Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Proteínas com funcionalidade mecânica: um estudo físico-químico sobre a viscoelasticidade da gliadina, uma proteína de reserva do glúten do trigo

Angela Maria Ferreira Monteiro

Tese de Doutorado

Profa. Dra. Elizabeth Pinheiro Gomes Arêas

Orientadora

São Paulo

2004

“Proteínas com funcionalidade mecânica: um estudo físico-químico sobre a viscoelasticidade da gliadina, uma proteína de reserva do glúten do trigo”

ANGELA MARIA FERREIRA MONTEIRO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química – Área: Físico-Química.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. ELIZABETH PINHEIRO GOMES ARÊAS
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. MARIA TERESA MACHINI DE MIRANDA
IQ – USP

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ – USP

Prof. Dr. MARCELO HENRIQUE GEHLEN
IQSC – USP

Prof. Dr. LUIZ ALBERTO COLNAGO
EMBRAPA – São Carlos

SÃO PAULO
04 de AGOSTO 2004

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que contribuíram com seu afeto, dedicação, companheirismo, amizade, apoio, compreensão, estímulo e amor. Em especial àquelas que, com mais do que isto, contribuíram com sacrifícios pessoais, quer seja pela distância suportada durante todo o tempo desta jornada, ou pela consideração além do dever: ao meu esposo, à minha mãe e à Beth.

Agradecimentos

À orientadora e amiga, Elizabeth Arêas.

Ao Marcelo, pelos ensinamentos, principalmente em informática.

Aos Professores e equipes de laboratório, os quais participaram do desenvolvimento desta Tese: Profa. Teresa e Cleber; Prof Omar e Paulo; Profa. Rosângela e Evandro; Prof. Arêas e Clarice; Prof. Yoshio e Laércio.

Ao Prof. Bruns, pela dedicação à análise estatística dos resultados experimentais.

Aos Coordenadores do Projeto Capes-Cofecub, Rosângela Itri (Brasil) e Carlos Marques (França), pelo Doutorado Sandwich na Universidade Louis Pasteur - CNRS / Strasbourg.

À Profa. Sílvia e colegas de laboratório, pelo carinho contagiante.

À Eva, pelos ensinamentos de vida.

Aos colegas Eliane e Luciano, pela alegria da juventude e dos sonhos por realizar.

A CAPES, pelo apoio financeiro recebido.

Resumo

A tese consistiu no estudo por técnicas reológicas da dinâmica de géis e dispersões da gliadina do glúten do trigo em meios de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e formamida puros e em suas misturas com a água. Investigou-se o efeito da temperatura e das concentrações das espécies componentes (proteína e constituintes dos sistemas solventes) sobre o comportamento de fluxo e de deformação dos sistemas. Foram realizados testes em regime estacionário, ensaios transientes e ensaios dinâmicos (oscilatórios).

A caracterização da proteína nos diversos meios foi realizada através de técnicas de espalhamento de luz dinâmico e estático e de espalhamento de raios X em baixos ângulos. Esses recursos permitiram descrever a distribuição de populações da proteína nos géis e dispersões, em suas formas livres ou associadas, assim como estimar aspectos de tamanho e mobilidade a partir da determinação dos raios hidrodinâmicos e coeficientes de difusão. As composições de aminoácidos da gliadina, na fração bruta e em uma fração isolada em meio etanólico, foram determinadas por técnicas de CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Um isolamento preliminar das sub-frações de gliadina foi obtido por outra técnica cromatográfica (FPLC – Fast Polymer Liquid Chromatography).

Foram ainda desenvolvidos estudos relativos ao efeito de gliadina sobre a bicamada lipídica de vesículas gigantes de fosfolipídio, através da técnica de aspiração por micropipetas, com monitoramento por vídeo-microscopia. O objetivo foi o de se verificar o eventual efeito da proteína sobre a constante de elasticidade, k_c , da bicamada.

Os resultados obtidos podem ser resumidos como se segue:

- a) o comportamento viscoelástico apresentado pela gliadina mostrou dependência com a natureza e a composição do meio de dispersão. Foi verificada a ocorrência de comportamento tixotrópico ou reopéxico como função da temperatura e um comportamento cíclico para a viscosidade em função do tempo.
- b) foi possível correlacionar alguns aspectos da estrutura molecular e polaridade do solvente com a maior ou menor capacidade de formação de gel de gliadina: solventes com regiões apolares mais expressivas, como DMSO e DMF ($\epsilon = 47,24$ e $38,25$, respectivamente) induzem a formação de géis rígidos, enquanto um composto como formamida, destituído de um domínio apolar minimamente significativo e ϵ maior que o da água ($\epsilon = 84$), tem capacidade significativamente menor de promover a formação de géis com as mesmas características de rigidez.

- c) os géis são formados por unidades com raios de giro da ordem de $15\text{\AA}$, além de agregados de tamanhos bem maiores. Considerando-se a massa molar média de 32 350 g/mol para a gliadina em nossa amostra, é de se supor que a proteína encontre-se muito compactada no gel (considere-se que lisozima, com massa molar muito menor, igual a 14300 g/mol, possui raio de giro nesse mesmo valor). Um modelo de enovelamento interpenetrante, proposto em nosso grupo através de métodos de dinâmica molecular para a conformação da gliadina, seria assim compatível com essas observações experimentais.
- d) gliadina ω , seletivamente extraída por tratamento com etanol, mostrou-se capaz de reduzir a elasticidade de membranas de microvesículas de fosfolipídios, aumentando o valor de sua constante de curvatura k_c . Um efeito de saturação foi observado, para razões de massa gliadina/DOPC $\sim 2\text{-}3\%$.
- e) coeficientes de difusão para dispersões de gliadina são da ordem de $10^{-10}\text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$, com raios hidrodinâmicos na faixa nm- μm . Duas populações dinamicamente distintas foram identificadas nos géis de gliadina.
- f) o grau de polidispersão e o tamanho dos agregados mostraram dependência com a concentração da proteína nos géis: são gerados agregados menores (diminuição da massa molar média) em tamanhos mais uniformes (menor polidispersão), com o aumento da concentração de gliadina. Essa mesma tendência de variação é observada como função do tempo, indicando a ocorrência de rearranjos estruturais na fase de envelhecimento dos géis.

Abstract

The thesis consisted in a rheological study of the dynamics of gels and dispersions of gliadin from wheat gluten in pure dimethylsulfoxide, dimethylformamide or formamide and in their mixtures with water. The effect of temperature and that of the concentration of the component species (protein and solvent constituents) on flow behavior and deformation were evaluated. Steady-state, transient and dynamical (oscillatory) tests were performed.

Protein characterization in the various media was performed through dynamic and static light scattering and small angle X ray scattering techniques. The application of techniques allowed to describe the distribution of protein populations in the gels and dispersions, in their free and associated forms, as well as to estimate their size and mobility, through the determination of the hydrodynamical radii and diffusion coefficients. The amino acid compositions of gliadin, both in the crude protein and in an isolated fraction in ethanol, were determined by HPLC technique. A preliminary isolation procedure of gliadin sub-fractions was achieved by another chromatographic technique (FPLC).

The effect of gliadin on the phospholipid bilayer of giant vesicles was studied through the technique of micropipet aspiration coupled to videomicroscopy. The aim was to verify the possible effect of protein on the elasticity constant, k_c , of the bilayer.

Results obtained can be summarized as follows:

- a) the viscoelastic behavior presented by gliadin was found to be dependent on the nature and composition of the dispersing media. Temperature-dependent tixotropic or rheopexic behavior were observed, as well as a cyclic behaviour for viscosity as a function of time.
- b) it was possible to correlate some aspects of solvent molecular structure and polarity with its greater or lesser capacity of gel formation: solvents with more expressive apolar regions, such as DMSO and DMF ($\epsilon = 47,24$ and $38,25$, respectively) induce formation of rigid gels, whereas a compound such as formamide, devoid of a minimally significant apolar domain and ϵ greater than that of water ($\epsilon = 84$), is significantly less able to promote gel formation with the same characteristics of rigidity.
- c) gels are formed by units with gyration radius around $15\text{\AA}$ and also by aggregates of greater size. Considering that the average molar mass in our sample for gliadin is 32350, one can assume that the protein is very densely packed in the gel (consider for instance that lysozyme, with a much lower molar mass, 14300 g/mol, has a gyration radius of this same size). A compact, interpenetrating folding model for gliadin, developed in our group through molecular dynamics, is compatible with such experimental observations.

- d) ω gliadin, selectively extracted in ethanol, was found to be able to reduce membrane elasticity of phospholipid microvesicles, by increasing its elastic curvature constant k_c . A saturation effect was observed, for a mass ratio as low as gliadin/DOPC $\sim 2-3\%$.
- e) diffusion coefficients for gliadin dispersions are circa $10^{-10} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$, with hydrodynamical radii in the nm- μm range. Two dynamically distinct populations are identified in the gliadin gels.
- f) gel polydispersity and aggregate size depend on protein concentration: smaller aggregates (lower average molar mass) of more uniform sizes are produced for increasing gliadin concentration. Variation with time followed the same pattern, indicating that structural rearrangements take place during gel aging.

Índice

I – Introdução	1
1 – Objetivos.....	1
2 – Desenvolvimentos experimentais	1
3 – Algumas considerações sobre o sistema de estudo	2
4 – Estrutura da Tese	3
5 – Bibliografia.....	4
 II – Reologia	5
1 – Introdução.....	5
1.1 - Considerações gerais	5
1.2 - Reologia de biocolóides	6
1.3 - Modelos de viscoelasticidade do glúten.....	7
2 - Alguns conceitos e principais grandezas reológicas envolvidas neste estudo	11
2.1 - Testes estáticos	12
2.1.1 - Comportamento ou fluido newtoniano.....	12
2.1.2 - Fluidos não-newtonianos.....	13
2.1.2.1 - Fluidos dilatantes.....	14
2.1.2.2 - Fluidos pseudoplásticos.....	14
2.1.2.3 - Fluidos plásticos	15
2.1.2.4 - Dependência temporal	16
2.1.2.4.1 - Fluidos tixotrópicos	16
2.1.2.4.2 - Fluidos reopéxicos	16
2.1.3 - Comportamentos ideais	17
2.1.4 - Comportamento viscoelástico	18
2.1.4.1 - Modelo de Maxwell.....	19
2.1.4.2 - Modelo de Kelvin-Voigt.....	20
2.1.4.3 - Modelo de Burgers	20
2.1.4.4 - Viscoelasticidade linear (LVE)	21
2.2 - Testes transientes.....	21
2.2.1 - Teste de relaxação	21
2.2.2 - Teste de ‘creep’ ou fluência	23
2.3 - Testes dinâmicos	27
2.3.1 - Varredura de amplitude com a frequência constante	31
2.3.1.1 - Varredura de amplitude de deformação.....	31
2.3.1.2 - Varredura de amplitude de tensão	32
2.3.2 - Varredura de frequência com amplitude de deformação constante.....	32
2.3.2.1 - Varredura de frequência de deformação.....	32
2.3.2.2 - Varredura de frequência de tensão	33
2.3.2.3 - Substâncias viscoelásticas com a deformação dependente da frequência	33
2.3.2.3.1 – Sistemas de baixa massa molar e baixa polidispersão	33
2.3.2.3.2 - Sistemas polidispersos e substâncias com massas molares mais elevadas..	35
2.3.2.3.3 - Substâncias viscoelásticas com ligações cruzadas	37
2.4 - Dependência da viscosidade com outras variáveis.....	38
2.4.1 - Com a massa molar	38
2.4.2 - Com a temperatura	38

3 - Materiais e Métodos	39
4 – Resultados e discussão	42
4.1 - Testes rotacionais - Curvas de fluxo – Energia de ativação.....	42
4.1.1 - Gliadina em DMSO.....	42
4.1.2 - Gliadina em formamida.....	48
4.1.3 – Gliadina em DMF.....	49
4.1.4 - Dependência cíclica da viscosidade com o tempo	50
4.2 – Testes dinâmicos – Varredura de amplitude.....	53
4.3 - Testes dinâmicos – Varredura de frequência	58
4.4 - Testes Transientes	61
4.4.1 – Tempo de relaxação	61
4.4.2 – ‘Creep’ ou fluência	63
4.5 - Sistemas ternários.....	68
5 – Conclusões.....	79
6 – Bibliografia.....	81
 III - Gliadina em Sistemas Organizados	83
1 - Vesículas de fosfolípidios	83
2 - Doença celíaca e as proteínas do glúten.....	85
3 – Fundamentos da técnica de aspiração de microvesículas	87
4 – Fase lamelar.....	91
5 – Metodologia.....	93
5.1 - Geração das vesículas.....	93
5.1.1 - Solução do fosfolípido	94
5.1.2 -Aplicação do fosfolípido sobre a lâmina metalizada/espaçadores	94
5.1.3 - Secagem do HCCl_3	95
5.1.4 - Solução de sacarose 0,1M	95
5.1.5 - Aplicação da tensão elétrica	95
5.2 - Confecção das micropipetas.....	96
5.2.1 - Limpeza dos capilares	96
5.2.2 - Extrusão das micropipetas.....	96
5.3 - Manipulação das vesículas	97
5.3.1 - Transferência das vesículas	97
5.3.2 - Solução de glicose	98
5.3.3 - Tempo de decantação	99
5.3.4 - Medição da pressão 0 e do L0	99
5.3.5 - Medição da série de depressões/tempo de estabilização	101
5.4 - Preparação da fase lamelar	102
5.4.1 - Verificação das propriedades físicas de micro-vesículas de fosfolípidios, derivados da fosfatidilcolina, em presença de meio anisotrópico de C_{12}E_5 e em meio de gliadina	102
5.4.1.1 - Determinação da melhor concentração de solução de C_{12}E_5 para a manipulação da fase lamelar, em função da temperatura de transição	102
6- Resultados e discussão	103
6.1 – Sistema de gliadina em vesículas de fosfolípidios.....	103
6.2 - Fase lamelar.....	107
6.3 - Geração de vesícula em presença de fase lamelar.....	109

