technol.**, v. 28, p. 380-385, 1995.

SANCHEZ, C.; ZUNIGA-LOPEZ, R.; SCHMITT, C.; DESPOND, S.; HARDY, J. Microstructure of acid induced skim milk-locust bean gum-xanthan gels. **Int. Dairy J.**, v. 10, p. 199-212, 2000.

SÁNCHEZ, V. E.; BARTHOLOMAI, G. B.; PILOSOFF, A. M. R. Rheological properties of food gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction. **Liebensm. Wiss. und Technol.**, v. 28, p. 380-385, 1995.

SANDERSON, G. R. Polysaccharides in foods. **Food Technol.**, v. 35, p. 50-57, 1981.

_____. The rationale behind the applications of food polysaccharides. XIXth INTERNATIONAL CARBOHYDRATE SYMPOSIUM, (1998 : San Diego). Anais. San Diego, 1998.

SANTOS, N. C.; SOUSA, A. M. A.; BETBEDER, D.; PRIETO, M.; CASTANHO, M. A. R. B. Structural characterization of organized systems of polysaccharides and phospholipids by light scattering spectroscopy and electron microscopy. **Carbohydr. Res.**, v. 300, n. 1, p. 31-40, 1997.

SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 8, p. 689-753, 1998.

SCHORSCH, C.; GARNIER, C.; DOUBLIER, J. L. Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: comparison of guar gum with locust bean gum. **Carbohydr. Polym.**, v. 34, p. 165-175, 1997.

_____; CLARK, A. H.; JONES, M. G.; NORTON, I. T. Behaviour of milk protein/polysaccharide systems in high sucrose systems. **Colloids and Surfaces B - Biointerfaces**, v. 12, p. 317-329, 1999a.

_____; JONES, M. G.; NORTON, I. T. Thermodynamic incompatibility and microstructure of milk protein/locust bean gum/sucrose systems. **Food Hydrocol.**, v. 13, p. 89-99, 1999b.

SCHRAMM, G. A Practical approach to rheology and rheometry. Karlsruhe, Federal Republic of Germany: Gebrueder HAAKE GmbH, 1994, 290p.

SIERAKOWSKI, M. R.; FREITAS, R. A.; FUJIMOTO, J.; PETRI, D. F. S. Adsorption behavior of oxidized galactomannans onto amino-terminated surfaces and their interaction with bovine serum albumin. **Carbohydr. Polym.**, v. 49, p. 167-175, 2002.

SILVA JÚNIOR, J. G. DA. Eletroforese de proteínas: guia teórico prático. Ed. Interciência: Rio de Janeiro, 2001, 125p.

SILVA-LUCCA, R. A.; TABAK, M.; NASCIMENTO, O. R.; ROQUE-BARRIERA, M. C.; BELTRAMINI, L. M. Structural and thermodynamic studies of KM⁺, a D-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. **Biophys. Chem.**, v. 79, p. 81-93, 1999.

SONI, S. K.; BOSE, S. Seed galactomannans and their structures. **J. Scient. Indust. Res.**, v. 44, p. 544-547, 1985.

ST. GROTH, S. F.; WEBSTER, R. G.; DATYNER, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 71, p. 377-391, 1963.

STAUB, H. W.; ALI, R. Nutritional and physiological value of gums. In: GLICKSMAN, M. **Food hydrocol.**. Boca Raton: CRC Press, 1982, v. 1, p. 101-121.

SUDHAKAR, V.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Starch-galactomannan interactions: functionality and rheological aspects. **Food Chem.**, v. 55, n. 3, p. 259-264, 1996.

SUGUI, J. A. Aplicação de galactomanana de *Mimosa scabrella* (bracatinga): interação com surfactantes e proteínas. Curitiba, 1994, Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SUN, S. F. Physical chemistry of macromolecules. basic principles and issues. Chapters 8, 13 and 14. New York: John Willey & Sons, Inc., 1994.

SYRBE, A. BAUER, W. J.; KLOSTERMEYER, H. Polymer science concepts in dairy systems – An overview of milk protein and food hydrocolloid interaction. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 179-193, 1998.

TAGER, A. A. Physical chemistry of polymers. 2rd. ed. Moscow: Mir Publishers, 1978, 652 p.

TOBIAS, I. Polysaccharide structure from circular dichroism. In: YALPANI, M. Progress in Biotechnology 3. Industrial polysaccharides: genetic engineering, structure/properties, relations and applications. Amsterdam: Elsevier, 1987, p. 207-216.

TOMPA, H. Polymer solutions. Butterworths, London, 1956.

TSVETKOV, V. N.; ESKIN, V. E.; FRENKEL, S. Y. Structure of macromolecules in solution. Nauka, Moscow, 1964, p. 136.

TUINIER, R.; DE KRUIF, C. G. Phase behavior of casein micelles/exocellular polysaccharide mixtures: experiment and theory. **J. of Chem. Phys.**, v. 110, n. 18, p. 9296-9304, 1999.

_____ ; TEN GROTENHUIS, E.; DE KRUIF, C. G. The effect of depolymerised guar gum on the stability of skim milk. **Food Hydrocol.**, v. 14, p. 1-7, 2000.

VÉLEZ-RUIZ, J. F.; CÁNOVAS, G. V. B. Rheological properties of selected dairy products. **Crit. Rev. Fd. Sci. Nutr.**, v. 37, n. 4, p. 311-359, 1997.

VIEBKE, C. A light scattering study of carrageenan/galactomannan interactions. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, p. 101-105, 1995.

WALTER, R. H. Polysaccharide dispersions. Chemistry and technology in food. San Diego: Academic Press, 1998, 236p.

WANG, Q.; ELLIS, P. R.; ROSS-MURPHY, S. B. The stability of guar gum in an aqueous system under acidic conditions. **Food Hydrocol.**, v. 14, p. 129-134, 2000.

WHISTLER, R. L.; SMART, C. L. Polysaccharide chemistry. New York: Academic Press, 1953. p. 292-301.

____ ; SAARNIO, J. Galactomannan from soy bean hulls. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 6055-6057, 1957.

____ ; DANIEL, J. R. Carbohydrates. In: O. R. FENNEMA (ed.). Food Chemistry 2, New York: Marcel Dekker, 1985, p. 69.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Interactions in mixed polysaccharide systems. In: STEPHEN, A. M. Food Polysaccharides and their application, 1995, p. 463.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 65, 1963a.

____ ; ____ . Acetylation. **Meth. Carbohydr. Chem.**, v. 2, p. 211, 1963b.

WOODSIDE, E. E.; TROTT, G. F.; DOYLE, R. J.; FISHEL, C. W. Polyglucose-protein complexes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 117, p. 123, 1966.

WRAY, W.; BOULIKAS, T.; WRAY, V. P.; HANCOCK, R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 118, p. 147-203, 1981.

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

XU, S. Y.; STANLEY, D. W.; GOFF, H. D.; DAVIDSON, V. J.; MAGUER, M. L. E. Hydrocolloid/milk gel formation and properties. **J. Food Sci.**, v. 57, n. 1, p. 96-102, 1992.

ZASYPKIN, D. V.; BRAUDO, E. E.; TOLSTOGUZOV, V. B. Multicomponent biopolymer gels. **Food Hydrocol.**, v. 11, n. 2, p. 159-170, 1997.

ZAWADZKI-BAGGIO, S. F. Arabinana e galactomanana de *Schizolobium parahybae*; estudo da biossíntese de galactomananas. Curitiba, 1994. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

Anexos

7. Anexos

Esta tese deu origem à seguinte publicação.

Interaction between the galactomannan from *Mimosa scabrella* and milk proteins

G.E. Perissutti^a, T.M.B. Bresolin^b, J.L.M.S. Ganter^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, B.P. 19046, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^bNiafar Curso de Farmácia, UNIVALI, Itajaí, SC, Brazil

Received 7 March 2001; revised 18 June 2001; accepted 12 October 2001

Abstract

The rheological properties of mixtures of the galactomannan (G) from *Mimosa scabrella* Bentham and skim milk (SM), whole milk (WM) and skim milk powder (SMP), sodium caseinate (NaC) and purified casein fractions were investigated. The viscosity curves for the mixtures showed a pseudoplastic behavior, suggesting a protein–polysaccharide synergy, which was more pronounced on increase of polymer concentration. The oscillatory experiments showed a weak gel or concentrated solution behavior at 25 °C, while the properties of the galactomannan in aqueous solution showed a typical liquid-like behavior. Creep and recovery tests for the mixtures confirmed the above results. Rheological measurements of galactomannan and mixtures of it with SM in temperature cycles (10–75–10 °C) showed a maximum in G' with $G'/G'' = 2.8$ at ≈ 65 °C. These phenomena can be explained by a modification of intermolecular network that became stronger with increase of thermal energy, induced by the galactomannan.

However, after cooling at 25 °C, a more viscoelastic material was obtained. Moreover, the galactomannan–NaC mixture showed a synergy effect, observed also for the mixtures with casein fractions in the order β , κ and α -casein. The synergy mechanism of galactomannan and casein fractions may involve phase separation, but electrostatic and/or hydrophobic interactions cannot be discarded. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Galactomannan; Milk proteins; Casein; Interaction

1. Introduction

Seed galactomannans (G) having a polymeric main chain of (1 → 4)-linked β -D-mannopyranosyl residues, substituted at O-6 by α -D-galactopyranosyl units (Dea & Morrison, 1975) are widely used in the food industry mainly as thickening agents. They have a lower cost as compared with carrageenan and xanthan, and their synergistic interactions raised the possibility of a new functionality with wide industrial importance (Baird, 1993; Dea & Morrison, 1975; Herald, 1986; Zhan, Ridout, Brownsey, & Morris, 1993).

