

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**RELAÇÃO ESTRUTURA-PROPRIEDADES DA AMILOPECTINA PRESENTE  
NA SOLUÇÃO DO AMIDO DO TIPO *AMIDEX 40003* E  
SEUS COMPLEXOS METÁLICOS**

Gisele Louro Peres

TESE

Porto Alegre, julho de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Gisele Louro Peres

**RELAÇÃO ESTRUTURA-PROPRIEDADES DA AMILOPECTINA PRESENTE  
NA SOLUÇÃO DO AMIDO DO TIPO *AMIDEX 40003* E  
SEUS COMPLEXOS METÁLICOS**

Tese apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Doutora em Química no Programa de Pós-graduação em Química na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Prof. Dr. Nádyá Pesce da Silveira  
Orientador

Porto Alegre, julho de 2013.

A presente tese foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre março/2009 de ingresso e julho/2013 da defesa, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) sob orientação da Prof. Dra. Nádyá Pesce da Silveira. No período de março/2012 a setembro/2012 parte do trabalho foi desenvolvido na Universidade de Tulane, em New Orleans, Louisiana, EUA sob a supervisão do professor Dr. Wayne F. Reed.

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. Joana Lea Meira Silveira  
UFPR

Prof. Dr. Sandro Rogerio Giacomelli  
URI-Frederico Westphalen

Prof. Dr. Rosane Michele Duarte Soares  
PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Deborah Pinheiro Dick  
PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Nádyá Pesce da Silveira  
Orientadora-UFRGS

Gisele Louro Peres

Dedico este trabalho a toda minha família, mas de uma maneira especial ao meu querido pai, **Luiz Carlos (in memorian)**, que com certeza sempre esteve e está ao meu lado, e a minha mãe **Ostilia**, pelo apoio incondicional.

*Obrigada por sempre aceitarem e apoiarem minhas escolhas!*

*E a razão da minha vida. O que me move cada vez mais.*

*Minha amada e adorada filha: **Alicia***

*A Prof<sup>a</sup> Dra. Nádyá Pesce da Silveira, minha orientadora, pelo exemplo de mulher e profissional, orientação, confiança, apoio e amizade. E acima de tudo, por oportunizar que eu realizasse os meus sonhos mais altos que para mim, seriam “quase” impossíveis. Meu eterno muito obrigada!!!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades na vida, proteção e força.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de realizar um curso de Pós-graduação.

À Nádyá, por ter me recebido, pela orientação deste trabalho, pela confiança, amizade, incentivos e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Wayne Reed pela sua orientação e recepção, em Tulane. A Mike Drenski, pelo apoio, ensinamentos, paciência e ajuda incansável e constante nos experimentos, e também, na minha chegada em New Orleans. Never forget, thank you!!!

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosane M. D. Soares, ao Prof<sup>o</sup> Dr. Ricardo V. Bof Oliveira e ao Prof<sup>o</sup> Dr. Cesar Petzhold pelas magníficas sugestões e contribuições no meu exame de qualificação.

Ao Departamento de Físico-Química, por ter me oportunizado lecionar nas disciplinas de Físico-Química Experimental e Físico-Química II, enquanto bolsista Reuni. Em especial as Prof<sup>a</sup>. Dra. Michele O. De Souza, Deborah P. Dick, Denise S. Azambuja; aos Prof<sup>o</sup> Dr. Paulo F. B. Gonçalves e Daniel E. Weibel, por toda atenção, carinho, incentivo e inúmeros ensinamentos ao longo deste estágio. Meu muito obrigada!!!

Aos professores e a coordenação do Programa de Pós-graduação em Química pela contribuição na minha formação científica, desenvolvimento intelectual e na realização deste estudo. Em especial, aos Prof. Dr. Dimitrios Samios e Hubert K. Stassen, pelo exemplo de paixão e respeito pela Físico-Química.

À Prof. Dr. Rosane M. D. Soares, muito obrigada pelo carinho, incentivo, amizade, apoio e ajuda, principalmente nos momentos que antecederam minha viagem para EUA e ao longo deste trabalho. Obrigada Rosane de coração!!!

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação em Química pelo carinho, paciência e auxílio psicológico (rsrsrsrs) em muitos momentos. Em especial ao Francisco Machado e Giuliana Rissi.

Às técnicas Mariana Koetz e Vanessa Amorim do departamento de Físico-Química, pela amizade, carinho, risadas, choradeiras e apoio no desenvolvimento da tese, meu muito obrigada.

Aos ICs: Cristiane, Gabriela (Bibi), Renan Zancani, Daiane e Rafael, que me auxiliaram nas análises não medindo esforços, certamente eu não teria conseguido sem vocês!!! Meu queridos, meu muito obrigado!!!

Aos colegas e amigos do Doutorado, jamais esquecerei os momentos que vivi com vocês, obrigada pelo acolhimento dado a mim. Em especial a Joice e Pedro, pelas inúmeras conversas com sabedoria nos corredores da UFRGS. Obrigada, pelo incentivo contínuo na minha formação, respeito e amizade!!!

Ao colegas e amigos do Laboratório Lindim, a todos que ainda estão por lá e aos que já seguiram a sua jornada, é impossível citar a contribuição de cada um de vocês. Obrigada pela convivência diária e ajuda constante em especial, aos queridos, inesquecíveis e às vezes muito obrigado engraçados, Quellen, Miriam, Rafael, Aline, Diego e Luis Angeloni.

Jessé, obrigada inicialmente pela amizade, carinho e risadas (rsrsrs). Mas em especial pelas exaustivas tentativas em me ajudar no RMN!!!

William, Mariana, Paula, Felipe, Vinicius. Muito obrigada pela parceria nos estudos. Will... (rsrsr) obrigada pelo colegismo, amizade, parceria, ensinamentos, enquanto nós, professores da Físico-Química experimental e também enquanto colegas da Pós. Meu querido vou te levar para sempre comigo no meu coração.

Aos meus amigos Claiton, Evelyn, Jumanne, Shiloh, Ankit, Jacob e Jonathan. Em especial ao Claiton e Evelyn que vivenciaram comigo a minha estada em New Orleans! Muitos foram os passeios, as risadas, as conversas, os choros... bom até um furacão passou por nós! Rsrsrcr Eu jamais vou esquecer!!! E a Shiloh e Jumanne por serem um exemplo de superação, por todas as aprendizagens e momentos felizes! Sem todos vocês... seria bem difícil suportar a saudade do Brasil!!! [...relax easy relax easy breath]

A Maria e Joelson pelas inúmeras discussões sobre espalhamento, viscosimetria e polímeros. Muito obrigada pela amizade e carinho ao longo deste trabalho. Muitas foram às contribuições! Muito obrigada!!!!

Felipe, obrigada querido amigo por tudoooo. Pela amizade, carinho, parceria, conselhos e incentivo. Pelas conversas mais malucas que dois químicos, físicos-químicos, poderiam ter!!! Obrigada, desejo que a nossa amizade seja eterna!!!

À Daiane Leite pela contribuição na tese. Meus complexos agradecem e eu também!!! Obrigada pelo planejamento fatorial que deu todo um novo sentido para este trabalho, pelo *i-PCA* que contribuíram e muito para o meu entendimento! Pelos gráficos que meu “not” não permitiu fazer (rsrsr). Obrigada pela parceria neste projeto, nos artigos e pela amizade a qualquer hora!

Yasmineeeeeee!!! Eu queria muito que você estivesse aqui comigo, você sabe disso!!! Você foi uma das primeiras pessoas que me acolheu quando cheguei na UFRGS e que estendeu a mão em muitos momentos, com uma humildade que você tem! Meu coração dói em saber que você não estará aqui neste momento. Mas França é França!!! (rsrsrs) Obrigada por tudo, pelos ensinamentos no espalhamento de luz, incentivo constante e permanente, obrigada por me ouvir, ouvir, ouvir, chorar, rir, ... obrigada acima de tudo pela amizade, respeito, cumplicidade e amor!!!

Ai amiga, eu pensei, pensei, em uma forma de escrever e poder expressar todo o meu carinho, respeito, amizade, admiração, zelo e amor por você! Não teve um ponto desta tese, que você não tenha lido!!! Não teve um dia sequer que não tivéssemos nos falado!!! Literalmente estivesse comigo em todos os momentos!!! (rsrsr) Muito obrigada por todas as contribuições, por horas e horas lendo a tese, me ouvindo, pelas noites mal dormidas. Minha co- (rsrsr) Muito obrigada, pela amizade, ajuda, aprendizagens, horas e horas, melhor dias, no espalhamento tentando calibrando, ao longo desta minha estada na UFRGS!! Heheheh Pelas conversar, por tudo!!! Meu sincero e verdadeiro obrigada por tudo, tudo mesmo! Palavras jamais expressaram meu eterno e verdadeiro amor por ti!!! Obrigada amiga Andresa, você sabe que sem você teria sido tudo muito mais difícil. Mói!!! Obrigada a você também!!!! Adooooo vocês!!! Que a nossa amizade, amor e carinho sejam eternos!!!

A todos os meus familiares, mas em especial a tia Nê, que me recebeu e acolheu com todo carinho, logo na minha chegada em POA. A minha madrinha Joana, a melhor de todas as madrinhas do mundo!!! Aos meus primos “*maravilhosos*” Sandra, Fernando e Nara!!! Bom... nem sei o que falar, vocês foram peças chaves na minha morada em POA e em muitos momentos da minha vida. Minha eterna gratidão. Aos meus irmãos por todo incentivo, carinho e ajuda. AMO TODOS VOCÊS!!!

A minha adorada, amada e lindinha, filha Alícia, pelo apoio, incentivo, compreensão, amor, amizade e paciência pela minha ausência. Prometo que tentarei ser uma mãe mais dedicada. EU TE AMO!!! Você é o  $O_{2(g)}$  que complexa a minha hemoglobina.

Ao meu amado Jackson, obrigada pelo incentivo nesta caminhada! Foi difícil, muito difícil e ainda é! Só nós sabemos o que passamos só nós temos a dimensão do que foi fazer um doutorado longe um do outro!!! Mas... a vida é feita de escolhas, nem tudo é belo, nem uma arte! Muito obrigada por todo amor, carinho, companheirismo, cumplicidade em tempos e espaços quase sempre não lineares, assim como a complexidade da vida!

Aos meus alunos, pela paciência e compreensão, em especial por aqueles que se apaixonaram pela Química e que daqui alguns anos serão meus colegas.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido, por tornar possível o sonho de todos nós, alunos de Pós-graduação, e promover o desenvolvimento intelectual e científico do Brasil.

A todos aqueles que procuraram seus nomes nesta lista de agradecimentos e não encontraram. Se eu esqueci de alguém, perdão!

Este trabalho é fruto da dedicação e colaboração de muitas pessoas. Mesmo não citando o nome de todas elas, deixo aqui registrado, meu sincero agradecimento, que de uma forma ou de outra contribuíram durante este trabalho e na finalização desta tese. Tanto da UFRGS, como em Tulane, e até mesmo da vida. Foi difícil chegar até aqui! Mas valeu por tudo!!! Meu muito obrigada a todos!

*Ao meu pai, que durante a elaboração deste trabalho nos deixou. Um de seus sonhos era ter um filho Doutor. Bom... acho que consegui cumprir a missão. Que fique em sua homenagem a conclusão desta tese.*

### Artigo aceito

BOERIS, V.; **PERES, G.**, CAPPELLA, L.; BURGOS, I.; SILVEIRA, N. P.; FIDELIO, G.; PICÓ, G. CHYMOTRYPSIN - EUDRAGIT COMPLEX FORMATION. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, p. 538-545, 2013.

### Artigo submetido – JULHO/2013

**PERES, G.L.**; Leite, D. C.; Silveira, N. P. STUDY OF THE FORMATION OF METAL COMPLEXES WITH AMYLOPECTIN. *Carbohydrate Polymers*.

### Artigo em formação

**Determination of Molecular Weight and Viscosity of the Treated Amylopectin with sonication process and their complexes.**

#### Trabalhos apresentados em congressos, simpósios e eventos.

1. Leite, D. C.; **Peres, G. L.**; Silveira, N. P. *Caracterização de complexos metálicos de amilopectina modificada por FT-IR e UV-Vis.* **2012**. X Workshop em Física Molecular e Espectroscopia (X-WFME). UFPE, Recife. Apresentação de Pôster. \*Trabalho Premiado.
2. **PERES, G. L.\***; Chagas, G. ; R. Zancani ; Silveira, N. P. Mean molecular weight amylopectin obtained by ultrasonic treatment of starch. In: **FBPOL, 2011** - 3rd French Brazilian/Meeting on Polymers, **2011**, Florianópolis.
3. **PERES, G. L.\***; Bittar, C.A; Silveira, N. P. Miniaturization of Amylopectin from Amidex by Ultrasonic Treatment. In: XII International Macromolecular Colloquium and the 7th International Symposium, 2010, Gramado. (ISNaPol – **2010**) p. 63-63.
4. Schmitz, D. C.\*; **PERES, G. L.**; Silveira, N. P. Análise de Complexos Metálicos com Biopolímero ramificado pela Técnica de Espalhamento de Luz. In: **SIC, 2012**, UFRGS - Porto Alegre.
5. Zancani, R.\*; **PERES, G. L.**; Silveira, N. P. . Caracterização e quantificação de amido por testes colorimétricos. In: **SIC, 2011**, UFRGS - Porto Alegre.
6. Chagas, G.R. ; **PERES, G. L.**; Silveira, N. P. Redução da massa molecular do amido através de tratamento ultrassônico. In: **SIC, 2011**, Porto Alegre. SIC, 2011.
7. Schmitz, D. C.\*; **PERES, G. L.**; Silveira, N. P. Controle da cadeia polimérica do amido através da técnica de espalhamento de luz. In: **SIC, 2011**, Porto Alegre.

## ÍNDICE GERAL

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xx</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xxiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xxv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	5
2.1.2. Objetivos específicos.....	5
<b>3. REVISAO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
3.1. AMIDO.....	14
3.1.1. Amilose .....	15
3.1.2. Amilopectina.....	17
<b>3.2. REOLOGIA .....</b>	<b>20</b>
3.2.1. Comportamento do Material .....	22
3.2.1.1 Fluidos Newtonianos .....	22
3.2.1.2. Fluidos Não-Newtonianos .....	22
3.2.1.2.1. Fluidos Não-Newtonianos Dependentes do Tempo .....	23
3.2.1.2.2. Fluidos Não-Newtonianos Independentes do Tempo.....	23
3.2.1.2.3. Fluido Não-Newtoniano Viscoelásticos .....	27
<b>3.3. VISCOSIMETRIA .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4. ESPALHAMENTO DE LUZ (LS) .....</b>	<b>34</b>
3.4.1. Espalhamento de Luz Estático (SLS) .....	39
3.4.2. Espalhamento de Luz Dinamico (DSL).....	51
3.4.3. Espalhamento de Luz Simultâneo de Amostra Múltipla (SMSLS).....	56
3.4.3.1 O equipamento SMSLS .....	57
<b>3.5. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS .....</b>	<b>59</b>

<b>3.6. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....</b>	<b>60</b>
<b>3.7. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) .....</b>	<b>61</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS DE ANÁLISE.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1. MATERIAIS .....</b>	<b>63</b>
<b>4.2. MÉTODOS INSTRUMENTAIS E DE ANÁLISE .....</b>	<b>64</b>
4.2.1. Ultrassom .....	64
4.2.2. Viscosimetria .....	64
4.2.3. Análise espectroscópica de UV-Vis.....	65
4.2.4. Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	65
4.2.5. Espalhamento de luz (UFRGS).....	65
4.2.6. Espalhamento de luz (TULANE).....	65
4.2.7. Análise termogravimétrica (TGA) .....	66
4.2.8. Medidas de pH.....	66
4.2.9. Medidas de condutividade .....	66
4.2.10. Índice de refração .....	66
4.2.11. Titulação complexométrica .....	67
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (Ap) A PARTIR DO <i>AMIDEX 40003</i> .....</b>	<b>69</b>
5.2. TRATAMENTO ULTRASSÔNICO .....	69
5.3. MÉTODO DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA SOLUÇÃO ApT .....	69
5.4. PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS METÁLICOS.....	71
<b>5.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE NO SMSLS (ESPALHAMENTO DE LUZ SIMULTÂNEO DE AMOSTRA MÚLTIPLA).....</b>	<b>73</b>
<b>6.1. CONTROLE DO PROCESSO DE SOLUBILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (Ap) .....</b>	<b>76</b>

<b>6.2. TRATAMENTO ULTRASSÔNICO .....</b>	<b>76</b>
6.3. ANÁLISE DA SOLUÇÃO TRATADA ATRAVÉS DE TESTES COLORIMÉTRICOS .....	79
6.3.1. Teste do iodo “adaptado” .....	79
6.3.2. Teste do Biureto.....	81
6.3.3. Teste de Benedict.....	81
<b>6.4. ANÁLISE REOLÓGICA.....</b>	<b>82</b>
6.4.1. Análise reológica da solução Ap (solução estoque de amilopectina) e solução ApT(solução tratada de amilopectina).....	82
6.4.2. Análise reológica da solução de amilopectina em relação à temperatura .....	84
6.4.3. Análise reológica dos complexos da solução de amilopectina.....	85
<b>6.5. RESULTADOS DE VISCOSIMÉTRICA.....</b>	<b>87</b>
6.5.1. Determinação da viscosidade intrínseca e concentração crítica ( $c^*$ ) da amilopectina .....	87
<b>6.6. OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE COMPLEXAÇÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>6.7. EFEITO DO pH NA COMPLEXAÇÃO DOS ÍONS METÁLICOS NA SOLUÇÃO DE AMILOPECTINA (ApT) .....</b>	<b>93</b>
<b>6.8. EFEITO DA CONDUTIVIDADE NA COMPLEXAÇÃO DOS ÍONS METÁLICOS NA SOLUÇÃO DE AMILOPECTINA (ApT) .....</b>	<b>95</b>
<b>6.9. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) .....</b>	<b>97</b>
<b>6.10. ANÁLISE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS .....</b>	<b>102</b>
<b>6.11. ANÁLISE DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) .....</b>	<b>104</b>
6.11.1 Tratamento dos dados utilizando a ferramenta estatística i-PCA.....	109
<b>6.12. ANÁLISE DA SOLUÇÃO ApT ATRAVÉS DO ESPALHAMENTO DE LUZ .....</b>	<b>114</b>
<b>6.13. MONITORAMENTO CONTÍNUO <i>ON-LINE</i> DA MODIFICAÇÃO DE BIOPOLÍMERO RAMIFICADO E PREPARAÇÃO DE SEUS COMPLEXOS METÁLICOS.....</b>	<b>122</b>

6.13.1. Estudo da estabilidade do biopolímero e os efeitos do uso do ultrassom para a miniaturização .....	122
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>134</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>139</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>147</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química das ligações glicosídicas no amido.....	7
Figura 2: Representação das possíveis ligações de hidrogênio da celulose (a) e metil celulose (b, c, d). <sup>21</sup> .....	8
Figura 3: Estrutura básica da macromolécula de amilose e amilopectina, com rotulagem dos átomos e torção dos ângulos. <sup>27</sup> .....	9
Figura 4: Sítios potenciais de coordenação do amido: grupos hidroxila (em vermelho), átomo de oxigênio (em verde) e átomo de oxigênio da ligação glicosídica (em azul). (Fonte: Autora) .....	10
Figura 5: Influência do pH no meio esfera de coordenação interna do Cu (II) (A) pH = 7,5, (B) pH 9,2, (C) pH 11,4. <sup>31</sup> .....	11
Figura 6: Estruturas de complexos de amido-lantânio [La (OPr- <i>i</i> ) <sub>3</sub> ], produzidos por refluxo em tolueno, obtidos por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x. <sup>36</sup> .....	12
Figura 7: Estruturas de compostos com Cd <sup>2+</sup> com ligantes 2,2-bpy. <sup>44</sup> .....	13
Figura 8: Estrutura dos compostos com ânions com 2,2-bpy. <sup>44</sup> .....	13
Figura 9: Esquema do sal metálico solvatado no processo de formação do complexo. <sup>43</sup> ...	14
Figura 10: A) Estrutura química e B) Representação física da amilose.....	15
Figura 11: A) Representação física da amilopectina. B) Estrutura química. ....	18
Figura 12: Classificação das cadeias da amilopectina, em tipo A, B e C. (B) Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido. <sup>50</sup> .....	19
Figura 13: Representação esquemática de fluxo entre duas placas paralelas. <sup>70</sup> .....	21
Figura 14: Fluxograma do comportamento dos fluidos Newtoniano e não-Newtoniano. (Fonte: Autora) .....	22
Figura 15: Reograma idealizado para um fluido pseudoplástico. <sup>64</sup> .....	25
Figura 16: Curvas de fluxo típicas de fluidos. <sup>75</sup> .....	26
Figura 17: Geometria básica de espalhamento onde a radiação incidente sobre o objeto consiste num vetor onda <i>ki</i> e a radiação espalhada consistem num vetor de onda <i>ke</i> num ângulo $\theta$ em relação à radiação incidente. ....	35
Figura 18: Equipamento Brookhaven utilizado nas medidas de espalhamento de luz estático e dinâmico. ....	36
Figura 19: Cubeta utilizada no equipamento Brookhaven para análises de espalhamento de luz. ....	36

Figura 20: Vista aérea da geometria básica de um experimento de espalhamento de luz. (Fonte:Autor).....	37
Figura 21: Relação, de L com $q$ , onde L é a maior porção da macromolécula. (Fonte: Autor).....	38
Figura 22: Esquematização do polímero em um bom solvente (A) e em mal solvente (B).43	
Figura 23: Perda da intensidade da luz espalhada como consequência da interferência intramolecular. <sup>121</sup> .....	44
Figura 24: Representação das dimensões de uma partícula do tipo polimérica. ....	46
Figura 25: Fluxograma para os diferentes gráficos que determinam o raio de giro ou giração ( $R_g$ ). .....	46
Figura 26: Exemplo de um modelo do gráfico de Zimm (obtido para amilose dissolvida em solução aquosa alcalina). A concentração de polímero está expressa em $\text{mg mL}^{-1}$ . <sup>106</sup> .....	47
Figura 27: Exemplo de um modelo do gráfico de Berry do espalhamento de luz para amilopectina extraída do amido de milho em 90% DMSO/H <sub>2</sub> O. <sup>129</sup> .....	49
Figura 28: Função de correlação temporal obtida para a amostra de gliadina em água à 25 °C. <sup>140</sup> .....	53
Figura 29: Comparação entre raio de giro ( $R_g$ ) e raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) para duas cadeias poliméricas isoladas (linhas contínuas) representando uma cadeia tipo novelo (esquerda) e uma cadeia estendida (direita). .....	54
Figura 30: Descrição física do equipamento SMSLS. ....	57
Figura 31: Tipos de cubetas utilizados nas análises. ....	58
Figura 32: Monitoramento da intensidade dispersas por CCD. ....	59
Figura 33: Representação esquemática dimensional do complexo de amilopectina-iodo. <sup>170</sup>	80
Figura 34: Valores obtidos da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento da solução ApT e da solução Ap à 25 °C. ....	82
Figura 35: Tensão em função da taxa de cisalhamento, à 25 °C da solução Ap e ApT, respectivamente. ....	83
Figura 36: Viscosidade aparente da solução Ap em função da taxa de cisalhamento a diferentes temperaturas. ....	84
Figura 37: Viscosidade aparente da solução tratada (ApT) em função da taxa de cisalhamento a diferentes temperaturas. ....	85
Figura 38: Gráfico da viscosidade reduzida versus concentração de amilopectina à $30,0 \pm 0,1$ °C. ....	87
Figura 39: Resultado da TGA para a solução de amilopectina tratada (ApT). ....	98

Figura 40: Representação do pico máximo de degradação da amilopectina e dos complexos de $Pb^{+2}$ através da primeira derivada termogravimétrica. ....	99
Figura 41: Representação do pico máximo de degradação da amilopectina e dos complexos de $Cu^{+2}$ através da primeira derivada termogravimétrica. ....	99
Figura 42: Perda de massa em função da temperatura para a amilopectina e seus complexos.....	100
Figura 43: Espectros dos complexos de cromo. ....	106
Figura 44: Espectros dos complexos de ferro.....	106
Figura 45: Espectros dos complexos de cobre.....	107
Figura 46: Espectros dos complexos de chumbo.....	108
Figura 47: Número de CP's (componentes principais) x intervalo de avaliação (i=1) ....	109
Figura 48: CP1 x CP2 do polímero e seus complexos em todo intervalo espectral (3995,99 – 399,84 $cm^{-1}$ ).....	110
Figura 49: Número de CP's x intervalo de avaliação (i=16).....	110
Figura 50: CP1 x CP2 do polímero e seus complexos no intervalo 3 de 3546,99–3323,42 $cm^{-1}$ .....	111
Figura 51: CP1xCP2 do polímero e seus complexos no intervalo 14 de 1071,98–848,41 $cm^{-1}$ .....	112
Figura 52: CP1 x CP2 do polímero e seus complexos no intervalo 15 de 846,98–623,41 $cm^{-1}$ .....	112
Figura 53: Relação da concentração da solução de amilopectina em função do raio hidrodinâmico (nm) para diversos ângulos. ....	116
Figura 54: Relação da concentração das soluções em função da intensidade (Kcps) para diferentes ângulos. ....	116
Figura 55: Relação da concentração das soluções em função da <i>PDI</i> para os diferentes ângulos.....	117
Figura 56: Fluxograma com os valores obtidos para a solução tratada de amilopectina. .	118
Figura 57: Comparação entre o Raio de giro ( $R_g$ ) e Raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) de um segmento da cadeia polimérica de amilopectina com a cadeia entrelaçada. ....	120
Figura 58: Forma que o novelo polimérico poderia ser encontrado com o metal. ....	121
Figura 59: Resultado da massa molecular ( $M_w$ ) para a solução de Ap, em diferentes tempos e frequências, à temperatura ambiente. ....	123
Figura 60: Massa molecular para as amostras tratadas, de acordo com o tempo e frequência aplicada.....	126

Figura 61: Massa molecular das soluções Ap sonicadas .....	126
Figura 62: Foto após a complexação nas diferentes concentrações para o $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , a direita, e $\text{CuCl}_2$ (esquerda).....	127
Figura 63: Monitoramento da complexação do $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ nas diferentes concentrações (em duplicata).....	128
<b>Figura 64:</b> Monitoramento da complexação do $\text{CuCl}_2$ nas diferentes concentrações. ....	129
Figura 65: Foto após o monitoramento da complexação nas diferentes concentrações para o $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ e $\text{CuCl}_2$ . Após 24h para a “cell 2”, após o mistura (mix) e condição da amostra após o mistura. ....	130
Figura 66: Adição do $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$ no solvente (DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$ ) e na solução polimérica.	130
Figura 68: Adição do $[\text{CuCl}_2]$ no solvente (DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$ ) e na solução polimérica.....	131

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Valores de $df$ para partículas com topologias típicas. ....	51
Tabela II: Valores de $\rho$ para partículas com topologias típicas. <sup>106</sup> .....	55
Tabela III: Dados obtidos no controle do processo de solubilização da solução estoque. ..	76
Tabela IV: Resultados obtidos do $R_h$ (nm), $PD.I$ e $\eta$ (mPa.s), em diferentes tempos e amplitudes da solução Ap.....	77
Tabela V: Viscosidades em função da temperatura de ambas soluções de amilopectina e dos complexos. ....	86
Tabela VI: Valores das concentrações ( $c$ ), tempo de fluxo ( $t_f$ ) e viscosidades obtidas para as diferentes soluções de amilopectina $30,0\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ . ....	87
Tabela VII: Planejamento fatorial completo $2^3$ com ponto central. ....	89
Tabela VIII: Resultados das complexações (%) dos 12 sais com a amilopectina. ....	90
Tabela IX: Efeitos das variáveis no percentual de complexação de cada sal.....	91
Tabela X: Medidas de pH das soluções salinas e dos complexos de amido, bem como a média de complexação.....	94
Tabela XI: Condutividades das soluções salinas e dos complexos de amido. ....	96
Tabela XII: Resultados das análises de TG/DTG.....	100
Tabela XIII: Análise UV-Vis comprimento de onda (nm) e absortividade molar ( $\text{cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}.\text{L}$ ) máxima das soluções salinas puras e dos complexos <sup>a</sup> .....	103
Tabela XIV: Bandas características do IR para a amilopectina em solução. ....	104
Tabela XV: Valores obtidos dos complexos metálicos formados com a amilopectina da solução ApT.....	119
Tabela XVII: Resultados obtidos a partir da análise do DSL no primeiro dia. ....	124
Tabela XXI: Valores das massas moleculares dos complexos de $\text{CuCl}_2$ , obtidas através da intensidade, a $50^\circ\text{C}$ . ....	131

## LISTA DE ABREVIATURAS

Am	amilose
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	acetato de chumbo ii
$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	acetato de cobre ii mono hidratado
$\text{Cr}_3(\text{CH}_3\text{COO})_7(\text{OH})_2$	acetato de cromo iii
$\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	acetato de níquel ii tetra hidratado
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
$\text{H}_2\text{O}$	água
$\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$	álcool isopropílico
Ap	amilopectina
PCA	análise por componentes principais
i-PCA	análise por componentes principais por intervalo
TGA	análise termogravimétrica
A	área
$\text{PbCl}_2$	cloreto de chumbo ii
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	cloreto de cobre
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,	cloreto de colbalto
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	cloreto de ferro
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	cloreto de níquel ii
$D_0$	coeficiente de difusão a diluição infinita
$D_{ap}$	coeficiente de difusão aparente
$\lambda_0$	comprimento de onda
CL	comprimento médio de cadeia
$c^*$	concentração crítica
$c$	concentração da solução
$k_B$	constante de boltzmann
$K_H$	constante de huggins
K	constante óptica
DTG	curva de termogravimetria derivada
DP	desvio padrão
$dv/dx$	diferença de velocidade entre as placas
$\Delta n$	diferença do índice de refração

$L$	dimensão do objeto
$df$	dimensão fractal
DMSO	dimetilsulfóxido
$h$	distância
$r$	distância entre o detector e o volume de espalhamento
$A(\tau)$	distribuição de tempos de relaxação
LS	espalhamento de luz
DSL	espalhamento de luz dinâmico
SLS	espalhamento de luz estático
QELS	espalhamento de luz quase elástico
SMSLS	espalhamento de luz simultâneo de múltiplas amostras
UV-Vis	espectro no ultravioleta-visível
PCS	espectroscopia de correlação de fótons
$\beta$	fator de coerência óptica
$S(\vec{q})$	fator de estrutura estático
$P(\theta)$	fator forma
$\alpha$	flutuação da polarizabilidade
$\delta\mu/\delta c$	flutuação local do potencial químico com a concentração
$\vec{F}$	força
$m_i$	fração mássica da partícula $i$
$g_2(t)$	função de correlação temporal
DP	grau de polimerização
HSAB	<i>hard and soft acid and bases</i>
NaOH	hidróxido de sódio
$dn/dc$	incremento do índice de refração
$n$	índice de comportamento de fluxo
$K_s$	índice de consistência
$PD.I$	índice de polidispersão
$n_0$	índice de refração
FTIR	infravermelho por transformada de fourier
$I(\vec{q})$	intensidade de espalhamento
$I(\theta)$	intensidade de espalhamento de luz no ângulo de observação

$I_{(solução)}$	intensidade de luz espalhada da solução
$I_{(solvente)}$	intensidade de luz espalhada do solvente
KI	iodeto de potásio
$I_2$	iodo
$CH_3COO^-$	íon acetato
$Cl^-$	íon cloreto
$Cu^+$	íon cuproso
$NO_3^-$	íon nitrato
$H_3O^+$	íons hidrônio
$M_i$	massa molar
$M$	massa molar do soluto
$\vec{M}_w$	massa molecular ponderal média
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	nitrato de cobre
$Pb(NO_3)_2$	nitrato de chumbo
$Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	nitrato de cromo
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	nitrato de ferro
$N_A$	número de avogadro
N	número de elementos espalhantes por moléculas
$\mu$	parâmetro que descreve o volume excluído
$\rho$	parâmetro sensitivo à forma
$P_v$	pressão de vapor
$R_e$	raio da esfera
$R_g$	raio de giro
$R_h$	raio hidrodinâmico
$R_\theta$	razão de rayleigh
ATR	<i>reflexão total atenuada</i>
$R^2$	regressão linear
$H^1$ -RMN	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
$A_2$	segundo coeficiente virial
ApT	solução de amilopectina tratada
$Cu(SO_4)_2$	sulfato de cobre
$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	tartarato duplo de sódio e potássio
$\Gamma$	taxa de decaimento da função

$\gamma$	taxa de deformação
$T$	temperatura
$t_{solução}$	tempo de escoamento da solução
$t_{solvente}$	tempo de escoamento do solvente
$t_f$	tempo de fluxo
$\sigma$	tensão de cisalhamento
$\sigma_0$	tensão de cisalhamento inicial
$A_3$	terceiro coeficiente virial
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	uréia
$\vec{q}$	vetor de espalhamento
$\vec{k}_e$	vetor de onda da radiação espalhada pelo objeto observado
$\vec{k}_i$	vetor de onda da radiação incidente sobre o objeto
$\eta$	viscosidade
$\eta_\infty$	viscosidade constante
$\eta_{solução}$	viscosidade da solução
$\eta_{solvente}$	viscosidade do solvente
$\eta_{sp}$	viscosidade específica
$[\eta]$	viscosidade intrínseca
$\eta_p$	viscosidade plástica
$K_c$	viscosidade plástica de casson
$\eta_{red}$	viscosidade reduzida
$\eta_{rel}$	viscosidade relativa
$V_e$	volume de uma esfera
TG	termogravimetria
TGA	Análise Termogravimétrica

## RESUMO

O presente trabalho de tese desenvolveu uma metodologia analítica na obtenção e na produção de uma solução de amilopectina extraída da solubilização do Amidex 40003, amido geneticamente modificado contendo majoritariamente amilopectina, dissolvido na mistura dimetilsulfóxido (DMSO)/H<sub>2</sub>O (90/10% v/v), respectivamente. O objetivo foi produzir e caracterizar nanocomplexos de amilopectina com íons metálicos Cr<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup> nas formas de sais de acetato, cloreto e nitrato, assim como, compreender as propriedades inorgânicas e físico-químicas (relação estrutura/propriedades) dos complexos formados, para futuras aplicações cosméticas. Foi realizado o monitoramento das características moleculares da solução de amilopectina durante a sua preparação sob ultrassom, em diferentes tempos e amplitudes, bem como em alguns complexos, através das técnicas de espectroscopia de espalhamento de luz (LS), viscosimetria, dentre outras. A redução da massa molecular da solução polimérica através do uso do ultrassom demonstrou que a metodologia desenvolvida é adequada para a redução e controle de tamanho da cadeia polimérica. O planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> foi realizado para a otimização das reações de complexação mostrando que o tempo de reação e a concentração são variáveis significativas. Além disso, as análises de pH, condutividade, infravermelho (FTIR), UV-Visível (UV-Vis), termogravimetria (TGA) e espalhamento de luz estático e dinâmico foram utilizados na confirmação dos complexos formados, bem como um estudo nas mudanças conformacionais ocorridas após a complexação com a solução de amilopectina. Os complexos com íons Cr<sup>3+</sup> e Fe<sup>3+</sup> possuem um rendimento reacional maior, comparado com os demais metais. O estudo reológico demonstrou a redução na viscosidade quando introduzidos os sais metálicos, devido ao empacotamento das cadeias poliméricas. Sendo que os sais de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> possuem uma estabilidade maior. O valor da viscosidade intrínseca encontrada foi de 1257 mL.g<sup>-1</sup> para a solução de amilopectina e a concentração crítica (*c*<sup>\*</sup>) da solução foi igual a 0,795 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi verificado que o pH para as reações de complexação próximo de 5 é ideal para uma maior média de complexação. Em pH acima de 8, diminui o poder complexante do metal na solução. O uso da ferramenta estatística de separação por similaridade, i-PCA, proporcionou uma melhor compreensão do conjunto de dados, extraídos do FTIR. Através do estudo da relação estrutura-propriedades dos complexos metálicos com a amilopectina tratada em solução conclui-se que o polímero em solução encontra-se como uma esfera não homogênea e enovelada, sendo que após a complexação com íons metálicos a macromolécula modifica sua conformação em solução. Para todos os complexos formados ficou evidenciado um aumento do *R<sub>h</sub>*, com exceção dos sais de Cr<sup>3+</sup>. Os resultados obtidos pelo gráfico de Berry mostram-se mais apropriado, pois a amilopectina possui elevadas ramificações, cujo as cadeias exteriores são cadeias flexíveis e não rígidas, o que facilita a complexação com os sais metálicos. Com o monitoramento, através da técnica do Espalhamento de luz estático de múltiplas amostras (SMSLS) é evidenciado o aumento da massa molecular ao adicionar o sal. A nanopartícula de amilopectina desenvolvida é altamente estável e compatível com bases cosméticas. Estudos posteriores serão realizados para a aplicabilidade cosmetologia, como hidrogéis e emulsões oleosas.

**Palavras-chave:** *amilopectina, complexos metálicos, ultrassom, cosmetologia.*

## ABSTRACT

The present work developed an analytical method to obtain and produce a solution of extracted solubilization of amylopectin Amidex 40003, genetically modified starch containing mostly amylopectin dissolved in DMSO/H<sub>2</sub>O mixture (90/10 v / v%), respectively. The objective was to produce and characterize amylopectin nanocomplexes with Cr<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> metal ions in the form of acetate, chloride and nitrate salts, as well as understanding the properties of inorganic and physical-chemical properties (the structure / properties) of complexes formed for future cosmetic applications. The monitoring of molecular characteristics of amylopectin solution was conducted during its preparation under ultrasound at different times and amplitudes, as well as in some complexes, using such as light scattering spectroscopy (LS), viscosimetry, techniques. The reduction of the molecular weight of the polymer solution using ultrasound demonstrated that this methodology is suitable for the reduction and control of the size of the polymer chain. The 2<sup>3</sup> full factorial design was performed to optimize the complexation reactions showing that the reaction time and concentration are significant variables. In addition, pH, conductivity, infrared (FTIR) spectroscopy, UV-Visible (UV-Vis), thermogravimetry (TGA) and static and dynamic light scattering (techniques) were used for the confirmation of complexes formed, and a study in conformational changes occurred after complexation with the solution of amylopectin. Complexes with Cr<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup> have a higher reaction yield compared to the other metals. The rheological study demonstrated a reduction in viscosity when introducing metal salts due to the packing of polymer chains. Since NO<sub>3</sub> salts have greater stability, the value of the intrinsic viscosity was found to be 1257 mL.g<sup>-1</sup> solution to amylopectin and the critical concentration (c \*) of the solution was equal to 0.795 mg.mL<sup>-1</sup>. It was found that the pH for complexation reactions around 5 is ideal for a higher average complexation. At pH above 8 decreases the complexing power of the metal in solution. The use of statistical tools separation similarity, i-PCA provided a better understanding of the data set extracted from FTIR. Through the study of the structure-properties of metal complexes in solution treated amylopectin concluded that the polymer is in solution as a sphere inhomogeneous and coiled, and after complexation with metal ions, the macromolecule alters its conformation in solution. For all complexes there was an evident increase of R<sub>h</sub>, with the exception of Cr<sup>3+</sup> salts. The results shown in the Berry plot were most suitable due to the high amylopectin branches whose outer chains are flexible and not rigid, which facilitates the complexation with metal salts. Using the technique of static light scattering of multiple samples (SMSLS) an increased molecular mass by adding salt is evident. The amylopectin nanoparticle developed is highly stable and compatible with cosmetic bases. Further studies will be performed to the applicability in cosmetology, such as hydrogels and oil emulsions.

**Keywords:** amylopectin, metal complexes, ultrasound, cosmetology.

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

---

## **1. INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, as políticas públicas relacionadas à preservação do meio ambiente priorizam pesquisas utilizando produtos e formas de processamento que usam os recursos de forma sustentável. Desta forma, a utilização de matérias-primas e diferentes tipos de processamentos vêm sendo estudados, com intuito de diminuir os problemas ambientais, bem como os índices de poluição e contaminação ambiental. Nesse sentido, os biopolímeros se mostram mais vantajosos em relação aos polímeros sintéticos biodegradáveis, pois são encontrados de forma abundante, principalmente no Brasil devido a biodiversidade de sua flora nativa, caracterizando-se assim como fonte renovável e não-poluidora.<sup>1</sup>

Dentre os produtos naturais podemos mencionar o amido, sendo um produto de baixo custo, renovável e biodegradável, possuindo grande importância econômica e ambiental.<sup>2</sup> Das inúmeras aplicações dos biopolímeros, tais como na área biomédica<sup>7</sup>, farmacêutica<sup>8</sup>, alimentícia<sup>9</sup> ou cosmética destaca-se o crescimento na demanda e produção de cosméticos à base de nanomateriais, chamados de nanocosméticos.<sup>10</sup> Entre os benefícios que a nanotecnologia pode trazer aos cosméticos destacam-se a melhor penetração de ingredientes na pele e nos cabelos, a estabilização de substâncias, a melhoria da eficácia e a possibilidade de liberação controlada dos ativos.<sup>11</sup> Contudo, um dos desafios a serem superados refere-se à baixa estabilidade de sistemas nanoestruturados nas bases cosméticas comerciais, levando à agregação ou perda de propriedades.<sup>12, 13</sup>

No que tange as pesquisas desenvolvidas com biopolímeros a respeito das suas propriedades cosméticas, diversos grupos no Brasil e em outros países, procuram compreender as suas estruturas e propriedades no sentido de isolar, de sintetizar e de analisar físico quimicamente os atributos na formulação de cosméticos.

Dentre os grupos de pesquisa nesta área, o Grupo de Bio&Macromoléculas, do Laboratório de Instrumentação e Dinâmica Molecular da UFRGS (LIMDIM), em uma de suas linhas de pesquisa, investiga a capacidade complexante de biopolímeros e suas características estruturais e físico-químicas, bem como seus mecanismos de interação, sendo que estes aspectos possibilitaram compreender as aplicações destas macromoléculas extraídas na diversidade da flora brasileira. Este conhecimento, aliado à tendência global do uso de produtos derivados de plantas e obtidos por processos biotecnológicos, por razões ecológicas, mostraram a importância da busca por novas fontes de polissacarídeos e

da avaliação de propriedades específicas na incorporação destas substâncias em sistemas complexos. Especificamente na indústria cosmética, existe uma demanda cada vez maior por matérias-primas de origem natural que confirmam ao produto as propriedades desejadas em termos de vantagens, de benefícios e de características físicas, sensoriais, visuais, funcionais e de compatibilidade com a pele e outros componentes da formulação, sendo que o entendimento do efeito causado por estes biopolímeros em um produto específico proporciona estabelecer uma ligação entre suas características físicas, químicas, sensoriais e sua utilização racional e funcional na indústria. A diversidade estrutural e propriedades físico-químicas dos biopolímeros fornecem uma alternativa para selecionar os materiais apropriados para o desenvolvimento e melhoria de novos produtos.

O amido por constituir-se num polímero natural biodegradável extremamente abundante e atóxico, vem sendo usado em diversos fins, o que torna esta pesquisa importante no sentido de compreender a estrutura-propriedades deste biopolímero e seus complexos metálicos, para futura aplicação cosmética.

Este biopolímero é um polissacarídeo de reserva encontrado nos vegetais, sendo constituído essencialmente por carboidratos, no entanto, substâncias como lipídios, proteínas e cinzas podem ser encontradas na sua composição. A quantidade destes constituintes depende da composição do vegetal e do método de extração e purificação.<sup>3</sup>

Os grânulos de amido são constituídos essencialmente por uma mistura de macromoléculas de dois tipos de  $\alpha$ -glucanos: amilose (Am) e amilopectina (Ap) que estão presentes em quantidades variáveis. As proporções em que essas estruturas aparecem diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta.<sup>4, 5</sup> As propriedades funcionais e físico-químicas dos amidos são retrogradação, gelatinização, solubilidade, poder de absorção de água e também possuem comportamento térmico e reológico. Estas propriedades são influenciadas pela forma, estrutura molecular e fontes botânicas dos amidos nativos.<sup>6</sup>

As propriedades mencionadas anteriormente, tanto funcionais quanto físico-químicas, conferem aos carboidratos especialmente a amilopectina, características no sentido de serem usados na formulação de cosméticos, principalmente as suas propriedades térmicas e reológicas.

A presente pesquisa de tese ocorreu em dois momentos: análise das propriedades estruturais e físico-químicas da amilopectina, bem como compreensão de suas

propriedades térmicas e reológicas. No segundo momento, a investigação destas propriedades a partir da potencialidade de outros métodos que contribuíram na confirmação da *performance* analítica desenvolvida no laboratório LINDIM, UFRGS, BRASIL, uma vez o estágio desenvolvido na universidade de TULANE, EUA, oportunizou o desenvolvimento de análises com outros equipamentos não disponíveis no Brasil. Estes dois momentos principais foram determinantes no entendimento dos aspectos investigados nesta pesquisa.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nanopartícula a base do biopolímero altamente estável e compatível com bases cosméticas (veículos) mais amplamente utilizadas em cosmetologia, os hidrogéis e as emulsões oleosas.

---

---

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho de pesquisa tem como objetivo desenvolver uma metodologia de performance analítica na obtenção e na produção de amilopectina de amido do tipo Waxy. Além disso, pretende-se produzir e caracterizar nanocomplexos de amilopectina com metais do subnível “p” e “d”. Além disso, deseja-se investigar as propriedades inorgânicas e físico-químicas (relação estrutura/propriedades) dos complexos formados, utilizando metodologias físico-químicas e analíticas.

#### 2.1.2. Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia de despolarização parcial da massa molecular de amilopectina, sob técnicas ultrassônicas;
- Caracterizar as soluções produzidas após a metodologia aplicada, utilizando técnicas de Viscosimetria, Espalhamento de Luz (LS), Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Termogravimétrica (TGA);
- Obter complexos de amilopectina com sais metálicos, através de reações de complexação;
- Determinar e avaliar as propriedades químicas dos complexos, evidenciando a presença do metal complexado, através de análises de condutividade, análise de pH, estudo reológico, técnicas espectroscópicas de espalhamento de luz, espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) e infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).
- Caracterizar os complexos formados com relação à sua estrutura e dimensão fractal.
- Monitorar as características moleculares da solução contendo majoritariamente amilopectina durante a sua preparação sob Ultrassom, em diferentes tempos e amplitudes, bem como em alguns complexos, através da técnica espectroscópica com detecção on line: Espalhamento de Luz Simultâneo de Múltiplas Amostras (SMSLS). Realizados no laboratório da Tulane University Center for Polymer Reaction Monitoring and Characterization (PolyRMC), em New Orleans, USA.

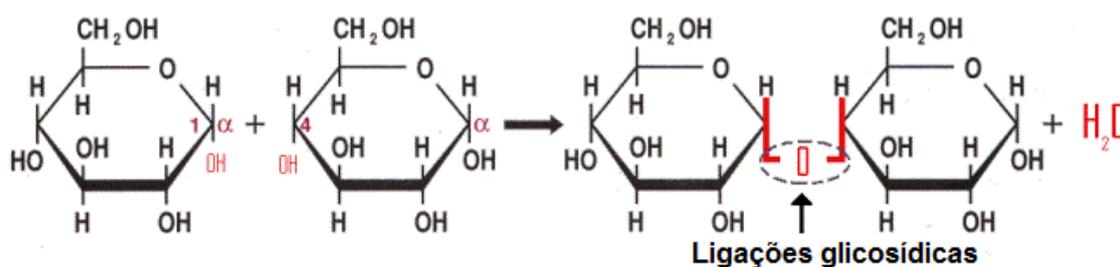
---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### 3. REVISAO BIBLIOGRÁFICA

Polissacarídeos são polímeros naturais constituídos de unidades monoméricas, monossacarídeos, de elevada massa molecular, com unidades repetitivas unidas através de ligações glicosídicas (Figura 1).