7 – Conclusão	110
8 – Bibliografia	112
IV – Proteínas do glúten – Gliadinas – Composição e Estrutura.....	114
1 – Composição	114
1.1 – Ocorrência e composição.....	114
1.2 – Procedimento de separação e caracterização de sub-unidades do glúten.....	116
1.2.1 – Algumas propriedades gerais de proteínas	116
1.2.2 – Isolamento das frações do glúten.....	117
1.2.3 – Sub-fracionamento das gliadinas	119
1.2.3.1 – Cromatografia por FPLC	119
1.2.3.2 – Teste da ninidrina.....	121
2 – Características estruturais e comportamento físico-químico das proteínas do glúten..	121
2.1 – Fracionamento, composição e seqüência de aminoácidos das proteínas do glúten do trigo.....	123
2.2 – Comportamento em solução das proteínas de cereais	125
2.2.1 – Dispersões de proteínas: aspectos termodinâmicos.....	127
2.2.2 – Estabilidade coloidal e a teoria DLVO	130
2.2.3 – Hidrofobicidade	132
2.3 – Fundamento das técnicas óticas empregadas no estudo estrutural	135
2.3.1 – Espalhamento de raios-X de baixo ângulo – SAXS	135
2.3.2 – Espalhamento de luz	138
2.3.2.1 – Espalhamento de luz estático	138
2.3.2.2 – Espalhamento de luz dinâmico (espalhamento quasi-elástico ou de correlação de fótons).....	143
3 – Metodologia.....	144
3.1 – Separação das gliadinas por FPLC	144
3.2 – Análise das gliadinas	146
3.2.1 – Teste qualitativo com ninidrina	146
3.2.2 – Composição de aminoácidos	146
3.3 – Solubilização.....	147
3.4 – Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).....	147
3.5 – Espalhamento de luz.....	148
4 – Resultados e discussão	150
4.1 – Separação das frações da gliadina por FPLC	150
4.2 – Teste qualitativo com ninidrina	153
4.3 – Quantificação de aminoácidos	153
4.4 – Solubilização da gliadina em solventes orgânicos.....	157
4.5 – Espalhamento de raios X a baixos ângulos (técnica SAXS)	158
4.6 – Espalhamento de luz quasi elástico	161
4.7 – Espalhamento de luz estático.....	165
5 – Conclusões.....	166
6 – Bibliografia.....	168
V - Conclusões gerais e perspectivas.....	172

Índice de Figuras

II - Reologia

Fig. 2.1 - Enovelamento interpenetrante em modelo de ω -gliadina	8
Fig. 2.2 - Segundo Belton ¹² : a deformação proposta para o mecanismo de deformação do glúten	10
Fig. 2.3 - Curvas de fluxo para comportamentos característicos	12
Fig. 2.4 - Escoamento viscoso	13
Fig. 2.5 - Comportamento dos fluidos: variação da viscosidade com a taxa de Cisalhamento.....	14
Fig. 2.6 - Comportamento dos fluidos: variação da viscosidade com o tempo	16
Fig. 2.7 - Sistema de sólido ideal – lei de Hooke (a) e de líquido ideal – lei de Newton (b)	17
Fig. 2.8 - Curva de comportamento de sólido ideal	18
Fig. 2.9 - Curva de comportamento de líquido ideal	18
Fig. 2.10 - Modelos viscoelásticos.....	18
Fig. 2.11 - Curvas de relaxação: (a) aplicação da deformação, (b) sólido hookeano, (c) líquido newtoniano, (d) fluido viscoelástico	21
Fig. 2.12 - Curvas de relaxação para sistemas de dinâmica mais rápida (curva a) e mais lenta (curva b)	22
Fig. 2.13 - Comportamentos de “creep”: (a) aplicação da tensão, (b) sólido hookeano, (c) líquido newtoniano e (d) material viscoelástico.....	23
Fig. 2.14 - Curva de ‘creep’ para fluido viscoelástico	24
Fig. 2.15 - Compliâncias do sistema: (a) período de carga do sistema, (b) recuperação do sistema	25
Fig. 2.16 - Modo oscilatório para um sólido hookeano,	28
Fig. 2.17 - Modo oscilatório para um líquido newtoniano	28
Fig. 2.18 - Representação gráfica do módulo de cisalhamento complexo (componentes imaginário e real).....	30
Fig. 2.19 - a) curva de varredura da amplitude de deformação a frequência constante; b) variação dos logaritmos dos módulos elástico e viscoso em função do logaritmo da deformação, a frequência constante, indicando o limite da região viscoelástica linear	31

Fig. 2.20 - a) curva de varredura de frequência com amplitude de deformação constante; b) variação dos logaritmos dos módulos elástico e viscoso em função do logaritmo da frequência, sob condições de amplitude de deformação constante	32
Fig. 2.21 - Curva de varredura de frequência para sistemas pouco polidispersos	34
Fig. 2.22 - Varredura de frequência de fluidos polidispersos. Linha cheia: substâncias com duas populações distintas de massa molar, de baixa dispersividade cada uma; linha tracejada: substâncias com larga distribuição de massa molar	36
Fig. 2.23 - Curva de varredura de frequência para substâncias com ligações cruzadas	37
Fig. 2.24 - Diagrama indicando dependência do tipo de comportamento de fluxo com idade da amostra e concentração (0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7; 9 (0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7; 9 e 10%) (0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7; 9 e 10%) e 10% m/v) de proteína, para gliadina em DMSO, a 20°C. Concentrações estão indicadas pelos símbolos identificados no próprio diagrama.....	43
Fig. 2.25 - Curvas de fluxo de gliadina a 1% em DMSO: (a) a várias temperaturas (amostra com idade de 12 dias, ordem de cisalhamento 20, 30, 10, 40, 0 e 60°C); (b) para amostras de diferentes idades, a uma temperatura constante de 30°C	43
Fig. 2.26 - Variação de $\ln \eta$ em função do inverso da temperatura para dispersões de gliadina em DMSO, a diversas concentrações da proteína.....	44
Fig. 2.27 - Energia de ativação de fluxo da gliadina em formamida e DMSO.....	45
Fig. 2.28 - Curvas de fluxo de gliadina a 20% em DMSO (11 dias) a diferentes temperaturas, (cisalhamento na ordem 20, 30, 10, 40, 0 e 60°C).....	46
Fig. 2.29 - Comportamento tixotrópico e reopéxico de gliadina a 20% em DMSO (amostra de 27 dias), a diversas temperaturas. Taxa de cisalhamento constante ($d\gamma/dt = 1000s^{-1}$).....	46
Fig. 2.30 - Variação da viscosidade com o tempo (tempos longos) para gliadina a 20% em DMSO, com taxa de cisalhamento constante ($d\gamma/dt = 1000s^{-1}$). Amostra com 27 dias	47
Fig. 2.31 - Curvas de fluxo de gliadina a 20% em formamida (amostra de 27 dias).....	48
Fig. 2.32 - Viscosidade da gliadina a 20% em DMF, de 20 dias, cisalhada por longos períodos às taxas de 500 e recisalhada a $1000s^{-1}$	50
Fig. 2.33 - Variação da viscosidade em função do tempo para amostras novas de gliadina a 20% em DMF puro (11 dias), cisalhadas a 500, 1000 e 2000 Hz.....	51

Fig. 2.34 - Variação da viscosidade com a frequência de dispersão a 20% de gliadina em DMF cisalhada a 500Hz. Amostra de 11 dias	51
Fig. 2.35 - Curvas de variação de viscosidade com o tempo para dispersão a 20% de gliadina em DMF, cisalhada e recisalhada a 2000Hz. Amostra de 11 dias.....	52
Fig. 2.36 - Curva de variação da viscosidade com o tempo para amostras novas de gliadina a 20% em formamida, cisalhadas a 500, 1000 e 2000 s ⁻¹ . Amostra de 12 dias	52
Fig. 2.37 - Curva de variação da viscosidade com o tempo para amostra de gliadina a 20% em formamida, cisalhada a 1000Hz. Amostra de 12 dias	53
Fig. 2.38 – Varredura de amplitude de gliadina 20% em DMSO (20 dias) e DMF (8 dias)	54
Fig. 2.39 - Varredura de amplitude da gliadina a 25% (3 dias) e 30% (7 dias) em formamida	55
Fig. 2.40 - Varredura de amplitude da gliadina a 20% (7 dias), 25% (3 dias) e 30% (8 dias) em DMF, a 20°C.....	55
Fig. 2.41 - Varredura de amplitude da gliadina 20% em DMF a 20°C, de amostras com 7 e 20 dias 60 Fig 2.42 - Varredura de amplitude da gliadina a 20% em DMSO, a 20°C. Amostras com 20 e 81 dias	56
Fig. 2.42 - Varredura de amplitude da gliadina a 20% em DMSO, a 20°C. Amostras com 20 e 81 dias	56
Fig. 2.43 - Módulo de armazenamento de gliadina a 20% em DMSO (81 dias). (vide máximo em G' a 23 ⁰ C).....	57
Fig. 2.44 - Módulo de armazenamento da gliadina a 25% em DMSO (58 dias) (vide máximo em G' a 26 e 29 ⁰ C)	58
Fig. 2.45 - Teste de varredura de frequência de gliadina 20% em DMSO (amostra de 20dias).....	60
Fig. 2.46 - Relaxação de gliadina 20% em DMSO (amostra de 20 dias), (valores de G ₁ e G ₂ na equação 2.80: 19,0956 e 26,85138, respectivamente)	61
Fig. 2.47 - Teste de relaxação da gliadina 30% em DMSO (idades 9 e 70 dias), a 20°C.....	62
Fig. 2.48 - Curvas de relaxação para gliadina 20% em DMF, em função da idade da Amostra.....	63
Fig. 2.49 - Teste de fluência da gliadina 20% em DMSO, amostra a 20°C com 20 dias, com J _e /J _{máx} de (em preto) = 93,85%; (em vermelho) = 93,67% sem equilíbrio térmico; (em verde) = 94,85% com repouso	64

Fig. 2.50 - Teste de fluência da gliadina 25% em DMSO, amostra a 20°C, com 8 e 42 dias	65
Fig. 2.51 - Testes de fluência da gliadina 20% em DMF, amostra a 20°C, com 3, 7 e 8 dias	66
Fig. 2.52 – Teste de fluência da gliadina 20, 25 e 30% em DMSO. Amostras a 20°C, com 20, 8, 42 e 70 dias	67
Fig. 2.53 - Teste de fluência da gliadina 20, 25 e 30% em DMF. Amostras a 20°C, com 3 dias	68
Fig. 2.54 - Curva de variação de G' , G'' e $\tan \delta$ em função da fração molar de DMSO em H ₂ O: $\chi_{\text{DMSO}}=0,8$, amostra com 14 dias, $\chi_{\text{DMSO}}=0,6$, amostra com 13 dias, $\chi_{\text{DMSO}}=0,4$, amostra com 70 dias; e $\chi_{\text{DMSO}}=0,3$ amostra com 8 dias, todas com gliadina a 20%	69
Fig. 2.55 - Variação de G' em função da fração molar de DMF e formamida nas dispersões contendo gliadina a 20%	70
Fig. 2.56 - Curvas de variação da viscosidade complexa com a frequência angular, para gliadina a 20% em DMSO/H ₂ O, a diversos valores de fração molar de DMSO	70
Fig. 2.57 - Curvas de varredura de amplitude de DMSO em água ($\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$), com gliadina a 20% (20°C) - efeito do cisalhamento sobre a amostra nova ($\gamma_{\text{máx}}=1,16\%$) e recisalhada ($\gamma_{\text{máx}} = 59,6\%$). Amostra com 7 dias.....	71
Fig. 2.58 - Dependência da viscosidade complexa com a frequência para dispersões a 20% em gliadina na mistura DMF/água ($\chi_{\text{DMF}} = 0,3; 0,4; 0,6$ e $0,8$). Amostra de 13 dias	71
Fig. 2.59 - Variação da viscosidade complexa com a frequência para dispersões a 20% de gliadina em formamida/água ($\chi_{\text{formamida}} = 0,4$ e $0,6$). Amostra de 13 dias	72
Fig. 2.60 - Curva da variação da viscosidade com o tempo, para gliadina a 20% em DMSO/H ₂ O ($\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$), a diferentes taxas de cisalhamento. Cisalhamento a 2000 s^{-1} efetuado após cisalhamento prévio da amostra a 500 s^{-1} . Cisalhamento a 500 s^{-1} e 1000 s^{-1} efetuado sobre amostras virgens. Amostra com 7 dias.....	73
Fig. 2.61 - Curvas de relaxação da gliadina a 20 % em DMSO/H ₂ O, $\alpha \chi_{\text{DMSO}} = 0,3$ (12 dias), 0,4 (13 dias), 0,6 (13 dias) e 0,8 (13 dias)	73

Fig. 2.62 - Curvas de relaxação de gliadina a 20% em DMF/H ₂ O, nas frações molares χ_{DMF} 0,3; 0,4; 0,6 e 0,8. Amostra de 13 dias	75
Fig. 2.63 - Curvas de relaxação de gliadina 20% em formamida/H ₂ O, 1 dia, nas frações molares 0,3 e 0,4	76
Fig. 2.64 - Curvas de fluxo e variação da viscosidade de gliadina a 20% em DMSO puro (amostra de 11 dias) e em DMSO/H ₂ O, a $\chi_{DMSO}=0,3$ (amostra de 7 dias).....	77
Fig. 2.65 - Curvas de fluência ('creep') de gliadina a 20% em DMSO/H ₂ O, a $\chi_{DMSO}=0,8$ (13 dias), $\chi_{DMSO}=0,6$ (12 dias) e $\chi_{DMSO}=0,4$ (13 dias).....	78
Fig. 2.66 - Curvas de fluência ("creep") de gliadina a 20% em DMF/H ₂ O, a $\chi_{DMSO}=0,8$, $\chi_{DMSO}=0,6$, $\chi_{DMSO}=0,4$. e $\chi_{DMSO}=0,3$	79

