



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**IOTA-CARRAGENANA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis*
VERSUS IOTA-CARRAGENANA COMERCIAL: PROPRIEDADES
ESTRUTURAIS E REOLÓGICAS**

MÁRJORY LIMA HOLANDA

FORTALEZA / 2007

MÁRJORY LIMA HOLANDA

**IOTA-CARRAGENANA DA ALGA MARINHA VERMELHA *Solieria filiformis*
VERSUS IOTA-CARRAGENANA COMERCIAL: PROPRIEDADES
ESTRUTURAIS E REOLÓGICAS**

**Tese de Doutorado apresentada
como requisito parcial à obtenção
do grau de doutor pelo Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará.**

**Orientadora: Profa. Dra. Norma
Maria Barros Benevides**

**FORTALEZA
Outubro/2007**

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas d ética científica.

Márjory Lima Holanda

TESE APROVADA EM: 05 / 10 / 07.

Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides
Orientadora
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula
Co-Orientadora
Departamento de Química Orgânica e Inorgânica
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Conselheira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Paulo Antônio de Souza Mourão
Conselheiro
Instituto de Ciência Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Fábio Rabelo Melo
Conselheiro
Instituto de Ciência Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

A Deus, por sua presença constante em minha vida,

CONSAURO

*Especialmente a minha mãe Anunciata que
permanece no meu coração, em todos os
momentos e a quem prometi essa conquista;
Aos meus eternos amores, Lúvia e Clístenes;
Ao meu pai, Assis pela dedicação
incessante;
Aos meus irmãos, Assis e Hemílio pela nossa
alegre união;
Aos meus segundos pais Eloína e Batista,*

Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

Especialmente à minha mãe científica, Dra. Norma Maria Barros Benevides, pela convivência harmoniosa por mais de uma década, por ter contribuído diretamente para o meu crescimento profissional, pela competência, pelo amor ao trabalho e pela grande e valiosa amizade. Sem que eu percebesse os anos foram passando e momentos marcantes da minha vida profissional e pessoal foram apoiados, além de tudo, pela sua grande sensibilidade. Muito obrigada.

À Profa. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula pela receptividade, gentileza e valiosa orientação em todas as fases dessa tese.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas pelos ensinamentos, sugestões, dedicação e elogios.

Ao Dr. Paulo Antônio de Souza Mourão pela importante contribuição e avaliação final deste trabalho.

Ao Dr. Fábio Rabelo Melo pelas valiosas sugestões, ensinamentos, companheirismo e amizade.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, aos quais reservo grande apreço e consideração, por todos os anos de convívio e relacionamento amigável.

Aos novos amigos do Laboratório de Algas Marinhas I: Ismael, Bruno, Natássia, Danilo, Ariévilo, Ana Luíza, Edna pereira, Edfrank, Orleandro e Ticiane Abreu que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho com a alegria e disposição. Em especial as amigas Érika e Ticiane Lima que participaram mais ativamente das fases finais desse trabalho com dedicação e curiosidade, continuem assim!

Um agradecimento especial a Luana e Maria que me acompanharam desde o início desse trabalho me apoiando e incentivando. Adoro vocês!

A todos aqueles que fazem ou fizeram parte dos Laboratórios de Algas Marinhas I e II: Bartolomeu, Fábiana, Dárlito, Edna Pereira, Edna Nascimento, Lídia, Luiziete, Márcia Rúbia, Maria, Noélia, Petronília, Rodrigo, Sâmia, Stélio, Vanda, Luana, Cristiane, Yáskara, Náuber, Dayse e Samuel pelos

inesquecíveis momentos de alegria e apoio, como também pela amizade e consideração sempre presentes.

Aos amigos do Laboratório de Biopolímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, em especial a Durcilene e Pablyana pelas análises de GPC e IR.

À Profa. Dra. Jeanny S. Maciel do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica pela inestimável contribuição e atenção especial dispensada a esta tese principalmente aos espectros de RMN.

Ao Charles Windson Isidoro Haminiuk da Universidade Federal do Paraná que apesar da distância e sem me conhecer pessoalmente foi atencioso e gentil me ajudando a esclarecer muitas dúvidas sobre reologia.

À Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo pelas palavras carinhosas de apoio e pelo entusiasmo contagiante.

Especialmente a minha mãe Anunciata, a quem prometi essa conquista. Obrigada pelo carinho e pelas conversas que tínhamos e que sinto muita falta. Ao meu pai Assis pelo esforço e dedicação incessante em nos proporcionar o nosso bem mais valioso, a educação e aos meus irmãos Assis e Hemílio, por todos os anos de alegria, companheirismo e carinho.

De forma também especial ao meu esposo Clístenes por todos esses anos de amor, cumplicidade, carinho, atenção e encorajamento que me incentivaram a todo o momento na busca dos nossos ideais.

À pequena Lívia, agora com 4 anos e com muita energia pra gastar. Obrigada pequena, principalmente pela sua alegria que revigora e abastece a mamãe de esperança e fé em Deus.

Aos meus segundos pais Eloína e Batista pela alegria, entusiasmo e amor pelo trabalho de educar.

A todos os bolsistas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela cooperação e amizade sempre constantes.

Este trabalho foi realizado graças às seguintes Instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de doutorado e auxílios ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Laboratório de Algas Marinhas II do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará pela execução da primeira etapa do trabalho.

Laboratório de Polímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará pela execução de grande parte desse trabalho.

Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pelos convênios e auxílios concedidos junto ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
CAPÍTULO 1	
1.1. INTRODUÇÃO	21
1.1.1. MACROALGAS VERMELHAS	21
1.1.1.1. Aspectos Gerais	21
1.1.1.2. Aspectos Econômicos	22
1.1.2. PROPRIEDADES ESTRUTURAIIS DE GALACTANAS SULFATADAS DE ALGAS MARINHAS	24
1.1.2.1. Agaranas	25
1.1.2.2. Carragenanas	29
1.2. OJETIVO GERAL	39
1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
1.3. MATERIAL E MÉTODOS	40
1.3.1. MATERIAIS	40
1.3.1.1. Algas Marinhas	40
1.3.1.2. Reagentes e Outros Materiais	40
1.3.2. MÉTODOS	42
1.3.2.1. Tratamento das Algas	42
1.3.2.2. Extração dos Carboidratos	42
1.3.2.3 Determinação do Teor de Açúcares Totais	44
1.3.2.4. Determinação do Teor de Proteínas	44
1.3.2.5. Determinação do Teor de Sulfato	44
1.3.2.6. Determinação de Umidade	44
1.3.2.7. Análise Elementar	45
1.3.2.8. Dessulfatação por Tratamento Solvolítico	45

1.3.2.9. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	45
1.3.2.10. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	46
1.3.2.11. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	46
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
1.4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	47
1.4.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	48
1.4.3. CROMATOLOGRAFIA DE PERMEÇÃO EM GEL (GPC)	55
1.4.4. ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	58
1.5. CONCLUSÕES	68
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

CAPÍTULO 2

2.1. INTRODUÇÃO	80
2.1.1. REOLOGIA	80
2.1.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS CARRAGENANAS	87
2.2. OBJETIVO GERAL	94
2.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	94
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	95
2.3.1. REAGENTES E OUTROS MATERIAIS	95
2.3.2. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DAS CARRAGENANAS	95
2.3.2.1. Reologia de fluxo	95
2.3.2.2. Reologia dinâmica	96
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
2.4.1. REOLOGIA DE FLUXO	97
2.4.1.1. Reologia de fluxo em sistemas lácteos	103
2.4.2. REOLOGIA DINÂMICA	107
2.5. CONCLUSÕES	115
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura	Página
1.1.1 Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L- <i>alternantes</i> .	27
1.1.2 Estruturas extremas encontradas em agaranas: Agarose (I); Precursor da Agarose (II).	28
1.1.3 Estrutura básica repetitiva de carragenanas, com unidades D- <i>alternantes</i> .	30
1.1.4. Representação esquemática das diferentes estruturas das unidades diméricas repetitivas das carragenenas. Os códigos em letras se referem a nomenclatura proposta por Knutsen <i>et al.</i> , 1994.	34
1.1.5. Biosíntese da κ e ι -carragenana catalizadas pelas enzimas sulfotransferase e sulfohidrolase a partir dos seus precursores bioquímicos μ e ν -carragenanas segundo Cardozo <i>et al.</i> , 2007.	36
1.3.1. Alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i> (Kützing) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae).	41
1.3.2. Esquema de extração dos carboidratos de <i>S. filiformis</i> .	43
1.4.1. Espectro de infravermelho na região entre 4000 a 400 cm^{-1} de Sf-25 em pastilha de KBr.	51
1.4.2 Espectro de infravermelho na região entre 2000 a 400 cm^{-1} em pastilha de KBr. A: Sf-90 e B: ι -CAR.	53
1.4.3. Espectro de absorção na região do infravermelho compreendida entre 1700 a 400 cm^{-1} de Sf-25, Sf-90 e ι -CAR em pastilhas de KBr.	54
1.4.4. Cromatograma de Permeação em Gel (GPC) em solução de NaNO_3 0,1 M da Sf-90 0,2%.	56
1.4.5. Cromatograma de Permeação em Gel (GPC) em solução de NaNO_3 0,1 M da ι -CAR 0,2%.	57
1.4.6. Espectro de RMN unidimensional de ^1H em D_2O a 60°C. A- Sf-90; B- ι -CAR.	59

1.4.7	Espectro de RMN unidimensional de ^{13}C em D_2O a 60°C . A- Sf-90; B- ι -CAR.	60
1.4.8.	DEPT 135° de ^{13}C em D_2O a 60°C . A- Sf-90; B- ι -CAR.	62
1.4.9.	Detalhes e correlações do espectro de HMQC de Sf-90.	63
1.4.10	Detalhes e correlações do espectro de HMQC de ι -CAR.	64
1.4.11	Detalhes dos espectros de HMQC de Sf-90. A: Dessulfatada e B: Nativa.	66
1.4.12	Estrutura química sugerida para Sf-90.	67

Capítulo 2

Figura		Página
2.1.1.	Perfil de escoamento de um fluido entre placas paralelas (cisalhamento).	82
2.1.2.	Esquema ilustrativo da solubilização e formação de gel das carragenanas.	88
2.1.3.	Esquema ilustrativo da interação proteína-polissacarídeo sulfatado.	91
2.4.1.	Reograma da Sf-90 a 40°C a diferentes concentrações.	98
2.4.2.	Reograma da ι -CAR a 40°C a diferentes concentrações.	99
2.4.3.	Efeito da taxa de cisalhamento sobre a viscosidade de Sf-90 1%. (A) e ι -CAR (B) a 40°C .	104
2.4.4.	Efeito da temperatura sobre a viscosidade de Sf-90 a uma taxa de cisalhamento constante (2 s^{-1}).	105
2.4.5.	Efeito da frequência sobre os módulos elástico (G' , cheio) e viscoso (G'' , vazio) de soluções aquosas de Sf-90 a 25°C e 2 Pa.	108
2.4.6.	Efeito da frequência sobre os módulos elástico (G' , cheio) e viscoso (G'' , vazio) de soluções aquosas de ι -CAR 3% a 25°C e 3 Pa.	110
2.4.7.	Efeito da temperatura sobre os módulos elástico (G') e viscoso (G'') de soluções aquosas de Sf-90 a 25°C , 1 Hz e 3 Pa.	113
2.4.8.	Efeito da temperatura sobre os módulos elástico (G') e viscoso (G'') da solução aquosa de ι -CAR 3% a 1 Hz e 3 Pa.	114

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela	Página
1.1.1. Nomenclatura alternativa em código de letras dos diferentes tipos de carragenanas proposta por Knutsen <i>et al.</i> , 1994.	32
1.1.2. Classificação das carragenanas de acordo com estruturas ideais das unidades A e B.	33
1.1.3. Composição química de ι -carragenanas obtidas de diferentes gêneros de algas marinhas da família Solieriaceae.	38
1.4.1. Análise elementar (nitrogênio, enxofre e carbono) de Sf-90 e ι -CAR.	49
1.4.2. Atribuições das absorvâncias de espectros de infravermelho de carragenanas kappa, iota e lambda.	50

Capítulo 2

Tabela	Página
2.4.1. Parâmetros reológicos segundo Herschel-Bulkley e a Lei da Potência da curva ascendente de Sf-90 e ι -CAR a diferentes concentrações a 40°C.	101
2.4.2. Parâmetros reológicos segundo Herschel-Bulkley e a Lei da Potência da curva descendente de Sf-90 e ι -CAR a diferentes concentrações a 40°C.	102
2.4.3. Comportamento reológico segundo o modelo da Lei da Potência de Sf-90 0,5% em sistemas lácteos a 40°C.	106
2.4.4. Efeito da concentração sobre os parâmetros reológicos de soluções aquosas de Sf-90 e ι -CAR a 25°C. Módulos elástico (G') e viscoso (G'') a 1Hz.	109

SÍMBOLOGIA E ABREVIATURAS

APAFG	Associação dos Produtores de Algas de Fleicheiras e Guajiru
BSA	Albumina Sérica Bovina
C-1	Carbono 1
C-2	Carbono 2
C-3	Carbono 3
C-4	Carbono 4
C-5	Carbono 5
C-6	Carbono 6
4C_1 e 1C_4	Conformações estruturais do anel piranosídico
CENAUREMN	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CMC	Carboximetilcelulose
D	4 \rightarrow α -D-galactopiranosose
D ₂ O	Óxido de Deutério
D2S,6S	4 \rightarrow α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato
D6S	4 \rightarrow α -D-galactopiranosose 6-sulfato
DA	4 \rightarrow 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose
DA2S	4 \rightarrow 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato
DBMB	Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
DEPT 135°	<i>Distortionless Enhancement through Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DSS	2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio
Ea	Energia de Ativação de Fluxo segundo Arrhenius
EtOH	Etanol
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
G	3 \rightarrow β -D-galactopiranosose
G'	Módulo de estocagem ou elástico
G''	Módulo de perda ou viscoso
G2S	3 \rightarrow β -D-galactopiranosose 2-sulfato
G4S	3 \rightarrow β -D-galactopiranosose 4-sulfato
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
GS	Grau de Sulfatação

HCl	Ácido Clorídrico
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherenc)</i>
Hz	Hertz – unidade de frequência
ι -CAR	ι -Carragenana comercial de grau alimentício (DANISCO)
IV	Infravermelho
k	Índice de consistência (Pa.s) segundo a Lei de Potência
KBr	Brometo de Potássio
kDa	Kilodáton
k_H	Índice de consistência segundo Hershel-Bulkley
MFA	Microscopia de Força Atômica
μm	micrômetro
m/v	Massa/Volume
n	Índice de comportamento de fluxo (adimensional)
NaNO_3	Nitrato de sódio
n_H	Índice do comportamento do fluido (Pa.s ⁿ) segundo Hershel-Bulkley
nm	nanômetro
OCEC	Organização das Cooperativas do Estado do Ceará
Pa	Pascal
R	Constante Universal dos Gases
R^2	Coefficiente de correlação
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Protônica
S	Éster sulfato (O-SO_3^-)
Sf-120	Fração obtida de <i>S. filiformis</i> a 120°C
Sf-25	Fração obtida de <i>S. filiformis</i> a 25°C
Sf-90	Fração obtida de <i>S. filiformis</i> a 90°C
T	Temperatura
TFA	Ácido Trifluoracético
UV	Ultravioleta
γ	Taxa de cisalhamento (s ⁻¹)
η_{ap}	Viscosidade aparente (Pa.s)
μ	Viscosidade Newtoniana (Pa.s)
σ	Tensão de cisalhamento (N.m ⁻² = Pa)
σ_0	Tensão de cisalhamento inicial (Pa)

RESUMO

Os polissacarídeos totais da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foram extraídos, caracterizados quanto a sua estrutura química e sua fração majoritária foi comparada às propriedades estruturais e físico-químicas de uma ι -carragenana comercial (ι -CAR). A alga seca foi submetida a extrações aquosas seqüenciais à 25, 90 e 120°C, obtendo-se as frações Sf-25, Sf-90 e Sf-120 com rendimentos de 1,4, 98,2 e 0,4%, respectivamente, com base no peso seco da alga. A fração de maior rendimento (Sf-90) e a ι -CAR mostraram composições químicas semelhantes quanto aos teores de sulfato (32,2 e 31,4%, respectivamente) e carboidratos (61,7 e 50,3%, respectivamente), mas diferiram no teor de proteína (5,5 e 0,3%, respectivamente). Os espectros de Infra-vermelho de Sf-90 e ι -CAR mostraram absorções típicas intensas em torno de 1250 cm^{-1} correspondente aos grupos éster sulfato presentes e em torno de 850 cm^{-1} , 930 cm^{-1} e 805 cm^{-1} correspondentes à galactopirranose-4-sulfato (G4S), 3,6-anidrogactose (DA) e 3,6-anidrogactose-2-sulfato (DA2S), respectivamente, permitindo sugerir que a estrutura química de Sf-90 corresponde a uma ι -carragenana. Os espectros de RMN de ^{13}C de ambas amostras (Sf-90 e ι -CAR) também mostraram sinais anoméricos correspondentes a estrutura química de uma ι -carragenana, constituída principalmente de G4S (51,9 e 57,1%, respectivamente) e DA2S (48,1 e 42,9%, respectivamente). No entanto, o espectro de RMN de ^1H da Sf-90 apresentou um pico intenso na região de 3,41 ppm correspondente a substituições no C-6 de G4S por grupos O-metil, pequenas quantidades de κ -carragenana e precursores da ι -carragenana. As amostras Sf-90 e ι -CAR foram dessulfatadas e seus espectros de HMQC confirmaram seus padrões de sulfatação. A Sf-90 apresentou massa molar média de 590.000 gmol^{-1} enquanto a ι -CAR apresentou massa molar média superior (2.100.000 gmol^{-1}). Os comportamentos reológicos de Sf-90 e ι -CAR se mostraram independentes do tempo, pseudoplástico e os modelos da Lei da Potência e Herschel-Bulkey descreveram bem tal comportamento. As soluções aquosas de Sf-90 apresentaram índices de comportamento de fluxo bem superiores a ι -CAR a concentrações de 0,5 e 1% e a temperatura influenciou muito na viscosidade

dessas soluções dado foi a alta energia de ativação de fluxo obtida para Sf-90 ($117,31 \text{ kJmol}^{-1}$). Em sistemas lácteos as carragenanas (Sf-90 e ι -CAR) interagiram com as proteínas do leite aumentando drasticamente a viscosidade das soluções lácteas quando comparadas com as soluções aquosas. Os géis verdadeiros formados por Sf-90 nas concentrações de 1, 2 e 3% não sofreram influência da frequência e apresentaram histerese térmica. Já a ι -CAR formou um gel fraco e sem histerese térmica apenas na concentração de 3%.

ABSTRACT

Marine red algae are an abundant source of carrageenans, a generic name for a family of polysaccharides, obtained by extraction from certain species of red seaweeds (Rhodophyta). Carrageenans represent one of the major texturising ingredients in the food industry. The quantitative and rheological analysis of carrageenan batches are of greatest importance for both ingredient suppliers and food industries to deliver a constant consumer product and to develop new applications based on their unique intrinsic properties. The red marine alga *Solieria filiformis* was submitted to aqueous extraction of your polysaccharides and presented a yield de 1.4% in the extraction to cold (Sf-25), 98.2% at 90°C (Sf-90) e 0.4% at 120°C (Sf-120). A comercial ι -carrageenan (ι -CAR) was utilized to comperre the chemical and rheological characteristics of the Sf-90. The sulfate, protein and carbohydrates contents in the Sf-90 and ι -CAR were 32.2, 5.5 and 61.7% and 31.4, 0.3 and 50.3%, respectively. In general, the FTIR spectra of Sf-90 e ι -CAR were similar and typical absorption peaks were present at 1250 cm^{-1} (ester sulfate), 930 cm^{-1} (3,6-anhydro-galactose), 850 cm^{-1} (D-galactose-4-sulfate) and 805 cm^{-1} from 3,6-anhydro-galactose-2-sulfate (DA2S). The ^{13}C RMN spectra of Sf-90 and ι -CAR also showed anomeric signals corresponding at chemical structure of a ι -carrageenan, constituted mainly of G4S (51.9 and 57.1%, respectively) and DA2S (48.1 and 42.9%, respectively). However, the ^1H RMN spectrum of Sf-90 presented an intense signal at 3.41 ppm corresponding to substitutions in C-6 of G4S for groups O-methyl, small amounts of κ -carrageenan and precursors of ι -carrageenan. The samples Sf-90 and -CAR were desulfated and your spectra of HMQC confirmed your sulfate patterns. Sf-90 presented mass molar medium of 590.000 gmol^{-1} while ι -CAR presented mass molar superior average (2.100.000 gmol^{-1}). Experiments to avaliate the rheological behaviors of Sf-90 and ι -CAR were performed in duplicate. The power law and Herschel-Bulkey models fitted most of the experimental results. Sf-90 1% (at 25°C) was exception, characterized by a yield stress and hence the rheograms were fitted with the Herschel-Bulkley model. Furthermore, ι -CAR showed a Newtonian behavior at 0.1%. Arrhenius model was used to describe the temperature effect. Sf-90 0.5% showed a hight temperature dependency ($E_a = 117, 31 \text{ kJmol}^{-1}$). The presence of Sf-90 in milk

resulted in synergy manifested as enhancements in viscosity suggesting interaction carrageenan/protein. True gels with presence of hysteresis were formed by Sf-90 at concentrations 1, 2 and 3% while ι -CAR formed weak gels just in the concentration of 3%. Therefore, based on the very similar quimical structure and rheological behavior of Sf-90 e ι -CAR, the alga *S. filiformis* can be harvested and addressed to the industrial extraction processes without any previous sorting.

Capítulo 1

Estrutura química

1.1. INTRODUÇÃO

1.1.1. MACROALGAS VERMELHAS

1.1.1.1. Aspectos Gerais

As macroalgas são organismos fotossintetizantes avasculares, com talo macroscópico, que vivem quase toda sua vida fixas a um substrato sólido, consolidado ou não. Embora talos de macroalgas possam ser vistos flutuando em algumas regiões, este é um fenômeno acidental e temporário (<http://www.ib.usp.br/algamare-br/>). Apresentam uma estrutura filamentosa que cresce a partir de uma única célula apical que se divide seqüencialmente em segmentos originando um eixo, que por sua vez, forma verticilos de ramos laterais (RAVEN *et al.*, 2003). As únicas fases do histórico de vida das algas marinhas que se apresentam livres e integram o plâncton por períodos muito curtos de tempo são os esporos e gametas.

Historicamente, as algas marinhas vêm sendo denominadas de vegetais inferiores e mais recentemente foram classificadas como pertencentes ao Reino Protista por se diferenciarem dos vegetais superiores (Reino Plantae) na sua simplicidade de organização quando comparadas com outros grupos de plantas, principalmente as vasculares (RAVEN *et al.*, 2003). As macroalgas são classificadas segundo sua pigmentação em três filos: Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas pardas). A parede celular das algas vermelhas é constituída por uma fração fibrilar rígida, embebida em uma matriz amorfa, que confere resistência à parede celular e consiste, predominantemente, de celulose (RAVEN *et al.*, 2003). Já a matriz mucilagínosa é composta por galactanas sulfatadas tais como agaranas e/ou carragenanas, as quais estão diretamente relacionadas a funções como regulação osmótica ou iônica, possibilitando sua sobrevivência no ambiente marinho (KLOAREG & QUATRANO, 1998). Possuem ainda, polissacarídeos de reserva denominados amido das florídeas, análogos à amilopectina dos vegetais, sendo assim constituídos por α -D-glucose, com ligações glicosídicas do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ e pontos de ramificação no C-6 (PAINTER, 1983).

1.1.1.2. Aspectos Econômicos

Os polissacarídeos sulfatados extraídos das algas marinhas vermelhas, carragenana e ágar, chegam a representar mais de 70% do seu peso seco (FENICAL, 1975). Esses polissacarídeos possuem propriedades físico-químicas de grande interesse para as indústrias alimentícia e farmacêutica atuando como espessantes, geleificantes, emulsificantes e estabilizantes. Tais propriedades estimularam o crescimento de uma das mais importantes atividades econômicas dentre a grande diversidade de aproveitamento das algas marinhas: a comercialização de ágar e carragenanas refinados. No ano de 2000, somente a carragenana chegou a movimentar no mercado mundial cerca de US\$ 310 milhões, mostrando um crescimento anual de 3 a 4% (VAN DE VELDE *et al.*, 2002; FURTADO, 2004). Estas galactanas, polímeros de galactose, estão presentes em uma infinidade de gêneros de algas, principalmente as vermelhas *Gelidium*, *Gracilaria*, *Phylophora*, *Chondrus*, *Gigartina*, *Hypnea* e *Eucheuma*, no entanto os bancos naturais dessas algas não são suficientes para atender a demanda da indústria. Diante disso, na década de 70, as Filipinas estabeleceram o primeiro cultivo de algas marinhas (*Kappaphycus alvarezii*) em sistema de maricultura para fins comerciais (PAULA & PEREIRA, 1998). Na África o cultivo da alga iniciou na Tanzânia em 1989 (MSHIGENI, 1992; LIRASAN & TWIDE, 1993). A partir de então, linhagens derivadas desses cultivos têm sido introduzidas em mais de 20 países, com propósitos de maricultura (PAULA, 2001; PAULA & PEREIRA, 1998).

No Brasil a partir da década de 70, tiveram início os primeiros estudos sobre o aproveitamento econômico das algas que objetivaram analisar os seguintes fatores: aceitabilidade das diferentes espécies pelos diferentes grupos étnicos, distribuição em seus respectivos habitats e ainda as diferenças químicas e físicas existentes entre as espécies (ROBINSON, 1980). A crescente demanda do mercado de hidrocolóides motivou estudos sobre o potencial econômico de bancos naturais de algas marinhas da costa brasileira e apontaram a alga *Hypnea musciformis* como uma espécie viável para a extração de carragenana. Atualmente, o nordeste brasileiro possui instalações industriais para a produção de ágar e carragenana semirefinados provenientes de bancos naturais de algas da região, limitando-se a produzir 10 t/mês temendo a escassez das espécies (FURTADO, 2004).

Estudos visando a adaptação e o cultivo de *Hypnea musciformis* no estado de São Paulo foram realizados, porém sem sucesso (BERCHEZ & OLIVEIRA, 1990; BERCHEZ *et al.*, 1996). Conseqüentemente o Brasil importa aproximadamente 1000 toneladas de carragenana e 2000 toneladas da alga seca *Kappaphycus alvarezii* por ano das Filipinas (FURTADO, 1999). Recentemente, o cultivo dessa alga em São Paulo foi reiniciado e os resultados dão indícios de uma boa adaptação da espécie às condições locais, com taxas de crescimento sustentadas de 4,2 a 8% ao dia e rendimentos de carragenana refinada de 23 a 43% durante o ciclo anual (PAULA & PEREIRA, 2003; HAYASHI, 2001). A adaptação de espécies exóticas de macroalga e conseqüentemente o sucesso dos cultivos se devem em grande parte às condições ambientais, que precisam ser semelhantes àquelas de onde a alga foi originalmente coletada (OHNO *et al.*, 1996).

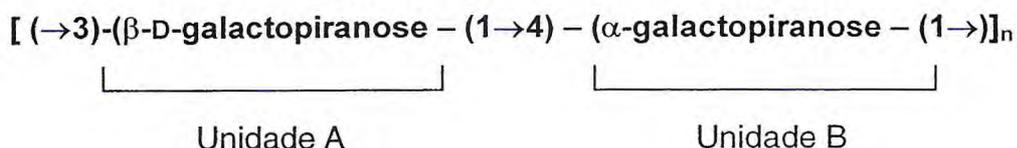
Nesse sentido, técnicos da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) avaliaram o potencial do litoral nordestino e consideraram como um local propício para o cultivo de algas marinhas nativas da região, e em 1999 a entidade financiou a consolidação final de um projeto-piloto de cultivo no Ceará, nas praias de Fleixeiras e Guajiru, município de Trairi. O projeto obteve sucesso e atualmente a venda de algas cultivadas para a indústria de produção de ágar é gerenciada pela Associação de Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG) com apoio da Organização das Cooperativas do Estado do Ceará (OCEC) e do Instituto Terramar de Pesquisa e Assessoria à Pesca Artesanal. O mais recente projeto da APAFG visa a construção de uma mini-fábrica de agar o que poderia ampliar o cultivo de algas, além de agregar valor ao produto. Em paralelo, pesquisas que objetivem identificar novas espécies de algas nativas produtoras de ficocolóides de alto valor agregado e com potencial para maricultura também são de grande importância e atualmente estão sendo desenvolvidas.

Recentemente, outro projeto visando estudar o cultivo de algas de valor comercial foi iniciado por Reis *et al.* (2005). As algas *Gracilaria caudata*, *G. cervicornis* e *Hypnea musciformis* foram cultivadas em sistema de maricultura na ilha de Marambaia, Rio de Janeiro. A espécie *Hypnea musciformis* apresentou o maior crescimento quando comparadas as taxas de crescimento das três espécies em 20 e 40 dias de cultivo. Apresentou ainda, um maior epifitismo o que favorece o cultivo dessa espécie no mar devido à forte aderência do talo à corda. No entanto fatores climáticos como o aumento no movimento das águas em decorrência do aumento da

intensidade dos ventos, variações da temperatura do ar e variações bruscas nos índices pluviométricos ocasionaram a perda da biomassa das espécies cultivadas, medidas em 20 e 40 dias de cultivo. Diante dos resultados observados a alga *H. musciformis* mostrou-se propícia para a maricultura no local de estudo, porém experimentos complementares são necessários para se avaliar a influência de fatores ambientais sobre o crescimento das algas.