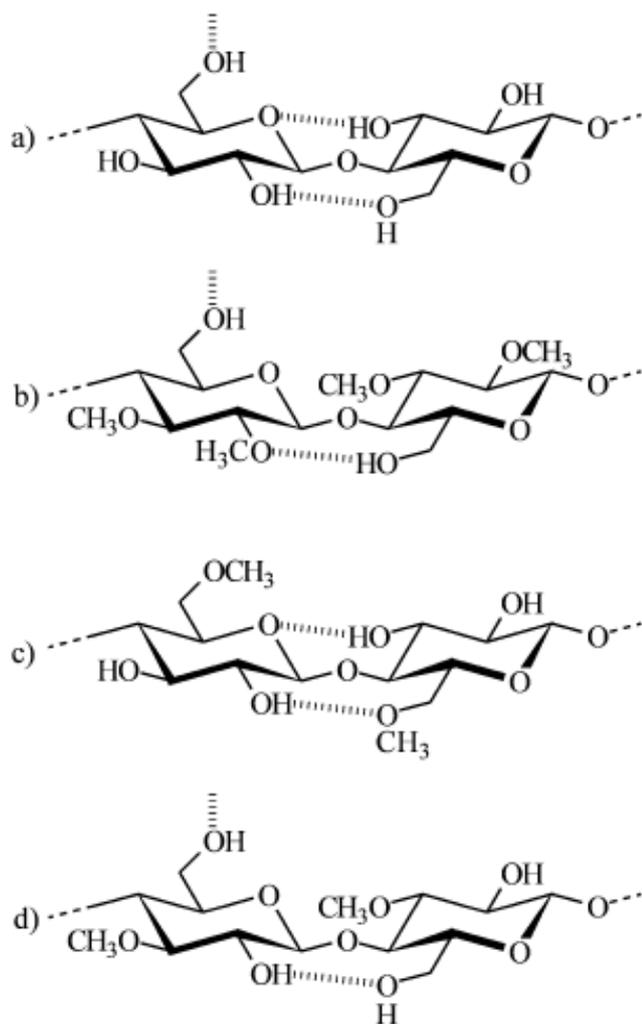


**Figura 1:** Estrutura química das ligações glicosídicas no amido.

Estas moléculas altamente abundantes na natureza são extraídas de plantas (incluindo as algas), de animais e fungos ou de origem microbiana. Suas propriedades físico-químicas possibilitam múltiplas estruturas químicas, composição química variável e uma natureza iônica<sup>15</sup>, com muitas especificidades favoráveis, tais como, solubilidade e hidrofiliabilidade. Além disso, suas características físico-químicas e biológicas podem ser modificadas utilizando técnicas, tais como oxidação, sulfatação, esterificação, amidação, grafting ou métodos de enxertia.<sup>16, 17</sup> A atoxicidade, biocompatibilidade, estabilidade, baixa natureza dos custos e disponibilidade de locais reativos para modificação química, possibilitam um interesse industrial<sup>18</sup> no uso extensivo de aplicações, especialmente nas áreas de alimentos<sup>9</sup>, biomédicas<sup>19</sup>, cosméticas<sup>10,12</sup> e farmacêuticas.<sup>8</sup> Esta visão industrialmente importante para os polissacarídeos se concentra principalmente nos derivados químicos de maior volume potencial, que bioquimicamente, são divididos em três classes: o amido, o glicogênio e a celulose.<sup>20</sup>

A funcionalização química usando os grupos livres hidroxila (-OH) torna provável a formação de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares<sup>21</sup> (Figura 2), sendo considerada como um dos fatores mais importantes que influenciam as propriedades físicas e químicas destas moléculas, pois estabilizam a molécula em si e servem para unir moléculas vizinhas.<sup>22, 23</sup> Sabe-se que as ligações de hidrogênio possuem um papel importantíssimo nos mecanismos biológicos e são responsáveis pela estrutura e propriedades da água, sendo essenciais nos processos metabólicos de espécies vegetais e animais. As ligações de hidrogênio são componentes fundamentais da estrutura e

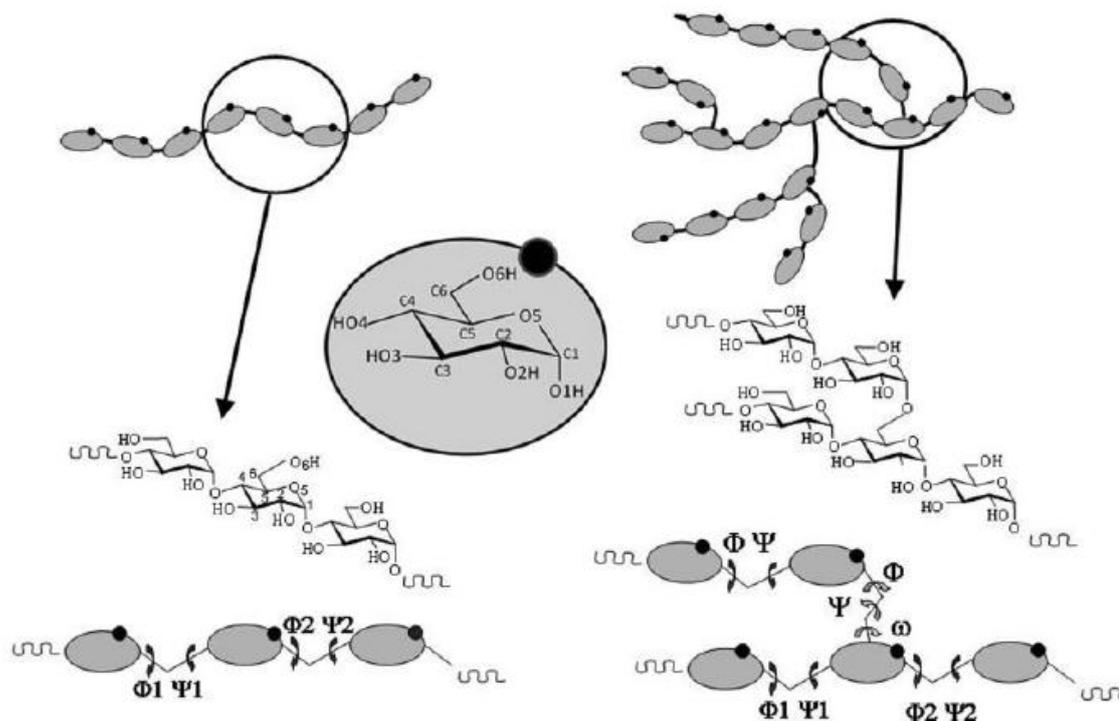
funcionalidade de biomoléculas, que determinam as ligações glicosídicas como nos polissacarídeos, proteínas e nos pares de bases dos ácidos nucleicos, e das espécies que contém grupos hidroxilas em geral.<sup>24, 25</sup>



**Figura 2:** Representação das possíveis ligações de hidrogênio da celulose (a) e metil celulose (b, c, d).<sup>21</sup>

A presença das ligações de hidrogênio intermolecular entre os componentes de uma solução polimérica pode promover compatibilidade e também efeitos de miscibilidade. Além disso, são significativas nas propriedades das misturas, tornando-se eficaz na modificação de suas propriedades. Dentro deste contexto, os polissacarídeos são muito mais complexos do que moléculas orgânicas comuns. Tal complexidade provém do elevado número de átomos presentes numa macromolécula e da possibilidade de rotação relativamente livre em torno das muitas ligações covalentes da mesma (Figura 3). Desta forma, estes polímeros naturais podem ser usados na retenção de água e produção de

fluídos viscosos, massas e géis com qualidade e textura desejadas, assim como formar complexos de polímero-metal.<sup>24-26</sup>



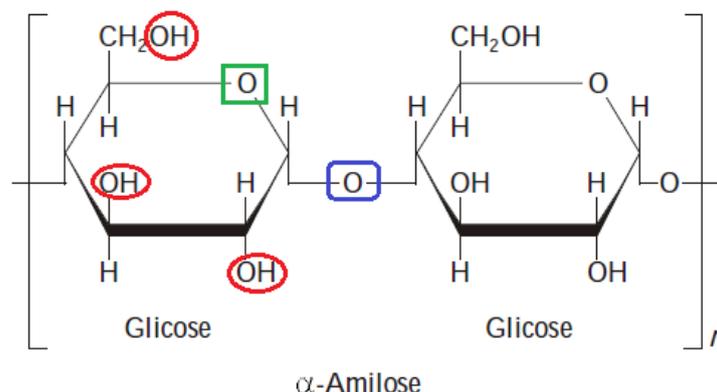
**Figura 3:** Estrutura básica da macromolécula de amilose e amilopectina, com rotulagem dos átomos e torção dos ângulos.<sup>27</sup>

Substâncias poliméricas com capacidade de formar complexos de íons metálicos são muito comuns, provenientes de fontes naturais e/ou industriais. Os polissacarídeos, como a glicose e quitosana são exemplos deste tipo de substância, cuja capacidade de fixar metais pesados merece interesse do ponto de vista científico e tecnológico.<sup>28</sup>

Um complexo polímero-metal é um composto de coordenação resultante da interação entre funções ligantes ancoradas numa cadeia polimérica e íons metálicos. Um polímero ligante contém em sua cadeia alguns sítios, tais como: nitrogênio, oxigênio ou enxofre. A presença de grupos funcionais reativos ao longo da cadeia dos polímeros favorecem interações com outras espécies moleculares podendo ocorrer complexação.<sup>29, 30</sup>

O amido e seus polissacarídeos, amilose e amilopectina, tem dois importantes grupos funcionais: o grupo – OH, que é suscetível a reações de substituição, e a ligação glicosídica C–O–C, suscetível à quebra de cadeia, sendo assim são potenciais ligantes (*O-ligante*) para vários íons metálicos. Isto é possível, pois cada uma de suas unidades monoméricas possuem cinco potenciais sítios de coordenação (Figura 4). O grupo

hidroxila da glicose tem caráter nucleófilo. Estes sítios consistem em três grupos hidroxilas, um átomo de oxigênio do anel na forma piranosídica e o oxigênio da ligação glicosídica, respectivamente.<sup>29, 30</sup>

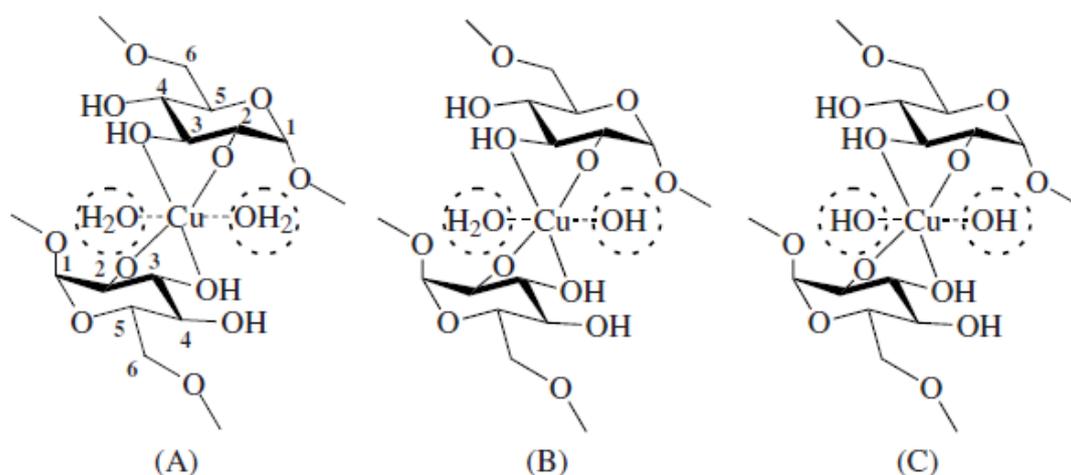


**Figura 4:** Sítios potenciais de coordenação do amido: grupos hidroxila (em vermelho), átomo de oxigênio (em verde) e átomo de oxigênio da ligação glicosídica (em azul). (Fonte: Autora)

A complexação dos íons metálicos com polissacarídeos podem influenciar a distribuição e mobilidade de minerais no organismo, assim como podem ser responsável pela introdução de íons metálicos na cadeia alimentar e/ou a sua evacuação dos organismos alimentados com polissacarídeos. NIKOLIC *et al.*<sup>31</sup> investigaram complexos de dextrano, um biopolímero ramificado, com íons de cobre, devido sua possível aplicação na medicina e na veterinária. Os autores mencionam que o dextrano é conhecido como um polissacarídeo neutro com inúmeras aplicações em alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica, sendo que o cobre um biometal indispensável para a vida de organismos, devido sua capacidade enzimática. A interação entre estas biomoléculas com íons metálicos nos organismos vivos provoca uma modificação na função biológica. Uma das funções conhecidas dos complexos deste polissacarídeo é o transporte de íons metálicos através de membranas celulares. Os complexos de cobre possuem, no campo da bioquímica, um significado especial a partir do aspecto da prevenção e tratamento para anemia causada por deficiência de ferro no organismo.<sup>31</sup>

Foi estabelecido que o grau de ligação do cobre dentro do complexo depende principalmente do pH da solução, bem como a participação tanto dos grupos – OH e das moléculas de H<sub>2</sub>O na esfera de coordenação do cobre. Os íons Cu<sup>2+</sup> podem adquirir três diferentes tipos de complexos com a unidade monomérica desprotonada. Um modelo proposto do complexo de Cu(II)-dextrano possui geometria tetragonal *O<sub>h</sub>* com coordenação

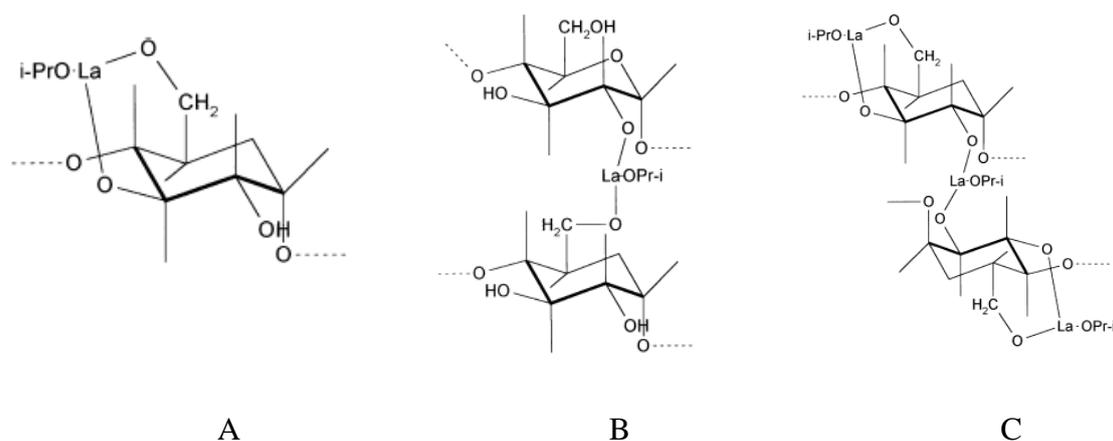
distorcida no pH 7,5; 9,2 e 11,4. (Figura 5) e a degradação do complexo de Cu (II) - dextrano começa com o pH acima de 12.<sup>32, 33</sup>



**Figura 5:** Influência do pH no meio esfera de coordenação interna do Cu (II) (A) pH = 7,5, (B) pH 9,2, (C) pH 11,4.<sup>31</sup>

A reatividade do dextrano na complexação do cobre depende principalmente da reatividade dos grupos hidroxilas equatorialmente orientadas.<sup>33</sup> Os carboidratos sem grupos doadores ancorados formam um complexo fraco com  $\text{Cu}^{2+}$  em meio aquoso. A existência de mais de um grupo pode evitar a coordenação dos grupos alcoólis – OH, completando a esfera de coordenação do íon metálico. A interação do metal com o conjunto de grupos – OH não-desprotonados aumenta a estabilidade do complexo.<sup>31</sup>

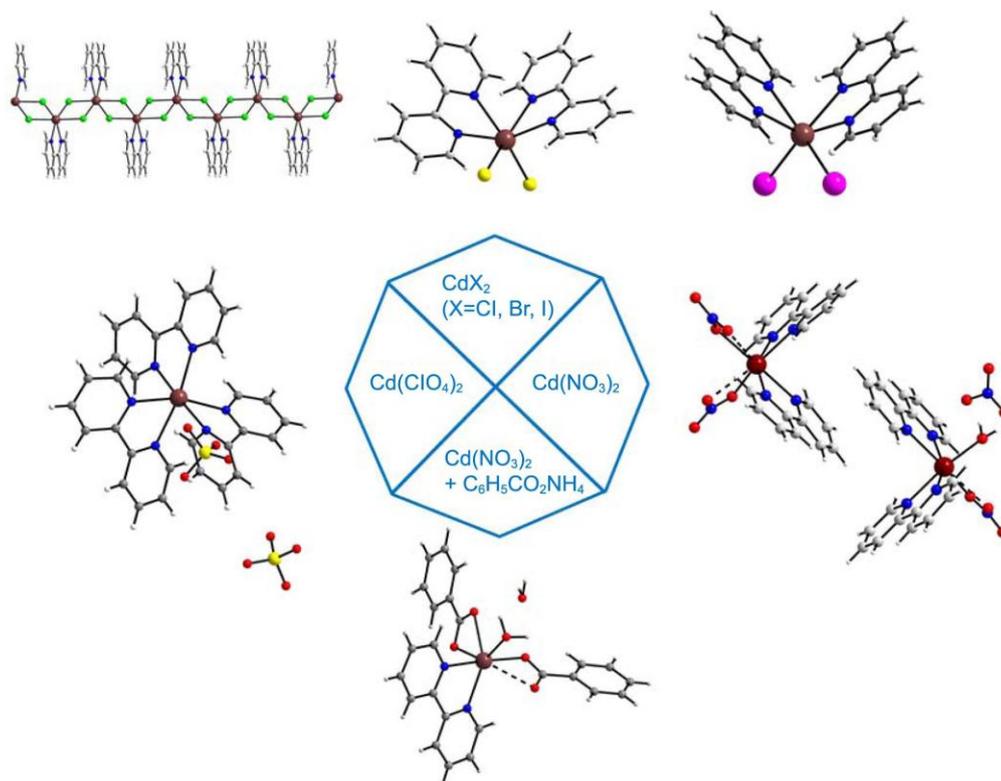
A coordenação de polissacarídeos com metais pode atuar na sua suscetibilidade a transformações enzimáticas e o efeito das interações metal-íon no amido age sobre suas propriedades reológicas e ópticas.<sup>30, 34, 35</sup> Todos estes centros de coordenação são bases rígidas de Pearson, devido à flexibilidade das cadeias promovida pelas ligações  $\alpha$  e  $\beta$  dos polissacarídeos e a presença de grupos hidroxilas (– OH), favorecem as ligações inter e intramoleculares. Porém, cabe salientar, que nem todos os centros de coordenação do ligante estão envolvidos na coordenação (Figura 6).<sup>36</sup> Além disso, devido as pequenas diferenças na basicidade dos sítios, a sua capacidade de coordenar os íons metálicos não é seletiva.<sup>37</sup>



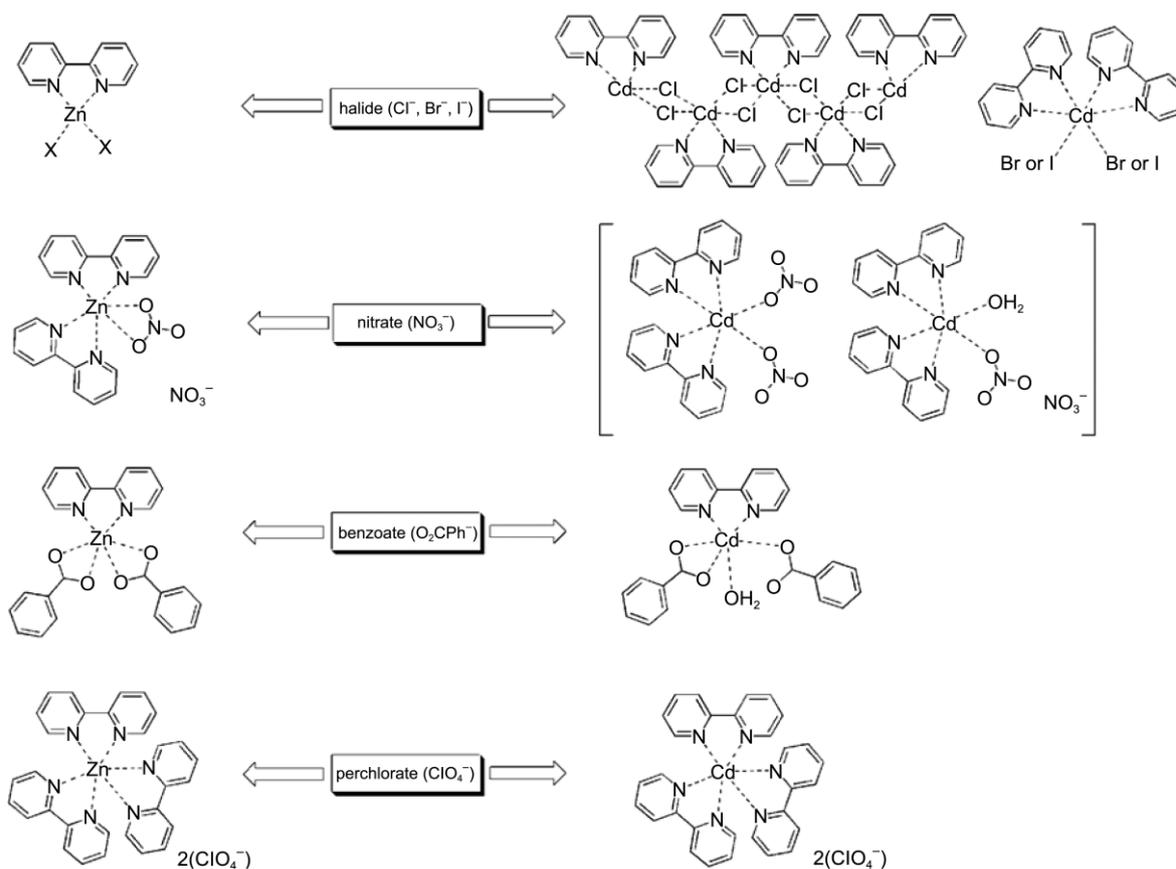
**Figura 6:** Estruturas de complexos de amido-lantânio  $[La(OPr-i)_3]$ , produzidos por refluxo em tolueno, obtidos por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x.<sup>36</sup>

Os polímeros de coordenação podem ser compreendidos como produtos originados das reações de auto-organização entre unidades metálicas e ligantes ambidentados atuando como ponte, gerando unidades de repetição que se estendem por meio de interações metal-ligante. Portanto, a construção de polímeros de coordenação baseados em arranjos de íons metálicos e ligantes orgânicos multifuncionais, tem-se mostrado um interessante campo de pesquisa, não somente por suas potenciais aplicações como materiais funcionais, mas também devido as intrigantes topologias de rede que vem sendo criadas.<sup>15, 38</sup>

Portanto, muitos esforços têm sido dedicados ao estudo dos aspectos estruturais para compreender e controlar a vários fatores que afetam a coordenação dos metais e suas diferentes arquiteturas. Embora exista um número muito escasso de trabalhos que discutem a complexação de biopolímeros com sais metálicos, há vários fatores que afetam a estrutura de um complexo, tais como a geometria de coordenação de íons metálicos<sup>39</sup>, a estrutura do ligante polimérico<sup>40</sup>, as ligações de hidrogênio<sup>22, 41</sup>, os contra-íons<sup>42, 43, 44</sup>, o valor de pH<sup>45, 46</sup>, a temperatura<sup>47</sup>, a concentração do ligante e do metal<sup>48</sup>, a interação do solvente<sup>43, 49</sup>, entre outros. Entre eles, os ânions desempenham um papel importante na construção do complexo. Park *et al*<sup>44</sup> demonstraram o efeito do ânions na estrutura de complexos (Figuras 7 e 8).

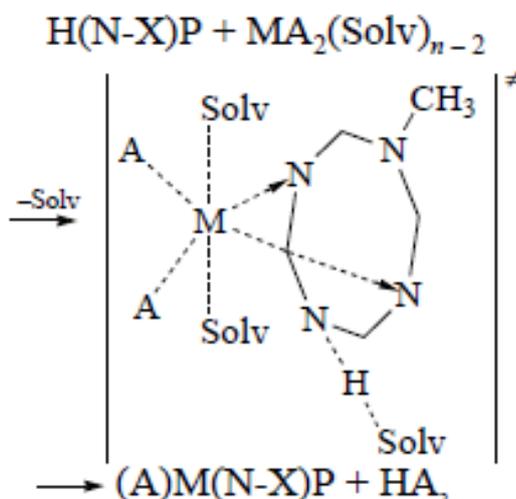


**Figura 7:** Estruturas de compostos com  $\text{Cd}^{2+}$  com ligantes 2,2-bpy.<sup>44</sup>



**Figura 8:** Estrutura dos compostos com ânions com 2,2-bpy.<sup>44</sup>

O estudo da relação do ânion e do solvente na formação do complexo, Berezin *et al*<sup>43</sup> demonstrou que as posições das bandas eletrônicas do espectro de absorção depende apenas da natureza do ânion na esfera de coordenação (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema do sal metálico solvatado no processo de formação do complexo.<sup>43</sup>

### 3.1. AMIDO

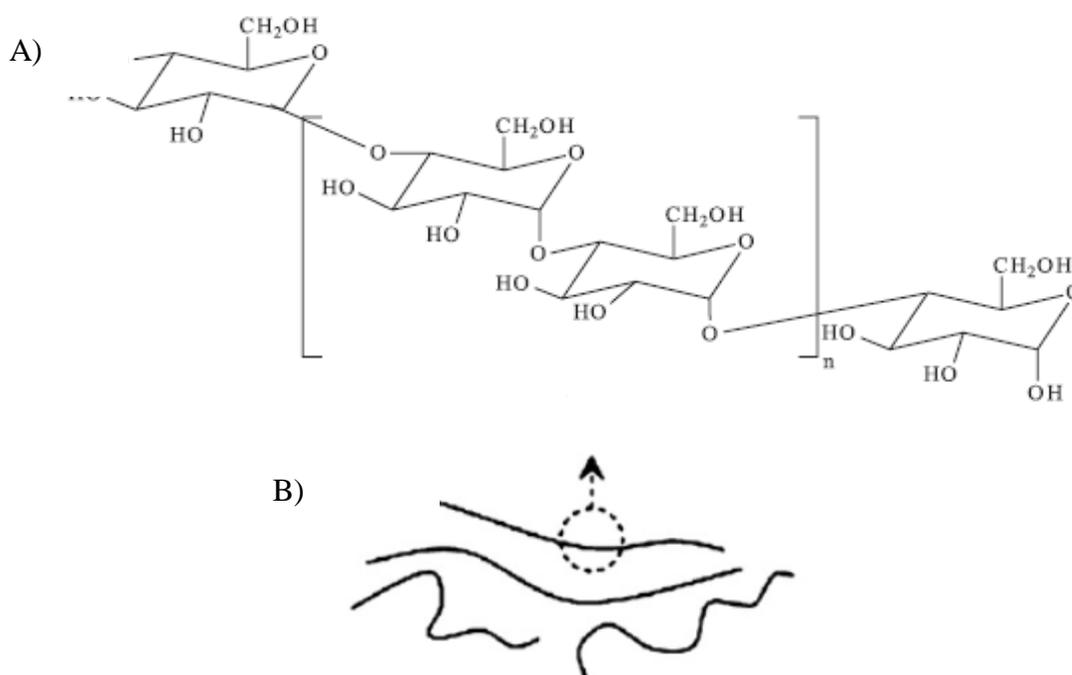
O amido é um polissacarídeo de reserva encontrado nas plantas. O mesmo é constituído praticamente de carboidratos, no entanto, substâncias como lipídios, proteínas, e cinzas estão presentes em sua composição. A quantidade destes constituintes depende da composição da planta e do método de extração e purificação<sup>3</sup> Os grânulos de amido, são constituídos essencialmente por uma mistura de macromoléculas de dois tipos de  $\alpha$ -glucanos: amilose (Am) e amilopectina (Ap) que estão presentes em quantidades variáveis. As proporções dessas estruturas diferem em relação às fontes botânicas, variedades de uma mesma espécie e, mesmo numa mesma variedade, de acordo com o grau de maturação da planta.<sup>4, 5</sup> As propriedades funcionais e físico-químicas dos amidos são retrogradação, gelatinização, solubilidade, poder de absorção de água e também possuem comportamento térmico e reológico. Estas propriedades são influenciadas pela forma, estrutura molecular e fontes botânicas dos amidos nativos.<sup>6</sup>

A amilose e a amilopectina têm propriedades diferentes. A primeira tem uma tendência alta a retrogradação e produz géis duros e filmes fortes. A amilopectina, por sua vez, produz géis macios, filmes fracos e flexíveis. Além disso, é estruturalmente e

funcionalmente a mais importante das duas frações, pois sozinha é suficiente para formar o grânulo, como ocorre em mutantes que são desprovidos de amilose.<sup>5,50</sup>

Os grânulos de amido podem ocorrer em todas as formas (esféricos, ovais, poligonais, lenticulares, alongados, etc.) e tamanhos,<sup>15,51</sup> com diâmetros que variam desde 0,1 a 200  $\mu\text{m}$ , dependendo da sua origem botânica com empacotamento denso, cuja densidade é de aproximadamente  $1,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  e estruturas semicristalinas, onde a cristalinidade varia de 15 a 45 %.<sup>27</sup> Comercialmente, os amidos disponíveis são isolados a partir de grãos, como de arroz, milho, trigo e de tubérculos, tais como batata e mandioca.<sup>52</sup>

Os amidos são blocos de carboidratos do tipo  $\alpha$ -D-glucopiranosose onde através da condensação enzimática, uma molécula de água dilui-se entre duas moléculas de glicose para formar uma ligação, como ilustrado na Figura 1. Esta condensação ocorre predominantemente entre os carbonos 1 e 4 e ocasionalmente entre os carbonos 1 e 6. Quando predominantemente se desenvolvem ligações  $\alpha$ -(1,4), o homopolímero resultante é denominado *amilose* (Figura 10).<sup>53,5</sup>



**Figura 10:** A) Estrutura química e B) Representação física da amilose.

### 3.1.1. Amilose

A amilose é uma macromolécula linear com algumas ramificações sendo que o comprimento desta cadeia varia de acordo com a fonte biológica. Em geral a mesma possui

entre 500 e 2 000 unidades de glicose, com massa molecular entre  $10^4 - 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , em que as unidades  $\alpha$ -D-glicopirranose são conectadas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4). Esta ligação glicosídica é estável em pHs altos, mas hidrolisa em pHs baixos, possuindo uma extremidade redutora e uma não-redutora. As poucas ramificações fazem com que a amilose seja hidrolisada mais lentamente e com isto aumenta a densidade, tornando-a menos solúvel em água.<sup>54</sup>

Estudos<sup>51, 55</sup> demonstram que a amilose não é completamente linear, destacam que existem nos grânulos de amido moléculas de amilose estritamente lineares e outras que apresentam ramificações. A amilose ramificada possui alguns pequenos *clusters* de cadeias menores. As ramificações são separadas por grandes distâncias, permitindo às moléculas agirem como se fossem essencialmente lineares, sem alterar significativamente o comportamento das cadeias de amilose em solução, permanecendo idênticas às cadeias estritamente lineares. Devido às ligações  $\alpha$ -(1,4), as moléculas de amilose assumem uma conformação helicoidal, onde os numerosos grupos hidroxila ficam voltados para o exterior.

Esta estrutura helicoidal explica sua complexação com outras moléculas, como o iodo,<sup>35, 50, 54</sup> em consequência, da capacidade de formar complexos de inclusão com moléculas pequenas, especialmente moléculas não polares com um grupo polar não-dominante.<sup>4, 56</sup> A estrutura dos complexos de amilose formados com uma grande variedade de pequenas moléculas foi investigado principalmente por técnicas de difração de raios-X e difração de elétrons.<sup>57, 13</sup>

O entrelaçamento entre a amilose e a amilopectina, juntamente com a presença de fosfolípidos e lípidos, tem efeitos significativos sobre as propriedades físicas.<sup>35</sup> Além da amilose e da amilopectina, alguns amidos, geneticamente modificados, possuem um teor de amilose aumentado. Por exemplo, as poliglucanas que contém estruturas que são aparentemente intermediárias aos componentes principais.<sup>27</sup>

Muitas propriedades da amilose podem ser explicadas pela sua habilidade em formar diferentes estruturas moleculares. A maioria das metodologias utilizadas para determinação desse tipo de amido baseia-se no fato de que, em soluções aquosas neutras, a estrutura normal de espiral possui a capacidade de interagir com iodo, produzindo complexo de inclusão helicoidal com aproximadamente seis moléculas de amilose por giro, no qual o iodo se encontra na cavidade central da hélice. Além disso, mudanças moleculares tornam possível a formação de complexos com moléculas de lipídios nas

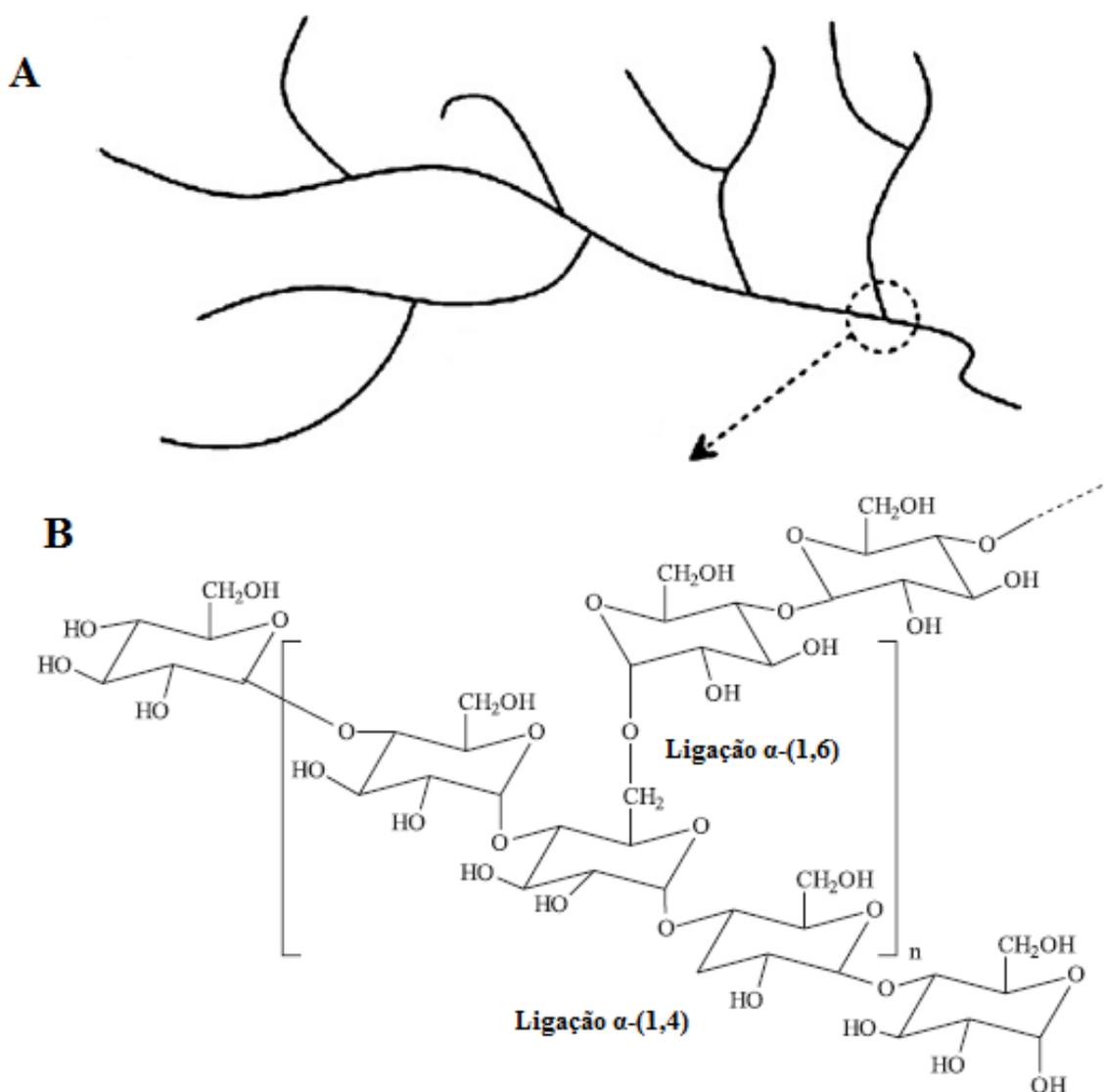
regiões superficiais do grânulo, o que inibe a degradação do amido por enzimas como fosforilase,  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase. Outros complexos de inclusão helicoidal que podem ser formados com a amilose incluem alguns álcoois e ácidos orgânicos,<sup>58, 59</sup> não sendo encontrados na literatura a complexação com metais de transição.

A amilopectina, por outro lado, é um polímero ramificado, com elevada massa molecular comparado com a amilose. A técnica de espalhamento de luz indica que a nível molecular, esta diferença pode ficar na casa dos milhões. A alta massa molecular e a estrutura ramificada da amilopectina reduz a mobilidade das cadeias poliméricas, interferindo na orientação das mesmas de modo a permitir vários níveis de ligação de hidrogênio.<sup>52</sup>

### 3.1.2. Amilopectina

A estrutura da amilopectina (Figura 11), além das ligações do tipo  $\alpha$ -(1,4) presentes entre as unidades de  $\alpha$ -D-glicopirranose na cadeia principal, é caracterizada pelo alto grau de ramificação. Essas ramificações ocorrem em um percentual de 5 a 6 % de ligações  $\alpha$ -(1,6) nas unidades de  $\alpha$ -D-glicopirranose e essa região é constituída por duplas hélices. Os conjuntos dessas ramificações formam agregados cristalinos (clusters).<sup>23</sup>

Este polissacarídeo possui cerca de 1500 unidades de glicose e a cada 25 dessas unidades há uma ramificação, com massa molecular entre  $10^7$ - $10^9$  g.mol<sup>-1</sup>.<sup>54, 51</sup> O mesmo apresenta um grau de polimerização (DP) de 4700 a 12800 unidades glicose e os valores de comprimento médio de cadeia (CL) variam entre 17 a 24.<sup>53</sup> Fisicamente, a maioria dos amidos nativos são semicristalinos, tendo uma cristalinidade de cerca de 20 - 45 %. A cristalinidade dos grânulos de amido é atribuída principalmente à amilopectina e não a amilose, que embora seja linear, apresenta uma conformação que dificulta sua associação regular com outras cadeias.<sup>50</sup>

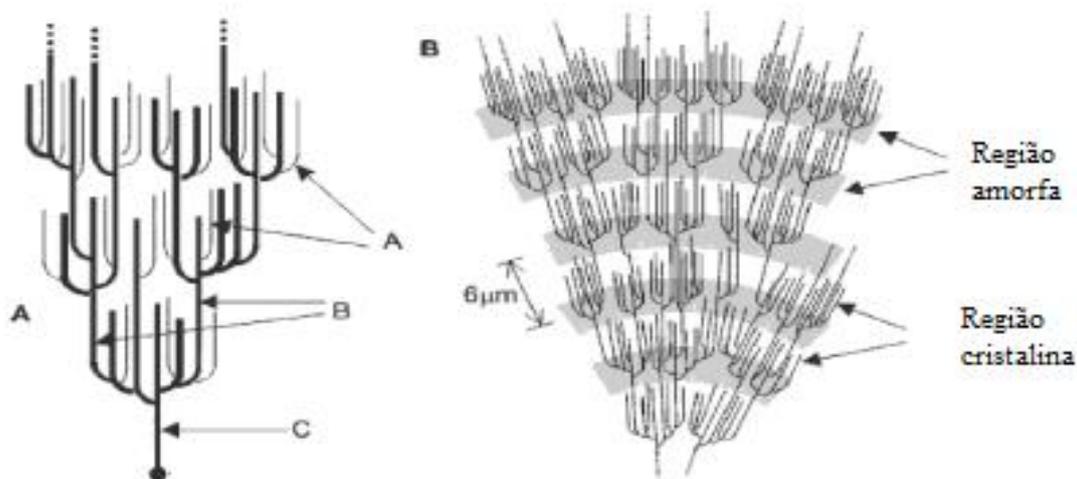


**Figura 11:** A) Representação física da amilopectina. B) Estrutura química.

Estes polímeros possuem muitas extremidades não-redutoras, porém apenas uma extremidade redutora. A amilose e os pontos de ramificação da amilopectina formam regiões amorfas. As curtas ramificações da amilopectina são o principal componente cristalino no amido granular. As regiões cristalinas estão presentes sob a forma de hélices duplas com comprimento de aproximadamente 6 nm e os segmentos de amilopectina nas regiões cristalinas estão todos em paralelo ao eixo da hélice maior.<sup>52, 60</sup> As cadeias de amilopectina estão organizadas de maneiras diferentes, sugerindo uma classificação de cadeias A, B e C (Figura 9). O tipo A é composto por uma cadeia não redutora de glicoses unidas por ligações  $\alpha$ -(1,4) sem ramificações, sendo unida a uma cadeia tipo B por meio de ligações  $\alpha$ -(1,6). As cadeias do tipo B são compostas por glicoses ligadas em  $\alpha$ -(1,4) e  $\alpha$ -(1,6), contendo uma ou várias cadeias tipo A e podem conter cadeias tipo B unidas por

meio de um grupo hidroxila primário. A cadeia C é única em uma molécula de amilopectina, sendo composta por ligações  $\alpha$ -(1,4) e  $\alpha$ -(1,6), com grupamento terminal redutor.<sup>53</sup>

Acredita-se que esta ligação esteja localizada entre as cadeias da amilopectina e aleatoriamente entremada entre as regiões amorfas e cristalinas (Figura 12).<sup>5</sup>



**Figura 12:** Classificação das cadeias da amilopectina, em tipo A, B e C. (B) Estrutura da amilopectina formando as regiões amorfas e cristalinas no grânulo de amido.<sup>50</sup>

Apesar de seu limitado papel na formação de cristais, a amilose pode influenciar a organização das duplas hélices, interferindo na densidade de empacotamento das cadeias de amilopectina.<sup>5</sup> Além disso, Parker e seus colaboradores<sup>50</sup> sugerem que parte da amilose pode se cristalizar juntamente com a amilopectina, formando lamelas cristalinas. Porém, a organização exata desses componentes dentro do grânulo ainda não está totalmente esclarecida.<sup>61, 23</sup>

Atualmente, diversas pesquisas<sup>37, 5, 59, 62, 63</sup> sobre a avaliação da relação existente entre a estrutura molecular da amilopectina e seu comportamento em algumas propriedades físico-químicas sugerem que várias características estruturais, como teor de amilose, distribuição de comprimento das cadeias e o grau de cristalinidade no amido, poderiam estar intimamente relacionadas aos eventos associados com a gelatinização e retrogradação, tais como inchamento do grânulo, lixiviação de amilose e/ ou amilopectina, perda da estrutura radial (birrefringência), supra-molecular (cristalinidade) e molecular e recristalização.

### 3.2. REOLOGIA

Para melhor compreender as características moleculares da solução contendo majoritariamente amilopectina alguns conceitos sobre reologia são necessários para explicar os resultados obtidos utilizando o viscosímetro Brookfield.

A reologia é o ramo da físico-química que estuda a deformação e o escoamento da matéria, quando esta é submetida a esforços originados por forças externas.<sup>64, 65</sup> As características de deformação e escoamento de um dado material, isto é, suas propriedades reológicas, irão depender da massa molecular, da possibilidade de formação de ligações intermoleculares, da forma que a molécula adota em solução, de sua concentração, da temperatura em que são efetuadas as medidas e da intensidade da força aplicada sobre o material.<sup>66</sup> A deformação ocorre no caso da matéria estar no estado sólido e o escoamento, quando a matéria está no estado líquido. A propriedade reológica de interesse no caso dos sólidos é a elasticidade e no caso dos líquidos é a sua viscosidade. No entanto, alguns materiais não podem ser diferenciados em sólidos ou líquidos com clareza, de modo que a propriedade reológica de interesse nestes casos é a viscoelasticidade.<sup>65, 67, 68</sup>

A viscosimetria consiste no segmento da mecânica dos fluidos capaz de determinar sua resposta reológica. A resistência de um fluido contra qualquer mudança posicional de seu elemento volumétrico é responsável pela grandeza física conhecida por viscosidade.<sup>69</sup>

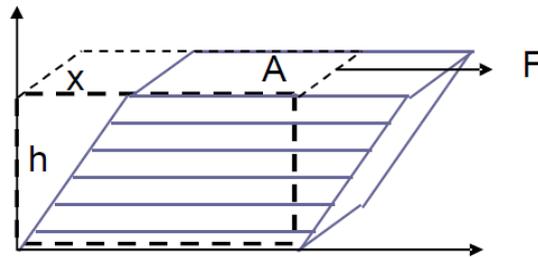
Matematicamente, Issac Newton foi o primeiro a descrever o comportamento de um líquido ideal ao relacionar a tensão de cisalhamento com a viscosidade.

$$\sigma = \eta \cdot \gamma$$

**Equação 1**

Onde:  $\sigma$  = tensão de cisalhamento (Pa);  $\eta$  = viscosidade (Pa.s);  $\gamma$  = taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ )

Newton definiu a viscosidade utilizando o modelo de duas placas de áreas A, separadas por uma distância h, movimentadas através da aplicação de uma força  $\vec{F}$  (Figura 13). A força ( $\vec{F}$ ) requerida por unidade de área (A) para manter uma diferença de velocidade entre as placas ( $dv/dx$ ) é diretamente proporcional ao gradiente de velocidade através do líquido. Assim, o coeficiente de proporcionalidade é igual à viscosidade ( $\eta$ ). A força por unidade de área é conhecida como tensão de cisalhamento ( $\sigma$ ) e o gradiente de velocidade é conhecido como taxa de cisalhamento ( $\gamma$ ).<sup>68</sup>



**Figura 13:** Representação esquemática de fluxo entre duas placas paralelas.<sup>70</sup>

A tensão de cisalhamento ( $\sigma$ ) é uma força aplicada tangencialmente sobre uma área, correspondente à interface entre a placa superior e o líquido abaixo, gerando um fluxo na camada líquida. A velocidade do fluxo pode ser mantida com uma força constante controlada pela resistência interna do líquido, a viscosidade. Esta força provoca um fluxo, cuja velocidade máxima se encontra na camada superior do líquido e diminui atravessando o corpo. No fluxo laminar, uma camada infinitamente fina de líquido desliza sobre a outra e esse gradiente de velocidade é denominado taxa de cisalhamento ( $\gamma$ )<sup>70</sup> A viscosidade, portanto, pode ser expressa matematicamente pela razão entre a tensão e a taxa de cisalhamento.

$$\eta = \sigma / \gamma \quad \text{Equação 2}$$

Sendo a unidade no SI para a viscosidade:

$$\eta = \frac{N/m^2}{m s^{-1}/m} \therefore \eta = \frac{N/m^2}{s^{-1}} \therefore \eta = Pa \cdot s$$

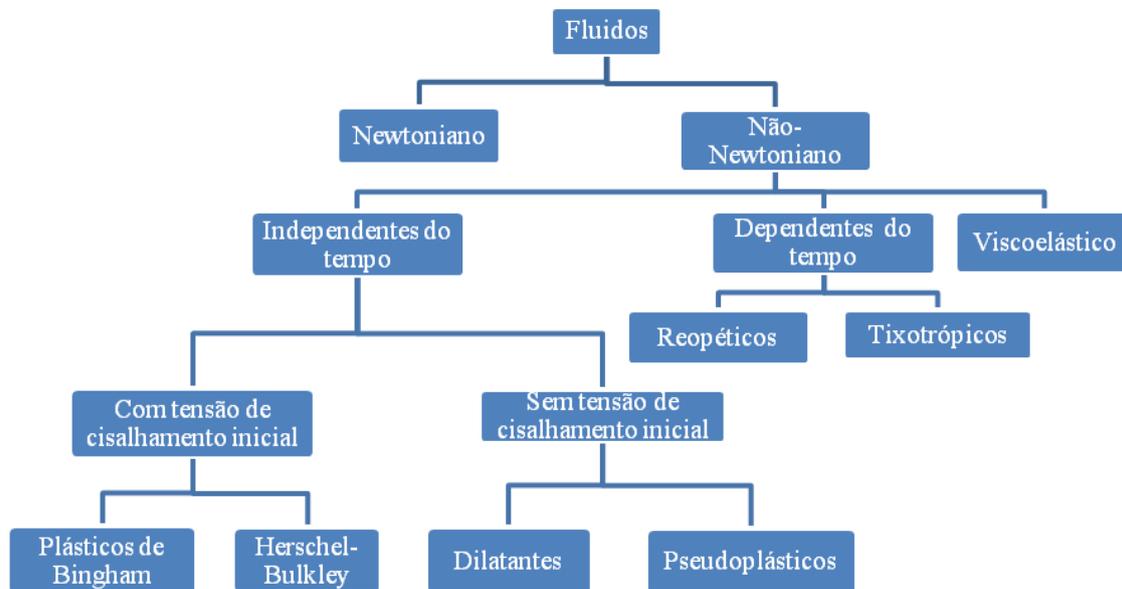
Onde:  $N$  é Newton,  $m$  é metros,  $s$  é segundos e  $Pa$  é Pascal.

A viscosidade pode ser medida com reômetros que mostram diferentes valores de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, caracterizando o comportamento de um fluido. Os reômetros concêntrico-cilindros são os mais comuns no campo da determinação da viscosidade aparente.<sup>71</sup>

Se o gráfico da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento à temperatura e pressão constantes for linear, a viscosidade será constante e igual ao coeficiente angular da reta.

### 3.2.1. Comportamento do Material

De uma maneira abrangente, os fluidos podem ser classificados em Newtonianos e não-Newtonianos (Figura 14).



**Figura 14:** Fluxograma do comportamento dos fluidos Newtoniano e não-Newtoniano. (Fonte: Autora)

#### 3.2.1.1 Fluidos Newtonianos

Nos fluidos Newtonianos, a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento como demonstrado na Equação 1. Deste modo a viscosidade ( $\eta$ ) do sistema independe da taxa de cisalhamento e da tensão de cisalhamento, dependendo apenas da composição e temperatura, e o escoamento se inicia assim que a tensão é aplicada. Uma única determinação experimental é suficiente para definir um único parâmetro reológico. Os fluidos que apresentam comportamento Newtoniano são todos os gases, líquidos e soluções homogêneas de baixa massa molecular.<sup>69</sup>

#### 3.2.1.2 Fluidos Não-Newtonianos

Os fluidos não-Newtonianos são caracterizados por uma relação não-linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento e, devido às interações entre seus componentes, os valores obtidos são considerados como viscosidade aparente, podendo, ainda serem classificados como dependentes ou independentes do tempo.

### 3.2.1.2.1. Fluidos Não-Newtonianos Dependentes do Tempo

Nos fluidos não-newtonianos dependentes do tempo, o tempo é a variável adicional, o que condiciona a análise. Um indício do comportamento reológico dependente do tempo de um fluido é a observação da chamada curva de *histerese*.<sup>64, 72</sup>

Para que seja possível verificar se o fluido apresenta ou não viscosidade aparente dependente do tempo, deve ser realizado um estudo reológico onde a substância em análise deve ser submetida a um aumento de tensão (ida) e, quando essa atingir um valor máximo, ser reduzida até retornar ao valor inicial (volta). Se a substância não apresenta comportamento reológico dependente do tempo, as curvas de tensão x taxas de cisalhamento obtidas (ida e volta) devem ser coincidentes. Entretanto, se a viscosidade aparente muda com o tempo, as curvas de ida e volta não seguem o mesmo caminho, formando uma curva de histerese.<sup>64, 72</sup>

Nos fluidos dependentes do tempo, a viscosidade aparente do fluido varia tanto com a taxa de cisalhamento quanto com a duração de sua aplicação, podendo ser classificados como tixotrópicos ou reopéticos. Nos fluidos tixotrópicos ocorre o decréscimo da viscosidade aparente com o tempo de cisalhamento, a uma condição constante de temperatura e taxa de cisalhamento. Nesses fluidos, as mudanças no comportamento reológico com o tempo devem-se provavelmente às mudanças estruturais no fluido. No entanto, após o repouso, tendem a retornar à condição inicial de viscosidade.<sup>65, 72</sup>

Nos fluidos reopéticos ocorre aumento da viscosidade aparente com o tempo de cisalhamento. Assim como os tixotrópicos, após o repouso, tendem a retornar ao seu comportamento reológico inicial. Esses são casos muito complexos e raros, não sendo muito frequentes no campo de alimentos. O comportamento desses fluidos, normalmente, não é incluído nos cálculos de engenharia, devido à complexidade do fenômeno.<sup>73, 74</sup>

### 3.2.1.2.2. Fluidos Não-Newtonianos Independentes do Tempo

Nos fluidos não-newtonianos independentes do tempo, à temperatura constante, a viscosidade depende somente da magnitude da tensão de cisalhamento ou taxa de cisalhamento. Nesta classificação estão incluídos os fluidos pseudoplásticos ou *shear thinning*, dilatantes ou *shear thickening* e plásticos de Bingham ou viscoplásticos.<sup>75</sup>

Os fluidos pseudoplásticos são fluidos cujo comportamento reológico não segue a proporcionalidade expressa na Equação 1. São caracterizados pelo decréscimo na viscosidade, com o aumento da taxa de cisalhamento. O modelo mais frequentemente usado para descrever esse comportamento segue a Lei da Potência, e pode apresentar ou não um termo de tensão inicial. O modelo de Ostwald-de Waele não possui o termo de tensão inicial ( $\sigma$ ) (Equação 3), enquanto que, o de Herschel-Bulkley<sup>72</sup> possui uma tensão inicial ( $\sigma_0$ ) (Equação 4):<sup>76</sup>

$$\sigma = K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação 3}$$

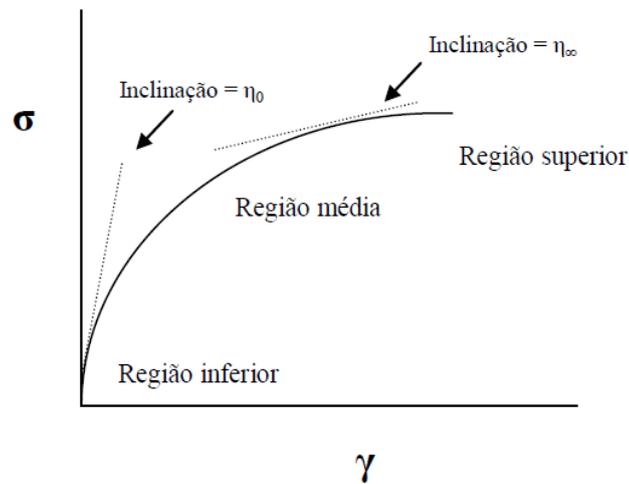
$$\sigma = \sigma_0 + K \cdot \gamma^n \quad \text{Equação 4}$$

Onde:  $K$  = índice de consistência ( $\text{Pa} \cdot \text{s}^n$ );  $\sigma_0$  = tensão inicial (Pa);  $\sigma$  = tensão de cisalhamento (Pa);  $\gamma$  = taxa de cisalhamento;  $n$  = índice de comportamento de fluxo (adimensional)

O comportamento físico de fluidos com tensão inicial de escoamento é usualmente explicado com relação a sua estrutura interna, a qual é capaz de impedir o movimento para valores de tensão menores que um valor limite  $\sigma_0$ . Para  $\sigma$  maior que  $\sigma_0$  a estrutura interna colapsa, permitindo que haja escoamento. A estrutura interna pode recuperar-se quando  $\sigma$  passa a ser menor que  $\sigma_0$ .<sup>76, 77</sup> Segundo Saravacos e Kostaropoulos, dispersões de moléculas ou partículas assimétricas, apresentam no repouso um estado desordenado e quando submetidas a uma tensão de cisalhamento, suas moléculas ou partículas tendem a orientar-se na direção da força aplicada.<sup>78</sup> Quanto maior for a força aplicada, maior será a ordenação e conseqüentemente menor será a viscosidade aparente. Quando a viscosidade aparente decresce com o aumento da tensão de cisalhamento, eles são classificados como fluidos pseudoplásticos ou *shear thinning*.<sup>76</sup>

Os fluidos estruturados, dentro da classe dos pseudoplásticos, mostram uma região de viscosidade constante a baixas taxas de cisalhamento ( $\eta_0$ ) seguida de uma região não linear à taxa de cisalhamento intermediária. À altas taxas de cisalhamento existem novamente uma tendência a viscosidade constante ( $\eta_\infty$ ), como mostra a Figura 15. O aparecimento dessas regiões está relacionado com as mudanças na estrutura do material em função da taxa de cisalhamento aplicada. Este efeito é muito comum em soluções de macromoléculas e óleos lubrificantes. A região de taxas de cisalhamento médias é a mais importante para a consideração da performance de equipamentos para processamento de

alimentos, sendo que a região newtoniana de baixas taxas de cisalhamento pode ser importante em problemas que envolvam baixas deformações, como é o caso de sedimentação de partículas em fluidos.<sup>64</sup>



**Figura 15:** Reograma idealizado para um fluido pseudoplástico.<sup>64</sup>

Outro modelo que tem sido bastante usado para alimentos líquidos é o de Casson. Este modelo, assim como o de Herschel-Bulkley<sup>72, 79</sup>, caracteriza-se pela existência de uma tensão inicial. Casson descreveu esse modelo para uma suspensão de partículas interagindo num meio Newtoniano (Equação 5).<sup>80</sup>

$$\sigma^{0,5} = Kc \cdot \gamma^{0,5} + (\sigma_0)^{0,5} \quad \text{Equação 5}$$

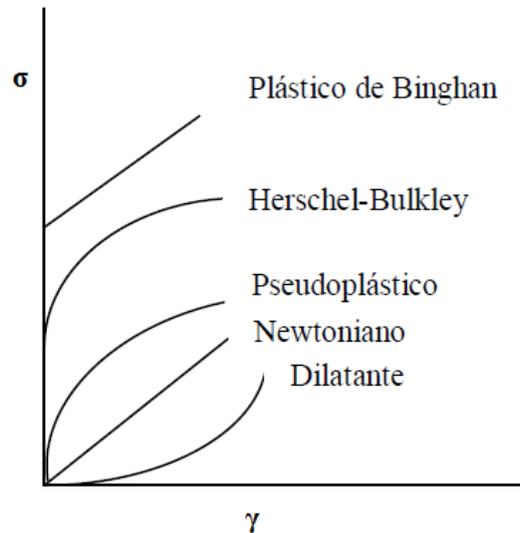
Onde:  $\sigma$  = tensão de cisalhamento (Pa);  $\sigma_0$  = tensão inicial (Pa);  $Kc$  = viscosidade plástica de Casson (Pa.s);  $\gamma$  = taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ )

Os fluidos dilatantes apresentam comportamento inverso aos pseudoplásticos, com a viscosidade aparente aumentando com a taxa de cisalhamento, como mostra a Figura 16, com as curvas típicas de escoamento de fluido.<sup>64, 75</sup> Uma explicação para este fato, no caso de suspensões, é que à medida que aumenta a tensão de cisalhamento, o líquido intersticial que lubrifica a fricção entre as partículas é incapaz de preencher os espaços devido ao aumento de volume que frequentemente acompanha este fenômeno. Desta forma, ocorre o contato direto com as partículas sólidas e, conseqüentemente, o aumento da viscosidade

aparente. Este comportamento é encontrado em soluções de amido, suspensões de proteínas e certas soluções de polímeros.<sup>77</sup> O modelo é descrito pela Equação 6.

$$\sigma = K_s \cdot \gamma^\eta, \text{ onde } 1 < \eta < \infty \quad \text{Equação 6}$$

Onde:  $\sigma$  = tensão de cisalhamento (Pa),  $K_s$  = índice de consistência (Pa.s);  $\gamma$  = taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ );  $\eta$  = viscosidade aparente



**Figura 16:** Curvas de fluxo típicas de fluidos.<sup>75</sup>

Os plásticos de Bingham ou viscoplásticos são fluidos que inicialmente necessitam de uma tensão de cisalhamento, para que haja fluxo ou movimentação do material. Uma vez atingida essa tensão, o fluido passa a apresentar um comportamento newtoniano sendo chamado de plástico de Bingham ou plástico ideal. A equação reológica para este comportamento é descrita na equação 7.

$$\sigma = \sigma_0 + \eta_p \cdot \gamma \quad \text{Equação 7}$$

Onde:  $\sigma$  = tensão de cisalhamento (Pa);  $\sigma_0$  = tensão inicial (Pa);  $\eta_p$  = viscosidade plástica (Pa.s);  $\gamma$  = taxa de cisalhamento ( $s^{-1}$ )

### 3.2.1.2.3. Fluido Não-Newtoniano Viscoelásticos

Os fluidos viscoelásticos apresentam um comportamento intermediário entre um sólido perfeitamente elástico e um líquido puramente viscoso. Como exemplo pode-se citar as soluções de biopolímeros.<sup>81</sup> Nas soluções poliméricas, como de polissacarídeos, o comportamento é dominado pelo fenômeno viscoelástico. Cada molécula flexível espalha-se num volume médio muito maior que as dimensões de suas unidades repetitivas e está continuamente mudando a forma de seu contorno com sua energia térmica. Estas moléculas apresentam-se num estado mínimo de energia. Uma deformação alonga a molécula ou seus segmentos na direção da força aplicada e parte da energia aplicada é armazenada (propriedade de sólidos) e outra parte é dissipada como calor (propriedade de líquidos). O estiramento aumenta os ângulos de ligação e o estado de energia das moléculas. Quando a força da deformação é removida, estas tentam retornar à conformação inicial e ao estado de menor energia.<sup>82</sup>

Em um líquido perfeitamente viscoso, a tensão de cisalhamento depende apenas da taxa de cisalhamento. O trabalho mecânico necessário para produzir qualquer deformação é dissipado instantaneamente, sendo armazenado na forma de energia elástica. Nos materiais viscoelásticos, uma parte da energia é armazenada e a outra dissipada. A tensão depende do histórico de deformação, pois se passa algum tempo antes que o material volte à sua forma original.<sup>83</sup>

### 3.3. VISCOSIMETRIA

Uma característica de soluções poliméricas diluídas é que a viscosidade da solução é consideravelmente maior que a do solvente puro, ou de soluções diluídas de pequenas moléculas. Isto se deve à grande diferença em massas moleculares entre as moléculas de polímero e as de solvente. Sabe-se que a viscosidade aumenta à medida que aumenta as dimensões das moléculas poliméricas em solução. Quando o soluto é polimérico, tais medidas permitem obter informações a respeito das dimensões da cadeia, do formato e tamanho da partícula de polímero (volume hidrodinâmico), e de sua massa molecular. Este cálculo de massa molecular não é absoluto, uma vez que se faz necessário uma técnica secundária de caracterização de massas moleculares.<sup>84</sup>

Numa dispersão de macromoléculas ou de polímeros, as longas cadeias se interligam, emaranham-se e enovelam-se, produzindo interações físicas e químicas, formando uma grande rede tridimensional. Sob esforços cisalhantes, inicialmente o fluido mostrará uma resistência similar a de um sólido, sendo deformado dentro dos limites dessa rede. A seguir, os segmentos conectados se esticarão elasticamente e finalmente as moléculas começarão a se desemaranhar, orientar-se e escoar irreversivelmente na direção da força cisalhante. Isso torna a resposta viscosa e elástica compreensível, introduzindo um conceito de tempo de resposta, dependente, inicialmente, mais da elasticidade do que da viscosidade.<sup>69</sup>

Os experimentos viscosimétricos mostram a existência de uma relação entre tamanho molar e viscosidade de soluções coloidais ou macromoleculares, o que torna possível determinar sua massa molecular. Os experimentos podem ser realizados rapidamente e requerem equipamentos simples, mas não é absoluto, visto que a viscosidade depende de uma série de outras propriedades moleculares além da massa. A concentração das soluções não deve ser muito alta, de modo que a razão entre a viscosidade da solução polimérica e do solvente puro recaia numa faixa de 1,1 a 1,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ .<sup>85</sup>

Os polímeros modificam a reologia em virtude de sua elevada massa molecular, entrelaçamentos na cadeia polimérica e interação do polímero com o solvente. Sua influência na reologia resulta do grande volume das macromoléculas em solução, comparadas ao total das dimensões moleculares das unidades básicas constituintes. O volume da solução ocupado por um polímero é denominado volume hidrodinâmico, o qual

é determinado por seus parâmetros estruturais (como o comprimento e rigidez da cadeia) e interações com o solvente, bem como associações ou repulsão poliméricas. O volume hidrodinâmico é dependente da temperatura, concentração, massa molecular e taxa de cisalhamento.<sup>86</sup>

A melhor representação da morfologia de uma partícula polimérica é a de um “novelo aleatório”. Quanto maior a interação entre os segmentos do polímero e das moléculas do solvente, maior será o novelo polimérico. A viscosidade está diretamente relacionada ao volume hidrodinâmico da partícula, dependendo da massa molecular e dessa interação. As relações usuais dos parâmetros viscosimétricos e a estrutura da partícula para o polímero disperso só são válidas para polímeros lineares ou com pequenas ramificações. A ramificação aumenta a densidade do novelo polimérico, sendo que um polímero ramificado ocupa um volume menor do que de um linear de mesmo tamanho e conseqüentemente apresenta uma viscosidade intrínseca menor.<sup>41, 87</sup>

As medidas de viscosidade em soluções poliméricas muito diluídas podem ser realizadas em viscosímetros capilares dos tipos Oswald-Cannon-Fenske ou Ubbelohde. As medidas são feitas por comparação do tempo,  $t$  (tempo de fluxo), requerido para que um determinado volume de solução passe através de um tubo capilar entre duas marcas gravadas, com o correspondente tempo de fluxo,  $t_0$ , para o solvente. Uma constante considera a variação de diâmetro interno do tubo e sua uniformidade, nas condições de entrada o regime transitório que ocorre devido à variação de nível durante o teste. A determinação consiste na medida do tempo de fluxo de um volume fixo de líquido, sob a ação da gravidade, através de um capilar com carga hidrostática média reprodutível a uma temperatura estreitamente controlada. Em função de o tempo estar na dependência tanto da densidade como da viscosidade, esses equipamentos proporcionam uma determinação direta da viscosidade. Acredita-se que tempos entre 100 e 500 segundos oferecem uma relação razoável entre velocidade e precisão.<sup>69, 88</sup>

A viscosidade de soluções de macromoléculas pode ser expressa em diferentes formas. A viscosidade intrínseca depende da massa molecular e descreve a interação do soluto com o solvente, permitindo a análise da macromolécula isolada; uma vez que os polímeros são constituídos por uma mistura com diferentes massas moleculares, conferindo-lhe a característica de polidispersão. É uma propriedade definida como o volume hidrodinâmico ocupado pelas moléculas de um polímero isolado. Um polímero

emaranhado ao acaso, por exemplo, apresenta uma estrutura compacta e é altamente denso em solução, o que proporciona valores baixos de viscosidade intrínseca.<sup>89</sup>

Para a obtenção da viscosidade intrínseca  $[\eta]$ , Huggins desenvolveu um modelo matemático em função do incremento da viscosidade relativa  $\eta_i$ , com mostra a Equação 8, extrapolando à diluição infinita:

$$\eta_i/c = [\eta] + K [\eta]^2 c \quad \text{Equação 8}$$

Onde  $\eta_i$  = viscosidade específica;  $c$  = concentração da solução;  $\eta$  = viscosidade intrínseca;  $K$  = constante de Huggins.