Casein has a complex structure (diameter between 20 and 600 nm) (Schmitt, 1982), with supramolecular association of individual subunits (α_{s1} , α_{s2} , β and κ -caseins), organized according to their hydrophobic and hydrophilic groups, yielding submicelles. κ -Casein is the most hydrophilic fraction and is therefore thought to be mainly present on the

surface of the micelle, providing a sterically stabilizing outer layer (Visser, 1992).

The behavior of polysaccharide–protein mixtures has been the subject of many investigations. However, few studies have been carried out on micellar casein–polysaccharide mixtures (Bourriot, Garnier, & Doublier, 1999a,b; Dickinson, 1995; Dickinson & Euston, 1991; Grinberg & Tolstoguzov, 1997; Tuinier, ten Grotenhuis, & de Kruif, 2000; Zasytkin, Braudo, & Tolstoguzov, 1997).

Grindrod and Nickerson (1968) observed that mixtures containing galactomannans of guar (with mannose/galactose ratio (Man/Gal) ≈ 1.8) or locust bean gum (Man/Gal ≈ 3.5), and purified caseins (α , β and κ) gave rise to a casein sediment when the system was maintained at 4 °C overnight, suggesting that biopolymers interaction must be very weak.

These protein–polysaccharide systems appeared to show a very weak association at low ionic strengths and at pHs different from the pI of the proteins (Antonov, Grinberg, & Tolstoguzov, 1979a,b,c; Dickinson & Euston, 1991; Grinberg & Tolstoguzov, 1997). Antonov, Lefebvre, and Doublier (1999) on the basis of static light scattering,

* Corresponding author. Tel.: +55-41-361-1661; fax: +55-41-266-2042.
E-mail address: jlea@bio.ufrpr.br (J.L.M.S. Ganter).

circular dichroism spectroscopy (CD), velocity sedimentation and viscometry observed the weak interaction between system composed of mixtures of sodium caseinate (NaC) or β -casein with guar gum molecules at low ionic strength, showed a phase separation for casein and guar gum systems at an ionic strength (I) > 0.09 – 0.2 . They found an excess of the viscosity of casein–guar mixtures in the single-phase region, as compared with the polysaccharide solutions. The CD spectra showed that the formation of a β -casein–guar gum complex causes the disruption of the small proportion of secondary structure of the protein. They suggested that the mechanism of casein–guar interaction and compatibility involves the creation of weak water-soluble electrostatic complexes, which may be destroyed on increase of ionic strength. These authors did not exclude the formation of protein–polysaccharide complexes in the single phase (low ionic strength) (Grinberg & Tolstoguzov, 1997).

Recently, the properties of micellar casein–galactomannan mixtures were also investigated by Bourriot et al. (1999a,b) by rheology, confocal laser scanning microscopy (CLSM) and phase diagram analysis, in order to understand the physicochemical interaction and characterize the phase behavior of the mixtures. Confocal laser scanning microscopy showed two coexistent phases in the system, containing mainly casein micelles whereas the other was enriched with guar gum, at concentrations of 2 g l^{-1} of guar and 30 g l^{-1} of casein. In contrast, in systems containing 2 g l^{-1} of guar and 3 g l^{-1} of casein, only one homogeneous phase was observed. Rheological measurements, showed a phase separation process in systems containing guar gum (0.3 g l^{-1}) and micellar casein (65 g l^{-1}) in the lower phase (protein-enriched) of mixtures of these biopolymers, in comparison with micellar casein suspension (65 g l^{-1}) and guar gum (0.3 and 2 g l^{-1})/casein (30 and 65 g l^{-1}) mixtures (Bourriot et al., 1999a). They suggested that the mixture tended to phase separation probably due to depletion–flocculation mechanisms. The casein micelles are actually spherical particles. Aggregation can be induced by the presence of a polymer, as first predicted by Asakura and Oasawa (1954, 1958) for the general case of hard spheres in the presence of macromolecules.

The addition of polysaccharides to milk can result in a phase separation into a polysaccharide-enriched phase, if the polysaccharide concentration exceeds a certain concentration (Grinberg & Tolstoguzov, 1997). Tuinier et al. (2000), in a study of mixtures of native and depolymerized guar gum with casein micelles, using a combination of size-exclusion chromatography and light scattering, observed that the polymer concentration at the phase boundary increased with decreasing guar chain length (it was important to achieve a high viscosity while maintaining a stable suspension). Phase separation in mixtures of polysaccharides and proteins is often due to a segregative interaction between these polymers, and a relative simple system containing only two biopolymers is favored to obtain a better understanding of biopolymer interactions.

Previous studies with the galactomannan from *Mimosa scabrella*, a leguminous Brazilian tree, were on its use as a substitute of starch in a pudding mixture that included milk in its formulation. An increase in viscosity of 100% was observed when the galactomannan (5 g l^{-1}) was used as a substitute for 10% of starch, when compared with the control (Lucyszyn, Reicher, & Ganter, 2000).

A mixture of the galactomannan with skim milk powder (SMP) in water, and aqueous NaCl and CaCl_2 was investigated by steady (viscosity curve and creep and recovery tests) and oscillatory rheological experiments. The results pointed to a synergistic effect, which was destroyed by salt addition at 0.01 and 0.1 mol l^{-1} concentrations, in agreement with previous results (Antonov et al., 1999). Only 0.01 mol l^{-1} CaCl_2 was favorable to interaction, probably due to its influence on casein micelles of the milk (Perissutti, Bresolin, & Ganter, 2000).

Assuming the interaction between galactomannan and milk proteins (Ambrose, 1935; Antonov et al., 1999; Bourriot et al., 1999a,b; Grindrod & Nickerson, 1968), and taking into account that the galactomannan from the seeds of *M. scabrella* is a highly branched polysaccharide with a Man/Gal ratio of $\approx 1.1:1$, the present study deals with elucidating the behavior of the polysaccharide and milk proteins mixtures, comparing it with mixtures containing commercial skim milk (SM), whole milk (WM), SMP, NaC and purified fractions of casein (α , β and κ), based in rheological studies (steady and oscillatory measurements).

2. Experimental

M. scabrella Bentham, locally known as bracinga, is a fast-growing native leguminous tree, widespread in Southern Brazil, whose seeds accumulate galactomannan as a storage carbohydrate. It can be isolated by aqueous extraction as a neutral product in 30% yield (Bresolin, Milas, Rinaudo, Reicher, & Ganter, 1999; Ganter, Corrêa, Reicher, Heyraud, & Rinaudo, 1991).

Seeds of *M. scabrella* were obtained from Instituto Ambiental do Paraná (IAP)—Brazil. Milled seeds dispersed in water were maintained at 100°C for 2 min in a microwave oven for enzymatic inactivation, and the galactomannan was obtained by aqueous extraction for 4 h at 25°C , under mechanical stirring. The solution was centrifuged at $20\,000g$ for 45 min at 20°C and the supernatant was treated with one volume of ethanol, and the resulting precipitated washed with a gradient of ethanol (70–100%) and dried under vacuum at 30°C .

Its protein content was determined by the methods of Hartree (1972) and Peterson (1977). Carbohydrate content was determined using the phenol–sulphuric acid method (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

The galactomannan was hydrolyzed with 1 mol l^{-1} trifluoroacetic acid (5 h, 100°C) (Adams, 1965), reduced with sodium borohydride (Wolfson & Thompson, 1963a)

and acetylated with pyridine/acetic anhydride (1:1, v/v) overnight at room temperature (Wolfrom & Thompson, 1963b). The resulting alditol acetates were analyzed by GLC using a 5890 SII HP Gas Chromatograph at 220 °C (FID and injector temperature, 250 °C) with a DB-225 capillary column (0.25 mm id × 30 m). The carrier gas was nitrogen.

¹³C NMR spectroscopy was performed to confirm the chemical structure and Man/Gal ratio of the galactomannan, using a Bruker AC-300 spectrometer at 75 MHz at 50 °C, in the Fourier-transform mode, with D₂O as solvent (5 mm diameter tube). The spectral width was 200 ppm. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) relative to the resonance of DDS (sodium-4,4-dimethyl-4-silopentane-1-sulfonate) as internal standard ($\delta = 0$).

The milk samples used were commercial SM and WM (Indústria e Cooperativa Batavo S.A., Curitiba-PR, Brazil), and the SMP Molico (Nestlé).

The total casein was obtained from SMP (100 g l⁻¹) by precipitation on acidification of the medium at pH 4.6 at room temperature, with stirring. As the casein was insoluble in aqueous solution, it was neutralized by NaOH addition until pH 7.0, with constant stirring, giving rise to NaC (completely soluble), which was freeze-dried and stored. The purified caseins (α , β and κ) utilized in examination of their interaction with the galactomannan, were obtained from Sigma.

The mixtures with proteins were prepared by dissolving the galactomannan (concentrations of 1–20 g l⁻¹), in water, SM, and WM. The SMP (25–200 g l⁻¹) and galactomannan (10–20 g l⁻¹) mixtures were also prepared by dissolving in water, (SMP at a concentration of 100 g l⁻¹ is similar qualitatively and quantitatively to skim milk UHT). All the mixtures were prepared using magnetic stirring, for 4 h at 25 °C. They were held 1 h before rheological determination, showing an homogeneous phase by visual analyses. Analyses were carried out in duplicate.

Rheological determinations were performed with a Haake Rheostress 75 rheometer, coupled with a DC5B3 heating circulator, K15 refrigerated bath, and a TC81 Peltier temperature control system in steady and oscillatory shear. The sensor systems utilized were DG41AL (coaxial) and C60/2° (cone plate) (diameter 60 mm and 2° cone angle). The cone-plate geometry has great advantages as the small cone angle (<4°), with negligible inertia of the fluids at lower rotational velocities, use of the small volumes of samples, and homogenous stress and strain (Mitchell, 1984).