1.1.2. PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE GALACTANAS SULFATADAS DE ALGAS MARINHAS

As algas vermelhas sintetizam moléculas de alta massa molecular, na sua maioria polissacarídeos contendo galactose, dispostas em uma cadeia linear onde há alternância de unidades designadas por A e B (AB)_n de acordo com a estrutura repetitiva esquematizada a seguir:



Uma ampla variedade de estruturas pode ser observada, devido à diversidade de substituintes de quaisquer das hidroxilas disponíveis nas unidades A e/ou B na cadeia principal, seja em termos quantitativos ou qualitativos. São eles: grupos O-sulfato, metil-éteres, acetal de ácido pirúvico e glicosilações (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

A unidade A está ligada através dos carbonos C-1 e C-3, podendo apresentar grupos O-metil no C-6, grupos éster sulfato no C-2, C-4 ou C-6, ou acetal de ácido pirúvico nos C-4 e C-6. A unidade B, por sua vez, está ligada através dos carbonos C-1 e C-4 e pode apresentar grupos sulfato no C-2 e/ou C-3 e no C-6, ou estar totalmente ciclizado na forma de 3,6-anidrogactose. Unidades B podem apresentar éter metílico no C-3 da galactose ou C-2 do anidro-açúcar, além da presença de unidades de galactose como pontos de ramificação (PAINTER, 1983). Existem ainda referências a cadeias laterais constituídas por xilose em diferentes posições (MILLER & BLUNT, 2002; USOV *et al.*, 1997; CASES *et al.*, 1994; CASES *et al.*, 1992; USOV & ELASHVILI, 1991).

A variabilidade gerada por esses substituintes origina uma grande diversidade de polissacarídeos que são denominados genericamente como galactanas (STORTZ *et al.*, 1997). A mais simples classificação das galactanas é feita de acordo com a estereoquímica da unidade B: sendo a unidade B pertencente à série D, estas galactanas são classificadas como carragenanas; sendo a unidade B pertencente à série L, as galactanas são classificadas como agaranas. No entanto estudos estruturais detalhados demonstram um terceiro grupo de galactanas onde a unidade B apresenta configuração D- e L- na mesma molécula. Polissacarídeos com essa estrutura são denominados de carrágar (CHOPIN *et al.*, 1999) ou híbridos – D/L (STORTZ & CEREZO, 2000).

Existem galactanas (hidrocolóides) capazes de se dissolverem ou dispersarem em sistemas aquosos produzindo viscosidade ou formando géis. As carragenanas têm a habilidade de formar, a baixas concentrações, colóides ou géis em soluções aquosas (FARIA, 2002).

A importância de se estudar a estrutura química das galactanas isoladas de Rhodophytas está em se correlacionar detalhes estruturais com propriedades físico-químicas ou atividades biológicas apresentadas pelas mesmas (USOV, 1998). Além disso, o estudo da estrutura química desses polímeros pode auxiliar na classificação taxonômica de algas, auxiliando critérios clássicos como morfologia, anatomia, etc. (MILLER *et al.*, 1995; USOV, 1998).

1.1.2.1. Agaranas

As agaranas formam uma classe de galactanas que ocorrem na matriz extracelular de diversas espécies de algas marinhas vermelhas. Elas possuem uma função semelhante à dos polissacarídeos de parede celular de plantas terrestres, porém, enquanto estas requerem uma estrutura rígida capaz de resistir à constante atração da gravidade, as algas marinhas precisam de uma maior flexibilidade em sua estrutura para acomodar as variações nas correntes marinhas e movimento das ondas.

Espécies produtoras de ágar (agarófitas) são encontradas principalmente nas famílias *Gracilariaceae*, *Gelidiaceae*, *Phyllophoraceae* e *Ceramiceae*. As agarófitas são usualmente dotadas de elevado crescimento (STEPHEN, 1995).

As agaranas, as quais existem como géis à temperatura ambiente, são geralmente obtidas por extração aquosa a temperaturas pouco acima de seus pontos de ebulição. Entretanto, como o uso das agaranas no Oriente já ocorre há vários séculos, diversas técnicas para obtê-las foram desenvolvidas, utilizando-se condições ácidas, neutras ou básicas, ou ainda, a combinação de tais condições (STEPHEN, 1995).

As agaranas são polissacarídeos que apresentam cadeia principal formada por unidades de (1→3)- β -D-galactopiranoose e (1→4)- α -L-galactopiranoose (**Figura 1.1.1**), diferindo portanto das carragenanas na configuração estereoquímica da unidade B. Esta unidade pode ainda estar na forma de seu derivado 3,6-anidrogactose (PAINTER, 1983).

A classificação das agaranas não é tão específica quanto a das carragenanas. Além disso, a substituição das agaranas por grupos sulfato, metil e pirúvico difere do observado em carragenanas. A presença de unidades A piruvatadas (4,6-O-(1carboxietilideno)-D-galactopiranoose) e com grupos metil (6-O-metil-D-galactopiranoose) é freqüente, bem como cadeias laterais de 4-O-metil-L-galactopiranoose e unidades B metiladas em C-2 (STORTZ & CERREZO, 2000). Melo *et al.*, (2002) avaliando a composição e estrutura de polissacarídeos sulfatados solúveis da alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* observaram a presença de 3,6-anidrogactose (24,7%), gactose (64,6%), 6-O-metil-gactose (8,5%), glucose (1,5%), xilose (0,7%) e grupos sulfatados (4,8%).

Embora haja uma grande variedade de grupos substituintes nas agaranas, existem três estruturas distintas que são consideradas os exemplos mais simples de gactanas do tipo agarana. Uma dessas estruturas é a agarose (**Figura 1.1.2**), a qual possui estrutura linear e regular constituída por unidades dissacarídicas repetitivas de β -D-galactopiranoose ligadas glicosidicamente através da posição 3 (unidades A) e 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose ligadas glicosidicamente através da posição 4 (unidades B) (ARAKI & HIRASE, 1960). A agarose é desprovida de sulfato e é a gactana com maior propriedade geleificante dentro do grupo das agaranas (USOV *et al.*, 1983). A substituição das unidades anidrogactosídicas por unidades de α -L-galactopiranoose-6-sulfato reduz consideravelmente a propriedade de

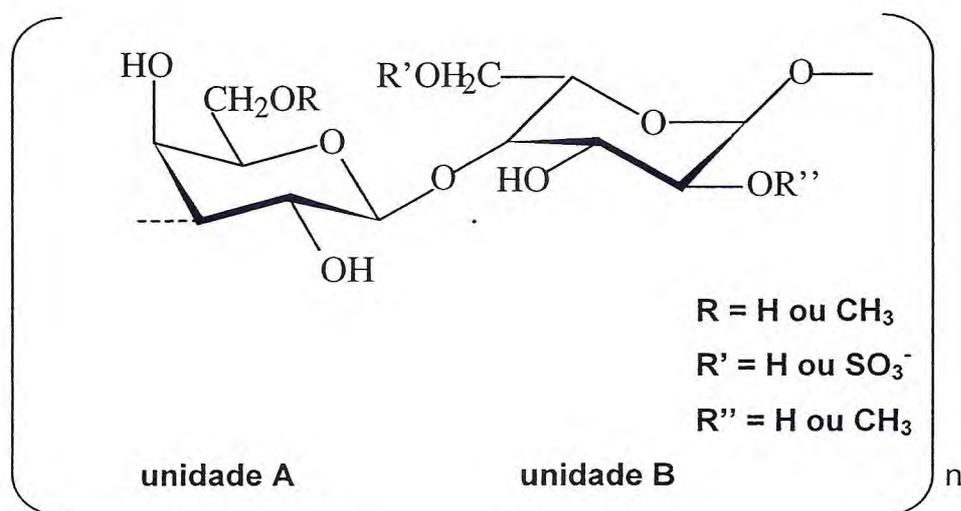


Figura 1.1.1 - Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L-alternantes.

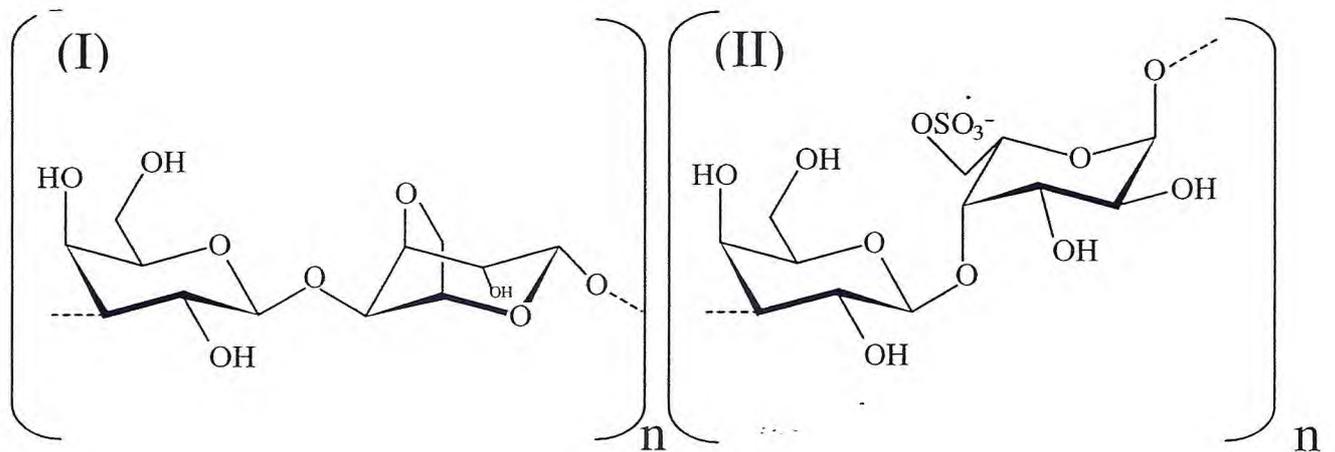


Figura 1.1.2 – Estruturas extremas encontradas em agaranas: Agarose (I); Precursor da Agarose (II).

gelificação desses polímeros, enquanto que a introdução de grupos metil nessa mesma posição tem pouca influência sobre tal propriedade.

O tratamento alcalino de agaranas contendo unidades precursoras, ou seja, α -L-galactopiranosose-6-sulfato (**Figura 1.1.4**) as transforma em unidades de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. Este tipo de tratamento é utilizado na indústria para aumentar o poder geleificante desses polímeros, ou em laboratório para a quantificação das unidades B naturalmente sulfatadas no C-6 presentes nas galactanas de algas vermelhas (NOSEDA & CERESO, 1995).

Um outro tipo estrutural utilizado para comparações em estudos de agaranas de algas vermelhas é a porfirana, a qual é biossintetizada por algas do gênero *Porphyra* e *Bangia*, sendo estruturalmente semelhante à agarose, porém mais complexa devido à ocorrência natural de grupos O-metil esterificando o C-6 de algumas unidades A e de grupos sulfato substituindo parcialmente o C-6 de unidades B. As unidades de α -L-galactopiranosose podem ainda encontrar-se em sua forma ciclizada de 3,6-anidrogalactose (ANDERSON & REES, 1965; ASPINALL, 1970).

Géis de agarose modificados quimicamente são utilizados em laboratórios em cromatografias de troca iônica (DEAE-Sephrose, CM-Sephrose). Estes géis estão entre os meios mais utilizados para eletroforese, assim como também o ágar é amplamente utilizado para solidificar meios de cultura de microrganismos (NOSEDA, 1994).

1.1.2.2. Carragenanas

As carragenanas são conhecidas desde o século XVIII quando eram utilizadas pela população de Carrageen (cidade costeira da Irlanda), como agentes espessantes e geleificantes em alimentos caseiros (NOSEDA, 1994). Compõem uma família de galactanas sulfatadas de cadeias lineares formadas por dissacarídeos com unidades de β -D-galactopiranosose e α -D-galactopiranosose ou 3,6-anidrogalactopiranosose alternantes (forma idealizada) (**Figura 1.1.3**) que sofrem diversas variações originadas de substituições das hidroxilas livres.

Para simplificar a descrição dessas estruturas complexas, Knutsen *et al.*, (1994) propuseram uma nomenclatura através de letras-código a qual foi aprovada

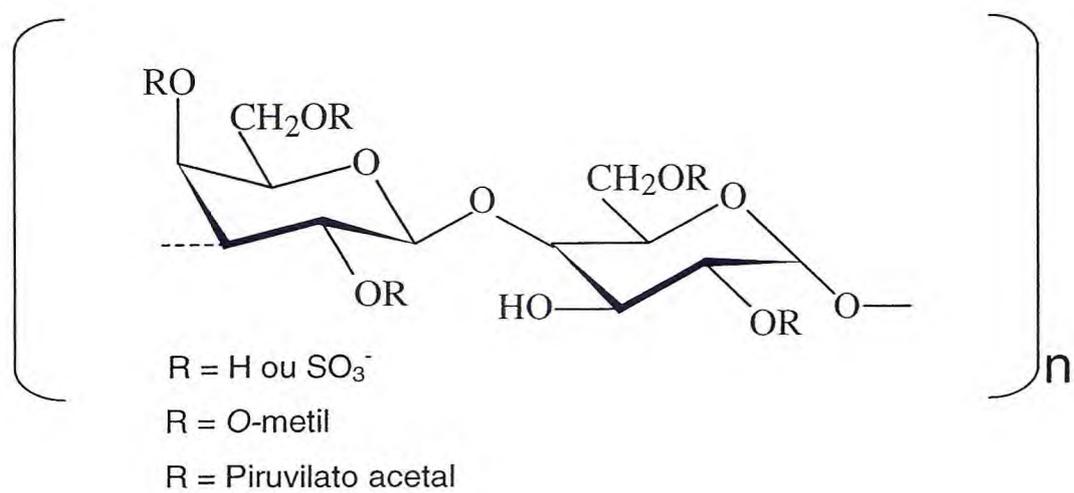


Figura 1.1.3 - Estrutura básica repetitiva de carragenanas, com unidades D- alternantes.

pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e atualmente é utilizada pelas comunidades científica, legislativa e do comércio (**Tabela 1.1.1**).

As variações que ocorrem na estrutura das carragenanas são originadas principalmente pela disposição de grupos sulfato, pela ocorrência de carboidratos residuais como xilose, glucose e ácido urônico e de substituintes como éteres metil e grupos piruvatos (VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Portanto, de acordo com a presença de 3,6-anidro-galactose e da posição de grupos sulfato que esterificam os carbonos das unidades A e B da cadeia linear, as carragenanas são agrupadas em 4 famílias (**Tabela 1.1.2**).

A família Kappa (κ) apresenta grupos sulfato no C-4 da unidade A [\rightarrow 3- β -D-Galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp-(1 \rightarrow)]. Em função da unidade B apresentar grupos sulfato no C-6 ou estar na forma de 3,6-anidrogalactose ou ainda na presença ou ausência de grupos sulfato no C-2, a família κ compreende carragenanas com estruturas ideais denominadas: κ -, ι -, μ - e ν -carragenanas.

A família Lambda (λ), possui grupos sulfato no C-2 de ambas as unidades, estando ainda a unidade B sulfatada no C-6. [\rightarrow 3- β -D-Galp-2-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -D-Galp-2,6-dissulfato(1 \rightarrow)]. Dependendo da unidade B estar sulfatada no C-2 ou a unidade A estar piruvatada, três estruturas naturais aparecem: λ -, ξ - e π -carragenanas. A família Beta (β) compreende polissacarídeos em que a unidade A não é sulfatada. Incluindo β - e α -carragenanas e seus precursores biológicos γ - e δ -carragenanas. A família omega (ω) compreende galactanas que apresentam grupos sulfato no C-6 da unidade A, podendo também estar presentes na unidade B. Nesta família está a carragenana natural ω - e seu precursor biológico ψ -carragenana (STORTZ & CERREZO, 2000).

As carragenanas mais comuns comercialmente são: κ (kappa), ι (iota) e λ (lambda)-carragenana. Elas apresentam teores de sulfatação variando entre 22 e 38% (w/w) e massa molecular entre 400 e 600 kDa (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

A diferença estrutural entre a κ , ι e a λ -carragenana é a quantidade de grupos sulfatos que esterificam os carbonos das unidades A e B da cadeia principal, de modo que a κ -carragenana possui 1, a ι -carragenana possui 2 e a λ -carragenana possui 3 grupos sulfato. Além disso, a λ -carragenana não possui 3,6-anidrogalactose na sua composição estrutural devido ao grupo sulfato que esterifica o C-6 da unidade B da cadeia linear (**Figura 1.1.4**). Além desses três, outros dois tipos são

Tabela 1.1.1- Nomenclatura alternativa em código de letras dos diferentes tipos de carragenanas proposta por Knutsen *et al.*, 1994.

Código (letras)	Encontrada em Carragenanas	Nomenclatura segundo IUPAC
G	β	3 \rightarrow β -D-galactopiranosose
D	Não encontrada ^a	4 \rightarrow α -D-galactopiranosose
DA	κ, β	4 \rightarrow 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose
S	$\kappa, \iota, \lambda, \mu, \nu, \theta$	Éster sulfato (O-SO ₃ ⁻)
G2S	λ, θ	3 \rightarrow β -D-galactopiranosose 2-sulfato
G4S	κ, ι, μ, ν	3 \rightarrow β -Dgalactopiranosose 4-sulfato
DA2S	ι, θ	4 \rightarrow 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose 2-sulfato
D2S,6S	λ, ν	4 \rightarrow α -D-galactopiranosose 2,6-dissulfato
D6S	μ	4 \rightarrow α -D-galactopiranosose 6-sulfato

a – Não encontrada naturalmente em carragenanas, mas pode ser encontrada em carragenanas dessulfatadas.

Tabela 1.1.2. - Classificação das carragenanas de acordo com estruturas ideais das unidades A e B.

FAMÍLIA	UNIDADE A		UNIDADE B	
	[→3-β-D-Galp-	(1→4)	-α-D-Galp-	(1→]
KAPPA				
κ (kappa)	4-sulfato		3,6-anidrogactose	
ι (iota)	4-sulfato		3,6-anidrogactose-2 sulfato	
μ (mu)	4-sulfato		6-sulfato	
ν (nu)	4-sulfato		2,6-dissulfato	
ο (omicron)	4-sulfato		2-sulfato	
LAMBDA				
λ (lambda)	2-sulfato		2,6-dissulfato	
ξ (xi)	2-sulfato		2-sulfato	
π (pi)	2-sulfato		4,6-O-(1-carboxi-etilideno-2-sulfato)	
θ (theta)*	2-sulfato		3,6-anidrogactose-2-sulfato	
OMEGA				
ω (omega)	6-sulfato		3,6-anidrogactose	
ψ (psi)	6-sulfato		6-sulfato	
BETA				
β (beta)	não sulfatada		3,6-anidrogactose	
α (alpha)	não sulfatada		3,6-anidrogactose-2-sulfato	
γ (gamma)	não sulfatada		6-sulfato	
δ (delta)	não sulfatada		2,6-dissulfato	

*A θ-carragenana não é biossintetizada naturalmente pelas algas. Para sua obtenção é necessário o tratamento alcalino da λ-carragenana.

Tabela modificada de: Knutsen *et al.*, 1994

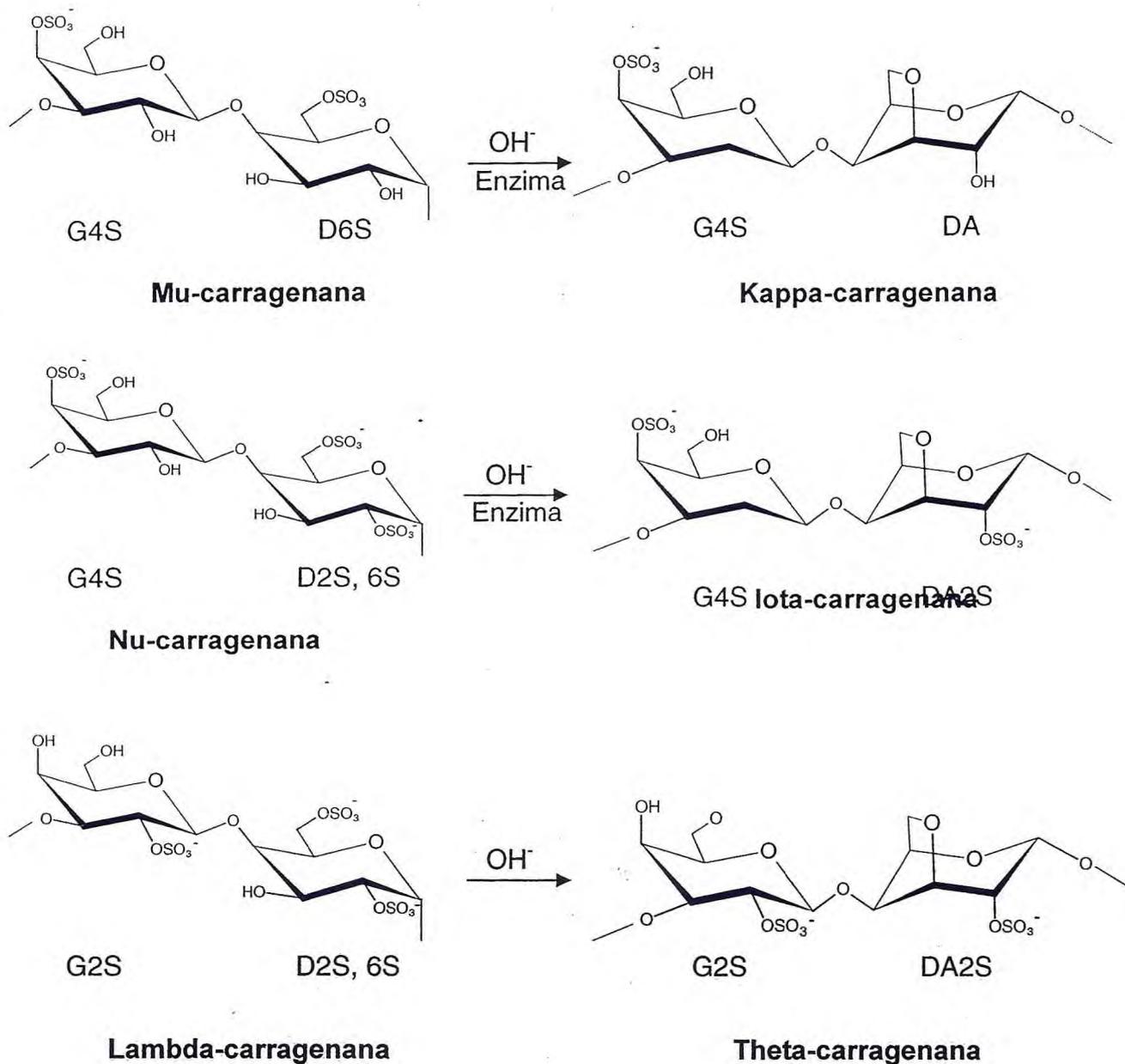


Figura 1.1.4- Representação esquemática das diferentes estruturas das unidades diméricas repetitivas das carragenenas. Os códigos em letras se referem à nomenclatura proposta por Knutsen *et al.*, 1994.

comumente encontrados em amostras de carragenanas comerciais: μ e a ν -carragenana também denominadas μ e ν -carragenanas, respectivamente. Estas estruturas são sulfatadas no C-6 da unidade B e consideradas precursores bioquímicos da kappa e iota-carragenana, respectivamente. Em meio alcalino, acontece a ciclização da α -D-galactopiranosose-6-sulfato dando origem ao 3,6-anidrogactose (**Figura 1.1.5**). *In vivo*, a biosíntese da κ e ι -carragenana é catalizadas pelas enzimas sulfotransferase e sulfohidrolase a partir dos seus precursores bioquímicos μ e ν -carragenanas, respectivamente, como mostrado na **Figura 1.1.5** (CARDOZO *et al.*, 2007).

A biossíntese de um outro tipo de carragenana denominado híbrido κ/ι , que consiste em uma mistura das carragenanas κ e ι , está relacionada com o ciclo de vida da alga, bem como a presença de μ e ν -carragenanas (NOSEDA, 1994). McCandlers *et al.* (1982) observaram que as algas *Gigartina* e *Chondrus*, no estágio esporofítico, produziam a λ -carragenana enquanto que, as mesmas espécies, no estágio gametofítico biossintetizavam o híbrido κ/ι carragenana.

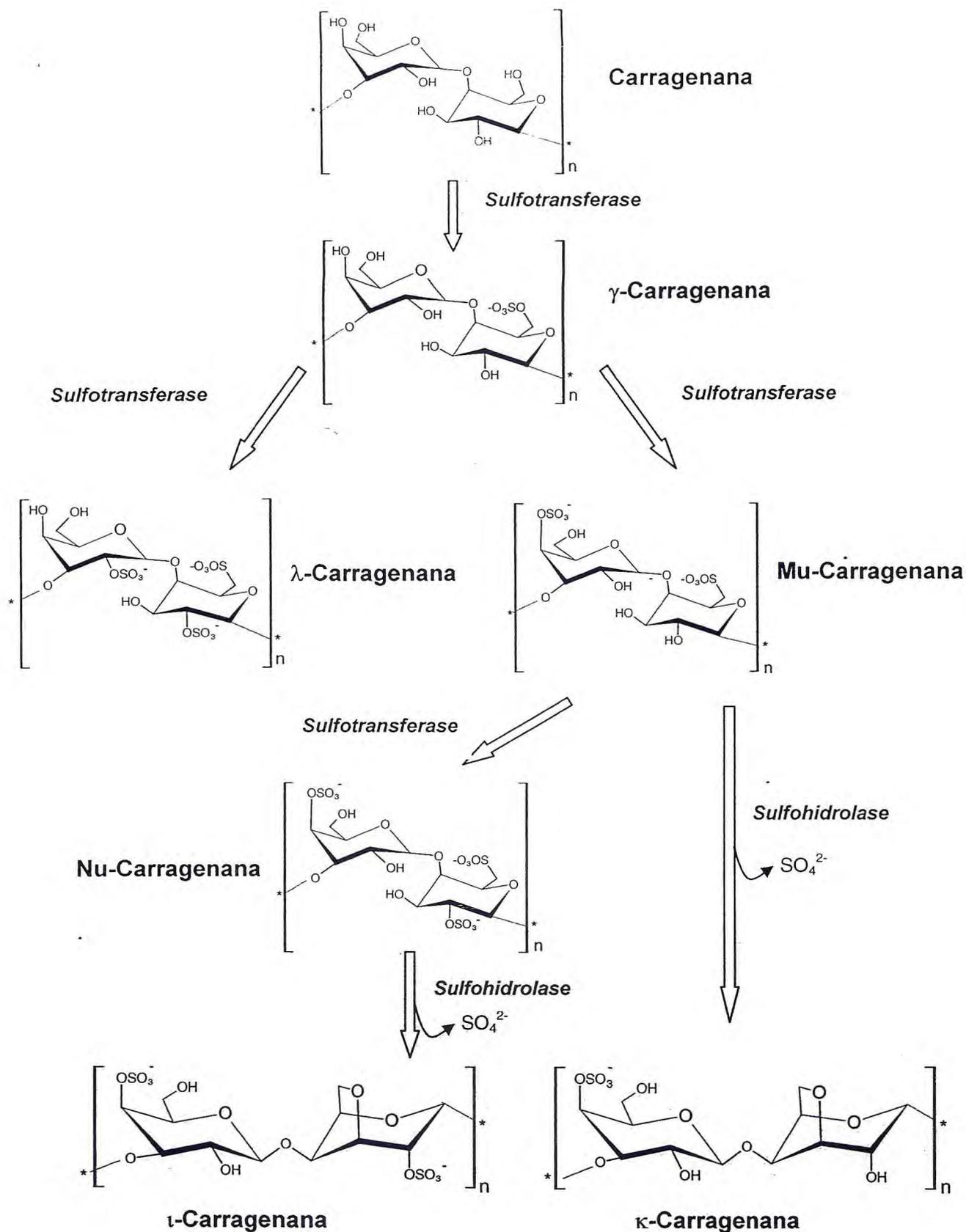


Figura 1.1.5 - Biosíntese da κ e ι -carragenana catalisadas pelas enzimas sulfotransferase e sulfatase a partir dos seus precursores bioquímicos mu e nu-carragenanas segundo Cardozo *et al.*, 2007.

Falshaw *et al.*, 2001 estudaram os tipos de carragenanas biossintetizadas pelas algas vermelhas *Sarcothalia crispata* e *Gigartina skottsbergii* nos estágios gametofíticos e esporofíticos. Os resultados mostraram que os extratos de algas gametofíticas continham híbridos κ/ι , μ e ν -carragenanas enquanto que os extratos de algas esporofíticas continham λ -carragenana. Observaram ainda, que extrações em meio alcalino de espécies gametofíticas não continham μ e ν -carragenanas, assim como extratos de espécies esporofíticas, nas mesmas condições, continham θ -carragenana.