O valor de  $K$  geralmente encontra-se entre 0,3 e 0,8, variando de 0,3 a 0,4 para soluções com bons solventes, de 0,5 a 0,8 para polímeros em solventes  $\theta$  e acima de 0,8, pode ocorrer a formação de agregados.<sup>90</sup> A constante de Huggins ( $K_H$ ) é determinada pelo gráfico utilizado para a obtenção da viscosidade intrínseca, no qual o coeficiente angular representa o valor de  $K_H[\eta]^2$ .

A viscosidade relativa  $\eta_{rel}$  pode ser calculada a partir da viscosidade da solução  $\eta_{solução}$  e da viscosidade do solvente  $\eta_{solvente}$ , sendo a mesma determinada pelo tempo de escoamento da solução ( $t_{solução}$ ) e pelo tempo de escoamento do solvente ( $t_{solvente}$ ), pela equação 9:

$$\eta_{rel} = \frac{\eta_{solução}}{\eta_{solvente}} = \frac{t_{solução}}{t_{solvente}} \quad \text{Equação 9}$$

Conforme a equação 10, o incremento da viscosidade relativa também pode ser obtida em função da viscosidade relativa  $\eta_{rel}$ , da viscosidade da solução  $\eta_{solução}$  e da viscosidade do solvente  $\eta_{solvente}$ :

$$\eta_{rel} = (\eta - \eta_s)/\eta_s \therefore \eta_i = \eta_{rel} - 1 \quad \text{Equação 10}$$

A partir do gráfico de Huggins, que relaciona  $\eta_i/c$  e  $c$ , a viscosidade intrínseca é obtida pelo coeficiente linear e a constante de Huggins  $K_H$  é obtida pela inclinação da reta, extrapolando à concentração zero.<sup>91</sup>

A viscosidade intrínseca é uma medida volumétrica, normalmente é expressa em  $d_L/g$ , pois está relacionada com o inverso da densidade do polímero em solução. Na

prática, a viscosidade de soluções diluídas aumenta com a concentração, a dependência pode ser expressa pela **Equação de Huggins**:

$$\frac{\eta_{esp}}{c} = [\eta] + K_H [\eta]^2 c + \dots \quad \text{Equação 11}$$

Onde:  $\eta_{red}$  = viscosidade específica;  $c$  = concentração da solução;  $[\eta]$  = viscosidade intrínseca;  $K_H$  = constante de Huggins.

O limite da função para soluções infinitamente diluídas é a viscosidade intrínseca da solução (Equação 12):

$$\lim_{c \rightarrow 0} \left( \frac{\eta_{esp}}{c} \right) = [\eta] \quad \text{Equação 12}$$

A viscosidade intrínseca é obtida pela extrapolação gráfica de relação de viscosidade reduzida versus a concentração.

Em solução a cadeia ramificada, a amilopectina ocupa um espaço hipotético de uma esfera ou um cubo de dimensão de raio de giro ( $R_g$ ). Em concentrações baixas, estas esferas ou cubos estão separados um do outro. Com o aumento da concentração  $c$ , tornam-se congestionados e eventualmente tocam-se, onde começa a sobreposição das cadeias de polímero. Esta concentração é chamada de **concentração crítica ( $c^*$ )**, que é dependente da massa molecular do polímero. A Equação 13 mostra que  $c^*$  também pode ser determinada pela viscosidade intrínseca do polímero. A definição quantitativa de  $c^*$  é geralmente utilizada:

$$c^* = \frac{1}{[\eta]} \quad \text{Equação 13}$$

Em geral, as propriedades reológicas dos polímeros são influenciadas pela massa molar e sua distribuição, presença de ramificações nas macromoléculas, etc. Com relação à massa molecular, quanto maior o seu valor, maior é a oposição ao fluxo viscoso, devido ao aumento no grau de emaranhamento e nos pontos de contato entre as cadeias. Por outro lado, quanto mais larga a distribuição de massa molecular, menor a probabilidade de ocorrerem emaranhamentos e menor será a viscosidade. O efeito das ramificações no comportamento reológico depende do tamanho das cadeias macromoleculares. Polímeros ramificados com cadeias longas propiciam a formação de emaranhados e, conseqüentemente, apresentam uma viscosidade maior que polímeros ramificados de cadeias curtas.<sup>74, 87, 92</sup>

A capacidade dos amidos de captar água e suas propriedades reológicas desperta o interesse para o uso como ingrediente em cosméticos. Quando o amido é utilizado como um ligante ou como agente de textura em produtos industrializados, é necessário que este não somente tenha um alto poder ligante, como também a viscosidade do produto formulado deve ser estável durante as diferentes etapas de processamento, tais como: cocção, pasteurização ou esterilização.<sup>93</sup> A amilopectina é uma das maiores moléculas na natureza e desempenha um papel significativo nas propriedades funcionais do amido. O estudo reológico é muito importante para determinar as propriedades individuais desta macromolécula e compreender o seu comportamento numa solução dispersa.<sup>64</sup>

O fato dos amidos terem alta massa molecular torna-os difíceis de dissolver e tendem a agregar-se, conseqüentemente suas propriedades funcionais são difíceis de verificar em solução aquosa.<sup>94</sup> Neste processo pode ocorrer a formação de hidrogéis<sup>95</sup> que são cadeias poliméricas tridimensionais hidrofílicas que podem absorver grande quantidade de água ou fluidos biológicos sem se dissolver, mantendo sua estrutura distinta. Assim a solubilidade em água depende do equilíbrio entre os grupos funcionais e o conteúdo das unidades de repetição, bem como sua disposição polimérica.<sup>96</sup> Embora o amido seja um polissacarídeo amplamente utilizado, o seu comportamento físico em solução não é suficientemente entendido.

As ligações de hidrogênio intermoleculares causam a insolubilidade do amido em água, e devem ser quebradas de forma eficaz para que se realize o estudo reológico das soluções. Geralmente é usada energia térmica durante o aquecimento da solução aquosa. Já em temperaturas muito baixas ou acima da ambiente, poderá ocorrer a gelatinização do amido em soluções alcalis, na presença de ureia, com dimetilsulfóxido (DMSO) e outros reagentes que perturbam ligações de hidrogênio.<sup>97</sup> A solubilização completa dos amidos normalmente requer temperaturas elevadas e/ou pH elevado que pode resultar na redução do tamanho molecular devido à degradação ou despolimerização por oxidação, ou ainda elevar a massa molecular, devido à dissociação incompleta ou de agregação, devido a gelatinização.<sup>98</sup> O sistema solvente água-DMSO tem sido amplamente utilizado como um agente dispersante e agente solubilizador do amido.<sup>99, 100</sup> O DMSO é um poderoso receptor e atua quebrando as ligações de hidrogênio no polissacarídeo e em água.<sup>101</sup> Pequenas quantidades de água tendem a aumentar a solubilização do amido em DMSO, que dispersa o amido porque ambos os grupos hidroxilas envolvidos nas ligações de hidrogênio podem tornar-se complexados com o DMSO. Uma pequena quantidade de água é necessária para

impedir temporariamente que o DMSO cause o inchaço das moléculas sobre a superfície do grânulo de amido.<sup>102</sup>

A maioria dos polissacarídeos apresenta taxa de cisalhamento semelhante devido ao seu comportamento, com forma aleatória e flutuações contínuas na sua conformação em solução. As interações intermoleculares são tipicamente emaranhados físicos não-específicos.<sup>103</sup> Em baixas taxas de cisalhamento, desembaralhados são forçados a equilibrar-se devido a formação de novos emaranhamentos entre cadeias diferentes o que corresponde à viscosidade de cisalhamento zero. Em valores mais elevados da taxa de cisalhamento, excede a formação do emaranhamento; portanto, a viscosidade diminui mostrando um comportamento pseudoplástico.<sup>104</sup>

### 3.4. ESPALHAMENTO DE LUZ (LS)

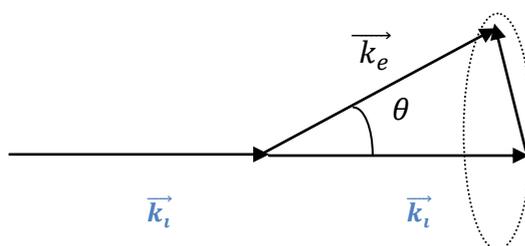
A técnica de espalhamento de luz tem sido cada vez mais difundida principalmente nos últimos anos e tornou-se uma das técnicas mais importantes para a caracterização de macromoléculas e nanopartículas em solução. Quando em comparação com muitos outros métodos de caracterização de solução polimérica, as técnicas de dispersão de luz mostram-se de uma elevada precisão, pois têm um tempo de resposta rápido e não são invasivos. Suas medições absolutas de massa molecular e tamanho das partículas podem ser realizadas sem o uso de padrões. Embora sua aplicação esteja tornando-se cada vez mais comum, são muito escassos os trabalhos que envolvem uma solução polimérica ramificada e pouco divulgada o estudo através da técnica de espalhamento quanto à inserção de sais metálicos nesta solução.<sup>105</sup> Parte desta Tese destina-se ao estudo do comportamento molecular da solução de amilopectina na presença de diferentes sais metálicos, quanto a sua forma e dimensões, através da técnica de espalhamento de luz.

É uma técnica amplamente utilizada para o estudo de fluídos complexos, incluindo soluções de polímeros e biopolímeros, suspensões coloidais, sistemas micelares e nanopartículas de uma forma geral.<sup>106</sup> Esta potencialidade deve-se aos comprimentos de correlação, ou mais propriamente às dimensões, que a espectroscopia de espalhamento de luz é capaz de determinar. Por tratar-se de uma metodologia que utiliza luz visível como fonte de energia e ângulos de observação facilmente obtidos para detecção da luz espalhada, pode-se dimensionar partículas em solução ou suspensão, com tamanhos entre 2 nm e 500 nm.<sup>106</sup> Quando a luz incide sobre uma partícula, ela pode ser desviada, absorvida ou transmitida. Para as partículas que são grandes em comparação com o comprimento de onda da luz emitida, ocorre a reflexão, refração ou difração. Para as partículas menores ou de mesmo tamanho do comprimento de onda incidente, ocorre o espalhamento de luz.<sup>107</sup>

A luz é uma onda eletromagnética resultante da soma vetorial do campo elétrico e campo magnético que se propagam pelo espaço perpendicularmente entre si. Esta onda pode exercer forças elétrica e magnética em partículas carregadas e sobre dipolos magnéticos.<sup>108</sup> A interação da luz com as moléculas gera um campo elétrico que fornece uma energia que estimula os movimentos dos elétrons. Desta forma, os elétrons excitados comportam-se como dipolos oscilantes que emitem energia da forma da radiação para retornar ao estado fundamental, ou seja, a luz é espalhada pela interação dos elétrons nas moléculas com a radiação incidente e o campo elétrico oscilatório causa uma vibração nos

elétrons (devido ao movimento browniano) gerando dipolos oscilatórios, que reemitem a radiação.<sup>109</sup> As frequências nas quais os elétrons oscilam estão na faixa de  $10^{15}$  a  $10^{16}$  Hz. Estas frequências correspondem àquelas da luz com o comprimento de onda na região fotoquímica de 200 a 700 nm, ou seja, nas regiões do ultravisível e do visível. Assim, com a indução de um momento de dipolo com a ação do campo elétrico, é produzida uma radiação eletromagnética secundária que é espalhada por uma molécula quando a mesma é iluminada com a luz monocromática. As moléculas em solução se movem em todas as direções com igual probabilidade e apresentam velocidade contínua de distribuição. O fenômeno do espalhamento de luz é, por conseguinte, uma característica da matéria.<sup>110</sup>

A relação entre comprimento de onda da radiação eletromagnética incidente e o tamanho do objeto que está espalhando luz é estabelecida pelo vetor onda  $\vec{q}$ . A geometria básica do espalhamento (Figura 17) consiste no vetor de onda da radiação incidente sobre o objeto ( $\vec{k}_i$ ) e no vetor de onda da radiação espalhada pelo objeto observado ( $\vec{k}_e$ ).



**Figura 17:** Geometria básica de espalhamento onde a radiação incidente sobre o objeto consiste num vetor onda ( $\vec{k}_i$ ) e a radiação espalhada consistem num vetor de onda ( $\vec{k}_e$ ) num ângulo  $\theta$  em relação à radiação incidente.

Assim o vetor de onda num experimento de espalhamento de luz é definido como:

$$|q| = \vec{k}_e - \vec{k}_i$$

No experimento de espalhamento de luz, a amostra a ser analisada está em uma pequena célula de vidro, e esta é inserida em uma cuba, também de vidro, a qual está preenchida com um solvente com índice de refração similar ao do vidro (tolueno,  $n_0=1,497$  ou decalina,  $n_0= 1,469$ ). Desta forma, eventuais reflexões oriundas da parede da célula porta-amostra são minimizadas. Fotos do equipamento e da cubeta utilizados são mostrados na Figura 18 e 19.

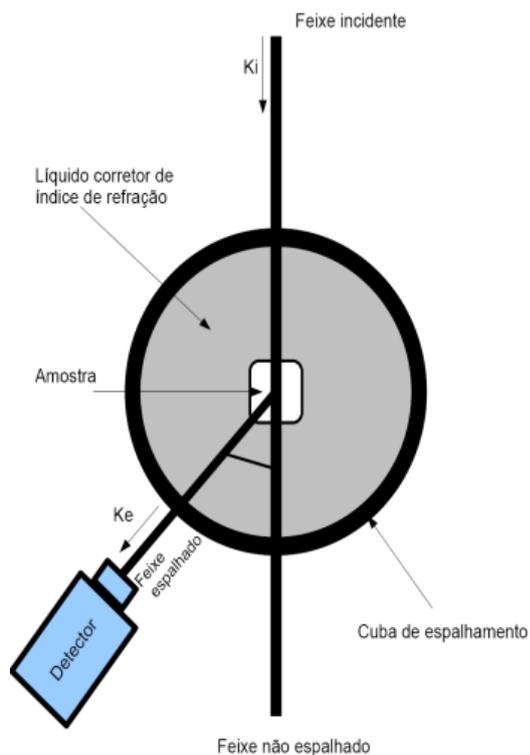


**Figura 18:** Equipamento Brookhaven utilizado nas medidas de espalhamento de luz estático e dinâmico.



**Figura 19:** Cubeta utilizada no equipamento Brookhaven para análises de espalhamento de luz.

Um feixe de luz (normalmente uma fonte de laser de He-Ne ou de  $\text{Ar}^+$ , com potência entre 15 e 100 mW, a depender do tipo de material que compõe a partícula em análise) é incidido sobre a amostra e a pequena intensidade de luz espalhada é detectada tipicamente por uma fotomultiplicadora, colocada horizontalmente a um ângulo  $q$  em relação ao feixe de radiação incidente, como está esquematizado na Figura 21.<sup>106</sup>



**Figura 20:** Vista aérea da geometria básica de um experimento de espalhamento de luz. (Fonte:Autor)

A radiação incidente na amostra apresenta um vetor de onda ( $\vec{k}_i$ ) paralelo à direção de propagação, com magnitude de  $2\pi/\lambda_0$  ( $\lambda_0$  é o comprimento de onda da luz incidente). A frequência do vetor de onda da luz espalhada ( $\vec{k}_e$ ) é igual ou muito próxima à da radiação incidente. Essa radiação espalhada corresponde ao que se conhece por espalhamento Rayleigh, desde que a dimensão da partícula sob análise seja bem menor do que  $\lambda_0$ .

Uma vez definidos os vetores  $\vec{k}_i$  e  $\vec{k}_e$ , pode-se definir o parâmetro conhecido como vetor de espalhamento  $\vec{q}$ . Deve-se levar em conta o ângulo de espalhamento ( $\theta$ ) e o índice de refração do solvente onde as partículas estão imersas ( $n_0$ ), uma vez que este muda o comprimento de onda da luz incidente comparado com o valor no ar. O vetor de espalhamento no espalhamento de luz é então definido então pela seguinte relação (Equação 14):<sup>111</sup>

$$\vec{q} = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad \text{Equação 14}$$

O vetor de espalhamento ( $\vec{q}$ ) é uma variável importante, pois está diretamente relacionada com as dimensões do objeto observado. Ele permite a observação dos objetos com maior ou menor nitidez, dependendo da sua magnitude. Quanto menor o valor de

(menor ângulo de observação), menor a magnitude da estrutura observada e, portanto, menor a resolução.<sup>112</sup> A figura 21 mostra esta relação, onde  $L$  (dimensão do objeto) é a maior porção do objeto observável, que pode ser, por exemplo, uma macromolécula.



**Figura 21:** Relação, de  $L$  com  $\vec{q}$ , onde  $L$  é a maior porção da macromolécula. (Fonte: Autor)

Em relação aos parâmetros dimensionais das estruturas que podem ser observadas por técnicas de espalhamento, deve-se considerar a relação inversa entre o vetor de onda ( $\vec{q}$ ) e a dimensão do objeto ( $L$ ). Na condição de  $\vec{q}L > 1$  a radiação espalhada contém informações sobre os segmentos internos da macromolécula. Já na condição de  $\vec{q}L < 1$ , a radiação espalhada contém informações sobre a região do espaço maior que uma molécula. Em condições especiais  $\vec{q}L \ll 1$ , podemos obter informações de várias moléculas, agregados e conjuntos de moléculas. O vetor de onda ( $\vec{q}$ ) pode ser modificado pela mudança do ângulo de observação, pela mudança do índice de refração da solução ou comprimento de onda do feixe de luz usado.

Em uma definição ampla, o espalhamento de luz (LS) poderia ser agrupado como inelástico (por exemplo, de Raman, fluorescência e fosforescência) e elástico (sem absorção de luz). No entanto, em ciência de polímeros e colóides, o LS é normalmente referido em termos de medições estáticas (elástica)<sup>109</sup> ou dinâmico (quase-elástica) ou ambos.

O espalhamento de luz estático (SLS) é um método que mede a intensidade média de luz espalhada por uma solução permitindo obter os parâmetros moleculares, sendo amplamente utilizado para caracterizar tanto uma macromolécula sintética ou natural. Por outro lado, as medidas de espalhamento de luz dinâmico (DSL) interpretam as pequenas flutuações da intensidade do espalhamento em função do tempo dos locais de polarizabilidade geradas pela difusão Browniana do sistema, que permite obter

informações sobre o coeficiente de difusão destas partículas no meio. A visibilidade dos objetos de espalhamento (macromoléculas ou partículas coloidais) no DSL depende da diferença do índice de refração ( $\Delta n$ ) entre o objeto de espalhamento e a dispersão média. Quando grandes modificações na frequência da luz espalhada são analisadas, temos as técnicas de Brillouin e de Bragg, por exemplo, conhecidas como formas de *Espalhamento Inelástico*.<sup>110, 113</sup>

### 3.4.1. Espalhamento de Luz Estático (SLS)

O espalhamento de luz estático (SLS) também é chamado de clássico ou espalhamento de luz Rayleigh e é um dos métodos mais utilizados para a caracterização de polímeros em solução. No SLS considera-se apenas a quantidade média da luz espalhada em uma determinada direção, sem levar em conta a modificação na distribuição de frequências. Nele é medido o excesso de intensidade da luz espalhada por uma solução comparada ao solvente puro.<sup>114</sup>

Sendo conhecido o incremento do índice de refração ( $dn/dc$ ) da solução polímero-solvente, um único experimento pode fornecer a massa molecular ponderal média ( $\bar{M}_w$ ), o raio de giro, também conhecido como raio de giração ( $R_g$ ) e o segundo coeficiente virial ( $A_2$ ). Também é possível determinar a chamada dimensão fractal ( $df$ ) de uma espécie em solução, se for de interesse, como será apresentado nesta Tese. Se o raio do novolo polimérico for maior que  $\lambda/20$ , onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz incidente é possível obter-se uma medida do tamanho da cadeia, isto é, o raio de giro ( $R_g$ ).

Os parâmetros  $\bar{M}_w$ ,  $A_2$  e  $R_g$  são propriedades estáticas da macromolécula solvatada, ou seja, não dependem do movimento Browniano entre os segmentos da cadeia e solvente. É muito importante que as amostras estejam livres de qualquer poeira, garantindo assim que toda luz espalhada seja proveniente das moléculas em solução e não de corpos estranhos, tornando os resultados falsos.

A teoria do espalhamento de luz para líquidos puros e soluções de macromoléculas é usualmente chamada de teoria das flutuações.<sup>114-116</sup> De acordo com esta teoria, a luz espalhada surge da flutuação da polarizabilidade  $\alpha$  do meio espalhante. Em fluidos simples, pequenas flutuações na polarizabilidade surgem da flutuação na pressão ou na temperatura o que causa um espalhamento pequeno. Para soluções poliméricas o principal efeito causador é a flutuação na concentração, como para a avaliação do excesso de

intensidade espalhada, a intensidade do espalhamento do solvente é subtraída, as condições da pressão e da temperatura são eliminadas.<sup>116</sup>

Escrevendo a mudança na polarizabilidade do meio como uma mudança no índice de refração ( $\eta_0$ ), temos que:

$$\frac{I_\theta}{I_0} \sim c \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \left( \frac{\delta\mu}{\delta c} \right)_{T,P}^{-1} \quad \text{Equação 15}$$

Onde  $I_\theta$  é a intensidade em excesso da luz espalhada,  $I_{(\text{solução})} - I_{(\text{solvente})}$ ,  $I_0$  a intensidade primária,  $dn/dc$  o incremento do índice de refração (contraste) e  $\delta\mu / \delta c$  é a flutuação local do potencial químico com a concentração. Desde que  $(\delta\mu / \delta c)_{T,P} = (\delta\mu / \delta c)_{T,P}$ , e aplicando a expansão virial da pressão osmótica, obtemos:

$$\frac{I_\theta}{I_0} = c \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 (M^{-1} + 2A_2c + 3A_3c + \dots)^{-1} \quad \text{Equação 16}$$

A expansão da equação 16 pode ser expressa de uma forma mais conveniente. A equação 17 de Rayleigh/Debye/Gans<sup>117</sup> acrescenta parâmetros à equação de Rayleigh e pode ser descrita para uma solução não ideal para partículas grandes ou e a equação 18 para uma solução ideal,<sup>117</sup>

$$\frac{k_c}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c + 3A_3c + \dots \quad \text{Equação 17}$$

$$\frac{k_c}{R_\theta} = \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2c \right) P(\theta) \quad \text{Equação 18}$$

Onde  $K$  é a constante óptica,  $c$  é a concentração,  $R_\theta$  é a razão de Rayleigh,  $M_w$  é a média ponderal das massas moleculares em peso,  $A_2$  é o segundo coeficiente de virial,  $A_3$  é o terceiro coeficiente de virial e  $P(\theta)$  é o fator de forma ou fator de espalhamento referente ao ângulo de análise do polímero.

O fator  $K$  varia de acordo com cada equipamento é uma constante associada ao contraste ótico entre partículas e solvente. Este fator está relacionado ao incremento do índice de refração da solução com relação à concentração ( $c$ ) de amostra ( $dn/dc$ ), conforme a equação 19:

$$K = 4 \pi^2 \eta_0^2 \left( \frac{dn}{dc} \right) / N_A \lambda_0^4 \quad \text{Equação 19}$$

Onde  $n_o$  é o índice de refração do solvente,  $dn/dc$  corresponde ao incremento do índice de refração da amostra em função da variação da concentração,  $N_A$  é o número de Avogadro,  $\lambda_0$  o comprimento de onda do laser e  $R_\theta$  é a razão de Rayleigh.<sup>105, 118</sup>

$$R_\theta = \frac{r^2 I_\theta}{I_\theta (1 + \cos^2 \theta)} \quad \text{Equação 20}$$

Onde  $r$  é a distância entre o detector e o volume de espalhamento.

A equação 19 encontra-se normalizada pelo número de Avogadro,  $N_A$ . Usualmente,  $dn/dc$  é determinado por meio de um refratômetro diferencial, utilizando-se uma série de soluções com concentrações crescentes. Graficando-se  $\Delta n$  (diferença do índice de refração do solvente puro e de cada solução medida) contra  $c$  (a concentração das soluções utilizadas em  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), gera-se uma linha reta, da qual o coeficiente angular corresponde ao valor estimado de  $dn/dc$ . O valor de  $dn/dc$  é então dimensionado em  $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ .<sup>106</sup>

Como o valor absoluto da intensidade primária (incidente) é difícil de determinar, o equipamento de espalhamento de luz é calibrado em relação a um padrão com espalhamento conhecido (usualmente benzeno e tolueno). A razão de Rayleigh é então descrita como:

$$R_\theta = \left( \frac{I_{\text{solução}} - I_{\text{solvente}}}{I_{\text{padrão}}} \right) I_{\text{abs}} (\text{padrão}) \quad \text{Equação 21}$$

Onde  $I_{\text{abs}} (\text{padrão})$  é encontrado na literatura.

Os coeficientes viriais ( $A_2$  e  $A_3$ ) descrevem o afastamento da equação limite (equação 17) causado pelas interações intermoleculares à concentração finita. O terceiro coeficiente virial, por ser muito pequeno, pode ser desprezado, dependendo do gráfico a ser analisado.

O segundo coeficiente virial ( $A_2$ ) corresponde a uma função complexa de temperatura, pressão e outros parâmetros do sistema polímero-solvente e classifica a interação desse sistema. Tem sido calculado com base na densidade média do segmento em torno do seu centro de massa.<sup>119</sup> As aproximações de Flory<sup>120</sup> e Tanford<sup>121</sup> baseadas na probabilidade de cadeias localizadas em volumes não ocupados da solução que a conduzem.

$$A_2 = \frac{N_A \mu}{2M^2} \quad \text{Equação 22}$$

Onde  $M$  é a massa molar do soluto e  $\mu$  é o parâmetro que descreve o volume excluído.

O volume excluído pela partícula depende da forma ou conformação da cadeia solvatada e pode ser expresso em termos de uma geometria regular. O volume de uma esfera ( $V_e$ ) é definido como:

$$V_e = \frac{4}{3} \pi R_e^3 \quad \dots\dots\dots \text{Equação 23}$$

Onde  $R_e$  é o raio da esfera. A adição de uma segunda partícula ao mesmo volume da solução contribui com a primeira, mas pode somente se aproximar a uma distância  $2R$  da primeira. O volume excluído pode ser escrito como:

$$u = \frac{32}{3} \pi R^3 \quad \dots\dots\dots \text{Equação 24}$$

E o segundo coeficiente virial para uma partícula esférica é reescrito pela relação:

$$A_2 = \frac{16\pi R^3 N_A}{3M^2} \quad \dots\dots\dots \text{Equação 25}$$

O que indica que o parâmetro  $A_2$  pode ser usado para estimar um tamanho médio de partícula.

Então o  $A_2$  pode como consequência ser descrito em termos das forças entre solvente e a cadeia polimérica, ou seja, interações polímero-polímero e polímero-solvente, sendo considerado como uma medida da não-idealidade no comportamento de uma solução ou suspensão. Quando numa solução polimérica a entropia da mistura compensa as forças repulsivas polímero-solvente e as forças de atração polímero-polímero,  $A_2$  tende a assumir um valor muito próximo de zero ( $A_2 \sim 0$ ). Isso acontece, por exemplo, para polímeros em solução em um solvente denominado solvente teta. Neste caso as dimensões de cadeia são somente dependentes dos comprimentos de ligação e ângulos de ligação da macromolécula. Um bom solvente por outro lado, estende o novelo, as cadeias poliméricas (Figura 22). Esta interação favorável polímero-solvente é evidenciada por um valor positivo de  $A_2$ . Enquanto que  $A_2$  negativo indica que as interações polímero-polímero são maiores do que as interações polímero-solvente, onde as cadeias podem colapsar intermolecularmente e ou intramolecularmente, neste caso o solvente utilizado é um mau solvente (solvente pobre) para a macromolécula.<sup>106</sup>



**Figura 22:** Esquemática do polímero em um bom solvente (A) e em mal solvente (B).

No caso de suspensões de nanopartículas poliméricas, espera-se um valor de  $A_2$  pequeno ou negativo, pois as partículas foram estabilizadas por meio da adição de um tensoativo e, portanto, a afinidade pelo solvente deve estar diminuída. O segundo coeficiente virial ( $A_2$ ) obtido através de medidas de espalhamento de luz apresentam uma boa concordância com os valores de  $A_2$  obtidos por intermédio de medidas osmóticas.<sup>106</sup>

Como já discutido anteriormente, na dispersão de luz estática, mede-se o excesso de intensidade de luz espalhada por uma solução comparada à intensidade de luz espalhada pelo solvente puro, sem levar em conta a modificação na distribuição de frequências. A intensidade absoluta da luz dispersa é detectada em diferentes ângulos de espalhamento, e a massa molar e o raio, é calculado a partir dessa informação. Fazendo uma relação da massa molar e do raio, pode-se ter a ideia da conformação, uma informação adicional sobre a forma e a estrutura da molécula.

A equação 18 representa a relação básica para a determinação da massa molar através da técnica de espalhamento de luz. Para sistemas polidispersos, a massa molar ponderal média deve ser levada em consideração, tem-se então:

$$\frac{R_{\theta}}{k} = \sum c_i M_i \quad \text{Equação 26}$$

E dividindo ambos os lados da equação acima por  $c = \sum c_i$  obtém-se:

$$\frac{R_{\theta}}{Kc} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i} = \bar{M}_w \quad \text{Equação 27}$$

A equação 27 corresponde a uma solução diluída ideal, em que não há dependência angular, podendo ser escrita de outra maneira:

$$\frac{kc}{R_{\theta}} = \frac{1}{\bar{M}_w} \quad \text{Equação 28}$$

Para macromoléculas, a razão de Rayleigh depende do vetor de espalhamento ( $\vec{q}$ ). Esta dependência é devido ao fato de que diferentes pontos espalhantes da solução geram ondas secundárias de diferentes fases. Em uma solução diluída de uma macromolécula, estas ondas secundárias originárias de diferentes porções da molécula são coerentes, pois elas são induzidas pela mesma fonte primária de radiação. No entanto, elas podem produzir o fenômeno de interferência e, dependendo do ângulo de observação teremos uma interferência mais ou menos completa. Esta situação é mostrada na Figura 23.

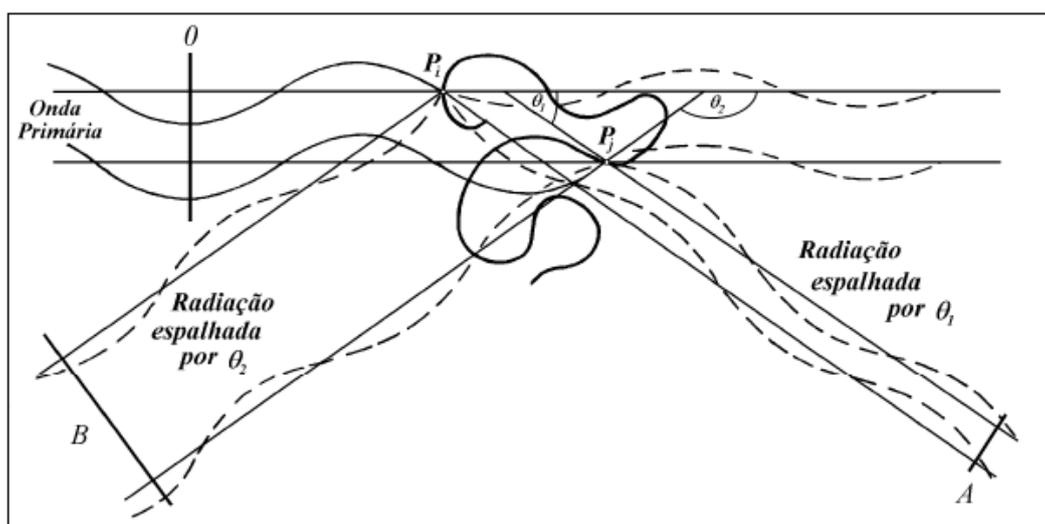


Figura 23: Perda da intensidade da luz espalhada como consequência da interferência intramolecular.<sup>121</sup>

A molécula espalhante pode ser dividida em pequenos elementos de volume, nos quais escrevemos  $P_i$  e  $P_j$ . O plano  $O$  é perpendicular a direção de propagação da radiação primária. A diferença de fase de radiação primária em relação aos elementos espalhantes  $P_i$  e  $P_j$  depende do ângulo de observação. Aumentando-se o ângulo de observação ( $\theta$ ) aumenta-se também a diferença de caminho entre os elementos espalhantes com uma diminuição da intensidade espalhada, devido a interferência. Este aumento da diferença de caminho entre o plano  $O$  e os planos  $A$  e  $B$ , situados perpendicularmente aos feixes de luz espalhada.<sup>121</sup>

Esta interferência é descrita pelo fator de estrutura estático:

$$S(\vec{q}) = \sum_i^x \sum_j^x \langle \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}_{ij}) \rangle$$

Equação 29

Onde  $x$  representa o número de pontos espalhantes no volume de espalhamento, e  $\vec{r}_{ij} = \vec{r}_i - \vec{r}_j$ , o vetor distância entre dois elementos espalhantes  $i$  e  $j$ . No limite de uma diluição infinita,  $S(\vec{q})$  se reduz a interferência puramente intramolecular,  $P(\vec{q})$  conhecido como fator forma:

$$P(\vec{q}) = \frac{S(\vec{q})}{S(0)} = \frac{1}{N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle \exp(i\vec{q} \cdot \vec{r}_{ij}) \rangle \quad \text{Equação 30}$$

Onde  $N$  é o número de elementos espalhantes por moléculas.

Inserindo  $P(\vec{q})$  na equação 17 temos então para sistemas polidispersos:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P_z(\vec{q})} + 2A_2c + 3A_3c + \dots \quad \text{Equação 31}$$

Onde  $P_z(\vec{q})$  é definido como:

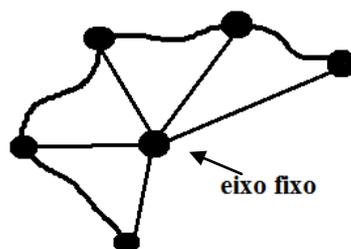
$$P_z(\vec{q}) = \frac{\sum m_i M_i P_i(\vec{q})}{\sum m_i M_i} \quad \text{Equação 32}$$

$m_i$  é a fração mássica da partícula  $i$  com a massa molar  $M_i$ . O fator forma  $P(\vec{q})$  depende da geometria das partículas espalhantes. Em relação a pequenos valores  $\vec{q}$ ,  $P(\vec{q})$  pode ser expandido da seguinte maneira:

$$P_z(\vec{q}) = 1 - \frac{1}{3} \vec{q}^2 \langle R_g^2 \rangle_z + \dots \quad \text{Equação 33}$$

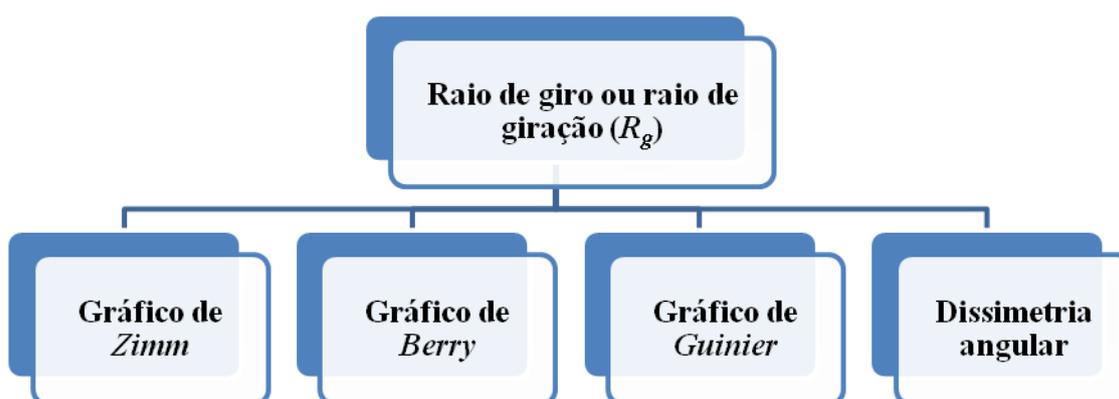
O raio de giro ( $R_g$ ) refere-se à distância de rotação em torno de um eixo fixo no espaço, no qual toda a massa de um objeto pode ser concentrada, para se obter o mesmo momento de inércia, ou seja, é definido como a média quadrática de todos os segmentos do polímero em relação ao seu centro de massa, como mostra a Figura 24.

Dessa forma, qualquer objeto tem um número infinito de raios de giro, pois há um número infinito de eixos correspondentes.<sup>105, 106</sup> No exemplo de uma molécula esférica, o eixo passa pelo seu centro de gravidade e o raio de giro estipula o tamanho da cadeia polimérica.



**Figura 24:** Representação das dimensões de uma partícula do tipo polimérica.

O raio de giro ( $R_g$ ) pode ser determinado através da intensidade ou excesso da luz espalhada através de diferentes gráficos dependendo do tipo de molécula a ser estudada, como ilustra o fluxograma abaixo (Figura 25).



**Figura 25:** Fluxograma para os diferentes gráficos que determinam o raio de giro ou giração ( $R_g$ ).

Assim, o SLS clássico envolve a medida da razão de Rayleigh da solução contendo as partículas espalhantes como uma função de  $\theta$  e da concentração de material na solução ou suspensão. A análise dos dados obtidos é comumente feita usando-se o **formalismo de Zimm** para soluções diluídas. Este modelo sugere que a intensidade de luz espalhada por um determinado objeto ( $R_\theta$ ) está relacionada com as propriedades macromoleculares da forma, conforme mostra a Equação 34:

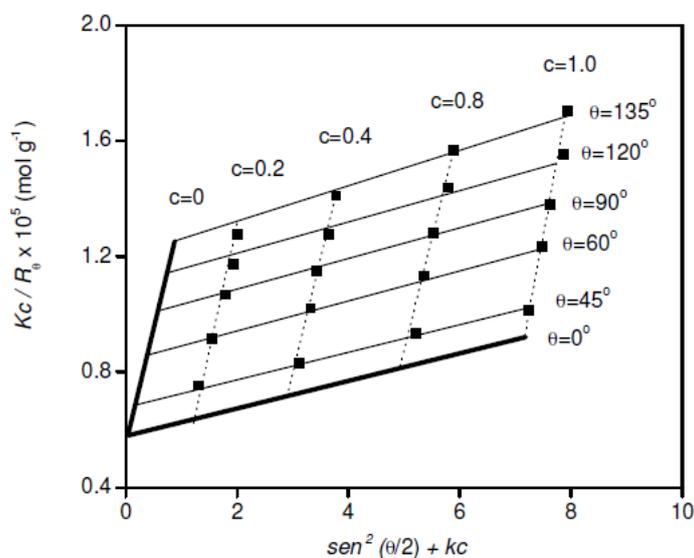
$$\frac{K_c}{R_\theta} = \left[ 1 + \frac{16\pi^2 \eta_0^2 R_g^2 \sin^2(\frac{\theta}{2})}{3\lambda_0^2} \right] \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2c \right) \quad \text{Equação 34}$$

A Equação 34 é a base do **gráfico de Zimm**.<sup>122</sup> Em baixas concentrações e considerando que o vetor de espalhamento ( $\vec{q}$ ) já descrito na equação 15 ( $\vec{q} = \frac{4\pi\eta_0}{\lambda_0} \sin\frac{\theta}{2}$ )

e que  $q^2 < S^2 > \leq 1$ , a equação de Rayleigh modificada pode ser escrita como uma população de polímeros polidispersa, através da equação 35:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} + \left(1 + \frac{q^2 \langle S^2 \rangle_z}{3}\right) + 2A_2 \quad \text{Equação 35}$$

Esta equação permite determinar o quadrado da soma das médias sobre as distâncias intramoleculares do centro de massa da partícula  $\langle S^2 \rangle_z$ .<sup>123</sup> A equação básica do espalhamento de luz confere a relação entre a intensidade de espalhamento e propriedades físicas da molécula. A dedução gráfica de Zimm ou Debye<sup>124</sup>, entre  $Kc/R_\theta$  e  $\text{sen}^2(\theta/2)$  extrapolada ao ângulo zero e à concentração zero, permite obter os parâmetros  $R_g$ ,  $A_2$  e  $M_w$ . Para construir-se um gráfico de Zimm necessita-se preparar pelo menos quatro concentrações diferentes de soluto, nas quais o  $R_g$  é determinado em diversos ângulos (normalmente entre  $30^\circ$  e  $150^\circ$ ). A Figura 26 exibe um exemplo de gráfico de Zimm, com  $Kc/R_\theta$  em função do  $\text{sen}^2(\theta/2)$ , em que os pontos que constituem as linhas horizontais correspondem à concentração e os pontos formadores das linhas verticais correspondem ao ângulo  $\theta$ .<sup>125</sup> Para a determinação dos parâmetros físicos gerados pelo gráfico de Zimm necessita-se conhecer previamente o valor de  $dn/dc$ , para o sistema em estudo, determinado com o mesmo comprimento de onda da radiação incidente que se vai utilizar no experimento.



**Figura 26:** Exemplo de um modelo do gráfico de Zimm (obtido para amilose dissolvida em solução aquosa alcalina). A concentração de polímero está expressa em  $\text{mL}^{-1}$ .<sup>106</sup>

Em muitos casos, para polímeros ramificados, o valor de  $\vec{q}$  começa baixo e extrapolação ao ângulo zero torna-se muito difícil. Nestes casos, usa-se frequentemente a aplicação do **gráfico de Berry**, onde a  $\sqrt{K_c/R_q}$  é plotada contra  $q^2 + K_c$ . Este gráfico é sugerido por Berry<sup>126</sup> para polímeros em bons solventes, onde a dependência da concentração já não é linear, mas também é afetada pelo terceiro coeficiente virial ( $A_3$ ). Para uma grande medida o  $A_3$  é determinado pelo  $A_2$ ; para esferas rígidas mostradas estatisticamente termodinamicamente.

$$A_3M = 5/8 (A_2M)^2 \quad \text{Equação 36}$$

Stockmayer *et al*<sup>127</sup> perceberam que para um novelo flexível este fator varia que acordo com a expansão do novelo e pode ser usado como uma boa aproximação ficando ainda a equação generalizada em<sup>128</sup>

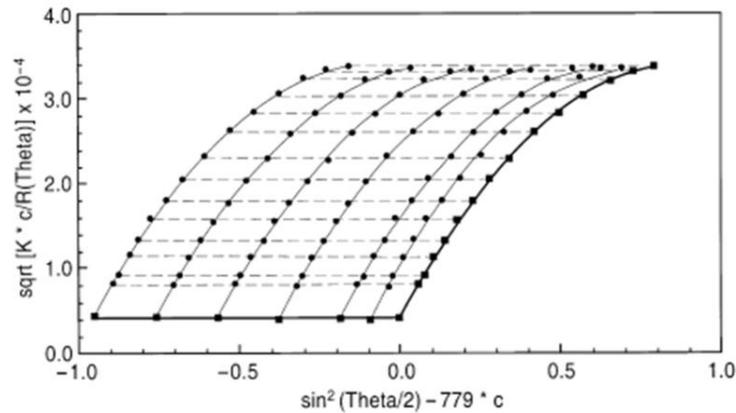
$$A_3M = g(A_2M)^2 \quad \text{Equação 37}$$

Se  $g = 4/3$ , depois  $(1 + 2A_2 M_c + 3A_3 M_c^2)$  torna-se  $(1 + A_2 M_c)^2$  e a equação para o espalhamento de luz pode ser escrita:

$$\frac{K_c}{R_q} = \frac{1}{M_w} + \left[ \frac{1}{M_w P_z(q)} \right] (1 + A_2 M_w c)^2 \quad \text{Equação 38}$$

O que dá uma linha reta se  $(K_c/R_q)^{1/2}$  é plotado. Para moléculas na forma de estrelas descobriu-se que também a dependência angular torna-se uma linha reta.

Para o modelo de cadeia ramificada regularmente funcional, o gráfico de Berry (Figura 27) mostra-se para moléculas na forma de estrelas, porém para polímeros com maiores ramificações não é possível fazer uma aproximação para um comportamento quadrático. Em elevadas ramificações, podemos esperar que o perfil de densidade de um dos segmentos se aproxime de uma esfera com duas diferenças essenciais, a primeira são as cadeias exteriores oscilando em torno da cadeia principal e a segunda, são cadeias flexíveis e não rígidas. Sendo assim, a cadeia polimérica é considerada como uma cadeia “macia”.<sup>128</sup>



**Figura 27:** Exemplo de um modelo do gráfico de Berry do espalhamento de luz para amilopectina extraída do amido de milho em 90% DMSO/H<sub>2</sub>O.<sup>129</sup>

Na aproximação de Guinier, a curva de espalhamento é aproximado a uma função exponencial, de onde construiu-se o gráfico de:  $\ln(R_g \text{sen}\theta)$  vs.  $\vec{q}^2$ , dando uma relação não totalmente linear que resumidamente apresenta-se como:

$$\ln(R_g \text{sen}\theta) = -\frac{R_g^2}{3} \vec{q}^2 \quad \text{Equação 39}$$

Determinando o  $R_\theta$  de uma solução contendo partículas espalhantes em uma determinada região de ângulos e graficando os valores obtidos contra  $q^2$ , obtém-se uma equação linear com coeficiente angular igual a  $-R_g^2/3$ . Uma vez que a intensidade de espalhamento de luz é proporcional ao volume de espalhamento, faz-se necessária uma correção de geometria, por meio da introdução do fator  $\text{sen}\theta$  e multiplicando os valores de  $R_\theta$  determinados para cada ângulo. No intuito de se detectar o espalhamento de um simples objeto, é necessário que o sistema esteja o mais diluído possível. A equação apresenta uma série de limitações, mas normalmente gera resultados satisfatórios para partículas de qualquer forma, desde que satisfeita a relação  $q.R_g \ll 1$ . Desta forma, podem-se determinar diâmetros de partículas entre 50 nm e 350 nm. Normalmente, a relação  $\ln(R_g \text{sen}\theta)$  vs.  $\vec{q}^2$  não é totalmente linear. Neste caso, utiliza-se a região de ângulos baixos para a determinação de  $R_g$ , onde o comportamento linear é normalmente observado. A estratégia experimental consiste em se obter um grande número de pontos na região de ângulos mais baixos possíveis de serem acessados experimentalmente.<sup>106</sup>

O **gráfico de Guinier** é bastante utilizado para ajustar a curva experimental SAXS a uma função exponencial para valores pequenos de  $\vec{q}$ . Outra relação fundamental a ser

satisfeita é o que se chama lei de Porod, fundamentada em que para valores grandes de  $\vec{q}$ , a intensidade de espalhamento  $I(\vec{q})$  é muito pequeno com tendência assintótica.<sup>130</sup>

Outra forma de se obter o  $R_g$  de partículas em suspensão é através do **método da dissimetria angular**,<sup>131</sup>

$$d_s(\theta) = \frac{I(\theta)}{I(180^\circ - \theta)} \quad \text{Equação 40}$$

Onde  $I(\theta)$  é a intensidade de espalhamento de luz no ângulo de observação e  $I(180^\circ - \theta)$  é a intensidade de espalhamento de luz em ângulos complementares, ou seja, o ângulo de  $180^\circ$  é subtraído da intensidade de luz espalhada no ângulo de observação. Neste caso, a razão das intensidades monitoradas em ângulos complementares está relacionada com o  $R_g$  da partícula pela seguinte relação:

$$\frac{R_\theta}{R_{180-\theta}} = 1 + \left(\frac{4\pi\eta_0}{\lambda_0}\right)^2 \left(\frac{R_g^2}{3}\right) \cos \theta \quad \text{Equação 41}$$

As razões de Rayleigh são então determinadas em ângulos complementares, relacionadas e graficadas contra  $\cos(\theta)$ . Este procedimento gera uma reta com coeficiente linear  $\sim 1$  e o valor de  $R_g$  é determinado usando-se o valor do coeficiente angular. Esta relação é válida somente se  $q \cdot R_g < 1$ .<sup>106, 132</sup>

Para a determinação da **dimensão fractal** ( $d_f$ ) de uma partícula, quando esta informação é de interesse devido as condições de preparação da amostra (por exemplo: agregação, polimerização em emulsão ou processo sol-gel em solução), considera-se que a massa  $M$  de uma partícula está escalonada relativamente à sua dimensão  $R$  (raio) de acordo com a Equação 42.

$$M(R) \approx R^{d_f} \quad \text{Equação 42}$$

Se no regime experimental utilizado a relação  $q > R_g^{-1}$  for observada, a intensidade de luz espalhada por uma partícula fractal será dada pela Equação 43.

$$I(q) \approx q^{-d_f} \text{ ou } \log I(q) = -d_f \log q \quad \text{Equação 43}$$

Portanto, construindo-se um gráfico da intensidade na forma logarítmica *vs.*  $\log q$ , pode-se assumir que a declividade desta curva, ou seu coeficiente angular, corresponde ao valor procurado de  $d_f$ . A Tabela I representada mostra valores de  $d_f$  para topologias típicas.