For the viscosity measurements at steady shear, the shear rate of 10 s⁻¹ was chosen for convenient comparison of the samples. Prior to a frequency sweep (10⁻²–10 Hz), a stress sweep had been carried out to choose the linear conditions. Analyses in the oscillatory system (G' and G'') were performed using a strain of 7%, within linearity limits of viscoelastic behavior for all the samples, and the values of G' and G'' were compared at a frequency of 1 Hz (Table 2) for experimental convenience. Creep and recovery tests

were performed using a stress 0.02 Pa with a time interval of 600 s. Temperature dependent analyses were performed with the Peltier temperature control system, with a temperature ramp from 10 to 75 °C in 120 s, on the Peltier system plate, with a cupula (to avoid the evaporation of the samples), and the determination was carried out on cooling from 75 to 10 °C at 3 °C min⁻¹. In order to determine the precision of the method, the tests were carried out in replicate (three samples by day in three different days) and the standard deviation and coefficient of variation (CV), was calculated.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of galactomannan

The usual method to obtain the galactomannan from seeds of *M. scabrella* is aqueous extraction for 4 h at room temperature, followed by centrifugation and treatment of the supernatant with ethanol giving a precipitate which was dried under vacuum, 30 °C (Bresolin, Beltrami, Sander, Reicher, & Ganter, 1996). This method was improved using a microwave oven treatment (2 min) of seed dispersion in water, which gave rise to the enzymatic inactivation.

Viscometric analysis at steady state of galactomannan solutions showed the same behavior as that obtained from the polymer isolated using the previous method of enzymatic inactivation (10 min on boiling water) (Ganter, Cardoso, Kaminski, & Reicher, 1997). The polysaccharide was analyzed by ¹³C NMR spectroscopy, and its spectrum was typical for a seed galactomannan, confirming its monosaccharide ratio being calculated from the C-1 signal areas of the expected α -D-galactopyranose (99.26 ppm) and β -D-mannopyranose (101.05 ppm) units with a Man/Gal ratio of \approx 1.1:1. This ratio was also confirmed by GLC (Ganter, Milas, Corrêa, Reicher, & Rinaudo, 1992). Its protein contents were 5.2 and 2.6% w/w, according to the Hartree (1972) and Peterson (1977) methods, respectively. Bresolin et al. (1999) found \approx 4.0% using the Bradford method described by Kresze (1983).

3.2. Viscosity curves

The behavior of galactomannan and milk mixtures was analyzed by viscometric methods in steady shear. Skim milk was selected to minimize the lipid contribution to the viscosity. The viscosity curves of the galactomannan (G) and SM mixtures were determined using galactomannan concentrations of 1–20 g l⁻¹ (Fig. 1). The results shown a Newtonian plateau for mixtures with galactomannan, only at concentrations below 3 g l⁻¹, the others showing a pseudoplastic behavior. In comparison, an aqueous galactomannan solution showed a Newtonian plateau up to 3.6 g l⁻¹ (Ganter et al., 1992) with same range of shear

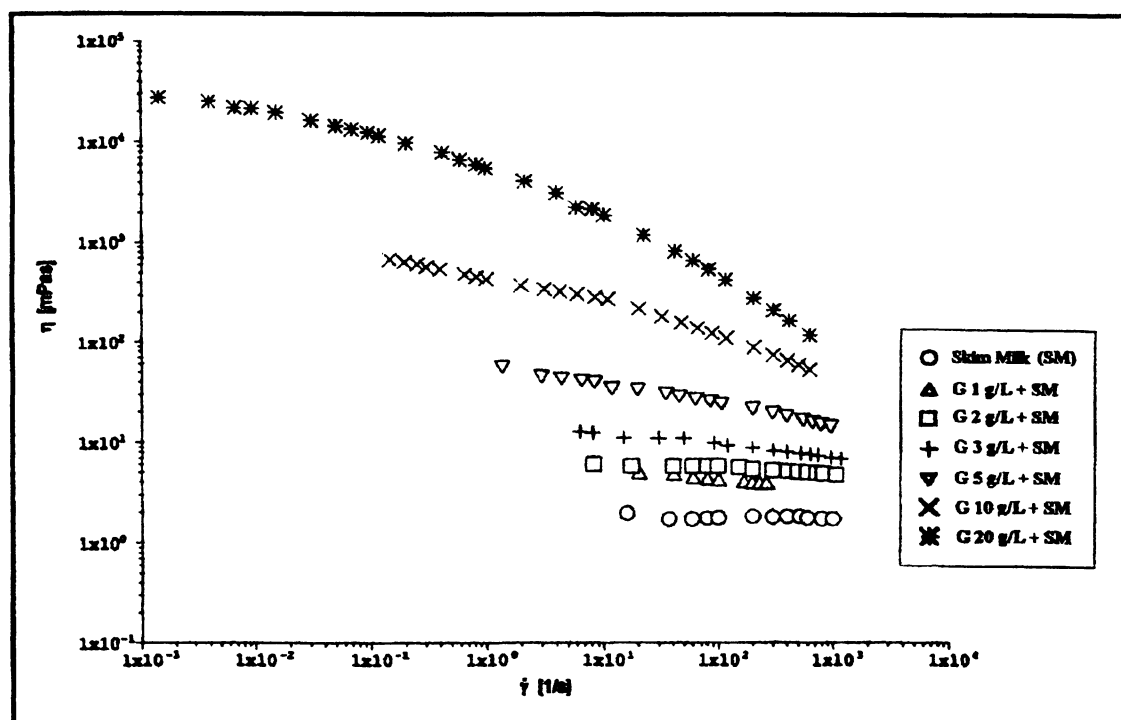


Fig. 1. Viscosity (η) as a function of shear rate ($\dot{\gamma}$) for galactomannan and skim milk (G/SM) mixtures. Concentrations range of galactomannan: 1–20 g l⁻¹.

rate. Addition of casein yields thus changes in the behavior of polysaccharide.

For mixtures with whole milk (G/WM), a shear-thinning behavior was obtained at a lower galactomannan concentration of 2 g l⁻¹ (Fig. 2). Moreover, the viscosities of the mixtures G/SM at galactomannan concentrations of 10 and 20 g l⁻¹ and for a shear rate 10 s⁻¹ are 300 and 2000 mPa s, respectively. These values can be compared with 500 and 2000 mPa s obtained for the G/WM system, respectively. In comparison, at the same aqueous concentrations of galactomannan lead to 100 and 1000 mPa s. This increase in viscosity cannot result from the additive contribution of milk samples, which is negligible (2 mPa s), when compared with that of the galactomannan. The change in the viscometric behavior and the increase of viscosity pointed for both mixtures (G/SM and G/WM) when compared with the galactomannan alone, suggests a synergy between galactomannan and the milk components. Carlson, Ziegenfuss, and Overton (1962) have also observed an increase in viscosity of a guar gum/SM mixture, without phase separation. Comparing the G/SM and G/WM systems, the higher viscosity values of G/WM can be attributed to the presence of lipid in WM. Xu, Stanley, Goff, Davidson, and Maguer (1992) observed that addition of lipid into a carrageenan-SMP system increased the gel strength, suggesting beyond a fill function of lipids, also the contribution to physical gel properties.

The G/SMP mixtures at 10 and 20 g l⁻¹ concentrations of galactomannan and 25, 50, 100, 150, and 200 g l⁻¹ of SMP

were analyzed (Fig. 3). The results showed a pseudoplastic behavior, and a viscosity increase accompanying an increase of the SMP concentration (Fig. 3 and Table 1). It can be observed that the G/SMP (10:100 g l⁻¹) mixtures showed, at the same galactomannan concentration, a higher synergistic effect than the G/SM mixture, with values of 700 and 300 mPa s (Fig. 3a), respectively, although a 100 g l⁻¹ SMP concentration is considered to be similar qualitatively and quantitatively to the skim milk UHT.

The influence of solid matter on rheological properties of commercial milk was analyzed by Fernández-Martín (1972), who proposed a quadratic equation to relate viscosity and solid content. In the G/SMP systems, a viscosity increment of 10-fold occurred when the galactomannan concentration increased from 10 to 20 g l⁻¹, at SMP concentrations of 25 and 50 g l⁻¹ (Table 1). When SMP concentrations increases to higher than 50 g l⁻¹ the viscosity increased in a proportional way, showing only the contribution of supplementary molecules, without any interaction effects.

3.3. Oscillatory experiments

The protein-polysaccharide mixtures were analyzed by oscillatory experiments to obtain further information on their rheological ground state, especially at higher SMP concentrations, which did not show any significant differences on viscosity analysis. A strain sweep had been carried out to choose the linear viscoelastic conditions, using

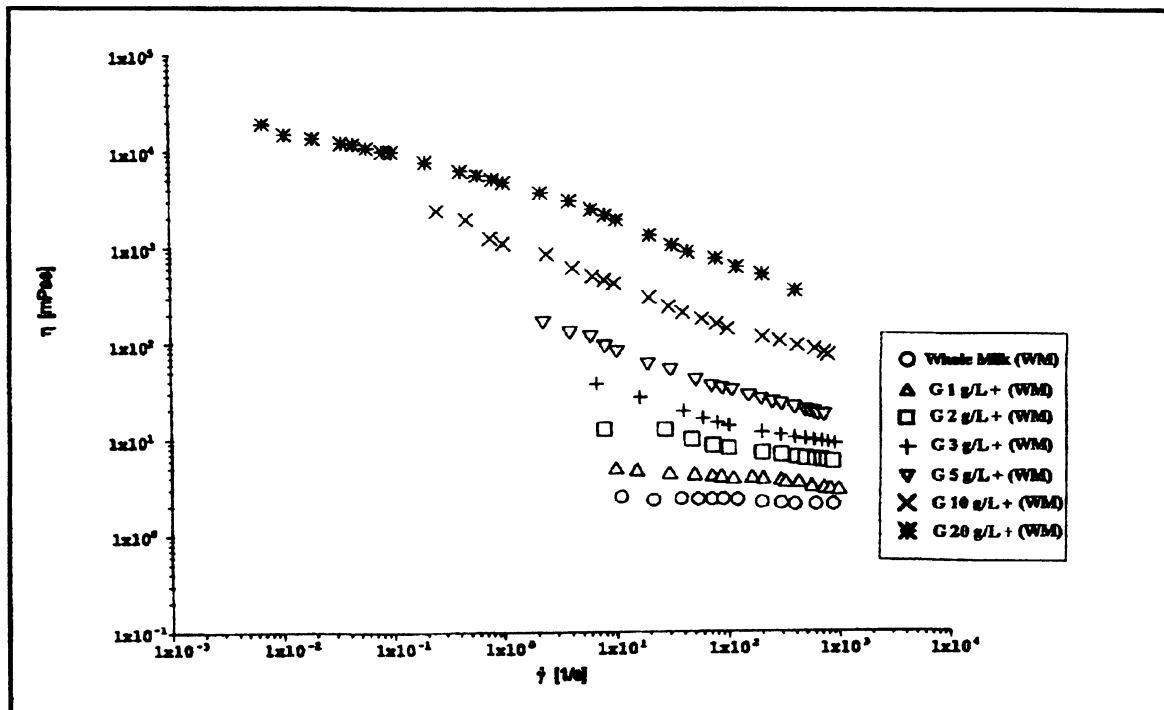


Fig. 2. Viscosity (η) as a function of shear rate ($\dot{\gamma}$) for galactomannan and whole milk (G/WM) mixtures. Concentrations range of galactomannan: 1–20 g l⁻¹.