III - Gliadina em Sistemas Organizados

Fig. 3.1 - Curva da tensão versus variação percentual de área da vesícula	88
Fig. 3.2 - Vesícula antes de ser capturada (a) e após sucção pela micropipeta (b)	89
Fig. 3.3 - Curvas de variação da pressão osmótica em função da concentração de glicose e sacarose.....	98
Fig. 3.4 - Micropipeta e amostra acima da objetiva do microscópio (a) e sistema de medição de pressão (b)	100
Fig. 3.5 - Desenho esquemático da manipulação das vesículas ao microscópio.....	100
Fig. 3.6 - Vesículas de DOPC em meio de solução 1M glicose, contendo em seu interior solução 1M de sacarose	101
Fig. 3.7 - Curvas de $\ln$ da tensão em função de α em vesículas de DOPC, com gliadina nas proporções gliadina / DOPC em massa indicadas	105
Fig. 3.8 - Variação do módulo elástico de curvatura k_c de vesículas gigantes de DOPC em função da concentração de gliadina	106
Fig. 3.9 - Fase lamelar de C ₁₂ E ₅	107
Fig. 3.10 - Corpos não esféricos observados na pulsação de DOPC em meio de fase lamelar de C ₁₂ E ₅	107
Fig. 3.11 - Fase lamelar de C ₁₂ E ₅ , puro à temperatura ambiente, sem tensão elétrica	109
Fig. 3.12 - Vesículas preenchidas de fase lamelar de C ₁₂ E ₅ sob tensão elétrica à temperatura ambiente com polarizadores cruzados	109

Fig. 3.13 - Vesículas preenchidas de fase lamelar de $C_{12}E_5$, à temperatura ambiente, sem polarizadores cruzados	110
--	-----

IV - Proteínas do glúten – Gliadinas - Composição e Estrutura

Fig. 4. 1 - Colunas cromatográficas: por filtração a gel (esq.) e por troca iônica (dir)	120
Fig. 4.2 - Espalhamento de raios X	136
Fig. 4.3 - Cromatograma da primeira etapa (permeação em gel) de separação das gliadinas por FPLC: α , β , γ e ω -gliadina	150
Fig. 4.4 - Cromatograma da segunda etapa (troca iônica) de separação por FPLC: α , β e γ -gliadinas	151
Fig. 4.5 - Cromatograma da purificação (troca iônica) da ω -gliadina por FPLC	151
Fig. 4.6 - Reação com a ninidrina (a) durante 2 min. e (b) durante 10 min	153
Fig. 4.7 - Cromatogramas do extrato de gliadina em etanol e da gliadina bruta	154
Fig. 4.8 - Curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo de gliadina 20% em diversos meios solventes (a); Gráficos de Guinier para gliadina 20% em formamida (b); em DMF (c); em água (d) e em TMU (e)	160
Fig. 4.9 - Espalhamento de luz dinâmico da gliadina 0,01% em formamida / H_2O 0,3	161

Índice de Tabelas

II – Reologia

Tab. 2.1 - Variação das tangentes das curvas de varredura de frequência de gliadina em DMSO.....	59
Tab. 2.2 - Variação da polidispersividade com a concentração de gliadina em DMSO	59
Tab. 2.3 - Variação da relação $\Delta G'/\Delta\omega$ com a concentração de gliadina em DMF	60
Tab. 2.4 - Tempos de relaxação para dispersões de gliadina a diferentes concentrações, em DMSO.....	62
Tab. 2.5 - Tempos de relaxação para gliadina 20% em DMF, em função da idade da amostra	63
Tab. 2.6 - Variação de $J_e/J_{m\acute{a}x.}$ e de $J_v/J_{m\acute{a}x.}$ com o cisalhamento de gliadina a 20% em DMSO, 20 °C	64
Tab. 2.7 - Variação de $J_e/J_{m\acute{a}x.}$ e de $J_v/J_{m\acute{a}x.}$ com a idade de gliadina em DMSO 25%, 20 °C	65
Tab. 2.8 - Variação de $J_e/J_{m\acute{a}x.}$ e de $J_v/J_{m\acute{a}x.}$ com a idade de gliadina em DMF 20%	65
Tab. 2.9 - Variação de $J_e/J_{m\acute{a}x.}$ e de $J_v/J_{m\acute{a}x.}$ com a concentração de gliadina em DMSO.....	67
Tab. 2.10 - Variação de $J_e/J_{m\acute{a}x.}$ e de $J_v/J_{m\acute{a}x.}$ com a concentração de gliadina em DMF	68
Tab. 2.11 - Tempos de relaxação de sistemas de gliadina em DMSO/H ₂ O em função da fração molar do solvente em água	74
Tab. 2.12 - Tempos de relaxação de sistemas de gliadina em DMF/H ₂ O em função da fração molar do solvente em água	75
Tab. 2.13 - Tempos de relaxação de sistemas de gliadina em formamida/H ₂ O em função da fração molar de formamida em água	76
Tab. 2.14 - Variação de $J_e/J_{m\acute{a}x.}$ e de $J_v/J_{m\acute{a}x.}$ com a fração molar de DMSO em água ..	78
Tab. 2.15 - Variação de $J_e/J_{m\acute{a}x.}$ e de $J_v/J_{m\acute{a}x.}$ com a fração molar de DMF em água	79

III. Gliadina em Sistemas Organizados

Tab. 3.1 - Pressão osmótica* X concentração das soluções.....	98
Tab. 3.2 - Valores de k_c calculados e suas médias.....	106
Tab. 3.3 - Amostras de fase lamelar e respectivas temperaturas de transição.....	108

IV - Proteínas do glúten – Gliadinas - Composição e Estrutura

Tab. 4.1 - Características das proteínas da gliadina	115
Tab. 4.2 - Classes das proteínas da farinha de trigo	118
Tab. 4.3 - Composição dos aminoácidos, em número de resíduos por 1000 das sub-frações de gliadina	123
Tab. 4.4 - Sequência de aminoácidos amino-terminais de gliadinas e gluteninas solúveis em etanol	124
Tab. 4.5 - Capacidade de solubilização de Proteínas	133
Tab. 4.6 - Composição de aminoácidos no extrato alcoólico de gliadina	155
Tab. 4.7 - Composição de aminoácidos na gliadina bruta.....	155
Tab. 4.8 - Composição de aminoácidos (em proporções molares) das sub-frações de gliadina, segundo Charbonier	156
Tab. 4.9 - Raios de giro (R_g) de gliadina em diversos solventes, obtidos por SAXS.....	158
Tab. 4.10 - Raios hidrodinâmicos e coeficientes de difusão obtidos por espalhamento de luz dinâmico para amostras de gliadina a diferentes concentrações em diversos solventes	162
Tab. 4.11 - Medidas de espalhamento de raios X e de luz a baixo ângulo.....	165

I - Introdução

1 - Objetivos

Este projeto desenvolveu-se no âmbito de uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Biofísico-Química do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – USP. Consistiu no estudo físico-químico do comportamento mecânico (reológico) de uma classe de sistemas protéicos viscoelásticos, as gliadinas, obtidas do glúten do trigo. Esses sistemas, além de relevantes na área médica e biotecnológica, constituem interessantes modelos de investigação acadêmica.

Três caminhos principais nortearam este projeto, constituindo seus próprios objetivos: a identificação e caracterização das estruturas macromoleculares e sua interdependência; o estudo de sua dinâmica em função do meio dispersante, através do acompanhamento dos perfis de comportamento reológico em meios orgânicos (dimetilsulfóxido – DMSO, dimetilformamida – DMF e formamida) e em meios aquo-orgânicos; e a investigação de seu eventual efeito sobre sistemas organizados (microvesículas de fosfolipídios).

2 - Desenvolvimentos experimentais

Os experimentos reológicos, executados no nosso Laboratório, incluíram testes estacionários, transientes e dinâmicos dos diversos sistemas estudados, levantando-se dados de polidispersão e tamanhos relativos de agregados, energias de ativação de fluxo, variação dos módulos elásticos e de dissipação com a amplitude e a frequência da tensão, tempos de relaxação e perfis de escoamento.

Para explorar aspectos de estrutura e dinâmica molecular dos sistemas em estudo, lançou-se mão de outras técnicas, em colaboração com equipes de outros laboratórios:

- Separação das gliadinas por FPLC (Fast Polymer Liquid Chromatography): Laboratório de Propriedades Funcionais de Alimentos, Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública – USP (Prof. Dr José Alfredo Gomes Arêas; participação da aluna Clarice Navarro Barros);
- Caracterização dos aminoácidos por HPLC/CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) de troca iônica: Laboratório de Química de Peptídeos,

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química – USP (Profa. Dra. Maria Teresa Machini de Miranda; apoio técnico do Dr. Cleber W. Liria);

- Determinação de parâmetros dimensionais por espalhamento de raios X a baixos ângulos – SAXS: Laboratório de Cristalografia, Instituto de Física – USP (Profa. Dra. Rosângela Itri; participação do aluno Evandro L. Duarte);
- Determinação de parâmetros dimensionais e de massa por espalhamento de luz estático e dinâmico: Grupo de Tensoativos e Polímeros, Instituto de Química – USP (Prof. Dr. Omar El Seoud; apoio técnico Dr. Paulo Augusto Rodrigues Pires);
- Determinação do efeito de gliadina sobre flutuações de membrana, em microvesículas, através de técnicas micro-reológicas: Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes, Université Louis Pasteur, Strasbourg, França (Dr. Carlos Marques).

3 - Algumas considerações sobre o sistema de estudo

Embora tratada no singular, a gliadina em realidade engloba uma família de proteínas, de estrutura supramolecular complexa, na faixa de 30.000 - 80.000 g/mol, encontrada no glúten do trigo e em outros cereais.

O glúten é um complexo protéico de alta massa molar média, derivado da farinha de trigo e dotado de propriedades viscoelásticas marcantes. Tais características constituem a base de sua utilização milenar nos processos de fabricação do pão, os quais remontam às origens da própria história do homem. Guiado pelo empirismo, cedo o homem soube apropriar-se das vantajosas propriedades mecânicas do glúten, e utilizá-las para obter texturas agradáveis a seu paladar.

A base empírica de aprendizado cedeu aos poucos lugar à compreensão dos mecanismos em jogo nesses processos e à possibilidade de seu controle para obtenção de propriedades desejáveis. Mais recentemente, usos inovadores do glúten têm sido propostos, como o emprego de algumas de suas frações, como gliadina, como filmes comestíveis para embalagens de alimentos e na geração de nanopartículas para liberação controlada de drogas^{1,2,3}.

As proteínas do trigo são particularmente estudadas em contextos ligados à Agronomia e Tecnologia de Alimentos, e à Gastroenterologia / Imunologia. Nesse último caso, o interesse da área por esses sistemas encontra-se ligado à ocorrência de uma séria afecção do trato intestinal, de fundo imunológico, a doença celíaca, induzida por gliadina em indivíduos susceptíveis, a qual impede a absorção dos nutrientes, levando, se não controlada, a um quadro muito grave de desnutrição⁴. Essa patologia aumenta a predisposição dos indivíduos afetados a doenças auto-imunes ou de natureza alérgica^{5,6}.

Em todos esses casos, a investigação físico-química é relevante, uma vez que permite o estudo da dependência de propriedades dinâmicas e estruturais de sistemas complexos com variáveis do meio e a elaboração de modelos, viabilizando o avanço do conhecimento em seus aspectos mais fundamentais.

4 - Estrutura da Tese

Esta Tese se apresenta em cinco capítulos:

- 1) O presente capítulo de Introdução, em que são apresentados o tema do estudo e sua relevância, bem como indicadas as principais formas de abordagem experimental empregadas.
- 2) O segundo capítulo, no qual se faz uma revisão dos fundamentos de reologia, para suporte da discussão subsequente, com apresentação dos métodos empregados e dos resultados obtidos nos diversos ensaios mecânicos.
- 3) O terceiro capítulo, que trata da investigação do efeito da gliadina sobre propriedades de flutuação de membranas de fosfolípido, com a determinação da constante de elasticidade de curvatura em microvesículas.
- 4) O quarto capítulo, que inclui considerações sobre composição e estrutura de proteínas do trigo, em particular as gliadinas, com levantamento bibliográfico. Incluem-se também neste capítulo descrições dos procedimentos experimentais utilizados e discussão dos resultados obtidos nas etapas de isolamento e de caracterização de gliadina e de suas frações.

- 5) O capítulo final tenta fazer confluir as principais conclusões dos capítulos antecedentes, com vistas a uma compreensão mais global da fenomenologia estudada.

5 - Bibliografia

- ¹ Kester, J.J.; Fennema, O., Food Technol, 1986, **40**, 47.
- ² Duclairoir, C.; Nakache, E.; Marchais, H.; Orecchioni, A.-M., Colloid Polym. Sci., 1998, **276**, 321.
- ³ Gonthard, N.; Guilbert, S.; Cuq, J.-L., J. Food Sci, 1993, **58**, 206.
- ⁴ De Vincenzi M., Stamatii A., Luchetti R., Toxicology, 1998, **127**, 97.
- ⁵ Schuppan, D., Gastroenterology, 2000, **119**, 234.
- ⁶ Enzenauer, R. J. e Root, S. J. Clin. Rheumatology, 1998, **4**, 205.

II - Reologia

1 – Introdução

1.1 - Considerações gerais

Reologia é a parte da Mecânica que se dedica ao estudo do fluxo e da deformação da matéria. O termo origina-se do grego e significa “o estudo daquilo que flui”, tendo sido introduzido por Bingham, em 1929. O comportamento dos fluidos sob tensão pode trazer importantes informações a respeito da estrutura e organização molecular de sistemas.