**Tabela I:** Valores de  $d_f$  para partículas com topologias típicas.

<b>Topologia</b>	<b><math>d_f</math></b>
Cilindros e bastões	1
Novelo aleatório ideal	2
Objetos 2D com superfície lisa	2
Objetos 2D com superfície fractal	1-2
Objetos 3D com superfície lisa	3
Objetos 3D com superfície fractal	2-3

### 3.4.2. Espalhamento de Luz Dinamico (DSL)

O espalhamento de luz dinâmico (DSL)<sup>110, 112, 133</sup> mede as flutuações na intensidade de luz espalhada, as quais têm origem nas modificações locais do índice de refração da solução, como resultado de processos de difusão translacional e/ou relaxações internas das cadeias poliméricas em solução. Também pode ser encontrado na literatura com o nome de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento de luz quase elástico (QELS).<sup>110</sup>

A técnica consiste em medir as flutuações temporais na intensidade de luz espalhada devido a flutuações de concentração e densidade na amostra causada pelo movimento Browniano das partículas. O número de fótons que entra no detector é gravado e analisado por meio de um correlador digital. O sinal da radiação é assim adquirido na forma de uma função de correlação temporal.

$$g_2(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} \left[ \frac{1}{T} \int_0^T I(t') I(t' + t) dt' \right] \quad \text{Equação 44}$$

O subscrito “2” na equação (44) indica uma função de correlação de segunda ordem que envolve medidas de intensidade de luz, as quais são proporcionais ao quadrado do campo elétrico. A função  $g_2(t)$  pode ser relacionada com a função de correlação do campo elétrico através da relação de Siegert:

$$g_2(t) = 1 + \beta |g_1(t)|^2 \quad \text{Equação 45}$$

Onde  $\beta$  é um parâmetro instrumental, que significa o fator de coerência óptica, um parâmetro que depende da óptica de detecção. A equação (45) somente é válida para concentrações finitas, partículas não-interativas entre si e sistemas ergódicos (que apresentam as mesmas propriedades espalhantes em todas as direções espaciais).

Em muitos casos,  $g_1(t)$  é relacionada com uma função exponencial simples:

$$g_1(t) = e^{-\Gamma t} \quad \text{Equação 46}$$

Onde  $\Gamma$  é a taxa de decaimento da função e fisicamente está relacionada com a frequência de relaxação do movimento dinâmico da partícula em observação. Entretanto, sistemas de objetos espalhantes reais sempre apresentam certa polidispersão de tamanho em torno de um valor médio, conhecido como índice de polidispersão. Para análise de sistemas particulados com essas características, um método facilmente disponível para o tratamento das funções de correlação é o método dos cumulantes, representado através de um polinômio.

$$g_1(t) = Ae^{-\Gamma t} \left( 1 + \frac{1}{2!} \mu_2 t^2 + \dots \right) \quad \text{Equação 47}$$

Na equação (47), “A” corresponde à amplitude da distribuição (linha de base),  $\Gamma$  é a frequência de relaxação média e  $\mu_2$  é denominado segundo cumulante ou segundo momento, e corresponde à uma expectativa de ocorrência. Geralmente, o método é disponível acompanhando os *softwares* de aquisição de dados. Este método é particularmente interessante no estudo de sistemas coloidais porque a distribuição de tamanho das partículas pode ser estimada utilizando-se o segundo cumulante, medindo-se assim a largura da distribuição de tamanhos (assumindo esta ser modomodal). O resultado é um índice de polidispersão (*PD.I*).

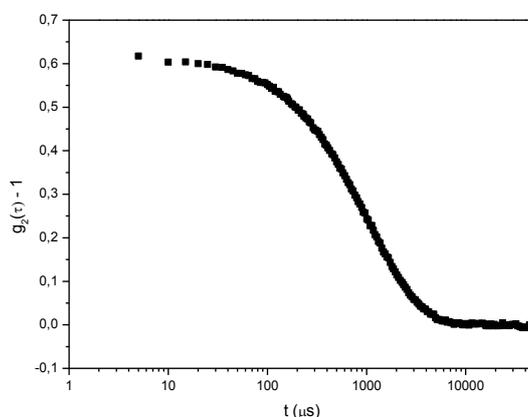
$$(PD.I) = \frac{\mu_2}{\Gamma^2} \approx \frac{(M_w/M_n - 1)}{4} \quad \text{Equação 48}$$

O método é empregado para sistemas com  $PD.I < 0.3$ . Se este não é o caso, métodos não-lineares de análises precisam ser usados e as funções de correlação são classicamente tratadas aplicando-se a operação matemática denominada transformada inversa de Laplace:

$$g_2(t) - 1 = \beta \left[ \int A(\tau) e^{(-t/\tau)} d\tau \right]^2 \quad \text{Equação 49}$$

Através de métodos matemáticos de análise da Equação 49 é determinada a frequência de relaxação  $\Gamma$ . Nas análises mais comuns tem sido empregados os métodos dos cumulantes<sup>134</sup> e da inversão da integral de Laplace<sup>135, 136</sup>, sendo este último mais elaborado que os cumulantes e bastante utilizado através de histograma pela amostragem exponencial, o através do programa computacional Contin.<sup>135, 137-139</sup>

O resultado desta transformação  $A(\tau)$  é uma distribuição de tempos de relaxação que pode consistir de um pico ou de vários picos, correspondendo à presença de uma única população de partículas ou a diferentes populações de partículas em uma mesma amostra, respectivamente ( $\Gamma = \tau^{-1}$ ). A figura 28 ilustra uma função de correlação e o resultado de sua análise.



**Figura 28:** Função de correlação temporal obtida para a amostra de gliadina em água à 25 °C.<sup>140</sup>

Com o valor de  $\Gamma$ , pode-se determinar quantitativamente o coeficiente de difusão

aparente ( $D_{ap}$ ) da partícula por meio da relação com o vetor de espalhamento ( $\vec{q}$ ).

$$D = \frac{\Gamma}{q^2}$$

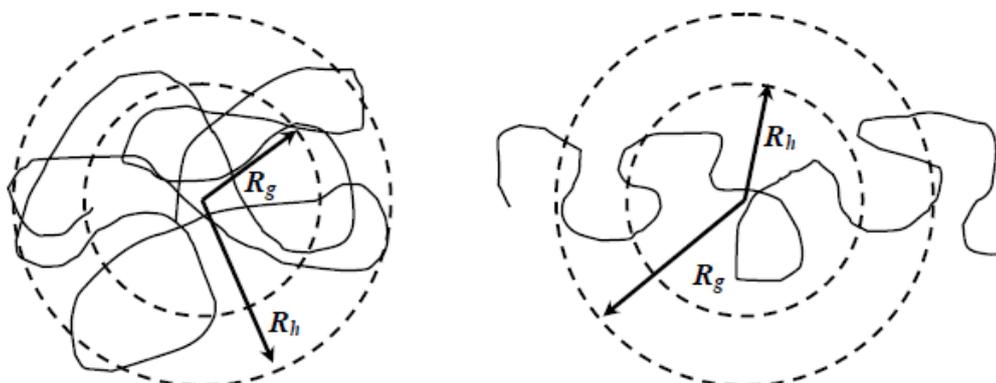
Equação 50

Onde  $\Gamma$  corresponde a meia largura a meia altura da curva de distribuição de frequências.

A partir do valor de coeficiente de difusão, é possível o cálculo do valor do raio hidrodinâmico  $R_h$  da partícula espalhante, desde que se conheça a viscosidade do solvente ( $\eta$ ) a uma dada temperatura (T). O valor do  $R_h$  corresponde a um valor hipotético para uma

esfera rígida que difunde com a mesma velocidade da partícula que está sendo estudada pelo Espalhamento de Luz Dinâmico. Entretanto, muitas macromoléculas e também muitas partículas, não são esferas rígidas, pois possuem uma dinâmica interna com movimentos entre as cadeias que podem estender ou contrair com a difusão, por exemplo.

Macromoléculas e partículas também são solvatadas, ou seja, possuem certa interação com o meio solvente, sendo que uma porção deste último pode difundir juntamente com a partícula. Sendo assim, o  $R_h$  representa o raio médio de uma partícula dentro da sua dinâmica de difusão, considerando a camada de solvatação. Em comparação com o  $R_g$ , o mesmo pode ser maior ou menor, dependendo das características estruturais e de interação das partículas com o solvente ou líquido em suspensão. A representação na Figura 29 procura ilustrar as diferenças entre  $R_g$  e  $R_h$  relativos a um novelo polimérico em solução.



**Figura 29:** Comparação entre raio de giro ( $R_g$ ) e raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) para duas cadeias poliméricas isoladas (linhas contínuas) representando uma cadeia tipo novelo (esquerda) e uma cadeia estendida (direita).

O tamanho geométrico da mesma partícula, que pode ser acessado por técnicas microscópicas é devido a este fato, geralmente um pouco menor que o valor de  $R_h$ . Na equação 51, de Stokes-Einstein,  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ).

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad \text{Equação 51}$$

Para sistemas monodispersos, a medida do coeficiente de difusão somente no ângulo de observação de  $90^\circ$  gera valores de  $R_h$  bastante confiáveis. Para amostras polidispersas, que é o caso da maioria das nanopartículas ou polímeros, faz-se necessário o monitoramento das funções de correlação em diferentes ângulos e o coeficiente de difusão

é obtido através da inclinação de  $\Gamma$  vs.  $q^2$ . Quando ainda a intenção é eliminar os efeitos da concentração no cálculo de  $R_h$ , calcula-se o coeficiente de difusão através da inclinação de  $\Gamma$  vs.  $q^2$  para uma série de concentrações. Assim, construindo-se o gráfico de  $D_c$  em função da concentração  $c$  e extrapolando a reta resultante à concentração zero, chega-se à determinação do coeficiente de difusão a diluição infinita ( $D_0$ ) através da Equação (52).

$$D_c = D_0 (1 + k_D c) \quad \text{Equação 52}$$

A relação entre o  $R_g$  obtido pelo Espalhamento de luz Estático (SLS) e do  $R_h$  obtido pelo Espalhamento de Luz Dinâmico (DSL) fornece o **parâmetro sensível à forma,  $\rho$** , dado através da Equação 53.

$$\rho = \frac{R_g}{R_h} \quad \text{Equação 53}$$

O valor deste parâmetro adimensional conduz a uma importante indicação da topologia da partícula espalhante, ou seja, da conformação da cadeia. Um amplo estudo relacionando valores de  $\rho$  com a estruturação de polímeros em solução foi desenvolvido por Burchard.<sup>141</sup> Assim, uma classificação do tipo de cadeia polimérica em solução tem se estabelecido em função de diferentes valores de  $\rho$ . A Tabela II mostra os valores de  $\rho$  calculados teoricamente para as topologias mais importantes:<sup>106</sup>

**Tabela II:** Valores de  $\rho$  para partículas com topologias típicas.<sup>106</sup>

Topologia	$\rho$
<b>Esfera rígida homogênea</b>	0,774
<b>Novelo aleatório monodisperso</b>	
condição teta	1,504
bom solvente	1,78
<b>Esfera oca</b>	1,0
<b>Microgel</b>	0,3-0,5
<b>Bastão rígido</b>	> 2

### 3.4.3. Espalhamento de Luz Simultâneo de Amostra Múltipla (SMSLS)

A técnica de Espalhamento de Luz Simultâneo de Amostra Múltipla (SMSLS) é uma valiosa ferramenta utilizada para monitorar a evolução molecular de amostras múltiplas, em tempo real, por meio de Espalhamento de Luz Estático (SLS). O SMSLS pode monitorar simultaneamente a estabilidade de um número ilimitado de amostras independentes por horas, dias, meses, tudo sob o controle de um único instrumento e um único computador, e sem qualquer intervenção humana significativa.

Em relação às técnicas que envolvem múltiplos canais e leitores de placas, tais como medições de raios ultravioletas, dispersão dinâmica de luz e outras abordagens, são extremamente onerosas, requerendo tempo, disponibilidade e conhecimento amplo dos equipamentos, além de serem instrumentos caros e pouco adequados para a medição direta da estabilidade.<sup>142</sup>

O SMSLS envolve análises simultâneas independente do tempo e totalmente dependente da intensidade de espalhamento de luz, a partir de tantas amostras independentes, conforme a intenção da pesquisa. Este tipo de dispersão de luz é extremamente sensível a nivelar as menores mudanças no peso molecular, como por exemplo, de proteínas terapêuticas, tais como agregação, degradação, desnaturação, dimerização, separação de fases, entre outros. A menor alteração na estabilidade de cada amostra é constantemente monitorada e detectada. SMSLS combina precisão, sensibilidade e velocidade de rastreamento de alto rendimento para as indústrias farmacêuticas e de polímeros.<sup>142</sup>

Esta técnica tem sido desenvolvida e implementada pelo grupo de investigação do professor diretor e fundador da PolyRCM o Dr. Wayne F. Reed e Diretor de instrumentação Mike F. Drenski há mais de 10 anos, para quantificar a degradação, agregação e a estabilidade das amostras que são submetidas a vários estímulos, como sal, ácido, temperatura, entre outros e monitorar a estabilidade de soluções.

SMSLS é visto como uma oportunidade para as indústrias farmacêuticas e de biopolímeros para aumentar radicalmente a precisão, simplicidade e rendimento com o qual eles podem medir a estabilidade das soluções. Proteínas e muitos outros polímeros naturais e sintéticos em solução são frequentemente bastante instáveis e uma má avaliação durante as análises pode levar a consequências graves em aplicações importantes, tais como na distribuição de medicamentos e desempenho do polímero em muitas aplicações

biomédicas. Testes no SMSLS podem ajudar a certificar-se que os polímeros são seguros para aplicabilidade no consumo humano.

### 3.4.3.1 O equipamento SMSLS

O equipamento SMSLS utilizado neste trabalho pode acomodar oito amostras independentes. O equipamento SMSLS fica dentro de uma caixa grande de metal. Dentro desta caixa há oito blocos de alumínio onde a temperatura é controlada de forma independente e a amostra é colocada para o monitoramento por SLS. Todas as amostras são totalmente independentes umas das outras, sendo que existe um laser individual e um controlador de temperatura para cada amostra no bloco. Os blocos com as amostras são contados da esquerda para a direita, e de frente para trás e, em seguida, como 1-4 e 5-8. Visto na parte da frente da caixa existem oito interruptores, um para cada laser. Há também dois controladores de temperatura em zonas múltiplas, à esquerda e direita. O controlador da esquerda é para os titulares de amostras 1-4 e o controlador da direita é para os titulares de amostras 5-8 (Figura 30).



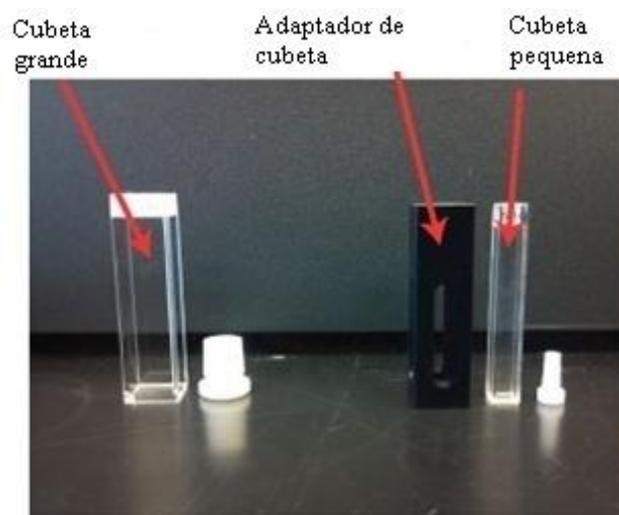
**Figura 30:** Descrição física do equipamento SMSLS.

Em princípio, não existe limite para o número de amostras que podem ser incorporados neste equipamento, embora o limite de detecção por matriz linear é de cerca de 50 amostras.<sup>118</sup>

O dispositivo pode utilizar cubetas de borosilicato ( $1 \text{ cm}^2$ ) ou de vidro óptico especial - Starna Cells (K5) com dois tamanhos para acomodar adequadamente o volume de amostra necessário, ou disponíveis para cada experiência SMSLS. As cubas menores são  $6,5 \times 6,5 \times 45 \text{ mm}$  de dimensões externas, com um comprimento interno de percurso de  $4 \text{ mm}$ . Estes são adequados para volumes compreendidos entre  $30 \mu\text{L}$  de  $450 \mu\text{L}$ . As

cubetas maiores são 12,5 x 12,5 x 45 mm, com um comprimento de percurso interior de 10 mm. Estas cubetas maiores são úteis quando é necessário um volume maior de amostra, ou quando se faz necessário uma mistura dentro da própria cubeta. A quantidade de volume necessário para a utilização destas células grandes fica entre 0,5 a 4 mL. As cubetas maiores são destinadas para serem colocados diretamente dentro do bloco de aquecimento de alumínio. Há um adaptador para a cubeta menor a ser colocado dentro do bloco de aquecimento. Ao manusear as cubetas o usuário deve ter cuidado ao tocar e limpá-las corretamente, de modo que se reduza a possibilidade de manchar a superfície do vidro, pois é a janela na qual o laser incide sobre a amostra.

Manchas devido ao derramamento de amostra ou sujeira dos dedos contribuirão para alargamento da função de correlação e afeta adversamente a medição SLS. Para cada cubeta há uma tampa de PTFE que se destina a reduzir tanto a contaminação pelo ar ou oxigênio, bem como reduzir a evaporação dos solventes voláteis. A Figura 31 mostra os tipos de cubetas utilizados nas análises.



**Figura 31:** Tipos de cubetas utilizadas nas análises.

O comprimento de onda do laser de diodo polarizado verticalmente (LaserMax, Rochester, NY) utilizado como fonte de luz é de 660 nm, com potência de 35 mW. Para cada feixe incidente no porta-amostra idêntico foi utilizado um compartimento de nylon preto, um para cada uma das quatro células, e canais de comunicação entre as células. Este dispositivo SMSLS, portanto, é um híbrido de série e de operação paralela, havendo dois bancos de amostras paralelas, cada um com quatro células de amostras em série.

As fibras ópticas (Tecnologia Polymicro) de diâmetro 0,48 nm são recolhidas na luz dispersa com um ângulo de dispersão de 90° a partir de cada célula e para cada um dos

dispositivos é acoplado um detector de carga Hamamatsu (BC-CCD, HC230-0907) e o divisor de feixe de laser. Dados de intensidade dispersas do CCD foram monitoradas continuamente através de uma interface de dados em LabVIEW (Figura 32).

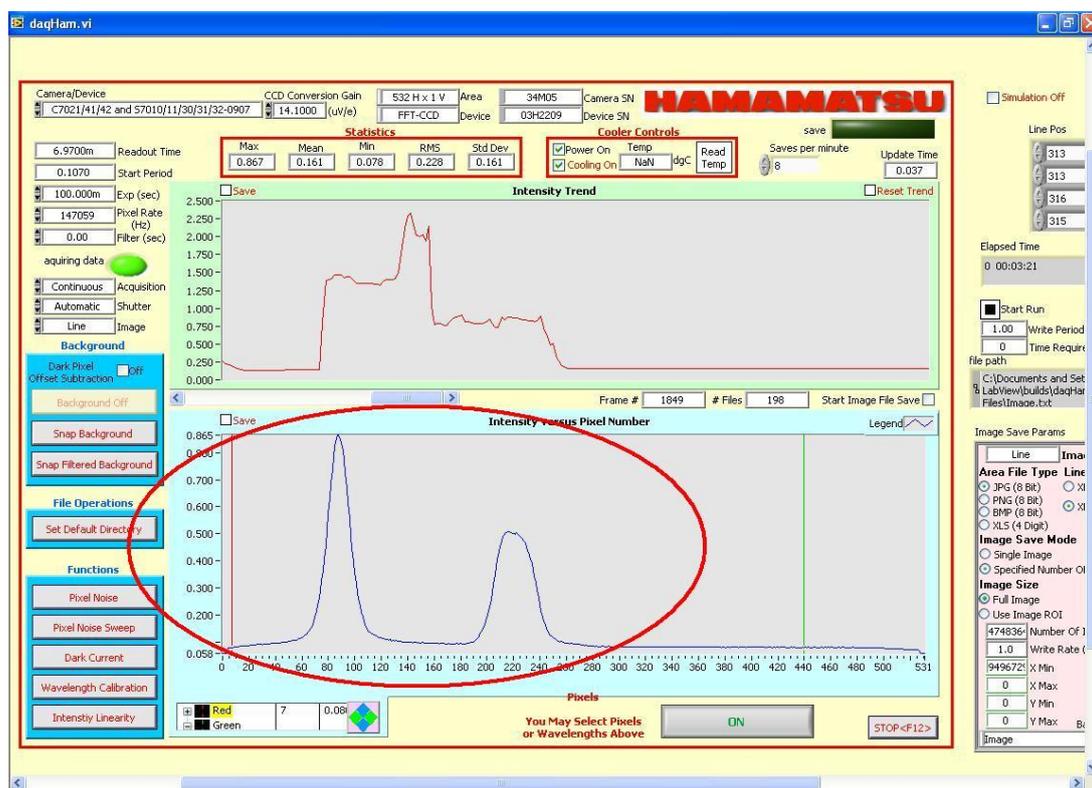


Figura 32: Monitoramento da intensidade dispersas por CCD.

Ao importar os dados para o Kaleidagraph é possível representar a intensidade de dispersão de luz para cada amostra graficamente como uma função do tempo.

### 3.5. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS

A maioria dos complexos estudados são coloridos devido às transições eletrônicas entre os níveis de energia dos orbitais  $d$ . A região do espectro do ultravioleta é na faixa de 200 a 400 nm e a da luz visível é entre 400 e 800 nm, em que o comprimento de onda de absorção das transições do orbital  $d$  depende do metal envolvido, do número de ligações, da geometria dos grupos coordenados, da basicidade e dos átomos doadores.<sup>143</sup> A absorção na região da luz depende da estrutura eletrônica da molécula, onde na região do ultravioleta produz modificações da energia eletrônica da molécula em consequência de

transições dos elétrons de valência. Estas transições fazem com que os elétrons excitados passem do orbital molecular ocupado para o primeiro orbital de energia superior.

O espectro no ultravioleta-visível (UV-Vis) é obtido quando uma radiação eletromagnética na região do UV ou visível passa através de um composto que contém cromóforos, que são grupos insaturados covalentes responsáveis pela absorção eletrônica (por exemplo, C=C, C=O ou NO<sub>2</sub>), que absorvem parte dessa radiação. Enquanto que para os íons metálicos, em especial metais de transição, a região do espectro no qual aparece o máximo de absorção depende de sua estrutura eletrônica.<sup>144</sup>

### **3.6. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier é utilizada como uma ferramenta prática e importante para elucidar a estrutura de biomoléculas<sup>145</sup>. Ela fornece informações sobre grupos químicos contendo ligações altamente polares ou o momento de dipolo durante a vibração, por exemplo, O – C e grupos O – H, bem como a formação dos complexos.<sup>146</sup>

A espectroscopia do infravermelho é baseada no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências vibracionais específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico. Se a molécula receber radiação será absorvida desde que sejam atendidas determinadas condições. Para que uma vibração apareça no espectro do infravermelho, a molécula precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar durante o movimento rotacional.<sup>147</sup>

Uma imagem FTIR pode ser adquirida principalmente por três diferentes configurações: a transmissão, reflexão ou reflexão total atenuada (ATR), dependendo da natureza da amostra. O modo de reflexão é raramente usado porque as amostras não são, frequentemente, muito reflexivas e o polimento de material biológico não é fácil ou desejável. Já o modo ATR tem demonstrado ser um modo de imagem altamente versátil porque o comprimento do percurso de amostragem não depende da espessura da amostra e, portanto, a preparação da amostra muitas vezes não é necessária. Além disso, quando uma

objetiva ATR é utilizada em um microscópio, a resolução espacial é melhorada devido ao elevado índice de refração do elemento de ATR.<sup>148</sup>

### 3.7. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

Termogravimetria é a técnica na qual uma variação da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada. A análise termogravimétrica (TGA) tem sido utilizada frequentemente no estudo da estabilidade térmica e da decomposição de polímeros, sendo ambas as propriedades importantes do ponto de vista científico e industrial.<sup>149</sup> A técnica examina a mudança de massa da amostra em função da temperatura ou do tempo, enquanto é submetida a uma programação controlada de aquecimento. A curva de termogravimetria derivada (DTG) é um recurso matemático que representa a derivada da primeira curva, que apresenta o pico máximo de temperatura de degradação e a área desse pico é proporcional à perda de massa naquele evento térmico.<sup>149, 150</sup>

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS DE ANÁLISE**

---

Nesse capítulo serão descritos os materiais utilizados para a realização da solução de amilopectina obtida da solução de Amidex 40003, das reações de complexação e os métodos experimentais e teóricos utilizados neste trabalho. O planejamento fatorial empregado teve como objetivo aprimorar as condições reacionais de complexação, quantificadas através do aumento no rendimento das reações.

As principais técnicas usadas para a preparação, análise e caracterização da solução de amilopectina e seus complexos foram: Ultrassom, Viscosimetria, Medidas de pH, Medidas de condutividade, Espectroscopia Vibracional (UV-Vis e FTIR), Espectroscopia de espalhamento de luz (LS) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

#### 4.1. MATERIAIS

A amostra de amilopectina foi obtida do amido de milho *Amidex 40003*. Este amido contém 80 % a 100 % de amilopectina. O grau de amilopectina presente no amido foi informado pelo fabricante, tendo sido obtido a partir de modificação genética da planta do qual foi extraído o amido. Neste trabalho, a solução original contendo majoritariamente amilopectina (preparada pela dissolução do *Amidex 40003*) será nomeada “solução Ap”.

Os solventes empregados, de grau analítico, para o preparo e purificação da amostra, foram o dimetilsulfóxido (DMSO), água (H<sub>2</sub>O) e álcool isopropílico (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH). Os reagentes utilizados para os testes colorimétricos foram: iodo (I<sub>2</sub>), iodeto de potássio (KI), uréia ((NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO); sulfato de cobre (Cu(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), tartarato duplo de sódio e potássio (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O) e hidróxido de sódio (NaOH).

Os complexos foram preparados com os seguintes sais adquiridos da Aldrich com elevado grau de pureza: FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, Cr<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>7</sub>(OH)<sub>2</sub>, Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Ni(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e PbCl<sub>2</sub>. Para as titulações complexométricas foram utilizados indicadores metalocrômicos (alaranjado de xilenol e murexida), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), iodeto de potássio (KI) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Para ajuste de pH foram utilizadas soluções de ácido clorídrico 1M (HCl), ácido nítrico 1M (HNO<sub>3</sub>), ácido acético 1M (CH<sub>3</sub>COOH) e solução tampão NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>Cl 0,1M. Todos os reagentes foram adquiridos da Aldrich com elevado grau de pureza.

A membrana semiseletiva foi obtida da Sigma-Aldrich - Dialysis Tubing Cellulose Membrane de tamanho 43mm x 27mm (esta membrana retém partículas de tamanho 16000 g.mol<sup>-1</sup> ou maior).

## 4.2. MÉTODOS INSTRUMENTAIS E DE ANÁLISE

### 4.2.1. Ultrassom

O tratamento da solução de amilopectina foi efetuado em Ultra-son Digital Sonifier, Models 250 & 450, Branson Ultrasonic Corporation. Em cada experimento foram utilizados 20 mL da solução contendo majoritariamente amilopectina. As irradiações foram aplicadas nos intervalos de tempo que variaram de 0,5 a 5 minutos em amplitudes que variaram de 10 % a 100 %.

### 4.2.2. Viscosimetria

Na determinação das viscosidades nas diferentes soluções, após tratamento ultrassônico, foi utilizado um viscosímetro Digital Brookfield (Modelo DV-II+PRO). Em função da viscosidade da solução obtida foi utilizado o Spindle de referência ULA. O viscosímetro foi acoplado a um banho termostático, permitindo assim mensurar a viscosidade das soluções no intervalo de 10 °C a 70 °C, com variação de temperatura de 0,5 °C, sempre que necessário. Uma vez que o software do viscosímetro fornece, além dos dados da viscosidade, os dados de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, estes foram utilizados para caracterização reológica das amostras. O volume da amostra utilizado foi de 20 mL, com velocidade inicial de 40 rpm, num intervalo de tempo de 15 s e 15 medidas. Os valores de viscosidade reportados neste trabalho referem-se aos valores médios, obtidos por triplicata em cada valor de velocidade de rotação.

Através da viscosidade intrínseca, as medidas de viscosidade da solução de amilopectina, foram realizadas para determinar a concentração crítica ( $c^*$ ) das cadeias do polímero em solução. As medidas de viscosidade foram realizadas em um viscosímetro SCHOTT AVS 350, sendo usado um viscosímetro capilar de Cannon-Fenske, de número 100, diâmetro de 0,63 mm. Foram utilizados 10,0 mL de solução para cada uma das diferentes concentrações que variaram de 0,002 a 0,020 mg.mL<sup>-1</sup> do biopolímero, a

temperatura foi termostatzada a  $30,0 \pm 0,1$  °C. Os valores de viscosidade obtidos neste trabalho referem-se aos valores médios, obtidos por triplicata.

#### 4.2.3. Análise espectroscópica de UV-Vis

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis) foram obtidos em um espectrofotômetro Varian (modelo Cary 50) realizadas na absorção de 300 nm a 900 nm. Sendo as análises das amostras dos complexos de amilopectina realizadas em cubetas de quartzo com capacidade para 4,0 mL com caminho óptico de 1 cm. Leituras abaixo de 300 nm não foram possíveis de serem realizadas porque o solvente (DMSO) absorve fortemente na faixa de 200 - 300 nm devido às transições  $n \rightarrow \pi^*$ .<sup>146</sup>

#### 4.2.4. Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A FTIR fornece informações sobre a natureza química e da estrutura molecular de materiais orgânicos, moléculas poliatômicas inorgânicas e componentes óxidos metálicos. Os dados espectroscópicos de FT-IR foram obtidos através do equipamento Bruker Modelo Alpha-P de Módulo UATR (Refletância Total Atenuada Universal). Os espectros foram obtidos com resolução espectral de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , em duplicata. Em todos os ensaios foi realizado o *background*.

#### 4.2.5. Espalhamento de luz (UFRGS)

As amostras foram analisadas em um espectrômetro do espalhamento de luz Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-900), com laser de He-Ne ( $\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$ ) como fonte de radiação.

#### 4.2.6. Espalhamento de luz (TULANE)

O protótipo do equipamento do Espalhamento de Luz Simultâneo de Amostra Múltipla (SMSLS) utilizado neste trabalho pode acomodar uma a oito amostras independentes. Posteriormente será discutido detalhadamente sobre este equipamento.

#### 4.2.7. Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas no equipamento TGA Q5000IR fabricado pela TA Instruments, utilizando atmosfera de gás nitrogênio em uma vazão de 25 mL.min<sup>-1</sup>, em panelas de platina herméticamente fechadas do modelo Platinum HT, em duplicata. A massa da amostra utilizada foi de 10 mg. O intervalo de temperatura da corrida foi de 20 – 400 °C com uma rampa de aquecimento de 5 °C.min<sup>-1</sup>. Os resultados foram tratados pelo software TA (*Thermal Analysis*) versão 4.4A, fornecido pelo próprio fabricante.

#### 4.2.8. Medidas de pH

As medidas de pH foram realizadas a temperatura ambiente (22 à 25°C) usando um pHmetro Digimed modelo DM-23, com um eletrodo de vidro combinado. O pHmetro foi calibrado previamente com soluções padrões com pH = 7,0 e pH = 10. As análises foram realizadas em e em triplicata.

#### 4.2.9. Medidas de condutividade

As medidas de condutividade foram realizadas utilizando condutivímetro de bancada microprocessado Bel Engineering srl, modelo W12D, previamente calibrado com solução padrão. As análises foram realizadas em temperatura ambiente (22 à 25°C) e em triplicata. Todos os valores de condutividade das soluções salinas (sal e solvente) foram subtraídos do valor de condutividade da mistura de solventes DMSO/água 90:10 (2,763 μS.cm<sup>-1</sup>), assim como os valores de condutividade dos complexos (sal, solvente e amilopectina) foram subtraídos do valor de condutividade da solução ApT pura (7,193 μS.cm<sup>-1</sup>).

#### 4.2.10. Índice de refração

As medidas do índice de refração foram realizadas num refratômetro AVS JENA – MADE IN GERMANY DDR, cedido pelo Departamento de Físico-Química, deste instituto, nesta universidade (IQ/UFRGS).

#### 4.2.11. Titulação complexométrica

A amilopectina é um potencial ligante devido à presença dos grupamentos – OH e – O - e forma complexos de adsorção<sup>151</sup> (complexo do tipo transferência de carga). A complexação de amilopectina com íons metálicos podem influenciar na distribuição e mobilidade de minerais nos organismos, bem como pode ser responsável pela introdução dos íons metálicos em alimentos e no sequestro de íons metálicos por soluções cosméticas que contenham amilopectina como espessante.<sup>10, 35, 152, 153</sup>

O estudo quanto à habilidade de complexação de metais pela amilopectina poderá nos explicar os resultados obtidos quanto ao tamanho, forma e dimensão dos complexos formados. Esta complexação é determinada por vários fatores: a natureza do metal, do ligante e do esqueleto polimérico, a distância entre os grupos pendentes na cadeia principal e as características do meio complexante como pH, temperatura, entre outras.<sup>154</sup>

A titulação é uma técnica de análise volumétrica na qual a formação de um complexo colorido entre o analito e o titulante é usada para indicar o ponto final da titulação. Qualquer reação de complexação pode em teoria ser usada como técnica volumétrica desde que a reação alcance o equilíbrio rapidamente a cada adição de titulante. Foram feitos estudos preliminares buscando otimizar as condições experimentais. Em muitas titulações com EDTA, o pH da solução é crítico. Para que a titulação seja bem sucedida é necessário um pH mínimo para que a complexação exista.<sup>143</sup> Por esta razão faz-se necessário um ajuste da solução,<sup>155</sup> para que possa ser observado o ponto viragem na titulação.

---

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

---

### 5.1. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (Ap) A PARTIR DO AMIDEX 40003

Inicialmente foram preparadas amostras da solução do amido dissolvido em DMSO e H<sub>2</sub>O, em diferentes tempos, temperaturas e proporções, com o objetivo de se obter uma solução homogênea e límpida. Para determinar qual a melhor proporção de DMSO/H<sub>2</sub>O e qual a concentração a ser utilizado de amido, o índice de refração deve se aproximar ao do vidro (1,52). Desta forma uma melhor observação através da técnica de Espalhamento de Luz será possível.

O controle do processo de solubilização do biopolímero foi feito através da determinação da absorbância, pH, índice de refração e condutividade da solução em função do tempo, sendo denominada *Solução estoque* (solução de Ap).

A partir dos resultados obtidos nos testes acima citados as condições experimentais para obtenção de uma solução homogênea de maior solubilização foram: 4 mg.mL<sup>-1</sup> preparada por dissolução do Amidex 40003, em 90 % de DMSO (v/v), homogeneizados por agitação mecânica, sob temperatura de aproximadamente 30 °C, durante 2 dias.

### 5.2. TRATAMENTO ULTRASSÔNICO

A solução estoque foi tratada com Ultrassom para promover a solubilização e a redução da massa molecular da amilopectina na solução, sendo denominada após este tratamento de “*solução tratada de amilopectina*” (ApT). Em cada experimento foram utilizados 20 mL da solução Ap (4,0 mg.mL<sup>-1</sup>). As irradiações foram aplicadas em intervalos de tempo que variaram de 0,5 a 3 minutos em amplitudes que variaram de 10 % a 100 %. As soluções resultantes foram e a viscosidade ( $\eta$ ).

O processo de obtenção da solução ApT foi monitorado por medidas de viscosidade (aparente) e espectroscópicas (por espalhamento de luz dinâmico (DSL)), onde foi analisado o raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) e o índice de polipersão ( $PD.I$ ) dos polímeros em solução.

### 5.3. MÉTODO DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA SOLUÇÃO ApT

De maneira geral, os amidos modificados podem ser portadores de substâncias como lipídios, proteínas e cinzas ou até mesmo desenvolver algumas cargas.<sup>3, 156</sup> Para eliminar tais interferentes a solução tratada de amilopectina escolhida para o estudo de

complexometria, foi purificada através de procedimentos que envolvem as seguintes etapas sequenciais: i) precipitação por adição de não-solvente;<sup>157</sup> ii) diálise;<sup>158</sup> iii) centrifugação; iv) liofilização<sup>158</sup> e v) lavagens e secagem.

O método de recuperação da solução de ApT foi realizado através da precipitação seletiva de tamanhos. Experimentalmente, esta técnica envolve a adição gradual de um co-solvente o qual, em geral, é um álcool ou uma cetona de cadeia curta, até que a solução apresente um aspecto turvo, cuja função é desestabilizar a dispersão do meio que contém o amido pela redução gradual de suas camadas de solvatação, permitindo sua agregação seguida de precipitação.<sup>157</sup> A redução da solvatação do amido na solução das partículas maiores favorece as forças atrativas de van der Waals, levando à agregação das partículas maiores anteriormente àquelas de tamanho inferior.<sup>159</sup> Assim, à medida que a precipitação da partículas com maior tamanho ocorre, há uma tendência natural de exclusão das menores.<sup>160</sup> Este processo pode ocasionar um fracionamento do material.<sup>161</sup> As floculações parciais da solução seguida de filtração ou centrifugação da suspensão, isolam um precipitado rico do amido de tamanhos maiores e mantêm as partículas de tamanhos inferiores dispersas no sobrenadante. A subsequente adição gradual do não solvente no sobrenadante produz um novo precipitado com uma segunda fração de tamanhos, a qual deverá conter partículas menores que as do primeiro precipitado e também maiores do que aquelas que se mantiveram dispersas no sobrenadante. De modo similar, o precipitado pode também ser novamente redisperso e submetido a esse procedimento de floculação para se obter uma distribuição de tamanhos ainda mais estreita.<sup>160, 162</sup>

Neste trabalho, em função da concentração do biopolímero, a precipitação ocorrerá com a adição gradual de isopropanol (solvente escolhido após testes preliminares, com maior obtenção do amido). Quando o teor crítico do não solvente é atingido, devido a sua pobre solubilidade nesse meio (DMSO/H<sub>2</sub>O), a amilopectina é precipitada e então é exaustivamente centrifugada e lavada com água para eliminar o excesso das impurezas.

Na segunda etapa de purificação do biopolímero foi aplicada a técnica de diálise por membrana<sup>158, 163</sup>, onde as substâncias em solução são separadas por suas diferenças de massa molecular. Este processo é usado para retirar as impurezas e aumentar a solubilidade da amilopectina. É um processo físico-químico pelo qual duas soluções de concentrações diferentes são separadas por uma membrana semipermeável e após certo tempo as espécies passam pela membrana para igualar as concentrações. Isso ocorre pelo mecanismo de difusão, no qual o fluxo de soluto ocorre de acordo com o gradiente de concentração,

sendo transferida massa de um local de maior concentração para um local de menor concentração.

O amido resultante da precipitação por adição do co-solvente foi colocado dentro da membrana semiseletiva e então mergulhada em água destilada por aproximadamente 3 dias, sob agitação magnética. Devido a massa molecular do biopolímero e ao tamanho dos poros da membrana, apenas a amilopectina fica retida dentro da membrana, enquanto o solvente DMSO, e os possíveis sub produtos da extração e o restante da molécula com massa molecular menor do que  $16000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  ultrapassam a membrana e são descartados.

Por fim, no produto obtido da membrana de diálise foi feita a liofilização.<sup>158</sup> Essa técnica remove a água e solventes de substâncias previamente congeladas pelo processo de sublimação que ocorre quando a temperatura e a pressão parcial do vapor da água são inferiores às do ponto triplo da mesma (610 PA à temperatura de  $0,01 \text{ }^\circ\text{C}$ , para a água pura). A secagem de um produto geralmente causa perda de atividade ou algum outro dano ao material. A liofilização é um método de secagem que reduz significativamente esses danos, secando o produto por sublimação após um prévio congelamento e em seguida submetendo-o a uma pressão negativa. Por esse motivo, a liofilização é usada quando deseja-se purificar materiais delicados e sensíveis ao calor. Esse processo foi realizado em um liofizador TermoFisher modelo Micromoduly YO-115. O produto resultante no interior da membrana de diálise foi transferido para um balão volumétrico apropriado para o equipamento e submetido a um prévio e rápido congelamento utilizando-se nitrogênio líquido e então submetido à liofilização durante aproximadamente 10 horas.

Adicionalmente, foram feitas análises na solução ApT para determinação da quantidade de amilose presente na solução. Foi utilizado o teste do iodo “adaptado”. Para verificar a presença de açúcares redutores na solução Ap foi feito o teste de Benedict. Com o objetivo de constatar a eventual presença de ligações peptídicas que ocorrem devido ao processo de modificação do amido pela empresa realizou-se o teste do Biureto. Após a realização destes estudos foi escolhida a melhor condição para posterior complexação com os metais.

#### **5.4. PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS METÁLICOS**

Inicialmente foi realizado o estudo da potencialidade de complexação com diferentes metais (ferro, cobre, cromo, níquel, cobalto e chumbo), através de testes colorimétricos e físico-químicos. A influência do pH também foi cuidadosamente estudado e monitorado no processo de complexação, sendo que é um dos fatores mais importantes

neste processo e também na titulometria. Visto que, em baixos valores de pH ocorre a protonação do grupo hidróxido, presente no biopolímero, provoca a repulsão das espécies metálicas, dificultando o processo de interação entre os metais e os grupos reativos. A escolha destes metais ocorreu devido à presença destes em alguns cosméticos<sup>11</sup>. Vários experimentos foram realizados, paralelamente, para a determinação do tempo que seria necessário para atingir o equilíbrio de complexação, da temperatura e da concentração. O estudo preliminar da concentração dos metais tornou-se útil para posterior determinação da massa molecular dos complexos nas análises de Espalhamento de Luz. Foi realizado a otimização das reações de complexação através do planejamento fatorial.

Para a determinação dos complexos com os sais de **cloreto de ferro III hexahidratado**  $[\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ , **nitrato de ferro III**  $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3]$ , as soluções foram preparadas com aproximadamente 0,01 g e 0,005 g de cada sal dos metais indicados e 12,5 mL de solução de amilopectina tratada (ApT). O ajuste do pH para (1-3) foi feito com a adição de ácido clorídrico e ácido nítrico,  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente, por gotejamento. O indicador usado foi o alaranjado de xilenol e titulados com uma solução padrão de EDTA de concentração de  $0,002 \text{ mol.L}^{-1}$ , todos realizados em triplicata.

Para a determinação dos complexos com os sais de **cloreto de cobre dihidratado**  $[\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ , **acetato de cobre monohidratado**  $[\text{Cu CH}_3\text{COO} \cdot \text{H}_2\text{O}]$  e **nitrato de cobre trihidratado**  $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$  as soluções foram preparadas com aproximadamente 0,01 g e 0,005 g de cada sal dos metais indicados e 12,5 mL de solução de amilopectina tratada (ApT). O ajuste do pH para (10-11) foi feito com a adição de solução tampão de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$   $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , para cada complexo formado, por gotejamento. O indicador usado foi o murexida e titulados com uma solução padrão de EDTA de concentração de  $0,002 \text{ mol.L}^{-1}$ , todos realizados em triplicata.

Para determinação dos complexos com os sais de **nitrato de cromo III nonahidratado**  $[\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$  e **acetato de cromo III dihidróxido**  $[\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COO})_3(\text{OH})_2]$ , as soluções foram preparadas com aproximadamente 0,01 g e 0,005 g de cada sal dos metais indicados e 12,5 mL de solução de amilopectina tratada (ApT). Para a titulação complexométrica, 5 mL do complexo formado foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL completando com água destilada até o menisco, logo após recolheu-se 25 mL da solução e colocou-se num erlenmeyer onde foi adicionado: 5 g de iodeto de potássio  $[\text{KI}]$ , 10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20 % e 10 mL de uma

solução padrão de EDTA 0,1M. Deixado em repouso por 5 minutos foi titulado com uma solução padrão de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N, todos realizados em triplicata.

Para a determinação dos complexos com os sais de **cloreto de níquel II hexahidratado**  $[\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ , **acetato de níquel II tetrahidratado**  $[\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  e **cloreto de cobalto II hexahidratado**  $[\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ , as soluções foram preparadas com aproximadamente 0,01 g e 0,005 g de cada sal dos metais indicados e 12,5 mL de solução de amilopectina tratada (ApT). O ajuste do pH para (4-6) foi feito com a adição de ácido clorídrico, ácido acético e ácido clorídrico,  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente, por gotejamento. O indicador usado foi o murexida e titulados com uma solução padrão de EDTA de concentração de  $0,002 \text{ mol.L}^{-1}$ , todos realizados em triplicata.

No que se refere aos sais de **nitrito de chumbo II**  $[\text{Pb}(\text{NO}_2)_2]$ , **cloreto de chumbo II**  $[\text{PbCl}_2]$  e **acetato de chumbo II**  $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$  as soluções foram preparadas com aproximadamente 0,01 g e 0,005 g de cada sal dos metais indicados e 12,5 mL solução de amilopectina tratada (ApT). O ajuste do pH para (4-6) foi feito com a adição de ácido nítrico, ácido clorídrico e ácido acético,  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente, por gotejamento. O indicador usado foi laranja de tilenol e titulados com uma solução padrão de EDTA de concentração de  $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$ , todos realizados em triplicata. Os cálculos utilizados para quantificar o percentual de complexação estão descritos no Anexo 1.

### 5.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE NO SMSLS (ESPALHAMENTO DE LUZ SIMULTÂNEO DE AMOSTRA MÚLTIPLA)

Inicialmente foram realizados alguns experimentos para determinar quais seriam as melhores condições para a realização do monitoramento, aplicando a técnica de SMSLS. Todos os experimentos foram feitas nas temperaturas de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando células de caminho óptico de 4 mm (volumes entre 30 a 450  $\mu\text{L}$ ) e de 10 mm (volumes entre 0,5 a 4 mL), durante o tempo de 12, 24 e 48 horas, dependendo do experimento, para a determinação da intensidade de luz espalhada e posteriormente análise de dados.

Todas as amostras foram filtradas antes da análise. Paralelamente foram realizados análises de DSL, que também através da intensidade, pôde-se calcular a massa molecular de modo rápido e eficaz. Foram realizados uma série de experimentos no SMSLS, para o aprofundamento do estudo quanto a potencialidade do tratamento ultrassônico e também em relação as melhores condições de complexação. Os valores da intensidade do solvente

(DMSO) e tolueno foram medidos para os cálculos da massa molecular, em cada célula de amostra.

---

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

A solução estoque (Ap) na concentração  $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi preparada por dissolução do Amidex 40003 usando solução aquosa de DMSO 90% (v/v). A solução foi mantida sob agitação magnética a uma temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 48 h até a sua dissolução total, com  $\text{NaN}_3$  (azida de sódio) adicionado como um agente antibacteriano. A dispersão foi da coloração opaca para translúcida depois de 30 h (o tempo foi dependente do nível de conversão de amido), e não foram encontrados agregados residuais.

### 6.1. CONTROLE DO PROCESSO DE SOLUBILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE (Ap)

O controle do processo de solubilização da solução Ap foi realizado através da determinação da absorbância (Abs), pH, índice de refração e condutividade da solução em função do tempo. A reprodutibilidade do processo de solubilização da solução de Ap foi verificada a partir dos dados obtidos, todos realizados em triplicata. A Tabela III apresenta os resultados obtidos para a concentração escolhida neste trabalho.

**Tabela III:** Dados obtidos no controle do processo de solubilização da solução estoque.

Solução estoque ( $4\text{mg.mL}^{-1}$ )	Abs (620 nm)	pH	Índice de refração	Condutividade ( $\mu\text{s}$ )
Média $\pm$ DP	$0,0410 \pm 0,009$	$8,78 \pm 0,83$	$1,4653 \pm 0,0010$	$0,819 \pm 0,071$

### 6.2. TRATAMENTO ULTRASSÔNICO

O tratamento da solução Ap foi efetuado no Ultra-son Digital Sonifier. Em cada experimento foram utilizados 20 mL da solução Ap ( $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). As irradiações foram aplicadas em intervalos de tempo que variaram de 0,5 a 3 minutos em amplitudes que variaram de 10 % a 100 %. As soluções resultantes foram analisadas quanto o raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) dos polímeros em solução, o índice de polidispersão ( $PD.I$ ) e a viscosidade aparente ( $\eta$ ), (Tabela IV).

**Tabela IV:** Resultados obtidos do  $R_h$  (nm),  $PD.I$  e  $\eta$  (mPa.s), em diferentes tempos e amplitudes da solução Ap.

<b>Amostra</b>	<b><math>R_h</math> (nm)</b>	<b><math>PD.I</math></b>	<b><math>\eta</math> (mPa.s)</b>
<b>0,5 min 30 %</b>	406,0	0,210	4,51
<b>0,5 min 60 %</b>	301,0	0,222	4,00
<b>0,5 min 80 %</b>	275,5	0,236	3,95
<b>0,5 min 100 %</b>	-	-	3,87
<b>1 min 30 %</b>	292,5	0,128	3,83
<b>1 min 60 %</b>	247,5	0,145	3,63
<b>1 min 80 %</b>	215,5	0,234	3,62
<b>1 min 100 %</b>	<b>151,0</b>	<b>0,260</b>	<b>3,58</b>
<b>2 min 30 %</b>	214,0	0,100	3,45
<b>2 min 60 %</b>	176,5	0,140	3,60
<b>2 min 80 %</b>	162,0	0,234	3,57
<b>2 min 100 %</b>	159,5	0,303	3,34
<b>3 min 30 %</b>	196,5	0,160	3,47
<b>3 min 60 %</b>	146,5	0,010	4,10
<b>3 min 80 %</b>	-	-	3,66
<b>3 min 100 %</b>	-	-	4,06

Obs.: Desvio padrão das análises variou de 0,001 a 0,08

A metodologia aplicada para o tratamento ultrassônico da solução Ap permite concluir que a mesma é adequada para a redução da massa molecular ( $M_w$ ) e controle de tamanho da cadeia polimérica, a partir de uma solução de Amidex 40003 em DMSO/H<sub>2</sub>O.

A partir da Tabela IV verifica-se uma redução no  $R_h$  do biopolímero em solução, em todas as intensidades (tempo) e com o aumento da amplitude, bem como na viscosidade aparente nos tempos de 1 min e 2 min. O índice de polidispersão representa o desvio absoluto em relação à mediana, ocorreu o inverso. É verificado que houve um aumento da mesma com o aumento da intensidade e amplitude, como o esperado, devido à grande perturbação no sistema e a estrutura ramificada do polímero. Esta perturbação ocorre devido ao mecanismo ultrassônico aplicado onde os segmentos das cadeias poliméricas próximas ao ponto de colapso se movem com velocidade superior àquelas dos segmentos mais distantes. Esta clivagem pode ocorrer preferencialmente próximo ao meio

da cadeia, sem alterar a estrutura química da unidade de repetição.<sup>164</sup> A tensão produzida por esta diferença gera um estresse e posterior quebra da cadeia, ocasionando uma redução da massa molecular e na viscosidade,<sup>60</sup> aumentando conseqüentemente a *PD.I*. No entanto, caso a amplitude e a intensidade do ultrassom forem excessivos, pode resultar na degradação da estrutura do polissacarídeo.<sup>165</sup>

A degradação surge como resultado do efeito do ultrassom no solvente. A maior parte dos efeitos físicos e químicos causados por ultrassom são normalmente atribuídos à cavitação, o colapso de microbolhas que explodem e se propagam como uma onda de som através da solução. Isto gera, em uma escala de tempo de microssegundo, rapidamente altas temperaturas e pressões.<sup>166, 167</sup>

Sabe-se que o tratamento ultrassônico é pouco convencional, mas ambientalmente é um método eficaz e não poluente, utilizado para promover modificações químicas nos polímeros, inativar microorganismos, e romper as membranas fosfolipídicas.<sup>166, 168</sup> A exposição de uma solução polimérica à alta intensidade de radiação de ultrassom pode reduzir sua massa molecular. Particularmente para o amido e seus componentes, a massa molecular tem influência significativa sobre muitas propriedades, entre elas, a absorção de água e a solubilidade.<sup>60</sup> Sendo assim, muitas das propriedades resultantes deste processo podem ser explicadas em termos do efeito de cavitação. A elevação da polidispersão pode estar relacionada com possíveis recombinações de macrorradicais, formados no início do processo, entre si e com moléculas ainda não afetadas pela degradação mecânica, produzindo material possivelmente mais ramificado.<sup>167</sup>

A intensidade da cavitação é função da pressão de vapor do solvente, variando em ordem inversa. Com a elevação da temperatura, devido ao aumento da convecção, ocorrerá um aumento na pressão de vapor do solvente, que acarretará uma maior quantidade de vapor nas bolhas de cavitação, que produzirá uma redução na pressão e temperatura máximas atingidas no momento da implosão, diminuindo este processo de implosão e a velocidade das moléculas do solvente e a intensidade das ondas de choque.<sup>60, 167, 168</sup>

A exposição prolongada de soluções contendo o biopolímero no ultrassom em altas intensidades e amplitudes, como no caso 3 min e 100 %, pode levar à degradação total ou parcial das cadeias do polímero, devido à alta cavitação. A degradação é devida ao aumento das forças de fricção desenvolvidas entre o rápido movimento das moléculas grandes e com menor mobilidade. Esta degradação pode ocorrer devido às forças

hidrodinâmicas da cavitação (isto é a energia de onda de choque produzida na implosão da bolha), a tensão de cisalhamento na interface das bolhas pulsando ou o efeito térmico.

O uso do solvente menos volátil na mistura, como o DMSO (cujo ponto de ebulição é 189 °C e ponto de fusão é 18,5 °C) e uma intensidade ultrassônica menor aplicada a solução, resulta em uma pressão de vapor ( $P_v$ ) menor, bem como o aumento da intensidade ultrassônica ocasiona um aumento do grau de despolimerização.