frequency values of 0.01–10 Hz. The oscillatory experiments were then performed at 7% strain within the linear viscoelastic region of the sample.

Frequency sweeps on G/SM, G/WM and G/SMP mixtures at 10 and 20 g l⁻¹ galactomannan concentrations were performed at a frequency range of 10⁻²–10 Hz. For the G/SM and G/WM mixtures, with 10 g l⁻¹ of galactomannan, the loss modulus (G'') values were higher than the storage moduli (G') at all the tested frequency ranges, as a viscous solution (Fig. 4a and b). The G' and G'' values increase in a parallel fashion. However, with G/SM and G/WM at 20 g l⁻¹ of galactomannan, a variation and crossover of G' and G'' values were observed at the highest frequencies (Fig. 4a and b). The crossover frequency provides a good indication of viscoelastic behavior of a

material. The lower the crossover value, the greater is the elastic contribution (Ramachandran, Shirlynn, & Etzler, 1999). All the mixtures with a galactomannan concentration of 20 g l⁻¹ showed an increase of G' and loss G'' modulus in comparison with the mixtures with a 10 g l⁻¹ concentration, the lower crossover frequency for the G/WM mixtures showing a more-viscoelastic behavior. The G' value and the corresponding crossover frequency for G/SM and G/WM at 20 g l⁻¹ of galactomannan was 30 Pa/7 Hz and 50 Pa/5 Hz, respectively (Fig. 4a and b). In comparison with an aqueous solution of galactomannan under similar conditions, a typical macromolecular solution was observed (Fig. 5). In the case of casein alone, it is known that the system is closer to a suspension than a solution. However, the galactomannan of *M. scabrella* and skim or whole milk

Table 1

Viscosity values (η) of galactomannan from *Mimosa scabrella* and skim milk powder (G/SMP) systems (The isolated galactomannan has η of 100 and 1000 mPa s, for 10 and 20 g l⁻¹ concentrations, respectively.)

SMP (g l ⁻¹)	η (mPa s) ^a for isolated SMP	η (mPa s) ^a for G (20 g l ⁻¹)/SMP	η (mPa s) ^a for G (10 g l ⁻¹)/SMP	η^b/η^c
25	1.5	1500	150	10
50	1.5	2000	200	10
100	2.0	2500	700	3.6
150	3.0	1500	800	1.9
200	4.0	1500	900	1.7

^a At 10 s⁻¹.

^b Corresponds to viscosity of G (20 g l⁻¹)/SMP.

^c Corresponds to viscosity of G (10 g l⁻¹)/SMP.

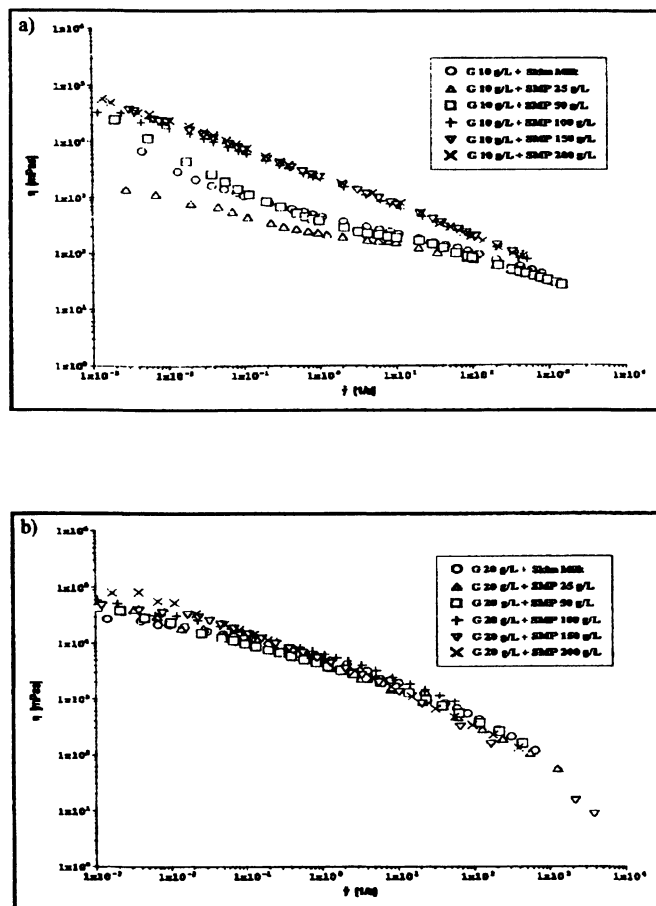


Fig. 3. Viscosity as a function of shear rate ($\dot{\gamma}$) for galactomannan and skim milk powder (G/SMP) mixtures. Concentrations range of SMP: 25–200 g l^{-1} . (a) Galactomannan 10 g l^{-1} , (b) galactomannan 20 g l^{-1} .

mixtures exhibited quite different viscoelastic properties, suggesting a formation of a weak association structure between the galactomannan solution and milk protein. The G/SMP mixtures in the milk concentration of 100 g l^{-1} (similar concentration to the SM) showed a viscoelastic profile, suggesting a better synergy between the macromolecules in the reconstituted system (Fig. 6). The viscoelastic moduli (G' and G'') were much less dependent upon the frequency and they were much higher than with galactomannan alone. The G' value and the corresponding cross-over frequency of the mixture (G/SMP) at a concentration 20 g l^{-1} of galactomannan was 35 Pa, at a frequency of 2 Hz.

Bourriot et al. (1999b) commented that the rheological data showed a transition from the behavior of a macromolecular solution to a slightly structured system when casein was added to galactomannan solutions, of guar or locust bean gum, having a more structured system at high polysaccharide concentrations. The authors concluded, according to microscopic observations, that the behavior of guar/casein mixtures is related to phase separation phenomena.

3.4. Creep and recovery tests

Creep and recovery tests were carried out using a constant and lower amplitude stress (0.02 Pa) and the observation of the corresponding strain in relation to time in the creep phase. In the recovery phase, the stress was completely removed, and the response of the sample may be available, which permits access to lower shear rates and study of the rheological behavior for various systems, in a practically non-perturbed state. The creep and recovery measurements, through the creep compliance (J) as a function of time, discriminated between the elastic and viscous response.

In the viscoelastic materials, recovery of the applied stress is partial, controlled by the more elastic or viscous character of the sample, situated in an intermediary position between the solid and liquid. The higher the recovery phase, higher is the viscoelastic character of the sample.

This technique enables the viscoelastic behavior of the samples to be analyzed with great sensitivity, without significant perturbation of the intramolecular structure of the sample.

The creep and recovery tests for the G/SM mixtures, with

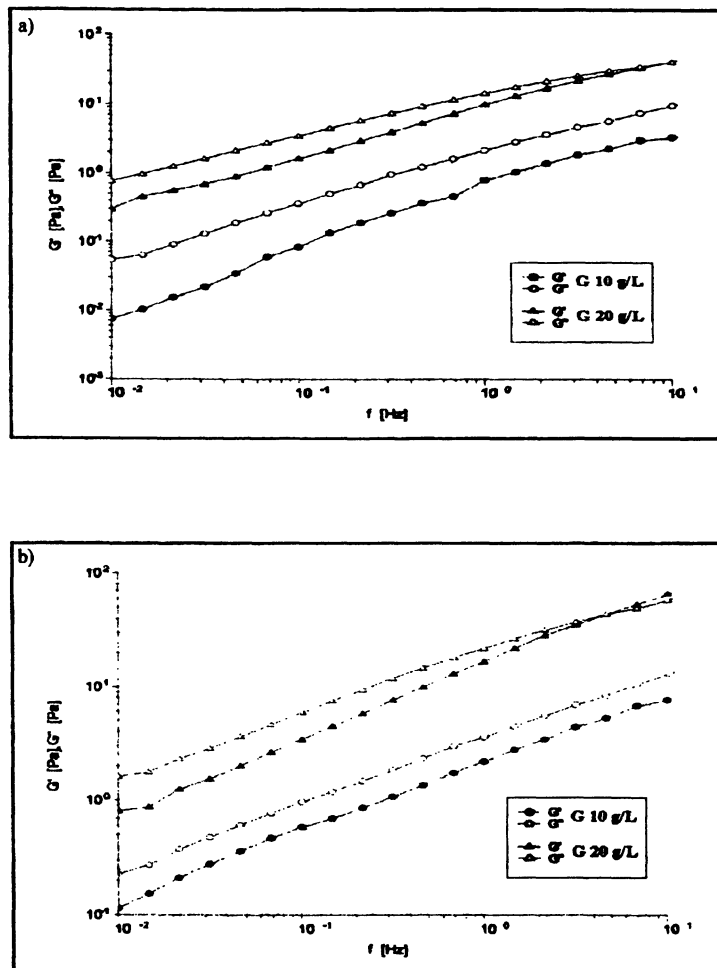


Fig. 4. Frequency sweep of galactomannan from *Mimosa scabrella* (10 and 20 g l⁻¹) in systems containing milk. (a) Galactomannan with skim milk (G/SM), and (b) galactomannan with whole milk (G/WM). G' : elastic modulus, G'' : viscous modulus, 7% strain amplitude.