Comercialmente a κ -carragenana é extraída da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, conhecida comercialmente como *Eucheuma cottonii* ou simplesmente “Cottonii”, já a ι -carragenana é extraída da espécie *Eucheuma denticulatum* mais conhecida como *Eucheuma spinosum* ou ainda “Spinosum” (VAN DE VELDE *et al.*, 2002)

As algas marinhas brasileiras foram estudadas pela primeira vez, sobre o aspecto de produção de carragenana, por Saito & de Oliveira em 1990. Neste trabalho, dentre as espécies consideradas carragenófitas, encontra-se a alga vermelha *Solieria filiformis*, comumente encontrada no litoral nordestino do Brasil. Em 1997, Murano *et al.* avaliaram através de Ressonância Magnética Nuclear e Infra-Vermelho a estrutura das carragenanas produzidas por *Solieria filiformis* e *Agardhiella subulata* coletadas no Mar Piccolo, Taranto, Itália. Várias extrações foram realizadas a fim de se caracterizar os diferentes tipos de carragenanas produzidas pelas duas espécies de algas. Os rendimentos totais de extração foram de 27 e 24% do peso seco-das algas *S. filiformis* e *A. subulata*, respectivamente. Os espectros de RMN e IR mostraram que os diferentes extratos obtidos a frio e a quente continham polissacarídeos de estrutura química muito semelhantes e característicos de uma ι -carragenana (DA2S-G4S). Contudo, algumas estruturas sulfatadas no C-6, atribuídas aos precursores bioquímicos das carragenanas, foram detectadas nos espectro de RMN de amostras de *S. filiformis*, porém em pequenas quantidades. Em geral observou-se que as algas *S. filiformis* e *A. subulata* são boas fontes de ι -carragenana pura, podendo ser extraídas sem tratamento alcalino. A **Tabela 1.1.3** mostra o rendimento e os teores de sulfato e 3,6-anidro-galactose de carragenanas extraídas de espécies de algas da família Solieriaceae.

Tabela 1.1.3 - Composição química de ι -carragenanas obtidas de diferentes gêneros de algas marinhas da família Solieriaceae.

Espécie	Rendimento (%) w/w	Sulfato NaSO ₃ (%)	Conteúdo de 3,6-AG (%)	Referência
<i>Anatheca montagnei</i>	24,0	31,0	18,7	FOSTIER <i>et al.</i> , 1992
<i>Callophycus costatus</i>	20	16,3	32	CHIOVITTI <i>et al.</i> , 1997
<i>Callophycus dorsiferus</i>	17	16,2	33	CHIOVITTI <i>et al.</i> , 1997
<i>Callophycus harveyanus</i>	11	16,2	26	CHIOVITTI <i>et al.</i> , 1997
<i>Callophycus laxus</i>	26	15,9	30	CHIOVITTI <i>et al.</i> , 1997
<i>Callophycus oppositifolius</i>	12	16,2	28,5	CHIOVITTI <i>et al.</i> , 1997
<i>Callophycus tridentifer</i>	21	16,8	28	CHIOVITTI <i>et al.</i> , 1997
<i>Eucheuma denticulatum</i>	56,6	29,1	-	WAKIBIA <i>et al.</i> , 2006
<i>Eucheuma denticulatum</i>	24,0	30,7	36,1	VIANA <i>et al.</i> , 2004
<i>Eucheuma denticulatum</i>	52,5	23,5	17,9	RASOAMAZAVA 1996
<i>Eucheuma isiforme</i>	44,6	33,5	26,8	FREILE-PELEGRIN <i>et al.</i> 2006
<i>Eucheuma sp.</i>	57,4	25,5	17,7	SAITO & OLIVEIRA 1990
<i>Eucheuma spinosum</i>	35,0	33,1	20,4	FOSTIER <i>et al.</i> , 1992
<i>Eucheuma striatum</i>	46,5	20,9	17,4	RASOAMAZAVA, 1996
<i>Meristiella echinocarpa</i>	59,1	27,0	21,9	SAITO & OLIVEIRA, 1990
<i>Meristotheca gigartinoides</i>	58,0	31,4	21,3	SAITO & OLIVEIRA, 1990
<i>Meristotheca senegalensis</i>	36,0	29,8	14,6	FOSTIER <i>et al.</i> , 1992
<i>Solieria filiformis</i>	50,8	30,1	21,5	SAITO & OLIVEIRA, 1990
<i>Solieria robusta</i>	40,0	31,1	-	CHIOVITTI <i>et al.</i> , 1999

(-) Não determinado

1.2. OBJETIVO GERAL

O presente capítulo tem como objetivo avaliar a estrutura química dos carboidratos extraídos de *Solieria filiformis* com ênfase no rendimento e na estrutura química de carragenanas com a finalidade de estabelecer um comparativo com a estrutura química de carragenanas comerciais.

1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair e avaliar o rendimento de extração de carragenanas da alga marinha *S. filiformis* provenientes de bancos naturais cearenses;
- ✓ Determinar a estrutura química das carragenanas de *S. filiformis* e da κ -carragenana comercial;
- ✓ Estabelecer um comparativo entre as carragenanas de *S. filiformis* e comercial.

1.3. MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1. MATERIAIS

1.3.1.1. Algas Marinhas

A alga marinha vermelha da espécie *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae), (Figura 1.3.1) foi coletada em bancos naturais do meso-litoral durante marés de sizígia (-2 à 2,0) nas praias de Fleixeiras e Pacheco, municípios de Trairi e Fortaleza, respectivamente.

1.3.1.2. Reagentes e Outros Materiais

Albumina Sérica Bovina, Coomassie Brilliant Blue G-250, Resina catiônica Dowex 50 x 8 (H⁺, 50 – 100 mesh), Dimetilsulfóxido (DMSO), Ácido Trifluoracético (TFA), D₂O (água deuterada), foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, E.U.A); Reativo para Fenol (Folin Ceocalteau) e membranas para diálise (MWCO 1000) foram obtidas da Merck, Gelatina e Agarose foram obtidas da Oxoid LTD. (Hampshire, Inglaterra); Os demais reagentes, adquiridos comercialmente, foram de grau analítico.

A ι-carragenana comercial de grau alimentício (ι-CAR) (GRINDSTED® Carrageenan CX302, Material N° 1204375, *Danisco Textural Ingredients*) foi cedida pela Fermentech Comércio de Insumos para Alimentos Ltda, São Paulo, Brasil. Essa ι-carragenana foi utilizada como referência comparativa para a carragenana obtida de *S. filiformis*.

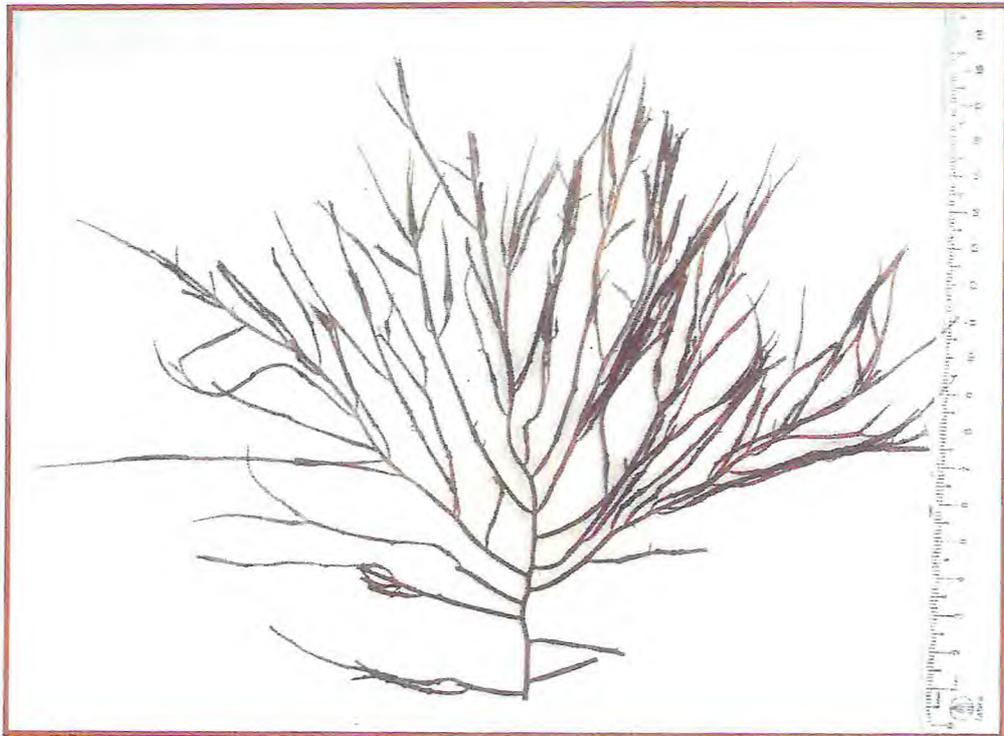


Figura 1.3.1- Alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Kützing) P.W. Gabrielson (Rhodophyta, Gigartinales, Solieriaceae).

1.3.2. MÉTODOS

1.3.2.1. Tratamento das Algas

Os exemplares da alga marinha *S. filiformis* coletadas e identificadas, foram transportados para o laboratório de Algas Marinhas II do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), em recipiente isotérmico. Após lavagem com água destilada e remoção de epífitas, o material foi exposto a temperatura ambiente até secagem.

1.3.2.2. Extração dos Carboidratos

Os carboidratos de *S. filiformis* foram extraídos segundo esquema de extração mostrado na **Figura 1.3.2**. As algas secas foram trituradas e submetidas a extrações aquosa dos carboidratos totais na concentração de 1,5% (m/v) à temperatura ambiente por 6 horas. Após filtração em tecido de *nylon*, o homogenato foi centrifugado a 3000 x g, 20°C, por 30 minutos e os carboidratos presentes no sobrenadante foram precipitados com álcool comercial (1:3, v/v) por 12 horas. Após centrifugação nas condições já citadas, o precipitado foi ressuspensão em água destilada suficiente para completa dissolução, dialisado e liofilizado (Sf-25). Já o resíduo foi submetido a uma re-extração a 90°C por 4 h, sob agitação constante. Após filtração e centrifugação nas mesmas condições, o resíduo foi separado e ao sobrenadante foram adicionados 3 mL/L de hipoclorito de sódio 2,5% seguido de precipitação dos carboidratos como descrito acima (Sf-90). O resíduo foi novamente submetido a um procedimento de re-extração nas condições já descritas, porém a 120°C por 15 min e os carboidratos obtidos desse procedimento foram denominados Sf-120. O resíduo foi descartado. As soluções para as análises químicas, estruturais e físico-químicas foram preparadas sob aquecimento a 90°C e agitação constante por 10 minutos.

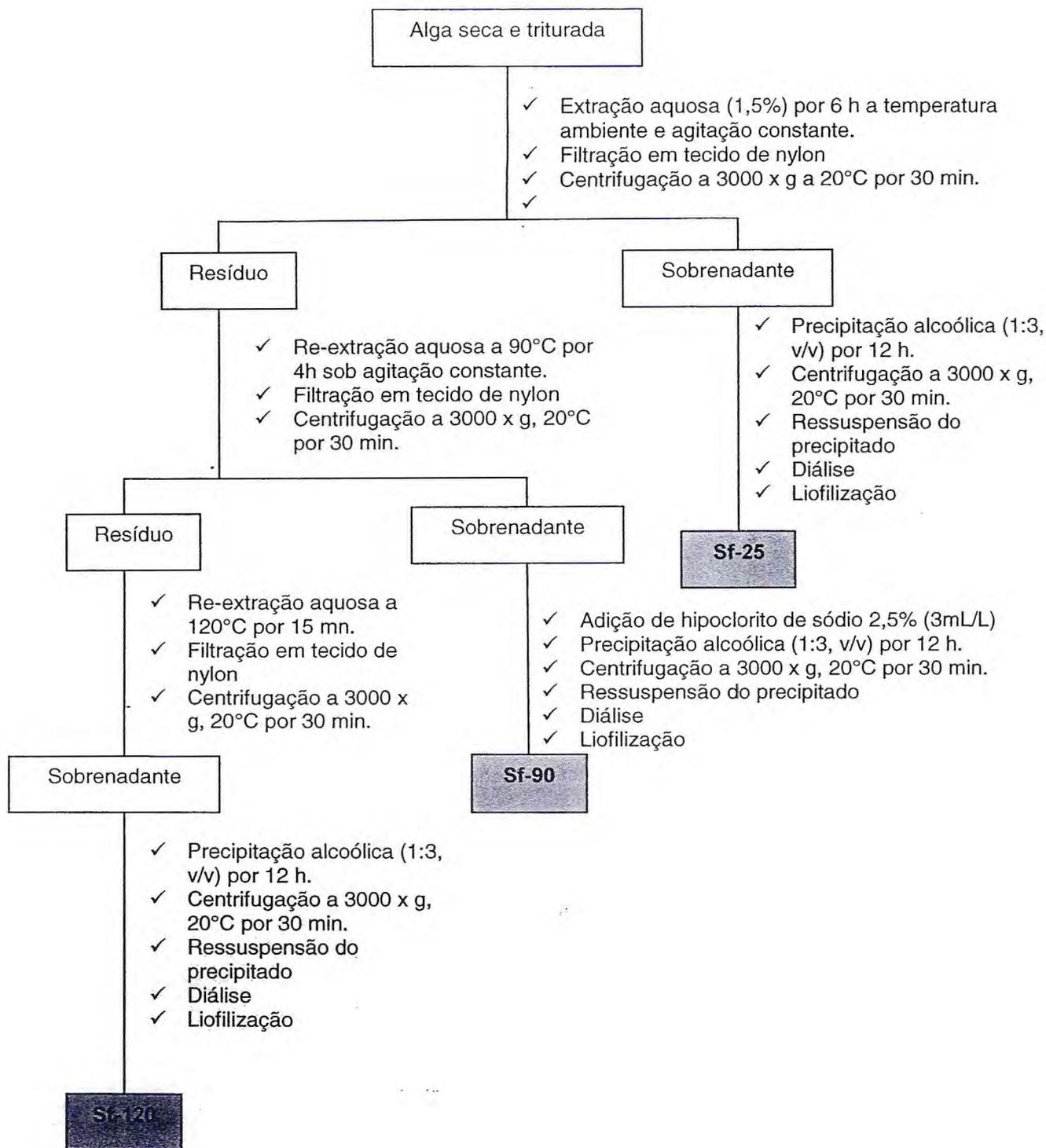


Figura 1.3.2 – Esquema de extração dos carboidratos totais de *S. filiformis*.

1.3.2.3 Determinação do Teor de Açúcares Totais

Os carboidratos totais foram determinados pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm, utilizando-se a D-galactose como padrão.

1.3.2.4. Determinação do Teor de Proteínas

As concentrações de proteínas solúveis nas soluções de carragenanas obtidas foram realizadas segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão.

1.3.2.5. Determinação do Teor de Sulfato

O teor de sulfato total foi determinado após hidrólise ácida (HCl 1M, 6 horas, 105 °C) por turbidimetria a 500 nm pelo método da gelatina-bário (DODGSON, 1961). Foi empregado o sulfato de sódio como padrão. Neste método, o sulfato se complexa com o bário, formando sulfato de bário (sal insolúvel) e a gelatina presente reduz o tempo de sedimentação do sal formado para proceder a leitura.

1.3.2.6. Determinação de Umidade

Para determinação da umidade, pesa-filtros previamente tarados, contendo amostras de Sf-90 e 1-CAR foram colocados em estufa a 110 °C por 24 horas. Ao saírem da estufa, os pesa-filtros foram levados para um dessecador onde permaneceram sobre sílica até atingirem o equilíbrio com a temperatura ambiente. Os pesa-filtros foram então pesados sucessivas vezes até que os pesos permaneceram constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo este valor expresso em percentagem.

1.3.2.7. Análise Elementar

O conteúdo de nitrogênio, carbono e enxofre de Sf-90 e ι-CAR também foi determinado por microanálise elementar (Perkin-Elmer CHN 2400) e o grau de sulfatação (GS) do polissacarídeo definido como número de átomos de enxofre por unidade dissacarídica foi calculado segundo a **Equação 1** sugerida por Rochas *et al.*, 1986.. Já o conteúdo de proteína foi calculado através da percentagem de nitrogênio utilizando o fator de correção 6,25 proposto por Marks *et al.*, (1985).

$$GS = (\%S / \text{massa atômica do S}) / (\%C / \text{massa atômica do C} \times 12) =$$

$$GS = 4,5 (\%S/\%C) \tag{1.3.1}$$

1.3.2.8. Dessulfatação por Tratamento Solvólico

A dessulfatação da ι-CAR e Sf-90 foi realizada por solvólise em dimetilsulfóxido (DMSO) como descrito por Nagasawa *et al.*, 1979.

O processo de solvólise foi conduzido com as carragenanas na forma de sal de piridônio. Para a formação desse sal cerca de 200 mg das carragenanas foram dissolvidas em 80 mL de água deionizada e misturadas a 2 g de Amberlite IRA 120 (VETEC). Após neutralização com piridina, as soluções foram dialisadas exaustivamente contra água destilada e liofilizadas. Os sais de piridônio foram dissolvidos em 2,5 mL de dimetilsulfóxido/etanol (9:1, v/v) e aquecido a 80°C por 4 horas. O produto dessulfatado foi exaustivamente dialisado contra água destilada, liofilizado e utilizado posteriormente para as análises de determinação do teor de sulfato, análise elementar e RMN.

1.3.2.9. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Espectros na região do infravermelho das carragenanas foram obtidos em Espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 100, em pastilhas de KBr, na região de 4000 a 400 cm⁻¹.

1.3.2.10. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^{13}C e ^1H , HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) e DEPT 135° (*Distortionless Enhancement through Polarization Transfer*) das carragenanas foram realizados utilizando-se um sistema Bruker DRX 600 MHz com uma sonda de ressonância tríplice de 5,0 mm. As carragenanas foram dissolvidas em água deuterada a 99,9% e os espectros foram obtidos a 70 °C. Todos os deslocamentos químicos foram determinados utilizando 2,2-dimetilsilapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) como padrão interno (0,00 ppm para ^1H). As análises foram realizadas pelo Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN da Universidade Federal do Ceará.

1.3.2.11. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As distribuições das massas molares das carragenanas (ι -CAR e Sf-90) foram estimadas através de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), usando-se um equipamento SHIMADZU, com detectores de índice de refração e UV-visível a 254 nm. Uma coluna ULTRAHYDROGEL de 7,8 x 300 mm foi utilizada, com fase móvel em NaNO_3 0,1 M e fluxo de 0,5 mL/min. Amostras de 0,004 g de carragenana foram dissolvidas em 1 mL de H_2O e a estas soluções foi acrescido 1 mL de NaNO_3 0,2 M. O volume injetado das amostras e dos padrões foram de 50 μL . Para construção da curva de calibração foram utilizadas Pululanas de diferentes massas molares.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A alga marinha vermelha *S. filiformis* foi submetida a extrações aquosas dos carboidratos totais a temperatura ambiente, a 90 e 120°C segundo procedimento descrito previamente. O rendimento total de carboidratos foi de 32,7% do peso seco da alga seca. Desse total 1,4% foi obtido a temperatura ambiente (Sf-25), 98,2% a 90°C (Sf-90) e 0,4% a 120 °C (Sf-120). Assim sendo, diante do pequeno rendimento das frações Sf-25 e Sf-120, as análises de caracterização química e estruturais foram direcionadas apenas à fração polissacarídica de maior rendimento (Sf-90).

O rendimento de Sf-90 (32,1% m/massa seca) está coerente com aqueles obtidos para as espécies de algas da família Solieriaceae, as quais apresentaram rendimentos totais de ι -carragenana que variaram de 24 a 59,1% (**Tabela 1.1.3**). No entanto, estes resultados não podem ser comparados aos rendimentos de carragenanas (50,8% m/m de alga seca) obtidos de *S. filiformis* por Saito e Oliveira (1990) e Murano *et al.* (1997). Estes autores utilizaram esquemas com pré-extrações etanólicas e re-extrações extensivas que não permitem comparações.

No aspecto econômico, o rendimento e os teores de sulfato e 3,6-anidrogactose de uma galactana são parâmetros importantes para a caracterização das suas propriedades reológicas e possível utilização industrial.

Os açúcares totais da Sf-90, determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) sem hidrólise prévia, apresentaram um teor de 61,7%. Já os teores de proteína e sulfato de Sf-90 foram determinados pelos métodos descritos por Bradford (1976) e Dodgson (1961) e apresentaram valores de 1,27% e 32,2%, respectivamente.

Tais resultados sugerem uma galactana altamente sulfatada coerente com as galactanas obtidas de *S. filiformis* coletadas no litoral da Paraíba e Espírito Santo (SAITO & OLIVEIRA, 1990).

Para fins comparativos, a amostra de ι -carragenana já comercializada e utilizada industrialmente (ι -CAR) também foi submetida às análises descritas acima e revelaram teores de 50,3% de açúcares totais e 31,4% de sulfato. Não foram detectadas proteínas, pelo método de Bradford (1976) nessa amostra.

Esses resultados foram confirmados quando as amostras (Sf-90 e ι -CAR) foram submetidas à análise elementar (nitrogênio, enxofre e carbono). O conteúdo de nitrogênio foi bem menor na ι -CAR (0,05%) quando comparado ao da Sf-90 (0,88%) e considerando o fator de conversão igual a 6,5 (MARKS *et al.*, 1985), o teor de proteína de ι -CAR e Sf-90 foram 0,3 e 5,5%, respectivamente. Já a relação sulfato (OSO_3^-)/dissacarídeo de Sf-90 e ι -CAR, calculada a partir da percentagem de sulfato e carbono determinadas pela análise elementar, foi de 1,4 e 1,6, respectivamente. Os teores de nitrogênio, enxofre, carbono e umidade são mostrados na **Tabela 1.4.1**.

Vale ressaltar que todos os valores apresentados acima foram calculados com base na massa úmida das galactanas Sf-90 e ι -CAR, as quais apresentaram umidade de 18,1 e 10,9%, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstram a similaridade da composição química de Sf-90 com a carragenana comercial e com as das espécies de algas da família Solieriaceae (**Tabela 1.1.3**).

1.4.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho é muito utilizada em estratégias que objetivam a identificação de estruturas de polissacarídeos. Trata-se de uma técnica interessante tanto para o meio industrial quanto acadêmico, pois conduz a um breve levantamento da estrutura química de ficocolóides que possam despertar interesse industrial.

A **Tabela 1.4.2** apresenta as atribuições de bandas encontradas em espectros de carragenanas dos tipos kappa, iota e lambda segundo Prado-Fernandes *et al.*, 2003.

O espectro de infravermelho de Sf-25 (**Figura 1.4.1**) não apresentou bandas bem definidas que sugerissem uma estrutura química definida, diferentemente do resultado obtido por Murano *et al.*, 1997 quando analisou as galactanas de *S. filiformis* extraídas a temperatura ambiente. Os sinais largos e sem definição na região entre 1000 e 1250 cm^{-1} sugerem apenas a presença de grupos sulfato como reportado por Nakamoto 1986 Apud Matsuhira & Rivas, 1993 e os

Tabela 1.4.1- Análise elementar (nitrogênio, carbono e enxofre) de Sf-90 e ι -CAR.

Carragenana	Nitrogênio (%)	Enxofre (%)	Carbono (%)	Umidade (%)	GS*
Sf-90	0,88	7,55	26,21	18,1	1,4
ι -CAR	0,05	12,87	24,06	10,9	1,6

(*) – Átomos de enxofre por unidade dissacarídica (Rochas *et al.*, 1986).

Tabela 1.4.2- Atribuições das absorvâncias de espectros de infravermelho de carragenanas kappa, iota e lambda.

Número de ondas (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Carragenanas		
		Kappa	Iota	Lambda
3400-3000	O-H	+	+	+
2920	C-H	+	+	+
1380-1355	Sulfato	+	+	+
1250-1230	O=S=O	+	+	+
1190	S=O	+	+	-
1160-1155	C-O-C	+	+	+
1125	Ligação glicosídica	+	+	+
1090	S-O	+	+	+
1080-1040	C-O + C-OH	+	+	+
1045	C-OH + S=O	+	+	+
1026	S=O em C ₂	-	+	+
1012	S=O em C ₆	-	-	+
1002	Ligação glicosídica	+	+	+
970-975	Ligação glicosídica	+	+	+
930	C-O-C (3,6-anidrogactose)	+	+	+
900-890	Grupo em C ₆ da β-D-gactose	+	+	+
850-840	C-O-S em C ₄ da gactose	+	+	-
830-825	C-O-S em C ₂ da gactose	-	-	+
820-810	C ₆ -O-S	-	-	+
805-800	C-O-S em C ₂ de 3,6 anidrogactose	-	+	-
740-725	C-O-C α(1→3)	+	+	-
705	Sulfatos em C ₄ , gactose			
615-608	O=S=O	+	+	+
580	O=S=O	+	+	+

Fonte: PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003.

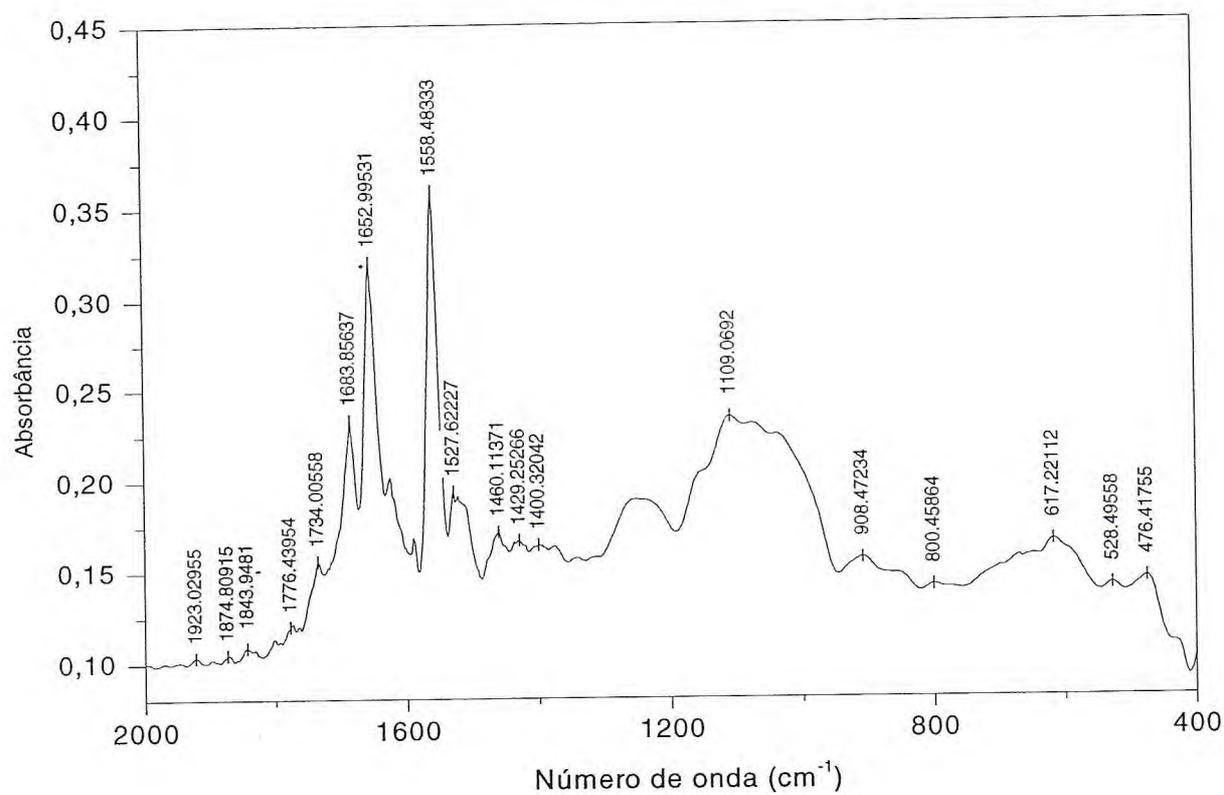


Figura 1.4.1 – Espectro de infravermelho na região entre 2000 a 400 cm⁻¹ de Sf-25 em pastilha de KBr.

sinais em torno de 1600 a 1700 cm^{-1} foram atribuídos a grupos amida de proteínas (CHOPIN, *et al.*, 1999).

Já os espectros de infravermelho de Sf-90 e ι -CAR (**Figura 1.4.2**) se mostraram bastante similares com típicas absorções intensas em torno de 1250 cm^{-1} correspondente aos grupos éster sulfato presentes em galactanas extraídas de algas marinhas vermelhas (PRADO-FERNANDEZ *et al.*, 2003). A intensidade dos picos observados concorda com os altos teores de sulfato determinados pelo método turbidimétrico descrito por Dodgson *et al.*, 1962. Apresentaram ainda bandas em torno de 850 cm^{-1} e 930 cm^{-1} correspondentes à galactopiranosose-4-sulfato (G4S) e 3,6-anidrogactose (DA), respectivamente (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003, CHOPIN *et al.*, 1999), comuns às galactanas do tipo κ e ι -carragenanas. Já a presença de uma banda bem definida em torno de 805 cm^{-1} associada a uma 3,6-anidrogactose-2-sulfato (DA2S) nos permite sugerir que a estrutura química de Sf-90 corresponde a uma ι -carragenana, assim como a similaridade do seu espectro com a de uma ι -carragenana comercial. Tal resultado corrobora com os resultados obtidos por Saito & Oliveira 1990 e Murano *et al.*, 1997.