A metodologia aplicada neste trabalho apresenta, portanto, uma boa reprodutibilidade e seletividade no tratamento da redução da massa molecular da amilopectina, mostrando-se eficaz. O tratamento para posterior complexação escolhido foi de **1 min** de intensidade, na amplitude de **100 %**, por se mostrar mais estável na repetibilidade e pelo fato da molécula possuir, ao final do processo, um tamanho adequado (na escala nanométrica). A partir deste momento iremos chamar a solução tratada de amilopectina de **ApT**.

### **6.3. ANÁLISE DA SOLUÇÃO TRATADA ATRAVÉS DE TESTES COLORIMÉTRICOS**

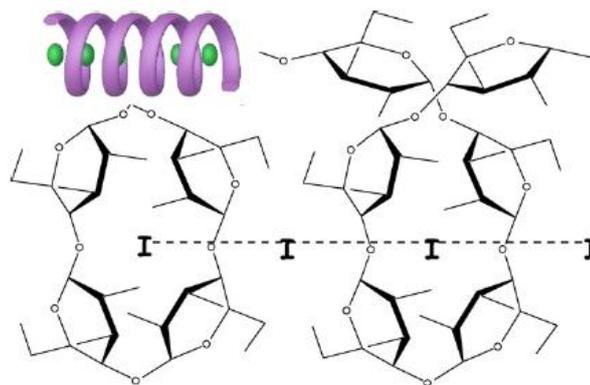
No amido em estudo, Amidex 40003, obtido da Corn Products Brasil, era esperado que a amilopectina fosse o componente de maior proporção, variando de 70 a 80 %. Após os tratamentos ultrassônicos, recuperação e purificação, determinou-se a quantidade de amilose presente na solução tratada (através do teste do Iodo), bem como a existência de proteínas e açúcares redutores. Trabalhou-se com a hipótese de que um eventual processo de degradação na amostra ao ser tratada no ultrassom possa estar formando açúcares redutores.<sup>156</sup> Por esta razão foi verificada também a presença destes açúcares através do teste de Benedict.

#### **6.3.1. Teste do iodo “adaptado”**

O teste do iodo é usado para determinar a quantidade de amilose presente no amido. Este teste é baseado na capacidade da amilose (complexo de adsorção) de formar um complexo helicoidal com o iodo (complexo de transferência de carga), resultando numa cor azul intenso caracterizada por uma absorção em 620 nm no espectrofotômetro. A cor azul intensa é resultante da adsorção do iodo (na forma  $I_5^-$ ) nestas cadeias. Porém, o complexo iodo-amilopectina produz uma cor violácea, de forma irreversível, mas não uma

conformação helicoidal devido as suas ramificações, baixando sua absorção para um máximo de aproximadamente 540 nm.<sup>152, 169, 170</sup>

Outros estudos divergem, relatando que quatro átomos de iodo poderiam estar dispostos linearmente dentro da cavidade da estrutura de hélice de 11 resíduos de anidroglicose para formar o grupo cromóforo no complexo de amilopectina-iodo<sup>171</sup>, conforme mostrado esquematicamente na Figura 34.



**Figura 33:** Representação esquemática dimensional do complexo de amilopectina-iodo.<sup>170</sup>

Normalmente o teste é feito em solução aquosa, mas a solução ApT encontra-se em DMSO/H<sub>2</sub>O, sendo necessário adaptar a técnica, adicionando-se ao sistema uma pequena quantidade de uréia, para basificar o meio e promover um desdobramento maior na molécula da amilose, fato que torna a solução azulada, permitindo ser feita a leitura em um espectrofotômetro.

Inicialmente, preparou-se uma solução padrão de iodo (20 mg de I<sub>2</sub>, 0,2 g de KI e água) e uma solução padrão da amilose Sigma ( $\sigma$ ), utilizada como referência. Para a determinação da quantidade de amilose na solução ApT, foi necessária a construção de uma curva padrão com concentrações de amilose padrão (Sigma). No preparo destas adicionou-se 0,9 mL das soluções de diferentes concentrações de amilose padrão, 0,1 mL de uréia, 0,2 mL de iodo e avolumou-se com água até 10 mL. As soluções de diferentes concentrações de amilose padrão e a solução tratada foram levadas ao espectrofotômetro e lidas a uma absorbância de 640 nm.<sup>152, 171</sup> Os testes foram realizados em triplicata.

A curva padrão de amilose (Figura 34) variou entre 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> a 1 mg.mL<sup>-1</sup>, onde obteve-se a seguinte equação da reta ( $y = 17,045 x + 0,1098; R = 0,98$ ). Considerando inicialmente a hipótese de um teor de 20 % de amilose na solução tratada, o valor encontrado foi de 21,9 %.

### 6.3.2. Teste do Biureto

O teste do biureto é utilizado para determinação de proteínas totais numa amostra. Os reagentes do teste formam um complexo com a ligação peptídica, evidenciada pela coloração violeta, onde os íons  $\text{Cu}^{2+}$  são reduzidos a  $\text{Cu}^+$ . A intensidade da cor é proporcional ao número de ligações peptídicas existentes, indicando que existe proteína na amostra.<sup>172</sup>

Para verificar a presença de proteínas na solução ApT, foi realizado o Teste do Biureto. Foi preparado o reagente de Biureto (0,15 g de sulfato de cobre, 0,6 g de tartarato duplo de sódio e potássio, 30 mL de hidróxido de sódio 10 %, 0,1 g de iodeto de potássio e água deionizada sob agitação) ao qual foi adicionado 2 mL da solução tratada em um tubo de ensaio a 2 mL do reagente. Os testes foram realizados em triplicata.

Não houve mudança na coloração de nenhuma das amostras, indicando que o cobre não formou complexos com ligações peptídicas, logo não há proteína na amostra.

### 6.3.3. Teste de Benedict

O teste de Benedict consiste na determinação de açúcares redutores. Baseia-se na redução do íon  $\text{Cu}^{2+}$  em meio alcalino a  $\text{Cu}^+$ , devido ao poder redutor das carbonilas em solução alcalina, a uma temperatura de aproximadamente 100 °C. O íon cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) produz o  $\text{Cu}_2\text{O}$ , composto de cor vermelha. Todos os monossacarídeos reagem positivamente, logo, frutose, glicose entre outros sofrem reação. Todavia, a sacarose também pode levar a resultados positivos caso sofra hidrólise prévia. Devido a extração e uma possível degradação do amido<sup>3</sup> que pode ter ocorrido quando as amostras foram submetidas ao Ultrassom, considerou-se a hipótese que o amido pode ter se degradado à glicose, monossacarídeo que forma amilose e amilopectina.

Para a determinação da presença de açúcares redutores preparou-se uma solução padrão de glicose e o reagente de Benedict (17,3 g de citrato de sódio, 1,73 g de sulfato de cobre, 20 g de carbonato de sódio e avolumou-se a 100 mL com água). Para a análise foi adicionado de 5 a 10 gotas da solução de glicose em 5 mL do reagente de Benedict sob aquecimento em banho-maria. Após o aquecimento, a solução tratada de amilopectina permaneceu incolor, indicando que não há presença de açúcares redutores.

Conclui-se então que a concentração de amilose em solução ApT é de aproximadamente 21,9 % (teste do Iodo adaptado). Além disso, o tratamento ultrassônico

não levou à formação de açúcares redutores, o que foi verificado através do teste de Benedict. Finalmente, a hipótese de haver proteínas provenientes da extração do amido foi excluída. Acredita-se que a amilose apenas participe da solução, mas não da complexação com os metais, visto que, ela forma complexos de inclusão helicoidal com o iodo, alguns álcoois e ácidos orgânicos.<sup>35, 58, 59</sup>

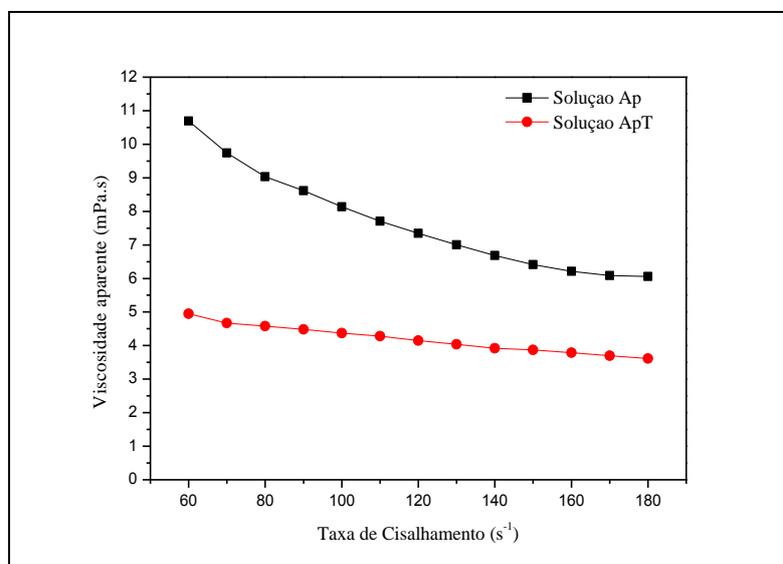
## 6.4. ANÁLISE REOLÓGICA

### 6.4.1. Análise reológica da solução Ap (solução estoque de amilopectina) e solução ApT (solução tratada de amilopectina)

Diversos estudos<sup>62, 164, 168, 173</sup> demonstraram que o tratamento ultrassônico reduz a massa molecular de biomacromoléculas, diminuindo a viscosidade das soluções, uma vez que a viscosidade está associada a complexas interações polímero-solvente entre outras variáveis, incluindo tamanho e forma, bem como a flexibilidade molecular do polímero.

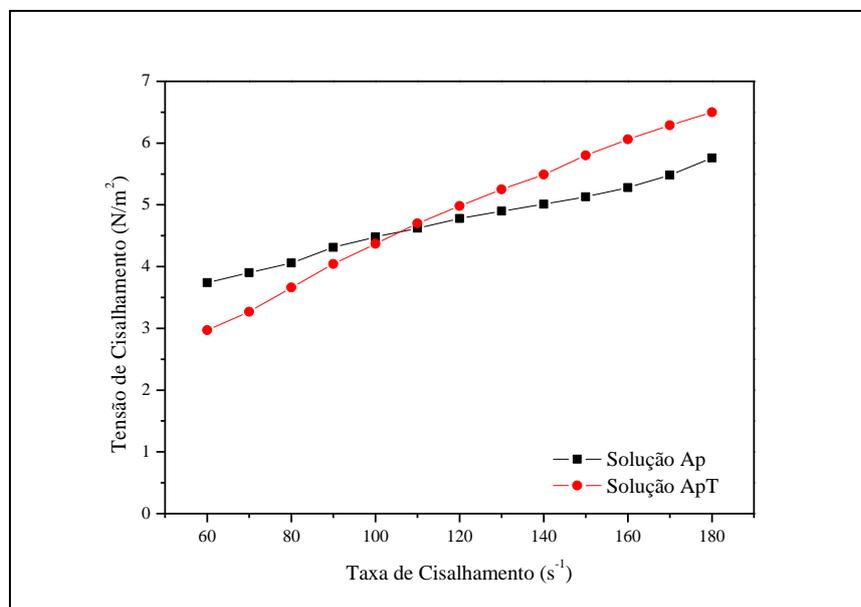
Os dados de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para a solução Ap e solução ApT (item 4.2.3) de amilopectina são mostrados na Figura 34. A partir desta figura foi avaliado o efeito do tratamento de ultrassônico sobre a viscosidade das amostras.

Observa-se uma redução na viscosidade da amilopectina tratada com a técnica de ultrassom, e este fato confirma uma modificação na cadeia polimérica da amilopectina em solução, o que sugere uma redução da massa molecular.



**Figura 34:** Valores obtidos da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento da solução ApT e da solução Ap à 25 °C.

Os resultados experimentais comprovaram que a solução Ap apresenta um comportamento reológico não-newtoniano e neste caso, pode-se afirmar que o material apresentou um comportamento de um fluido pseudoplástico, uma vez que a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Para a solução de amilopectina tratada (ApT) também se observa uma ligeira diminuição na viscosidade, tendendo a um comportamento newtoniano, com o aumento da taxa de cisalhamento. Como sugerido anteriormente, a diminuição da viscosidade é devida a diminuição da massa molecular da macromolécula tratada com ultrassom, isto é, a força de cisalhamento é reduzida com a diminuição da viscosidade devido ao alongamento da cadeia de amilopectina. São apresentados os diagramas das curvas de escoamento da solução Ap e da solução de ApT da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento (Figura 35), o que mais uma vez mostra o comportamento pseudoplástico, para ambas as soluções, sendo que para a solução tratada observa-se uma lineariedade maior.



**Figura 35:** Tensão em função da taxa de cisalhamento, à 25 °C da solução Ap e ApT, respectivamente.

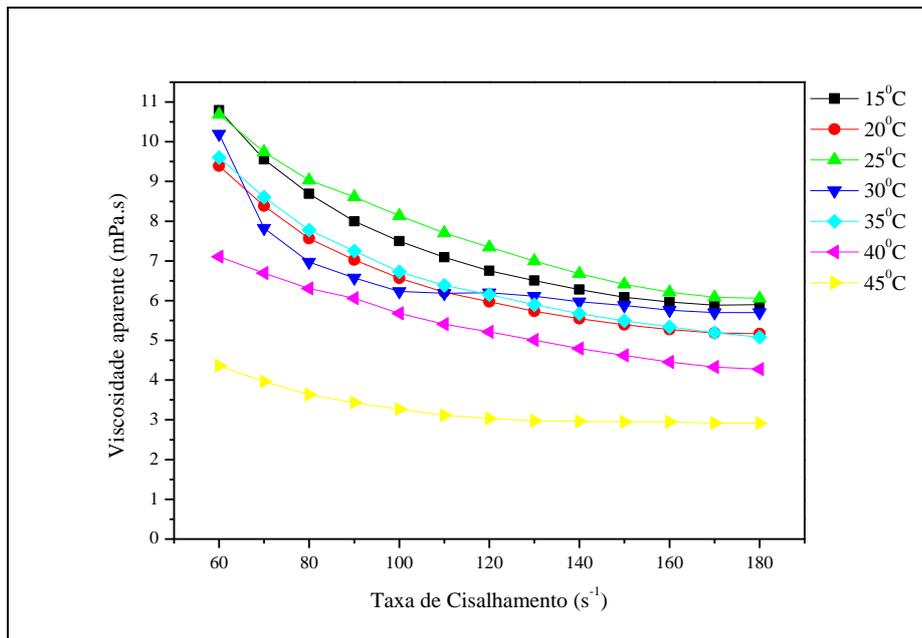
As curvas de fluxo também foram descritas utilizando o modelo de lei de potência, que é amplamente utilizado para descrever as propriedades de fluxo de líquidos não-newtonianos em análise teórica, assim como em aplicações práticas<sup>174, 175</sup>. Sendo assim, as amostras apresentaram comportamento pseudoplástico não-newtoniano com valores de índice de comportamento de fluxo ( $n$ ), variando de 0,31 para a solução Ap e 0,48 para amilopectina ApT. O modelo de lei de potência foi adequado para descrever o

comportamento do fluxo das amostras, uma vez que o coeficiente de correlação obtido através da análise da regressão linear ( $R^2$ ) medidos apresentaram um valor de 0,97.

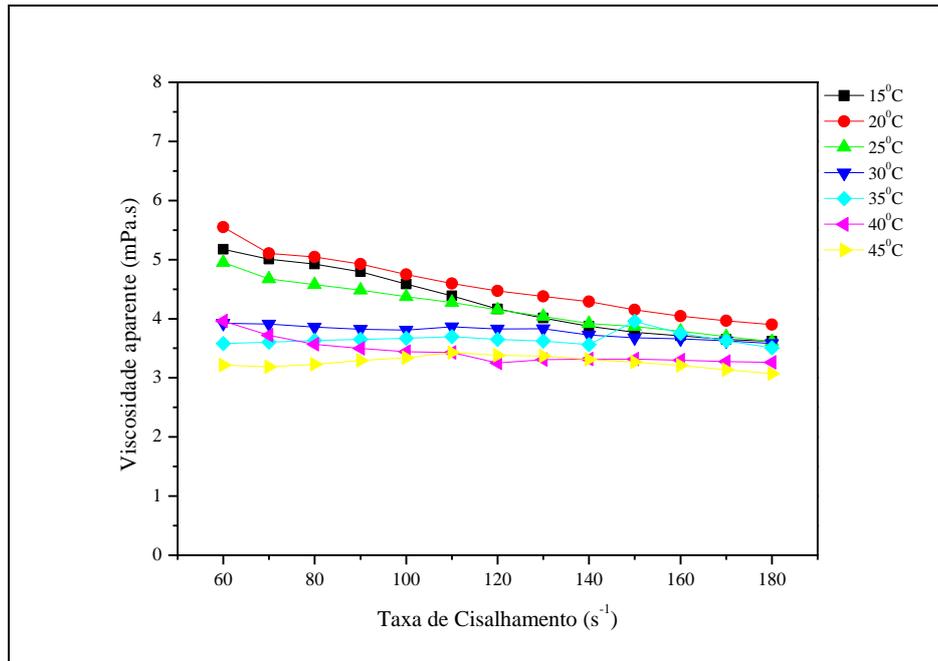
Além disso, é possível observar que a viscosidade é mais estável para a amilopectina tratada. Sugere-se que isto ocorre porque, neste caso as cadeias de amilopectina são mais alongadas, ou seja, mais flexíveis. Outros estudos obtiveram resultados semelhantes, com uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento<sup>176, 174</sup>, isto indicou uma consistência nos resultados. Os coeficientes de consistência também diminuíram com valores de 145,6 para solução estoque e 45,1 para a amilopectina tratada. A redução dos valores de  $K$  pode ser atribuída à clivagem da cadeia nestas amostras quando foram sonicadas.

#### 6.4.2. Análise reológica da solução de amilopectina em relação à temperatura

As Figuras 36 e 37 mostram o efeito da viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento para a solução Ap e solução tratada ApT, na concentração 4mg/mL de amilopectina em sete diferentes temperaturas.



**Figura 36:** Viscosidade aparente da solução Ap em função da taxa de cisalhamento a diferentes temperaturas.



**Figura 37:** Viscosidade aparente da solução tratada (ApT) em função da taxa de cisalhamento a diferentes temperaturas.

É claramente observado nas figuras 36 e 37 que o aumento da temperatura ocasionou uma diminuição na viscosidade nas duas amostras. Além disso, duas regiões foram observadas: a região de baixo cisalhamento (onde a viscosidade diminuiu drasticamente, sugerindo comportamento pseudoplástico) e uma região de elevado cisalhamento (em que a viscosidade tende a ser constante indicando um comportamento newtoniano). Para a amostra tratada, esse comportamento foi mais evidente.

Sugere-se que quando a temperatura aumenta ocorre um aumento na densidade da solução devido a evaporação do solvente, assim, a massa efetiva dos polímeros em unidade de volume de solvente também diminuiu. Este fato causa uma diminuição na viscosidade das amostras, devido ao aumento da flexibilidade da cadeia e compactação da molécula. No entanto, a certa temperatura, a diminuição da massa não é significativa e a viscosidade não varia.

#### 6.4.3. Análise reológica dos complexos da solução de amilopectina

De modo a avaliar o comportamento viscosimétrico dos complexos de amilopectina, foram analisados diagramas da tensão de cisalhamento (N/m<sup>2</sup>) em função da taxa de cisalhamento (s<sup>-1</sup>) a 25 °C e a 45 °C, onde através do coeficiente angular da reta foi

determinada a viscosidade, cujos os valores de coeficientes ( $R^2$ ) encontram-se entre 0,96 a 0,99.

Na Tabela V, podemos observar que houve uma redução na viscosidade quando foram introduzidos os sais metálicos na solução de amilopectina tratada, a temperatura de 25 °C, para formação dos complexos. Isto ocorre em função do aumento da massa da solução, após a introdução do sal, e também devido ao empacotamento das cadeias poliméricas. Podemos observar que para os sais de nitrato a estabilidade é maior, com uma viscosidade mais próxima à da solução tratada. Para a maioria dos complexos estudados, observa-se que o aumento da temperatura (45 °C) proporciona a gelatinização das soluções, impossibilitando o torque.

**Tabela V:** Viscosidades em função da temperatura de ambas soluções de amilopectina e dos complexos.

	$\eta$ (mPa.s) 25 °C	$\eta$ (mPa.s) 45 °C
<b>Solução de amilopectina tratada</b>	5,7	3,6
<b>Cr(CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub></b>	2,1	-
<b>Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	4,9	-
<b>Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	3,6	-
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	2,0	-
<b>Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub></b>	5,1	Gelatinizou
<b>Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	5,1	Gelatinizou
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	1,6	4,6
<b>Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub></b>	4,1	Gelatinizou
<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	4,9	5,2
<b>PbCl<sub>2</sub></b>	2,9	4,9

Como já discutido anteriormente quando a temperatura aumenta ocorre uma diminuição na densidade da solução, devido à evaporação de parte do solvente, favorecendo a capacidade de hidratação das cadeias ramificadas. Este fenômeno causa um aumento no volume hidrodinâmico ocupado pelas moléculas, devido à quebra das ligações de hidrogênio que unem as moléculas tornando a estrutura mais compacta, rígida e altamente densa em solução, o que conseqüentemente, diminuiu a viscosidade dos complexos, formando um líquido altamente viscoso. Cabe salientar aqui, o resultado obtido através do planejamento fatorial, onde para a maioria dos casos, quando a temperatura estava envolvida o efeito tornava-se negativo, mostrando que esta variável deve ser mantida à temperatura ambiente para formação dos complexos.

## 6.5. RESULTADOS DE VISCOSIMÉTRICA

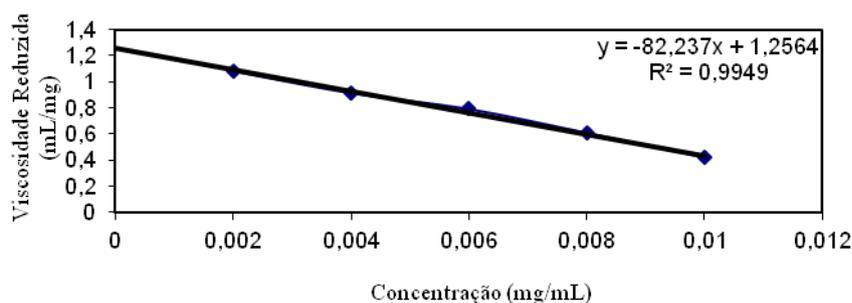
### 6.5.1. Determinação da viscosidade intrínseca e concentração crítica ( $c^*$ ) da amilopectina

A Tabela VI apresenta os resultados encontrados para os valores de viscosidade relativa ( $\eta_{rel}$ ), viscosidade específica ( $\eta_{sp}$ ) e viscosidade reduzida ( $\eta_{red}$ ) para a solução de ApT, cujos resultados serviram para a determinação da viscosidade intrínseca.

**Tabela VI:** Valores das concentrações ( $c$ ), tempo de fluxo ( $t_f$ ) e viscosidades obtidas para as diferentes soluções de amilopectina  $30,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

$C \text{ (mg/mL}^{-1}\text{)}$	$t_f \text{ (s)}$	$\eta_{rel}$	$\eta_{sp}$	$(\eta_{red}) / \text{mL} \cdot \text{mg}^{-1}$
0	147,50	1	0	0
0,002	147,82	1,00217	0,00217	1,08500
0,004	148,04	1,00366	0,00366	0,91500
0,006	148,20	1,00475	0,00475	0,79167
0,008	148,22	1,00485	0,00485	0,60625
0,010	148,12	1,00417	0,00417	0,41700
0,015	148,10	1,00403	0,00403	0,26867
0,020	148,35	1,00576	0,00576	0,28800

A viscosidade intrínseca foi obtida a partir dos valores das viscosidades reduzidas específicas em concentrações diferentes, e extrapolando os dados para uma concentração zero usando uma regressão linear (Figura 38).



**Figura 38:** Gráfico da viscosidade reduzida versus concentração de amilopectina à  $30,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Neste estudo, o valor encontrado para a viscosidade intrínseca foi de  $1,257 \text{ L.g}^{-1}$ . Este valor foi inferior aos valores reportados em outro estudo<sup>177</sup> para soluções de amilopectina no mesmo solvente (90 % DMSO/H<sub>2</sub>O).

Sabe-se que a magnitude da viscosidade intrínseca é dependente de dois fatores: o comprimento da cadeia (isto é, a massa molecular) e a rigidez da cadeia<sup>178</sup>. Assim, os baixos valores da viscosidade intrínseca para a amostra neste estudo são atribuídos à flexibilidade da cadeia relativamente elevada e baixos valores de massa molecular, devido ao tratamento de ultrassônico. Sendo assim, os resultados mostram que a amilopectina é um polissacarídeo altamente ramificado sensível ao cisalhamento. O tratamento de ultrassom nas cadeias causa grandes reduções no volume hidrodinâmico e isso pode causar grandes reduções na viscosidade da dispersão.

A partir do valor da viscosidade intrínseca encontrado determinou-se a concentração crítica (interpenetração) das cadeias ( $c^*$ ) da amilopectina tratada (ApT) que foi igual a  $0,795 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

A concentração crítica ( $c^*$ ) distingue o regime diluído do regime semi diluído e marca o início do emaranhamento do polímero<sup>138, 179</sup>. Quando  $c > c^*$  (regime semi diluído) os envoltórios intermoleculares predominam o movimento molecular total dos polímeros. Já quando  $c < c^*$  (regime diluído) as moléculas individuais estão estatisticamente separadas uma das outras<sup>138</sup>.

Neste estudo, o valor para  $c^*$  determinado indica que a amilopectina tratada (na concentração de  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) utilizada está em um regime semi diluído. Neste caso, as cadeias de amilopectina isoladas em solução começam a sobrepor-se e interpenetram, indicando interações intermoleculares. Além disso, as cadeias de amilopectina apresentaram mobilidade severamente limitada em comparação com as soluções diluídas.

Com este resultado fica evidente que os estudos referentes a relação-estrutura do biopolímero-metal devem ser realizados em uma concentração de amilopectina bem abaixo da  $c^*$ , ou seja, será necessário fazer uma diluição da solução para que o comportamento da solução seja semelhante a uma solução ideal.

## 6.6. OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE COMPLEXAÇÃO

A otimização das reações de complexação foi realizada através de planejamento fatorial.<sup>180</sup> Para  $k$  fatores, ou seja,  $k$  variáveis controladas pelo analista, um planejamento completo de dois níveis exige a realização de  $2^k$  ensaios diferentes.<sup>181</sup> Para as reações de complexação foram avaliados três fatores: temperatura, tempo e concentração de metal, estudados em dois níveis, sendo assim foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$ , acrescidos de 3 pontos centrais (Tabela V). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e a resposta foi avaliada através do percentual de complexação e quantificada através da titulometria.

**Tabela VII:** Planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Massa (mg)
1	25,0	3	5
2	40,0	3	5
3	25,0	5	5
4	40,0	5	5
5	25,0	3	10
6	40,0	3	10
7	25,0	5	10
8	40,0	5	10
9	32,5	4	7,5

\* As concentrações molares dos sais são apresentadas no Anexo 2.

Os dados obtidos do planejamento fatorial foram tratados por planilhas eletrônicas publicadas pelo Laboratório de Quimiometria Teórica e Aplicada do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).<sup>182</sup> Nesse tratamento de dados, os efeitos das variáveis temperatura, tempo e concentração foram avaliados de forma univariada e multivariada, o que corresponde a interações de até 3ª ordem (efeitos das 3 variáveis ao mesmo tempo). Normalmente, os níveis dos fatores são nomeados pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto. Para os experimentos no nível zero, o número 0 (zero) é utilizado na nomeação. Os sinais para os efeitos de interação entre todas as variáveis do planejamento, realizando todas as combinações possíveis, são obtidos pelo produto dos sinais originais das variáveis envolvidas.

Através do planejamento fatorial obtiveram-se os seguintes resultados para os 12 sais usados no estudo da complexação com a solução ApT (Tabela IX). De acordo com as

informações contidas na Tabela VIII, o experimento 7 possui melhor resposta para a condição de otimização desejada em todos os casos. O sal de acetato de chumbo  $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$  não solubilizou nas condições estipuladas para esta análise, e mesmo variando a concentração mostrou-se instável, precipitando em alguns momentos.

**Tabela VIII:** Resultados das complexações (%) dos 12 sais com a amilopectina.

	$\text{PbCl}_2$	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	$\text{FeCl}_3$	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	$\text{CuCl}_2$
1	$3,53 \pm 1,1$	$5,52 \pm 1,7$	$16,6 \pm 0,5$	$25,9 \pm 1,3$	$18,4 \pm 1,6$	$7,53 \pm 0,6$
2	$2,04 \pm 1,3$	$6,62 \pm 1,9$	$12,6 \pm 1,0$	$18,9 \pm 2,7$	$12,6 \pm 1,6$	$11,7 \pm 1,4$
3	$4,64 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,6$	$11,5 \pm 1,3$	$35,0 \pm 2,0$	$38,8 \pm 0,8$	$10,3 \pm 1,1$
4	$4,27 \pm 0,7$	$12,6 \pm 1,4$	$19,5 \pm 0,9$	$31,2 \pm 2,0$	$10,0 \pm 2,0$	$9,35 \pm 0,9$
5	$12,0 \pm 0,3$	$7,11 \pm 0,6$	$9,81 \pm 1,1$	$27,5 \pm 1,3$	$24,9 \pm 1,4$	$7,34 \pm 0,8$
6	$10,8 \pm 1,6$	$9,43 \pm 0,9$	$13,5 \pm 1,6$	$16,7 \pm 1,0$	$26,4 \pm 0,8$	$11,1 \pm 0,3$
7	$20,4 \pm 2,3$	$15,5 \pm 0,5$	$28,1 \pm 0,9$	$38,5 \pm 1,7$	$40,0 \pm 0,5$	$16,1 \pm 0,7$
8	$6,26 \pm 0,6$	$9,32 \pm 0,3$	$13,5 \pm 0,7$	$15,1 \pm 1,7$	$8,95 \pm 0,6$	$10,8 \pm 0,3$
9	$6,74 \pm 0,4$	$8,23 \pm 1,8$	$15,4 \pm 0,2$	$14,9 \pm 0,2$	$12,8 \pm 1,0$	$8,14 \pm 0,8$
	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	$\text{Cr}_3(\text{CH}_3\text{COO})_7(\text{OH})_2$	$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$	$\text{NiCl}_2$	$\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	$\text{CoCl}_2$
1	$14,1 \pm 1,0$	$23,4 \pm 2,2$	$29,6 \pm 2,3$	$19,7 \pm 1,2$	$22,9 \pm 2,1$	$11,1 \pm 1,2$
2	$10,1 \pm 0,7$	$27,8 \pm 0,2$	$15,7 \pm 2,0$	$13,0 \pm 0,4$	$17,6 \pm 1,2$	$6,35 \pm 1,2$
3	$14,1 \pm 1,0$	$29,8 \pm 0,3$	$46,9 \pm 1,5$	$30,1 \pm 2,7$	$21,6 \pm 1,7$	$17,5 \pm 1,2$
4	$12,3 \pm 1,0$	$24,5 \pm 0,7$	$20,0 \pm 1,7$	$19,0 \pm 1,3$	$11,9 \pm 0,8$	$11,7 \pm 0,4$
5	$9,09 \pm 0,9$	$45,5 \pm 0,2$	$35,3 \pm 4,1$	$20,2 \pm 0,2$	$20,7 \pm 0,8$	$9,70 \pm 1,0$
6	$6,61 \pm 0,2$	$47,8 \pm 0,3$	$46,7 \pm 0,5$	$15,1 \pm 0,4$	$12,9 \pm 1,4$	$16,1 \pm 0,4$
7	$17,0 \pm 0,2$	$55,4 \pm 0,7$	$54,0 \pm 3,1$	$32,2 \pm 0,6$	$31,1 \pm 0,8$	$21,6 \pm 0,2$
8	$9,22 \pm 0,5$	$48,7 \pm 0,2$	$22,5 \pm 3,2$	$10,6 \pm 1,7$	$14,1 \pm 0,8$	$14,3 \pm 0,2$
9	$10,4 \pm 1,5$	$35,7 \pm 0,1$	$44,5 \pm 0,8$	$13,8 \pm 0,9$	$18,8 \pm 0,7$	$14,5 \pm 0,6$

O experimento 7 foi realizado à 25 °C (temperatura ambiente), por 5 horas e com 0,01 g de sal. Os efeitos das variáveis podem ser discutidos através da Tabela X, que mostra o efeito das variáveis no percentual de complexação de cada sal com a amilopectina.

Para as posteriores análises de caracterização dos complexos, foram utilizadas apenas as condições otimizadas definidas pelo tratamento dos dados do planejamento experimental. Também foram preparadas soluções contendo apenas a mistura de solventes e o sal (brancos), a fim de avaliar a condutividade e o pH das mesmas antes e após a

complexação, para complementar a efetividade de complexação. Essas mesmas soluções foram utilizadas para as análises espectroscópicas.

**Tabela IX:** Efeitos das variáveis no percentual de complexação de cada sal.

	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	$\text{PbCl}_2$	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	$\text{FeCl}_3$	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$
<b>Media das complexações</b>	9,23	7,65	23,04	15,58	11,25	19,86
<b>1</b>	-0,24	-4,32	-11,24	-1,72	-4,03	-16,03
<b>2</b>	4,88	1,80	7,74	5,02	3,16	3,87
<b>3</b>	1,44	8,75	-3,30	1,18	-2,18	5,12
<b>12</b>	-1,95	-2,94	-2,36	-1,60	-0,79	-13,91
<b>13</b>	-1,67	-3,39	-5,86	-3,71	-1,10	1,26
<b>23</b>	-0,75	0,13	-3,03	4,11	2,09	-5,01
<b>123</b>	-2,28	-3,50	-3,98	-7,55	-1,86	-2,43
	$\text{CuCl}_2$	$\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$	$\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$	$\text{NiCl}_2$	$\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	$\text{CoCl}_2$
<b>Media das complexações</b>	9,88	37,28	36,76	18,32	19,03	13,81
<b>1</b>	0,43	-1,35	-15,23	-11,11	-9,93	-2,83
<b>2</b>	2,23	3,49	4,03	5,99	1,13	5,47
<b>3</b>	1,63	22,97	11,57	-0,95	1,21	3,79
<b>12</b>	-3,54	-4,67	-13,97	-5,22	-3,40	-3,67
<b>13</b>	-1,21	-0,85	5,17	-2,23	-2,46	2,40
<b>23</b>	2,05	1,92	-6,77	-2,26	4,62	-0,40
<b>123</b>	-0,98	0,19	-7,44	-3,00	-1,24	-3,20

\* A análise de variância para cada sal é apresentada no Anexo 3.

Os efeitos 1, 2 e 3 correspondem respectivamente às variáveis temperatura, tempo e concentração do sal avaliadas univariadamente. Os efeitos de interação entre variáveis são chamados de 12, 13, 23 e 123.

As respostas dos efeitos foram dadas em percentual em relação à média das complexações de cada sal com a amilopectina. O tempo (2) e a concentração (3) foram às variáveis significativas que mostraram, na sua maioria, um efeito positivo no percentual de complexação, assim como, a interação entre estas duas variáveis (23).

Esses efeitos positivos estão relacionados aos fatores termodinâmicos e cinéticos das reações de complexação.<sup>183, 184</sup> No que se refere aos fatores termodinâmicos, sabe-se que a termodinâmica não leva em consideração o fator tempo, porém a concentração é de

total importância no que se refere aos cálculos das constantes de equilíbrio e da taxa de reação.<sup>183</sup>

Os complexos se formam porque há diminuição da energia livre do sistema, possibilitando a reação um ganho de estabilidade. Esta estabilidade reacional ocorre porque em certas reações a taxa é determinante para o alcance do equilíbrio químico, promovendo uma estabilidade cinética maior. Por outro lado, a complexação é bastante limitada pelo fator tempo, isso porque a concentração, o tamanho do íon metálico, assim como o alta massa molecular da amilopectina influenciam no alcance do equilíbrio químico na complexação, onde para alguns casos é necessário um maior tempo reacional para a formação do complexo.

Para a maioria dos casos, quando a variável 1 (temperatura) está envolvida o efeito torna-se negativo, mostrando que a variável temperatura deve ser mantida ambiente. Sabe-se que a temperatura influencia na taxa de solubilidade do sal, bem como ao estado termodinâmico de complexação. Porém para os complexos de amilopectina formados nesta tese, dissolvidos em DMSO e H<sub>2</sub>O, observa-se o contrário. Isto reforça que a temperatura é um indicativo da capacidade da amilopectina absorver água à temperatura acima da ambiente e formar um gel ou líquido viscoso, como resultado da pré-gelatinização,<sup>185</sup> devido suas cadeias ramificadas e a alta massa molecular. Uma característica marcante da sua estrutura de formar hidrogéis é consequência da presença dos grupos -OH. O aumento da temperatura faz com que ocorra o empacotamento das cadeias poliméricas em razão do fato das ligações de hidrogênio que unem as moléculas se quebrem, favorecendo a capacidade de hidratação das cadeias, o que irá refletir no grau de pré-gelatinização e na viscosidade da solução de amilopectina a temperaturas elevadas.<sup>96</sup>

Conclui-se então que o experimento 7 mostra-se mais adequado para se obter rendimento máximo na complexação de todos os sais com o polímero, visto que as variáveis 2 e 3 estão no nível maior e a variável 1 no nível menor. Ou seja, a concentração e o tempo são variáveis significativas na complexação; e a temperatura é um efeito negativo. A partir dessa conclusão, todas as amostras de complexos utilizadas para as análises posteriores serão preparadas nas condições do experimento 7.

A interpretação dessas diferenças pode ser realizada com sucesso com base no princípio HSAB (*hard and soft acid and bases*). Sabe-se que o ânion (OH)<sup>-</sup> presente na amilopectina (base de Lewis) é uma espécie dura de Pearson, ou seja, possui pequeno raio atômico, alta carga efetiva nuclear e baixa polarizabilidade.<sup>186</sup> Embora possam existir

exceções, a regra geral dita que ácidos duros se ligam a bases duras. Dentre os metais escolhidos para o estudo de complexação, os íons  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  (ácidos de Lewis) também são espécies duras de Pearson<sup>144</sup>, justificando o rendimento reacional maior, independente do contra-íon.

### 6.7. EFEITO DO pH NA COMPLEXAÇÃO DOS ÍONS METÁLICOS NA SOLUÇÃO DE AMILOPECTINA (ApT)

A influência do pH na capacidade de complexação dos íons metálicos é um fator importante e deve ser investigado. A interação dos íons metálicos com os grupos funcionais localizados no biopolímero pode ser fortemente sensível aos valores do pH do meio. Além disso, o pH do meio também afeta a solubilidade dos sais no solvente e o estado de ionização dos grupos funcionais.<sup>187</sup> A capacidade de complexação dos íons metálicos além dos fatores termodinâmicos e cinéticos discutidos anteriormente (item 5.3), depende fortemente do valor do pH do meio, da atração eletrostática dos grupos funcionais da amilopectina carregados negativamente após a desprotonação e também dos contra-íons, como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , ativos na reação de complexação.<sup>188</sup>

A complexação com os íons metálicos envolvem hidrólise, complexação pelo ligante, orgânicos ou inorgânicos, reações redox, precipitação, concentração, tempo de reação, entre outros.<sup>189</sup> A capacidade de interação dos íons metálicos em DMSO aumenta com o aumento do pH no processo de complexação, mas não em uma relação linear. A valores de pH mais baixos, os grupos funcionais ou locais de interação, estariam intimamente associados aos íons hidrônio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) e pode restringir o acesso aos sítios de ligação dos metais, como resultado das forças repulsivas.<sup>190</sup> Por outro lado, o valor de pH demasiado elevado pode causar a precipitação de metal como complexos metálicos.<sup>191, 192</sup>

A realização desse experimento teve como objetivo avaliar as diferenças causadas no pH das soluções salinas (brancos) antes e após a adição da amilopectina, para a formação dos complexos. A Tabela XI mostra as medidas de pH realizadas em temperatura ambiente.

**Tabela X:** Medidas de pH das soluções salinas e dos complexos de amido, bem como a média de complexação.

Contra-íon	pH das soluções salinas	pH dos complexos	Percentual de redução (%)
<b>Sais de Fe<sup>3+</sup></b>			
<b>Cloreto</b>	5,73 ± 0,03	4,92 ± 0,05	14,2
<b>Nitrato</b>	5,15 ± 0,05	4,52 ± 0,06	12,1
<b>Sais de Cu<sup>2+</sup></b>			
<b>Nitrato</b>	6,22 ± 0,02	4,96 ± 0,12	20,3
<b>Cloreto</b>	6,06 ± 0,05	4,97 ± 0,07	18,0
<b>Acetato</b>	9,20 ± 0,01	8,59 ± 0,03	6,7
<b>Sais de Cr<sup>3+</sup></b>			
<b>Acetato</b>	9,25 ± 0,02	8,08 ± 0,02	12,7
<b>Nitrato</b>	5,77 ± 0,02	4,79 ± 0,09	17,0
<b>Sais de Ni<sup>2+</sup></b>			
<b>Cloreto</b>	8,60 ± 0,01	5,92 ± 0,02	31,2
<b>Acetato</b>	10,01 ± 0,04	9,74 ± 0,03	2,7
<b>Sais de Co<sup>2+</sup></b>			
<b>Cloreto</b>	7,21 ± 0,02	5,46 ± 0,08	24,3
<b>Sais de Pb<sup>2+</sup></b>			
<b>Nitrato</b>	6,31 ± 0,02	5,60 ± 0,02	11,3
<b>Cloreto</b>	6,48 ± 0,03	5,78 ± 0,12	10,7

Como observado na tabela acima, há um redução de pH do meio em todos os complexos formados. Essa redução pode ser atribuída à reação de complexação, devido à troca de alguns íons H<sup>+</sup> das hidroxilas da molécula de amilopectina pelos cátions metálicos, liberando íons H<sup>+</sup> e acidificando o meio.<sup>193</sup>

Sabe-se que a formação do complexo depende pH da solução<sup>183</sup> devido ao equilíbrio químico entre a amilopectina e o metal, bem como a participação do sítio ligante básico -OH e moléculas de água presentes na esfera de coordenação do metal. Além destes fatores, acredita-se que os contra-íons atuem também na redução do pH, visto os diferentes

papéis dos ânions na construção das esferas de coordenação interna e externa dos complexos.

Observa-se que para os sais de cloreto e nitrato a redução do pH é mais evidente, comparada com os sais de acetato. Isto porque, o ânion acetato forma ácidos fracos e tende a formar uma solução tampão, além do seu poder ressonante que resulta numa maior estabilidade do meio.

Quando analisada a relação pH e as médias de complexação, nota-se que para todos os sais de nitrato o pH fica próximo de 5, e são estas espécies  $(\text{NO}_3)^-$  que apresentam uma maior média de complexação comparado com os demais ânions dos sais correspondentes. O que prova mais uma vez, a eficácia do processo de complexação. Este comportamento está provavelmente associado à variação das espécies de hidróxido-complexo formado que facilitam a mobilidade em solução e, conseqüentemente, uma maior complexação do metal pelo biopolímero. Conclusão também obtida por Rosa *et al*<sup>183</sup> no estudo da diferenciação de espécies metálicas lábeis e inertes. Cabe salientar também que para todos os sais de acetato estudados neste trabalho, o pH de formação dos complexos é relativamente alto, comparado com os demais (acima de 8). Acredita-se que a reatividade esteja relacionado com o tamanho do ânion, o fato do acetato ser maior comparado com os demais ânions aqui estudados, dificulta a penetração nas cadeias do polímero, o que conseqüentemente, diminui o poder complexante. Qualitativamente, os íons metálicos ligados ao ligante são preferencialmente complexados por grupos funcionais de maior acessibilidade na macromolécula.<sup>194</sup>

## 6.8. EFEITO DA CONDUTIVIDADE NA COMPLEXAÇÃO DOS ÍONS METÁLICOS NA SOLUÇÃO DE AMILOPECTINA (ApT)

A condutividade de uma solução depende da concentração do soluto e do número de cargas presentes. A formação dos complexos da amilopectina com os sais metálicos é evidenciada pela redução nas medidas de condutividade (Tabela XII), observado anteriormente em outros estudos.<sup>29, 30, 38</sup>

Essa redução pode ser explicada devido à redução de íons livres em solução causada pela complexação. Neste trabalho, o solvente (DMSO/H<sub>2</sub>O) é utilizado como um agente solubilizante para a amilopectina e os seus complexos, formando uma solução

estável com a amilopectina. Já para os complexos, o DMSO atua também como um solvente competitivo, uma vez que também interage com os ânions.<sup>189</sup>

**Tabela XI:** Condutividades das soluções salinas e dos complexos de amido.

Contra-íon	Condutividade molar ( $\Lambda_m$ ) das soluções salinas (S.cm <sup>2</sup> .mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Condutividade molar ( $\Lambda_m$ ) dos complexos (S.cm <sup>2</sup> .mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Média de redução (%)
<b>Sais de Fe<sup>3+</sup></b>			
<b>Cloreto</b>	44,84 ± 0,25	38,62 ± 0,43	13,9
<b>Nitrato</b>	88,38 ± 0,27	79,22 ± 0,17	10,4
<b>Sais de Cu<sup>2+</sup></b>			
<b>Nitrato</b>	55,63 ± 0,09	50,65 ± 0,12	8,9
<b>Cloreto</b>	22,06 ± 0,05	18,78 ± 0,46	14,9
<b>Acetato</b>	2,84 ± 0,03	0,62 ± 0,01	78,0
<b>Sais de Cr<sup>3+</sup></b>			
<b>Acetato</b>	20,22 ± 0,13	7,47 ± 0,19	63,1
<b>Nitrato</b>	81,32 ± 0,11	71,77 ± 0,33	11,7
<b>Sais de Ni<sup>2+</sup></b>			
<b>Cloreto</b>	43,60 ± 0,19	39,08 ± 0,11	10,4
<b>Acetato</b>	5,52 ± 0,03	3,92 ± 0,01	28,9
<b>Sais de Co<sup>2+</sup></b>			
<b>Cloreto</b>	49,62 ± 0,05	40,10 ± 0,05	19,2
<b>Sais de Pb<sup>2+</sup></b>			
<b>Nitrato</b>	63,39 ± 0,04	52,89 ± 0,89	16,6
<b>Cloreto</b>	19,06 ± 0,59	15,49 ± 0,06	18,7

<sup>a</sup> Condutividade da mistura de solventes (DMSO 90%) é de 2,763  $\mu$ S/cm.

<sup>b</sup> Condutividade da solução de amilopectina é de 7,193  $\mu$ S/cm.

Os complexos de amilopectina com acetatos de Cu (II) e Cr (III) mostraram um decréscimo de cerca de 70 % na condutividade em comparação com a solução original de sal. Nos outros complexos tais diminuições da condutividade foram cerca de 10 – 30 %.

Acredita-se que essas diferenças sejam decorrentes do fato da amilopectina encontrar-se enovelada em solução e este enovelamento iria envolver interações não-

polares, com isto, os grupos hidroxilas da amilopectina ficariam expostos a uma melhor coordenação com cátions metálicos. Outra possibilidade é o fato dos grânulos do amido poderem ser penetrados pelos ânions.<sup>195</sup>

A Tabela XII revelou que a diminuição da condutividade da solução de sal depois da adição de amilopectina na complexação destes polissacarídeos com os cátions é bastante aleatória. Portanto, pode ser provável que o envelhecimento da amilopectina leva a conformações em que os grupos de hidroxila nos locais de coordenação sejam potenciais ligantes envolvidos na formação das ligações de hidrogênio e/ou estejam escondidos dentro de macroestruturas.

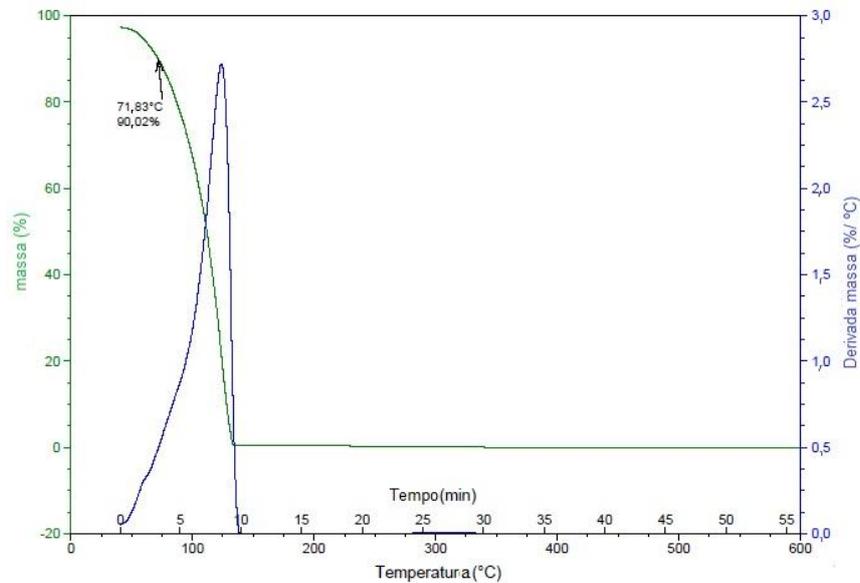
Além da coordenação, as alterações na condutividade das soluções podem resultar de interações entre o grupo (-OH) ou (-O) e ânions. Segundo Ciesielski & Tomasik<sup>29</sup>, os cátions Cu (II), Fe (III), Mn (II), e Ni (II) complexam a amilose e a amilopectina segundo os resultados das medidas de condutividade, o estudo mostrou que a amilopectina complexa com sais metálicos, e os ânions acetatos formam complexos de maior extensão, devido a não penetração na esfera interna do complexo, em comparação com os nitratos e cloretos, o que coincidem com os resultados obtidos no presente trabalho. Todos os valores de condutividade expressos na Tabela XII foram subtraídos do valor de condutividade do solvente puro (no caso das soluções salinas) e da amilopectina pura em solução (no caso dos complexos).

## 6.9. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) tem sido utilizada frequentemente no estudo da estabilidade térmica e da decomposição de polímeros, sendo ambas as propriedades importantes do ponto de vista científico e industrial.<sup>149</sup> A técnica examina a mudança de massa da amostra em função da temperatura ou do tempo, enquanto é submetida a uma programação controlada de aquecimento. A curva de termogravimetria derivada (DTG) é um recurso matemático que representa a derivada da primeira curva, que apresenta o pico máximo de temperatura de degradação e a área desse pico é proporcional à perda de massa naquele evento térmico.<sup>149, 150</sup>

Para a solução de amilopectina tratada (ApT) (Figura 39), na temperatura de 71,83 °C a perda de massa foi de 90,02 %. Observa-se que a perda de massa ocorreu em uma única etapa, na faixa de temperatura de 71 a 120 °C e está relacionado à saída de água da

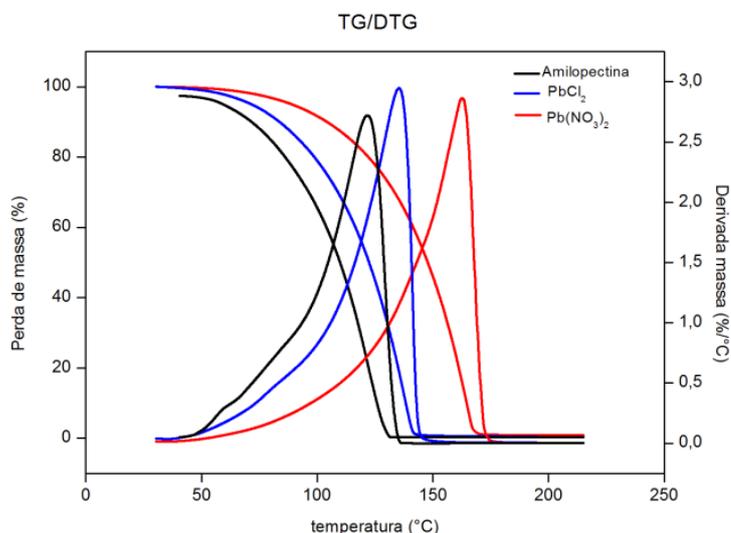
amostra, uma vez que as cadeias de glicose que constituem o biopolímero são interligadas e enoveladas sobre si mesmas e apresentam diferentes graus de hidratação, assim como a decomposição inicial de matéria orgânica remanescente do material, não havendo decomposição de material residual.



**Figura 39:** Resultado da TGA para a solução de amilopectina tratada (ApT).

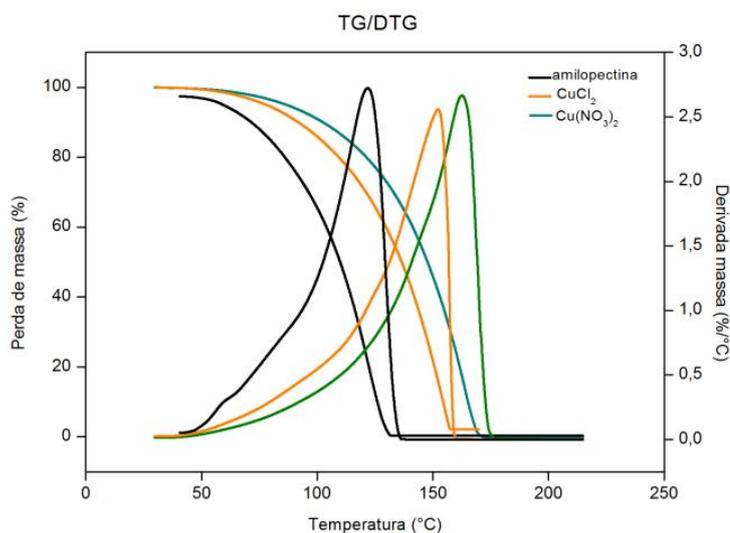
A comprovação da coordenação da amilopectina com os íons metálicos pode ser expressa pelas diferenças na decomposição térmica entre a amilopectina pura e complexada com metais. Os gráficos de DTG revelam que os picos de decomposição térmica de todos os complexos ocorrem em temperatura maior que aquela encontrada para a amilopectina pura.

As curva TG/DTG da amilopectina e seus complexos de  $Pb^{+2}$  mostram que as substâncias são termicamente estáveis até aproximadamente 40 °C. A partir dessa temperatura, houve a perda de massa em uma única etapa. Este evento corresponde à degradação do material (Figura 40).



**Figura 40:** Representação do pico máximo de degradação da amilopectina e dos complexos de  $Pb^{+2}$  através da primeira derivada termogravimétrica.

O mesmo efeito observa-se com os complexos de  $Cu^{+2}$  que, na presença de  $Cl^-$ , resultaram na perda de massa de 95,77 % na curva TG e  $T_{pico}$  DTG de 149,39 °C (temperatura em que a taxa de perda de massa foi maior). Para o nitrato de cobre, a perda de massa foi de 97,43 % na curva TG e  $T_{pico}$  DTG em 162,47 °C (Figuras 41). A Tabela XII mostra os valores de degradação para os complexos.