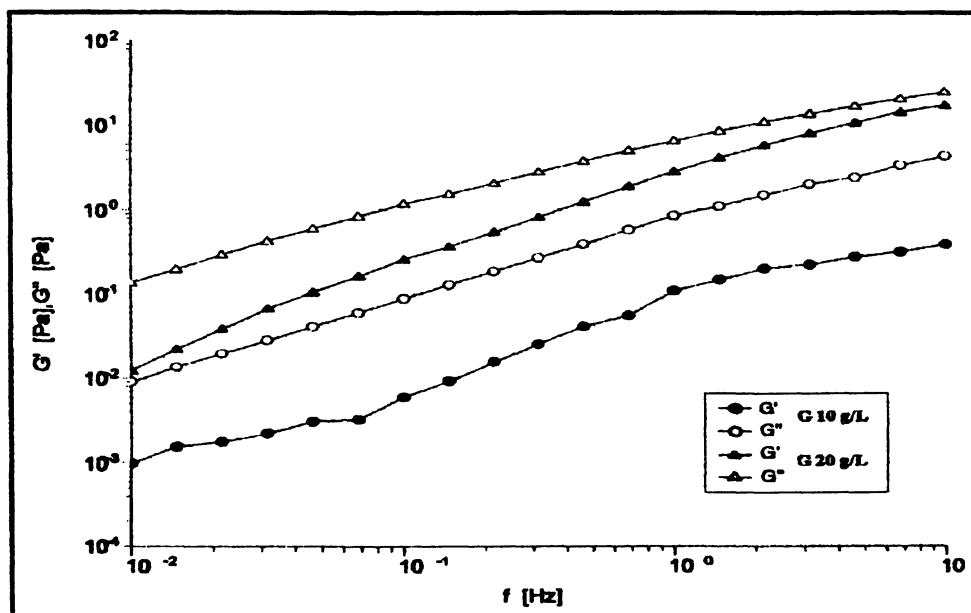


Fig. 5. Frequency sweep of galactomannan (10 and 20 g l⁻¹) in aqueous solution. G' : elastic modulus, G'' : viscous modulus, 7% strain amplitude.

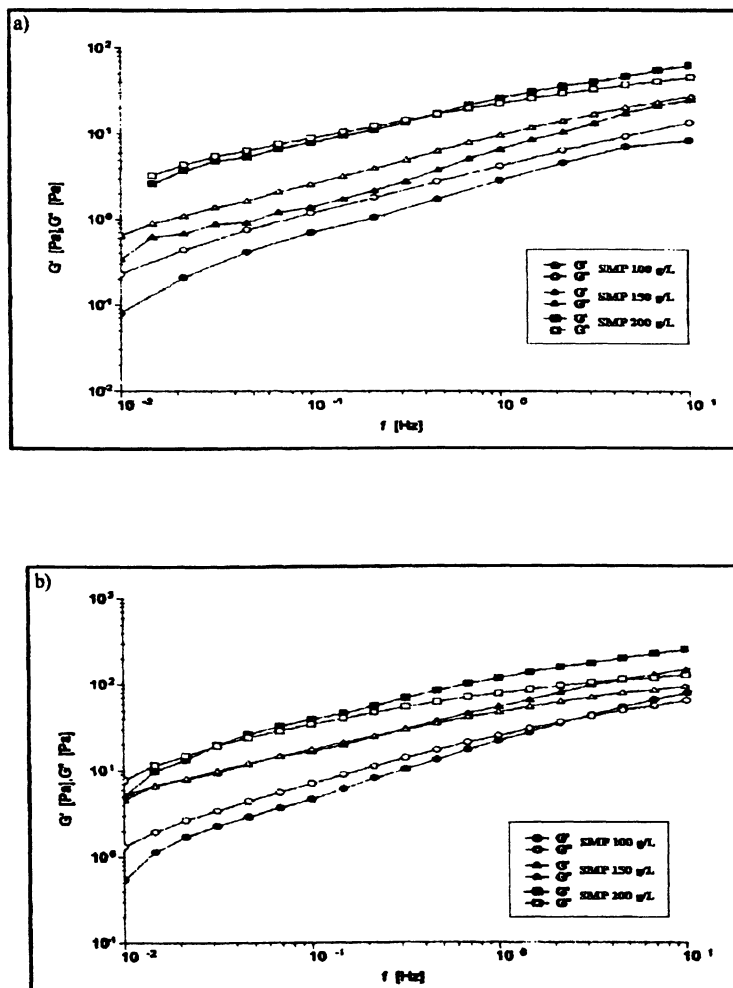


Fig. 6. Frequency sweep of galactomannan and skim milk powder mixtures (G/SMP) at different concentrations (SMP 100, 150, and 200 g l⁻¹) mixtures. (a) Galactomannan 10 g l⁻¹, (b) galactomannan 20 g l⁻¹. G' : elastic modulus, G'' : viscous modulus, 7% strain amplitude.

galactomannan concentrations of 10 and 20 g l⁻¹ were performed at an interval time of 600 s. By analysis of the creep compliance (J), a decrease in the J parameter of the mixtures with increase of the galactomannan concentration was observed. J values for G/SM of 124 and 10 Pa⁻¹, were found respectively, for 10 and 20 g l⁻¹ concentrations of galactomannan, in comparison to galactomannan in aqueous solution for which was obtained 320 and 110 Pa⁻¹ at the same concentrations, showing a viscoelastic liquid response for the mixtures (Fig. 7a). The J parameter can be also observed in detail at Fig. 7b for G/SM at a 20 g l⁻¹ galactomannan concentration.

G/WM mixtures showed a higher viscoelastic behavior than G/SM for both of concentrations of galactomannan, with lower values of J (33 and 1 Pa⁻¹, respectively) (Fig. 8a). The J parameter values of G/WM at a 20 g l⁻¹ of galactomannan concentration can be observed in more detail in Fig. 8b. The higher inclination of the curve for G/WM mixtures when compared to G/SM is also indicative of a more viscoelastic response (Figs. 7 and 8). For all cases,

the mixtures containing galactomannan at 20 g l⁻¹ concentration showed a more viscoelastic behavior, due to lower values of the creep compliance parameter (Figs. 7 and 8).

For the system G/SMP, 10 g l⁻¹ concentration of galactomannan and SMP at 100, 150, and 200 g l⁻¹ concentrations, a significant decrease of the creep compliance parameter of the samples with the increase of SMP concentration can be observed, with J values of 16, 11, and 1 Pa⁻¹, respectively (Fig. 9a). The G/SMP system at a 20 g l⁻¹ concentration shows the same profile, with J values of 6.8, 1, and 0.4 Pa⁻¹, for concentrations of SMP of 100, 150, and 200 g l⁻¹, respectively (Fig. 9b). The mixtures with concentrations of 20 g l⁻¹ galactomannan and 200 g l⁻¹ SMP showed a more viscoelastic behavior, due to the low values of the J parameter in comparison with the other SMP concentrations. The values of the J parameter of the G/SMP systems are lower than those of the G/SM mixtures.

According to the rheological measurements in the steady shear as well as in oscillatory shear, it appears that mixing milk (SM, WM and SMP) and the galactomannan leads to

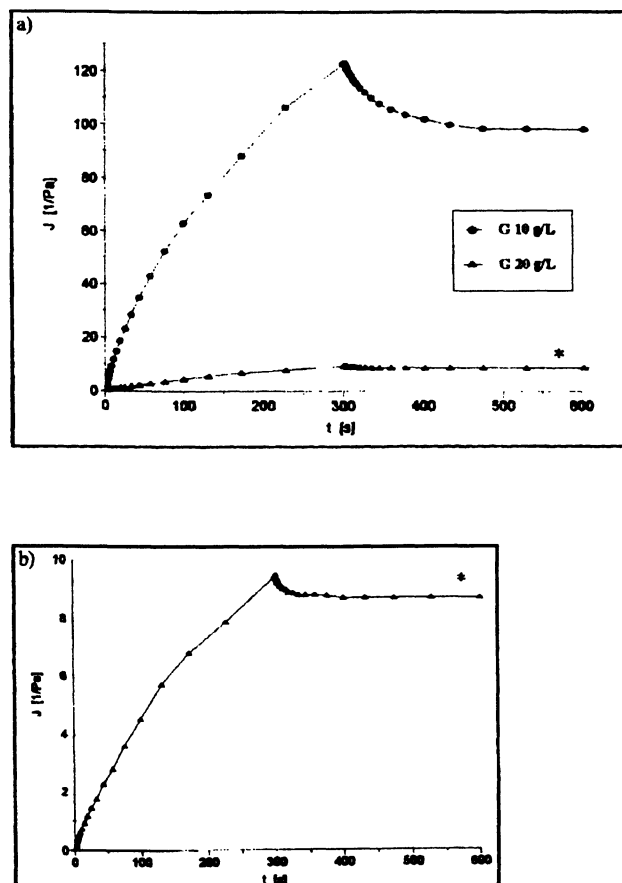


Fig. 7. (a) Creep and recovery tests of mixtures of galactomannan (10 and 20 g l⁻¹)-skim milk (G/SM), (b) (*) Zoom of the mixture at 20 g l⁻¹ concentration. *J*: creep compliance parameter.

the formation of structure within the system, the higher the biopolymer concentration, the more structured the mixtures, even with a galactomannan as highly substituted as that of *M. scabrella*.