A viscoelasticidade é uma característica inerente aos polímeros que lhes permite, por exemplo, se comportarem como fios flexíveis. Para tais fluidos, as propriedades de viscosidade somam-se às de elasticidade. Dependendo da temperatura e de interações específicas com o meio solvente (no caso de dispersões poliméricas), sua cadeia linear amorfa pode apresentar comportamento líquido, viscoelástico ou sólido (estado vítreo)¹.

A gliadina, uma das sub-unidades do glúten, é considerada um polímero amorfo² (aspectos de estrutura, composição e comportamento físico-químico desses sistemas são tratados em extensão no Capítulo IV). Por se tratar de uma proteína, a estrutura dessa macromolécula é quimicamente mais rica, em comparação com outros polímeros, no sentido de diversidade estrutural, o que torna mais complexo qualquer tratamento fenomenológico ou teórico. Mostra-se solúvel em alguns meios orgânicos, gerando sistemas viscoelásticos em regime concentrado. Proteínas vegetais em meio ácido (pH abaixo de 4,0) comumente mostram boa capacidade de formação de gel, de emulsificação e de formação de espuma. Sua aplicação, no entanto é limitada nesse aspecto³ em comparação aos polímeros sintéticos.

A literatura registra um grande número de estudos reológicos sobre os sistemas viscoelásticos do trigo, referente ao comportamento reológico de massas alimentícias derivadas da farinha desse cereal. Um número relativamente menor de publicações se dedica à reologia do glúten isolado e um número ainda menor, às suas frações constituintes, como a gliadina⁴.

As proteínas do glúten exibem atividade superficial, cuja relevância é variável dependendo da fração considerada. Assim, em termos desse parâmetro, a ordem decrescente de atividade de superfície para as proteínas do glúten seria gliadina > glutenina > globulina > albumina⁵.

A investigação sobre o comportamento reológico da gliadina como função das condições de meio envolveu os experimentos descritos adiante. Foram realizados experimentos em função de variáveis como temperatura, condições de cisalhamento, tempo e concentração da proteína em solvente puro e em mistura do solvente com água.

1.2 - Reologia de biocolóides

Proteínas em solução constituem sistemas coloidais macromoleculares cujas propriedades mecânicas podem ser estudadas através de técnicas reológicas. O comportamento coloidal desses sistemas decorre de suas dimensões típicas, usualmente na faixa nanométrica^{6, 7}.

Proteínas globulares nas concentrações usuais de interesse em Bioquímica tendem a ter comportamento de fluxo muito proximamente Newtoniano, isto é, comportamento ideal. No entanto, algumas proteínas mostram desvios significativos da idealidade, mesmo a baixas concentrações, apresentando-se como fluidos pseudoplásticos e viscoelásticos. A essa categoria de sistemas pertencem proteínas de origens e funções bastante distintas. Assim, podemos citar proteínas de origem animal com papel estrutural (como colágeno, elastina)^{8,9} e proteínas com ação emulsificante (como a caseína do leite)^{10,11}, bem como proteínas de reserva de origem vegetal, como as proteínas do glúten¹². O comportamento reológico desses sistemas é decisivo para a definição de aspectos de sua funcionalidade.

Um outro grupo de sistemas de biocolóides que apresenta interesse para o estudo reológico são os sistemas fluidos particulados do organismo, como o sangue^{13,14}. Também são relevantes sob este ponto de vista diversos biofluidos como a mucina¹⁵, que recobre a mucosa estomacal e os pulmões e cujas propriedades reológicas estão envolvidas na asma; o fluido sinovial, com ação lubrificante das juntas, entre tantos outros¹³.

Em todos esses sistemas, o comportamento reológico é crucial para a adequada funcionalidade da estrutura. Assim, certas doenças do colágeno e patologias envolvendo as artérias são causadas por defeitos estruturais nas moléculas de proteína, os quais se revelam em seu comportamento reológico, afetando seu correto desempenho biológico. O aumento da viscosidade ou a alteração dos padrões dinâmicos reológicos de normalidade de certas secreções biológicas podem servir como elementos auxiliares no diagnóstico de condições patológicas. Assim, doenças como diabetes afetam o padrão reológico normal do sangue. As propriedades reológicas do sangue por sua vez irão

determinar a carga de bombeamento do coração, afetando o desempenho de válvulas cardíacas artificiais.

Além de sua relevância em sistemas biológicos, como acabamos de ver, sistemas coloidais são também reconhecidamente de enorme importância em áreas de aplicação biotecnológica, como na indústria cosmética e de alimentos. Sua capacidade plastificante, espessante, emulsificante ou moduladora de propriedades de fluxo propicia a obtenção das mais diversas propriedades desejadas, garantindo o desempenho desejado para o produto.

1.3 - Modelos de viscoelasticidade do glúten

Diversos modelos são propostos para a viscoelasticidade do glúten, não havendo uma visão única sobre a questão até o presente. De um modo geral, o caráter elástico do glúten é predominantemente atribuído à fração das gluteninas, que são as espécies protéicas de mais alta massa molar, enquanto a contribuição viscosa é atribuída predominantemente às gliadinas. Contribuição elástica significativa foi, no entanto observada para gliadina dispersa em diversos meios orgânicos e aquo-orgânicos¹².

Na maior parte dos modelos, um detalhe de estrutura costuma ser tratado com especial atenção. Trata-se dos motivos repetitivos de seqüência, presentes em várias das sub-frações do glúten. A investigação do possível papel biomecânico dessas seqüências repetitivas é uma área de pesquisa bastante relevante devido ao caráter fundamental que tais correlações podem representar na elucidação da dinâmica desses sistemas^{12,16,17,18,19}. Essas seqüências repetitivas são de extensão variável (tri-, hexa-, nona-, octa- peptídeos) e contêm em geral grandes quantidades de glutamina e prolina. Nas subunidades de alta massa molar, glicina é também um dos resíduos de aminoácidos preponderantes. Nessas sub-unidades, as seqüências repetitivas constituem regiões lineares da cadeia polipeptídica e os domínios C e N terminais constituem regiões α -helicoidais. Nelas é significativa a presença de resíduos de cisteína nas regiões terminais de cadeia.¹²

As regiões repetitivas se caracterizam por uma alta mobilidade na presença de água. Consistem basicamente de dobras β e folhas β , em proporções que variam com o conteúdo de água. Estudos espectroscópicos sugerem que as ligações de hidrogênio entre regiões repetitivas das sub-unidades de alta massa molar do glúten são responsáveis por sua elasticidade²⁰.

Em um trabalho de modelagem por simulação computacional, desenvolvido em nosso grupo¹⁸, um modelo foi proposto para uma das sub-frações da gliadina, a sub-fração ω . O modelo consiste em uma estrutura tubular retorcida, em cuja superfície externa se acomodam, de forma enfileirada à semelhança de cordões e acompanhando a torção da estrutura, resíduos de fenilalanina e de glutamina. Essa topologia define quatro regiões externas contínuas e segregadas entre si, duas delas consistindo de resíduos de Gln e duas delas de resíduos de Phe. Regiões alternadas, hidrofílica (Gln) e hidrofóbica (Phe) são assim formadas. As fileiras formam-se pela sucessão espacial dos aminoácidos e não por sua seqüência na estrutura covalente da cadeia. Esse aspecto é decorrência de uma particularidade notável no enovelamento do modelo: a interpenetração da cadeia polipeptídica. Tal interpenetração possui contornos periódicos, observando-se uma “laçada” ou interpenetração a cada 4 extensões de uma seqüência repetitiva de cadeia (PQQPFPQQ), bastante característica¹⁸.

Diferentemente do que se observa na superfície externa da estrutura do modelo, descrita acima, o interior da mesma é constituído por projeções dos resíduos de glutamina apenas, criando um canal tubular retorcido interno de caráter hidrofílico que se supões possa ser uma via preferencial para difusão de água na estrutura. Tal canal apresenta uma rede extensa de ligações de hidrogênio, formando dois planos, um na região superior (à semelhança de um “teto”) e outro na região inferior (à semelhança de um “piso”) desse canal interno, que estabilizam a estrutura. Os resíduos de prolina respondem pela torção característica da estrutura, situando-se justamente na região das dobras. Imagens bastante ilustrativas das estruturas descritas podem ser encontradas no trabalho original.¹⁸ Uma ilustração está mostrada a seguir.

Fig. 2.1 - Enovelamento interpenetrante em modelo de ω -gliadina. O sistema pode ser deformado sem perda de sua integridade estrutural (Arêas e Cassiano)¹⁸.

Essas características do modelo são bastante sugestivas de uma estrutura que pode deformar-se de forma significativa quando submetida à tensão, sem perda, contudo de sua integridade estrutural. Tal possibilidade decorre dos dois planos infinitos descritos pelas ligações de hidrogênio do canal interno e da disposição torcionada da cadeia. Observando-se a estrutura, é possível perceber-se que deslocamentos provocados por aplicação de tensão levam a cadeia polipeptídica a desfazer uma série de ligações de hidrogênio, para logo adiante, na nova posição assumida pela cadeia tensionada, encontrar-se em uma situação em tudo semelhante à anterior, no que diz respeito à possibilidade de estabelecimento de novas ligações de hidrogênio. É o caráter periódico da estrutura o fator que garante essa peculiaridade de comportamento. Desse modo, tal estrutura pode ser tensionada, deformando-se em consequência e após cessada a força aplicada relaxar, retornando à sua posição original, sem prejuízo de sua estrutura covalente polipeptídica.

Já no modelo de Belton¹², a viscoelasticidade do glúten é ser analisada a partir de um tratamento usualmente empregado em química de polímeros e de superfícies para analisar o fenômeno de adsorção. O autor faz uma analogia entre as interações existentes no glúten com as conhecidas regiões de trens e alças (trains and loops) de polímeros adsorvidos em uma dada superfície. As alças correspondem a regiões de grande mobilidade¹⁷, enquanto os trens correspondem a regiões de mobilidade restrita. Ao se estender a massa no processo de panificação, essas regiões em alça são as primeiras a se deformarem e se estenderem seguidas pelas regiões em trens que exigem uma maior energia para serem deformadas. Esses eventos se refletem no deslizamento das cadeias umas sobre as outras. As interações envolvidas nas regiões de trens e de alças são ligações de hidrogênio, que se estabelecem entre cadeia-cadeia no primeiro caso ou entre cadeia-água, no segundo. O conceito essencial de elasticidade implica na capacidade de um dado material em restabelecer suas dimensões originais após ter sido submetido a uma extensão. A força de restauração elástica, dentro desse modelo¹² é fornecida pelo restabelecimento do equilíbrio trem-alça.

Fig. 2.2 - Segundo Belton¹², (adaptado): a deformação proposta para o mecanismo de deformação do glúten, à semelhança do que ocorre na extensão de polímeros, segundo o modelo de trens e alças: a) a configuração de equilíbrio; b) após o sistema ter sido submetido a pequena extensão: apenas as alças são parcialmente deformadas; c) após grande extensão: as alças tornam-se completamente estendidas e as ligações de hidrogênio intercadeias são quebradas de tal modo que as cadeias passam a deslizar umas sobre as outras.

As regiões em trens são regiões de mobilidade restrita e estão associadas à formação de folhas β , levando à formação de redes interconectadas no sistemas protéico do glúten²¹. As regiões em alças correspondem a regiões hidratadas, de alta mobilidade. Durante o processo de extensão, essas últimas são as primeiras regiões da rede a serem deformadas. Somente após a deformação das alças é que as ligações das regiões em trens serão por sua vez rompidas. A estrutura como um todo irá relaxar retornando à condição de equilíbrio inicial entre alças e trens. Essa força restauradora envolve um termo entrópico, que está associado à entropia conformacional das alças e das ligações de hidrogênio nas regiões em “trens”. A perda entrópica, causada pela formação de ligações de hidrogênio inter-cadeias, será compensada em parte pelo aumento de entropia causado pela quebra das ligações de hidrogênio da água.

O modelo de Belton¹² pode ser comparado ao de Ewart^{22,23} que também sugere a existência de alças na rede do glúten. Neste ultimo, no entanto, postula-se que as alças sejam formadas por ligações dissulfeto, que seriam as responsáveis por suportar as tensões aplicadas, preservando as alças de qualquer tensão. No modelo de Belton, ligações dissulfeto também ocorrem no glúten como forma de interação inter-cadeias, porém não estão relacionadas às regiões de trens e alças, mas envolvem predominantemente as regiões terminais das sub-unidades de alta massa molar, que se emaranham ao ser o glúten submetido ao cisalhamento mecânico. Essas ligações levariam a um aumento da massa molar efetiva da subunidade e ao conseqüente aumento do número de interações proteína-proteína.

Embora todos esses esforços interpretativos sejam válidos quando se consideram apenas algumas das estruturas componentes do glúten (gliadinas, gluteninas e outros), descrever o comportamento do glúten como um todo é tarefa muito mais desafiadora. É preciso considerar-se a existência das frações globulares do glúten e a diversidade de frações não globulares presentes. Alguns trabalhos atribuem a alguns dos componentes do glúten uma contribuição exclusivamente viscosa (não elástica) e a outros uma contribuição exclusivamente elástica.¹² Dentro dessa ótica, a viscoelasticidade do glúten poderia ser vista como um conjunto de componentes elásticos estendendo-se e contraindo-se em uma matriz viscosa, a qual atuaria como uma resistência à extensão dos componentes elásticos, retardando suas deformações.

O problema, no entanto, é muito provavelmente de maior complexidade, uma vez que a atribuição de um caráter unicamente elástico ou unicamente viscoso a este ou aquele componente molecular não é certamente a melhor descrição da realidade. Conforme se percebe do estudo reológico dos componentes isolados, como apresentado nesta Tese, é o caráter misto (ou viscoelástico) o que em geral é observado, variando a magnitude de cada uma das duas contribuições em cada tipo de sub-unidade considerada.