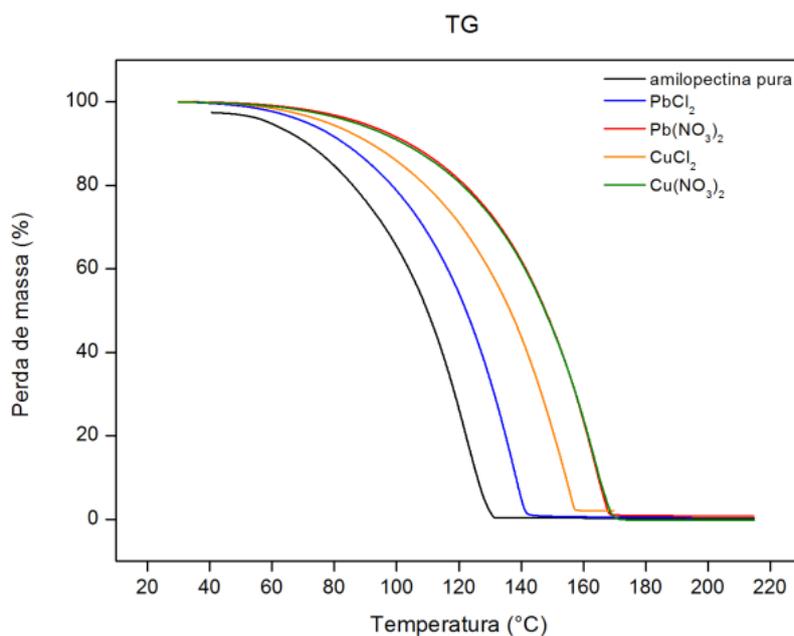
**Figura 41:** Representação do pico máximo de degradação da amilopectina e dos complexos de  $Cu^{+2}$  através da primeira derivada termogravimétrica.

**Tabela XII:** Resultados das análises de TG/DTG

	$T_{\text{máx}}$ (degradação) (°C)
<b>Amilopectina</b>	123,81
<b>PbCl<sub>2</sub></b>	132,32
<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	162,66
<b>CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	149,39
<b>Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O</b>	162,47

O efeito do contra-íon na complexação da amilopectina com sais compostos pelo mesmo metal apresenta diferenças quanto à temperatura de decomposição térmica. Uma tendência dependente do contra-íon (ânion) é facilmente observada (Figura 42) nas curvas de perda de massa em função da temperatura, onde os complexos que possuem o ânion nitrato em sua composição adquirem estabilidade térmica adicional.

Estudos similares<sup>196, 197, 198</sup> sobre o efeito dos contra-íons sugerem a formação de ligações de hidrogênio entre os ânions nitrato e moléculas de água. Aqui, acredita-se que essas ligações de hidrogênio são formadas entre os ânions nitrato e as hidroxilas que compõem as unidades glicosídicas da amilopectina, atribuindo resistência térmica a esses complexos.

**Figura 42:** Perda de massa em função da temperatura para a amilopectina e seus complexos.

O que mais uma vez comprova que os complexos de sais de nitrato possuem uma estabilidade maior, devido provavelmente às ligações de hidrogênio e compactação das cadeias poliméricas. Além de uma média de complexação maior comparada com os demais sais estudados, o estudo da viscosidade aparente mostrou que sais de nitrato possuem uma estabilidade maior, pois apresentam uma viscosidade mais próxima da solução tratada.

## 6.10. ANÁLISE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

As análises do espectro no UV-Vis permitem reconhecer quais são as bandas de transição, verificar suas modificações de acordo com as espécies complexadas vai sendo formadas ou desfeitas. Além de informar em especial no caso dos metais de transição sobre a coordenação destes metais, uma vez que a absorção na região do ultravioleta e do visível é quantizada, também informam a dependência da estrutura eletrônica analisada. Através desta técnica podem ser obtidos dados comparativos relacionados com o ligante puro e na presença dos íons metálicos, têm a finalidade de identificar as transições específicas referentes aos complexos formados<sup>199</sup>

Assim, a espectroscopia de UV-Vis possibilitou a visualização dos picos característicos de absorção dos metais estudados antes e após a complexação. Na Tabela XIII, a coordenação de íons metálicos causa um deslocamento no comprimento de onda de absorção e/ou diminuição da intensidade da banda.<sup>17,48</sup>

Além disso, para alguns metais observa-se mais de um pico de absorção, devido à configuração dos orbitais *d*. De acordo com a literatura<sup>186</sup> metais com configuração  $d^1$ ,  $d^4$ ,  $d^5$ ,  $d^6$  e  $d^9$  apresentam apenas uma banda de absorção, como verificado para os complexos de  $Fe^{3+}(d^5)$  e  $Cu^{2+}(d^9)$ ; aqueles com configuração  $d^2$ ,  $d^3$ ,  $d^7$  e  $d^8$  apresentam três bandas de absorção, sendo a terceira de difícil detecção, confirmado para os complexos de  $Ni^{2+}(d^8)$ ,  $Co^{2+}(d^7)$  e  $Cr^{3+}(d^3)$ . Sugere-se que a segunda banda de absorção nas regiões de comprimento de onda de 410 e 771 nm, aproximadamente, é devido ao fato da reação estar se deslocando para ao equilíbrio químico, devido à labilidade destes metais com o biopolímero, e ao empacotamento das cadeias. Os espectros eletrônicos dos íons metálicos encontram-se no Anexo 4.

**Tabela XIII:** Análise UV-Vis comprimento de onda (nm) e absorvidade molar ( $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ) máxima das soluções salinas puras e dos complexos<sup>a</sup>

Contra-íon	Soluções salinas		Complexos	
	$\lambda_{\text{máx}}$	$\epsilon_{\text{máx}}$	$\lambda_{\text{máx}}$	$\epsilon_{\text{máx}}$
<b>Sais de Fe<sup>3+</sup></b>				
Cloreto	331,2	311,33	330,7	188,67
Nitrato	310,6	415,50	309,9	470,00
<b>Sais de Cu<sup>2+</sup></b>				
Nitrato	860,0	29,39	855,1	32,12
Cloreto	884,9	68,30	884,8	63,19
Acetato	729,1	91,50	717,8	83,50
<b>Sais de Cr<sup>3+</sup></b>				
Acetato (pico 1)	444,7	123,85	442,9	120,00
Acetato (pico 2)	588,8	122,31	588,8	111,54
Nitrato (pico 1)	440,0	19,50	436,5	21,00
Nitrato (pico 2)	619,3	18,00	619,3	17,00
<b>Sais de Ni<sup>2+</sup></b>				
Cloreto (pico 1)	414,9	9,41	413,8	12,65
Cloreto (pico 2)	774,7	3,82	770,8	3,88
Acetato (pico 1)	404,7	12,19	403,2	18,12
Acetato (pico 2)	739,8	5,00	739,8	5,00
<b>Sais de Co<sup>2+</sup></b>				
Cloreto (pico 1)	534,6	15,75	534,1	13,03
Cloreto (pico 2)	669,9	6,97	669,8	3,94

<sup>a</sup> Por não absorver na região visível os complexos contendo o íon  $\text{Pb}^{2+}$  não estão na tabela.

### 6.11. ANÁLISE DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Algumas investigações<sup>18, 29, 30, 28, 34, 152</sup> indicam que a amilopectina tem o extraordinário poder de formar os complexos em H<sub>2</sub>O/DMSO com vários metais. O surgimento de métodos químicos estruturais, tais como espectroscopia de infravermelho como a transformada de Fourier (FTIR), permitiu atribuir a ligação – O – H, caracterizar o metal de coordenação, monitorar a conformação do ligante e/ou alterações de configuração forçados pelos processos de complexação.

A espectroscopia de IR é amplamente utilizada para estudar a composição de um sistema de biopolímeros com metais, a orientação molecular e as interações e transições conformacionais do polissacárideos em solução.<sup>200</sup> Espera-se que a solução de amilopectina tratada (ApT) interaja com os íons metálicos causando perturbações nas bandas, sendo a banda de maior interesse é aquela que caracteriza as ligações –O–H, isto porque se existe a complexação do biopolímero com o metal isto irá causar um deslocamento ou ausência nas bandas, devido à interação do polímero com o íon metálico.

De acordo com a literatura<sup>200, 201</sup> o espectro  $\alpha$ -D-glicose contém as seguintes bandas características (cm<sup>-1</sup>): 3440  $\nu$  (OH), 2928  $\nu$  (CH), 1648  $\delta$  (O-H), 1432  $\delta$  (OH), 1008  $\nu$  (C-O), 929  $\delta$  (C-O-C). As bandas de IR característicos da amilopectina tratada são mostradas na Tabela XIV.

**Tabela XIV:** Bandas características do IR para a amilopectina em solução.

cm <sup>-1</sup>	Atribuição	Intensidade <sup>c</sup>
3430	$\nu$ (OH)	f
3000	$\nu$ (CH)	ff
1654	$\delta$ (OH)	ff
1435	$\delta$ (OH)	m
1017	$\nu$ (CO)	f
932	$\delta$ (C-O-C)	m

f= forte; m= médio; ff= fraco

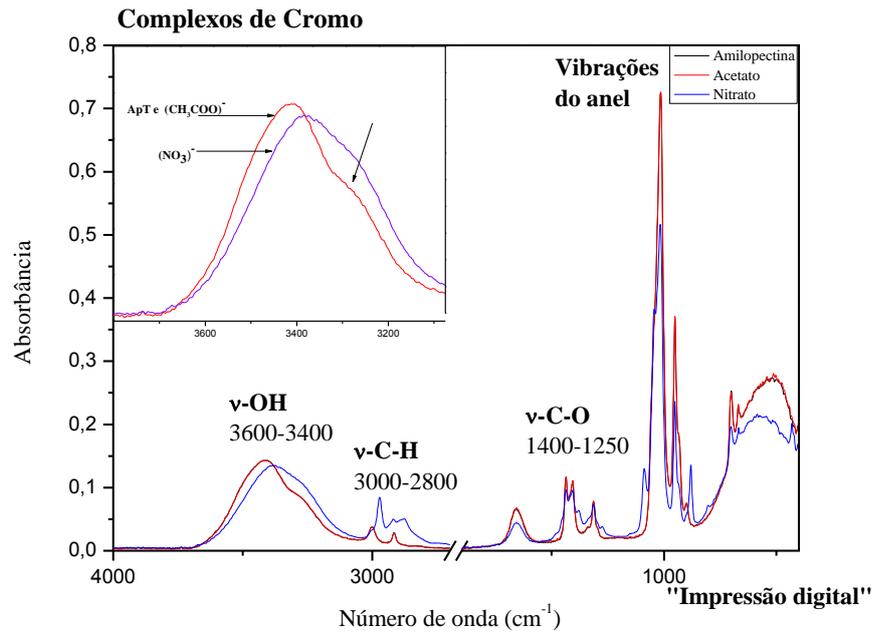
Os dados espectroscópicos de FTIR foram obtidos através do equipamento Bruker Modelo Alpha-P de Módulo de ATR (Refletância Total Atenuada). Os espectros foram obtidos com resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>. Paralelamente foi feito o tratamento dos dados

utilizando a ferramenta estatística i-PCA (análise por componentes principais por intervalo), através do software MATLAB<sup>®</sup> (The Mathworks, Inc.). Similar ao PCA (análise por componentes principais), o i-PCA permite a visualização gráfica de todo o conjunto de dados, mesmo quando o número de amostras e variáveis elevadas.<sup>202</sup>

Observa-se que as bandas na região abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a “impressões digitais” do esqueleto da molécula e no caso a ligação C – O – C no esqueleto. As bandas por volta de  $800 - 900\text{ cm}^{-1}$  características da região anomérica, ou seja, ocorre a distinção entre as configurações  $\alpha$  ou  $\beta$  da molécula. No caso da amilopectina tem-se a configuração  $\alpha$ .<sup>203</sup>

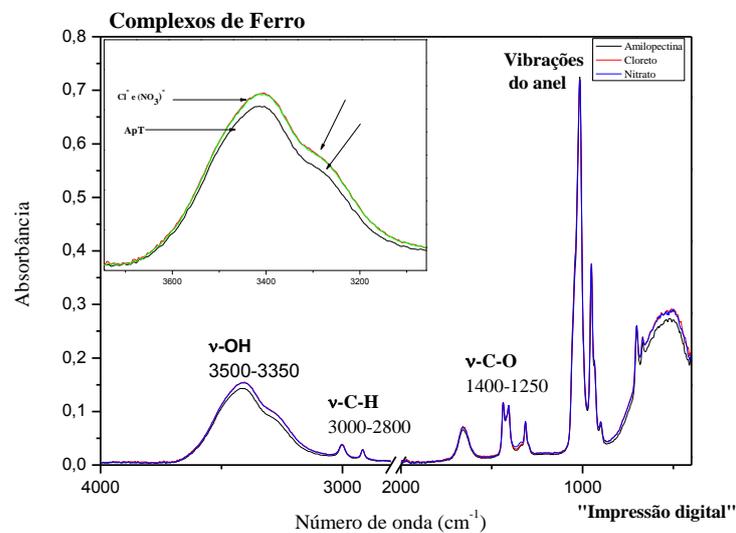
Na região entre  $1000 - 1100\text{ cm}^{-1}$  foram observadas bandas de vibrações do anel de seis átomos (como no monômero de glucose) de estiramento de grupos laterais (C – OH) e por vibrações de ligações glicosídicas C – O – C (éter) dependendo de deformação axial (simétrica ou assimétrica) essas bandas irão se deslocar.<sup>204</sup> Na região entre  $1250-1400\text{ cm}^{-1}$  obtiveram-se bandas atribuídas ao estiramento da ligações C – O, com alguma contribuição do estiramento C – OH. As bandas na região entre  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento da ligação C – H. Em  $3500 - 3330\text{ cm}^{-1}$  foi observada uma banda alargada atribuída ao estiramento assimétrico do grupo O–H do monômero glicosídico, da água presente no solvente e dos grupo complexados ao metal, estando o mesmo relacionado as ligações de hidrogênio.

Na Figura 43, o espectro dos sais de cromo é observado. Nele podemos observar que para este complexo, a banda atribuída ao estiramento da ligação – OH da solução de amilopectina tratada (ApT) ocorre praticamente na mesma região que o sal de acetato ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) e para o sal de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) houve um pequeno deslocamento, podendo ser uma mudança na conformação. Observa-se a formação de uma distorção em  $0,089\text{ nm}$ , no espectro do complexo de ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) e para a solução de ApT. E uma distorção menos exposta em  $0,110\text{ nm}$  para o complexo de ( $\text{NO}_3^-$ ).



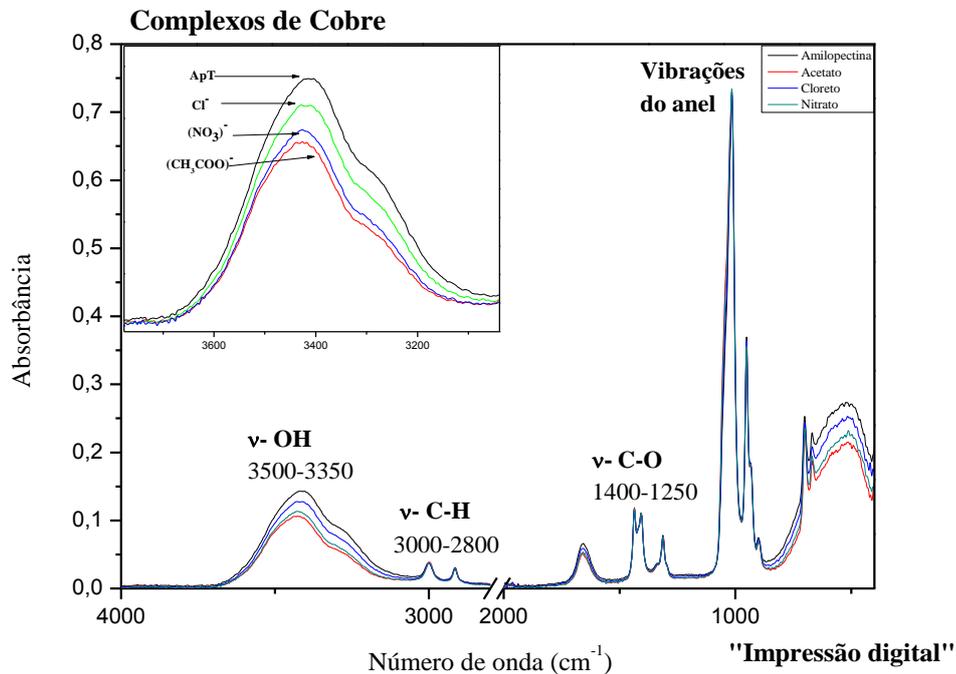
**Figura 43:** Espectros dos complexos de cromo.

Na Figura 44, no espectro dos sais de ferro, observa-se que para o sal de  $\text{Cl}^-$ , tem uma intensidade levemente maior, referente à banda atribuída ao estiramento da ligação  $\text{OH}$ , comparada com o sal de  $(\text{NO}_3)^-$ . Além disso, cabe salientar que é o único complexo onde a banda da solução de ApT é maior. Observa-se a formação de uma distorção em 0,100 nm, no espectro do complexo de  $\text{Cl}^-$  e para o complexo de  $(\text{NO}_3)^-$ . E uma distorção na banda de 0,085 nm para a solução de ApT.



**Figura 44:** Espectros dos complexos de ferro.

Na Figura 45, no espectro dos sais de cobre, observa-se que ocorre uma diminuição das bandas, referentes ao estiramento da ligação – OH, a maior intensidade é para a solução de ApT, havendo um decréscimo desta banda para o sal de  $\text{Cl}^-$ , seguida dos sais de  $(\text{NO}_3)^-$  e  $(\text{CH}_3\text{COO})^-$ . Observa-se a formação de uma distorção em 0,085 nm para a solução ApT, em 0,078 nm para o complexo de  $\text{Cl}^-$ , em 0,065 para o complexo de  $(\text{NO}_3)^-$  e em 0,056 nm para o complexo de  $(\text{CH}_3\text{COO})^-$ .



**Figura 45:** Espectros dos complexos de cobre.

Na Figura 46, no espectro dos sais de chumbo, observa-se que o sal de  $\text{Cl}^-$ , tem uma intensidade levemente maior, referente à banda atribuída ao estiramento da ligação – OH, comparada com o sal de  $(\text{CH}_3\text{COO})^-$  e  $(\text{NO}_3)^-$ . Evidencia-se a formação de uma distorção em 0,086 nm para a solução ApT, em 0,070 nm para o complexo de  $\text{Cl}^-$ , em 0,060 nm para o complexo de  $(\text{CH}_3\text{COO})^-$  e em 0,054 nm para o complexo de  $(\text{NO}_3)^-$ .

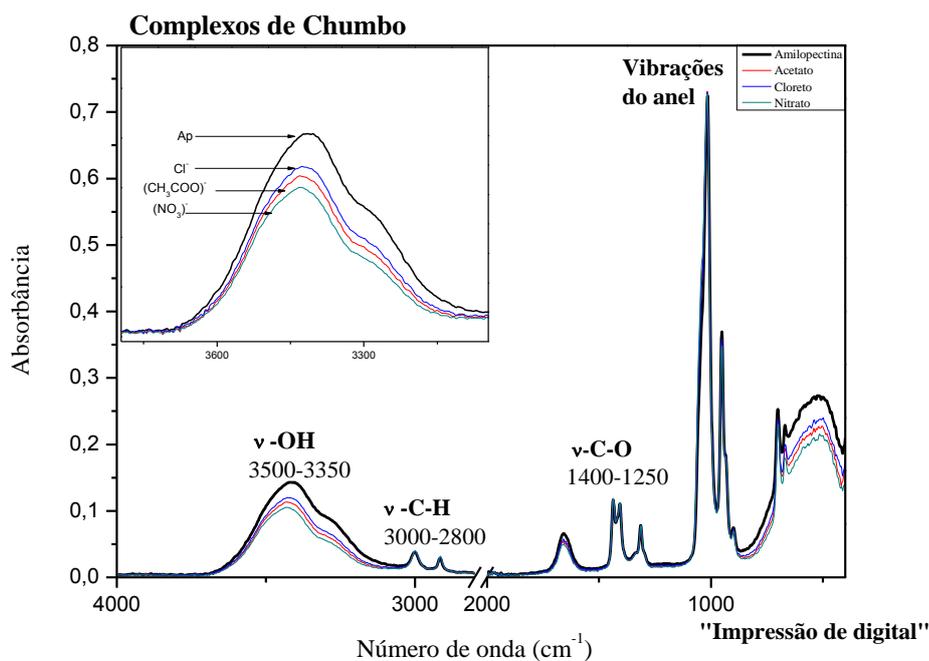


Figura 46: Espectros dos complexos de chumbo.

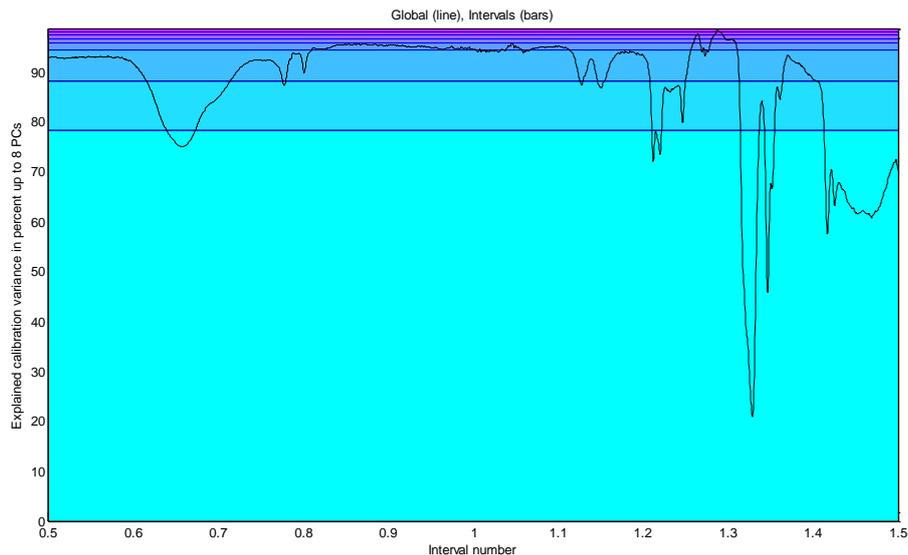
Os espectros de infravermelho de todas as amostras são muito similares, o que sugere que em todos os casos há a coordenação da amilopectina ao metal, formando um quelato ou complexo. Há grande concordância entre as bandas da solução de amilopectina e seus complexos. Havendo apenas um pequeno deslocamento para os sais de cromo. Dessa maneira pode-se concluir que a estrutura da amilopectina não induz mudanças no seu espectro de infravermelho comparado com suas complexações, ou seja, não houve mudanças estruturais e sim conformacionais, com pequenas mudanças na intensidade.

Observou-se ao longo das análises a formação de uma distorção na região entre  $3500 - 3330 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da ligação  $-OH$ , das ligações de hidrogênio intermolecular.

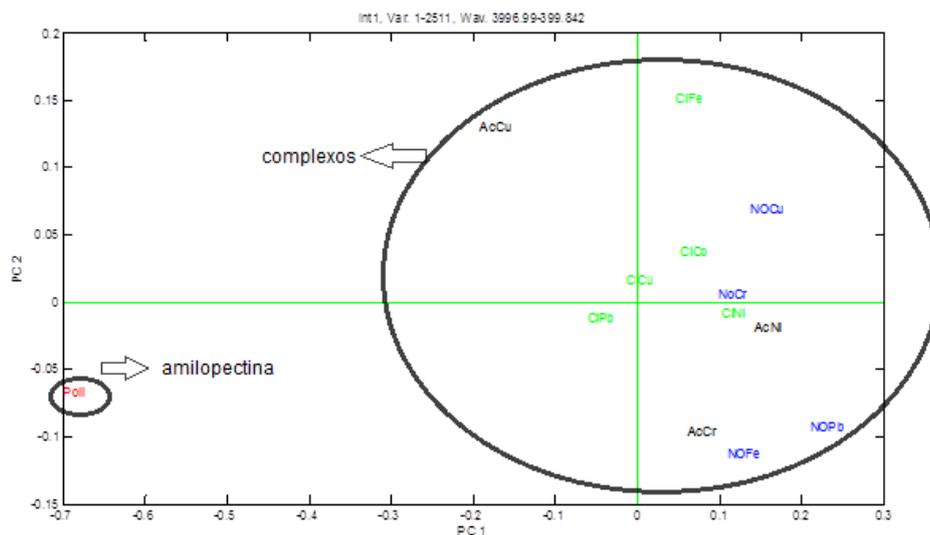
### 6.11.1 Tratamento dos dados utilizando a ferramenta estatística i-PCA

A ferramenta estatística i-PCA (análise por componentes principais por intervalo), realizado através do software MATLAB<sup>®</sup> (The Mathworks, Inc.) permite a visualização gráfica de todo o conjunto de dados, mesmo quando o número de amostras e variáveis é elevado.<sup>202</sup> O uso dessa técnica estatística tem como objetivo principal aumentar a compreensão do conjunto de dados, examinando a presença ou a ausência de similaridades entre as amostras. A vantagem do i-PCA na comparação de dados espectrais é a possibilidade de avaliar o conjunto de dados em intervalos específicos ( $i= 1, 4, 8, 16$ , etc), podendo limitar qual a faixa (no caso, números de onda) que se deseja estudar.

Para facilitar a discussão de resultados<sup>180</sup>, foi utilizado a ferramenta estatística de separação por similaridade, i-PCA. As Figuras 47 e 48 apresentam o espectro completo ( $i= 1$ ) e o i-PCA respectivamente; esse modelo não foi considerado adequado, visto que não há como distinguir em quais bandas do intervalo espectral a distinção entre o polímero de amilopectina em solução (ApT) e os complexos são vistos, mesmo que a separação seja nítida.

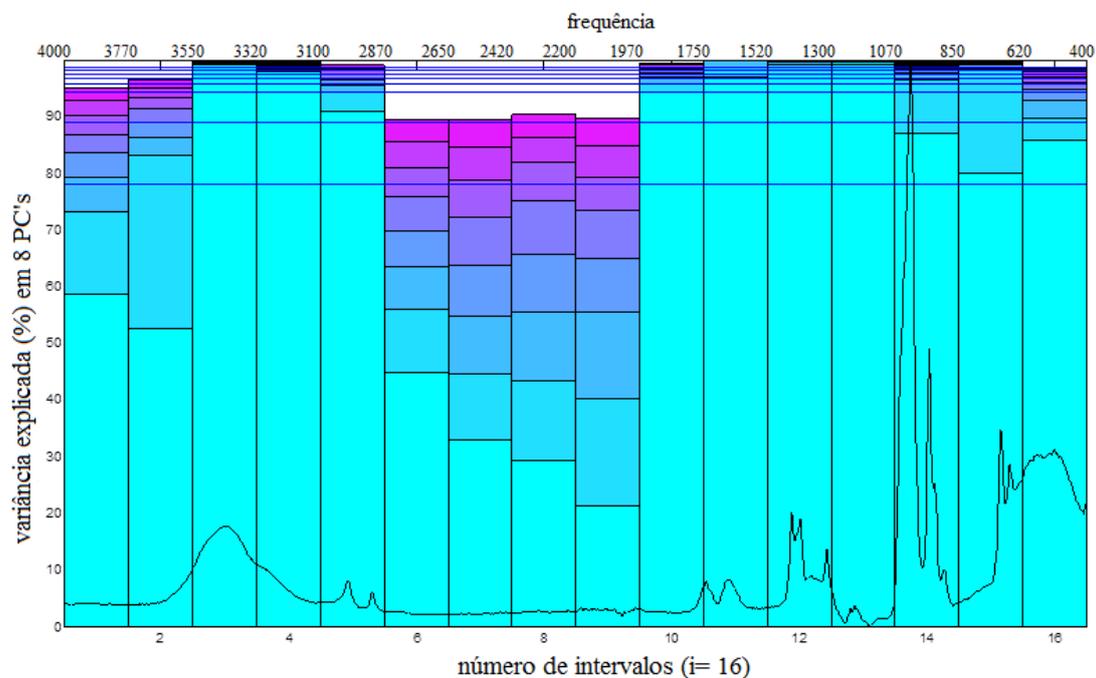


**Figura 47:** Número de CP's (componentes principais) x intervalo de avaliação ( $i=1$ )



**Figura 48:** CP1 x CP2 do polímero e seus complexos em todo intervalo espectral (3995,99 – 399,84  $\text{cm}^{-1}$ ).

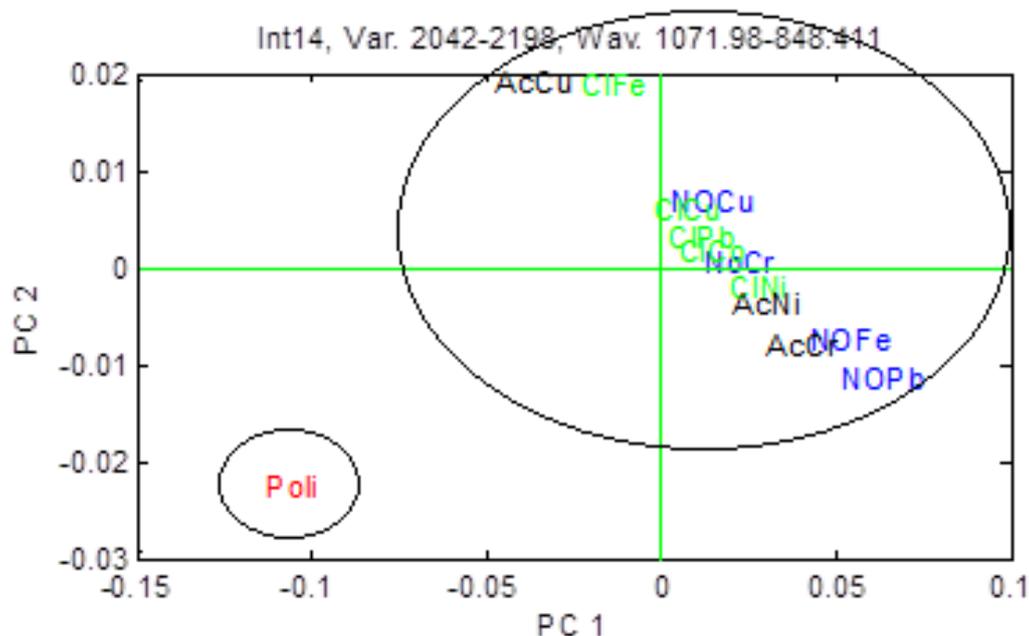
Visto isso, o modelo de i-PCA foi dividido em 16 intervalos ( $i=16$ ), mostrando-se mais adequado para o melhor detalhamento das diferenças observadas nos espectros (Figura 49).



**Figura 49:** Número de CP's x intervalo de avaliação ( $i=16$ ).

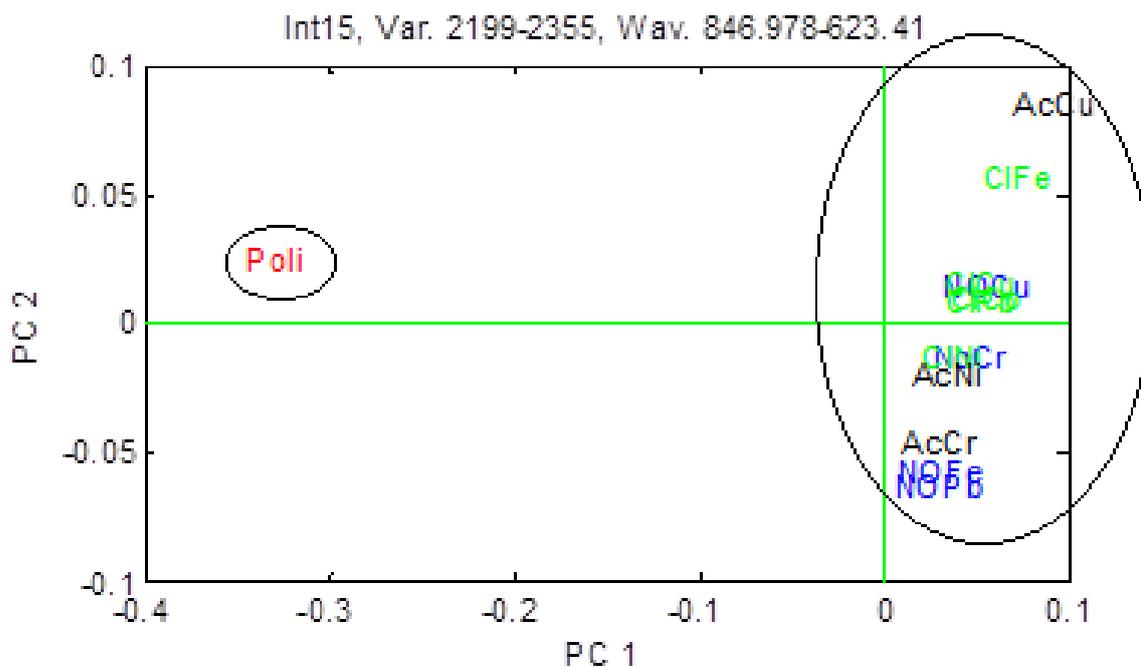
De acordo com a Figura 49, constata-se que os intervalos de 6 – 10 necessitam de um número elevado de CP's para expressar a variância explicada, devido ao excesso de ruído e de pouca representatividade do intervalo completo.





**Figura 51:** CP1xCP2 do polímero e seus complexos no intervalo 14 de 1071,98–848,41  $\text{cm}^{-1}$ .

No intervalo 15, região que compreende o intervalo 846 – 623  $\text{cm}^{-1}$ , nota-se outra distinção, devido ao surgimento da ligação M - O (Figura 52).<sup>205</sup>



**Figura 52:** CP1 x CP2 do polímero e seus complexos no intervalo 15 de 846,98–623,41  $\text{cm}^{-1}$ .

O uso dessa técnica estatística proporcionou uma melhor compreensão do conjunto de dados, extraídos do FTIR. Fica evidente que houve a formação de complexos através da desprotonação do grupo hidróxila do polímero e também através da interação com o metal complexado, através da ferramenta estatística i-PCA (análise por componentes principais por intervalo).

## 6.12. ANÁLISE DA SOLUÇÃO ApT ATRAVÉS DO ESPALHAMENTO DE LUZ

As medidas de espalhamento permitiram a determinação das intensidades da luz espalhada ( $I$ ) juntamente com a avaliação de tamanho, forma e o índice de polidispersão ( $PD.I$ ) da amilopectina e dos complexos formados. Diferentes resultados foram encontrados de acordo com a concentração de amilopectina, bem como do metal complexado.

O Espalhamento de Luz Estático, através do método de Zimm,<sup>208</sup> foi utilizado para caracterização da amilopectina em solução (ApT). As concentrações variaram entre 0,1 e 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 °C.

Para a obtenção do gráfico de Zimm, a intensidade foi medida à temperatura de 20 °C em intervalos angulares de 10° entre os ângulos de 35° e 135° para cada amostra. O tolueno foi usado como padrão para determinação da razão de Rayleigh. Para o cálculo da constante óptica  $K$ , o incremento no índice de refração em função da concentração foi obtido refratometricamente (Brookhaven Instruments BI-DNDCW) para as mesmas concentrações a 620 nm com  $dn/dc = 0,074 \text{ mL.g}^{-1}$  à temperatura de 20 °C.

Através da relação de Zimm os valores da  $M_w$ ,  $A_2$  e  $R_g$  foram determinados a partir do SLS para a solução de amilopectina. A massa molecular obtida foi de  $5,61 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  (com erro associado de  $\pm 1,9 \%$  para ambas as extrapolações - concentração e dependência angular) e com raio de giro de  $60,0 \pm 3,1 \text{ nm}$ . Com este valores pode-se concluir que o tratamento ultrassônico foi bem sucedido, pois houve uma redução na massa molecular. Na literatura os valores encontrados variam entre  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^9 \text{ g.mol}^{-1}$ .<sup>54, 209, 210</sup>

Além da análise de Zimm, foi feita a análise do raio de giro pelo método da dissimetria angular, sendo o valor do raio de giro obtido de 108,68 nm. Este último valor é considerado mais correto pois a metodologia de Guinier utilizado no gráfico de Zimm pressupõe que a partícula tenha uma dimensão em torno de 50 nm ( $q \cdot R_g \ll 1$ ), enquanto que o método da dissimetria angular pressupõe que a partícula possua dimensão maior, em torno de 100 nm ( $q \cdot R_g < 1$ ), o que é mais próximo do tamanho as partículas aqui estudadas.

O segundo coeficiente virial é um parâmetro que avalia a qualidade do solvente para o polímero em solução e está relacionado à interação entre soluto e solvente, quanto maior o seu valor, maior será essa interação. O valor encontrado foi de  $1,33 \pm 0,86 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol.g}^{-2}$ , sendo que o valor positivo significa que temos um bom solvente para o polímero em estudo, havendo pouca ou nenhuma formação de agregados e precipitados.

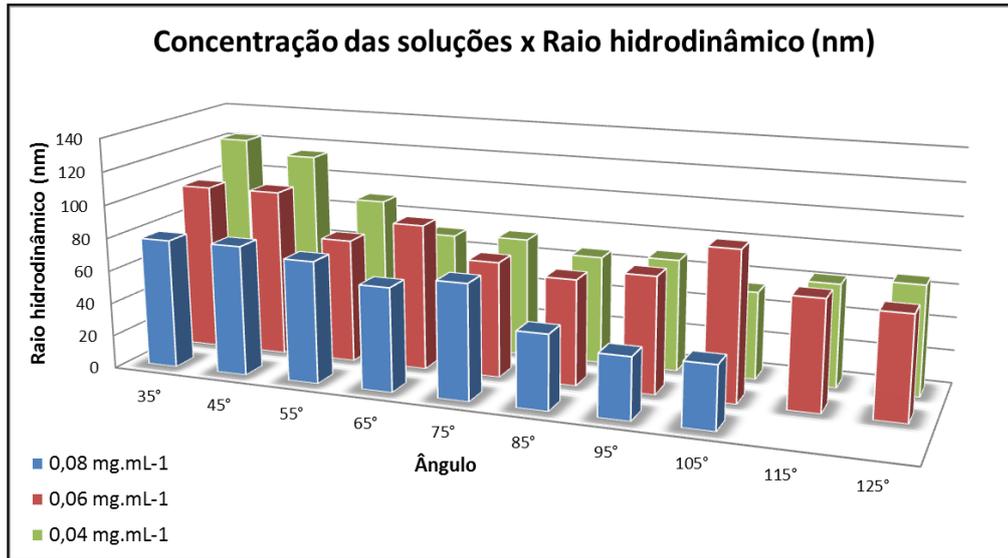
Neste caso as dimensões de cadeia são somente dependentes dos comprimentos de ligação e ângulos de ligação da macromolécula.

Em contrapartida, análises pelo método de Berry também foram realizadas, modelo bastante utilizado para polímeros de cadeias ramificadas,<sup>128</sup> os valores da  $M_w$ ,  $A_2$  e  $R_g$  foram determinados a partir do SLS para a solução de amilopectina tratada. A  $M_w$  obtida foi de  $9,9 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$  (com erro associado de  $\pm 1,6 \%$  para ambas as extrapolações - concentração e dependência angular), com  $R_g$  de  $100,0 \pm 1,6 \text{ nm}$  e o valor do  $A_2$  foi de  $9,9 \pm 0,54 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol.g}^{-2}$ .

Embora os resultados pelo método de Zimm seja usualmente utilizado em muitos trabalhos com amidos, acredita-se que o resultado obtido pelo gráfico de Berry mostra-se mais apropriado, pois a amilopectina possui elevadas ramificações, e com isto, podemos esperar que o perfil de densidade dos segmentos se aproxime de uma esfera com duas diferenças essenciais, a primeira são as cadeias exteriores oscilando em torno da cadeia principal e a segunda, são cadeias flexíveis e não rígidas, o que facilitaria na complexação com os sais metálicos utilizados neste trabalho. Considerando assim a cadeia polimérica como uma cadeia “macia”.<sup>128</sup> Além do  $R_g$  assemelhar-se ao obtido pelo método da dissimetria (108,68 nm), como já discutido anteriormente.

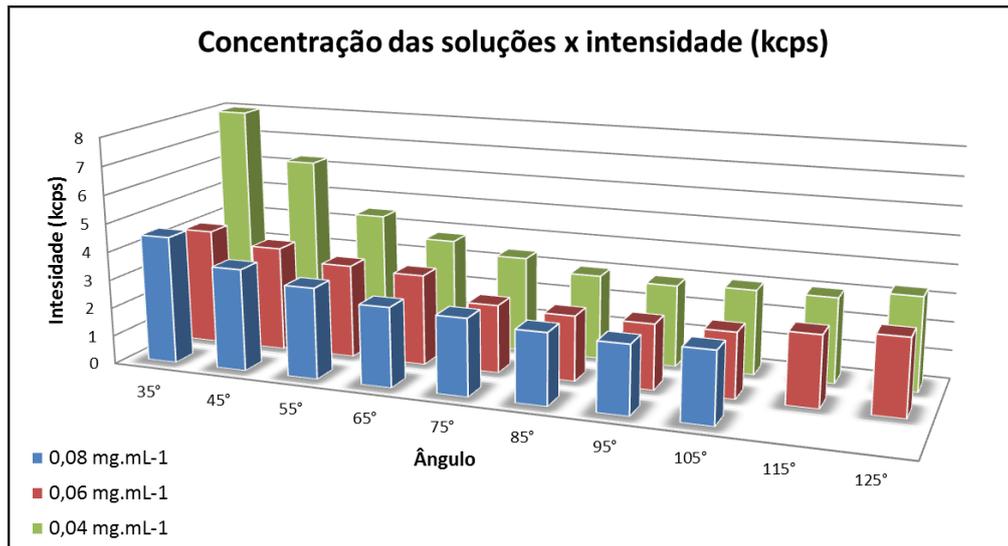
No estudo para determinar o tamanho real da amilopectina, através do  $R_h \times q$ , foram usadas as concentrações 0,04, 0,06 e 0,08  $\text{mg.L}^{-1}$ . Extrapolando-se estes valores de concentração para concentração zero (diluição infinita) obteve-se o valor de raio hidrodinâmico igual a 202,89 nm.

De acordo com Figura 53 observa-se que o raio hidrodinâmico aumentou, com o decréscimo da concentração para os ângulos baixos e manteve-se praticamente o mesmo para os demais ângulos.



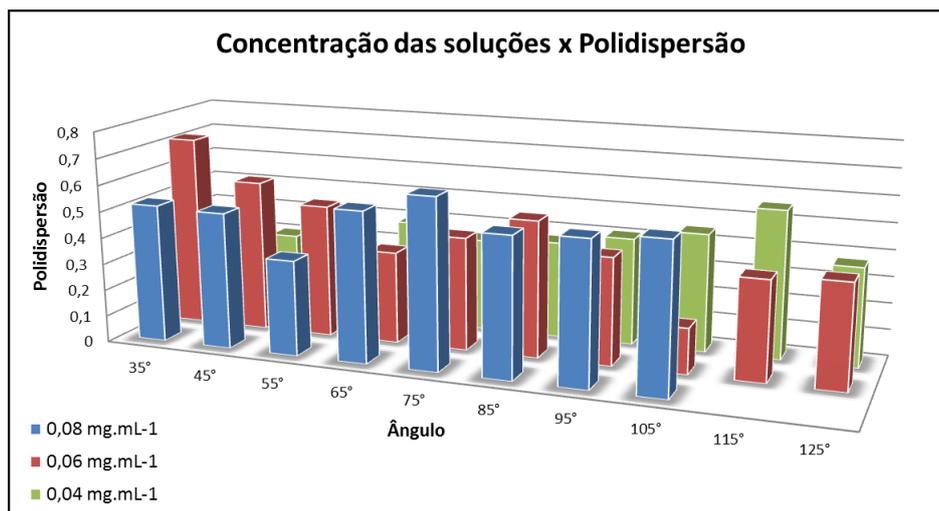
**Figura 53:** Relação da concentração da solução de amilopectina em função do raio hidrodinâmico (nm) para diversos ângulos.

O mesmo pode ser observado na Figura 54, onde a intensidade de luz emitida foi maior para as soluções de amilopectina mais diluídas, para baixos ângulos, mantendo-se praticamente a mesma para os demais ângulos.



**Figura 54:** Relação da concentração das soluções em função da intensidade (Kcps) para diferentes ângulos.

De acordo com a Figura 55, observa-se que a polidispersão aumentou com o aumento da concentração.



**Figura 55:** Relação da concentração das soluções em função da  $PD.I$  para os diferentes ângulos.

Combinando-se os resultados de espalhamento de luz estático e dinâmico através do cálculo do parâmetro sensitivo (equação 52), o valor obtido para a amostra de solução tratada é de  $\rho = 0,72$  demonstra, de acordo com a Tabela II (pág. 54), que a amilopectina em solução encontra-se como uma esfera rígida homogênea, mas devido a dinâmica interna (entrelaçamento e mobilidade) com os movimentos entre as cadeias que podem se estender ou contrair com a complexação, acredita-se que ele se encontre como uma esfera não rígida. O mesmo pode ainda ser mostrado, a partir da  $c^*$ ,  $0,795 \text{ mg.mL}^{-1}$ , sendo que ela é menor que a concentração da solução de amilopectina, e neste regime a solução é chamada semidiluída, neste caso as cadeias encontram-se sobrepostas e se entrelaçam, com a mobilidade extremamente reduzida se comparada com as soluções diluídas, como o esperado, pelo fato da amilopectina ser um polímero altamente ramificado.

Para um estudo mais detalhado da solução tratada, de concentração inicial de  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ , usou-se então  $1 \text{ mL}$  desta solução dissolvida em  $5 \text{ mL}$  ( $0,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) do solvente, com a qual foi determinada a dimensão fractal do polímero em solução. Devido à complexidade da amilopectina a dimensão fractal proporciona uma melhor informação sobre a forma que se encontra a amilopectina em solução e o grau de complexidade da estrutura macromolecular no meio solvente. Através da análise de Espalhamento de Luz, podemos observar que a solução de amilopectina possui uma dimensão fractal ( $df$ ) de  $1,690$ , o que de acordo com a Tabela I (pág. 49) indica que ela se encontra como um objeto 2D com superfície fractal em solução. Isto é esperado, uma vez que a amilopectina é um polímero ramificado. Abaixo segue o fluxograma (Figura 56) dos resultados obtidos para a solução de amilopectina tratada.

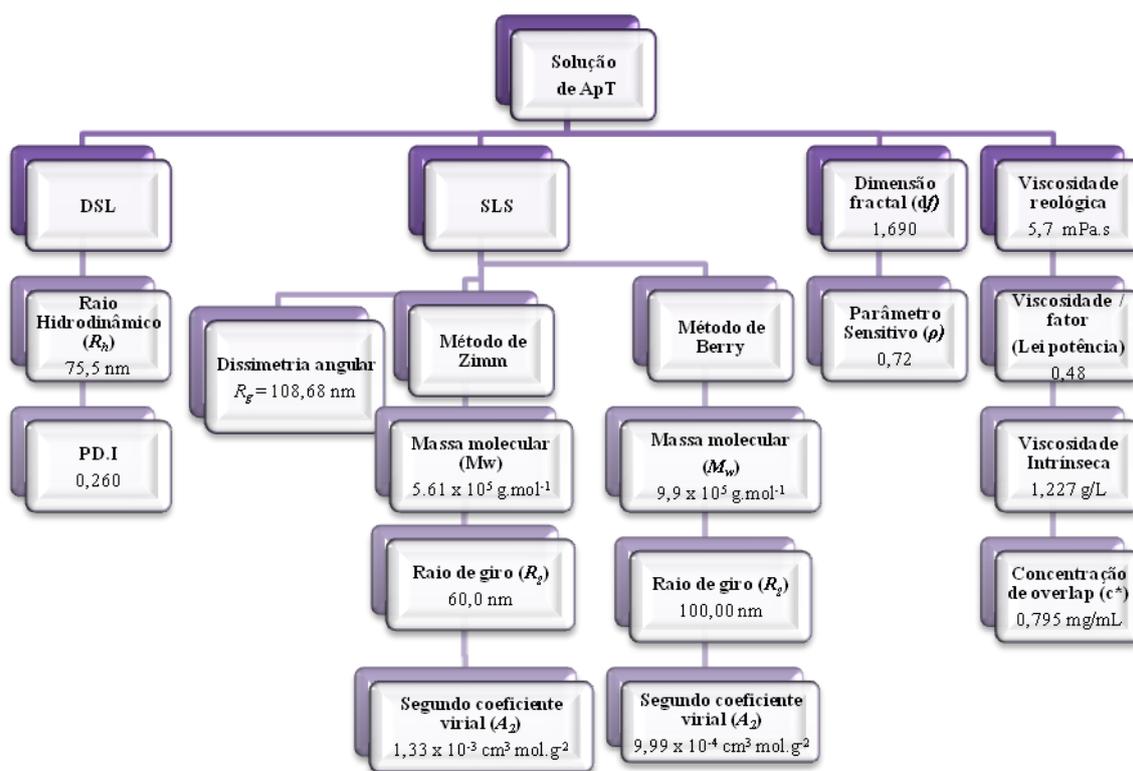


Figura 56: Fluxograma com os valores obtidos para a solução tratada de amilopectina.

### 6.12.1. Análise dos complexos formados quanto às dimensões através da técnica de espalhamento de luz

Para o preparo dos complexos usou-se a menor concentração para se obter um valor de intensidade adequado. Para a maioria dos complexos usou-se de 8 a 12 gotas do complexo formado (item 6.2) na solução de amilopectina (ApT) cuja concentração foi de  $0,66 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Na tabela XV, encontram-se os resultados obtidos quanto ao  $R_h$ ,  $R_g$ ,  $d_f$  e  $\rho$ , para todos os complexos formados.

**Tabela XV:** Valores obtidos dos complexos metálicos formados com a amilopectina da solução ApT.

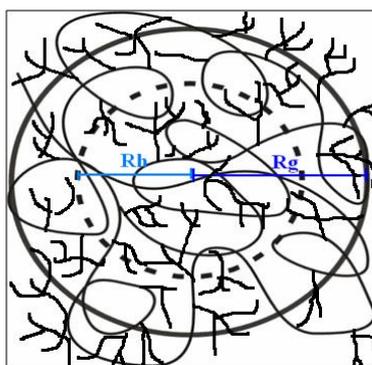
	$R_h$ (nm)	$R_g$ (nm) Dissimetria	Dimensão fractal ( $d_f$ ) ( $\log I \times \log q$ )	Parâmetro sensetivo ( $\rho$ ) $R_g/R_h$
<b>Solução de Amilopectina</b>	<b>151,0</b>	<b>108,68</b>	<b>1,7</b>	<b>0,72</b>
<b>Cr(CH<sub>3</sub>COO)<sub>3</sub></b>	196,3	64,6	1,2	0,33
<b>Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	206,7	91,3	1,1	0,44
<b>Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	491,8	100,1	2,4	0,20
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	487,2	106,5	2,2	0,22
<b>Cu (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub></b>	> 1000	177,5	2,7	0,16
<b>Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	207,5	36,5	1,1	0,17
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	242,7	36,8	1,3	0,15
<b>Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub></b>	400,9	78,2	1,6	0,19
<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	232,1	62,8	1,4	0,27
<b>PbCl<sub>2</sub></b>	279,1	43,2	1,3	0,15

Como discutido a dimensão das partículas, dada pelo  $R_h$ , está relacionada com as interações dinâmicas entre as partículas em suspensão e o solvente, a uma dada temperatura.<sup>137</sup> Fica evidenciado, que para todos dos complexos formados houve um aumento do  $R_h$ , comparando-se com a solução de amilopectina na ausência de metal. Este resultado evidencia a presença do íon metálico complexado com a amilopectina, mudando o tamanho e a forma do complexo formado. O que vai ao encontro dos resultados obtidos na viscosidade (item 6.4.3). A inserção do íon metálico da cadeia polimérica modifica a forma e a viscosidade da solução Ap devido ao aumento da massa molecular da solução Ap, ao empacotamento das cadeias poliméricas e a interação do íon metálico com as cadeias do polímero.

Fisicamente, o  $R_g$  é a medida das médias dos raios da estrutura a partir do seu centro de massa. Para uma cadeia polimérica isso significa a média das distâncias de cada um dos segmentos da cadeia ao seu centro de massa. O  $R_g$  da amilopectina foi determinado através do método de dissimetria angular. Observou-se que houve uma redução

significativa do  $R_g$  dos complexos, quando comparado com os valores obtidos para a solução de amilopectina na ausência de metal. Os valores de  $R_g$  são menores do que os valores de  $R_h$ . Isto pode se deve ao fato da macromolécula estar mais rígida ou “endurecida”, devido ao entrelaçamento e às interações das cadeias do polímero com o metal. Outro fator que pode ser analisado é a interação do contra-íon do sal metálico com a amilopectina em solução, como discutido anteriormente em outros resultados. As interações inter e intramoleculares (metal-polímero-solvente) forma geometrias diferentes para cada complexo, pelo fato, provavelmente, de completarem a esfera de coordenação interna e externa do metal.

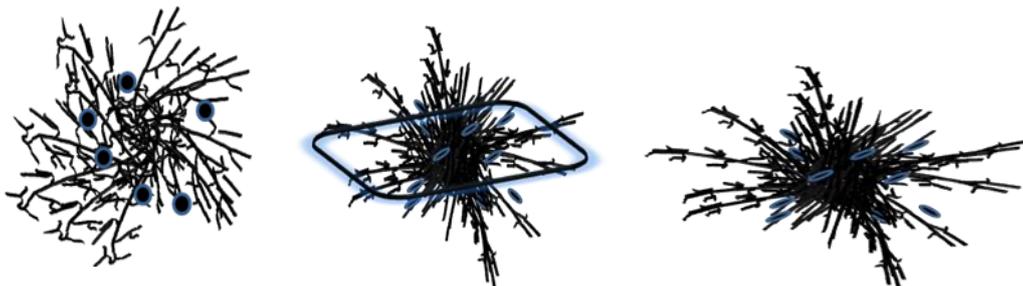
Para a maioria dos casos, quanto maior for a eletronegatividade do metal e maior o tamanho do contra-íon, maior será a rigidez da macromolécula em solução. Pode-se mencionar os efeitos da atração entre a macromolécula e o íon metálico e sobre os mecanismos de contração da estrutura macromolecular que é ramificada, em solução. A Figura 57 ilustra de forma comparativa os dois tipos de raios obtidos pelas técnicas de espalhamento de luz.