It can be noted that during the analysis period in all of the experiments, visual analyses showed an homogeneous phase for the mixtures, even at the higher concentrations. However, after 2 h, a phase separation effect was observed in some samples as galactomannan 10 g l⁻¹-SM at temperature of 25 and 75 °C. The mixtures containing galactomannan (10 and 20 g l⁻¹)-SM at temperature of 75 °C and cooled at 25 °C showed a phase separation after 30 min. So the synergic effect observed in viscosity, oscillatory and creep and recovery analyses may occur through aggregation of casein micelles by depletion–flocculation mechanisms as first predicted by Asakura and Oasawa (1954, 1958) for the general behavior of hard spheres in the presence of macromolecules, also observed by Bourriot et al. (1999a,b).

Bourriot et al. (1999a,b) analyzed the rheological properties of micellar casein–galactomannan of guar gum (Man/Gal 1.8 and $[\eta] = 1290 \text{ ml g}^{-1}$) and locust bean gum (Man/Gal 3.5 and $[\eta] = 740 \text{ ml g}^{-1}$) in the monophasic domain, as well as in the biphasic one, and interpreted the results in

terms of an interaction involving a depletion–flocculation mechanism. The floccules between galactomannan and micellar casein should form a continuous phase of the system, increasing the viscosity of the medium. The network can be easily broken under shear because the interactions between the flocs are non-covalent.

As the galactomannan of *M. scabrella* has a Man/Gal 1.1 and $[\eta] = 720 \text{ ml g}^{-1}$, its behavior in the mixture is probably similar to that of galactomannans analyzed by Bourriot and co-workers. They ascribed the modifications of individual components (galactomannan and casein) casein flocculation induced by the presence of the galactomannan polymer.

3.5. Effect of temperature cycles on protein–polysaccharide interaction

In order to understand the properties of the galactomannan–milk proteins, the systems were heated from 10 to 75 °C (120 s) on the Peltier system plate, followed by cooling. Analyses were performed at 25 °C before heating and from 75 to 10 °C with cooling of 3 °C min⁻¹. One can

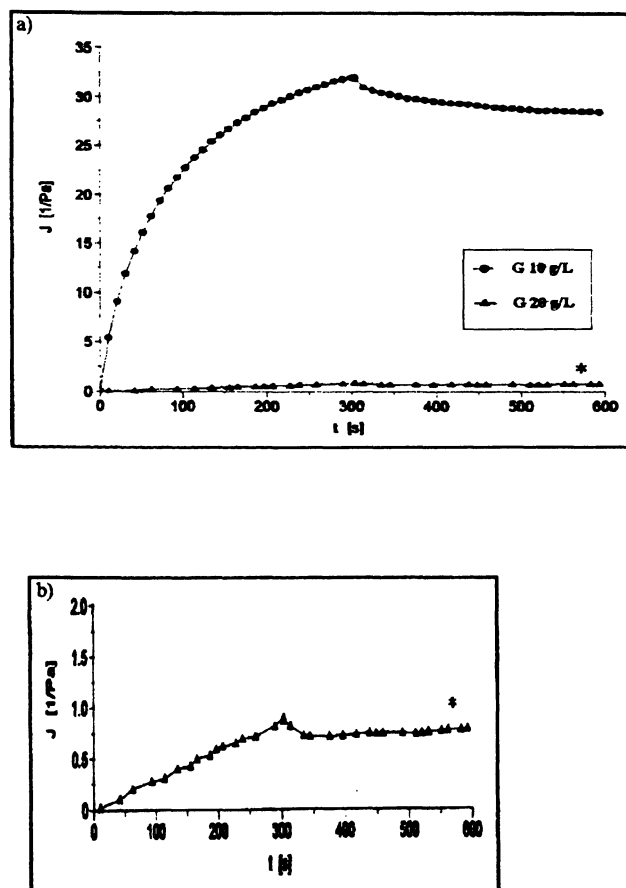


Fig. 8. (a) Creep and recovery tests of mixtures of galactomannan (10 and 20 g l⁻¹)-whole milk (G/WM), (b) (*) Zoom of the mixture at 20 g l⁻¹ concentration. J : creep compliance parameter.

observe (Fig. 10) a maximum of G' and G'' values at ≈ 65 °C.

The cooling process to 10 °C of the systems gave rise to a decrease in G' . However, it was found that at 25 °C, after heating the system, that the G' values were higher than those at 25 °C without heating, showing a more elastic system after heating, probably due to reorganization of the association after cooling. In order to confirm this behavior, the G (10 g l⁻¹)/SM mixture was submitted to frequency sweeps at 25 °C before and after heating and at 65 °C (Fig. 11). The systems show a transition from concentrate solution at 25 °C without heating (G'' higher than G' in lower frequencies with a crossover at higher frequencies) to a more elastic structure at 25 °C after heating (G' higher than G'' independently of frequencies). At 65 °C there is a solid-like structure, similar to 25 °C after heating (though the absolute values of G' and G'' are higher at 65 °C). The values of G' and G'' were compared at a frequency of 1 Hz, and shown in Table 2. It is evident that at ≈ 65 °C the system shows a more pronounced gel-like behavior ($G'/G'' = 2.8$), as shown in Figs. 10 and 11. At 25 °C, after heating at 75 °C, there is a more pronounced effect of viscoelastic material, as a weak gel ($G'/G'' = 2.7$), in comparison with the system

before heating ($G'/G'' = 0.4$). This is significant, since it shows that temperature variation can induce a better synergic effect in these systems, when the formulations are submitted to temperature cycles, especially in food products, thus improving industrial applications. Processing of materials in the food industry may cause modifications in their properties. In our case, the heating conducted to a more viscoelastic behavior.

Lucyszyn et al. (2000), studying a formulation of pudding using water or milk and galactomannan of *M. scabrella* as substitute of starch, observed an increase of viscosity for the pudding mixture with increase of temperature from 50 to 90 °C. In the formulation containing water instead of milk, a small increase of viscosity was observed as 7 and 21% when galactomannan (2.5 and 5 g l⁻¹, respectively) was used as a substitute for 5 and 10% of starch, in comparison to the commercial product. However, formulations containing milk had a higher viscosity with the increase of galactomannan content as 11, 22, 35, and 100% when the galactomannan (0.5, 1.3, 2.5, and 5 g l⁻¹, respectively) was used as substitute for 1, 2.5, 5, and 10% of starch, respectively.

The latter data showed that the depletion–flocculation mechanism in the G (10 g l⁻¹)/SM may be responsible for

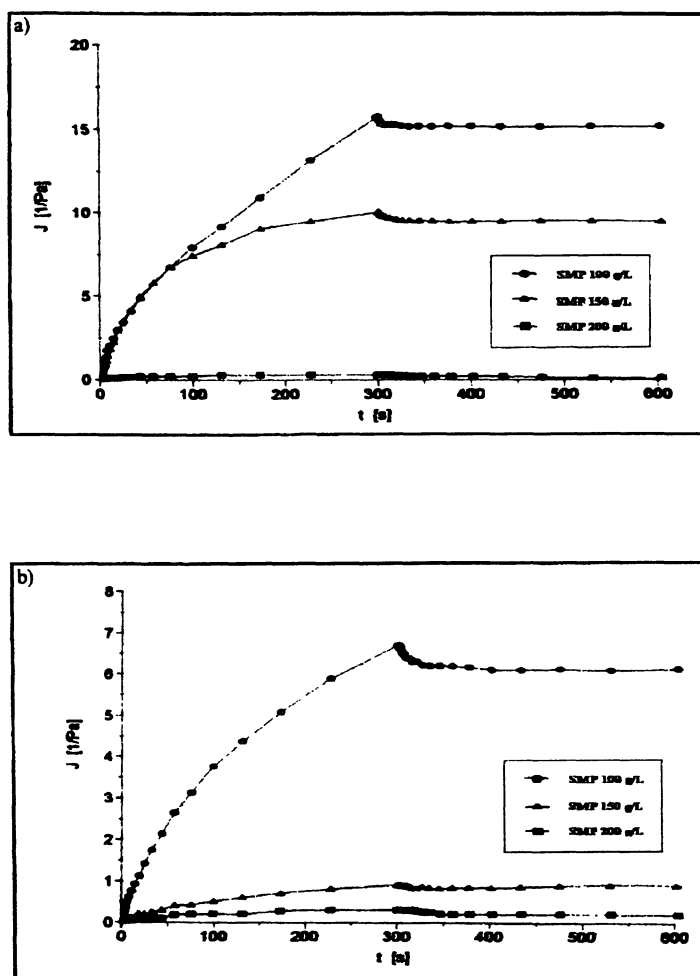


Fig. 9. Creep and recovery tests of mixtures of galactomannan–skim milk powder (G/SMP) at different concentrations (SMP 100, 150, and 200 g l⁻¹). (a) Galactomannan 10 g l⁻¹, (b) galactomannan 20 g l⁻¹. J : creep compliance parameter.

the G' maximum at 65 °C, when phase separation takes place, as well as the denaturation of whey protein during the heating of the system.

3.6. Interaction between galactomannan and sodium caseinate and purified caseins

In the light of the rheological measurements, and the

Table 2
Dynamic viscoelastic parameters obtained from the galactomannan (10 g l⁻¹) from *Mimosa scabrella* and skim milk system (G10/SM) at 1 Hz and different temperatures

Temperature (°C)	G' (Pa), CV (%) ^a	G'' (Pa), CV (%) ^a	G'/G''
25 (before heating)	0.98, 18.3	2.32, 9.4	0.4
75	11,725, 3.0	5395, 10.9	2.2
65	19,780, 11.6	7069, 13.5	2.8
25 (after heating)	237, 6.9	87, 4.8	2.7

^a The results were obtained from duplicates. G' —elastic modulus; G'' —viscous modulus; CV—coefficient of variation.

possible existence of other mechanisms involved in the G'/SMP synergic effect, the interaction of galactomannan and fractions of milk was studied. SMP was fractionated into whey protein and casein by acidification of the medium to pH 4.6 and centrifugation.