2 - Alguns conceitos e principais grandezas reológicas envolvidas neste estudo

Os experimentos reológicos envolvidos neste estudo estão subdivididos em três categorias distintas: estacionários ou *estáticos*, *dinâmicos* e *transientes*.

Nos experimentos estáticos o sistema encontra-se em estado estacionário. O experimento se desenvolve em modo rotacional e a curva obtida é chamada de ‘*curva de fluxo*’.

Os experimentos dinâmicos são desenvolvidos no modo oscilatório, se subdividem em testes de *varredura de amplitude* e *varredura de frequência*.

Os experimentos transientes se subdividem em teste de *relaxação* e teste de ‘*creep*’ ou *fluência*, desenvolvidos no modo rotacional.

Na prática, os testes são executados nesta ordem, uma vez que informações geradas em uma modalidade de teste são necessárias para definição das condições de ensaio dos testes da modalidade seguinte.

2.1 - Testes estáticos

Deste tipo de ensaio podemos obter o perfil de fluxo da amostra, ao medirmos a variação na tensão de cisalhamento como função da taxa de cisalhamento. O sistema encontra-se em regime de estado estacionário e as curvas de resposta mostrarão um dentre os seguintes possíveis comportamentos:

Fig. 2.3 – Curvas de fluxo para comportamentos característicos.

Dos quatro tipos de comportamento da figura acima, os dois últimos são característicos de fluidos não-newtonianos (dependência não linear da tensão com a taxa de cisalhamento). Plásticos de Bingham são sistemas que apresentam uma tensão de cisalhamento residual, a qual deve ser excedida para que o líquido comece a fluir; nesse caso, após atingido esse valor limite, o fluxo observado é do tipo newtoniano.

2.1.1 - Comportamento ou fluido newtoniano

A Fig. 2.3 mostra a curva do comportamento newtoniano como uma relação constante entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento. Esta relação é a viscosidade e independe da magnitude ou duração do cisalhamento (ver Fig. 2.5). Em outras palavras, este tipo de comportamento dos fluidos apresenta apenas a contribuição viscosa quando em escoamento e se expressa fisicamente como a **Lei de Newton**:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{ou} \quad \tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{eq. 2.1})$$

sendo η , viscosidade dinâmica (em Pa.s no SI), τ , tensão de cisalhamento (em Pa) e $\dot{\gamma}$,

taxa de cisalhamento (s^{-1}). A unidade pode encontrar-se fora do Sistema Internacional de medidas, em centipoise (no Sistema CGS), onde $1cP = 1mPa.s$.

No escoamento viscoso, a viscosidade é medida pela resistência ao escoamento. Considerem-se duas placas paralelas a uma distância h (em m), com um fluido preenchendo o espaço entre elas. Se uma delas se desloca de uma distância v (em m), em relação à outra, com velocidade constante V , as camadas infinitesimais de fluido adjacentes às duas placas tendem a se comportar como elas, levando a um gradiente de deslocamento das camadas infinitesimais intermediárias, como mostra a Figura 2.4.

Fig. 2.4 – Escoamento viscoso

Esta deformação sofrida pelo fluido, *deformação por cisalhamento*, é definida pela razão:

$$\text{Deformação (adimensional)} = \frac{\text{deslocamento do plano (m)}}{\text{Distância entre os planos (m)}} \quad \gamma = \frac{v}{h} \quad (\text{eq. 2.2})$$

Distância entre os planos (m)

A *tensão de cisalhamento* é definida como:

$$\text{Tensão de cisalhamento (Pa)} = \frac{\text{força aplicada (N)}}{\text{área da placa (m}^2\text{)}} \quad \tau = \frac{F}{A} \quad (\text{eq. 2.3})$$

A *taxa de cisalhamento* é definida pela variação da deformação com o tempo:

$$\text{Taxa de cisalhamento (s}^{-1}\text{)} = \frac{\text{derivada da deformação}}{\text{derivada do tempo (s)}} \quad \dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} \quad (\text{eq. 2.4})$$

2.1.2 - Fluidos não-newtonianos

Para esses sistemas, as viscosidades dependem do tempo e/ou das taxas de cisalhamento aplicadas, sendo portanto, denominadas de viscosidade aparente (η'). A

grande maioria dos materiais possui comportamento reológico desse tipo, em maior ou menor extensão.

Fig. 2.5 – Comportamento dos fluidos: variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento

2.1.2.1 - Fluidos dilatantes

Pode-se observar pela Fig. 2.5 que a dependência da viscosidade aparente com a taxa de cisalhamento, para os diversos tipos de fluidos apresentados, é característica de cada um e independe do tempo de aplicação da tensão. A curva de fluxo (Figura 2.3) referente ao comportamento dilatante pode ser descrita por uma lei de potências:

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad \text{para } n > 1 \quad (\text{eq.2.5})$$

sendo K o coeficiente de consistência e n um número natural.

O comportamento dilatante é o mais raro entre os materiais, ocorrendo em materiais que se tornam subitamente endurecidos quando se aplica uma alta tensão de cisalhamento. São típicos de sistemas muito densamente empacotados, contendo fase líquida apenas suficiente para preencher os poucos espaços entre as partículas. Ao ser atingida uma taxa de cisalhamento suficiente, as partículas começam a mover-se, fazendo com que nessa expansão o líquido seja insuficiente para preencher os vazios. É característico, por essa razão, que esses sistemas pareçam mais “secos” quando submetidos a taxas altas de cisalhamento. São exemplos suspensões cerâmicas, de argilas e de areia em altas concentrações, dispersões concentradas de amido, etc.

2.1.2.2 - Fluidos pseudoplásticos

Ainda na Fig. 2.5 pode-se observar que para esse tipo de sistemas, a viscosidade varia inversamente com a taxa de cisalhamento. A variação independe do tempo. Este decaimento da viscosidade em função do aumento da taxa de cisalhamento pode ocorrer devido a:

- Orientação de partículas não esféricas na direção do fluxo (bombeamento de lamas fibrosas)
- Quebra e/ou orientação de cadeias poliméricas na direção do fluxo (extrusão de polímeros)
- Deformação de gotículas de geometria esférica para geometria elíptica em emulsões (produção de margarinas de baixo teor de gorduras)
- Quebra de agregados em suspensão (agitação de tintas)

É possível que o sistema, após reorganizar-se, apresente comportamento newtoniano. A curva de tensão é dada por:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{para } n < 1 \quad (\text{eq. 2.6})$$

sendo K o coeficiente de consistência e n um número natural.

2.1.2.3 - Fluidos plásticos

Esses fluidos possuem uma resistência inicial ao escoamento e somente começam a fluir quando a força aplicada ultrapassa a força estrutural interna. Abaixo desse *ponto de escoamento* o fluido apresenta propriedades elásticas, se comportando como um sólido. Acima do ponto de escoamento o fluido pode comportar-se como newtoniano, com modelo matemático da *tensão de escoamento aparente de Bingham*, ou não-newtoniano, podendo seguir dois modelos matemáticos: o de *Casson* e o de *Herschel-Bulkley*.

- Bingham $\Rightarrow \tau = f_B + \eta_B \cdot \dot{\gamma}$ (eq. 2.7)

sendo f_B o ponto de escoamento de Bingham, η_B a viscosidade de Bingham.

- Casson $\Rightarrow \tau = \left(\sqrt{f_C} + \sqrt{\eta_C \cdot \dot{\gamma}} \right)^2$ (eq. 2.8)

sendo f_C o ponto de escoamento de Casson, η_C a viscosidade de Casson.

- Herschel-Bulkley $\Rightarrow \tau = f_H + m \cdot \dot{\gamma}^n$ (eq. 2.9)

sendo f_H o ponto de escoamento de Herschel-Bulkley, m o coeficiente de

fluxo e $n < 1$ para comportamento pseudoplástico e $n > 1$ para comportamento dilatante.

2.1.2.4 - Dependência temporal

Os fluidos que têm sua viscosidade dependente do tempo podem apresentar dois tipos de comportamento: reopéxico e tixotrópico.

Fig. 2.6- Comportamento dos fluidos: variação da viscosidade com o tempo.

2.1.2.4.1 - Fluidos tixotrópicos

Os fluidos tixotrópicos se caracterizam pelo decréscimo na viscosidade aparente com o tempo, sob condições de taxa ou de tensão de cisalhamento constante, seguido por uma recuperação gradual quando se interrompe o cisalhamento. Há uma degradação de sua estrutura durante o período sob cisalhamento, sendo este *processo reversível* e o tempo de recuperação dependente do tipo do material. Quando o processo não é reversível, o fluido não é considerado tixotrópico.

São exemplos destes fluidos quase todas as dispersões (suspensões, emulsões, espumas), cremes, pastas, ketchups, géis, etc.

2.1.2.4.2 - Fluidos reopéxicos

Os fluidos reopéxicos, de comportamento oposto aos tixotrópicos, se caracterizam pelo aumento da viscosidade aparente com o tempo, quando submetidos a

taxa ou tensão de cisalhamento constante, seguido por uma recuperação gradual quando o cisalhamento é interrompido.

São exemplos destes fluidos: dispersões concentradas de látex e de surfactantes. Este tipo de comportamento é bem raro, em comparação com a ocorrência dos tixotrópicos.

2.1.3 - Comportamentos ideais

O comportamento reológico dos sistemas pode ser analisado melhor considerando-se os extremos clássicos do comportamento mecânico dos materiais: o *sólido ideal* e o *líquido ideal*. Um sólido ideal apresentará comportamento puramente elástico, de acordo com a lei de Hooke e um líquido ideal terá comportamento puramente viscoso, de acordo com a lei de Newton.

Lei de Hooke:

$$F = -k.x \quad (\text{eq. 2.10})$$

Lei de Newton:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Fig. 2.7 – Sistema de sólido ideal – lei de Hooke (a) e de líquido ideal – lei de Newton (b)

No comportamento clássico, a mola (sólido elástico), de constante de força k (em kg.s^{-2}), distende-se instantaneamente de uma distância x (em m) sob a força aplicada F (em N). Toda a energia despendida é recuperada no retorno da mola, após cessada a força. Por princípios reológicos equivalentes, a lei de Hooke descreve:

$$\tau = G.\gamma \quad (\text{eq. 2.11})$$

sendo a constante de proporcionalidade G , chamada de *módulo de rigidez*.

De forma diferente, no fluido viscoso do amortecedor a energia não é recuperada.

Tal como a lei de Newton, a lei de Hooke é linear. As duas leis assumem proporção direta entre tensão e deformação ou taxa de cisalhamento. Muitos materiais se comportam idealmente dentro de certas faixas de tensão, e não idealmente em outras regiões de tensão. Os comportamentos típicos de um sólido ideal e de um líquido ideal estão mostrados nas Figuras 2.6 e 2.7, adiante.

Fig. 2.8 – Curva de comportamento de sólido ideal

Fig. 2.9 – Curva de comportamento de líquido ideal

Entre estes extremos, de sólido ideal e líquido ideal, se encontra a maior parte dos materiais e estas contribuições se somam para explicar o comportamento viscoelástico.

2.1.4 - Comportamento viscoelástico

Enquanto os extremos do comportamento dos materiais têm os modelos de mola e amortecedor para explicá-los, o comportamento viscoelástico pode ser explicado através dos modelos:

Fig. 2.10 – Modelos viscoelásticos

2.1.4.1 - Modelo de Maxwell

Maxwell, em 1866, representou o comportamento *viscoelástico líquido* em seu modelo por um amortecedor e uma mola em série. Quando submetido a uma tensão o sistema irá distender instantaneamente a mola até o seu limite, enquanto o fluido viscoso do amortecedor, de resposta mais lenta, continuará se deformando por algum tempo. Após a remoção da tensão, a mola (componente elástico) retorna ao seu estado inicial e o fluido (componente viscoso) continua deformado. A deformação do sistema será dada por:

$$\gamma = \gamma_e + \gamma_v \quad (\text{eq. 2.12})$$

sendo γ_e a componente elástica da deformação e γ_v , a viscosa.

A tensão de cisalhamento do sistema será:

$$\tau = \tau_e = \tau_v \quad (\text{eq. 2.13})$$

Pela equação 2.11, temos $\tau_e = G \cdot \gamma_e$ ou $\gamma_e = \tau_e / G$. Derivando-se em relação ao tempo, tem-se:

$$\frac{d\gamma_e}{dt} = \frac{1}{G} \frac{d\tau_e}{dt} \quad (\text{eq. 2.14})$$

Da equação 2.1, temos:

$$\eta = \frac{\tau_v}{\dot{\gamma}} = \frac{\tau_v}{d\gamma/dt} \quad \text{ou} \quad \frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau_v}{\eta} \quad (\text{eq. 2.15})$$

Substituindo as equações 2.14 e 2.15 em 2.12 temos:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{\tau_v}{\eta} + \frac{1}{G} \frac{d\tau_e}{dt} \quad (\text{eq. 2.16})$$

O tempo de que o sistema precisa para voltar à condição original após a remoção da tensão é o tempo de relaxação, expresso matematicamente como:

$$t_r = \frac{\eta}{G} \quad (\text{eq. 2.17})$$

Substituindo equação 2.17 em 2.16, temos:

$$\frac{d\gamma}{dt} = \frac{1}{t_r} \frac{\tau_v}{G} + \frac{1}{G} \frac{d\tau_e}{dt} \quad (\text{eq. 2.18})$$

A integral desta equação, em relação à tensão e taxa de cisalhamento, fornece:

$$\tau(t) = \gamma G e^{(-t/t_r)} \quad (\text{eq. 2.19})$$

Este modelo é aplicável somente a sistemas monodispersos, em que se tem um único tempo de relaxação. Para sistemas polidispersos, onde se tem mais de um tempo de relaxação o modelo matemático deve ser complementado com a função de distribuição de tempos:

$$\tau(t)\gamma = \int_0^{\infty} G(t) e^{(-t/t_r)} dt_r \quad (\text{eq. 2.20})$$

2.1.4.2 - Modelo de Kelvin-Voigt

Em 1890, Kelvin e Voigt apresentaram um modelo para explicar o comportamento *viscoelástico sólido*, com uma mola e um amortecedor em paralelo. Quando é aplicada a tensão, ela se divide em dois braços, sendo o esforço sobre cada componente do sistema menor do que se a tensão fosse aplicada nos dois montados em linha. Após cessada a força, a mola retorna totalmente à condição original, forçando o amortecedor também a fazê-lo, apenas com um retardo na resposta.