As absorbâncias de baixa intensidade em torno de 1690 e 1425 cm^{-1} no espectro de Sf-90 foram associadas a grupos amida derivados de proteínas (CHOPIN *et al.*, 1999). Esses resultados concordam com o baixo teor de proteína da Sf-90 (1,27%) determinado pelo método de Bradford (1956) e com a presença de nitrogênio pela análise elementar. A região dos espectros de Sf-90 e ι -CAR compreendida entre 1700 e 400 cm^{-1} foi ampliada para expor as bandas de menor intensidade (**Figura 1.4.3**). Assim sendo, foi possível observar uma banda de muito baixa intensidade em torno de 970 cm^{-1} atribuído à presença de β -D-galactose-4-sulfato ligada a α -D-galactose-2-sulfato (CHOPIN & WHALEN, 1993 Apud ESTEVEZ *et al.*, 2000). Já o ombro compreendido entre 900 e 905 cm^{-1} sugere a presença da unidade β -D-galactose não sulfatada e/ou 6-O-metilada (ESTEVEZ *et al.*, 2000).

Vale salientar que não foi observada banda em torno de 867 cm^{-1} atribuída a galactose-6-sulfato 1 \rightarrow 4 ligada, indicando inexistência do precursor bioquímico da ι -carragenana. E ainda, a ausência de banda em torno de 820 cm^{-1} atribuída a sulfatação no C-6 da galactose corrobora com tal constatação (VILLANUEVA & MONTAÑO, 2003).

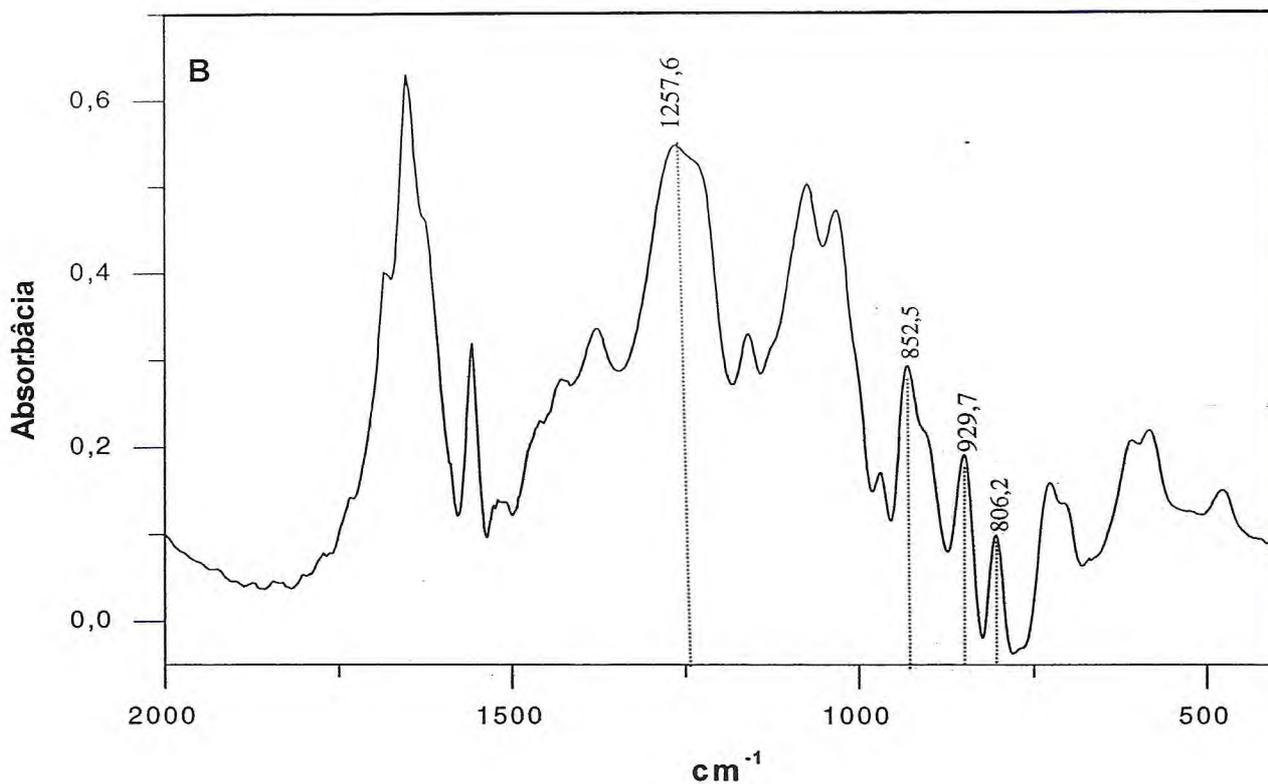
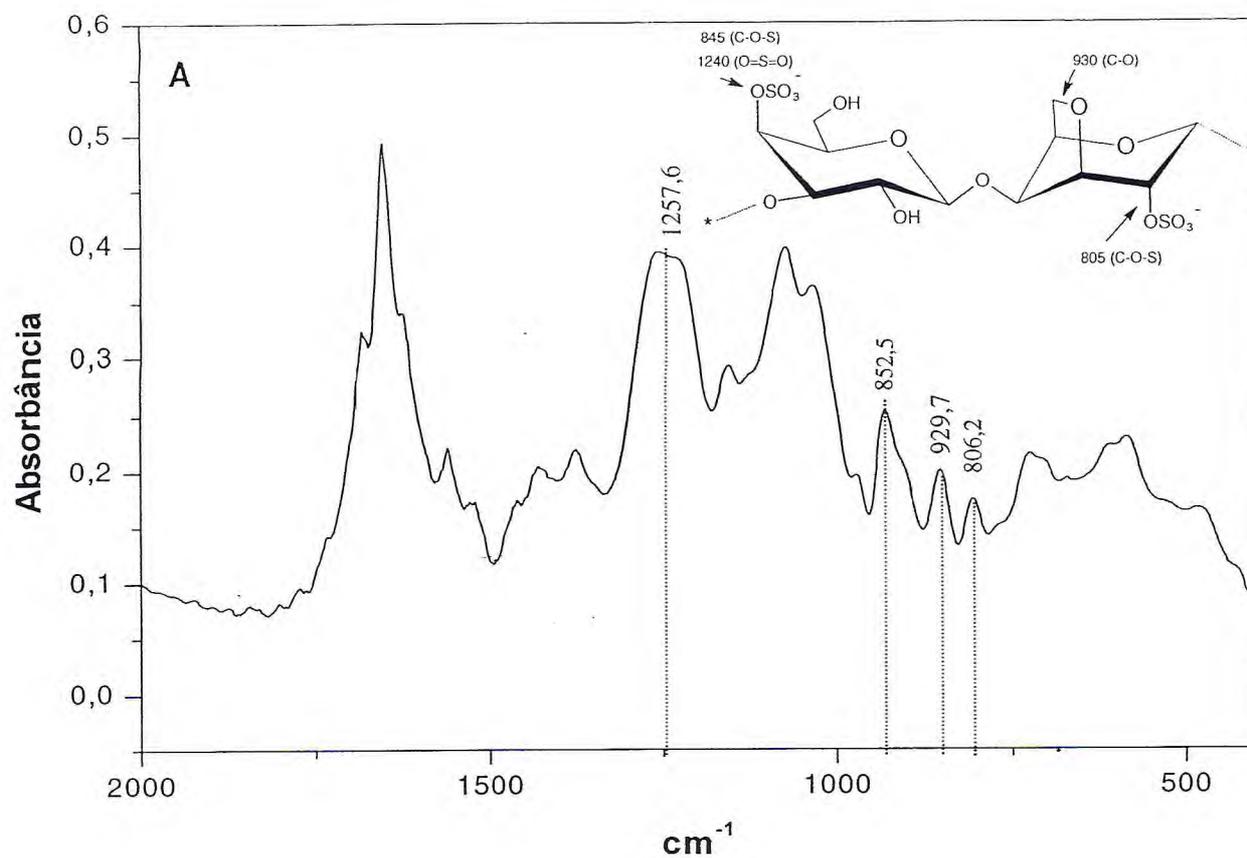


Figura 1.4.2 - Espectro de infravermelho na região entre 2000 a 400 cm⁻¹ em pastilha de KBr. A: Sf-90 e B: τ-CAR.

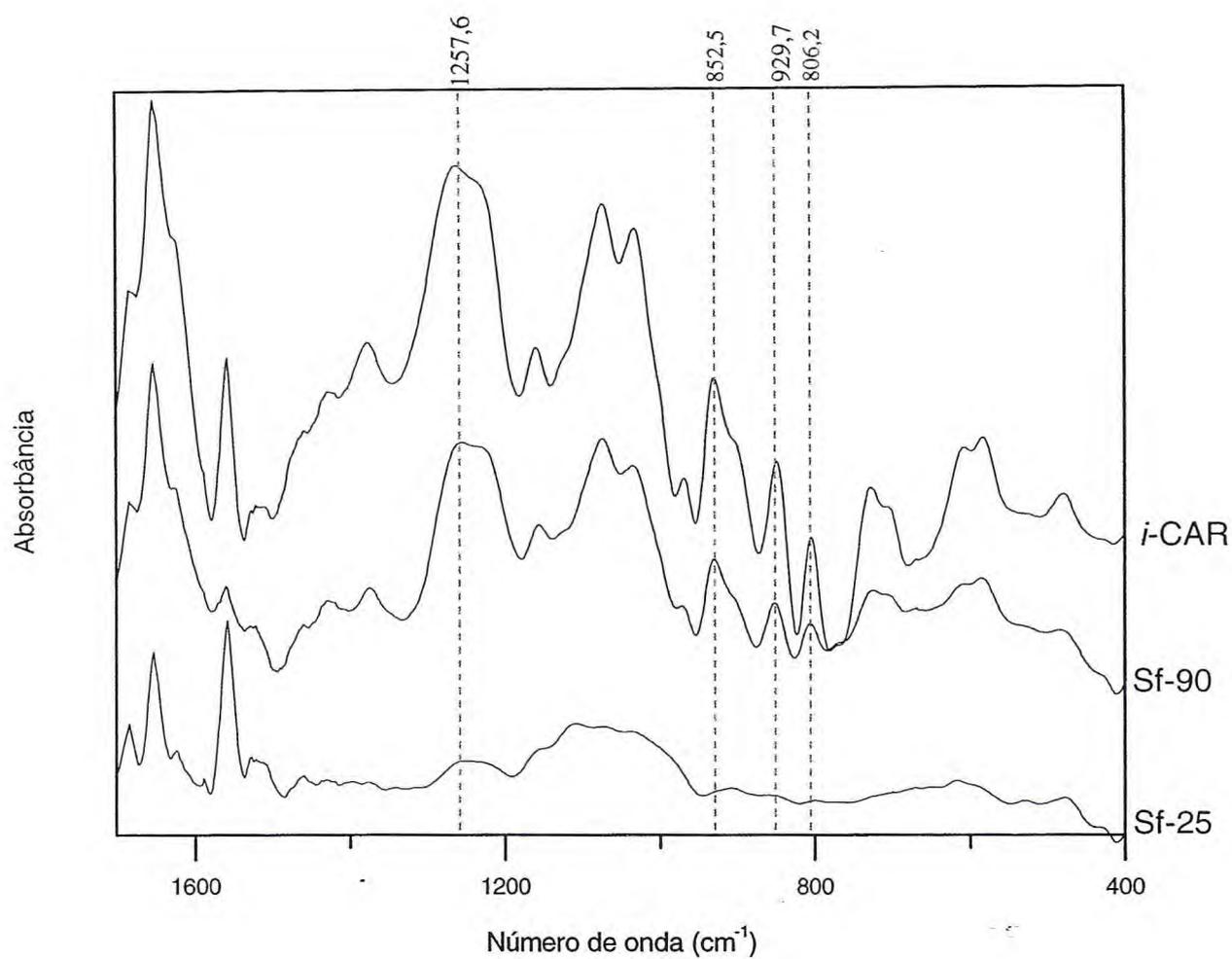


Figura 1.4.3 - Espectro de absorção na região do infravermelho compreendida entre 1700 a 400 cm⁻¹ de Sf-25, Sf-90 e *l*-CAR em pastilhas de KBr.

Assim sendo, o procedimento de extração alcalina realizado pelas indústrias, no sentido de converter os precursores bioquímicos em carragenanas geleificantes, não seria necessário para *S. filiformis*. Um simples procedimento de extração aquosa é capaz de obter um bom rendimento (32,7%) de carragenana com propriedades gelificantes, visto que não há precursores bioquímicos ou existe em quantidade insignificante. Vale ressaltar ainda que os resultados obtidos com um esquema de extração bem mais simplificado estão de acordo com aqueles obtidos por Murano *et al.* (1997) que realizaram várias extrações.

1.4.3. CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

O cromatograma de GPC da Sf-90 revelou a presença de um pico largo com volume de eluição em torno de 7,5 mL e massa molar média correspondente de $5,9 \times 10^5$ g.mol⁻¹ (**Figura 1.4.4**). Já o cromatograma da ι-CAR (**Figura 1.4.5**) revelou a presença de um pico majoritário, largo, com massa molar média de $2,1 \times 10^6$, porém subdividido em quatro picos discretos com massas molares de $5,3 \times 10^6$, $2,3 \times 10^6$, $7,1 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ g.mol⁻¹. A presença de picos largos nos cromatogramas de Sf-90 e ι-CAR está de acordo com Stephen (1995) que concluiu que os polissacarídeos de algas marinhas geralmente se apresentam de maneira polidispersa (picos largos), não possuindo massas molares precisamente definidas, mas sim, massas molares médias, representando uma distribuição de espécies moleculares bastante semelhantes em suas estruturas, porém variando no tamanho da cadeia polissacarídica.

Posteriormente, Lahaye (2001) observou que a massa molar de carragenanas comerciais demonstra uma alta polidispersividade e uma massa molar média que varia entre 300.000 e 600.000 g.mol⁻¹. A presença de grupos sulfatos nessas cadeias polissacarídicas promovem agregações intercadeias, formando gel e produzindo picos polidispersos.

Com base nestes dados podemos sugerir que as carragenanas de *S. filiformis* e comercial são sistemas heterogêneos, formados por cadeias polissacarídicas de altas massas molares, semelhante ao observado para outros polissacarídeos provenientes das algas marinhas *Gymnogongrus griffithsiae* (FARIA, 2002), *Gracilaria ornata* (AMORIN, 2005), *Gelidium crinale* (PEREIRA *et al.*, 2005), *Gracilaria*

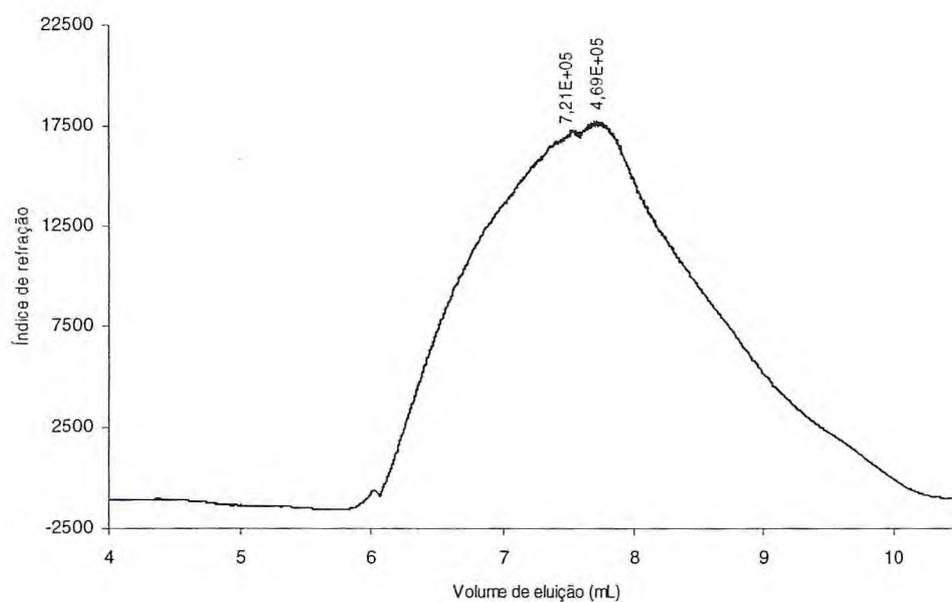


Figura 1.4.4 - Cromatograma de Permeação em Gel (GPC) em solução de NaNO_3 0,1 M da Sf-90 0,2%.

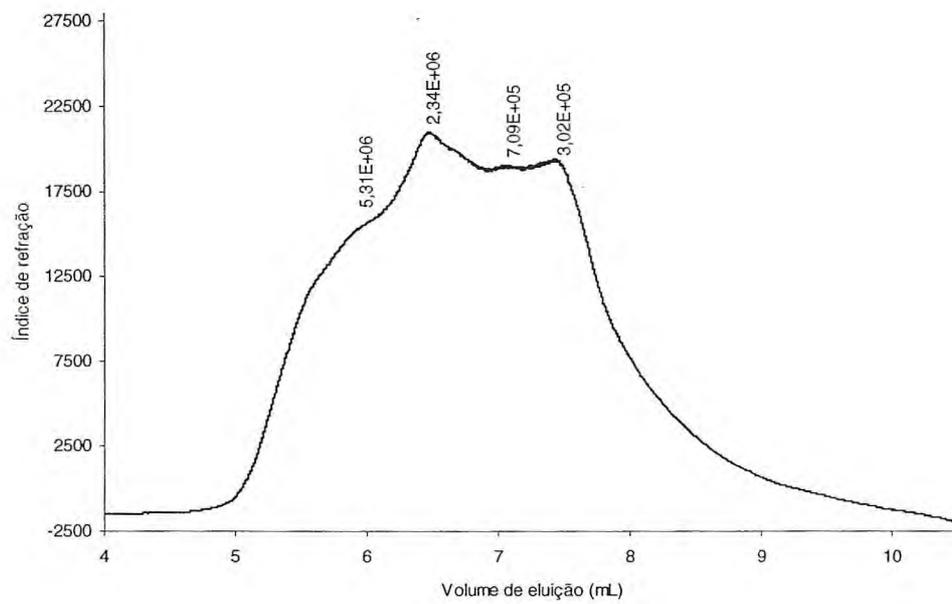


Figura 1.4.5 - Cromatograma de Permeação em Gel (GPC) em solução de NaNO_3 0,1 M da ι -CAR 0,2%.

cornea, *Agardhiella ramosissima* (MELO *et al.*, 2002) e κ e ι -carragenanas comerciais (HJERDE *et al.*, 1999).

1.4.4. ESPECTROSCOPIA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A Sf-90 e a ι -CAR foram analisadas através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Uni (1D) e Bidimensional (2D). Ambos espectros de RMN de ^1H (**Figura 1.4.6**) mostraram dois sinais principais na região anomérica a 5,30 e 4,66 ppm correspondentes a 3,6-anidro- α -D-galactose-2-sulfato (DA2S) e a β -D-galactose-4-sulfato (G4S), respectivamente (WELTI, 1977). No entanto, no espectro de Sf-90 é possível observar também um sinal de intensidade muito baixa a 5,55 ppm atribuído a α -D-galactose-2,6-disulfato (D2S-6S), precursor do DA2S e outro a 5,10 ppm correspondente ao H-1 da (DA) 3,6-anidro- α -D-galactose (CIANCIA *et al.*, 1993; MURANO *et al.*, 1997).

A principal diferença entre as duas carragenanas é a presença de um sinal relativamente intenso a 3,41 ppm atribuído ao grupo O-CH₃ de 6-O-metil- β -D-galactose-4-sulfato (G4S,6M). A intensidade do pico representou 24% da intensidade dos picos anoméricos. Esse resultado está de acordo com o padrão de metilação (> 15 mol%) encontrado em carragenanas de gêneros de algas da família Solieriaceae como *Rhabdonia*, *Erythroclonium*, *Austroclonium*, and *Areschougia* (CHIOVITTI *et al.*, 1997; 1998a e b e 2001). Nas carragenanas metiladas dos dois primeiros gêneros o éter metil ocorre na díade da ι -carragenana (G4S2M-DA2S) enquanto no outros dois gêneros a metilação ocorre na α -carragenana (G6M-DA2S). A presença de 6-O-metil-galactose-4-sulfato não foi observada por Murano *et al.* (1997) quando estudaram o polissacarídeo de *S. filiformis* coletada no litoral italiano.

A região anomérica dos espectros de RMN de ^{13}C para Sf-90 e ι -CAR (**Figura 1.4.7**) mostraram dois sinais principais que foram atribuídos segundo dados da literatura como C-1 de G4S a 102,7 ppm e C-1 de DA2S a 92,6 ppm (MURANO *et al.*, 1997; CHIOVITTI *et al.*, 1998 e 2001; USOV & SHASHKOV, 1985). A composição polissacarídica foi estimada a partir da integral dos sinais C-1. Assim sendo, as composições molares de Sf-90 e ι -CAR são respectivamente 48,1 e 42,9% de DA2S e 51,9 e 57,1% de G4S. Para comparar o conteúdo de DA2S com outras

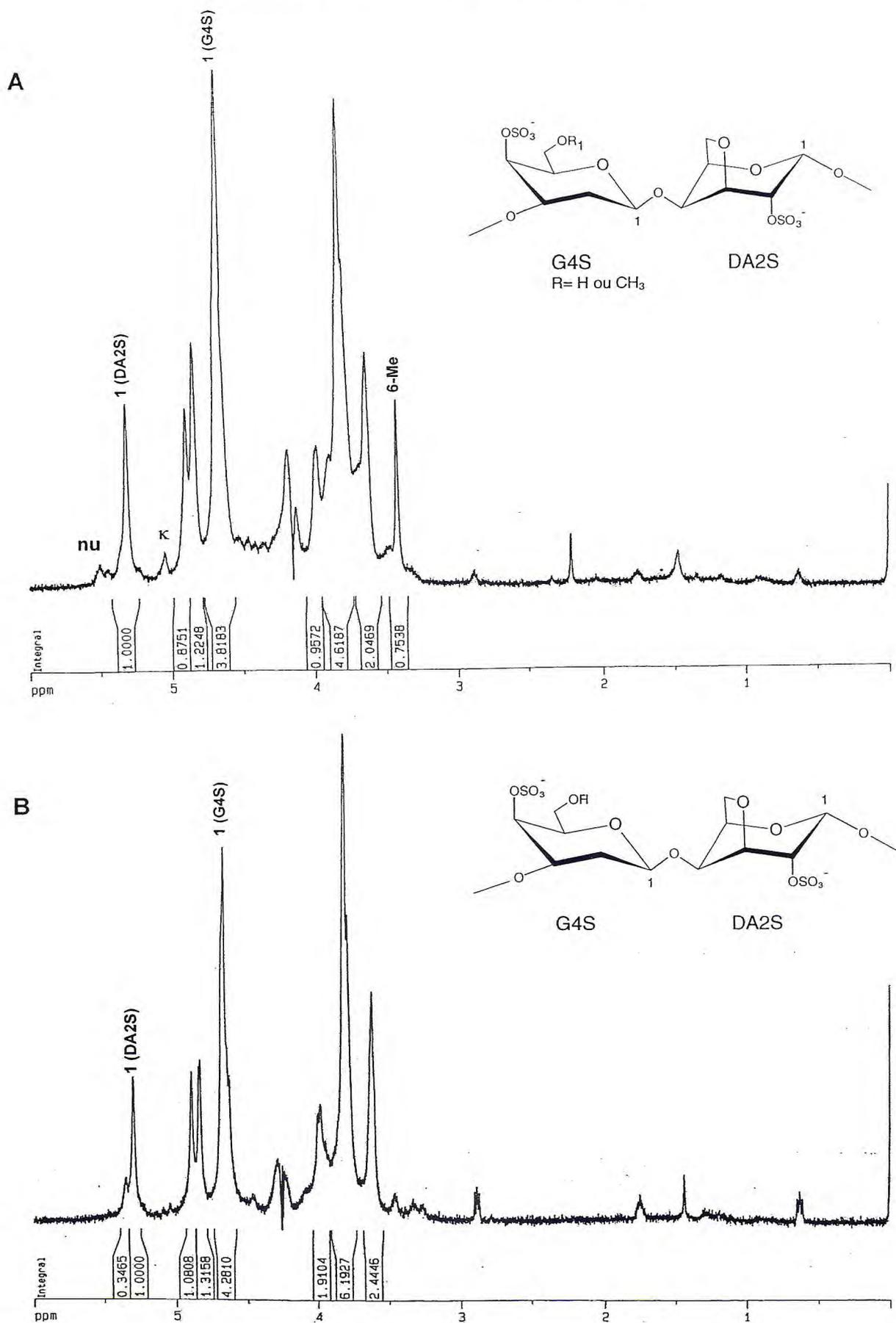


Figura 1.4.6- Espectro de RMN unidimensional de ¹H em D₂O a 60°C. A- Sf-90; B- t-CAR.

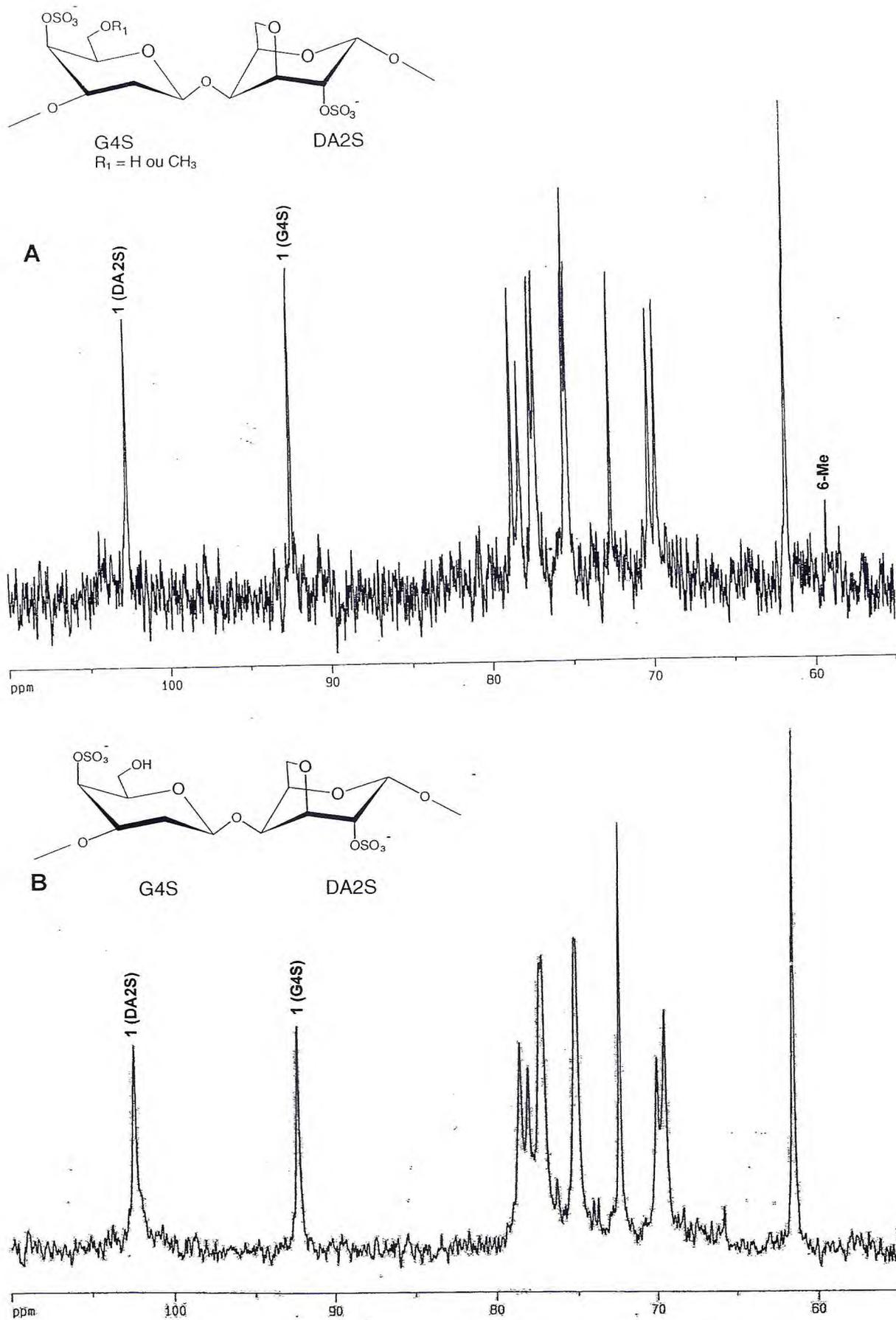


Figura 1.4.7 - Espectro de RMN unidimensional de ^{13}C em D_2O a 60°C . A- Sf-90; B- t-CAR.

espécies de algas a percentagem de massa foi calculada e a ι -CAR apresentou um conteúdo menor (20,7%) que a mostrada ela Sf-90 (23,8%).

Estes resultados estão de acordo com o conteúdo de DA2S encontrado em ι -carragenanas de espécies de algas importantes comercialmente como a de *E. spinosum* (Tabela 1.1.3). Um sinal de baixa intensidade (59,1 ppm) presente no espectro de RMN de ^{13}C de Sf-90 foi atribuído ao grupo O-metil, segundo Villanueva & Montaña, 2003.

Os espectros de DEPT 135° de Sf-90 e ι -CAR (Figura 1.4.8) mostraram dois sinais de CH_2 a 61,7 e 70,0 ppm atribuídos ao C-6 de DA2S e G4S, respectivamente.