The rheological studies in the static and dynamic systems showed that the whey protein fraction (α -lactalbumin and β -lactoglobulin) has no interaction with the galactomannan of *M. scabrella* shown by an absence of variation in the viscosity values, elastic (G') and viscous (G'') shear moduli, as well as the creep compliance parameter (J) (data not shown). Since the interaction observed in the galactomannan–milk system was not due to the whey protein fraction, only the casein fraction was analyzed.

As the casein fraction is insoluble, this fraction was neutralized with aqueous NaOH giving NaC, which is totally soluble. The mixtures were prepared using 10 and 20 g l⁻¹ galactomannan concentrations and 10, 30, 50, and 100 g l⁻¹ of NaC. The steady shear experiments of G (10 g l⁻¹)/NaC gave rise to an increase of viscosity with

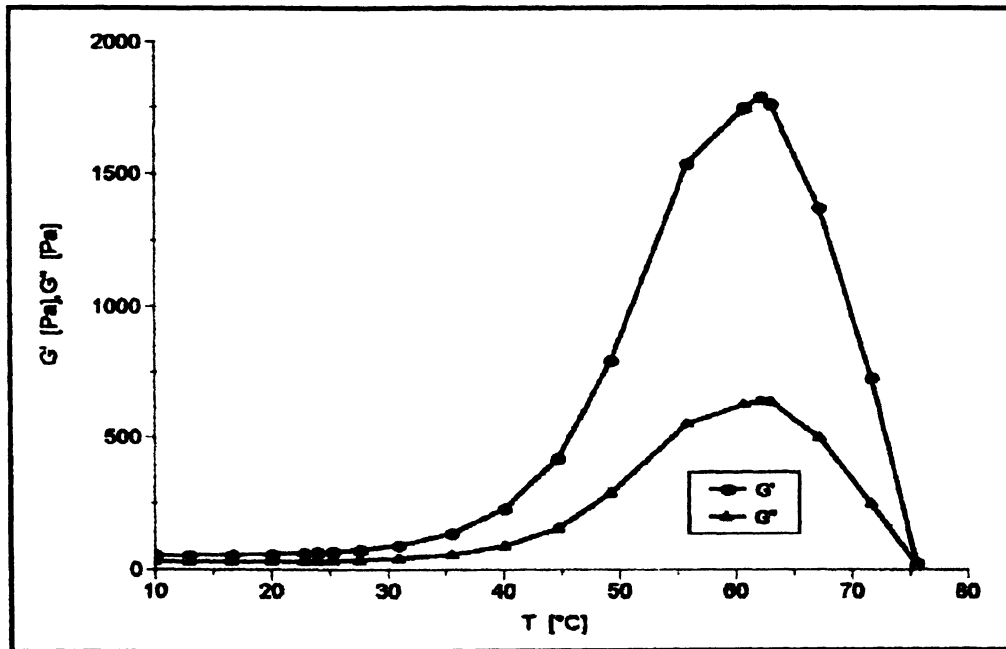


Fig. 10. Dynamic viscoelastic measurements during cooling ($3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) of the mixture of galactomannan from *Mimosa scabrella* (10 g l^{-1}) and skim milk (G/SM) system. G' : elastic modulus, G'' : viscous modulus, 7% strain amplitude.

the increase of NaC at lower shear rate values (10^{-3} – 10^0 s^{-1}), suggesting a probable interaction between these systems.

Oscillatory experiments were performed using 50 and 100 g l^{-1} concentrations of NaC, and they showed a viscous behavior, and an increase of viscoelasticity accompanying increase in galactomannan and NaC concentrations. The creep and recovery tests confirmed the results of the

viscosity curves and frequency sweeps, with a decrease of J parameter, with increase of biopolymer concentrations, indicating a more viscoelastic solution in comparison with the galactomannan in aqueous solution, with J values of 60 and 54 Pa^{-1} for the G (10 and 20 g l^{-1})/NaC(50 g l^{-1}) mixtures, respectively, and 52 and 36 Pa^{-1} for the G (10 and 20 g l^{-1})/NaC(100 g l^{-1}) mixtures, respectively.

In order to investigate which subunits of casein have the

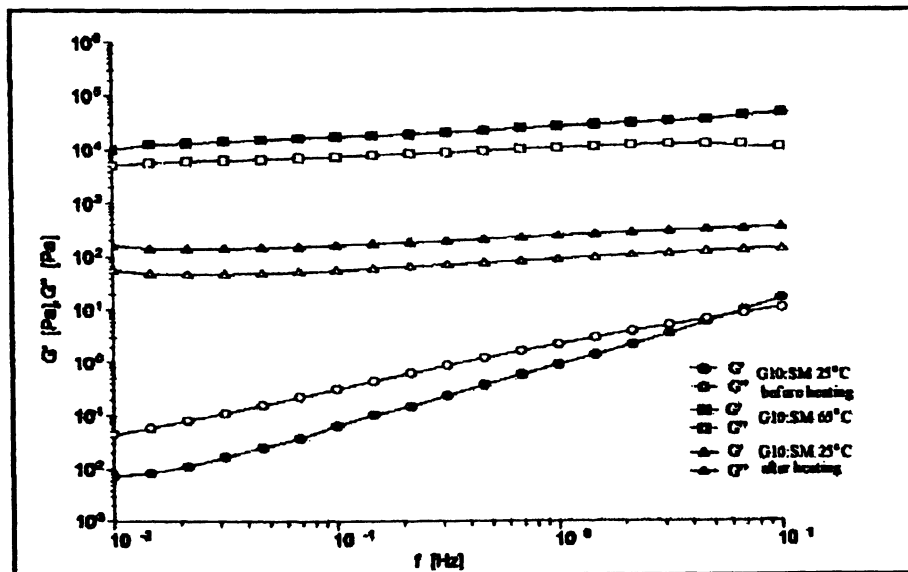


Fig. 11. Frequency sweep of the samples during cooling ($3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) of galactomannan (10 g l^{-1}) and skim milk (G/SM) at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ before and after heating, and at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. G' : elastic modulus, G'' : viscous modulus, 7% strain amplitude.

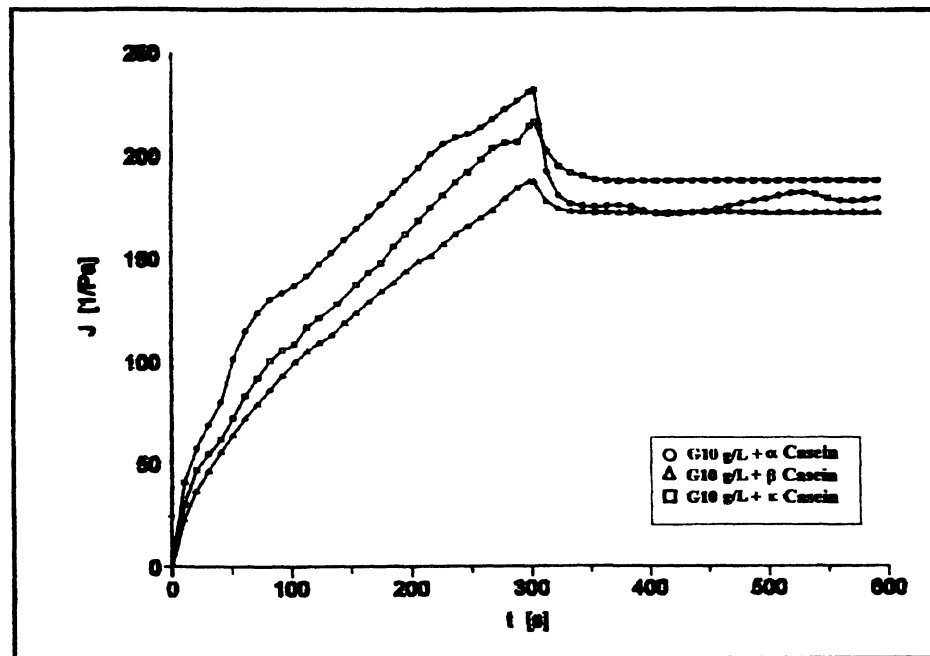


Fig. 12. Creep and recovery tests of galactomannan (10 g l^{-1})-purified caseins fractions (α , β and κ) (5 g l^{-1}) mixtures. J : creep compliance parameter.

better association with the galactomannan, an analysis with galactomannan G (10 g l^{-1}) and purified casein subunits (α , β and κ) (5 g l^{-1}) was carried out. The viscosity curves in steady shear and frequency sweep it a significant change in the profiles was not observed when compared with those obtained with galactomannan in aqueous solution (data not shown). However, the creep and recovery tests (Fig. 12), showed a decrease of the J parameter of the mixtures with values 230, 216, and 190 Pa^{-1} for the galactomannan and α , κ and β -casein fractions mixtures, respectively, indicating a more viscoelastic response for galactomannan with β -casein in comparison with galactomannan in aqueous solution alone ($J = 320 \text{ Pa}^{-1}$). These results suggest an effective synergy with the *M. scabrella* galactomannan and the β -casein fraction despite its high Man/Gal ratio (1.1:1).

Langendorff et al. (1999, 2000), studying the mixtures carrageenan/milk by rheological measurements and phase diagrams, utilizing guar gum as an experimental control, observed that guar gum at 0.05 g l^{-1} had no effect on the casein micelle size, and with or without guar, the micelle size increased slightly with temperature decrease, confirming that guar does not absorb to the casein micelles. Probably the absence of the effects observed by Langendorff et al. (1999, 2000) is due to the guar concentration used in their systems.