**Figura 57:** Comparação entre o Raio de giro ( $R_g$ ) e Raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) de um segmento da cadeia polimérica de amilopectina com a cadeia entrelaçada.

A redução da  $d_f$  seria outro fator que poderia ser explicado devido a eletronegatividade do metal e do contra-íon ou o modo de interpenetração na amilopectina com os mesmos, alterando a topologia de cada complexo em estudo. Acredita-se que a solução de amilopectina ao ser complexada, pode passar da forma de uma esfera não homogênea para uma forma mais próxima de um bastão, devido a uma maior compactação das ramificações do polímero pela presença do íon metálico. A viscosidade, discutida anteriormente, reflete esta ideia, pois a mesma diminui para todos os complexos metálicos, quando se compara os dados da macromolécula na presença do íon metálico e na ausência

do mesmo. A Figura 58 ilustra os diferentes formatos hipotéticos em que o complexo poderia ser encontrado.



**Figura 58:** Forma que o novelo polimérico poderia ser encontrado com o metal.

O parâmetro sensitivo de forma  $\rho$  é um parâmetro adimensional que conduz a uma importante indicação da topologia das partículas espalhantes em uma solução. Podemos argumentar que neste estudo, para todos os complexos metálicos formados com a solução de amilopectina, houve uma redução nos valores do parâmetro sensitivo de  $\rho$  para os complexos, quando comparados aos valores obtidos para a solução polimérica na ausência do íon metálico. A redução dos valores do parâmetro sensitivo  $\rho$ , indica a evolução de uma topologia em 2D ou 3D, correspondendo a uma estrutura do tipo bastão.

### 6.13. MONITORAMENTO CONTÍNUO *ON-LINE* DA MODIFICAÇÃO DE BIOPOLÍMERO RAMIFICADO E PREPARAÇÃO DE SEUS COMPLEXOS METÁLICOS

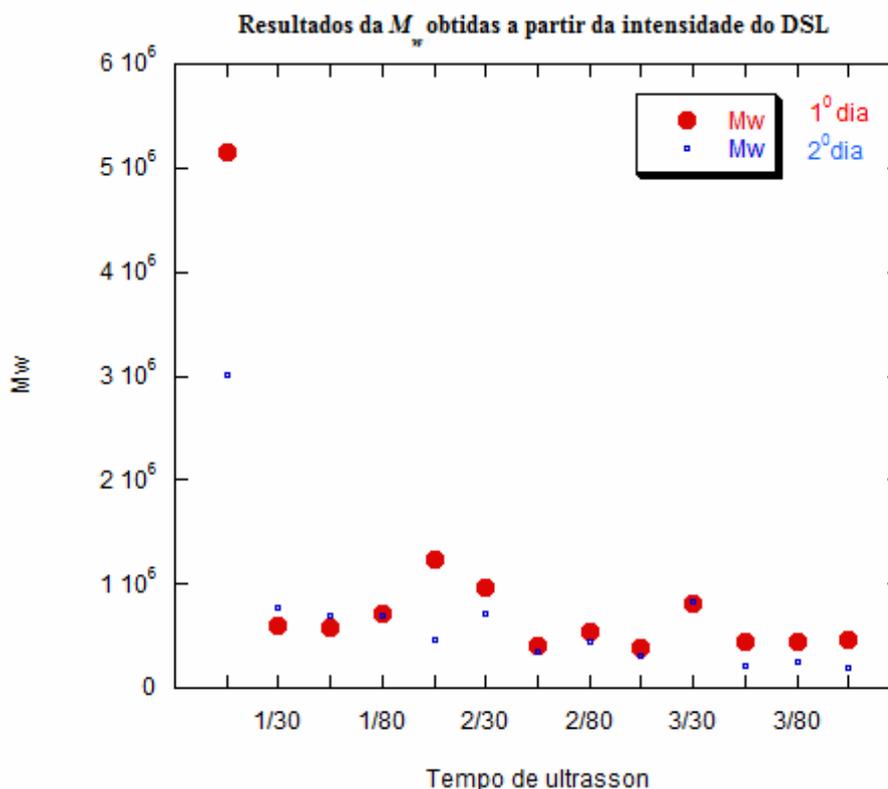
O objetivo principal do Doutorado Sanduiche foi complementar a seqüência de estudos já realizados no projeto de Tese de Doutorado, proporcionando o aprimoramento o conhecimento científico relacionado com a técnica de Espalhamento de Luz e com o Monitoramento Contínuo *on-line*, uma vez que não existe na literatura um estudo aprofundado do monitoramento da complexação de metais com biopolímero ramificado utilizando estas técnicas.

Para obtenção do objetivo principal utilizou-se solução Ap (item 5.3), com ultrassom para miniaturização de sua massa molecular, em solvente orgânico. O processo de obtenção das diversas massas moleculares durante o tratamento ultrassônico foi realizado pelo monitorado por SMSLS com detecção *on line*. Além disso, foi investigada a capacidade complexante do biopolímero frente a diferentes íons metálicos, por metodologia de Espectroscopia de Espalhamento de Luz (DSL e SMSLS) e Espectroscopia de UV-Vis e posterior análise dos resultados. O estudo de complexação ocorreu com os sais de  $\text{CuCl}_2$  e  $\text{Cu}(\text{COOH})_2$ , devido sua atividade biológica em organismos vivos e também, pela existência do íon cobre em muitos produtos cosméticos.

O projeto contemplou o uso da técnica de SMSLS, uma valiosa ferramenta utilizada para monitorar a evolução molecular de amostras múltiplas, em tempo real, por meio de Espalhamento de Luz Estático (SLS).

#### 6.13.1. Estudo da estabilidade do biopolímero e os efeitos do uso do ultrassom para a miniaturização

Através da técnica de DSL pode ser visto que a metodologia aplicada para a redução da massa molecular de Ap, como mostrado na Figura 59 por meio de ultrassom, é bastante apropriada para reduzir e controlar o tamanho do polímero e o massa molecular ( $M_w$ ) da cadeia polimérica do biopolímero na solução Ap.



**Figura 59:** Resultado da massa molecular ( $M_w$ ) para a solução de Ap, em diferentes tempos e frequências, à temperatura ambiente.

A redução da massa molecular ( $M_w$ ) e o raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) da solução Ap foram observados em função da intensidade de luz espalhada (Eq. 28) e da frequência do ultrassom aplicado. Pode-se observar (Figura 59) que não houve variação significativa na massa molecular da solução Ap, em relação ao tempo de análise posterior ao preparo da solução, ou seja, não ocorre degradação da solução polimérica.

Como pode ser visto na Tabela XVII, é observada uma ligeira diminuição no pH das soluções tratadas com a técnica de ultrassom em comparação com a solução Ap. Além disso, é observado um aumento na condutividade. Sugere-se que durante o ultrassom ocorre a formação de radicais livres que causam um aumento na condutividade e uma diminuição no pH. Ou seja, o aumento da intensidade do ultrassom causou um aumento da intensidade da cavitação, responsáveis pela formação dos radicais livres. Podemos observar que alguns dos resultados obtidos se aproximam dos resultados obtidos nas análises realizadas na UFRGS. Acredita-se que esta diferença ocorre devido ao fato do

sistema de ultrassom ter sido realizado num sistema aberto, mas de mesma magnitude. Ao contrário do ultrassom da UFRGS que é um sistema fechado.

**Tabela XVI:** Resultados obtidos a partir da análise do DSL no primeiro dia.

Amostras	pH	Condutividade ( $\mu\text{S}$ )	$T$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$R_h$ (nm)	$M_w$ (g/mol)	$PD. I$
<b>Solução Ap</b>	<b>8,78</b>	<b>0,819</b>	<b>22,0</b>	<b>171,3</b>	<b><math>5,12 \times 10^6</math></b>	<b>0,391</b>
Solvente	8,46	1,194	-	-	-	-
1 min 30%	8,14	1,261	23,8	52,0	$5,97 \times 10^5$	0,146
1 min 60%	7,90	1,255	28,9	56,8	$5,76 \times 10^5$	0,176
1 min 80%	7,71	1,241	35,3	55,5	$7,15 \times 10^5$	0,183
<b>1 min 100%</b>	<b>7,20</b>	<b>1,144</b>	<b>45,9</b>	<b>74,4</b>	<b><math>1,23 \times 10^5</math></b>	<b>0,196</b>
2 min 30%	7,63	1,130	30,3	52,1	$9,68 \times 10^5$	0,186
2 min 60%	7,42	1,128	37,5	41,3	$3,98 \times 10^5$	0,185
2 min 80%	7,31	1,115	41,2	39,1	$5,44 \times 10^5$	0,207
2 min 100%	7,11	1,047	45,8	37,5	$3,88 \times 10^5$	0,249
3 min 30%	7,59	1,251	39,2	49,5	$8,07 \times 10^5$	0,190
3 min 60%	7,57	1,234	43,2	35,3	$4,47 \times 10^5$	0,216
3 min 80%	7,56	1,226	47,2	34,3	$4,48 \times 10^5$	0,253
3 min 100%	7,56	1,195	52,0	35,8	$4,67 \times 10^5$	0,259

Outro fator analisado relaciona-se a variação da temperatura durante o ultrassom. É sugerido que o aumento da temperatura causa um aumento na energia cinética do sistema, levando a um aumento na pressão de vapor do solvente, o qual penetra em quantidades maiores nas bolhas de cavitação. Acredita-se, assim, que ocorre um aumento na flexibilidade da cadeia molecular, diminuindo o  $R_h$  e  $M_w$  do polímero em solução. Este fato foi observado em todas as amostras (principalmente no tempo de 2 min).

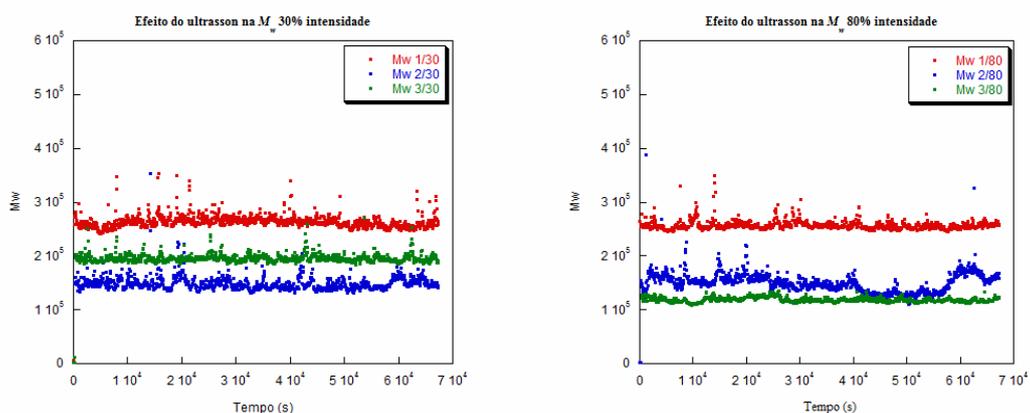
Observou-se que houve uma redução superior a 50 % em relação à  $M_w$  das soluções tratadas em comparação com a solução Ap. A redução, após a utilização da técnica de ultrassom, é devido à clivagem da espinha dorsal de amilopectina, que resulta em uma diminuição da  $M_w$ , reduzindo o volume eficaz das cadeias do biopolímero, ou seja, as forças hidrodinâmicas que resultam da aplicação de ultrassom são suficientes para causar a ruptura da cadeia polimérica. Uma tendência semelhante é observada para outros biopolímeros, tais como o pululana, a quitosana e etc.<sup>212, 213</sup>

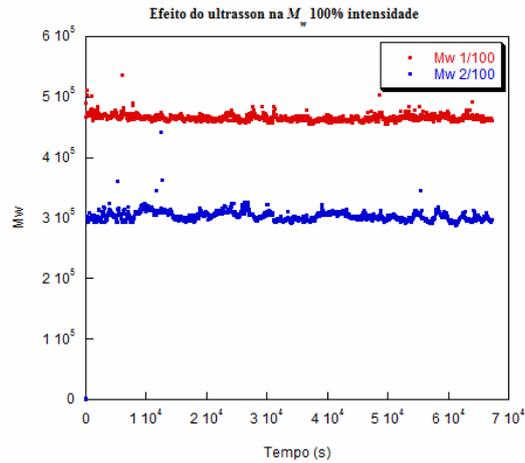
Os resultados obtidos para a  $PD. I$  mostraram claramente uma ruptura das partículas de grandes dimensões e a formação de distribuição de tamanho de partícula mais

estreitas o que resulta em partículas menores em todos os tempos e amplitudes. Observou-se também que a solução Ap mostrou uma *PD. I* mais elevada do que a amilopectina tratada (após ultrassom). Quanto menor for a *PD. I* mais estreita a distribuição da massa molecular<sup>213</sup>. Apesar disso, a *PD. I* é variável no tempo e amplitudes. Isto pode estar relacionado com as diferentes unidades de amilopectina formadas após a técnica de ultrassom. Outros testes também foram realizados, aumentando o tempo de realização da análise e pode-se constatar que a massa molecular permanece estável ao longo do tempo para a solução de Ap.

No estudo da estabilidade do biopolímero e os efeitos do uso do ultrassom para a redução da massa molecular observa-se a dependência do tempo para dispersão de luz estática nas soluções de Ap. Escolheu-se usar as amplitudes de 30, 80 e 100 %, devido a pouca diferença entre os resultados, ao número de porta-amostra disponível no equipamento, e também visando a otimização do experimento. Também excluiu-se o tempo de 3 minutos 100 %, devido a alta perturbação do sistema.

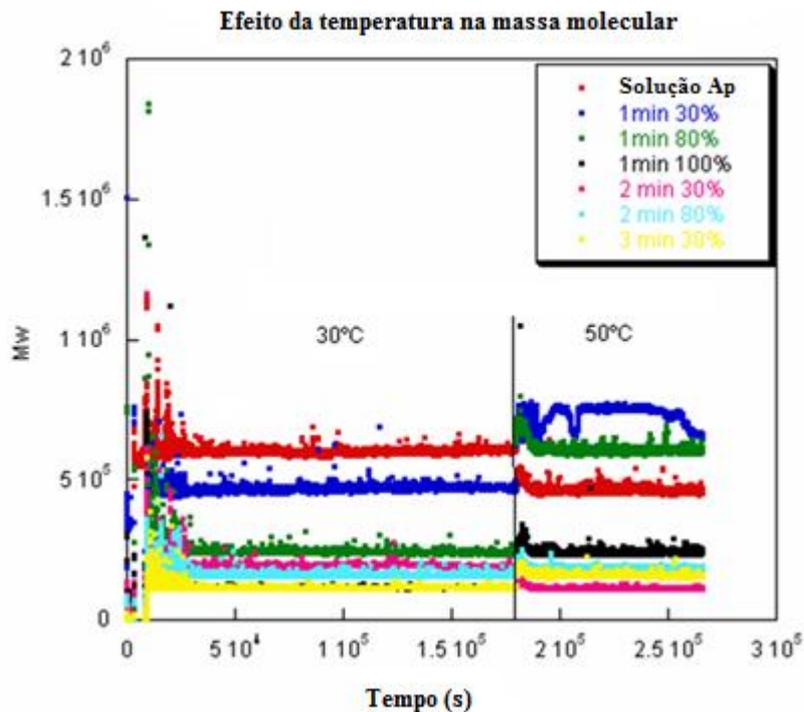
Este resultado foi obtido utilizando SMSLS que contém uma grande quantidade de informações qualitativa e semi-quantitativa e a partir do tratamento de dados, pelo programa KaleidaGraf obteve-se a massa molecular, calculada a partir das intensidade (Eq. 28) para cada amostra produzida por ultrassom, este primeiro experimento foi realizado a temperatura ambiente. Observa-se individualmente para as diferentes amplitudes, na Figura 60, a estabilidade da massa molecular para as amostras tratadas em diferentes tempos e amplitudes, e quanto maior o tempo e a frequência da aplicação de ultrassons, maior é a redução no peso molecular, com exceção do tempo de 3 min. Embora perceba-se a diferença significativa da massa molecular entre os tempos de 1 e 2 minutos de exposição no ultrassom.





**Figura 60:** Massa molecular para as amostras tratadas, de acordo com o tempo e frequência aplicada.

Para estudar o efeito da temperatura, adotamos as temperaturas de 30 °C e 50 °C (Figura 61), pois os testes realizados na viscosidade sob o efeito da temperatura, demonstraram que ocorre uma diminuição na viscosidade, acredita-se que isto seja decorrente da compactação das cadeias e mudança de conformação.



**Figura 61:** Massa molecular das soluções Ap sonicadas

Observa-se que para a solução Ap (solução estoque) e para a solução tratada (ApT) no tempo de 2 min 30 % houve uma diminuição na massa molecular ( $M_w$ ). E para as demais soluções tratadas com o ultrassom houve um aumento quanto à massa molecular. Com isto podemos afirmar que para a maioria das soluções tratadas, o aumento da temperatura aumenta a massa molecular, devido a diminuição na viscosidade e compactação das cadeias poliméricas. O mesmo não ocorre com a Solução Ap, devido a podispersão do meio. Acredita-se que em amplitudes maiores de ultrassom, a existência de ligações de hidrogênio seja bastante grande, causando maior agregação das cadeias poliméricas, levando a um aumento da massa molecular. A utilização de um solvente menos volátil na mistura, como DMSO e uma menor intensidade de ultrassom aplicado à solução, resulta numa pressão de vapor ( $P_v$ ) inferior, o que ocasiona um aumento na intensidade e induz a um aumento do grau de polimerização da solução Ap.

Para o monitoramento da complexação e estabilidade dos complexos formados, realizou-se o experimento analisando na solução de ApT (1 min 100 %), com a adição do sal. Para a formação dos complexos de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$  (Figura 62), utilizou-se 0,8 g a 1,6 g de sal, devido o volume da amostra da solução Ap ( $0,66 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) na cubeta (3,5 mL), para todas as amostras. Abaixo segue a condição de cada cubeta (célula).

Cubeta 1 =  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Cubeta 2 =  $1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Cubeta 3 =  $1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

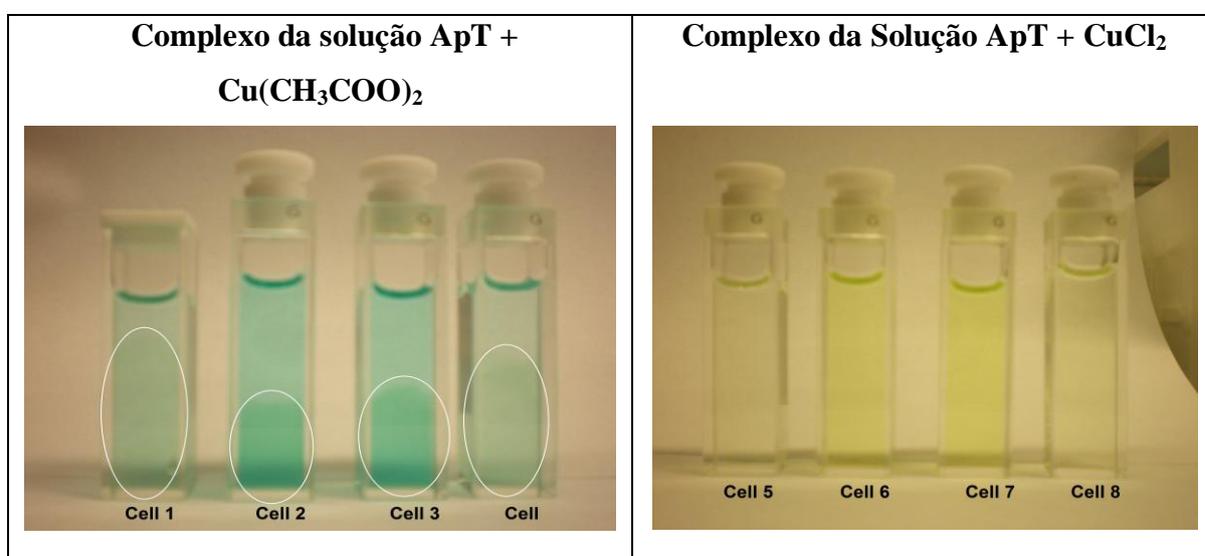
Cubeta 4 =  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$

Cubeta 5 =  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$

Cubeta 6 =  $1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$

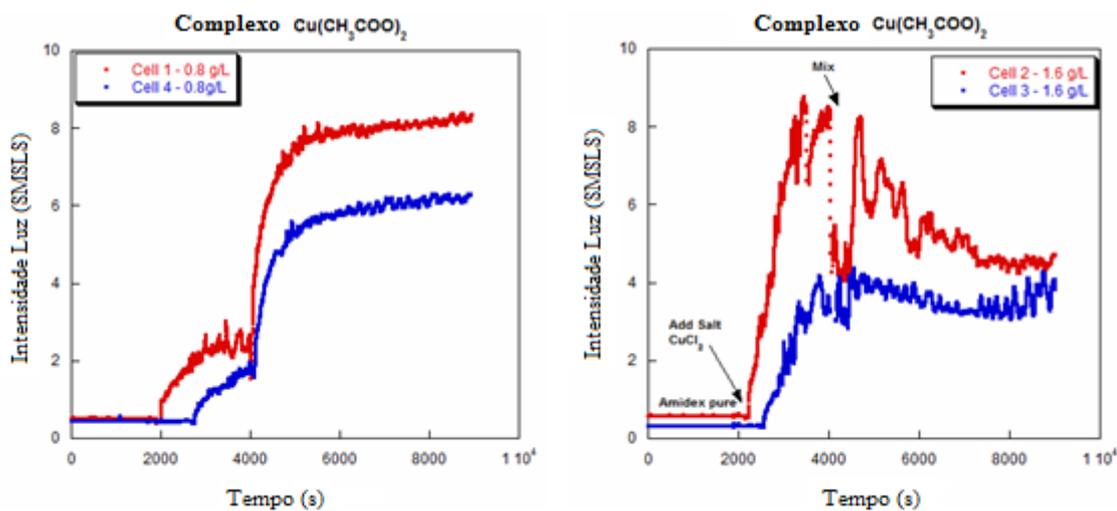
Cubeta 7 =  $1,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$

Cubeta 8 =  $0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuCl}_2$



**Figura 62:** Foto após a complexação nas diferentes concentrações para o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , a direita, e  $\text{CuCl}_2$  (esquerda)

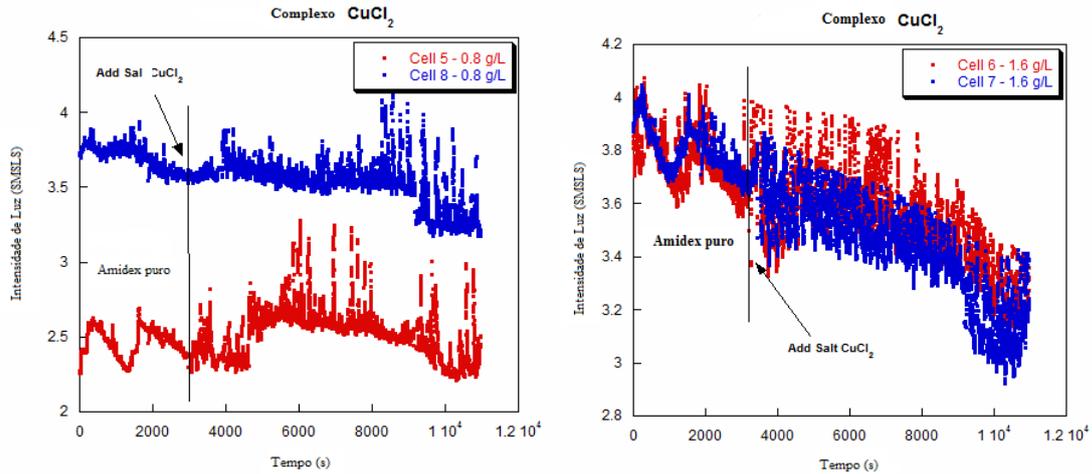
Na figura 63, mostra o monitoramento do complexo de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  com a solução polimérica, nas diferentes concentrações. Observa-se que, o comportamento é praticamente o mesmo, independente da concentração. Para elucidar as diferenças, segue no Anexo 5, os valores das massas moleculares obtidas através da intensidade para o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 30 °C.



**Figura 63:** Monitoramento da complexação do  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  nas diferentes concentrações (em duplicata).

Observa-se inicialmente que ao adicionar o sal, a massa molecular da solução aumenta e que num primeiro momento quanto maior a concentração, maior é a proporção entre a massa molecular do amidex (solução Ap) com o sal e o amidex puro (solução Ap). Após a primeira mistura ocorre o aumento da solubilidade do sal na solução havendo maior interação entre os reagentes, indicando também um aumento na massa molecular, porém não se torna significativo a concentração do sal. Com exceção da “cell 2”.

Para os complexos de  $\text{CuCl}_2$ , observa-se que não ocorre uma variação significativa na adição do sal, em relação a intensidade como mostra a figura 64, na concentração de  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ , porém houve uma diminuição na concentração  $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ .

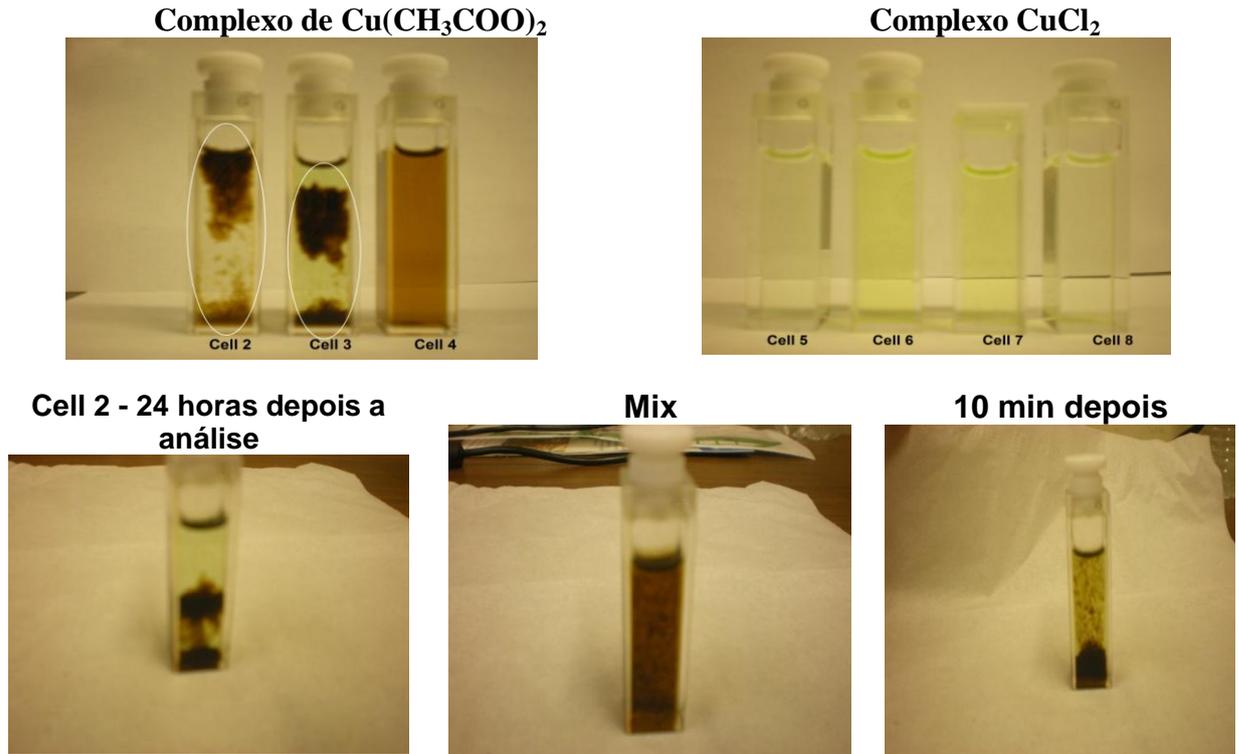


**Figura 64:** Monitoramento da complexação do  $\text{CuCl}_2$  nas diferentes concentrações.

O valores obtidos para as massas moleculares do complexo de  $\text{CuCl}_2$  (anexo 6). Porém com o aumento da concentração ocorre uma redução na massa molecular do complexo de  $\text{CuCl}_2$ .

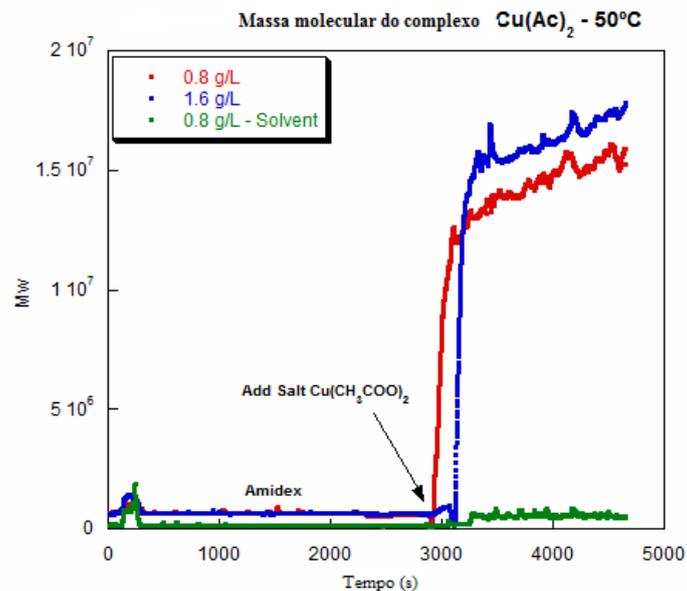
A fim de estudar o efeito da temperatura e do solvente, foram realizados novos experimentos a temperatura de  $50^\circ\text{C}$ . Abaixo segue a condição de cada célula (Figura 65).

Cubeta 1 = -----	Cubeta 5 = $0,8 \text{ g.L}^{-1} \text{ CuCl}_2$ (complexo)
Cubeta 2 = $0,8 \text{ g.L}^{-1} \text{ Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (complexo)	Cubeta 6 = $1,6 \text{ g.L}^{-1} \text{ CuCl}_2$ (complexo)
Cubeta 3 = $1,6 \text{ g.L}^{-1} \text{ Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (complexo)	Cubeta 7 = $1,6 \text{ g.L}^{-1} \text{ CuCl}_2$ (complexo)
Cubeta 4 = $0,8 \text{ g.L}^{-1} \text{ Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ + <b>Solvente</b>	Cubeta 8 = $0,8 \text{ g.L}^{-1} \text{ CuCl}_2$ + <b>Solvente</b>



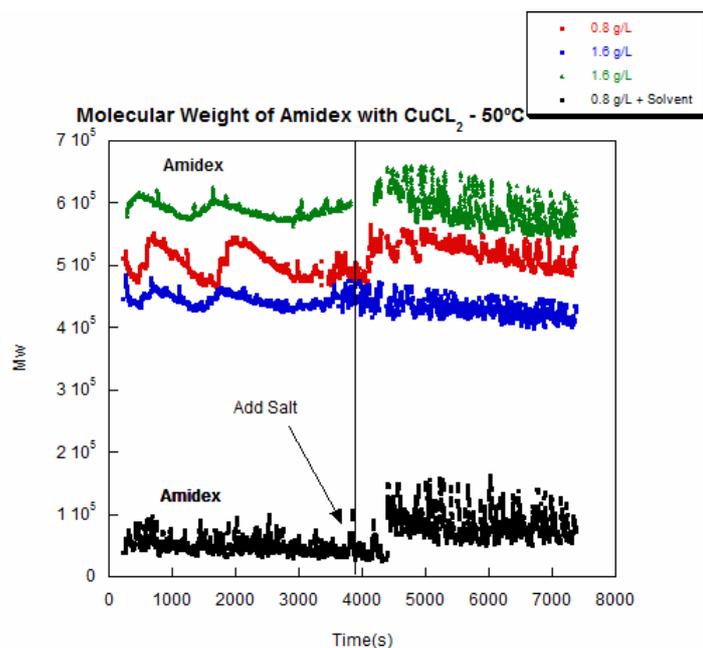
**Figura 65:** Foto após o monitoramento da complexação nas diferentes concentrações para o  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  e  $\text{CuCl}_2$ . Após 24h para a “cell 2”, após o mistura (mix) e condição da amostra após o mistura.

Observa-se na figura 66 que a adição do sal no solvente, não altera a  $M_w$ , porém ao adicionar o sal no biopolímero ocorre um aumento expressivo e que a concentração também altera na massa molecular (Anexo 7).



**Figura 66:** Adição do  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]$  no solvente (DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$ ) e na solução polimérica.

Observa-se na figura 70 que a adição do sal no solvente, não altera a  $M_w$ , e nem na solução polimérica



**Figura 67:** Adição do  $[\text{CuCl}_2]$  no solvente (DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$ ) e na solução polimérica.

A Tabela XXI mostra os valores obtidos para as massas moleculares do complexo de  $\text{CuCl}_2$ , onde podemos observar que não ocorre mudança significativa com a adição do na solução de amidex (solução Ap) a uma baixa concentração e que o aumento da temperatura não altera significativamente a massa da solução.

**Tabela XVII:** Valores das massas moleculares dos complexos de  $\text{CuCl}_2$ , obtidas através da intensidade, a  $50^\circ\text{C}$ .

<b>I abs</b>	1.19E-05
<b>K</b>	1.88E-07
<b>F</b>	0.95
<b>Dark</b>	0.081

	Cell 5 #ND1	Cell 6 #ND1	Cell 7 #ND1	Cell 8 #ND1
<b>50°C</b>				
<b>Solvente</b>	0.20311064	0.22929785	0.26783565	0.22799256
<b>Toluene</b>	0.55306994	0.89949656	0.7164791	0.65583742
<b>[Amidex] mg.mL<sup>-1</sup></b>	0.00066	0.00066	0.00066	0.00066
<b>[CuCl<sub>2</sub>] g.L<sup>-1</sup></b>	0.8	1.6	1.6	0.8
<b>Média do Amidex puro</b>	2.689093	3.9784551	4.1473776	0.51896112
<b>Média Amidex with salt (added salt CuCl<sub>2</sub>)</b>	2.754	3.9773	4.2224	0.7169

---

<b>Intensidade do Amidex puro</b>	$5.95 \times 10^{-5}$	$5.18 \times 10^{-5}$	$6.90 \times 10^{-5}$	$5.72 \times 10^{-6}$
<b>Intensidade do Amidex com <math>\text{CuCl}_2</math></b>	$6.11 \times 10^{-5}$	$5.18 \times 10^{-5}$	$7.04 \times 10^{-5}$	$9.62 \times 10^{-6}$
<b>Mw do Amidex puro</b>	$4.80 \times 10^5$	$4.17 \times 10^5$	$5.56 \times 10^5$	$4.61 \times 10^4$
<b>Mw do Amidex com <math>\text{CuCl}_2</math></b>	$4.92 \times 10^5$	$4.17 \times 10^5$	$5.67 \times 10^5$	$7.75 \times 10^4$
<b>Proporção da Mw do Amidex com <math>\text{CuCl}_2</math> / Amidex pure</b>	1.026	1.000	1.019	1.680

---

---

## **7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que a metodologia aplicada para a miniaturização ultrassônica da solução de amilopectina é adequada para a redução e controle de tamanho da cadeia polimérica ramificada da amilopectina natural, possuindo uma boa repetibilidade e seletividade. O tratamento escolhido para a complexação foi de **1 min** de intensidade, na amplitude de **100 %**, por se mostrar mais estável na repetibilidade e pelo fato da molécula possuir, ao final do processo, um tamanho adequado (na escala nanométrica).

Conclui-se que a concentração de amilose em solução ApT é de aproximadamente 21,9 % (através do teste do Iodo adaptado). Além disso, o tratamento ultrassônico não levou à formação de açúcares redutores, o que foi verificado através do teste de Benedict. E a hipótese de haver proteínas provenientes da extração do amido foi excluída.

O planejamento fatorial foi válido para a otimização das reações de complexação elucidando que o tempo de reação e a concentração são variáveis significativas que mostraram, na sua maioria, um efeito positivo no percentual de complexação, assim como, a interação entre estas duas variáveis e a temperatura reflete um efeito negativo.

Os íons  $\text{Cr}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  possuem um rendimento reacional maior, comparado com os demais metais na complexação.

O estudo reológico permitiu caracterizar a solução tratada de amilopectina como um fluido pseudoplástico não-newtoniano, sendo que o aumento da temperatura do sistema, reduziu a viscosidade da solução. O modelo de lei de potência é adequado para descrever o comportamento do fluxo das amostras, evidenciando o comportamento do biopolímero cujo os valores de índice de comportamento de fluxo ( $\eta$ ), variam de 0,31 para a solução mãe (solução Ap) e 0,48 para solução de amilopectina tratada (solução ApT).

A introdução de sais metálicos na solução de amilopectina tratada reduz a viscosidade da solução, devido ao empacotamento das cadeias poliméricas, sendo que os sais de nitrato possuem uma estabilidade maior, com uma viscosidade mais próxima à da

solução tratada. Em temperaturas elevadas ocasiona a gelatinização das soluções, impossibilitando o torque para alguns metais.

O valor da viscosidade intrínseca encontrada foi de  $1,257 \text{ L.g}^{-1}$  para a solução de amilopectina tratada (ApT). A partir do valor da viscosidade intrínseca determinou-se a concentração crítica ( $c^*$ ) da amilopectina tratada (ApT) que foi igual a  $0,795 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Valor menor que a concentração inicial da solução Ap de amilopectina. Portanto, concluiu-se que a solução mãe (Ap) encontra-se no regime semidiluído. Os estudos de interação polímero-metal foram realizados a uma concentração da solução de amilopectina abaixo da  $c^*$ , para que o comportamento da solução fosse comparável ao de uma solução polimérica ideal.

Observou-se que o pH das reações de complexação, para todos os sais de nitrato, fica próximo de 5 (pH baixo), que apresentam uma maior média de complexação comparado com os demais ânions dos sais correspondentes. O que prova mais uma vez, a eficácia do processo de complexação. Para os sais de acetato estudados neste trabalho, o pH de formação dos complexos é relativamente alto, comparado com os demais (acima de 8), o que diminui o poder complexante.

Para os complexos da solução polimérica de amilopectina com acetatos de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$  mostraram um decréscimo de cerca de 70 % na condutividade em comparação com a solução original de sal.

O efeito do contra-íon na complexação da amilopectina com sais compostos pelo mesmo metal apresenta diferenças quanto à temperatura de decomposição térmica. Uma tendência dependente do contra-íon (ânion) é facilmente observada nas curvas de perda de massa em função da temperatura, onde os complexos que possuem o ânion nitrato em sua composição e adquirem estabilidade térmica adicional. Acredita-se que as ligações de hidrogênio formadas entre os ânions nitrato e as hidroxilas que compõem as unidades glicosídicas da amilopectina, atribuem uma resistência térmica a esses complexos.

Para os complexos de  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$  foi verificado que estes complexos apresentam três bandas de absorção, sendo a terceira de difícil detecção.

Através do FTIR observou-se que não houve mudanças estruturais e sim conformacionais na estrutura da amilopectina tratada (ApT), havendo apenas pequenas mudanças na intensidade das bandas principais. Observou-se ao longo das análises a formação de um ombro na região entre  $3500 - 3330 \text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da ligação - OH, das ligações de hidrogênio intermolecular. Os sais de cromo e ferro, possuem maior energia de absorção comparada com os demais metais. Da mesma forma que para os ânions cloreto e nitrato possuem menor energia, comparado com o contra-íon acetato. Acredita-se que estas diferenças estejam relacionadas com a conformação dos complexos, ao empacotamento das cadeias e ao pH da solução.

O uso da ferramenta estatística de separação por similaridade, i-PCA, proporcionou uma melhor compreensão do conjunto de dados, extraídos do FTIR. Ficando evidente que houve a formação de complexos através da desprotonação do grupo hidróxila do polímero e também através da interação com o metal complexado.

Através do estudo da relação estrutura-propriedades, pela técnica de espalhamento de luz, pudemos concluir que o polímero em solução encontra-se como uma esfera não homogênea, sendo que após a complexação com íons metálicos a macromolécula muda a sua conformação em solução, passando para um formato do tipo bastão.

Para todos os complexos formados fica evidenciado um aumento do  $R_h$ , comparando-se com a solução de amilopectina na ausência de metal, com exceção dos sais de cromo. Este resultado evidencia a presença do íon metálico complexado com a amilopectina, mudando o tamanho e a forma do complexo formado. Essas mudanças conformacionais se devem principalmente a interação do íon metálico com as cadeias do polímero.

A análise do raio de giro foi realizada pelo método da dissimetria angular, o valor obtido foi de 108,68 nm. Já o valor do segundo coeficiente virial encontrado foi de  $1,33 \pm$

$0,86 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol.g}^{-2}$ , sendo o valor positivo, o que significa que o solvente utilizado para dissolução do polímero é um bom solvente.

As análises realizadas pelo método de Berry também foram realizadas, utilizado para polímeros de cadeias ramificadas. A  $M_w$  obtida foi de  $9,9 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$ , com  $R_g$  de  $100,0 \pm 1,6 \text{ nm}$  e o valor do  $A_2$  foi de  $9,9 \pm 0,54 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol.g}^{-2}$ . Os resultados obtidos pelo gráfico de Berry mostrou-se mais apropriado e vai ao encontro do resultado para o  $R_g$ , por dissimetria angular. Pois a amilopectina possui elevadas ramificações, cujo as cadeias exteriores são cadeias flexíveis e não rígidas, o que facilita a complexação com os sais metálicos.

*Através da técnica do SMSLS observou-se* que para a maioria das soluções tratadas, o aumento da temperatura aumenta a massa molecular, devido a diminuição na viscosidade e compactação das cadeias poliméricas. O mesmo não ocorre com a solução mãe (Ap), devido a podispersão do meio.

O monitoramento do complexo de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  com a solução polimérica, em diferentes concentrações, mostra que o comportamento é praticamente o mesmo ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Porém ocorre a formação de um gel. Em temperaturas elevadas ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ocorre uma aglutinação maior, e ao mesmo tempo ocorre uma oxidação na solução polimérica. Ficou evidenciado neste experimento que ocorre o aumento da massa molecular ao adicionar o sal. Mas para os complexos de  $\text{CuCl}_2$ . Não ocorre variação significativa na massa.

Por fim, o estudo desenvolvido nesta tese é válido. A nanopartícula de amilopectina desenvolvida é altamente estável e compatível com bases cosméticas. Estudos posteriores serão realizados para a aplicabilidade cosmetologia, como hidrogéis e emulsões oleosas. Assim como, foi provado a capacidade de complexação deste biopolímero frente a diferentes metais.

---

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Zhang, M.; Cui, S. W.; Cheung, P. C. K.; Wang, Q., *Trends in Food Science & Technology* **2007**, *18* (1), 4-19.
2. Vilaplana, F.; Hasjim, J.; Gilbert, R. G., *Carbohydrate Polymers* **2012**, *88* (1), 103-111.
3. Peroni, F. H. G.; Rocha, T. S.; Franco, C. M. L., *Food Science and Technology International* **2006**, *12* (6), 505-513.
4. Rolland-Sabaté, A.; Sánchez, T.; Buléon, A.; Colonna, P.; Jaillais, B.; Ceballos, H.; Dufour, D., *Food Hydrocolloids* **2012**, *27* (1), 161-174.
5. Tester, R. F.; Karkalas, J.; Qi, X., *Journal of Cereal Science* **2004**, *39* (2), 151-165.
6. Correia, P. R.; Nunes, M. C.; Beirão-da-Costa, M. L., *Food Hydrocolloids* **2012**, *27* (1), 256-263.
7. Singh, R. P.; Pal, S.; Rana, V. K.; Ghorai, S., *Carbohydrate Polymers* **2013**, *91* (1), 294-299.
8. Zych, K.; Perepelov, A.; Baranowska, A.; Zablotni, A.; Shashkov, A. S.; Knirel, Y. A.; Sidorczyk, Z., *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **2005**, *43* (3), 351-356.
9. Blazek, J.; Gilbert, E. P., *Carbohydrate Polymers* **2011**, *85* (2), 281-293.
10. Bennett, M. L.; Henderson Jr, R. L., *Current Problems in Dermatology* **2003**, *15* (2), 43-83.
11. I. Goddard, E. D. I. G., James V., *Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care* E. Desmond Goddard and James V. Gruber ed.; MARCEL DEKKER, INC: NEW YORK • BASEL, 1999; p 668.
12. Bais, D.; Trevisan, A.; Lapasin, R.; Partal, P.; Gallegos, C., *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *290* (2), 546-556.
13. Cardoso, M. B.; Putaux, J.-L.; Nishiyama, Y.; Helbert, W.; Hytch, M.; Silveira, N. P.; Chanzy, H., *Biomacromolecules* **2007**, *8* (4), 1319-1326.
14. Okeke, M. I.; Iroegbu, C. U.; Eze, E. N.; Okoli, A. S.; Esimone, C. O., *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, *78* (2-3), 119-127; Rabanal, R. M.; Arias, A.; Prado, B.; Hernández-Pérez, M.; Sánchez-Mateo, C. C., *Journal of Ethnopharmacology* **2002**, *81* (2), 287-292.
15. Mizrahy, S.; Peer, D., *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (7), 2623-2640.
16. Bigand, V.; Pinel, C.; Perez, D. D.; Rataboul, F.; Huber, P.; Petit-Conil, M., *Carbohydrate Polymers* **2011**, *85* (1), 138-148; Gu, Q. M., *Biocatalysis in Polymer Science* **2003**, *840*, 243-252; Parada, J.; Aguilera, J. M., *Food Science and Technology International* **2011**, *17* (3), 187-204.
17. Para, A.; Karolczyk-Kostuch, S., *Carbohydrate Polymers* **2002**, *50* (2), 151-158.
18. Partain Iii, E. M., Industrially important polysaccharides. In *Applied Polymer Science: 21st Century*, Clara, D. C. a. C. E. C.; Jr, A. C. D. C.; Charles E. Carraher, Jr., Eds. Pergamon: Oxford, 2000; pp 303-323.
19. Singh, B., *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *334* (1-2), 1-14.
20. Conn, E. E.; Stumpf, P. K., *Introdução à Bioquímica*. 4 ed.; 1980; p 293.
21. Kondo, T.; Koschella, A.; Heublein, B.; Klemm, D.; Heinze, T., *Carbohydrate Research* **2008**, *343* (15), 2600-2604.
22. Guo, Y. L.; Wu, P. Y., *Carbohydrate Polymers* **2008**, *74* (3), 509-513.
23. Heineck, M. E.; Cardoso, M. B.; Giacomelli, F. C.; da Silveira, N. P., *Polymer* **2008**, *49* (20), 4386-4392.
24. He, Y.; Zhu, B.; Inoue, Y., *Progress in Polymer Science* **2004**, *29* (10), 1021-1051.
25. Hatakeyama, H.; Hatakeyama, T., Interaction between cellulosic polysaccharides and water. In *Hydrocolloids*, Katsuyoshi, N., Ed. Elsevier Science: Amsterdam, 2000; pp 261-270.
26. Casimiro, M. H., *Parte I: Fundamentos Teóricos* **2005**, (98), 29-35.

27. Perez, S.; Bertoft, E., *Starch-Starke* **2010**, 62 (8), 389-420.
28. Teresa, M.; Vasconcelos, S. D.; Gomes, C. A. R., *European Polymer Journal* **1997**, 33 (5), 631-639.
29. Ciesielski, W.; Tomasik, P., *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, 98 (12), 2039-2051.
30. Ciesielski, W.; Lii, C.-y.; Yen, M.-T.; Tomasik, P., *Carbohydrate Polymers* **2003**, 51 (1), 47-56.
31. Nikolic, G. S.; Cakic, M.; Mitic, Z.; Ilic, L., *Russian Journal of Coordination Chemistry* **2008**, 34 (5), 322-328.
32. Tolmachev, V. N.; Lugovaya, Z. A.; Ishchenko, I. K.; Valakhanovich, A. I.; Zaboronok, V. U., *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya A* **1975**, 17 (2), 419-422.
33. Tolmachev, V. N.; Lugovaya, Z. A., *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya B* **1976**, 18 (7), 548-549.
34. Tomasik, P.; Schilling, C. H., Complexes of Starch with Inorganic Guests. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Derek, H., Ed. Academic Press: 1998; Vol. Volume 53, pp 263-343.
35. Putseys, J. A.; Lamberts, L.; Delcour, J. A., *Journal of Cereal Science* **2010**, 51 (3), 238-247.
36. Tomasik, P.; Schilling, C.; Anderegg, J.; Refvik, M., *Carbohydrate Polymers* **2000**, 41 (1), 61-68.
37. Tomasik, P.; Schilling, C. H., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol 59 **2004**, 59, 175-403.
38. Tomasik, P.; Schilling, C. H., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol 53 **1998**, 53, 345-426.
39. Berezin, D. B.; Toldina, O. V.; Berezin, B. D., *Russian Journal of Inorganic Chemistry* **2006**, 51 (11), 1728-1734.
40. Bergmann, D.; Furth, G.; Mayer, C., *International Journal of Biological Macromolecules* **2008**, 43 (3), 245-251.
41. Antoniou, E.; Buitrago, C. F.; Tsianou, M.; Alexandridis, P., *Carbohydrate Polymers* **2010**, 79 (2), 380-390.
42. Wang, H.; Wang, P.; Huang, C.; Chang, L.; Wu, J.; Hou, H.; Fan, Y., *Inorganica Chimica Acta* **2011**, 378 (1), 326-332.
43. Berezin, D. B.; Zharnikova, N. V.; Andrianov, V. G.; Shatunov, P. A.; Semeikin, A. S., *Russian Journal of Coordination Chemistry* **2002**, 28 (5), 325-332.
44. Park, H. M.; Hwang, I. H.; Bae, J. M.; Jo, Y. D.; Kim, C.; Kim, H.-Y.; Kim, Y.; Kim, S.-J., *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2012**, 33 (5), 1517-1522.
45. Islam, M. N.; Mohd, B. M. N., *Starch-Starke* **1994**, 46 (9), 349-354.
46. Belen Lago, A.; Carballo, R.; Garcia-Martinez, E.; Vazquez-Lopez, E. M., *Crystal Growth & Design* **2011**, 11 (1), 59-68.
47. Khondkar, P.; Aidoo, K. E.; Tester, R. F., *International Journal of Medicinal Mushrooms* **2010**, 12 (1), 73-85.
48. Para, A.; Tomasik, P., *International Journal of Food Science and Technology* **2010**, 45 (4), 784-788.
49. Wang, X. H.; Zhang, X. F.; Xu, X. J.; Zhang, L. N., *Biopolymers* **2012**, 97 (10), 840-845.
50. Parker, R.; Ring, S. G., *Journal of Cereal Science* **2001**, 34 (1), 1-17.
51. Copeland, L.; Blazek, J.; Salman, H.; Tang, M. C., *Food Hydrocolloids* **2009**, 23 (6), 1527-1534.

52. Liu, H.; Xie, F.; Yu, L.; Chen, L.; Li, L., *Progress in Polymer Science* **2009**, 34 (12), 1348-1368.
53. Vandeputte, G. E.; Delcour, J. A., *Carbohydrate Polymers* **2004**, 58 (3), 245-266.
54. Buléon, A.; Colonna, P.; Planchot, V.; Ball, S., *International Journal of Biological Macromolecules* **1998**, 23 (2), 85-112.
55. Biliaderis, C. G., *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **1991**, 69 (1), 60-78.
56. Jouquand, C.; Ducruet, V.; Le Bail, P., *Food Chemistry* **2006**, 96 (3), 461-470.
57. Buleon, A.; Delage, M. M.; Brisson, J.; Chanzy, H., *International Journal of Biological Macromolecules* **1990**, 12 (1), 25-33.
58. Wrolstad, R. E., *Food Technology* **1983**, 37 (6), 121-121.
59. Svihus, B.; Uhlen, A. K.; Harstad, O. M., *Animal Feed Science and Technology* **2005**, 122 (3-4), 303-320.
60. Lima, F. F.; Andrade, C. T., *Ultrasonics Sonochemistry* **2010**, 17 (4), 637-641.
61. Cardoso, M. From Rice To Amylose Crystals: Alkaline Extraction of Rice Starch, Solution Properties of Amylose and Crystal Structure of V-Amylose Inclusion Complexes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Abril, 2007.
62. Zhu, J.; Li, L.; Chen, L.; Li, X., *Food Hydrocolloids* **2012**, 29 (1).
63. Alvani, K.; Qi, X.; Tester, R. F.; Snape, C. E., *Food Chemistry* **2011**, 125 (3), 958-965.
64. Steffe, J. F., *Rheological Methods in Food Process Engineering*. Second ed.; Michigan State University: 1996; p 428.
65. Rao, M. A., *Rheology of Fluid and Semisolid Foods: principles and applications* 1999; p 433.
66. Burgalassi, S.; Chetoni, P.; Panichi, L.; Boldrini, E.; Saettone, M. F., *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* **2000**, 16 (6), 497-509.
67. Shaw, D. J., *Introdução a química dos colóides e de superfícies*. São Paulo, 1975.
68. Navarro, R. F., *Fundamentos de Reologia de Polímeros*. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 1997; p 300.
69. Machado, J. C. V., *Reologia e escoamento fluidos-ênfase na indústria de petróleo*. Rio de Janeiro: 2002; p 257
70. Scrhamm, G., *Reologia e Reometria. Fundamentos Teóricos e Práticos*. São Paulo, 2006; p 240.
71. Queiroz, V. M. S.; Fontes, S. R., *Food and Bioprocess Technology* **2008**, 1 (2), 180-186.
72. Sato, A. C. K.; da Cunha, R. L., *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* **2007**, 27 (4), 890-896.
73. Choi, Y. H.; Yoo, B., *International Journal of Food Science and Technology* **2004**, 39 (7), 801-805.
74. Steffe, J. F., *Rheology of Fluid and Semisolid Foods: principles and applications*. Second ed.; New York: 1999; p 433.
75. Sharma, S. K., Mulvaney, S.J., Rizvi, S. S. H., *Food processing engineering theory and laboratory experiments*. United States of America, 2000; p 348.
76. Toledo, R. T., *Fundamentals of Food Process Engineering*. New York, 1991; p 602.
77. Rao, M. A.; Tattiyakul, J., *Carbohydrate Polymers* **1999**, 38 (2), 123-132.
78. Saravacos, G. D.; Kostaropoulos, A. E., *Transport properties in processing of fruits and vegetables*. 1995; Vol. 49, p 105 ; Saravacos, G. D., *Engineering and Food for the 21st Century* **2002**, 153-176.
79. Penna, A. L. B.; Sivieri, K.; Oliveira, M. N., *Journal of Food Engineering* **2001**, 49 (1), 7-13.