As correlações entre $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de Sf-90 e ι -CAR observadas nos espectros de HMQC e mostradas nas Figuras 1.4.10 e 1.4.11 sugerem a estrutura química de uma ι -carragenana (FALSHAW *et al.*, 1996). No entanto, a correlação a 3,41/ 59,5 atribuído ao 6-metil-galactose-4-sulfato (G4S,6M) foi somente observado no espectro de Sf-90 e constituiu a principal diferença da ι -carragenana comercial.

O sinal intenso a 4,66 ppm presente no espectro de RMN de ^1H de Sf-90 foi uma sobreposição de sinais (CHIOVITTI *et al.*, 2004). Assim sendo, o espectro de HMQC de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de Sf-90 permitiu correlacionar apenas os sinais de H-1/C-1 de G4S (4,63/102,6) e H-2/C-2, H-4/C-4 e H-5/C-5 de DA2S (4,64/75,5; 4,66/78,7 e 4,65/77,5, respectivamente).

O procedimento de dessulfatação das amostras permitiu confirmar o padrão de sulfatação sugerido pelos espectros de Infravermelho e RMN. Se a sulfatação ocorresse somente no C-4 do resíduo de G4S da ι -carragenana, a nova estrutura desulfatada seria similar a α -carragenana (G- DA2S).

Falshaw *et al.*, 1996 mostraram que a mudança de estrutura de uma ι -carragenana (G4S-DA2S) para uma α -carragenana (G-DA2S) provoca deslocamentos dos sinais de C-2 (+4,9 ppm) e C-5 (+0,4 ppm) de G4S e C-1 (+2,5 ppm) de DA2S para campo baixo e de C-4 (-5,5 ppm) de G4S para campo alto.

Por outro lado, se a dessulfatação ocorresse somente no C-2 do resíduo de DA2S a estrutura química da ι -carragenana seria similar à estrutura da κ -carragenana (G4S-DA). Neste caso o deslocamento químico de ^{13}C para campo baixo ocorreria no C-4 de G4S (+2 ppm) e C-1 de DA2S (+3,1 ppm) e para campo alto no C-2 de DA2S (-5,1 ppm).

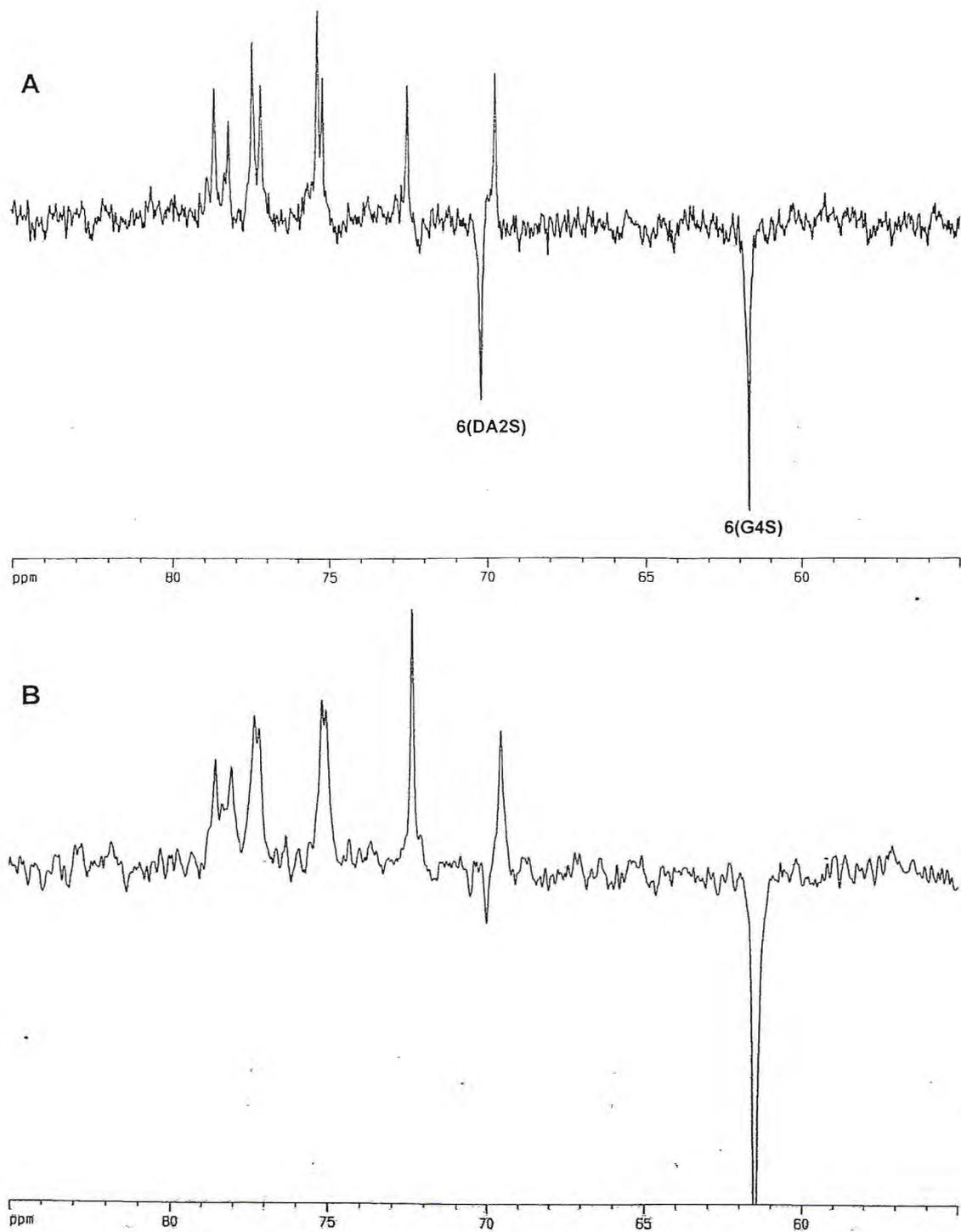
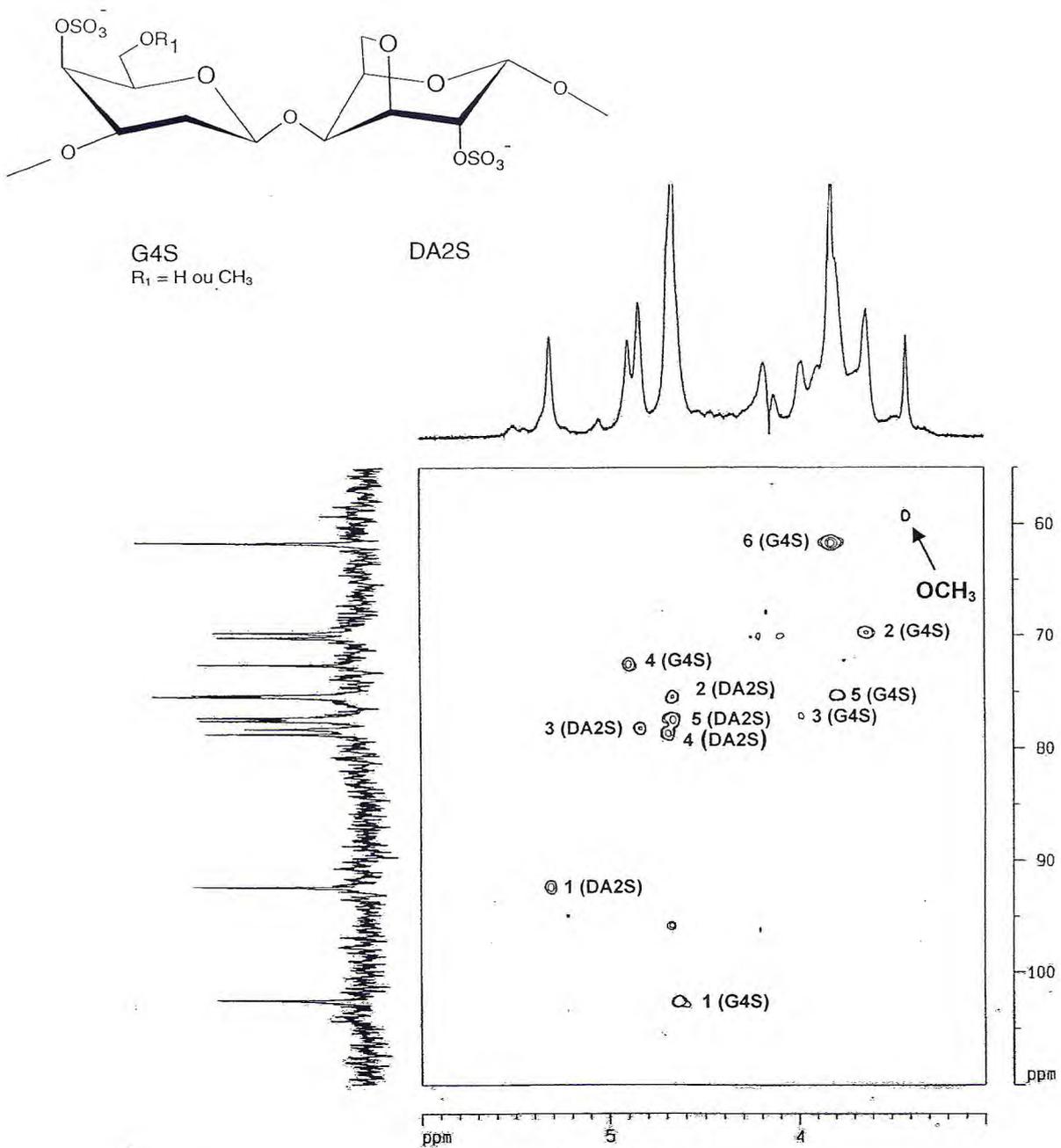
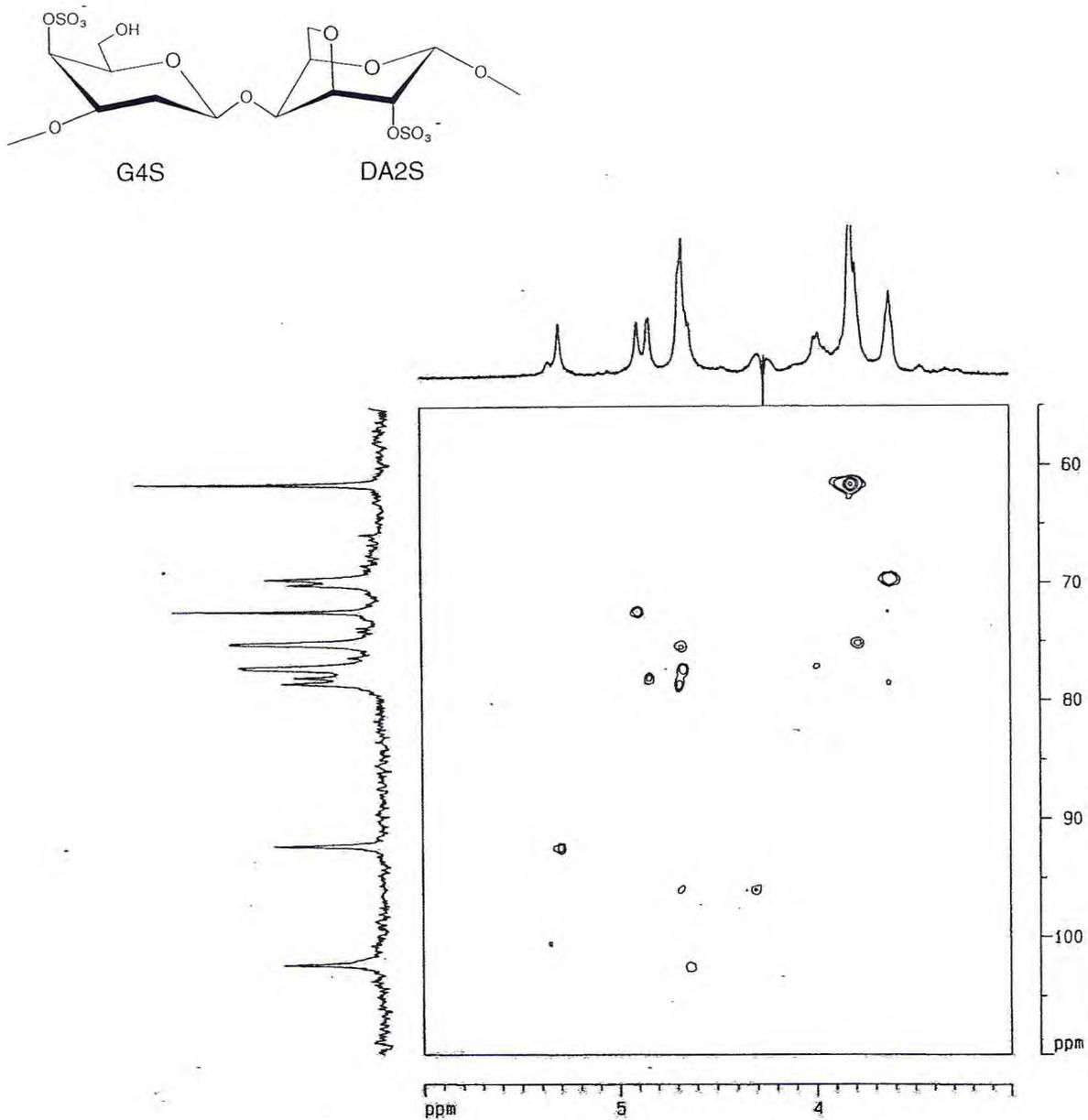


Figura 1.4.8 – DEPT 135° de ¹³C em D₂O a 60°C. A- Sf-90; B- t-CAR.



Unidade	Correlações $^1\text{H}/^{13}\text{C}$						
	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6	OCH ₃
G4S	4,61/102,6	3,61/69,8	4,02/77,2	4,86/72,5	3,81/75,2	3,79/61,7	3,41/59,5
DA2S	5,28/92,5	4,64/75,5	4,81/78,2	4,66/78,7	4,65/77,5	? /70,2	-

Figura 1.4.9 – Detalhes e correlações do espectro de HMQC de Sf-90. Atribuições segundo Falshaw *et al.*, 1996.



Unidade	Correlações $^1\text{H}/^{13}\text{C}$						
	H-1/C-1	H-2/C-2	H-3/C-3	H-4/C-4	H-5/C-5	H-6/C-6	OCH ₃
G4S	4,63/102,6	3,62/69,7	4,02/77,2	4,89/72,5	3,78/75,1	3,81/61,7	-
DA2S	5,29/92,5	4,67/75,4	4,83/78,2	4,68/78,7	4,67/77,5	-/70,2	-

Figura 1.4.10 – Detalhes e correlações do espectro de HMQC de α -CAR.

A **Figura 1.4.11** mostra o espectro de HMQC da Sf-90 dessulfatada em comparação com o espectro de HMQC da Sf-90 nativa. Como pode ser observado a dessulfatação ocorreu nos dois resíduos (DA2S e G4S) visto que os sinais correspondentes são mais intensos no espectro de HMQC de Sf-90. A ausência das correlações a 4,86/72,5 devido a H-4/C-4 de G4S e 4,64/75,5 de H-2/C-2 de DA2S confirmaram o padrão de sulfatação da carragenana de *S.filiformis* como uma α -carragenana. O padrão de sulfatação foi confirmado ainda pelas correlações de H-1/C-1 das unidades de G (5,10/95,2) e DA (4,63/102,67) que corresponderam a uma β -carragenana (FALSHAW *et al.*, 1996).

Diante dos resultados obtidos a estrutura química sugerida para Sf-90 é mostrada na **Figura 1.4.12**.

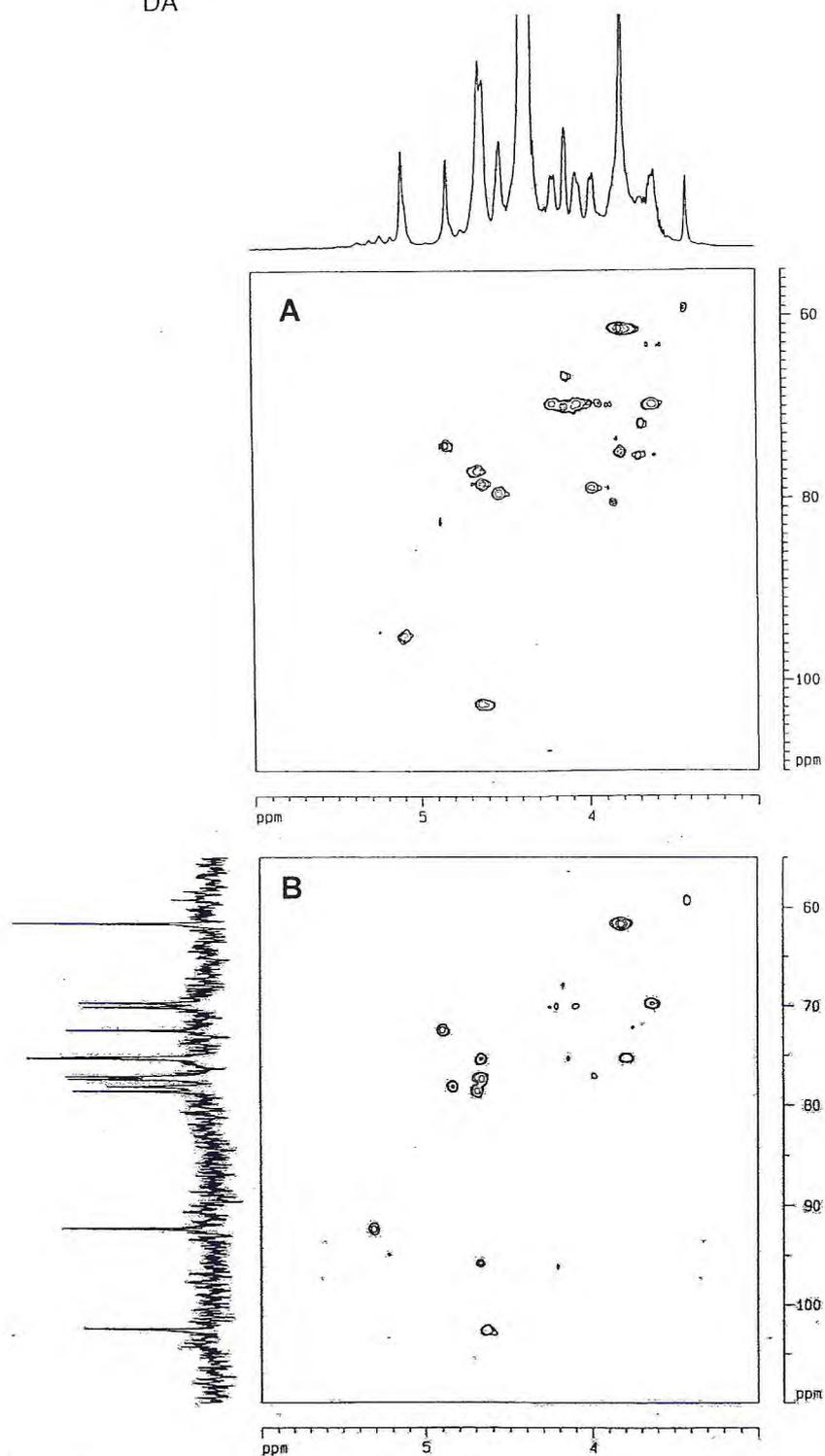
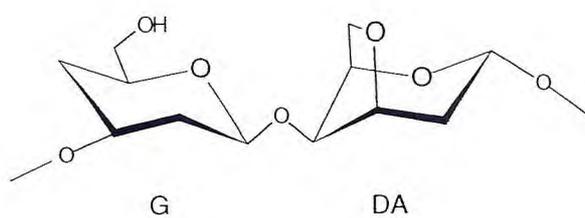


Figura 1.4.11 – Detalhes dos espectros de HMQC de Sf-90. A: Dessulfatada e B: Nativa.

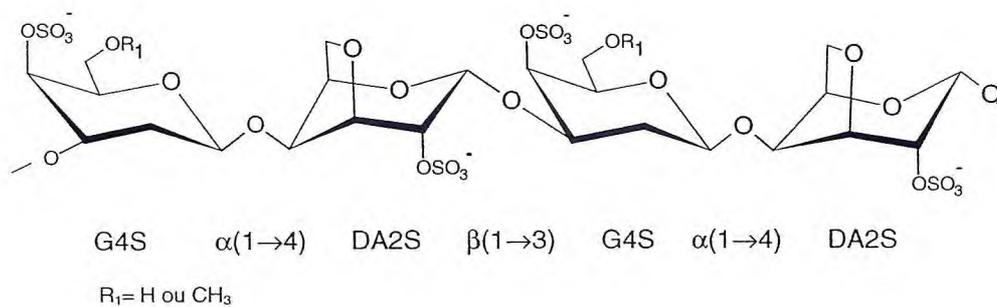


Figura 1.4.12 - Estrutura química sugerida para Sf-90.

1.5. CONCLUSÕES

O esquema de extração aquosa dos carboidratos totais de *S. filiformis* proporcionou a obtenção de um rendimento de ι-carragenana comparável àqueles utilizados para obtenção das carragenanas por extração alcalina das espécies comercializadas (*E. spinosum* e *E. denticulatum*).

A análise química de Sf-90 demonstrou um alto teor de sulfato e teor de proteína superior a ι-carragenana comercial.

Já a análise estrutural por métodos espectroscópicos de Sf-90 demonstrou que ela é constituída principalmente por uma carragenana do tipo iota (Unidade A: β-D-galactose-4-sulfato 1→4 ligada e Unidade B: 3,6-anidro-α-D-galactose-2-sulfato 1→3 ligada) com alto grau de substituição no C-6 da unidade A por grupos O-metil. A dessulfatação confirmou a posição dos grupos sulfatos nessas unidades. Apresentou ainda baixos teores de precursores biológicos e κ-carragenana.

Diante desses resultados, a alga marinha *S. filiformis* encontrada no litoral cearense é capaz de fornecer, através de extrações aquosas, uma ι-carragenana com pequenas diferenças estruturais, baixos teores de precursores bioquímicos e baixos teores de κ-carragenana quando comparada a ι-carragenana já comercializada.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, N. S., REES, D. A. Porphyrin: a polysaccharide with a masked repeating structure. **Journal Chemistry Society**, p. 5880-5887, 1965.

ARAKI, C., HIRASE, S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XXI Reinvestigation of methylated agarose of *Gelidium amansii*. **Bulletin of Chemistry Society Japanese**, v.36, p. 291-295, 1960.

ASPINALL, G. O. **Polysaccharides**. First edition. Pergamon Press, New York, p. 228, 1970.

BERCHEZ, F. A. S., PEREIRA, R. T. L. & KAMIYA, N. F.,. Culture of *Hipnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) on artificial substrates attaches to linear ropes. **Hidrobiologia** v. 260/261. p. 415-420, 1996.

BERCHEZ, F. A. S. & OLIVEIRA, E. C. Maricultural essays with the carrageenophyte *Hypnea musciformis* in São Paulo, Brasil. In: OLIVEIRA, E. C. & KAUTSKY, N. **Cultivation of seaweeds in Latin América**. São Paulo, Universidade de São Paulo, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARDOZO, K. H. M., GUARATINI, T., BARROS, M. P., FALCÃO, V. R., TONON, A. P., LOPES, N. P., CAMPOS, S., TORRES, M. A., SOUZA, A. O., COLEPICOLA, P., PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007.

CASES, M. R., STORTZ, C. A., CERREZO, A. S. Structure of the 'corallinans'-sulfated xylogalactans from *Corallina officinalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16 (2), p. 93-97, 1994.

CASES, M. R., STORTZ, C. A., CERREZO, A. S. Methylated, sulphated xylogalactans from the red seaweed *Corallina officinalis*. **Phytochemistry**, v. 31 (11), p. 3897-3900, 1992.

CHIOVITTI, A., BACIC, A., CRAIK, D. J., MUNRO, S. L. A., KRAFT, G. T., LIAO, M. Cell-wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. **Carbohydrate Research**, v. 299, p. 229-243, 1997.

CHIOVITTI, A., KRAFT, G.T. BACIC, A., D. J. CRAIK, D.J., MUNRO, S.L.A. & LIAO, M. L. Carrageenans from Australian representatives of the family Cystocloniaceae (Gigartinales, Rhodophyta), with description of *Calliblepharis celatospora* Kraft, sp. nov., and transfer of *Austroclonium* Min-Thein et Womersley to the family reschougiaceae. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 515–535, 1998a.

Chiovitti, A., Bacic, A.,D., Craik, D.J., Kraft,G.T., Liao, M.-L., Falshaw, R. & Furneaux, R.H. A pyruvated carrageenan from Australian specimens of the red alga *Sarconema filiforme*. **Carbohydrate Research**, v. 310, p. 77–83, 1998b.

CHIOVITTI, A., BACIC, A., KRAFT, G.T., CRAIK, D. J., LIAO, M. Pyruvated carrageenans from *Solieria robusta* and its adelphoparasite *Tikvahiella candida*. **Hydrobiologia**, v. 398-399, p. 401–409, 1999.

CHIOVITTI, A., KRAFT, G.T.,BACIC, A. Chemistry, properties and phylogenetic implications of the methylated carrageenans from red algae of the genus *Areschougia* (Areschougiaceae, Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 37, p. 1127-1137, 2001.

CHIOVITTI, A., BACIC, A., CRAIK, D. J., KRAFT, G. T., LIAO, M. A nearly idealized 6'-O-methylated η -carrageenan from the Australian red alga *Claviclonium ovatum* (Acrotylaceae, Gigartinales). **Carbohydrates Research**, v. 339, n. 8, p. 1459-1466, 2004.

CHOPIN, T., KERIN, B. F., MAZEROLLE R. Phycocolloids chemistry as taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae. **Phycological Research**, v. 47, p. 167-188, 1999.

CIANCIA, M, NOSEDA, M. D., MATULEWICZ, M.C., CEREZO, A.S. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota, mu/nu and lambda-series. **Carbohydrates Polymers**, v. 20, p. 95-98, 1993.

DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemistry Journal**, v. 78, p. 312-319, 1961.

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

ESTEVEZ, J. M., CIANCIA, M., CEREZO, A. S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. **Carbohydrate Research**, v. 325, p. 287–299, 2000.

FALSHAW, R., BIXLER, H. J., JOHNDRO, K. Structure nad performance of comercial Kappa-2 carrageenan extracts. I. Structure analysis. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 441-452, 2001.

FALSHAW, R., FURNEAUX, R.H., WONG, H., LIAO, M.L., BACIC, A. Chandkrachang S (1996) Structural analysis of carrageenans from Burmese and Thai samples of *Catenella nipae* Zanardini. **Carbohydrate Research**, v. 285, p. 81–98, 1996.

FARIA, P. C. S. Estrutura química de carragenanas e galactanas híbridas D/L isoladas de *Gymnogongrus griffithsiae* (Gigartilanes, Rhodophyta). **Dissertação de Mestrado**, Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, 2002.

FENICAL, W. Halogenation in Rhodophyta – Review. **Journal of Phycology**, n. 11, v. 13, p. 245-259, 1975.

FOSTIER, A. H., KORNPORST, J. M., COMBAUT, G. Chemical composition and rheological properties of carrageenans from two senegalese Solieriaceae *Anatheca montagnei* Schmitz and *Meristotheca senegalensis* Feldmann, **Botanica Marina**, v. 35, p. 351-355, 1992.

FREILE-PELEGRIN, Y. ROBLEDO, D., AZAMAR, J.A. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. I. Effect of extraction conditions. **Botânica Marina**, v. 49, p. 65-71, 2006.

FURTADO, M. R., Desequilíbrio climático abre mercado para novos hidrocolóides. **Química e Derivados**, 430, 2004.

FURTADO, M. R. Alta lucratividade atrai investimentos em hidrocolóides. **Química e Derivados**, 377, p. 20-29, 1999.

HAYASHI, L. **Extraction, yield and proprieties of Kappaphycus alvarezii (Doty) Doty ex. P. Silva carrageenan, in experimental cultivation in Ubatuba, São Paulo.** Master Degree Dissertation. University of São Paulo, São Paulo, 83 pp., 2001.

HJERDE, T., SMIDSRØD, O., CHRISTENSEN B.E. Analysis of the conformational properties of κ - and ι -carrageenan by size-exclusion chromatography combined with low-angle laser light scattering. **Biopolymers**, v. 49: 71–80, 1999.

KLOAREG, B. & QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of matrix polysaccharides. **Oceanography Marine Biology Annual Review.**, Winchester, v. 26, p. 259-315, 1998.

KNUTSEN, S.H., MYSLABODSKY, D.E., LARSEN, B., USOV, A.I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica Marina**, v. 37, p. 163-169, 1994.

LAHAYE, M. Development on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology.**, v. 13, p. 173-184, 2001.

LIRASAN, T. & TWIDE, P. Farming *Eucheuma* in Zanzibar, Tanzania. **Hidrobiologia**, v. 260/261, p. 353-355, 1993.

PAINTER, T. J., Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PAULA, E. J. **Marinomia da alga exótica, *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) para a produção de carragenans no Brasil.** Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo, SP, 39 pp, 2001.

PAULA, E. J. & PEREIRA, R. T. L. Factors affecting growth rates of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. Silva (Rhodophyta, Solieriaceae) in subtropical waters of São Paulo State, Brasil. In: CHAPMAN, A. R. O., ANDERSON, R. J., VREEDLAND, V. J. & DAVISON, I. R. (Eds). **Proceeding of the 17th international seaweed symposium**, Cap Town. Oxford. Oxford University Press. p. 381-388, 2003.