Considerando-se que a tensão se divide entre os dois ramos temos:

$$\gamma = \gamma_v = \gamma_e \quad \text{ou} \quad \dot{\gamma} = \dot{\gamma}_v = \dot{\gamma}_e \quad \text{e} \quad (\text{eq. 2.21})$$

$$\tau = \tau_v + \tau_e \quad \text{ou} \quad (\text{eq. 2.22})$$

pelas equações 2.14 e 2.15:

$$\tau = \eta \frac{d\gamma}{dt} + G\gamma_e \quad \text{ou} \quad \tau = \eta \dot{\gamma} + G\gamma_e \quad (\text{eq. 2.23})$$

2.1.4.3 - Modelo de Burgers

Burgers em 1935 apresentou seu modelo, combinando os modelos de Maxwell e Kelvin-Voigt, resultando num sistema de três blocos: (1) puramente elástico representado pela mola em série E_1 , que é a componente hookeana; (2) viscoelástico sólido, representado pela mola E_2 e amortecedor V_2 em paralelo; (3) puramente viscoso,

representado pelo amortecedor V_3 , que é a componente newtoniana. Com a aplicação da força os elementos do modelo se deformam segundo suas características (viscosa ou elástica), necessariamente limitados pelas associações mútuas entre eles. Após a interrupção da força, dá-se o retorno do sistema à sua condição inicial. Nesse retorno, V_3 continua deformado por constituir um componente totalmente viscoso, permanecendo o sistema com uma deformação residual, que caracteriza o líquido viscoelástico.

2.1.4.4 - Viscoelasticidade linear (LVE)

As magnitudes da tensão e da deformação se relacionam linearmente quando são aplicadas deformações bem pequenas ou suficientemente lentas para que o arranjo molecular não se afaste do equilíbrio. A resposta mecânica do sistema reflete os processos dinâmicos no nível molecular em permanente transição, mesmo no equilíbrio.

2.2 - Testes transientes

2.2.1 - Teste de relaxação

Consiste em se aplicar uma deformação instantânea (com valor dentro da região viscoelástica linear) ao sistema, mantendo-a constante ao longo do experimento (Fig. – 2.11a). O teste consiste em se monitorar a variação das tensões internas do sistema de modo a manter constante a deformação aplicada (Fig. 2.13 b, c,d).

Para o comportamento sólido não há relaxação: a tensão interna do sistema permanece constante com o tempo. No comportamento newtoniano a tensão interna cai instantaneamente e permanece em zero. A combinação destes dois resultados é observada no comportamento viscoelástico, onde há um decaimento exponencial da tensão interna com o tempo.

Fig. 2.11 – Curvas de relaxação: (a) aplicação da deformação, (b) sólido hookeano, (c) líquido newtoniano, (d) fluido viscoelástico.

Para pequenas deformações (na faixa linear), a relação tensão/deformação é uma função somente do tempo. Esta função é a propriedade dos materiais conhecida por *módulo de relaxação de tensão* $G(t)$ dada por:

$$G(t) = \frac{\tau(t)}{\gamma}, \text{ (em Pa)} \quad (\text{eq. 2.24})$$

Sistemas com grande número de pequenas moléculas tendem a ter um decaimento pronunciado em curto espaço de tempo (Fig.2.12a). Por outro lado, um decaimento mais lento indica a existência de moléculas maiores e mais pesadas, consequentemente com dinâmicas mais lentas (Fig. 2.12b).

Fig. 2.12 – Curvas de relaxação para sistemas de dinâmica mais rápida (curva a) e mais lenta (curva b).

Em princípio, fluidos que seguem o modelo de Maxwell decaem por uma exponencial simples, atingindo a tensão interna igual a zero a um tempo infinito:

$$\frac{d\tau}{dt} = -k\tau \quad (\text{eq. 2.25})$$

sendo, τ o inverso do tempo de relaxação t_r .

Para os sistemas polidispersos, o modelo geral de Maxwell adota um arranjo em paralelo constituído por múltiplas seqüências em série (mola e amortecedor), como aquela mostrada na Fig. 2.8a., cada uma representando uma fase ou componente do sistema, de forma que o tempo de relaxação de cada tipo de componente será dado por:

$$t_{r_i} = \frac{\eta_i}{G_i} \quad (\text{eq. 2.26})$$

As 'n' razões de decaimentos apresentadas pela curva são calculadas por um programa de análise de dados disponível no reômetro. O número 'n' de tempos de relaxação obtidos é igual ao número de microfases polidispersas, correspondendo portanto ao número de populações dinamicamente distintas na amostra.

2.2.2 - Teste de ‘creep’ ou fluência

Neste teste uma tensão constante é aplicada na amostra por um determinado tempo, findo o qual é ela removida. A deformação é monitorada em função do tempo tanto na etapa de deformação ($t_1 - t_2$) quanto no retardo ($t > t_2$).

A Figura 2.13 mostra os comportamentos característicos: o sólido elástico perfeito irá se deformar instantaneamente e permanecerá deformado enquanto durar a tensão, retornando instantaneamente após a remoção da tensão. O líquido newtoniano irá se deformar e permanecerá deformado mesmo após remoção da tensão. O fluido viscoelástico descreverá um comportamento intermediário.

Fig. 2.13 – Comportamentos de “creep”: (a) aplicação da tensão, (b) sólido hookeano, (c) líquido newtoniano e (d) material viscoelástico.

Na Fig. 2.13d o comportamento representado pela curva é de um material viscoelástico líquido - modelo de Maxwell ou de Burgers. A representação do comportamento de um material viscoelástico sólido - modelo de Kelvin-Voigt - teria na região de recuperação de deformação um maior decaimento, com a curva tendendo a zero.

No teste de relaxação, as tensões internas do sistema diminuem em resposta à deformação que é mantida constante. Supostamente componentes mistos mecânicos representativos do sistema, como por exemplo, os elementos de Kelvin-Voigt, devem, juntamente com os elementos viscosos puros, ser os responsáveis pela diminuição das tensões. Nas curvas de ‘creep’ ao se retirar totalmente a tensão externa, no retardo a componente viscosa sofre os efeitos da retração da componente elástica.

O modelo que melhor explica o comportamento no ‘creep’ para o fluido viscoelástico é o de Burgers. Nos primeiros instantes em que a tensão é aplicada atua a deformação elástica pura (mola E_1 , Fig.2.10c e deformação γ_1 , Fig. 2.14). Num segundo momento a deformação γ_2 corresponderá à deformação viscoelástica do segundo bloco da Fig. 2.10c (mola E_2 e amortecedor V_2). A deformação da componente viscosa pura V_3 é representada por γ_3 . β corresponde à viscosidade da substância

deformada. A deformação total é a soma das três etapas. Neste ponto termina a curva de deformação e começa a curva de retardo, na remoção da tensão.

No retorno do sistema, a primeira etapa do decaimento da curva representa a retração γ_e das molas E_1 e E_2 . A dimensão γ_v representa a parcela viscosa que não retrai (V_3). Este é o comportamento do líquido viscoelástico. No comportamento do sólido viscoelástico, o retorno alcançaria o eixo dos x, não havendo, portanto, a parcela γ_v .

Fig. 2.14. Curva de ‘creep’ para fluido viscoelástico

Com os valores de γ_e e de γ_v temos definido com quanto participa cada componente (viscosa e elástica) no sistema. Assim:

$$\gamma_{total} = \gamma_1 + \gamma_2 + \gamma_3 = \gamma_e + \gamma_v \quad (\text{eq. 2.27})$$

No intervalo de carga do sistema, entre t_0 e t_1 , a viscosidade varia em função da tensão e do tempo ($\eta = f(\tau_0, t)$), e a deformação neste trecho da curva é *não-estacionária*.

Entre t_1 e t_2 a viscosidade não varia em função do tempo, mas somente da tensão ($\eta = f(\tau_0)$) e a deformação é *estacionária*. A viscosidade neste trecho da curva, *viscosidade de cisalhamento zero* (η_0), corresponde à viscosidade do amortecedor V_3 (Fig. 2.10c). Ela é medida sob uma taxa de cisalhamento muito pequena e é dada por:

$$\eta_0 = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}_3} = \frac{\tau_0}{\tan \beta}, \text{ em Pa.s} \quad (\text{eq. 2.28})$$

$$\text{pois, } \tan \beta = \frac{d\gamma}{dt} = \dot{\gamma} \quad (\text{eq. 2.29})$$

É deste trecho da curva que se obtém informação, por exemplo, sobre a massa molar de moléculas desagregadas de polímeros. Mas o tempo de medida dever ser o menor possível para não ultrapassar o limite da viscoelasticidade linear - LVE.

Durante todo o trecho de carga do sistema ($t_0 - t_2$), podemos definir o parâmetro *compliância* $J_e(t)$, dada por:

$$j_e(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_0}, \text{ em Pa}^{-1} \quad (\text{eq. 2.30})$$

e no retorno ou recuperação: $J_r(t) = (\gamma_{\max} - \gamma_r(t)) / \tau_0 \quad (\text{eq. 2.31})$

Fig. 2.15 – Compliâncias do sistema: (a) período de carga do sistema, (b) recuperação do sistema.

No trecho $t_1 - t_2$, a *compliância recuperável no equilíbrio* é dada por:

$$J_e^0 = \frac{1}{G_e^0} = \frac{\gamma_e^0}{\tau_0}, \text{ em Pa}^{-1} \quad (\text{eq. 2.32})$$

sendo G_e^0 o *módulo de cisalhamento total*, em Pa, equivalente ao comportamento das molas E_1 e E_2 (Fig. 2.10c) e γ_e^0 o coeficiente linear da reta que passa no trecho estacionário. Tanto J_e^0 como G_e^0 são constantes relacionadas à deformabilidade elástica do sistema e podem dar informações a respeito da distribuição de massa molar de macromoléculas desagregadas e da polidispersividade do meio. Da equação 2.27 podemos associar:

$$\begin{aligned} \gamma(t) &= mola(E_1) + mod\, Kelvin - Voigt(E_2 + V_2) + amortecedor(V_3) = \gamma_1 + \gamma_2(t) + \gamma_3(t) \\ \gamma(t) &= \frac{\tau_0}{G_1} + \frac{\tau_0}{G_2} \cdot (1 - e^{-t/\lambda_R}) + \frac{\tau_0 \cdot t}{\eta_0} \end{aligned} \quad (\text{eq. 2.33})$$

onde, $G_1 (= \tau_0/\gamma_1)$, em Pa, é o módulo de cisalhamento correspondente à mola E_1 , podendo ser chamada de G_0 por representar a componente elástica pura. O tempo de retardo é dado em (s), por:

$$\lambda_R = \frac{\eta_2}{G_2} \quad (\text{eq. 2.34})$$

sendo G_2 , em Pa, o módulo de cisalhamento da mola E_2 e η_2 , em Pa.s, a viscosidade do amortecedor V_2 . η_0 é a viscosidade de cisalhamento zero, em Pa.s, correspondente ao amortecedor V_3 .

Outra equação que expressa o comportamento do fluido no modelo Kelvin-Voigt é:

$$\tau = G_2 \cdot \gamma + \eta_2 \cdot \dot{\gamma} \quad (\text{eq. 2.35})$$

No trecho do retorno, retardo, ou *recuperação não estacionária* ($t_2 - t_3$), o fluido recupera de uma quantidade γ_e , característica da parcela elástica, equivalente à quase totalidade da energia armazenada na fase de deformação, usada agora para a recuperação. Na *faixa estacionária*, uma deformação constante de valor γ_r corresponde à porção de energia dissipada ou perdida para o meio pela componente viscosa do sistema. Para o intervalo de recuperação:

$$\gamma(t) = \gamma_{\max} - \frac{\tau_0}{G_1} - \frac{\tau_0}{G_2} \cdot (1 - e^{-t/\lambda_R}) \quad (\text{eq. 2.36})$$

Aplicando os limites de $t = 0$, na recuperação apenas da mola E_1 :

$$\gamma(0) = \gamma_{\max} - \frac{\tau_0}{G_1} \quad (\text{eq. 2.37})$$

e em $t = \infty$, para a recuperação das molas E_1 e E_2 , e conseqüentemente do amortecedor V_2 tendo-se o amortecedor V_3 deformado, temos:

$$\gamma(\infty) = \gamma_{\max} - \frac{\tau_0}{G_1} - \frac{\tau_0}{G_2} \quad (\text{eq. 2.38})$$

e no *tempo de retardo* λ_R :

$$\gamma(\lambda_R) = \gamma_{\max} - \frac{\tau_0}{G_1} - \frac{\tau_0}{G_2} \left(1 - \frac{1}{e}\right) = \gamma_{\max} - \frac{\tau_0}{G_1} - 0,632 \frac{\tau_0}{G_2} \quad (\text{eq. 2.39})$$

Esta equação define o *tempo de retardo* como o período de tempo desde a remoção da tensão (no tempo t_2), até a amostra recuperar a deformação, dada pela eq. 2.39 (no tempo t_3).

2.3 - Testes dinâmicos

Os ensaios oscilatórios consistem na aplicação de uma perturbação mecânica senoidal, de amplitude e frequência controláveis, a um dado sistema e na análise da onda de resposta. Pode ser compreendida como uma espectroscopia mecânica, em que a principal distinção com técnicas espectroscópicas convencionais encontra-se na natureza da perturbação imposta ao sistema: em Reologia a perturbação é mecânica, em Espectroscopia, a perturbação é eletromagnética.