80. Holdsworth, R. E.; Stewart, M.; Imber, J.; Strachan, R. A., *Continental Reactivation and Reworking* **2001**, 184, 115-137.
81. SILVA, J. A.; RAO, M. A., *Viscoelastic Properties of Foods*. Elsevier Applied Science: London, 1992; p 441.
82. FERRY, J. D., *Viscoelastic properties of polymers*. New York, 1980; p 641.
83. Graessley, W. W., *Viscoelastic and flow in polymers melts and concentrated solutions*. In *Physical properties of polymers*. Washington, D.C, 1984; p xp.
84. Shi, Y.; Pinto, B. M., *Carbohydrate Research* **2012**, 358, 89-95.
85. Canevarolo JR., S. V., *Ciência dos Polímeros*. São Paulo, 2002; p 183.
86. Glass, J. E.; Schulz, D. N.; Zukoski, C. F., *Acs Symposium Series* **1991**, 462, 2-17.
87. Hoover, R., *Carbohydrate Polymers* **2001**, 45 (3), 253-267.
88. Morris, G. A.; de al Torre, J. G.; Ortega, A.; Castile, J.; Smith, A.; Harding, S. E., *Food Hydrocolloids* **2008**, 22 (8), 1435-1442; Patel, T. R.; Morris, G. A.; Ebringerová, A.; Vodeničarová, M.; Velebný, V.; Ortega, A.; Garcia de la Torre, J.; Harding, S. E., *Carbohydrate Polymers* **2008**, 74 (4), 845-851.
89. Dakia, P. A.; Blecker, C.; Robert, C.; Wathelet, B.; Paquot, M., *Food Hydrocolloids* **2008**, 22 (5), 807-818.
90. Khouryieh, H. A.; Herald, T. J.; Aramouni, F.; Alavi, S., *Food Research International* **2007**, 40 (7), 883-893; Yang, L. Q.; Zhang, L. M., *Carbohydrate Polymers* **2009**, 76 (3), 349-361.
91. Tanglertpaibul, T.; Rao, M. A., *Journal of Food Science* **1987**, 52 (6), 1642-&.
92. Chung, J. H.; Han, J. A.; Yoo, B.; Seib, P. A.; Lim, S. T., *Carbohydrate Polymers* **2008**, 71 (3), 365-371.
93. Czuchajowska, Z.; Klamczynski, A.; Paszczynska, B.; Baik, B. K., *Cereal Chemistry* **1998**, 75 (5), 747-754.
94. Fishman, M. L.; Rodriguez, L.; Chau, H. K., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, 44 (10), 3182-3188.
95. Suh, J. K. F.; Matthew, H. W. T., *Biomaterials* **2000**, 21 (24), 2589-2598.
96. Wang, W.-B.; Huang, D.-J.; Kang, Y.-R.; Wang, A.-Q., *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2013**, 106, 51-59.
97. Galliard and Bowler, T. G., P. Bowler Morphology and composition of starch; T. Galliard (Ed.), S. P. a. P., Vol. 13 John Wiley, New York (1987), pp. 55-78; Vasanthan, T.; Hoover, R., *Food Chemistry* **1992**, 45 (5), 337-347.
98. Yokoyama, W.; Renner-Nantz, J. J.; Shoemaker, C. F., *Cereal Chemistry* **1998**, 75 (4), 530-535.
99. Morrison, W. R.; Laignelet, B., *Journal of Cereal Science* **1983**, 1 (1), 9-20.
100. Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Valle, G.; Veronese, A., *Tetrahedron* **1995**, 51 (2), 527-538.
101. Cooreman, F. L.; van Rensburg, H.; Delcour, J. A., *Journal of Cereal Science* **1995**, 22 (3), 251-257.
102. Jackson, D. S., *Starch-Starke* **1991**, 43 (11), 422-427.
103. Dário, A. F.; Hortêncio, L. M. A.; Sierakowski, M. R.; Neto, J. C. Q.; Petri, D. F. S., *Carbohydrate Polymers* **2011**, 84 (1), 669-676.
104. Cross, M. M., *Journal of Colloid Science* **1965**, 20 (5), 417-437.
105. Wyatt, P. J., *Analytica Chimica Acta* **1993**, 272 (1), 1-40.
106. Giacomelli, F. C.; Silveira, N. P. d., Espalhamento de Luz Aplicado à Caracterização de Polímeros e Nanopartículas. In *Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia*, Pohlmann, A. R.; Petter, C. O.; Balzaretto, N. M.; (Org.), S. S. G., Eds. Editora da UFRGS Porto Alegre, 2008 pp 93-106. .

107. Jones, A. R., *Progress in Energy and Combustion Science* **1999**, 25 (1), 1-53.
108. Turro, N. J.; Ramamurthy, V.; Scaiano, J. C., *Photochemistry and Photobiology* **2012**, 88 (4), 1033-1033.
109. Santos, N. C.; Castanho, M., *Biophysical Journal* **1996**, 71 (3), 1641-1650.
110. Pecora, R., *DYNAMIC LIGHT-SCATTERING FROM MACROMOLECULES*. 1993; Vol. 1884, p 2-15.
111. Florenzano, F. H.; Strelitzki, R.; Reed, W. F., *Macromolecules* **1998**, 31 (21), 7226-7238.
112. Pecora, R., *Journal of Chemical Physics* **1968**, 49 (3), 1032-&.
113. Aragon, S. R.; Pecora, R., *Journal of Chemical Physics* **1985**, 82 (12), 5346-5353.
114. Brown, R. G. W., *Appl. Opt.* **1987**, 26 (22), 4846-4851.
115. Jørgensen, E. B.; Hvidt, S.; Brown, W.; Schillén, K., *Macromolecules* **1997**, 30 (8), 2355-2364.
116. Brown, W., *Light Scattering Principles and Development*. Oxford University Press: New York, 1996; p 528.
117. Karlsson, A.; Yi, T.; Bengtsson, P. E., *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision* **2013**, 30 (3), 316-324.
118. Drenski, M. F.; Mignard, E.; Alb, A. M.; Reed, W. F., *Journal of Combinatorial Chemistry* **2004**, 6 (5), 710-716.
119. Kostanski, L. K.; Keller, D. M.; Hamielec, A. E., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2004**, 58 (2), 159-186.
120. Flory, P. J., *Principles of Polymers Chemistry*. New York: Cornell University Press, 1953; p 672.
121. Tanford, C., *Macromolecules; Chemistry, Physical and theoretical* Wiley & Sons, Incorporated, John: New York, 1961; p 710.
122. Zimm, B. H., *Journal of Chemical Physics* **1948**, 16 (12), 1093-1099.
123. Strelitzki, R.; Reed, W. F., *Journal of Applied Polymer Science* **1999**, 73 (12), 2359-2367.
124. Aragon, S. R.; Pecora, R., *Journal of Chemical Physics* **1976**, 64 (6), 2395-2404.
125. Johnson, C. S. a. G., D.A, *Laser Light Scattering*. Dover Publications, INC.: New York, 1994; p 96.
126. Berry, G. C., *Journal of Polymer Science Part a-2-Polymer Physics* **1971**, 9 (4), 687-&.
127. Stockmayer, W. H.; Moore, L. D.; Fixman, M.; Epstein, B. N., *Journal of Polymer Science* **1955**, 16 (82), 517-530.
128. Burchard, W., *Branched Polymers Ii* **1999**, 143, 113-194.
129. Millard, M. M.; Wolf, W. J.; Dintzis, F. R.; Willett, J. L., *Carbohydrate Polymers* **1999**, 39 (4), 315-320.
130. Barbosa, L. C.; Reynoso, V. C. S.; dePaula, A. M.; deOliveira, C. R. M.; Alves, O. L.; Craievich, A. F.; Marotti, R. E.; Cruz, C. H. B.; Cesar, C. L., *Journal of Non-Crystalline Solids* **1997**, 219, 205-211.
131. Mertins, O.; Cardoso, M. B.; Pohlmann, A. R.; da Silveira, N. P., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2006**, 6 (8), 2425-2431.
132. Mertins, O.; Sebben, M.; Pohlmann, A. R.; da Silveira, N. P., *Chemistry and Physics of Lipids* **2005**, 138 (1-2), 29-37.
133. Pecora, R., *Journal of Nanoparticle Research* **2000**, 2 (2), 123-131.
134. Frisken, B. J., *Appl Opt* **2001**, 40 (24), 4087-91.
135. Tang, Y.; Duan, J.; Wu, J., *Colloids Surf., A* **2012**, 395, 82-87.
136. Pereira-Lachataignerais, J.; Pons, R.; Panizza, P.; Courbin, L.; Rouch, J.; Lopez, O., *Chem. Phys. Lipids* **2006**, 140 (1-2), 88-97.

137. Provencher, S. W., *Computer Physics Communications* **1982**, 27 (3), 229-242.
138. Durrani, C. M.; Donald, A. M., *Carbohydr. Polym.* **1999**, 41 (2), 207-217.
139. Zhu, X.; Shen, J.; Wang, Y.; Guan, J.; Sun, X.; Wang, X., *Optics & Laser Technology* **2011**, 43 (7), 1128-1137.
140. Ribeiro, A. C. Estudo estrutural da Gliadina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2012.
141. Burchard, W.; Kajiwara, K.; Pfannemu.B, *Angewandte Chemie-International Edition* **1970**, 9 (7), 532-&.
142. Drenski, M. F.; Reed, W. F., *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, 92 (4), 2724-2732.
143. Skoog, D.; West, D.; Holler, J.; Crouch, S., *Fundamentos de Química Analítica*. 8 ed ed.; Pioneira Thonson Learning: Sao paulo, 2006; p 999.
144. Shriver, D. F.; Atkins, P. W., *Química Inorgânica*. 3. ed ed.; Bookman: Porto Alegre, 2003; p 816.
145. Komal, K. J.; Devi, P. A. G., *Drug Invent. Today* **2012**, 4 (12), 616-618.
146. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J., *Identificação espectroscópica de compostos orgânicos*. 7ª ed. ed.; 2007; p 508.
147. Paiva, D.; Lampman, G.; Kriz, G., *Introduction to Spectroscopy*. 3 ed.; Cengage Learning: 2000; p 672.
148. Kazarian, S. G.; Chan, K. L. A., *Analyst (Cambridge, U.K.)* **2013**, 138 (7), 1940-1951.
149. Liu, X. X.; Wang, Y. F.; Yu, L.; Tong, Z.; Chen, L.; Liu, H. S.; Li, X. X., *Starch-Starke* **2013**, 65 (1-2), 48-60.
150. Hatakeyama, T.; Quinn, F. X., *Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer science*. 2 ed.; John Wiley & Sons: Michigan, 1999; p 180.
151. Zou, W.; Yu, L.; Liu, X. X.; Chen, L.; Zhang, X. Q.; Qiao, D. L.; Zhang, R. Z., *Carbohydrate Polymers* **2012**, 87 (2), 1583-1588.
152. Herrero-Martínez, J. M.; Schoenmakers, P. J.; Kok, W. T., *Journal of Chromatography A* **2004**, 1053 (1-2), 227-234.
153. Gulseren, I.; Fang, Y.; Corredig, M., *Food & Function* **2012**, 3 (8), 859-866; Ye, A. Q., *International Journal of Food Science and Technology* **2008**, 43 (3), 406-415.
154. Rivas, B. L.; Seguel, G. V., *Polyhedron* **1999**, 18 (19), 2511-2518.
155. Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K., *Vogel: Análise Química Quantitativa*. 6 ed.; Livros Tecnicos e Científicos Editora (LTC) S.A: Rio de Janeiro, 2002; p 462.
156. Wolf, M. J.; Melvin, E. H.; Garcia, W. J.; Dimler, R. J.; Kwolek, W. F., *Cereal Chemistry* **1970**, 47 (4), 437-&.
157. Haworth, W. N.; Peat, S.; Sagrott, P. E., *Nature* **1946**, 157 (3975), 19-19.
158. Mendhan, J., *Análise Química Quantitativa*. 6 ed.; LTC-Livros Técnicos e Científicos Rio de Janeiro, 2002; p 462.
159. Viol, L. C. D.; Silva, F. O.; Ferreira, D. L.; Alves, J. L. A.; Schiavon, M. A., *Química Nova* **2011**, 34 (4), 595-U41.
160. Murray, C. B.; Kagan, C. R.; Bawendi, M. G., *Annual Review of Materials Science* **2000**, 30, 545-610.
161. T. Vossmeier , L. K., M. Giersig , I. G. Popovic, K. Diesner , A. Chemseddine , A. Eychmueller , H. Weller. CdS Nanoclusters: Synthesis, Characterization, Size Dependent Oscillator Strength, Temperature Shift of the Excitonic Transition Energy, and Reversible Absorbance Shift *J. Phys. Chem.* [Online], **1994**, p. 7665–7673.
162. Gaponik, N.; Talapin, D. V.; Rogach, A. L.; Hoppe, K.; Shevchenko, E. V.; Kornowski, A.; Eychmuller, A.; Weller, H., *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, 106 (29), 7177-7185.

163. Tan, Z.-j.; Li, F.-f.; Xu, X.-l.; Xing, J.-m., *Desalination* **2012**, 286 (0), 389-393.
164. Price, G. J.; Smith, P. F., *Polymer* **1993**, 34 (19), 4111-4117.
165. Li, X. Y.; Wang, Z. Y.; Wang, L.; Walid, E.; Zhang, H., *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 51 (4), 523-530.
166. Price, G. J.; Smith, P. F., *European Polymer Journal* **1993**, 29 (2-3), 419-424.
167. Langton, N. H., *Journal of Sound and Vibration* **1969**, 10 (1), 22-31.
168. Aliyu, M.; Hopher, M. J., *Ultrasonics Sonochemistry* **2000**, 7 (4), 265-268.
169. Santacruz, S.; Andersson, R.; Åman, P., *Carbohydrate Polymers* **2005**, 59 (3), 397-400.
170. Jung, Y.-S.; Sathiya Priya, A. R.; Lim, M. K.; Lee, S. Y.; Kim, K.-J., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, 209 (2-3), 174-180.
171. Davis, H.; Skrzypek, W.; Khan, A., *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1994**, 32 (12), 2267-2274.
172. Zaia, D. A. M.; Zaia, C.; Lichtig, J., *Quimica Nova* **1998**, 21 (6), 787-793.
173. Iida, Y.; Tuziuti, T.; Yasui, K.; Towata, A.; Kozuka, T., *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2008**, 9 (2), 140-146.
174. Wang, Y.; Ju, B.; Zhang, S., *Carbohydr. Polym.* **2012**, 90 (1), 696-702.
175. Ghasem, N. M.; Al-Marzouqi, M. H., *Journal of Chemical & Engineering Data* **2011**, 56 (12), 4444-4448.
176. Iida, Y.; Tuziuti, T.; Yasui, K.; Towata, A.; Kozuka, T., *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2008**, 9 (2), 140-146.
177. Dintzis, F. R.; Bagley, E. B., *J. Rheol. (N. Y.)* **1995**, 39 (6), 1483-95.
178. de Vasconcelos, C. L.; de Azevedo, F. G.; Pereira, M. R.; Fonseca, J. L. C., *Carbohydrate Polymers* **2000**, 41 (2), 181-184.
179. Farzi, M.; Saari, M. M.; Emam-Djomeh, Z.; Mohammadifar, M. A., *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, 46 (4), 849-854.
180. Leite, D. C., Estudo teorico-experimental de complexo metalico de amilopectina. Dissertacao de mestrado - comunicacao pessoal: PPQG, UFRGS, 2013.
181. Barros neto, B. d.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E., Como fazer experimentos : pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4 ed.; Bookman: Porto Alegre, 2010; p 414; Pereira-Filho, E. R.; Poppi, R. J.; Arruda, M. A. Z., *Quimica Nova* **2002**, 25 (2), 246-253.
182. Teofilo, R. F.; Ferreira, M. M. C., *Quimica Nova* **2006**, 29 (2), 338-350.
183. Rosa, A. H.; Goveia, D.; Bellin, I. C.; Tonello, P. S.; Pereira Antunes, M. L.; Dias Filho, N. L.; Rodrigues Filho, U. P., *Quimica Nova* **2007**, 30 (1), 59-65.
184. Khasbaatar, A. D.; Ko, Y. G.; Choi, U. S., *Reactive & Functional Polymers* **2007**, 67 (4), 312-321.
185. Chen, X.; Peng, L.-H.; Shan, Y.-H.; Li, N.; Wei, W.; Yu, L.; Li, Q.-M.; Liang, W.-Q.; Gao, J.-Q., *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, 447 (1-2), 171-181.
186. Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L., *Inorganic chemistry: Principles of structure and reactivity*. 4th ed ed.; Harper Collins College Publishers: New York, 1993; p 964.
187. Saeed, A.; Iqbal, M.; Akhtar, M. W., *Journal of Hazardous Materials* **2005**, 117 (1), 65-73.
188. Yin, P. H.; Yu, Q. M.; Jin, B.; Ling, Z., *Water Research* **1999**, 33 (8), 1960-1963.
189. Zhou, D.; Zhang, L. N.; Zhou, J. P.; Guo, S. L., *Water Research* **2004**, 38 (11), 2643-2650.
190. Akar, T.; Tunali, S.; Kiran, I., *Biochemical Engineering Journal* **2005**, 25 (3), 227-235.
191. Trimukhe, K. D.; Varma, A. J., *Carbohydrate Polymers* **2008**, 71 (1), 66-73.
192. Varma, A. J.; Deshpande, S. V.; Kennedy, J. F., *Carbohydrate Polymers* **2004**, 55 (1), 77-93.

193. Martell, A. E.; Calvin, M., *Chemistry of the Metal Chelate Compounds*. Englewood Cliffs: New Jersey, 1956; p 613.
194. Burba, P.; Rocha, J.; Klockow, D., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1994**, *349* (12), 800-807.
195. Lii, C.-y.; Liao, C.-d.; Stobinski, L.; Tomasik, P., *Carbohydrate Polymers* **2002**, *49* (4), 499-507.
196. Pramanik, A.; Basu, A.; Das, G., *Polyhedron* **2010**, *29* (8), 1980-1989.
197. Lee, J. H.; Park, H. M.; Jang, S. P.; Eom, G. H.; Bae, J. M.; Kim, C.; Kim, Y.; Kim, S. J., *Inorganic Chemistry Communications* **2012**, *15*, 212-215.
198. Wang, H. Y.; Wang, P.; Huang, C.; Chang, L. X.; Wu, J.; Hou, H. W.; Fan, Y. T., *Inorganica Chimica Acta* **2011**, *378* (1), 326-332.
199. Lee, J. D., *Química Inorgânica Não Tão Concisa*. 5 ed ed.; Sao Paulo, 1996; p 527.
200. Miranda, V. R.; Carvalho, A. J. F., *Polimeros-Ciencia E Tecnologia* **2011**, *21* (5), 353-360.
201. Xie, G. R.; Shang, X. Q.; Liu, R. F.; Hu, J.; Liao, S. F., *Carbohydrate Polymers* **2011**, *84* (1), 430-438.
202. Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C., *Química Nova* **2007**, *30* (2), 481-487.
203. Ibrahim, M.; Alaam, M.; El-Haes, H.; Jalbout, A. F.; Leon, A. d., *Eclética Química* **2006**, *31* (3), 8.
204. Silverstein, R. M., *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7 ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2007; p 490.
205. Santos, J. C. d.; Pedrosa, A. M. G.; Mesquita, M. E., *Química Nova* **2011**, *34* (8), 4.
206. Silva, G. R. O.; Santos, J. C.; Martinelli, D. M. H.; Pedrosa, A. M. G.; Souza, M. J. B. d.; Melo, D. M. A., *Materials Sciences and Applications* **2010**, *1*, 7.
207. Bera, M.; Patra, A., *Carbohydrate Research* **2011**, *346* (14), 2075-2083.
208. Zimm, B. H.; Stockmayer, W. H., *Journal of Chemical Physics* **1949**, *17* (12), 1301-1314.
209. Biliaderis, C. G.; Arvanitoyannis, I.; Izydorczyk, M. S.; Prokopowich, D. J., *Starch-Starke* **1997**, *49* (7-8), 278-283.
210. Karkalas, J.; Ma, S.; Morrison, W. R.; Pethrick, R. A., *Carbohydrate Research* **1995**, *268* (2), 233-247.



**ANEXO 1.** Concentrações molares dos sais utilizados no planejamento fatorial, de acordo com a Tabela V.

Sal	Concentração Molar (mol.L <sup>-1</sup> )		
	Experimentos 1-4 (0,4 g.L <sup>-1</sup> )	Experimentos 5-8 (0,8 g.L <sup>-1</sup> )	Experimento 9 (0,6 g.L <sup>-1</sup> )
<b>PbCl<sub>2</sub></b>	1,4.10 <sup>-3</sup>	2,9.10 <sup>-3</sup>	2,1.10 <sup>-3</sup>
<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	1,2.10 <sup>-3</sup>	2,4.10 <sup>-3</sup>	1,8.10 <sup>-3</sup>
<b>FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	1,5.10 <sup>-3</sup>	3,0.10 <sup>-3</sup>	2,2.10 <sup>-3</sup>
<b>Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O</b>	1,0.10 <sup>-3</sup>	2,0.10 <sup>-3</sup>	1,5.10 <sup>-3</sup>
<b>CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	2,3.10 <sup>-3</sup>	4,7.10 <sup>-3</sup>	3,5.10 <sup>-3</sup>
<b>Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O</b>	1,6.10 <sup>-3</sup>	3,3.10 <sup>-3</sup>	2,5.10 <sup>-3</sup>
<b>Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	2,0.10 <sup>-3</sup>	4,0.10 <sup>-3</sup>	3,0.10 <sup>-3</sup>
<b>Cr<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>7</sub>(OH)<sub>2</sub></b>	6,6.10 <sup>-4</sup>	1,3.10 <sup>-3</sup>	9,9.10 <sup>-4</sup>
<b>Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O</b>	1,0.10 <sup>-3</sup>	2,0.10 <sup>-3</sup>	1,5.10 <sup>-3</sup>
<b>NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	1,7.10 <sup>-3</sup>	3,4.10 <sup>-3</sup>	2,5.10 <sup>-3</sup>
<b>Ni(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</b>	1,6.10 <sup>-3</sup>	3,2.10 <sup>-3</sup>	2,4.10 <sup>-3</sup>
<b>CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O</b>	1,7.10 <sup>-3</sup>	3,3.10 <sup>-3</sup>	2,5.10 <sup>-3</sup>

**ANEXO 2.** Cálculos utilizados para quantificar o percentual de complexação através da titulação complexométrica

$$n_{\text{titulante}} = n_{\text{titulado}} \quad \text{onde} \quad n_{\text{titulante}} = M_{\text{titulante}} \cdot V_{\text{gasto}}$$

$$m_{\text{i metal}} = m_{\text{sal}} \cdot X_{\text{metal}} \quad m_{\text{f metal}} = n_{\text{titulante}} \cdot \bar{M}_{\text{metal}}$$

$$y \% = \frac{(m_{\text{i metal}} - m_{\text{f metal}}) \cdot 100}{m_{\text{i metal}}}$$

Onde:

$n_{\text{titulante}}$  = nº mols do titulante

$n_{\text{titulado}}$  = nº mols titulado (íon metálico)

$M_{\text{titulante}}$  = molaridade do titulante

$V_{\text{gasto}}$  = volume gasto do titulante (bureta)

$m_{\text{i metal}}$  = massa inicial do metal

$m_{\text{sal}}$  = massa do sal

$X_{\text{metal}}$  = fração molar do metal no sal

$m_{\text{f metal}}$  = massa final do metal

$y \%$  = percentual de complexação do íon metálico com o EDTA

**ANEXO 3.** Análises de Variância para cada sal de acordo com os resultados do planejamento fatorial.

**- Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**

**Análise de Variância - Modelo Linear**

<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>
<b>Regressão</b>	410		01,4	,408 ,3
<b>Resíduos</b>	51		3,66	
<b>F. Ajuste</b>	49,1		49,1	62 <b>G</b>
<b>Erro Puro</b>	,901		,951	
<b>Total</b>	380	0		
% variação explicada				02,2
% máx. de variação explicável				9,86

**- Cr(CH<sub>3</sub>COO)<sub>7</sub>(OH)<sub>2</sub>**

**Análise de Variância - Modelo Linear**

<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>
<b>Regressão</b>	136		62,3	6,93 <b>G</b>
<b>Resíduos</b>	0,37		,458	
<b>F. Ajuste</b>	0,34		0,34	66,9 <b>G</b>
<b>Erro Puro</b>	,036		,018	
<b>Total</b>	82,8	0		
% variação explicada				15,6
% máx. de variação explicável				00

**- Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>****Análise de Variância - Modelo Linear**

<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>	
<b>Regressão</b>	24,3		4,9	,822	,6
<b>Resíduos</b>	73,4		1,15		
<b>F. Ajuste</b>	73,4		73,4	438	<b>G</b>
<b>Erro Puro</b>	,065		,032		
<b>Total</b>	30,4	0			
% variação explicada				1,79	
% máx. de variação explicável				9,99	

**- FeCl<sub>3</sub>****Análise de Variância - Modelo Linear**

<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>	
<b>Regressão</b>	25,7		0,94	,732	,7
<b>Resíduos</b>	14,4		8,6		
<b>F. Ajuste</b>	14,3		7,14	51,8	<b>G</b>
<b>Erro Puro</b>	,12		,06		
<b>Total</b>	40	0			
% variação explicada				2,34	
% máx. de variação explicável				9,95	

- CoCl<sub>2</sub>

## Análise de Variância - Modelo Linear

FV	Q	GL	Q	calc.
Regressão	64		3,43	3,64 <b>G</b>
Resíduos	,972		,991	
F. Ajuste	,877		,877	,428 ,2
Erro Puro	,095		,548	
<b>Total</b>	62,7	0		
% variação explicada				00,8
% máx. de variação explicável				9,33

- Ni(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>

## Análise de Variância - Modelo Linear

FV	Q	GL	Q	calc.
Regressão	83,8		0,54	8,98 <b>G</b>
Resíduos	,763		,588	
F. Ajuste	,197		,197	,251 ,7
Erro Puro	,566		,783	
<b>Total</b>	35,4	0		
% variação explicada				20,6
% máx. de variação explicável				9,33

**- NiCl<sub>2</sub>****Análise de Variância - Modelo Linear**

	<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>	
<b>Regressão</b>		13,5		9,08	,086	,3
<b>Resíduos</b>		4,95		8,32		
<b>F. Ajuste</b>		2,23		2,23	0,59	<b>G</b>
<b>Erro Puro</b>		,714		,357		
<b>Total</b>		98	0			
% variação explicada					3,05	
% máx. de variação explicável					9,45	

**- Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>****Análise de Variância - Modelo Linear**

	<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>	
<b>Regressão</b>		4,51		2,42	,937	,2
<b>Resíduos</b>		6,91		,228		
<b>F. Ajuste</b>		,919		,959	,418	,4
<b>Erro Puro</b>		,994		,497		
<b>Total</b>		1,42	0			
% variação explicada					1,5	
% máx. de variação explicável					2,35	

**- Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>****Análise de Variância - Modelo Linear**

<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>	
<b>Regressão</b>	049		49,9	,135	,3
<b>Resíduos</b>	10,6		0,19		
<b>F. Ajuste</b>	07,4		07,4	30,6	<b>G</b>
<b>Erro Puro</b>	,175		,588		
<b>Total</b>	163	0			
% variação explicada				0,22	
% máx. de variação explicável				9,73	

**- CuCl<sub>2</sub>****Análise de Variância - Modelo Linear**

<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>	
<b>Regressão</b>	3,83		,691	,631	,4
<b>Resíduos</b>	4,14		,714		
<b>F. Ajuste</b>	2,47		2,47	4,89	,1
<b>Erro Puro</b>	,674		,837		
<b>Total</b>	7,69	0			
% variação explicada				9,53	
% máx. de variação explicável				7,53	

**- Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>****Análise de Variância - Modelo Linear**

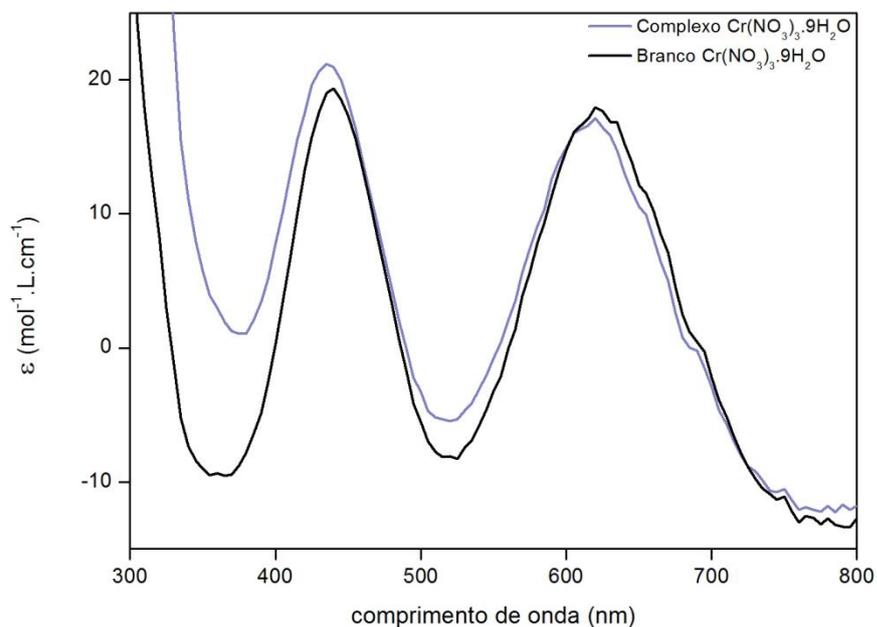
<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>	
<b>Regressão</b>	6,28		1,05	,831	,3
<b>Resíduos</b>	4,13		,031		
<b>F. Ajuste</b>	4,58		,289	,527	,4
<b>Erro Puro</b>	,548		,774		
<b>Total</b>	0,4	0			
% variação explicada				3,31	
% máx. de variação explicável				9,44	

**- PbCl<sub>2</sub>****Análise de Variância - Modelo Linear**

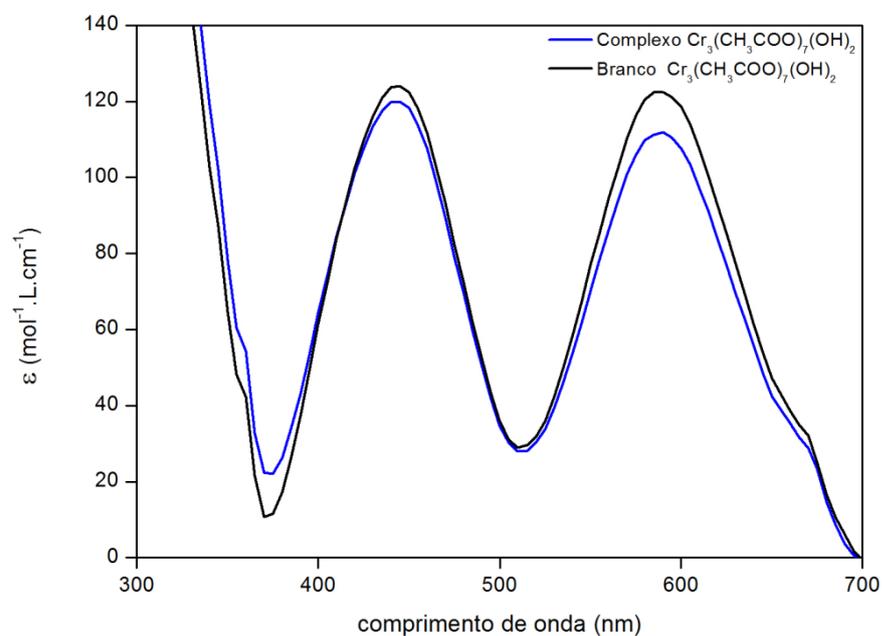
<b>FV</b>	<b>Q</b>	<b>GL</b>	<b>Q</b>	<b>calc.</b>	
<b>Regressão</b>	61,7		7,38	8,39	<b>G</b>
<b>Resíduos</b>	,95		,317		
<b>F. Ajuste</b>	,43		,43	3,19	,1
<b>Erro Puro</b>	,52		,26		
<b>Total</b>	54,2	0			
% variação explicada				02,9	
% máx. de variação explicável				9,8	

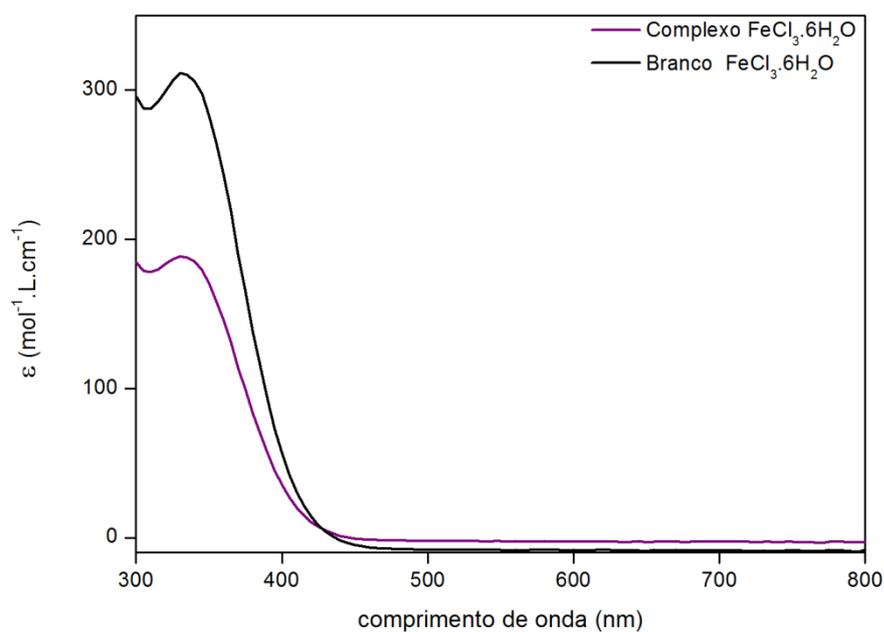
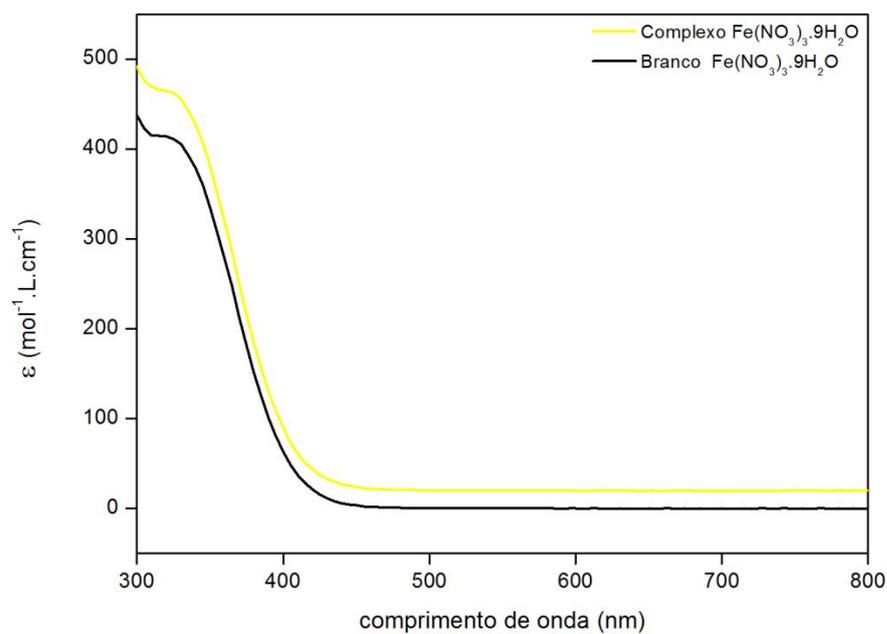
**ANEXO 4:** Sobreposição dos espectros eletrônicos das soluções salinas (brancos) e dos complexos.

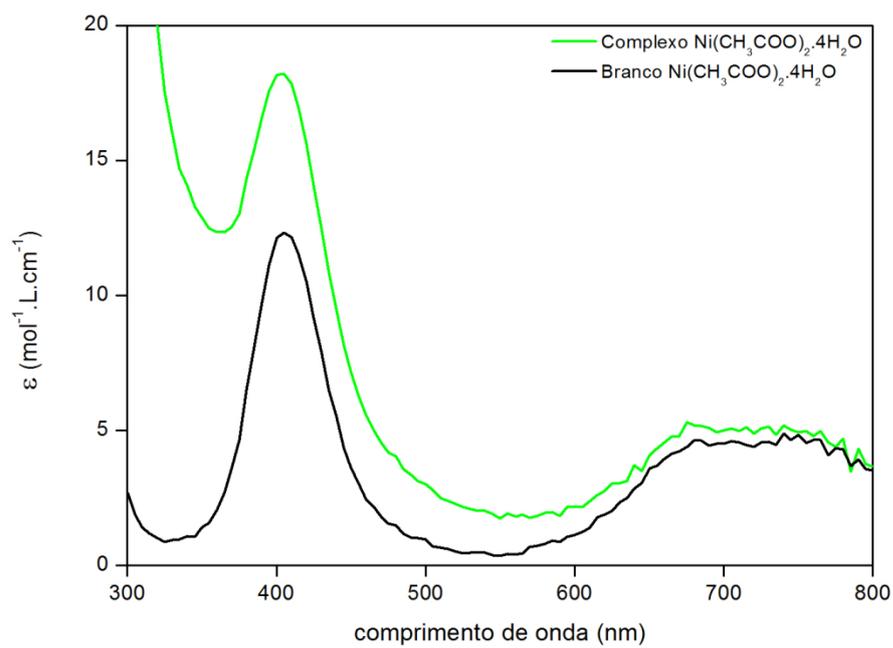
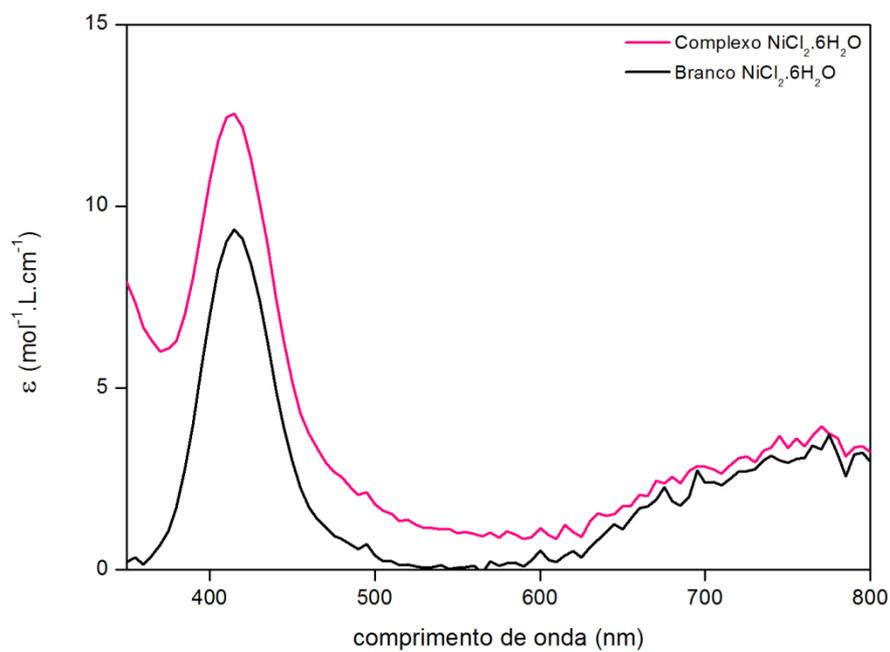
-  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 - d^3$

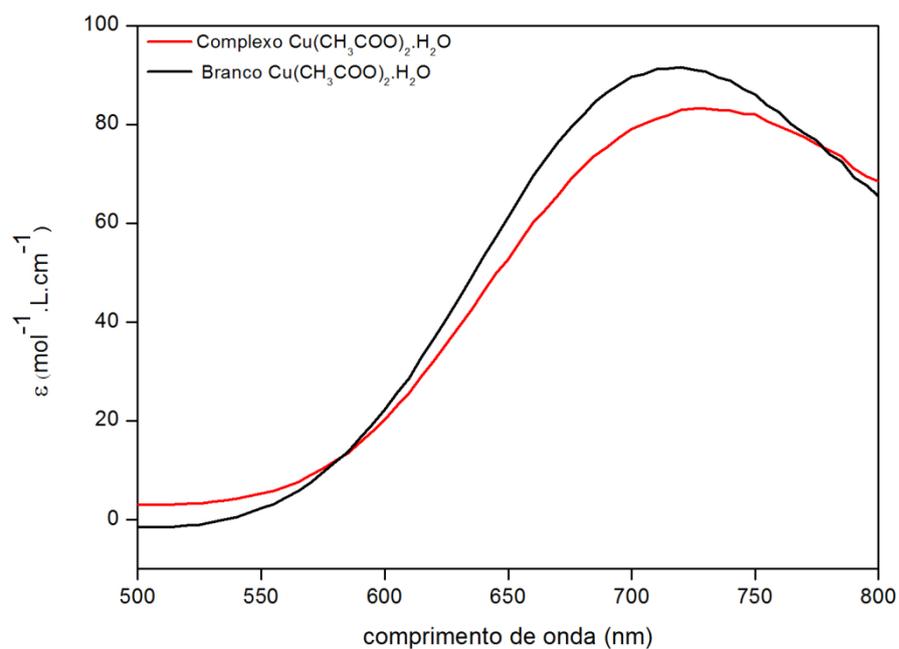
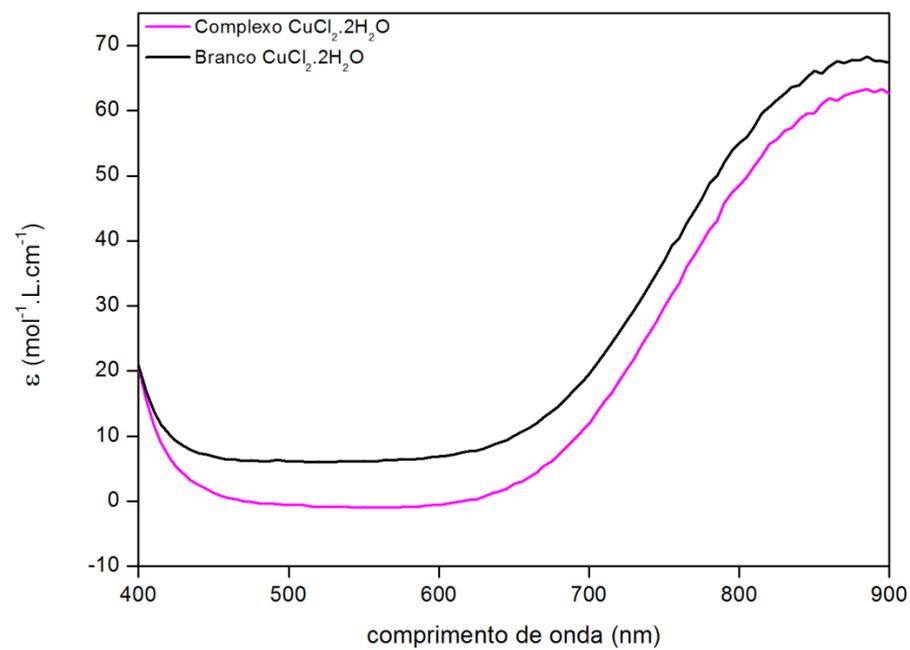


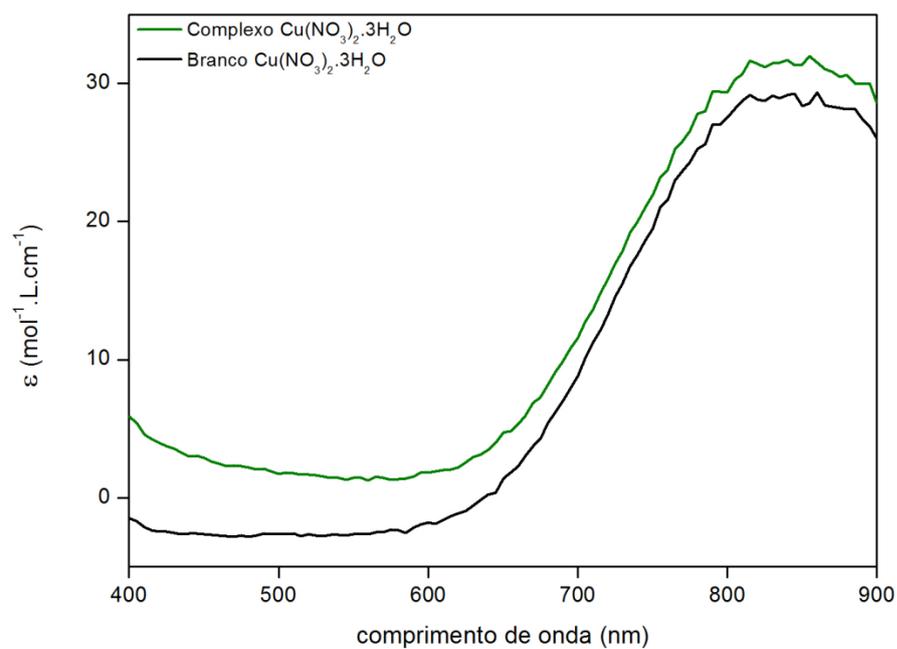
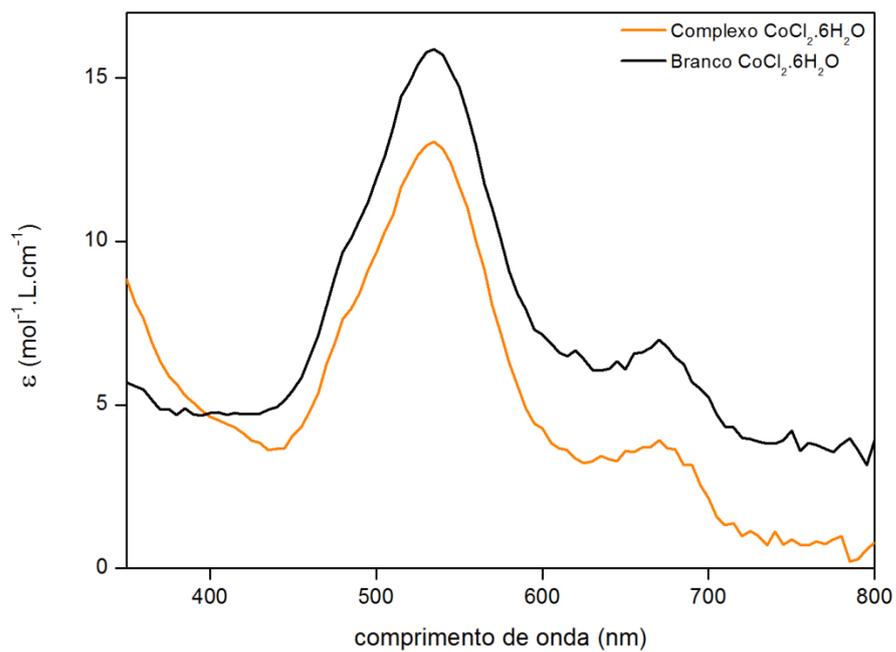
-  $\text{Cr}_3(\text{CH}_3\text{COO})_7(\text{OH})_2 - d^3$



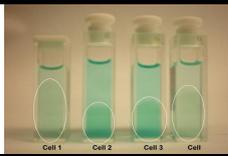
**- FeCl<sub>3</sub> – d<sup>5</sup>****- Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> – d<sup>5</sup>**

**- Ni(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> - d<sup>8</sup>****- NiCl<sub>2</sub> - d<sup>8</sup>**

**- Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> - d<sup>9</sup>****- CuCl<sub>2</sub> - d<sup>9</sup>**

**- Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> – d<sup>9</sup>****- CoCl<sub>2</sub> – d<sup>7</sup>**

**ANEXO 5:** Valores das massas moleculares dos complexos de  $\text{Cu}(\text{COOH})_2$ , obtidas através da intensidade, a 30 °C.

<b>I abs</b>	$1,19 \times 10^{-5}$	
<b>K</b>	$1,88 \times 10^{-7}$	
<b>F</b>	0,95	
<b>Dark</b>	0,081	

	<b>30°C</b>	<b>Cell 1 #ND2</b>	<b>Cell 2 #ND2</b>	<b>Cell 3 #ND2</b>	<b>Cell 4 #ND2</b>
<b>Solvente</b>		0.0953317	0.10423935	0.092992558	0.097402637
<b>Tolueno</b>		0.14809886	0.1723767	0.12155302	0.13648195

<b>[Amidex] mg.mL<sup>-1</sup></b>	0.00066	0.00066	0.00066	0.00066
<b>[Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>] g.L<sup>-1</sup></b>	0.8	1.6	1.6	0.8

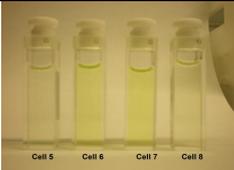
<b>Média do Amidex puro</b>	0.51817587	0.581436	0.31817521	0.44458087
<b>Média do Amidex com sal (Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>)</b>	2.3261	7.8986	3.3708	1.6408
<b>Média do Amidex com sal (1 Mix)</b>	7.9937	5.2358	3.554	5.9571

<b>Intensidade do Amidex puro</b>	$7.12 \times 10^{-5}$	$5.90 \times 10^{-5}$	$6.28 \times 10^{-5}$	$7.07 \times 10^{-5}$
<b>Intensidade do Amidex com sal (Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>)</b>	$3.76 \times 10^{-4}$	$9.64 \times 10^{-4}$	$9.14 \times 10^{-4}$	$3.14 \times 10^{-4}$
<b>Intensidade do Amidex com sal (1<sup>o</sup> Mix)</b>	$1.33 \times 10^{-3}$	$6.35 \times 10^{-4}$	$9.65 \times 10^{-4}$	$1.19 \times 10^{-3}$

<b>Mw do Amidex puro</b>	$5.74 \times 10^5$	$4.76 \times 10^5$	$5.06 \times 10^5$	$5.70 \times 10^5$
<b>Mw do Amidex com sal</b>	$3.03 \times 10^6$	$7.77 \times 10^6$	$7.36 \times 10^6$	$2.53 \times 10^6$
<b>Mw do Amidex com salt (1<sup>o</sup> Mix)</b>	$1.07 \times 10^7$	$5.12 \times 10^6$	$7.78 \times 10^6$	$9.62 \times 10^6$

<b>Proporção da Mw do Amidex com adição do sal (Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>)/Amidex puro (sem mistura)</b>	5.276	16.334	14.556	4.446
<b>Proporção da Mw do Amidex com sal (1<sup>o</sup> Mix)/Amidex puro</b>	18.679	10.754	15.370	16.878

**ANEXO 6:** Valores das massas moleculares dos complexos de  $\text{CuCl}_2$ , obtidas através da intensidade, a  $30^\circ\text{C}$ .

<b>I abs</b>	1.19E-05	
<b>K</b>	1.88E-07	
<b>F</b>	0.95	
<b>Dark</b>	0.081	

<b>30°C</b>	<b>Cubeta 5 #ND1</b>	<b>Cubeta 6 #ND1</b>	<b>Cubeta 7 #ND1</b>	<b>Cubeta 8 #ND1</b>
<b>Solvente</b>	0.20311064	0.22929785	0.26783565	0.22799256
<b>Tolueno</b>	0.55306994	0.89949656	0.7164791	0.65583742

<b>[Amidex] mg.mL<sup>-1</sup></b>	0.00066	0.00066	0.00066	0.00066
<b>[CuCl<sub>2</sub>] g.L<sup>-1</sup></b>	0.8	1.6	1.6	0.8

<b>Média do Amidex puro</b>	2.4605858	3.7909274	3.8381737	3.7601231
<b>Média do Amidex com sal (CuCl<sub>2</sub>)</b>	2.495	3.5495	3.4506	3.5242

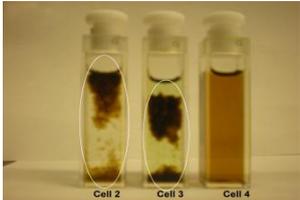
<b>Intensidade do Amidex puro</b>	$5.41 \times 10^{-5}$	$4.92 \times 10^{-5}$	$6.35 \times 10^{-5}$	$6.95 \times 10^{-5}$
<b>Intensidade do Amidex com sal (CuCl<sub>2</sub>)</b>	$5.49 \times 10^{-5}$	$4.59 \times 10^{-5}$	$5.66 \times 10^{-5}$	$6.48 \times 10^{-5}$

<b>Mw do Amidex puro</b>	$4.36 \times 10^5$	$3.96 \times 10^5$	$5.12 \times 10^5$	$5.60 \times 10^5$
<b>Intensidade do Amidex com sal (1<sup>o</sup> Mix)</b>	$4.42 \times 10^5$	$3.70 \times 10^5$	$4.56 \times 10^5$	$5.22 \times 10^5$

<b>Proporção da Mw do Amidex com sal (1<sup>o</sup> Mix)/Amidex puro</b>	1.015	0.932	0.891	0.933
--	-------	-------	-------	-------

**ANEXO 7:** Valores das massas moleculares dos complexos de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , obtidas através da intensidade, a  $50^\circ\text{C}$ .

<b>I abs</b>	1.19E-05
<b>K</b>	1.88E-07
<b>F</b>	0.95
<b>Dark</b>	0.081



<b>50°C</b>	<b>Cubeta 2 #ND2</b>	<b>Cubeta 3 #ND2</b>	<b>Cubeta 4 #ND2</b>
<b>Solvente</b>	0.1383	0.09299256	0.097402637
<b>Tolueno</b>	0.0936	0.12155302	0.13648195
<b>[Amidex] mg.mL<sup>-1</sup></b>	0.00066	0.00066	0.00066
<b>[Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>] g.L<sup>-1</sup></b>	0.8	1.6	0.8
<b>Média Amidex puro</b>	0.48513456	0.36364014	0.17203754
<b>Média do Amidex com sal (Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>)</b>	8.6889	6.9948	0.34959
<b>Intensidade para o Amidex pure</b>	$3.11 \times 10^{-4}$	$7.54 \times 10^{-5}$	$1.52 \times 10^{-5}$
<b>Intensidade para o Amidex com o sal</b>	$7.67 \times 10^{-3}$	$1.92 \times 10^{-3}$	$5.14 \times 10^{-5}$
<b>Mw Amidex puro</b>	$2.51 \times 10^6$	$6.08 \times 10^5$	$1.23 \times 10^5$
<b>Mw do Amidex com sal</b>	$6.18 \times 10^7$	$1.55 \times 10^7$	$4.14 \times 10^5$
<b>Proporção da Mw do Amidex com sal /Amidex puro</b>	24.653	25.501	3.379