MARKS, D. L., BAUM, R. B., SWAIN, T. Measurement of total protein in plant samples in the presence of tannins. **Analytical Biochemistry**, 147, 136–140, 1985.

MATSUHIRO, B., RIVAS, P. Second-derivative Fourier transform infrared spectra of seaweed galactans. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 45–51, 1993.

MELO, M.R.S., FEITOSA, J.P.A., FREITAS, A.L.P., de PAULA, R.C.M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrates Polymers**, v. 49, p. 491-498, 2002.

McCANDLESS, E.L., WEST, J. A., & GUIRY, M.D. Carrageenan patterns in the Gigartinales, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 10, p. 275-284, 1982.

MILLER, I. J., FLASHAW, R., FURNEAUX, R. H., Structural analysis of the polysaccharides from *Pachymenia lusoria* (Cryptonemiaceae, Rhodophyta). **Carbohydrates Research**, v. 268, p. 219-232, 1995.

MILLER I. J. & BLUNT, J. W. Evaluation of the structure of the polysaccharides from *Chondria macrocarpa* and *Ceramium rubrum* as determined by C-13 NMR spectroscopy. **Botanica Marina**. n. 45, v. 1, p. 1-8, 2002.

MSHIGENI, K. E. Seaweed farming in Tanzania: A success story. In: MSHIGENI, K. E., BOLTON, J. J., CRITCHLEY, A. T., KIANGI G., Proc. First Int. **Workshop on Sustainable Seaweed Resource development in Sub-Saharan Africa**. Univ. Press, pp. 221-245, 1992.

MURANO, E., TOFFANI, R., CECERE, E., RIZZO, R., KNUTSEN, S. H., Investigation OF THE Carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiella subulata* from Mar Piccolo, Taranto. **Marine Chemistry**, v. 58, p. 319-325, 1997.

NAGASAWA, K., INOUE, Y., TOKUYASU, T. An improved method for the preparation of the chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. **Journal Biological Chemistry**, v. 86, p. 1323-1327, 1979.

NOSEDA, M.D. **Polissacarídeos sulfatados isolados da fase tetraesporofítica de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales)**. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica da UFPR, Curitiba, 180 pp., 1994.

NOSEDA, M.D., CERESO, A.S. Alkali modification of carragenans – II. The cyclization of model compounds containing non-sulfated β -D-galactose units. **Carbohydrates and Polymers.**, v. 26, p. 1-3, 1995.

OHNO, M., NANG, H. Q., HIRASE, S. Cultivation and carrageenan yield and quality of *Kappaphycus alvarezii* in the waters of Vietnam. **Journal of Applied Phycology**. V. 8, p. 431-437, 1996.

PAINTER, T. J., Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, 1983.

PEREIRA, M.G, BENEVIDES, N. M. B., MELO, M. R. S., VALENTE, A. P., MELO, F. R., MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate research**, v. 340, p. 2015 – 2023, 2005.

PRADO-FERNANDEZ, J., RODRIGUEZ-VÁZQUEZ, J. A., TOJO, E., ANDRADE, J. M. Quantitation of κ , ι and λ - carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, p. 23–37, 2003.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F. e EICHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7^a edição. Guanabara/Koogan. Rio de Janeiro, p. 248-259, 2003.

REIS, R. P., BARROS-BARRETO, M. B., CALDEIRA, A. Q. & MIRANDA, A. P. S. Cultivo de algas vermelhas de interesse comercial na Ilha da Marambaia, Rio de Janeiro, Brasil. In: **Anais da Reunião Brasileira de Ficologia**, v. 10, p. 289-300, 2005.

ROBINSON, R.K., Algae as a crop. **World crops**, n. 32, v. 1, p. 9-14, 1980.

ROCHAS, C., LAHAYE, M. & YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared-spectroscopy, **Botanica Marina**, v. 29, n. 4, p. 335 – 340, 1986.

SAITO, R. M., & OLIVEIRA, E. C. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. **Hydrobiology**, v. 204/205, p. 585-588, 1990.

STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their Applications**. Department of Chemistry, Universiti of Cape Town, Rondebosch, South Africa. Marcel Dekker Inc. New York, USA, 1995.

STORTZ, C.A., CASES, M.R., CEREZO, A.S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa*. **Carbohydrates and Polymers.**, v. 34, (1-2) p. 61-65, 1997.

STORTZ, C.A., CEREZO, A.S. Novel findings in carragenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Current Topics in Phytochemistry.**, v. 4, p. 121-134, 2000.

USOV, A.I., ELASHVILI, M. Ya. Polysaccharides of algae. Investigation of sulfated galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) using partial reductive hydrolysis. **Botânica Marina**, v. 34, p. 553-560, 1991.

USOV, A.I., IVANOVA, E.G., SHASHKOV, A.S. Polysaccharides of algae XXXIII: Isolation and ¹³C NMR spectral study of some gel-forming polysaccharides from Japan Sea red seaweeds. **Botanica Marina**, v. 26, p. 285–294, 1983.

USOV, A.I., BILAN, M.I., SHASHKOV, A.S. Structure of sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, corallinaceae). **Carbohydrates Research**, v. 303, p. 93-102, 1997.

USOV, A.I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan group. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 301-308, 1998.

USOV, A. I., & SHASHKOV, A. S. Polysaccharides of algae. 34. Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J.Ag. (Rhodophyta) using ^{13}C -NMR spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 28, p. 367–373, 1985.

VAN DE VELDE, F., KNUTSEN, S. H., USOV, A. I., ROLLEMA, H.S. and CERESO, A. S., ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Food Science & Technology**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VIANA, A. G., NOSEDA, M.D., DUARTE, M. E. R., CERESO, A.S. Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota–nu hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 455–460, 2004.

VILLANUEVA, R. D., MONTAÑO, M. N. Fine chemical structure of-carrageenan from the commercially cultivated *Kappaphycus striatum*, (Sacol variety) (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Phycology**, v. 39, p. 513–518, 2003.

WAKIBIA, J. G., BOLTON, J. J., KEATS, D. W., RAITT, L. M. Seasonal changes in carrageenan yield and gel properties in three commercial eucheumoids grown in southern Kenya, **Botanica Marina**, v. 49, p. 208–215, 2006.

WELTI, D. Carrageenans. Part 12. The 300 MHz proton magnetic resonance spectra of methyl beta-d-galactopyranoside, methyl 3,6-anhydro-alpha-d-galactopyranoside,

agarose, kappa-carrageenan, and segments of iota-carrageenan and agarose sulfate. **Journal of Chemical Research**, p. 3566–3587, 1977.

Capítulo 2
Reología

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. REOLOGIA

Reologia é a ciência da deformação e do escoamento da matéria, ou seja, é o estudo da maneira, segundo a qual os materiais respondem à aplicação de uma determinada tensão ou deformação (STEFFE, 1996).

Todos os materiais possuem propriedades reológicas, de modo que a reologia é uma ciência que pode ser aplicada em diversas áreas de estudo. O estudo das propriedades reológicas dos alimentos, segundo Rao (1974, 1986), é essencial para várias aplicações que incluem desde os projetos e avaliação de processos até o controle de qualidade, a correlação com a avaliação sensorial e a compreensão da estrutura de materiais. De acordo com Steffe (1996), podem-se destacar diversas áreas na indústria de alimentos nas quais o conhecimento dos dados reológicos é essencial: a) Cálculos em engenharia de processos, envolvendo grande variedade de equipamentos, tais como bombas, tubulações, extrusores, misturadores, trocadores de calor, dentre outros; b) Determinação da funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos; c) Controle intermediário ou final da qualidade de produtos; d) Testes de tempo de prateleira; e) Avaliação da textura de alimentos e correlação com testes sensoriais.

A Reologia Clássica começa com a consideração de dois materiais ideais: o sólido elástico e o líquido viscoso. O sólido elástico é um material com forma definida que, quando deformado por uma força externa dentro de certos limites, irá retornar à sua forma e dimensões originais, após a remoção dessa força. O líquido viscoso não tem forma definida e irá escoar, irreversivelmente, com a aplicação de uma força externa (STANLEY, *et al.*, 1996 APUD TONELI *et al.*, 2005). Na reologia de sólidos, a propriedade de maior interesse é a elasticidade ao passo que, em líquidos, a viscosidade é a propriedade mais importante. A viscosidade de um material pode ser definida como a propriedade física dos fluidos que caracterizam a sua resistência ao escoamento (PARK & LEITE, 2001 APUD TONELI *et al.*, 2005).

O estudo da deformação em fluidos pode ser realizado submetendo-os a uma deformação contínua, a uma taxa constante.

Essa condição pode ser idealizada com a utilização de duas placas paralelas com o fluido colocado no espaço entre elas, como mostra a **Figura 2.1.1**.

Fluidos reais deformam-se irreversivelmente, ou seja, quando tensões são aplicadas sobre esses materiais, eles escoam. A energia da deformação é dissipada dentro dos fluidos em forma de calor e não pode ser recuperada se a tensão aplicada for cessada. Aqui é importante ressaltar que devido ao escoamento, esses materiais são estudados, segundo a reologia, pela relação entre sua taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento (VIDAL, 2000).

Segundo Ibarz e Barbosa-Cánovas (1996) a importância do conhecimento do comportamento reológico dos hidrocolóides é indispensável no dimensionamento de projetos, avaliação e operação dos equipamentos processadores de alimentos e de fundamental importância na economia de energia, o que, atualmente, se tornou extremamente importante a ponto de cada vez mais as operações de troca de calor e massa serem feitas de forma precisa.

Além disso, muitas das propriedades texturais que os humanos percebem quando consomem alimentos são basicamente reológicas na natureza, isto é, cremosidade, suculência, maciez, suavidade e dureza. A estabilidade e aparência dos alimentos freqüentemente dependem das características reológicas e de seus componentes. As propriedades reológicas também servem como um meio de controlar e monitorar um processo industrial (SHARMA *et al.*, 2000).

A crescente necessidade e procura dos parâmetros reológicos para os diversos fluidos manipulados nas indústrias de processamento está ligada também a grande importância econômica que estes fluidos e equipamentos de manipulação representam atualmente (VIDAL, 2000).

Um fluido define-se como uma substância que se deforma continuamente quando se submete a um esforço constante, sem se importar quão pequeno seja este esforço.

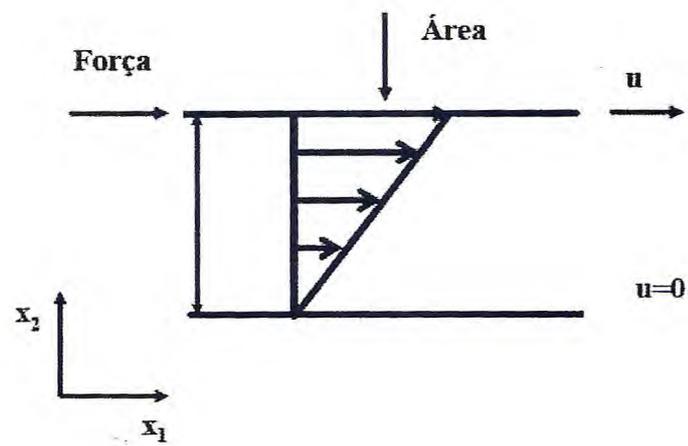


Figura 2.1.1. - Perfil de escoamento de um fluido entre placas paralelas (cisalhamento), segundo Steffe, 1996. u = velocidade.

De todas as propriedades dos fluidos, a viscosidade requer uma maior atenção no estudo do fluxo de um fluido (STREETER, 1996). A viscosidade é a propriedade do fluido que descreve a magnitude da resistência devido às forças cisalhantes dentro do fluido (SHARMA *et al.*, 2000).

As propriedades reológicas de fluidos classificados como Newtonianos são independentes da taxa de cisalhamento e do histórico anterior de cisalhamento, e dependentes somente da composição e temperatura (VIDAL, 2000). Para um fluido Newtoniano ideal, a tensão de cisalhamento é uma função linear da taxa de cisalhamento, e a constante de proporcionalidade para esta relação μ é chamada de viscosidade Newtoniana (SHARMA *et al.*, 2000).

A equação matemática que descreve a viscosidade é dada pela **Equação 2.1.1:**

$$\mu = \sigma / \dot{\gamma} \quad (2.1.1)$$

onde:

σ = Tensão de cisalhamento (N.m² = Pa)

$\dot{\gamma}$ = Taxa de cisalhamento (s⁻¹)

μ = Viscosidade Newtoniana (Pa.s)

Muitos alimentos e bebidas, como leite, suco de maçã, suco de laranja, vinho e cerveja exibem um comportamento Newtoniano (SHARMA *et al.*, 2000).

Já os fluidos viscosos não-Newtonianos não apresentam proporcionalidade entre a taxa de cisalhamento e a tensão cisalhamento (IBARZ e BARBOSA-CÁNOVAS, 1996). Eles podem ser dependentes ou independentes do tempo. Para os fluidos não-Newtonianos independentes do tempo, à temperatura e composição constantes, a viscosidade aparente depende da taxa de cisalhamento ou da tensão de cisalhamento (RAO & RIZVI, 1986). Para fluidos não-Newtonianos o termo viscosidade é substituído

por η_{ap} que é a viscosidade aparente e é função do gradiente de velocidade (VIDAL, 2000), (Equação 2.1.2):

$$\eta_{ap} = \sigma / \dot{\gamma} \quad (2.1.2)$$

onde:

η_{ap} = Viscosidade aparente (Pa.s)

σ = Tensão de cisalhamento (N.m² = Pa)

$\dot{\gamma}$ = Taxa de cisalhamento (s⁻¹)

Dentre os fluidos de comportamento não-Newtoniano e independentes do tempo, encontram-se os pseudoplásticos, fluidos que começam a escoar sob a ação de tensões de cisalhamento infinitesimais (VIDAL, 2000). Este tipo de fluido demonstra um decréscimo na viscosidade com um aumento na tensão de cisalhamento (McCLEMENTS, 2005), sendo que a taxa de cisalhamento versus a tensão de cisalhamento forma uma linha convexa (SHARMA *et al.*, 2000). Esses fluidos em repouso apresentam um estado desordenado, e quando submetidos a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada. Quanto maior a tensão aplicada, maior será a ordenação. Conseqüentemente, a viscosidade aparente será menor (HOLDSWORTH, 1971). Alguns exemplos de fluidos pseudoplásticos são: sucos de frutas concentrados, purê de maçã, pasta de amido, proteínas e soluções de macromoléculas como hidrocolóides (RHA, 1978). A consistência desses produtos é um importante parâmetro de qualidade industrial (IBARZ e BARBOSA-CÁNOVAS, 1996).

No entanto, apesar desses fluidos serem independentes do tempo, eles podem apresentar características de fluidos dependentes do tempo como a tixotropia. Um fluido tixotrópico é aquele no qual a viscosidade aparente diminui com o tempo quando o fluido é submetido a uma taxa de cisalhamento constante. Fluidos desse tipo são conhecidos por conter pequenas partículas (cristais ou biopolímeros) que são mantidos juntos por forças fracas. O cisalhamento do material separa as partículas agregadas e então ocorre uma

menor resistência ao escoamento e a viscosidade decresce com o tempo até um valor constante ser alcançado (McCLEMENTS, 2005).

Existem modelos reológicos que são aplicados para relacionar propriedades reológicas de um fluido com grandezas práticas, como concentração, temperatura, pH, índice de maturação, entre outros. Esses modelos podem ser isotérmicos ou não isotérmicos. Dentre os mais aplicados para descrever o comportamento de fluidos pseudoplásticos estão os modelos de Ostwald-De-Waele (Lei da Potência) e o de Herschel-Bulkley (STEFFE, 1996). No primeiro caso, os índices de comportamento de fluxo e o de consistência são determinados de acordo com a **Equação 2.1.3**.

$$\sigma = k\gamma^n \quad (2.1.3)$$

onde:

k = Índice de consistência (Pa.s)

n = Índice de comportamento de fluxo (adimensional)

γ = Taxa de cisalhamento (s^{-1})

σ = Tensão de cisalhamento (Pa)

Neste caso a viscosidade aparente do fluido diminui à medida que aumenta a tensão de cisalhamento. Se na **Equação 2.1.3**, o índice de comportamento reológico n for > 1 o fluido é considerado dilatante, o qual corresponde ao fenômeno inverso da pseudoplasticidade, pois a viscosidade do fluido aumenta à medida que aumenta a taxa de cisalhamento. Se n for < 1 o fluido é considerado pseudoplástico.

Já o segundo modelo é usado para fluidos que só iniciam o processo de escoamento quando a tensão de cisalhamento aplicada supera uma tensão inicial que é própria de cada um destes materiais (VIDAL, 2000).

A relação geral que descreve o comportamento dos fluidos não-Newtonianos é :

$$\sigma = K_H \gamma^{n_H} + \sigma_{oH} \quad (2.1.4)$$

Onde:

σ = Tensão de cisalhamento (Pa)

σ_0 = Tensão de cisalhamento inicial (Pa)

K_H = Índice de consistência

n_H = Índice do comportamento do fluido (Pa.sⁿ)

γ = Taxa de cisalhamento (s⁻¹)

Esse modelo é uma forma modificada da Lei da Potência (RAO & COOLEY, 1974), ou seja, o que diferencia um do outro é a presença ou ausência do termo da tensão de cisalhamento inicial.

Atualmente, a reologia dinâmica tem sido o procedimento mais utilizado para se estudar as propriedades viscoelásticas de hidrocolóides. Os resultados são muito sensíveis à composição química e estruturas físicas de macromoléculas e portanto são muito úteis em uma variedade de aplicações incluindo a avaliação de força de géis, monitoramento de geleificação, estudos de pontos de transição solução-gel e gel-solução, avaliação de pontos de coagulação e desnaturação de proteínas, avaliação de pontos de formação de coágulos em produtos lácteos, pontos de fusão de queijos, avaliação da textura de produtos cárneos e de panificação, avaliação de tempo de prateleira de produtos alimentícios e correlações entre propriedades reológicas e percepções sensoriais humanas (STEFFE, 1996).

O comportamento viscoelástico dos fluidos pode ser determinado através de testes dinâmicos onde o fluido é submetido a movimentos oscilatórios. Tipicamente, uma deformação sinusoidal é aplicada causando níveis de tensão que são transmitidas pelo fluido. A magnitude da transmissão depende da natureza viscoelástica da substância testada. Em soluções viscosas (líquidos) a tensão é dissipada através da fricção entre as moléculas e transmitida em soluções altamente elásticas. Dessa forma o comportamento viscoelástico de fluidos diluídos, concentrados e géis é expresso na forma dos seus componentes elástico ou de estocagem (G') e viscoso ou de perda (G'') os quais variam frente a frequência, temperatura, pH, adição de sais, etc. Os géis são caracterizados por $G' \gg G''$ e a variação da relação entre esses módulos ($\tan \delta$) frente a frequência classifica um gel como forte ou fraco (STEFFE, 1996).

2.1.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS CARRAGENANAS

Vários estudos têm sido realizados para quantificar as características reológicas de hidrocolóides de alimentos (DA SILVA *et al.*, 1997; ABDELRAHIM *et al.*, 1995; DA SILVA & RAO, 1995; WHITE *et al.*, 1993; STANLEY, 1990; DICKIE & KOKINI, 1983; SANDERSON, 1981). A viscosidade dos hidrocolóides pode ser significativamente afetada por variáveis tais como taxa de cisalhamento, temperatura, pressão e tempo de agitação (MARCOTTE *et al.*, 2001).

As carragenanas têm habilidade de formar, a baixas concentrações, colóides ou géis em soluções aquosas e devido a tais propriedades elas estão entre os principais hidrocolóides utilizados na indústria alimentícia. Atuam como agentes geleificantes, estabilizantes, espessantes, emulsificantes e retentores de umidade em diversos produtos como sobremesas tipos gelatinas, geléias, carnes processadas, produtos derivados do leite, pasta de dente ou clarificante de cervejas entre outros (LAHAYE, 2001).

As diferenças estruturais observadas entre as carragenanas geleificantes (κ e ι) também são refletidas nas características físico-químicas dos géis formados de tal maneira que as κ -carragenanas formam géis duros, fortes e quebradiços, enquanto que as ι -carragenanas formam géis macios e fracos. No entanto, misturas entre os diferentes tipos de carragenanas permitem obter uma ampla gama de texturas (VAN DE VELDE *et al.*, 2001).

O mecanismo de formação de géis termo-reversíveis das carragenanas ainda não é bem elucidado. Segundo van de Velde *et al.* (2002) a geleificação das carragenanas está diretamente ligada a estrutura química do polímero. Em temperatura acima da temperatura de fusão do gel, os polímeros da carragenana existem na solução como espirais aleatórias. Durante o resfriamento da solução, uma rede de polímeros tridimensional é formada onde as hélices duplas constituem os pontos de junção das cadeias de polímero. O resfriamento adicional causa a agregação dos pontos de junção para formar a estrutura de gel tridimensional (**Figura 2.1.2**).

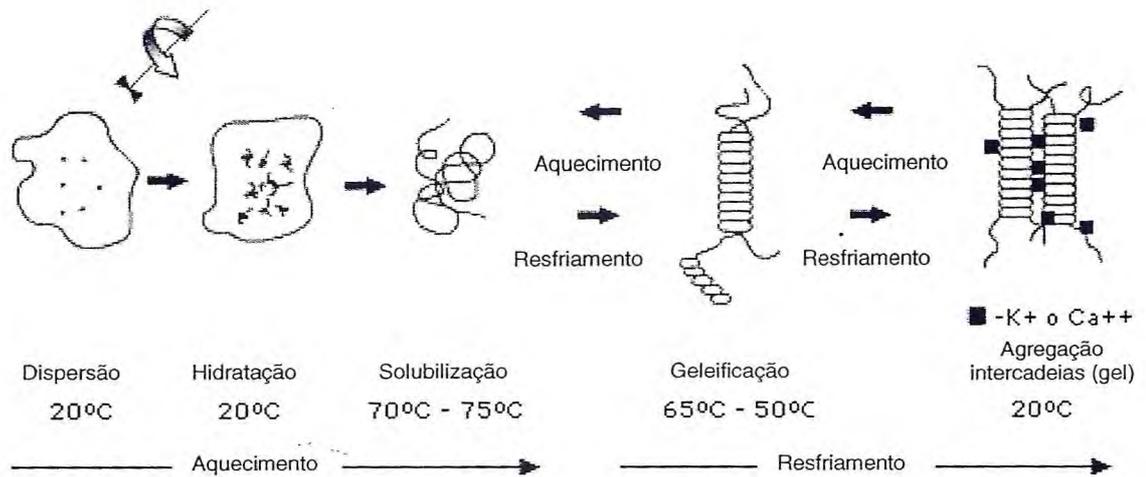


Figura 2.1.2. - Esquema ilustrativo da solubilização e formação de gel das carragenanas.

Fonte: www.gelymar.com

A conformação 1C_4 da unidade B (3,6-anidrogactose) nas κ e ι -carragenanas permite a formação da estrutura helicoidal que é essencial para a formação do gel.

No entanto, a ausência de 3,6-anidrogactose e a presença de anéis piranosídicos em conformação 4C_1 , bem como o número, tipo e posição dos grupos de éster sulfato na cadeia polimérica, têm efeitos deletérios sobre as propriedades de gelificação desse hidrocolóide, como acontece com a λ -carragenanas e os precursores μ e ν carragenanas (VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Assim sendo, tais hidrocolóides são utilizados nas indústrias alimentícias como agentes espessantes.

Diante disso, os processos industriais de extração das carragenanas do tipo kappa e iota são realizados em meio alcalino. A OH^- presente no meio catalisa a reação de ciclização dos anéis piranosídicos em conformação 4C_1 , presentes nos precursores bioquímicos μ e ν -carragenanas, respectivamente, formando 3,6-anidrogactose em conformação 1C_4 . Tal procedimento aumenta o rendimento de extração e evita danos no poder de gelificação desses hidrocolóides (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

As propriedades funcionais das carragenanas são amplamente influenciadas por diversos fatores tais como concentração de sais em solução, aquecimento e resfriamento, concentração do hidrocolóides e presença de outros biopolímeros. Variações nesses fatores afetam diretamente as temperaturas de fusão e geleificação, bem como as propriedades reológicas do gel (BAEZA *et al.*, 2002).

A kappa carragenana é sensível ao íon potássio e produz géis rígidos e quebradiços em soluções aquosas com sais de potássio. O gel de kappa carragenana apresenta sinérese (extrusão espontânea de água através da superfície do gel em repouso) e quanto maior a concentração de potássio na solução maior será a sinérese. A iota carragenana é sensível ao íon cálcio e produz géis macios e elásticos em soluções aquosas com sais de cálcio. A iota carragenana não apresenta sinérese. A força de gel é diretamente proporcional à concentração de carragenana e sais. A concentração de cátions superior a um certo limite implicará na diminuição da força de gel. O gel formado é termo-reversível e pode ser submetido a ciclos de aquecimento e resfriamento sem considerável alteração na estrutura do gel (pH neutro).

São estáveis a pH neutro ou ligeiramente ácido, mas a combinação de alta temperatura e baixo pH (valores inferiores a 3,7), produz hidrólise das moléculas provocando uma perda de viscosidade e força do gel. As temperaturas de geleificação e fusão do sol/gel dependem da concentração de cátions. O aumento da concentração de sais de potássio ou cálcio em soluções aquosas resultará no aumento da temperatura de gelificação. Os grupos sulfato presentes nas carragenanas interagem com os cátions na solução. Este mecanismo, no qual cátions causam a geleificação da carragenana em solução, envolvem o tamanho e a forma dos íons potássio e cálcio, permitindo que os mesmos encaixem-se na hélice da molécula do hidrocolóide (AGARGEL, 2005).

Uma das propriedades que diferenciam a carragenana de outros hidrocolóides é a sua habilidade de interagir com as proteínas do leite evitando a separação de fases (precipitação protéica). A alta reatividade da carragenana no leite deve-se à forte interação eletrostática entre os grupos de éster sulfato negativamente carregados da molécula da carragenana com a micela de caseína do leite que possui regiões de forte carga positiva (resíduos 97-112 da κ -caseína). Acima do ponto isoelétrico da proteína íons metálicos polivalentes atuam como pontes entre o grupo carboxil carregado negativamente da proteína e o polissacarídeo carregado negativamente devido à presença do éster sulfato (**Figura 2.1.3**). Em pH abaixo do ponto isoelétrico da proteína, semelhantes interações eletrostáticas são formadas entre o éster sulfato do polissacarídeo e os grupos amino protonados da proteína (LIN, 1977). Este fenômeno de interação e reatividade da carragenana com as proteínas do leite em combinação com sua habilidade de formar gel e reter água torna-o um ingrediente eficaz para a estabilização e geleificação de produtos lácteos.

Porém ainda existem muitos questionamentos a respeito dessa interação proteína-polissacarídeo e duas teorias têm sido propostas para explicar essa interação. A primeira, citada anteriormente, é recusada pelo fato que as micelas de caseínas são cobertas por uma camada de glicomacropéptido conferindo uma carga negativa à micela (HOLT & HORNE, 1996).

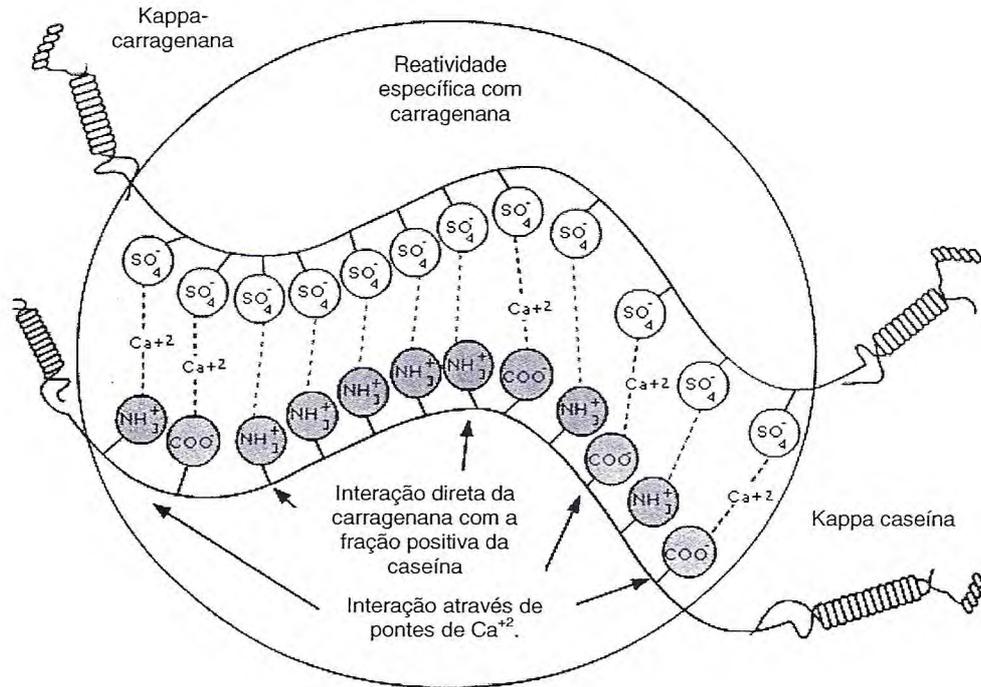


Figura 2.1.3. - Esquema ilustrativo da interação proteína-polissacarídeo sulfatado. Fonte: www.gelymar.com

A segunda defende a hipótese que a rede tridimensional formada pela carragenana (gel) abraça as micelas de caseína evitando a separação de fases e promovendo a estabilidade do sistema lácteo (BOURRIOT *et al.*, 1999).