Previous results (Perissutti et al., 2000) obtained with G/SMP in salt systems (NaCl and CaCl_2 0.01 and 0.1 mol l^{-1}) from rheological measurements in steady shear (viscosity curves and creep and recovery tests) and frequency sweep, under the same conditions as presently

used, pointed a synergy between galactomannan and SMP, in which electrostatic forces may be involved, in agreement with Antonov et al. (1999). However, the present results can also suggest that other forces such as hydrophobic interactions, have a role in the system, although the phase separation phenomenon could not be excluded.

4. Conclusion

Analysis of the rheological properties in the static system, using viscosity curves, showed that galactomannan–skim milk (G/SM) or galactomannan–whole milk (G/WM) mixtures have a pseudoplastic behavior at lower galactomannan concentrations, in comparison with the galactomannan in aqueous solutions under similar conditions. Oscillatory system and the creep and recovery tests confirm the results observed for the viscosity curves, with viscoelastic liquid behavior, and a more viscoelastic response on increase of galactomannan concentration. These results showed a synergistic effect for galactomannan from *M. scabrella* and milk protein systems, greater for the reconstituted system of galactomannan–skim milk powder (G/SMP), allowed by G/WM and G/SM. A maximum interaction was found at a temperature close to 65°C with $G'/G'' = 2.8$, although a more viscoelastic solution was obtained after heating. Bresolin et al. (1999) reported the influence of the protein content of the galactomannan from *M. scabrella* on their interactions with xanthan. This influence was attributed to an increase of solution ionic strength due to the presence of proteins, and there can also be a

contribution of the synergy of the galactomannan–milk protein system, now described.

The galactomannan–sodium caseinate (G/NaC) mixture presented a synergic effect with increasing NaC concentration, as shown by the rheological properties in static and dynamic measurements in comparison with those of galactomannan in aqueous solution and mixtures with whey proteins, which did not show the same effect.

These results point to a specific synergic effect with the casein components. The interactions were confirmed by the study of mixtures of galactomannan and purified caseins (α , β and κ). An interaction by creep and recovery test, with a decrease of the J parameter and a more viscoelastic profile for these systems in the order β , κ and α -casein, was observed.

The mechanism of interaction of galactomannan and casein fractions may involve electrostatic, phase separation, and/or hydrophobic interactions. Additional studies are being carried out to confirm this proposition.

Acknowledgements

The authors thank Dr Michel Milas from CERMAV (Centre des Recherches sur les Macromolécules Végétales)—Grenoble/France, for helpful discussions, the Instituto Ambiental do Paraná (IAP)—Brazil for providing the seeds, and CAPES, CNPq and PRONEX-CARBOHYDRATES for financial support.

References

- Adams, G. A. (1965). Acid hydrolysis of weak linkages. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1, 21–31.
- Ambrose, A. S. (1935). Extracting casein from milk. *Chemical Abstracts*, 29, 2255.
- Antonov, Y. A., Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. B. (1979a). Thermodynamic aspects of the compatibility of proteins and polysaccharides in aqueous media. Part I. Theoretical concepts of the decomposition of water–protein–polysaccharide systems into liquid phases. *Die Nahrung*, 23, 207–214 in Russian.
- Antonov, Y. A., Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. B. (1979b). Thermodynamic aspects of the compatibility of proteins with polysaccharides in aqueous media. Part II. Phenomenology of the thermodynamic incompatibility of proteins with polysaccharides in aqueous media. *Die Nahrung*, 23, 597–610 in Russian.
- Antonov, Y. A., Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. B. (1979c). Thermodynamic aspects of the compatibility of proteins with polysaccharides in aqueous media. Part III. Influence of the physical–chemical factors in the thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides. *Die Nahrung*, 23, 847 in Russian.
- Antonov, Y. A., Lefebvre, J., & Doublier, J. L. (1999). On the one-phase state of aqueous protein–uncharged polymer systems: casein–guar gum system. *Journal of Applied Polymer Science*, 71, 471–482.
- Asakura, S., & Oosawa, F. (1954). On interaction between two bodies immersed in a solution of macromolecules. *Journal of Chemical Physics*, 22, 1255–1256.
- Asakura, S., & Oosawa, F. (1958). Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *Journal of Polymer Science*, 33, 183–192.
- Baird, J. K. (1993). *Industrial gums, polysaccharides and their derivatives*. (3rd ed). San Diego: Academic Press pp. 605–618.
- Bourriot, S., Garnier, C., & Doublier, J. L. (1999a). Phase separation, rheology and microstructure of micellar casein–guar gum mixtures. *Food Hydrocolloids*, 13, 43–49.
- Bourriot, S., Garnier, C., & Doublier, J. L. (1999b). Phase separation, rheology and structure of micellar casein–galactomannan mixtures. *International Dairy Journal*, 9, 353–357.
- Bresolin, T. M. B., Beltrami, L. M., Sander, P. C., Reicher, F., & Ganter, J. L. M. S. (1996). Physicochemical aspects of the intermolecular interaction of the galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella* Benth. *Latin American Applied Research*, 26, 5–7.
- Bresolin, T. M. B., Milas, M., Rinaudo, M., Reicher, F., & Ganter, J. L. M. S. (1999). Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 225–231.
- Carlson, W. A., Ziegenfuss, E. M., & Overton, J. D. (1962). Food technology feature: Compatibility and manipulation of guar gum. *Food Technology*, 19, 50–54.
- Dea, I. C. M., & Morrison, A. (1975). Chemistry and interaction of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 241–312.
- Dickinson, E. (1995). *Food polysaccharides and their applications*. New York: Marcel Dekker pp. 501–515.
- Dickinson, E., & Euston, S. R. (1991). *Food polymers, gels and colloids*, Vol. 82. Cambridge: RCS Special Publication pp. 132–146.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350–356.
- Fernández-Martín, F. (1972). Influence of temperature and composition on some physical properties of milk and milk concentrates II. Viscosity. *Journal of Dairy Research*, 39, 75–82.
- Ganter, J. L. M. S., Corrêa, J. B. C., Reicher, F., Heyraud, A., & Rinaudo, M. (1991). Low molecular weight carbohydrates from *Mimosa scabrella* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 29 (2), 139–146.
- Ganter, J. L. M. S., Milas, M., Corrêa, J. B. C., Reicher, F., & Rinaudo, M. (1992). Study of solution properties of galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*. *Carbohydrate Polymers*, 17, 171–175.
- Ganter, J. L. M. S., Cardoso, A. T. M., Kaminski, M., & Reicher, F. (1997). Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: A scale-up process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 137–140.
- Grinberg, V. Y. A., & Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11 (2), 145–158.
- Grindrod, J., & Nickerson, T. A. (1968). Effect of various gums on skim milk and purified milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 51 (6), 834–841.
- Hartree, E. F. (1972). Determination of protein a modification as the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48, 422–427.
- Herald, C. T. (1986). Locust/carob bean gum. In M. Glicksman, *Food Hydrocolloids* (p. 161), Vol. 3. Boca Raton: CRC Press.
- Kresze, G. B. (1983). In J. Bergmeyer & M. Grsaßl, (3rd ed). *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 3. Weinheim: Verlag Chemie.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Launay, B., Michon, C., Parker, A., & de Kruif, C. G. (1999). Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: Influence of temperature. *Food Hydrocolloids*, 13, 211–218.
- Langendorff, V., Cuvelier, G., Michon, C., Launay, B., Parker, A., & de Kruif, C. G. (2000). Effects of carrageenan type on the behavior of carrageenan/milk mixtures. *Food Hydrocolloids*, 14, 273–280.
- Lucyszyn, N., Reicher, F., & Ganter, J. L. M. S. (2000). Galactomannan from *Mimosa scabrella* (bracatinga) as starch substitute in food formulation. Natural polymers and composites. *Proceedings from the Third International Symposium on Natural Polymers and Composites—ISNAPol, and Workshop on Progress in Production and Processing of Cellulosic Fibres and Natural Polymers* (pp. 233–237). São Paulo.

- Mitchell, J. R. (1984). In D. W. Gruenwedel & J. R. Whitaken. *Food analysis: Principles and techniques* (pp. 151–220). Marcel Dekker.
- Perissutti, G. E., Bresolin, T. M. B., & Ganter, J. L. M. S. (2000). Influence of ionic strength on the interaction of galactomannan of *Mimosa scabrella* Benth and skim milk. Natural polymers and composites. *Proceedings from the Third International Symposium on Natural Polymers and Composites—ISNaPol, and Workshop on Progress in Production and Processing of Cellulosic Fibres and Natural Polymers* (pp. 101–107). São Paulo.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346–356.
- Ramachandran, S., Shirlynn, C., & Etzler, F. (1999). Rheological characterization of hydroxypropylcellulose gels. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25 (2), 153–161.
- Schmitt, D. G. (1982). Association of casein and casein micelle structure. In P. F. Fox, *Development in dairy chemistry 1* (pp. 60–86). London: Applied Science Publishers.
- Tuinier, R., ten Grotenhuis, E., & de Kruif, C. G. (2000). The effect of depolymerised guar gum on the stability of skim milk. *Food Hydrocolloids*, 14, 1–7.
- Visser, H. (1992). A new casein micelle model and its consequences for pH and temperature effects on the properties of milk. In H. Visser, *Protein interactions* (pp. 135–165). New York: VCH.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963a). Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 65.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1963b). Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 2, 211.
- Xu, S. Y., Stanley, D. W., Goff, H. D., Davidson, V. J., & Maguer, M. L. E. (1992). Hydrocolloid/milk gel formation and properties. *Journal of Food Science*, 57 (1), 96–102.
- Zasypkina, D. V., Braudo, E. E., & Tolstoguzov, V. B. (1997). Multi-component biopolymer gels. *Food Hydrocolloids*, 11 (2), 159–170.
- Zhan, D. F., Ridout, M. J., Brownsey, G. J., & Morris, V. J. (1993). Xanthan-locust bean gum interactions and gelation. *Carbohydrate Polymers*, 21, 53–58.