Através da utilização dos testes oscilatórios, obtêm-se informações adicionais àquelas fornecidas pelos testes de ‘creep’ e de relaxação, ampliando-se a compreensão sobre a natureza viscoelástica dos materiais. As variáveis dinâmicas incluem o *módulo de perda ou de dissipação*, também chamado de *módulo viscoso* (G''), o *módulo de estocagem ou de armazenagem*, também chamado de *módulo elástico* (G') que são definidos a partir de um *módulo de cisalhamento dinâmico complexo* (G^*). Outros parâmetros incluem relações entre tais grandezas, como: – *ângulo de perda* ($\tan \delta$) e a *viscosidade complexa dinâmica* (η^*). Esses e demais parâmetros serão adiante definidos.

O procedimento adotado nesses testes consiste em se submeter uma amostra colocada entre dois pratos ou entre uma placa e um cone a uma tensão de cisalhamento ou deformação oscilatória, de amplitude senoidal, a uma frequência f (Hz) ou frequência angular ω (rad.s^{-1}), fixa ou variável, e em observar-se o comportamento de resposta da amostra. Também neste tipo de teste, a região de viscoelasticidade linear (LVE) não deve ser excedida, uma vez que o formalismo envolvido nas equações apresentadas nesta Tese limita-se a condições lineares de viscoelasticidade (viscoelasticidade não-linear não será tratada no âmbito desta Tese).

Uma substância de comportamento de um sólido perfeito (hookeano) submetida a uma tensão (τ) ou a uma deformação (γ) controlada terá o comportamento mostrado na Fig. 2.16.

Como o comportamento puramente elástico acompanha imediatamente o esforço da tensão, as curvas de tensão e deformação se apresentam em fase e a taxa de cisalhamento apresenta-se 90° defasada:

Fig. 2.16 – Modo oscilatório para um sólido hookeano

$$\tau(t) = G \cdot \gamma(t) \quad (\text{sob deformação controlada}) \text{ ou} \quad (\text{eq. 2.40})$$

$$\gamma(t) = \frac{1}{G} \cdot \tau(t) \quad (\text{sob tensão controlada}) \quad (\text{eq. 2.41})$$

Para substâncias viscosas ideais a tensão e taxa de cisalhamento apresentam-se em fase, enquanto a deformação é defasada de 90° (Fig. 2.17).

Fig. 2.17 – Modo oscilatório para um líquido newtoniano

As relações matemáticas para este tipo de fluido são:

$$\tau(t) = \eta \cdot \dot{\gamma}(t) \quad (\text{sob taxa ou deformação controlada}) \quad (\text{eq. 2.42})$$

$$\dot{\gamma}(t) = \frac{1}{\eta} \cdot \tau(t) \quad (\text{sob tensão controlada}) \quad (\text{eq. 2.43})$$

Para um fluido viscoelástico, usando o controle da deformação, aplica-se:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \text{sen}(\omega \cdot t), \quad (\text{eq. 2.44})$$

ou a correspondente

$$\dot{\gamma}(t) = \gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) = \dot{\gamma} \cdot \cos(\omega t) \quad (\text{eq. 2.45})$$

Para um fluido viscoelástico, usando o controle da tensão, aplica-se:

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \text{sen}(\omega t) \quad (\text{eq. 2.46})$$

sendo, γ_0 a *amplitude de deformação*, τ_0 a *amplitude de tensão* (Pa) e ω a *freqüência angular* (s^{-1}) ou $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$ com a freqüência f em Hz.

A resposta observada será uma curva de tensão de cisalhamento, com controle de deformação, ou a curva de deformação, com controle de tensão, ambas defasadas de um ângulo δ entre 0 e 90°. Dessas curvas pode-se obter:

Módulo de estocagem, que representa o comportamento elástico da amostra:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos \delta = |G^*| \cdot \cos \delta \quad (\text{eq. 2.47})$$

Módulo de perda, que caracteriza o comportamento viscoso da amostra:

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \text{sen} \delta = |G^*| \cdot \text{sen} \delta \quad (\text{eq. 2.48})$$

Fator de amortecimento ou *ângulo de perda*, que indica a razão entre a energia perdida e a estocada ou a proporção entre a componente viscosa e a componente elástica da amostra:

$$\text{tg} \delta = \frac{G''}{G'} = \frac{\eta'}{\eta''} \quad (\text{eq. 2.49})$$

sendo η' a parte real da viscosidade (chamada de *viscosidade dinâmica*; corresponde à viscosidade de estado estacionário, η_0 , quando ω tende a zero; mede a velocidade de dissipação de energia). É dada por:

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} = \frac{\tau}{\omega \cdot \gamma_0} \sin \delta \quad (\text{eq. 2.50})$$

e η'' a parte imaginária da viscosidade (mede a elasticidade ou energia estocada; está relacionada com o módulo de cisalhamento de armazenagem). É dada por:

$$\eta'' = \frac{G'}{\omega} = \frac{\tau}{\omega \cdot \gamma_0} \cos \delta \quad (\text{eq. 2.51})$$

G' e G'' são os componentes reais e imaginários, respectivamente, do módulo complexo de cisalhamento, G^* . O *módulo complexo* mede a resistência total dos materiais à deformação. Por definição, G^* corresponde à razão τ_0 / γ_0 .

$$|G^*| = G' + iG'' = \frac{\tau(t)}{\gamma(t)} \quad \text{ou} \quad (\text{eq. 2.52})$$

$$|G^*| = (G'^2 + G''^2)^{1/2} \quad (\text{eq. 2.53})$$

Fig 2.18 – Representação gráfica do módulo de cisalhamento complexo (componentes imaginário e real)

Analogamente, a *viscosidade complexa* η^* é dada por:

$$|\eta^*| = \eta' - i\eta'' = \frac{\tau(t)}{\dot{\gamma}(t)} \quad (\text{eq. 2.54})$$

Na faixa de viscoelasticidade linear (LVE) se aplica a relação entre G^* e η^* :

$$G^* = i\omega \cdot \eta^* \quad (\text{eq. 2.55})$$

A compliância complexa é definida como o inverso do módulo de cisalhamento complexo:

$$J^* = \frac{1}{G^*} = J' + iJ'' \quad (\text{eq. 2.56})$$

2.3.1 - Varredura de amplitude com a frequência constante

Existem duas formas de se proceder à varredura de amplitude com a frequência constante:

2.3.1.1 - Varredura de amplitude de deformação

Esta forma de teste se caracteriza pelo controle de deformação ao longo do tempo, dada por:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin \omega t \quad (\text{eq. 2.57})$$

sendo ω a frequência angular constante e $\gamma_0 = \gamma_0(t)$, a amplitude de deformação. A Fig. 2.19 mostra a curva de variação da amplitude com frequência constante e a curva do logaritmo do módulo de cisalhamento em função do logaritmo da amplitude de deformação.

Fig. 2.19 – a) curva de varredura da amplitude de deformação a frequência constante; b) variação dos logaritmos dos módulos elástico e viscoso em função do logaritmo da deformação, a frequência constante, indicando o limite da região viscoelástica linear.

A segunda curva mostra que substâncias viscoelásticas medidas com deformações crescentes podem responder linearmente, com G' , G'' (e também $|\eta^*|$) permanecendo independente da tensão aplicada (ou deformação sofrida) em uma certa região, caracterizada por um patamar (LVE), cujo limite é designado γ_1 (limite da região viscoelástica linear). Este valor limite é definido com base em uma tolerância de até 10% de desvio (negativo ou positivo) sobre o valor do ângulo de perda ($\tan \delta$). Para

valores acima de γ_1 , a estrutura física do material estará destruída e desse modo não se aplicam as relações matemáticas aqui expostas, as quais se referem estritamente a materiais dentro da região de resposta linear ($<\gamma_1$).

2.3.1.2 - Varredura de amplitude de tensão

Analogamente a curva é obtida, agora com o controle de tensão, de acordo com a equação:

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \sin \omega t \quad (\text{eq. 2.58})$$

com a frequência angular, ω , constante e amplitude de tensão dada por $\tau_0 = \tau_0(t)$. Como este tipo de teste não foi utilizado no estudo, seu desenvolvimento será omitido aqui.

2.3.2 - Varredura de frequência com amplitude de deformação constante

De forma inversa ao teste anterior, neste a frequência é que varia, com a amplitude mantida constante (dentro da região viscoelástica linear). Também apresenta dois modos de medição:

2.3.2.1 Varredura de frequência de deformação

Fig. 2.20 – a) curva de varredura de frequência com amplitude de deformação constante; b) variação dos logaritmos dos módulos elástico e viscoso em função do logaritmo da frequência, sob condições de amplitude de deformação constante.

A curva de amplitude de frequência é dada por:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin \omega t, \quad (\text{eq. 2.59})$$

com amplitude de deformação, γ_0 , constante e ω uma função do tempo dada por $\omega = \omega(t)$.

2.3.2.2 - Varredura de frequência de tensão

Analogamente a curva é obtida, agora com o controle de tensão, de acordo com a equação:

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \sin \omega t, \quad (\text{eq. 2.60})$$

com amplitude de tensão, τ_0 , constante e frequência angular, ω , variável. Como também esta modalidade de medida não foi utilizada em nosso estudo, maiores detalhes serão omitidos.

A varredura de frequência nos dá informações a respeito da estrutura e organização molecular, o que discutiremos a seguir.

2.3.2.3 - Substâncias viscoelásticas com a deformação dependente da frequência

2.3.2.3.1 – Sistemas de baixa massa molar e baixa polidispersão

Nesses sistemas, sem ligações cruzadas, o comportamento das substâncias acompanha o modelo de Maxwell, num arranjo em série das molas e amortecedores, em número proporcional à polidispersividade, aplicando-se as relações:

$$G'(\omega) = G_1 \frac{\omega^2 t_r^2}{(1 + \omega^2 t_r^2)} \quad (\text{eq. 2.61})$$

$$G''(\omega) = G_1 \frac{\omega t_r}{(1 + \omega^2 t_r^2)} \quad (\text{eq. 2.62})$$

onde, t_r é o tempo de relaxação e G_1 o valor do patamar da curva G' .

Analisando-se a equação 2.62 e a Figura 2.20 é possível perceber-se que:

- Quando o produto $\omega \cdot t_r = 1$, $G''(\omega) = G_1/2$ e a curva $G''(\omega)$ passa por seu ponto máximo, igual à metade do valor do patamar da curva $G'(\omega)$:

$$G''_{\max} = G_1/2 \quad (\text{eq. 2.63})$$

- Para baixas frequências, as declividades das curvas são de 2:1 para G' (porque a proporcionalidade $G' \sim \omega^2$ nesse caso se aplica – vide eq. 2.61) e de 1:1 para G'' : ($G'' \sim \omega$ se aplica - vide eq. 2.62).

$$\omega \rightarrow 0 \Rightarrow tg(G') = \frac{2}{1} \Leftrightarrow tg(G'') = \frac{1}{1} \quad (\text{eq. 2.64})$$

Em altas frequências ($\omega \rightarrow \infty$), G'' volta a cair com inclinação igual a 1:1

- Para baixos valores de frequência, o sistema se comporta como líquido viscoso:

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} G' = 0 \text{ Pa} \quad (\text{eq. 2.65})$$

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} G'' = 0 \text{ Pa} \quad (\text{eq. 2.66})$$

Fig. 2.21 – Curva de varredura de frequência para sistemas pouco polidispersos

- Para altas frequências o sistema se comporta com sólido elástico, pois:

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} G' = G_1 \quad (\text{eq. 2.67})$$

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} G'' = 0 \text{ Pa} \quad (\text{eq. 2.68})$$

- A viscosidade zero (η_0), que corresponde ao valor da viscosidade em condições estacionárias, pode ser obtida a partir do ensaio oscilatório através de:

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} \frac{G''}{\omega} = \eta_0 \quad (\text{eq. 2.69})$$

- A compliância do estado estacionário J_e^0 , atribuída à componente elástica do sistema, pode também ser obtida por:

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} \frac{G'}{(G'')^2} = \frac{1}{G_1} = J_e^0 \quad (\text{eq. 2.70})$$

- Por fim, o tempo de relaxação, que descreve a re-formação elástica com dependência temporal, pode ser obtido da relação:

$$\lim_{\omega \rightarrow 0} \frac{G'}{\omega G''} = t_r \quad (\text{eq. 2.71})$$

Os parâmetros η_0 e J_e^0 podem ser obtidos também através dos ensaios de ‘creep’, como mostrado no item 2.2.

Assim, qualquer fluido viscoelástico destituído de ligações cruzadas pode ser caracterizado na região de baixa-freqüência em ensaios dinâmicos (oscilatórios), empregando-se o modelo de Maxwell, de onde derivaram as equações 2.61 e 2.62 utilizadas nessa análise.

2.3.2.3.2 - Sistemas polidispersos e substâncias com massas molares mais elevadas

O comportamento dessas moléculas se distingue das de menor tamanho porque elas se apresentam enoveladas, formando uma rede com maior dificuldade de movimentação. No entanto, nos movimentos mais suaves, a freqüências mais baixas, as moléculas possuem uma certa liberdade de fluidez, que segue o modelo de Maxwell (com G' e G'' indo a zero para freqüências muito baixas), portanto, com comportamento semelhante às curvas de baixa dispersividade na primeira zona de fluxo.

Na curva da Fig. 2.22 observam-se as seguintes regiões com comportamentos de fluxo distintos:

abaixo de $\omega_1 = 1^a$ zona de fluxo

ω_1 a ω_2 = patamar elástico ou faixa elástica (rubber elastic) (G_2)

ω_2 a ω_3 = 2a. zona de fluxo, faixa de transição

$\geq \omega_3$ = patamar vítreo (G_1)

Fig. 2.22 Varredura de frequência de fluidos polidispersos. Linha cheia: substâncias com duas populações distintas de massa molar, de baixa dispersividade cada uma; linha tracejada: substâncias com larga distribuição de massa molar.