Diante disso, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de se avaliar e entender a interação proteína-carragenana existente em sistemas lácteos. Mleko *et al.*, (1997) observaram que sob condições ácidas (pH 1-3), a adição de 0,5% de kappa-carragenana reduziu o valor de tensão de cisalhamento de géis formados por proteínas isoladas do soro de leite a concentração de 10%.

No entanto, pH superiores (5-11) favoreceram a interação proteína- κ -carragenana resultando em maiores valores de tensão de cisalhamento para o gel formado.

A concentração de proteínas no leite influencia as propriedades reológicas de géis formados por carragenana. Essa foi a conclusão obtida por Trckova *et al.* (2004) quando observaram um aumento linear na elasticidade do gel com o aumento na concentração de carragenana e um aumento quadrático na elasticidade do gel com um aumento na concentração de caseína sugerindo que a elasticidade do gel formado é influenciada pela interação proteína-carragenana.

Michon *et al.*, (2005) visando relacionar a estrutura de carragenanas com a sua habilidade de formação de hélices e gel em produtos lácteos, utilizaram amostras de ι -carragenana pura e amostras contaminada com seu precursor (nu-carragenana). Os resultados mostraram que a presença de precursores da ι -carragenana afeta suas propriedades reológicas diminuindo sua habilidade de formação de hélices e conseqüentemente gel no leite.

Estudos visando obter imagens da interação caseína- κ -carragenana por microscopia eletrônica foram realizados e os resultados observados sugerem que ambas as teorias, adsorção da κ -carragenana à micela de caseína e a formação da rede tridimensional, são responsáveis pela propriedade estabilizante do polissacarídeo em sistemas lácteos (SPAGNUOLO *et al.*, 2005).

Em sistemas cárneos, a carragenana ajuda a reter água nos espaços intersticiais do gel de proteína formado, reforçando a estrutura e conferindo uma maior firmeza ao produto final.

A kappa carragenana apresenta uma sinergia incomum com a goma de alfarroba (LBG) em sistemas aquosos. O gel obtido da mistura de carragenana com LBG apresenta um considerável aumento de força de gel, melhora na capacidade de retenção de água, redução de sinérese e uma alteração da textura do gel de quebradiça para elástica.

A iota carragenana apresenta sinergia com os amidos. Um sistema que contenha uma mistura de iota carragenana e amido apresenta um aumento de viscosidade até 10 vezes superior à viscosidade de um sistema que contenha somente o amido. Desta forma, a carragenana iota torna-se muito útil para a alteração de textura, palatabilidade e propriedades de processo de sistemas baseados em amido (AGARGEL, 2005). Recentemente, Ticher et al. (2006), verificaram que a ι-carragenana extraída da alga marinha vermelha *Meristiella gelidium* apresentou sinergia com o amido aumentando a estabilidade térmica e resultando em géis macios e termoreversíveis.

2.2. OBJETIVO GERAL

O presente capítulo tem como objetivo avaliar as propriedades reológicas da carragenana extraída da alga marinha vermelha *S. filiformis* associando essas propriedades a sua estrutura química e estabelecendo um comparativo com as propriedades estruturais e reológicas de carragenanas comerciais.

2.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar as propriedades reológicas das carragenanas obtida de *S. filiformis* e comercial, descrevendo o comportamento em termos dos modelos de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) e Herschel-Bulkley;
- ✓ Analisar a influência da temperatura e da concentração sobre o comportamento reológico das carragenanas de *S. filiformis* e comercial;
- ✓ Avaliar o comportamento da carragenana de *S. filiformis* em sistemas lácteos;
- ✓ Avaliar a força dos géis formados pelas carragenanas de *S. filiformis* e comercial através da reologia dinâmica;
- ✓ Avaliar a influência da temperatura sobre os géis formados pelas carragenanas de *S. filiformis* e comercial e associá-la a estrutura química proposta para as duas carragenanas.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. REAGENTES E OUTROS MATERIAIS

A ι -carragenana comercial de grau alimentício (ι -CAR) (GRINDSTED® Carrageenan CX302, Material N° 1204375, *Danisco Textural Ingredients*) foi cedida pela Fermentech Comércio de Insumos para Alimentos Ltda, São Paulo, Brasil. Essa ι -carragenana foi utilizada como referência comparativa para carragenana (Sf-90) obtida de *S. filiformis* que foi obtida segundo esquema de extração mostrado na **Figura 1.3.2**.

Para os ensaios de comportamento reológico em sistemas lácteos foram utilizados leites em pó integral e desnatado (Ninho e Molico, Nestlé) adquiridos no comércio local.

2.3.2. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DAS CARRAGENANAS

2.3.2.1. Reologia de fluxo

Soluções aquosas de carragenanas (Sf-90 e ι -CAR) a 0,05, 0,1, 0,5 e 1% m/v foram submetidas a análise reológica de fluxo em viscosímetro rotacional cone-placa Brookfield DV-III (modelo LV) usando geometrias CPE-40 e CPE-52 (*Brookfield Engineering Laboratories, Massachusetts, USA*) equipado com banho-maria termostatizado. As amostras (0,5 mL) foram colocadas no copo, equilibradas por 20 minutos para atingir a temperatura desejada (40°C) e então submetidas a análise através de um sistema programado de aumento linear seguido de uma diminuição linear da taxa de cisalhamento. A viscosidade aparente, a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento foram obtidas através do programa computacional Rheocalc (versão V2.3, *Brookfield Engineering Laboratories, MA, USA*).

Os modelos reológicos de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) e Harschel-Bulkley foram utilizados para caracterizar os comportamentos reológicos das soluções de Sf-90 e ι -CAR nas concentrações testadas. Os

dados experimentais e os parâmetros reológicos (n , índice de comportamento de fluxo; k , índice de consistência e R^2 , coeficiente de determinação) foram calculados através programa computacional Origin 7.0 (*OriginLab Corporation*, MA, USA).

A influência da temperatura sobre a viscosidade das carragenanas foi expressa em termos da equação de Arrhenius (3.1), envolvendo a temperatura absoluta (T), a constante universal dos gases (R), o fator exponencial e a energia de ativação de fluxo (E_a) (STEFFE, 1996):

$$\eta = \eta_0 e^{(E_a/RT)} \quad (3.1)$$

O leite para preparação das soluções lácteas de Sf-90 0,5% foi reconstituído com água destilada respeitando as proporções descritas nos rótulos dos produtos (18%, m/v para o leite integral e 10%, m/v para o leite desnatado). As soluções foram aquecidas a 90°C sob agitação constante por 10 minutos, resfriadas a temperatura ambiente e submetidas á análise do seu comportamento reológico como descrito acima.

2.3.2.1. Reologia dinâmica

Soluções de carragenanas (Sf-90 e ι -CAR) a 1, 2 e 3% foram submetidas a análise de reologia dinâmica utilizando um reômetro oscilatório Advanced Rheometer AR 550 com um sistema de controle de temperatura Pelier. As análises foram realizadas utilizando o sistema cone-placa, cujas especificações do cone eram: ângulo de 0°59'01", diâmetro de 40 mm e espaço entre placa e cone (gap) de 28 μ m. A tensão utilizada nos experimentos de rampa de frequência (0,01 – 10 Hz) e temperatura (5 – 65°C) foi de 3,0 Pa. Este valor foi compreendido na região viscoelástica linear onde a estrutura do gel foi preservada. Durante as análises de rampa de temperatura foi utilizado óleo mineral para evitar a evaporação das amostras. Os resultados foram analisados através do programa computacional Origin 7.0 (*OriginLab Corporation*, MA, USA). Os pontos dos gráficos representam a média de 2 experimentos independentes.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. REOLOGIA DE FLUXO

Os gráficos (curvas de fluxo) da tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento obtidos para Sf-90 nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 %, são mostrados na **Figura 2.4.1**. Os reogramas de Sf-90 nas concentrações de 0,05 e 0,1 mostraram um comportamento bem próximo ao Newtoniano, apresentando uma proporcionalidade entre taxa e tensão de cisalhamento. Já nos reogramas da Sf-90 nas concentrações de 0,5 e 1,0% observou-se um comportamento pseudoplástico, típico de soluções concentradas de macromoléculas como amido, proteínas e gomas (SEFFE, 1996). No entanto, nessas concentrações, é possível perceber que a curva descendente não coincide com a curva ascendente, mostrando uma certa sensibilidade da estrutura química de Sf-90 frente à aplicação de uma taxa de cisalhamento continuada. Segundo Steffe (1996) soluções que com características elásticas podem simultaneamente exibir comportamentos pseudoplástico e dependente do tempo. Tal fato também foi observado para as soluções de hidrocolóides de carboximetilcelulose (CMC) e pectina (RAMASWAMY & BASAK, 1991 e 1992).

Os reogramas de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento de ι -CAR (**Figura 2.4.2.**) mostraram um comportamento pseudoplástico, porém sem tixotropia. Em todas as concentrações as curvas ascendentes coincidiram com as curvas descendentes. Resultados semelhantes foram obtidos por Marcotte *et al.* (2001), quando estudaram as propriedades reológicas de hidrocolóides incluindo uma carragenana.

Para descrever os comportamentos reológicos de Sf-90 e ι -CAR foram utilizados os modelos de Herschel-Bulkley e da Lei da Potência e ambos proporcionaram bons parâmetros estatísticos apresentando coeficientes de determinação superiores a 0,95 para as curvas ascendentes e descendentes.

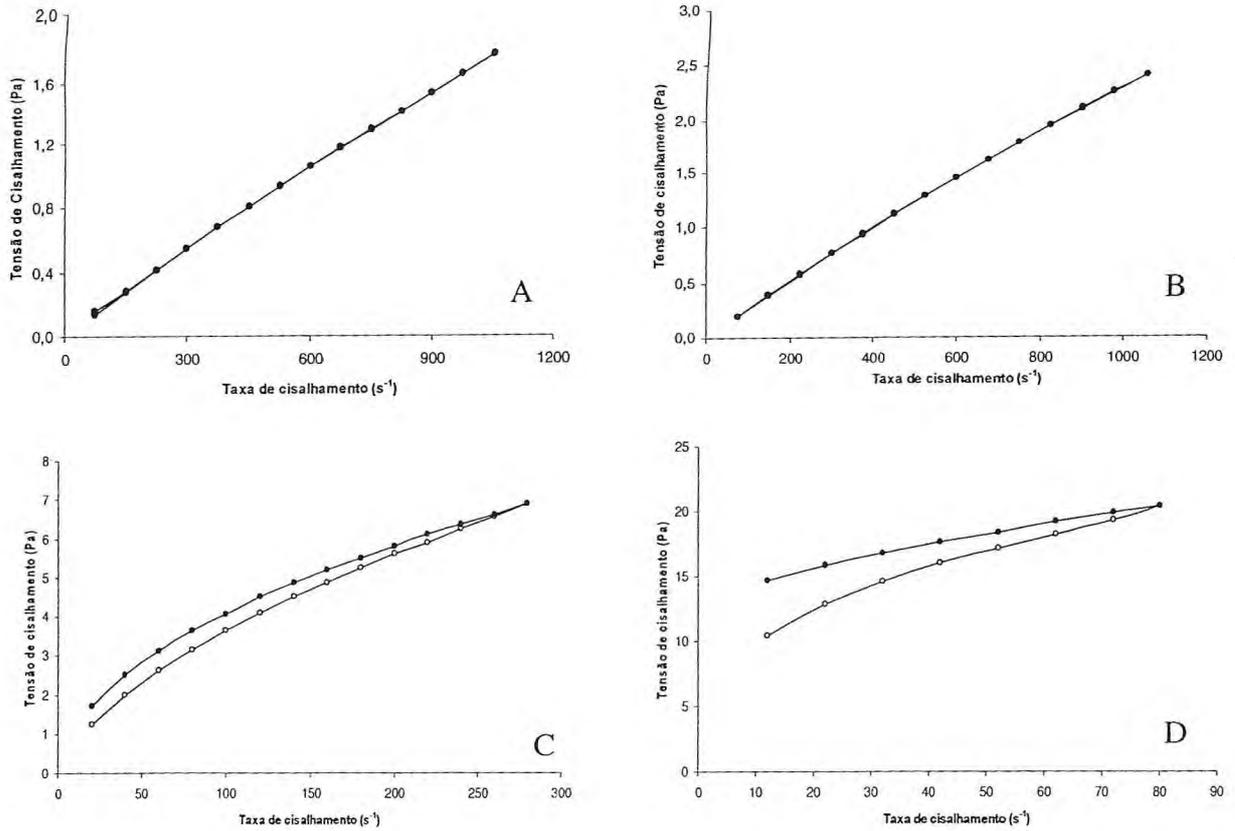


Figura 2.4.1. – Reograma da Sf-90 a 40°C a diferentes concentrações. (●—●) curva ascendente e (○—○) curva descendente. A – 0,05%; B- 0,1%; C- 0,5% e D- 1,0%.

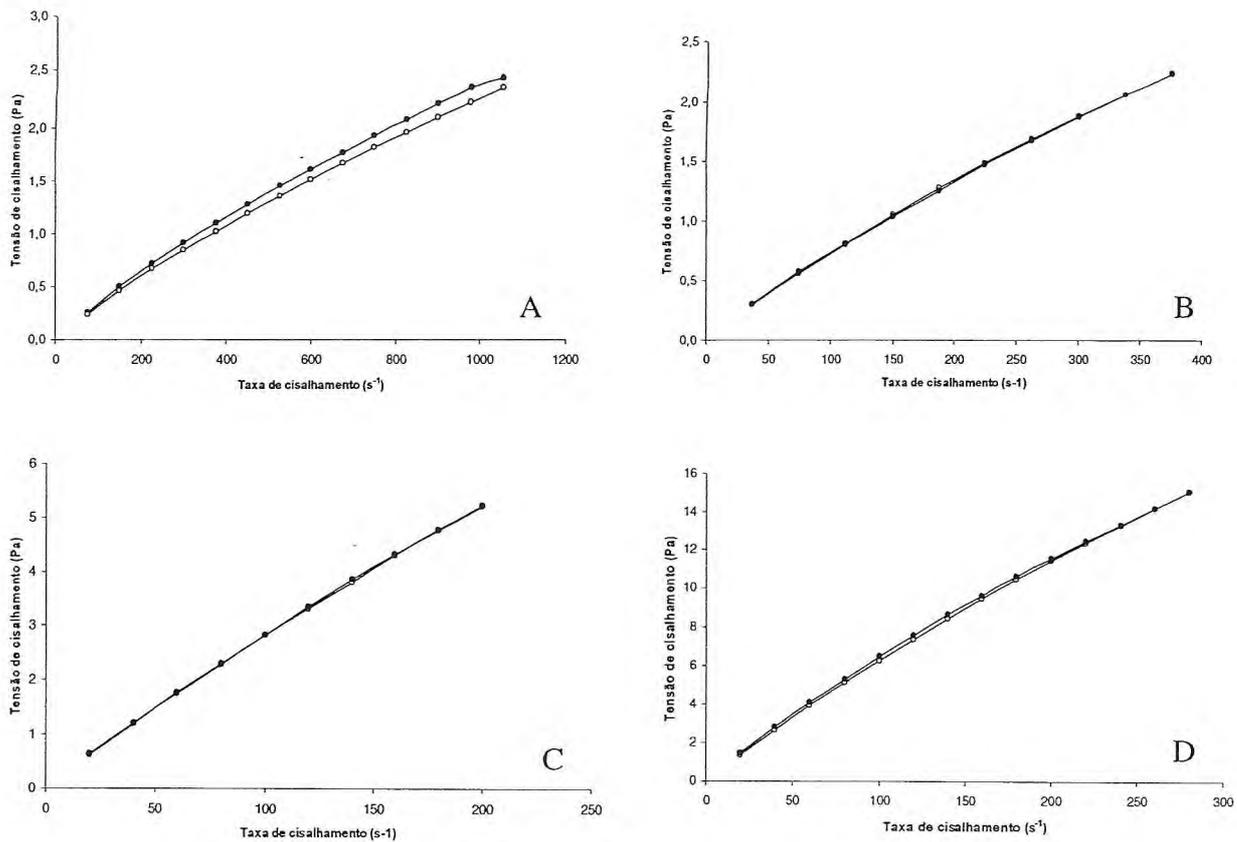


Figura 2.4.2. – Reograma da ι -CAR a 40°C a diferentes concentrações. (●—●) curva ascendente e (○—○) curva descendente. A – 0,05%; B- 0,1%; C- 0,5% e D- 1,0%.

De acordo com as Tabelas 2.4.1 e 2.4.2, a Sf-90 exibiu um comportamento pseudoplástico, devido os valores dos índices de comportamento de fluxo (n e n') serem menores que 1 ($n < 1$) nas curvas ascendentes e descendentes de todas as concentrações testadas. No entanto na concentração de 1% o valor de n para Sf-90 (0,24), segundo o modelo da lei da Potência, foi bem menor do que o observado para ι -CAR, ou seja, nessa concentração a Sf-90 apresentou uma pseudoplasticidade bem superior a ι -CAR, bem como a formação de gel. A diferença do comportamento reológico é observada também quando ambas as amostras são avaliadas pelos modelos de Herschel-Bulkley e Lei da Potência. Na concentração de 1% e temperatura de 40°C a Sf-90 apresentou tensão inicial de 5,2 Pa, parâmetro não observado na ι -CAR. Segundo Marcotte *et al.*, (2001) a carragenana comercial apresenta tensão inicial apenas em concentrações de 2 e 3% a uma temperatura de 20°C. O aumento da pseudoplasticidade de Sf-90 com a concentração é explicado pela alta massa molar desses polímeros que acentuam o grau de agregação intercadeias, aumentando a consistência das soluções (PICULELL *et al.*, 1997).

Os índices de comportamento de fluxo para ι -CAR, segundo os modelos aplicados, praticamente não variaram nas concentrações testadas e foi possível observar que os valores se situaram próximos do comportamento Newtoniano ($\sim 0,80$). No entanto, nos resultados obtidos por Marcotte *et al.*, (2001) para ι -carragenana comercial é possível perceber o aumento da pseudoplasticidade desse polímero nas concentrações de 1, 2 e 3% a 40°C. Assim sendo, diante dos valores de n observados para ι -CAR, a viscosidade aparente apresentou pequena variabilidade com o aumento da taxa de cisalhamento.

A diferença entre as duas amostras, com relação à viscosidade, é perceptível já no momento da preparação das amostras. Ao resfriar a Sf-90 forma um gel fraco enquanto a ι -CAR forma uma solução viscosa. A viscosidade aparente de Sf-90 1% a 80 s⁻¹ foi bem superior (230,54 mPa.s) quando comparada a de ι -CAR (65,45 mPa.s). No entanto, essa viscosidade foi bastante sensível ao aumento da taxa de cisalhamento

Tabela 2.4.1.: Parâmetros reológicos segundo Herschel-Bulkely e a Lei da Potência da curva ascendente de Sf-90 e τ -CAR a diferentes concentrações a 40°C.

Amostra/ Concentração	Herschel-Bulkely				Power-Low		
	σ_0 (mPa)	k (mPa s ⁿ)	n	R ²	k' (mPa s ⁿ)	n'	R ²
Sf-90							
0,05%	0	4,17±0,49	0,87±0,066	0,99973	3,14±0,001	0,91±0,007	0,99957
0,1%	0	5,37±0,19	0,88±0,004	0,99999	3,97±0,001	0,92±0,003	0,99998
0,3%	0	29,99±1,25	0,78±0,006	0,99998	19,71±0,001	0,84±0,009	0,99962
0,5%	0	499,26±23,5	0,48±0,006	0,99993	407,21±0,006	0,51±0,003	0,99977
1,0%	5.287,32±103,08	1.274,78±60,66	0,48±0,009	0,99988	5.367,99±293,9	0,24±0,014	0,96352
τ-CAR							
0,05%	0	17,23±2,31	0,72±0,017	0,99962	9,72±0,63	0,80±0,009	0,99965
0,1%	0	20,71±1,34	0,80±0,009	0,99994	15,07±0,56	0,85±0,006	0,99972
0,3%	0	31,51±4,57	0,87±0,025	0,99982	23,99±0,97	0,92±0,008	0,99976
0,5%	0	47,68±2,17	0,88±0,008	0,99996	41,48±0,85	0,90±0,004	0,99991
1,0%	0	170,33±8,53	0,80±0,008	0,99993	114,69±4,84	0,87±0,007	0,99947

Parâmetros reológicos segundo Herschel-Bulkely and a Lei da Potência, respectivamente: σ_0 , Tensão inicial; k e k', coeficiente de consistência; n e n', índice de comportamento de fluxo; \pm erro padrão de 2 replicatas.

Tabela 2.4.2.: Parâmetros reológicos segundo Herschel-Bulkely e a Lei da Potência da curva descendente de Sf-90 e ι-CAR a diferentes concentrações a 40°C.

Amostra/ Concentração	Herschel-Bulkely				Lei da Potência		
	σ_0 (Pa)	k (mPa s ⁿ)	n	R ²	k' (mPa s ⁿ)	n'	R ²
Sf-90							
0,05%	0	3,3± 0,11	0,90±0,01	0,99998	3,03±0,07	0,91±0,003	0,99992
0,1%	0	5,01±0,28	0,89±0,01	0,99994	4,00±0,12	0,92±0,005	0,99985
0,5%	0	289,02±10,61	0,57±0,01	0,99996	204,31±13,71	0,63±0,012	0,99676
1,0%	4.776,44± 50,6	1.148,53± 29,08	0,52±0,01	0,97323	3.653,33±432,26	0,34±0,027	0,96695
ι-CAR							
0,05%	0	5,91±0,26	0,86±0,01	0,99998	5,13±0,001	0,88±0,002	0,99996
0,1%	0	17,16±0,74	0,82±0,01	0,99997	14,75±0,001	0,85±0,005	0,99978
0,5%	0	62,37±5,41	0,85±0,01	0,99994	51,69±0,002	0,87±0,01	0,9995
1,0%	0	214,53±10,11	0,77±0,01	0,99993	152,39±0,004	0,81±0,005	0,99971

Parâmetros reológicos segundo Herschel-Bulkely and a Lei da Potência, respectivamente: σ_0 , Tensão inicial; k e k', coeficiente de consistência; n e n', índice de comportamento de fluxo; ± erro padrão de 2 replicatas.

como pode ser observado na **Figura 2.4.3**. A diminuição da viscosidade aparente de fluidos pseudoplásticos frente ao aumento da taxa de cisalhamento é resultado do alinhamento das cadeias poliméricas (GLICKSMAN, 1969 Apud MARCOTTE *et al.*, 2001).

O efeito da temperatura sobre a viscosidade aparente de Sf-90 1% (m/v), a uma taxa de cisalhamento de 2 s^{-1} , foi descrito segundo a equação de Arrhenius e apresentou um bom ajuste dos dados com um coeficiente de determinação de 0,98 e erro padrão de 0,08 (**Figura 2.4.4**). O valor da energia de ativação (E_a) calculado para Sf-90 foi de $117,31 \text{ kJmol}^{-1}$, bem superior quando comparado com o obtido para uma carragenana comercial a 1% a 50 s^{-1} ($30,3 \text{ kJmol}^{-1}$) (MARCOTTE *et al.*, 2001). Ainda segundo estes autores, dentre os hidrocolóides avaliados, a carragenana obteve os maiores valores de E_a com sua viscosidade aparente sendo a mais afetada pela temperatura e essa influência aumentando com o aumento da concentração. De acordo com Steffe (1996) altos valores de E_a indicam uma maior sensibilidade do polímero frente ao aumento da temperatura.

2.4.1.1. Reologia de fluxo em sistemas lácteos

A Sf-90 também foi avaliada quanto ao seu comportamento reológico frente a sistemas lácteos e os resultados são mostrados na **Tabela 2.4.3**.

A pseudoplasticidade da Sf-90 em leite integral ($n=0,39$) foi menor que em leite desnatado ($n= 0,15$) e, portanto o gel formado com o leite desnatado foi mais consistente. Em comparação com os parâmetros reológicos de soluções aquosas de Sf-90 a 0,5% e 40°C ($k = 0,407 \text{ Pa.s}^n$), segundo a Lei de Potência, é possível observar um aumento na consistência do gel formado indicado pelos altos valores de k para a Sf-90 em sistemas lácteos como o leite integral ($k = 65,7 \text{ Pa.s}^n$). E, quando comparado aos parâmetros reológicos do leite integral ($k= 0,00123 \text{ Pa.s}^n$ e $n = 1,0$ a 40°C segundo STEFFE, 1996), o aumento no valor de k e na pseudoplasticidade da carragenana em sistema lácteo é ainda mais acentuado.

Esse aumento da consistência do gel é explicado pela habilidade das carragenanas de interagir com as proteínas do leite evitando a separação de

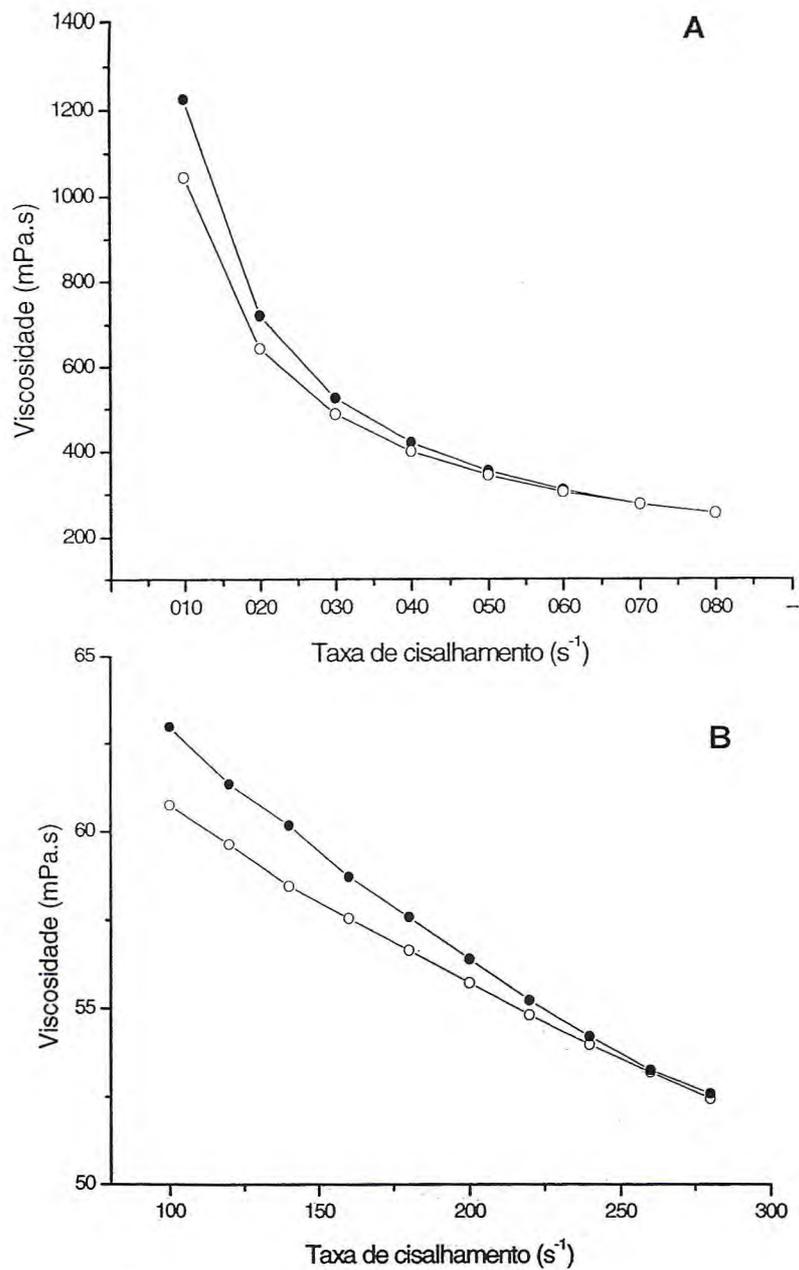


Figura 2.4.3. – Efeito da taxa de cisalhamento sobre a viscosidade de Sf-90 1,0% (A) e ι -CAR 1,0% (B) a 40°C. (●—●) curva ascendente; (○—○) curva descendente.

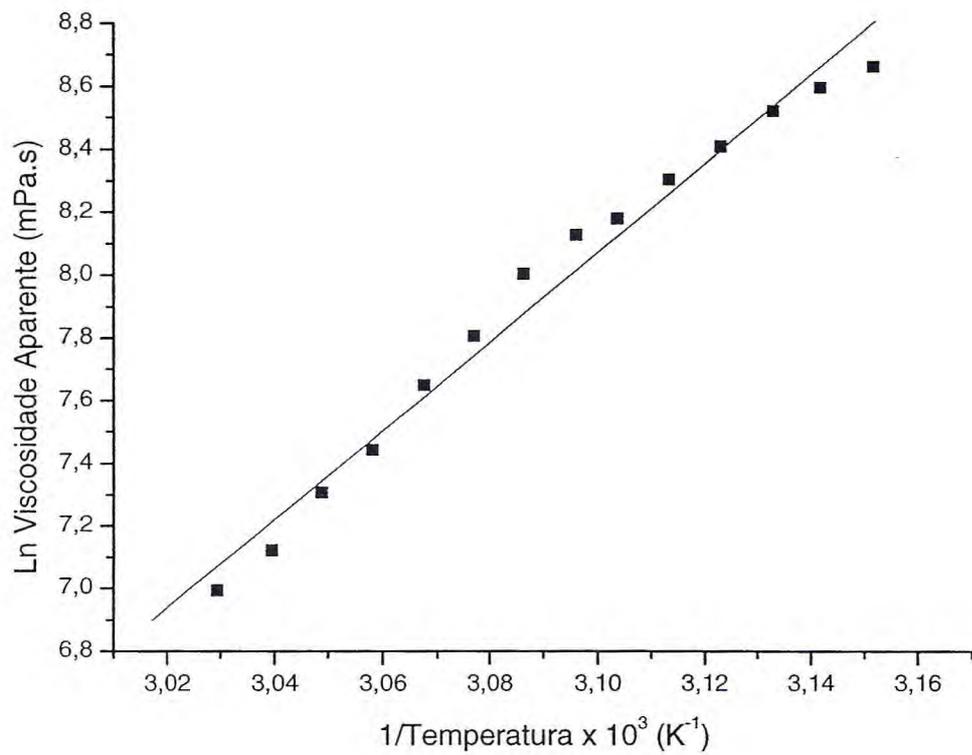


Figura 2.4.4. – Efeito da temperatura sobre a viscosidade de Sf-90 a uma taxa de cisalhamento constante (2 s^{-1}).

Tabela 2.4.3. – Comportamento reológico segundo o modelo da Lei da Potência de Sf-90 0,5% em sistemas lácteos a 40°C.

Sistema lácteo	Parâmetros reológicos		
	k (Pa.s ⁿ)	<i>n</i>	R ²
Leite integral	65,7	0,39	0,98
Leite desnatado	91,7	0,15	0,87

fases (precipitação protéica).

Esses resultados sugerem que o teor de lipídios presente no leite integral interfere na interação proteína-carragenana diminuindo a consistência do gel formado. Este resultado está de acordo com as propriedades funcionais das carragenanas que são amplamente influenciadas por diversos fatores incluindo a presença de outros biopolímeros. Variações nesses fatores afetam diretamente as temperaturas de fusão e gelificação, bem como as propriedades reológicas do gel (BAEZA *et al.*, 2002).

2.4.2. REOLOGIA DINÂMICA

O comportamento viscoelástico das soluções aquosas de Sf-90 a 1, 2 e 3%, determinados a uma faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz a 25°C, são mostrados na **Figura 2.4.5**. Em todas as concentrações a frequência exibiu uma fraca influência sobre o módulo elástico (G') de Sf-90 e este foi sempre superior ao módulo viscoso (G''). Essa influência foi avaliada através do valor de "n", parâmetro reológico que reflete a dependência de G' da frequência. O coeficiente angular da regressão linear resultante do gráfico log-log de $G' \times f$ corresponde ao valor de "n". Para $n \approx 1$ o sistema se comporta como um gel viscoso, enquanto para $n \approx 0$ o gel apresenta um comportamento elástico (RINAUDO, 2001; WINTER & CHAMBOM, 1987). A **Tabela 2.4.4** apresenta os parâmetros reológicos de Sf-90 e ι -CAR. Nas três concentrações testadas a Sf-90 apresentou valores de $n = 0,02$ bem menores quando comparados ao valor de n para ι -CAR a 3% (0,18). A ι -CAR apresentou comportamento de gel somente na concentração de 3% (**Figura 2.4.6**). Nas concentrações de 1 e 2% os módulos elásticos (G') apresentaram valores negativos. Segundo Lapasin *et al.* (1995), os géis podem ser classificados ainda como fortes ou fracos baseado na razão G'/G'' . A relação G'/G'' de um gel real, cujas junções intra e

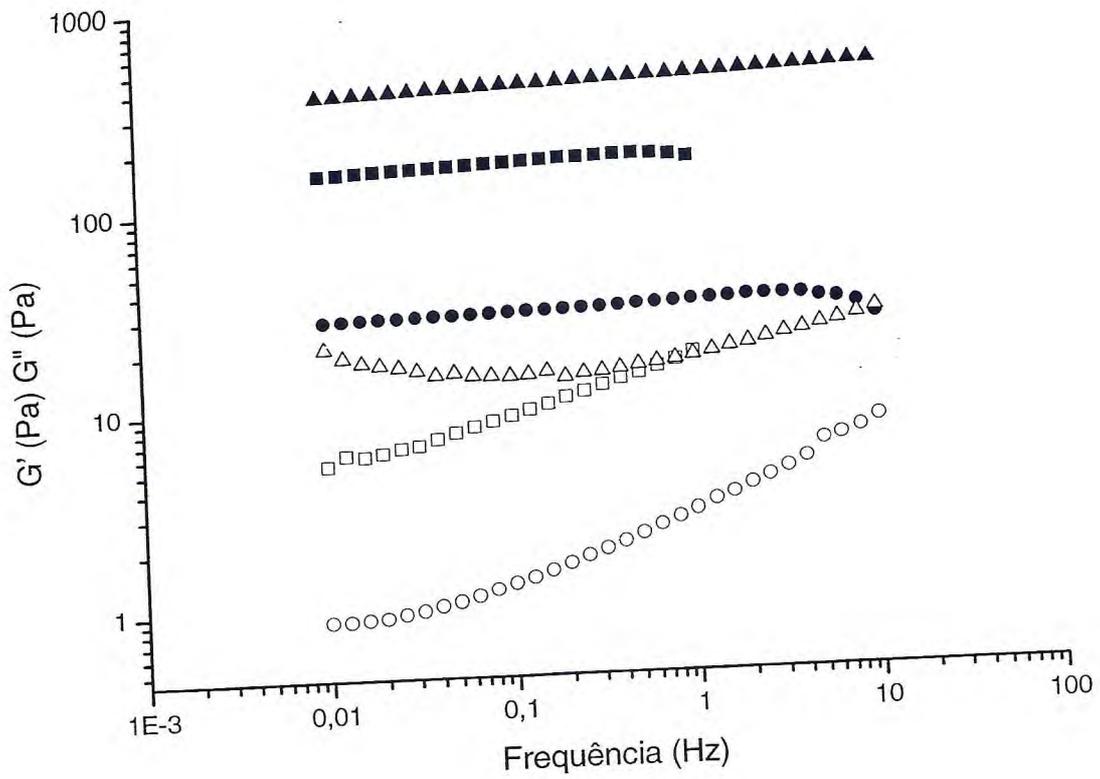


Figura 2.4.5. - Efeito da frequência sobre os módulos elástico (G' , cheio) e viscoso (G'' , vazio) de soluções aquosas de Sf-90 a 25°C e 2 Pa. Concentrações: 1(●,○); 2(■,□) e 3% (▲,△).

Tabela 2.4.4 - Efeito da concentração sobre os parâmetros reológicos de soluções aquosas de Sf-90 e ι-CAR a 25°C. Módulos elástico (G') e viscoso (G'') a 1Hz.

Concentração (%, m/v)	Sf-90			ι-CAR		
	G' ± DP (Pa)	G'/G''	n	G' ± DP (Pa)	G'/G''	n
1	31,6 ± 1,8	9,2	0,02	-	-	-
2	159,5 ± 8,6	11,2	0,02	-	-	-
3	411,2 ± 32,5	24,7	0,02	208,6 ± 29,5	4,3	0,18

(-) Valores de G' negativos.

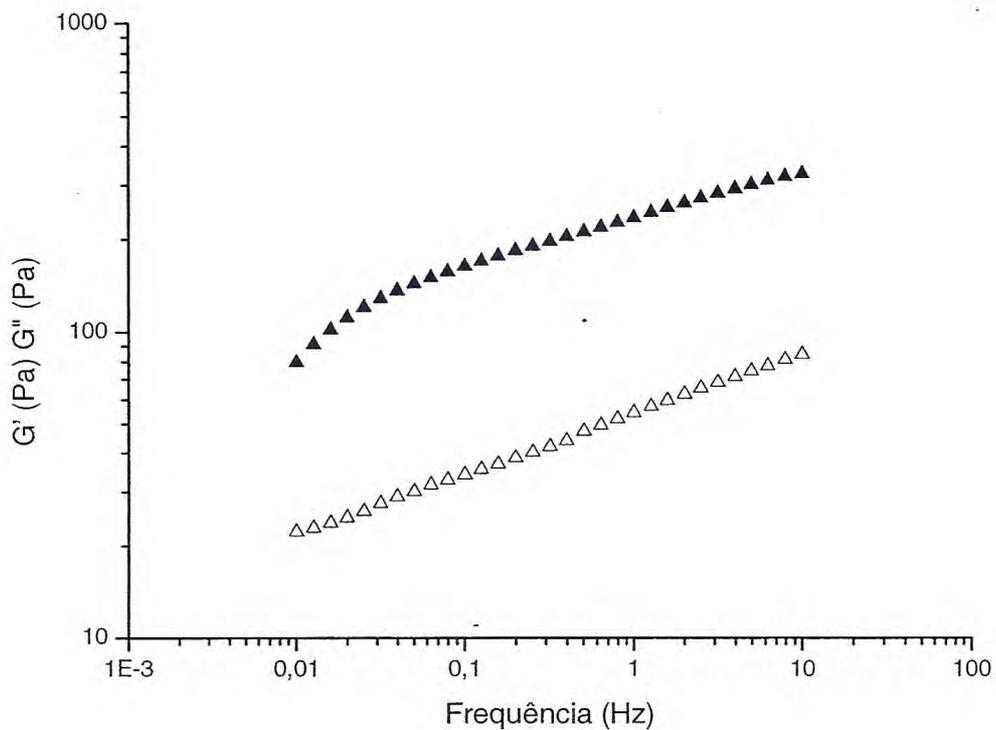


Figura 2.4.6.- Efeito da frequência sobre os módulos elástico (G' , cheio) e viscoso (G'' , vazio) de soluções aquosas de ι -CAR 3% a 25°C e 3 Pa.

intermoleculares têm uma alta energia de ligação, é superior a 3. No caso de Sf-90 a 1Hz, esta condição é encontrada na três concentrações testadas (9,2 a 1%; 11,2 a 2% e 24,7 a 3%). Para ι -CAR essa condição é encontrada apenas na concentração de 3% ($G'/G'' = 4,3$).

A propriedade geleificante de ágars e carragenanas estão diretamente ligadas a suas estruturas químicas e ao ambiente iônico da solução (LAHAYE, 2001; PICULELL, 1995). Assim sendo, sugere-se que a diferença no comportamento reológico exibido pela Sf-90 seja atribuída as principais diferenças encontradas na estrutura química dessa carragenana, ou seja, a presença de grupos O-CH₃ no C-6 do resíduo de G4S e a presença de pequenas quantidades de κ -carragenana. Falshaw & Furneaux, (1998) demonstraram uma forte relação entre a proporção de grupos O-metil em C-6 de resíduos de galactose e a formação do gel em galactanas extraídas das algas da família *Gracilariaceae*.

O aumento de G' com o aumento da concentração de Sf-90 está de acordo com o modelo de geleificação mais aceito atualmente (MORRIS *et al.*, 1981) onde a alta massa molar das carragenanas combinada à alta concentração aumentam o número de pontos de interações intercadeias produzindo géis mais fortes. Entretanto, no caso específico de Sf-90 essa interação intercadeias deve ter sido ocasionada pelo pequeno conteúdo de κ -carragenana observado no seu espectro de RMN de ¹H, visto que, diferentemente da κ -carragenana, a geleificação da ι -carragenana não está associada a interações intercadeias, mas apenas à formação de duplas hélices (STANLEY, 1990 Apud TISCHER *et al.*, 2006).

Recentemente, Funami *et al.* (2007), confirmaram esta hipótese quando avaliaram as interações intercadeias de κ e ι -carragenanas, mediadas por cátions (Na⁺, K⁺ e Ca²⁺), através da Microscopia de Força Atômica (MFA). Segundo estes pesquisadores a adição de K⁺ a soluções aquosas de ι -carragenana provocou um aumento na espessura dos fios (compostos por hélices) mostrados nas imagens da MFA, enquanto a adição de Ca²⁺ mediou a associação entre os fios formando estruturas de rede que pode ter ocorrido durante a preparação das amostras para MFA. Contudo, um nível muito baixo ou nenhuma agregação lateral entre hélices foi observado para ι -carragenana.

Ao contrário, para κ -carragenana foi possível observar através das imagens de MFA que a adição de K^+ e Ca^{2+} conduziu à formação de redes através de interações laterais entre hélices.

A estabilidade térmica das soluções de Sf-90 e ι -CAR é mostrada nas **Figuras 2.4.7. e 2.4.8.** As temperaturas de transição gel-solução de Sf-90 nas concentrações de 1 e 2% (44,3 e 52,1°C, respectivamente) foram superiores as temperaturas de transição solução-gel (40,2 e 47,9°C, respectivamente). Diferente da ι -CAR, a histerese térmica apresentada pela Sf-90, que sugere agregações intercadeias, confirmou a influência do pequeno conteúdo de κ -carragenana sobre os seus parâmetros reológicos.

Em resumo, os resultados obtidos sugerem que apesar da Sf-90 ter uma estrutura majoritária correspondente a uma ι -carragenana, a presença de grupos O-metil e a pequena quantidade de κ -carragenana exercem uma influência marcante no seu comportamento reológico quando comparada a ι -carragenana comercial. Tais diferenças estruturais de Sf-90 aumentaram a viscoelasticidade e a estabilidade térmica do gel e diminuíram a concentração necessária para geleificação.

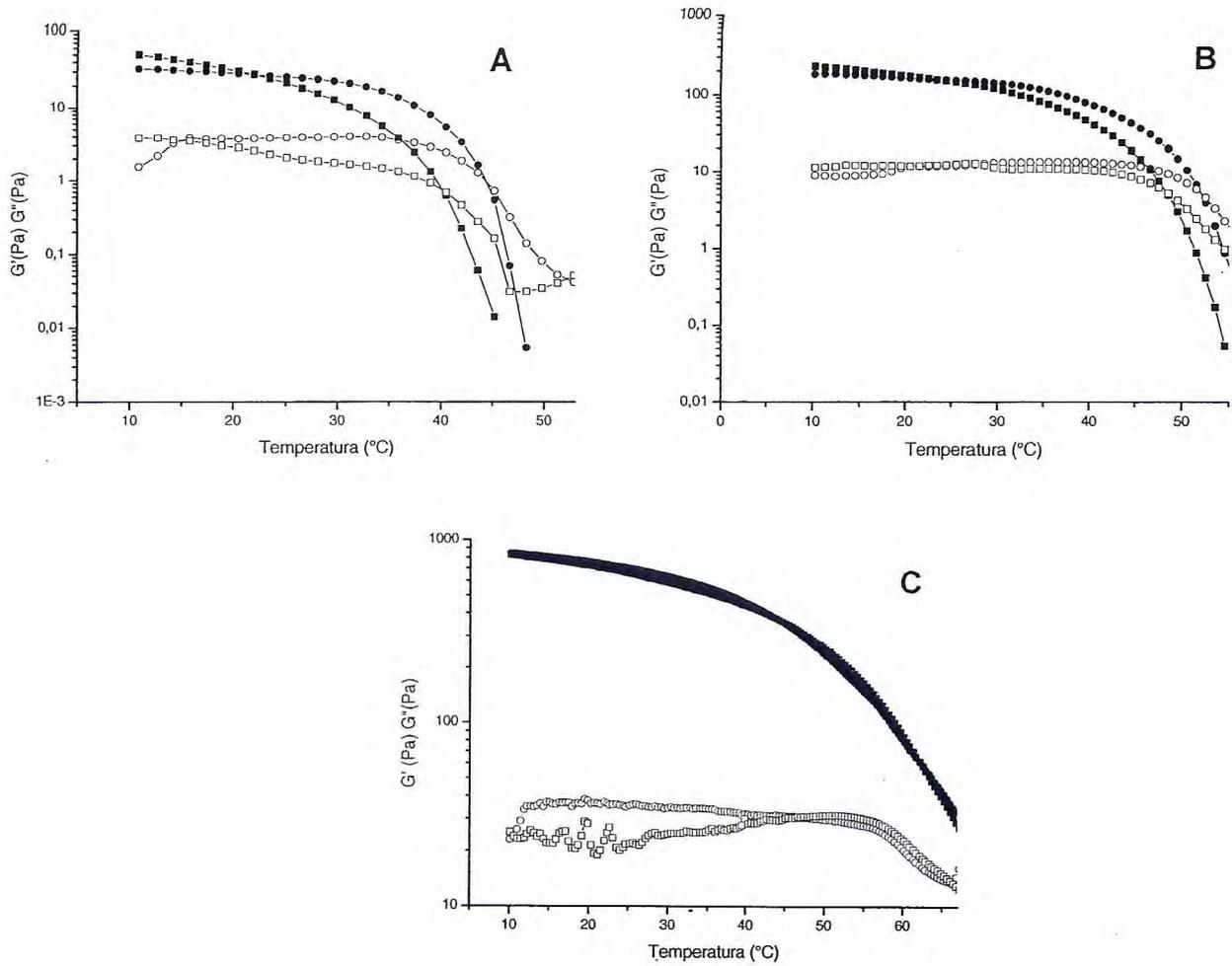


Figura 2.4.7.- Efeito da temperatura sobre os módulos elástico (G') e viscoso (G'') de soluções aquosas de Sf-90 a 25 $^{\circ}\text{C}$, 1 Hz e 3 Pa. A:1%; B: 2% e C: 3%. Aquecimento (\bullet, \circ) e Resfriamento (\blacksquare, \square).

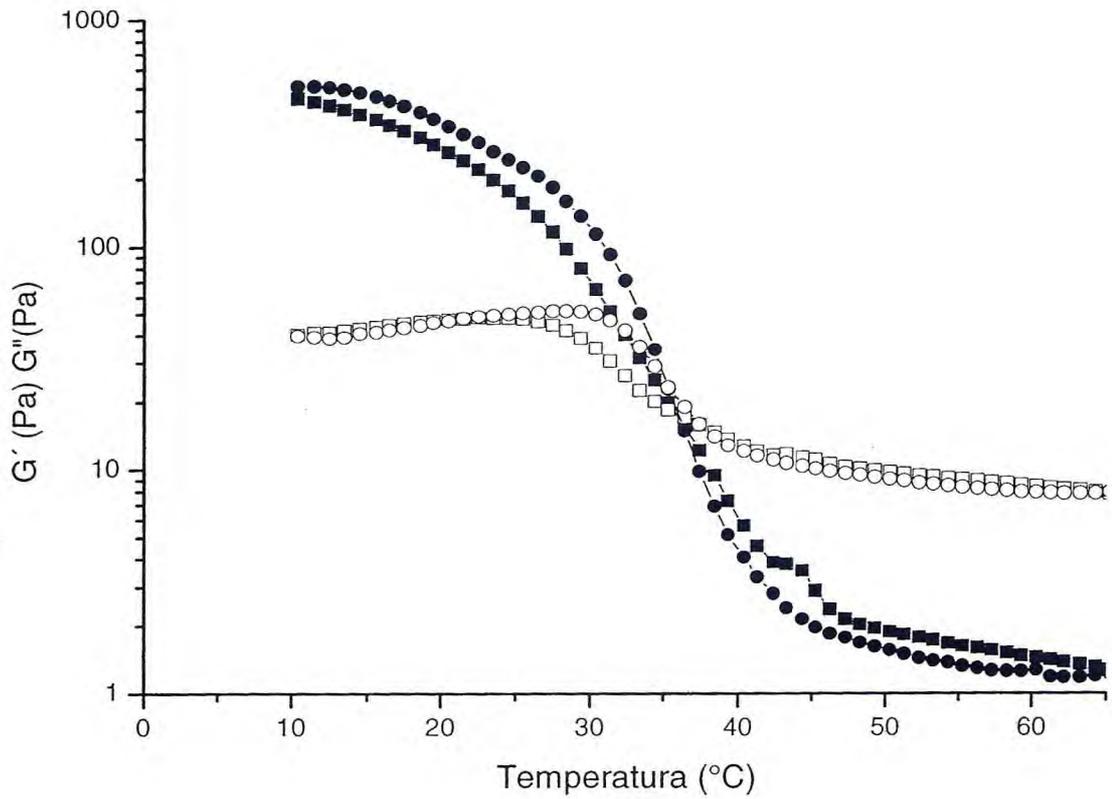


Figura 2.4.8.- Efeito da temperatura sobre os módulos elástico (G') e viscoso (G'') da solução aquosa de τ -CAR 3% a 1 Hz e 3 Pa. Aquecimento (\bullet, \circ) e Resfriamento (\blacksquare, \square).

2.5. CONCLUSÕES

As carragenanas de *S. filiformis* (Sf-90) e comercial apresentaram um caráter não-Newtoniano, com o comportamento pseudoplástico independente do tempo. A Sf-90, no entanto, apresentou ainda um comportamento tixotrópico e a concentração influenciou bastante na pseudoplasticidade dos géis. A temperatura também exerceu uma forte influência sobre a viscosidade dos géis de Sf-90, caracterizada por uma alta energia de ativação de fluxo.

Em sistemas lácteos a ι -carragenana de *S. filiformis* exibiu uma alta reatividade com as proteínas do leite, dada sua alta viscosidade quando comparada com as soluções aquosas.

Em solução aquosa, a Sf-90 foi capaz de formar géis verdadeiros e mais fortes a concentrações bem menores, quando comparada a comercial, e o aumento da concentração aumentou o ponto de transição gel-solução. A Sf-90 apresentou histerese térmica, diferentemente da ι -CAR, confirmando a influência da pequena quantidade de κ -carragenana na formação do gel.

Diante desses resultados, é possível sugerir que alga marinha vermelha *S. filiformis* encontrada no litoral cearense é capaz de fornecer, nas condições citadas, uma ι -carragenana com propriedades geleificantes de interesse industrial comparáveis as da ι -carragenana comercial proveniente de importação.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHIM, K. A., RAMASWAMY, H. S., VAN DE VOORT, F. R. Rheological properties of starch solutions under aseptic processing temperatures. **Food Research International**, v.28, p. 473-480, 1995.

AGARGEL, Ágar Brasileiro Indústria e Comércio Ltda. Disponível em <www.agargel.com.br> . Acesso em 15 de junho de 2005.

BAEZA, R.I., CARP, D. J., PEREZ, O. E., PILOSOFF, A. M. R., kappa-carrageenan - Protein interactions: Effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. **Food Science and Technology**, v. 8, n. 35, p. 741-747, 2002.

BOURRIOT, S., GARNIER, C. & DOUBLIER, J. L. Micellar casein- κ -carrageenan mixtures. I. Phase separation and ultrastructure. **Carbohydrate Polymers**, v. 40, p. 145-157, 1999.

DA SILVA, L.A.L., RAO, M.A. Rheology of structure development in high-methoxyl pectin/sugar systems. **Food Technology**, v. 49, n.10, p. 70-73, 1995.

DA SILVA, J. A. L., PEDRO, M.S., OLIVEIRA, J. C., RAO, M. A. Granule size distribution and rheological behavior of heated modified waxy and unmodified maize starch dispersions. **Journal Texture Studies**, v. 28, p. 123-138, 1997.

DICKIE, A. M., KOKINI, J.L. An improved model for food thickness from non-Newtonian fluid mechanics in the mouth. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 57-65, 1983.

FALSHAW, R., & FURNEAUX, R. H. Structural analysis of carrageenans from the tetrasporic stages of the red algae, *Gigartina lanceata* and *Gigartina*

chapmanii (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 307, p. 325–331, 1998.

FUNAMI, T., HIROE, M., NODA, S., ASAI, I., IKEDA, S., NISHINARI, K. Influence of molecular structure imaged with atomic force microscopy on the rheological behavior of carrageenan aqueous systems in the presence or absence of cations. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 617 – 629, 2007.

HOLDSWORTH, S.D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products. **Journal of Texture Studies**, v. 2, n. 4, p. 393-418, 1971.

HOLT, C. & HORNE, D. S. The hairy casein micelle: evolution of the concept and implications for dairy technology. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 50, p. 85-111, 1996.

IBARZ, A., BARBOSA-CANOVAS, G. V., **Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos**. Technomic Publishing company, Inc. Pennsylvania – USA: 85 -204, 1996.

LAHAYE, M. Development on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 173-184, 2001.

LAPASIN, R., DE LORENZI, L., PRICL, S., TORRIANO, G. Flow properties of hydroxypropyl guar polysaccharide and its long-chain hydrophobic derivatives. **Carbohydrates Polymers**, v. 28, p. 195-202, 1995.

LIN, C. F., Interaction of sulfated polysaccharides with proteins. In: **Food Colloids**. 1977. Westport, Avi, p. 320-346,.

MARCOTTE, M., HOSHAHILI, A. R. T., RAMASWAMY, H. S., Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, v. 34, p. 695-703, 2001.

MCCLEMENTS, J. **Food Biopolymers and Colloids Research Laboratory**. University of Massachussets Amherst. Disponível em <<http://www.unix.oit.umass.edu/~mcclements/581Rheology.html>>. Acesso em: 06/02/2005.

MICHON, C., CHAPUIS, C., LANGENDORFF, V., BOULENGUER, P. & CUVELIER, G. structure evolution of carrageenan/milk gels: effect of shearing, carrageenan concentration and nu fraction on rheological behavior. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 541-547, 2005.

MLEKO, S., LI-CHAN, E.C.Y. & PIKUS, S. interactions of κ -carrageenan with whey proteins in gels formed at different pH. **Food Research International**, v. 30, n. 6, p. 427-433, 1997.

MORRIS, E. R.; CUTLER, A. N.; ROSS-MURPHY, S.B.; REES, A. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. **Carbohydrate Polymers**. v.1, n.1, p. 5-21, 1981.

PICULELL, L., BORGSTRON, J., CHRONAKIS, I. S., QUIST, P-O., VIEBKE, C. Organisations and association of k-carrageenan helices under different salt conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 141-153, 1997.

RAMASWAMI, H. S., BASAK, S. Rheology os stirred yogurth. **Journal of Texture Studies**, v. 22, p. 231-241, 1991.

RAMASWAMI, H. S., BASAK, S. Time dependent stress decay rheology of stirred yogurt. **International Dairy Journal**, v. 1, p. 17-31, 1992.

RAO, M. A., COOLEY, H. J. Applicability of flow models with yield for tomato concentrates. **Journal of Food Science**, v. 39, p. 160-161, 1974.

RAO, M.A., RIZVI, S.S. **Engineering properties of foods.**, New York, Marcel Dekker, 1986

RHA, C. Rheology of fluid food. **Food Technology**. V. 32, p. 77-82, 1978.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol an gel states. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 433-440, 2001.

RINAUDO, M., & ROCHAS, C. Investigations on aqueous solution properties of κ -carrageenans. **ACS Symposium Series**, v. 150, p. 367-378, 1981.

SANDERSON, G. R. Polysaccharides in food. **Food Technology**, v. 7, n.4, p. 50-56, 1981.

SHARMA, S. K., MULVANEY, S. J., RIZVI, S. S. H. **Food processing engineering: theory and laboratory experiments**. United States of America: Wiley-Interscience. 348 p., 2000.

SPAGNUOLO, P. A., DALGLEISH, D. G., GOFF, H. D. & MORRIS, E. R. kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. **Food Hydrocolloids**, v. 19, 371-377, 2005.

STANLEY, N.F. **Carrageenans**. In: **Food gels**. Elsevier Applied Science, 1990. New York, NY. Chapter 3, p.79-119.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**, 2° Ed. Freeman Press, East Lansing, Michigan State, USA. 418p. 1996.

STREETER, V.L. **Mecânica de fluidos**, México: McGraw Hill. 594p. 1996.

TISHER, P. C. S. F., NOSEDA, M. D., FREITAS, R. A., SIERAKOWSKI, M. R., DUARTE, M. E. Effects of iota-carrageenan on the rheological properties of starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 49–57, 2006.

TONELI, J. T. C. L., MURR, F. E. X., KIL, J. P. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.7, n.2, p.181-204, 2005.

TRCKOVA, J., STETINA J. & KANSKY, J. Influence of protein concentration on rheological properties of carrageenan gels in milk. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 337-343, 2004.

VAN DE VELDE , F., PEPPELMAN, H. A., ROLLEMA, H. S. & TROMP, R. H. On the structure of kappa/iota-hybrid carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 331, 271-283, 2001.

VAN DE VELDE, F., KNUTSEN, S. H., USOV, A. I., ROLLEMA, H.S. and CEREZO, A. S., ¹ H and ¹³ C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Food Science & Technology**, v. 13, p. 73-92, 2002.

VIDAL, J.R.M.B. **Comportamento reológico da polpa de manga (*Mangifera indica* L-Keitt)**. 2000.159p. Tese de doutorado – Universidade de Campinas, SP, 2000.

WHITE, J. P., DAVIDSON, V. J., OTTEN, L. A capillary viscometer for characterization of fluid foods. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.26, p. 109-114, 1993.

WINTER, H. H. & CHABOM, F. Analyses of linear viscoelasticity of a cross-linking polymer at the gel point. **Journal of Rheology**, v. 30, p. 367-382, 1986.