A valores intermediários de frequência, o comportamento assemelha-se a uma rede elástica temporária, formada pelas moléculas maiores, com pouca capacidade para deslizarem umas sobre as outras, com um comportamento de fluxo quasi-elástico. É a região em que se forma um primeiro patamar (G_2). Logo acima desta região de frequência, na faixa de transição, uma nova fluidez é observada, causada pelas moléculas mais leves, de maior mobilidade. Na última faixa de frequência, no patamar vítreo, nenhuma fluidez é observada.

Em contrapartida os sistemas polidispersos, com vasta distribuição de massas molares, mostram curvas sem distinção clara destas faixas intermediárias, causadas pela sobreposição de diversas curvas nesta região. Somente o patamar vítreo é aparente. Valores maiores de frequência destroem a estrutura interna e as curvas diminuem abruptamente.

Da Fig. 2.22 as seguintes informações podem ser tiradas:

- Quanto mais elevado o valor do plateau G_1 , mais fortes são as estruturas e maiores as forças interativas entre as macromoléculas de maior tamanho.
- Curvas com início do comportamento ascendente a frequências mais baixas ($G''_{\max}$ a $\omega \cdot t_r = 1$) indicam tempos de relaxação mais altos. Moléculas longas e ramificadas somente fluem em baixas frequências, ocorrendo bloqueio entre elas quando em alta frequência. O deslocamento do início da curva para a direita significa, portanto, moléculas menos ramificadas e menores.

- Curvas com inclinações ascendentes mais acentuadas indicam distribuição de massa molar mais estreita (espectro de relaxação menos expandido). Quanto maior a polidispersão (menor inclinação ascendente na curva $G'(\omega)$) e maior a proporção de massas molares baixas (um menor ponto de máximo na curva $G''(\omega)$), maior a dispersão de tempos de relaxação.
- Um deslocamento para a esquerda no ponto de cruzamento das duas curvas $G'(\omega)$ e $G''(\omega)$ indica aumento da massa molar média, para uma distribuição de massa molar constante. Se a distribuição de massa molar se alarga (aumento da polidispersão), o cruzamento das curvas se desloca para baixo, para uma massa molar média constante.

2.3.2.3.3 - Substâncias viscoelásticas com ligações cruzadas

A rede formada por estas ligações torna impossível o deslizamento de umas camadas sobre as outras, além de um certo limite, sem a destruição de sua estrutura. Uma deformação limitada da rede pode ser observada, dependendo do tamanho dos interstícios da estrutura. Se eles forem maiores possibilitarão maiores deformações.

Fig. 2.23 – Curva de varredura de frequência para substâncias com ligações cruzadas

Substância plena de ligações cruzadas -----

Substância com ligações cruzadas parciais ———

Para a substância plena de ligações cruzadas a curva G'' tem valor zero e G' é constante, isto é, invariante com a frequência.

Para ambos os casos, $G'(\omega)$ não tende ao valor zero para $\omega = 0$

2.4 - Dependência da viscosidade com outras variáveis

2.4.1 - Com a massa molar

As propriedades reológicas, como viscosidade, normalmente aumentam com a elevação da massa molar, principalmente em polímeros lineares. Porém, a um valor de massa molar crítico, característico de cada polímero, a elevação da massa molar acarreta um aumento abrupto da viscosidade, devido à formação de ligações cruzadas transientes²⁴.

2.4.2 - Com a temperatura

Outra variável que interfere nas propriedades reológicas é a temperatura. Para líquidos Newtonianos a relação da viscosidade, η , com a temperatura, pode ser descrita por:

$$\eta = Ae^{-B/T} \quad (\text{eq. 2.72})$$

A equação 2.72 é uma expressão do tipo Arrhenius, onde A e B são constantes características da amostra e T a temperatura absoluta.

A constante A está relacionada com o volume da partícula (V) e B está relacionada com a energia livre de ativação de fluxo ($\Delta G^\#$):

$$\eta = (h/V) \exp(-\Delta G^\# / RT) \quad (\text{eq. 2.73})$$

onde: h = cte. de Planck

V = volume médio ocupado por partícula

R = cte. universal dos gases perfeitos.

Tendo-se que:

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\# \quad (\text{eq. 2.74})$$

podemos desdobrar a equação 2.73 em suas componentes entálpica e entrópica, conforme indicado⁷:

$$\eta = (h/V) \exp\left[-\left(\Delta H^\# / RT\right) - \left(\Delta S^\# / R\right)\right] \quad (\text{eq. 2.75})$$

$\Delta H^\#$ e $\Delta S^\#$ = entalpia e entropia de ativação de fluxo, respectivamente.

Para os líquidos e sólidos, pode-se considerar o volume como sendo independente da variação da temperatura e tomar o termo $\Delta S^\#$ como uma constante. A equação 2.74 fica reduzida a:

$$\eta = \eta_0 \exp\left(-\frac{\Delta H^\#}{RT}\right) \quad \text{onde:} \quad (\text{eq. 2.76})$$

$$\eta_0 = \left(\frac{h}{V}\right) \exp\left(-\frac{\Delta S^\#}{R}\right) \quad (\text{eq. 2.77})$$

A equação é comumente encontrada na literatura na forma:

$$\eta = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (\text{eq. 2.78})$$

A energia de ativação de fluxo para grandes moléculas, como no caso das gliadinas, envolve a mobilidade relativa de segmentos ou porções menores da macromolécula. Analogamente aos polímeros, que possuem segmentos em sua molécula que podem mover-se independentemente como unidades cinéticas, nas proteínas tal papel é representado por segmentos de cadeia com extensões de 6 a 10 resíduos de aminoácidos⁶.

Para a determinação das energias de ativação de fluxo, a expressão acima é em geral tomada em sua forma logarítmica,

$$\ln \eta = \ln A - E_a / RT \quad (\text{eq. 2.79})$$

de modo a permitir a determinação de E_a a partir da inclinação da reta, em um gráfico $\ln \eta$ versus $1/T$.

3 – Materiais e Métodos

A gliadina do glúten do trigo utilizada é um produto Sigma-Aldrich (G-3375, Lotes 56H7105 e 90K7043),. Empregou-se água ultra-pura, reagente tipo 1 (ASTM), com resistividade de 18,2 M Ω .cm (Milli-Q, da Millipore). Os demais reagentes foram todos de grau analítico.

Tanto os testes rotacionais (estacionários e transientes) quanto os oscilatórios foram executados em um reômetro da Paar-Physica, modelo MCR-300, com controle de tensão e taxa de cisalhamento e de temperatura (sistema Peltier com precisão de 0.05°C), equipado com software US200. A geometria de medição foi um sistema cone-placa com diâmetro de 25mm e ângulo de 1°.

As amostras para os ensaios reológicos foram preparadas a partir da pesagem da proteína em balança analítica seguida de sua dispersão nos diversos meios solventes. Foram empregados dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e formamida, e concentrações da proteína variando de 0,5% a 30%, com agitação manual para facilitar a dispersão. O tempo para homogeneização variou conforme a concentração da proteína e a natureza do solvente, de algumas horas a alguns dias. Na preparação dos sistemas ternários gliadina-solvente-água, foi empregada gliadina na concentração de 20%, variando-se a concentração do solvente orgânico-aquoso na faixa de fração molar (para o componente orgânico no solvente) de 0,3 a 0,8.

As faixas de temperatura de ensaio foram variáveis, mas não excederam os limites de 0 a 60°C (em todos os ensaios reológicos utilizou-se câmara com atmosfera saturada do solvente para minimizar efeitos de evaporação). Apesar do comportamento dinâmico não aparentar perturbações aparentes abaixo da temperatura de solidificação do DMSO (18°C), em muitos ensaios optou-se por não se estender a faixa de temperatura para abaixo do limite inferior de 20°C. Nos ensaios em que amostras foram tratadas por longos períodos (8h) a 40°C, foram evidenciadas modificações irreversíveis no comportamento reológico. Além disso, apesar da câmara com atmosfera saturada, as temperaturas acima deste valor se mostraram de difícil controle, em razão da evaporação do solvente (câmara não hermética). Por essas razões, o limite superior de temperatura para a maior parte dos ensaios situou-se em 35°C.

Para os demais solventes os critérios para estabelecimento dos limites de temperatura de ensaio foram os mesmos, isto é, adotou-se como limite inferior de temperatura de teste valores um pouco acima do ponto de solidificação dos solventes puros.

O comportamento das amostras foi caracterizado inicialmente pelas curvas de fluxo (teste rotacional), medindo-se em um grupo de experimentos 50 pontos no intervalo de taxa de cisalhamento de 200 a 4000s⁻¹ com tempo de aquisição de 3s por ponto. Para outro grupo de amostras, em que se fez uma varredura de velocidade de cisalhamento mais extensa (100-4000s⁻¹), foram medidos 100 pontos, com o mesmo tempo de aquisição.

Com os valores médios das viscosidades dos sistemas, em sua faixa de comportamento newtoniano de fluxo obtidos para cada temperatura, foi possível se determinar a energia de ativação de fluxo, a partir da inclinação da reta do gráfico $\ln \eta$ versus o inverso da temperatura absoluta.

As amostras de comportamento não-newtoniano foram submetidas a testes oscilatórios de varreduras de amplitude de deformação e de frequência e a testes rotacionais transientes de relaxação e fluência ('creep'). Em algumas amostras ainda foram realizados ensaios para verificação de eventuais efeitos de histerese, além de testes de varredura de temperatura e de tempo.

Os testes oscilatórios ou dinâmicos aplicados aos sistemas viscoelásticos basearam-se na aplicação de uma tensão de cisalhamento ou deformação com amplitude senoidal a uma frequência $f = 1\text{Hz}$ e acompanhamento simultâneo da resposta do sistema (módulos de armazenamento, G' , e de perda ou dissipação, G''). A tangente da diferença de fase δ , correlacionada com o maior ou menor grau de componente elástico e viscoso presente nas amostras, foi também registrada.

Da varredura de amplitude de deformação nos testes oscilatórios obteve-se a faixa viscoelástica linear. A partir desta faixa foi determinado o valor de deformação para os testes de varredura de frequência, relaxação e fluência. Para a varredura de amplitude de deformação estabeleceu-se a medição de 60 pontos na faixa de deformação de 0,1-1000%, com a frequência de 1Hz.

Nos testes de varredura de frequência foram medidos 60 pontos, com uma faixa de frequência de 0,1 – 30Hz, utilizando-se a deformação da faixa linear sugerida pelo cálculo da varredura de amplitude de deformação. Desta curva é possível avaliar-se a polidispersividade do sistema, verificando-se na porção inicial da curva a relação entre variação do módulo elástico G' e a variação da frequência angular ω . O ponto de interseção das curvas G' e G'' foi avaliado quanto à sua dependência com a massa molar média dos agregados de proteína.

Os testes de relaxação consistiram na aplicação de uma deformação constante ao sistema e simultâneo acompanhamento da variação das tensões internas do mesmo enquanto submetido a essa deformação, como função do tempo. Essas medidas podem informar a respeito da polidispersividade do sistema, na medida em que os tempos de relaxação obtidos a partir dos ajustes das curvas às funções apropriadas apontem para a existência de uma ou mais populações dinamicamente distintas. Para cada teste de relaxação, 240 pontos foram medidos na razão de 0,5s por ponto, utilizando-se a

deformação indicada pelo cálculo da varredura de amplitude de deformação. Os ajustes das curvas às funções matemáticas correspondentes foram feitos através do programa MicrocalTM Origin .

Nos testes de fluência ('creep'), escolheu-se uma tensão cuja deformação a ser provocada no sistema recaísse dentro da faixa viscoelástica linear, sendo tomado um valor menor que o $\gamma_{\text{máx}}$ sugerido pelo cálculo da varredura de amplitude de deformação. Essa tensão foi mantida até que se atingisse a região estacionária (em que a viscosidade passou a ser constante, sem dependência com o tempo), respeitando-se a faixa viscoelástica linear. Após um pequeno intervalo de tempo nessa região, a tensão aplicada na amostra foi suspensa e registrou-se então a curva de retardo ou de recuperação (re-deformação). A partir desse tipo de teste, pudemos quantificar a contribuição das componentes elástica e viscosa dos sistemas viscoelásticos, através da determinação dos valores das compliâncias.

4 - Resultados e discussão

4.1 - Testes rotacionais - Curvas de fluxo – Energia de ativação

Alguns aspectos mais gerais devem ser mencionados. A viscosidade das diferentes amostras mostrou uma dependência direta com a concentração de proteína e inversa com a temperatura, conforme esperado. Tratando-se de sistemas em regime concentrado, observou-se também uma dependência da viscosidade com a idade da amostra, refletindo a lenta cinética de intumescimento da proteína e envelhecimento dos géis nos diferentes meios de dispersão.

4.1.1 – Gliadina em DMSO

Na gama de concentrações de gliadina estudadas em DMSO, (12 amostras com concentrações na faixa de 0,5 a 30% (m/v)), o estado físico das amostras variou de um líquido com características de fluxo newtoniano a um gel bem firme. Amostras até a concentração de 7% (m/m) em proteína, nesse e em outros meios, puderam ter suas curvas de fluxo determinadas, apresentando um comportamento newtoniano.

O diagrama da Figura 2.24 delimita duas regiões distintas quanto ao comportamento de fluxo das amostras, em função de sua concentração e idade (tempo após preparo). Assim, amostras com concentrações mais elevadas em proteína e baixas idades ou de concentrações mais baixas, porém com idades mais avançadas, geram

sistemas de caráter viscoelástico (não Newtoniano). Esses sistemas encontram-se acima da linha traçada no diagrama. Abaixo dessa linha, encontram-se sistemas de fluxo Newtoniano, representados por sua vez por amostras com proteína em alta concentração e baixa idade ou de baixa concentração, independentemente da idade.

A curva da Figura 2.24 é somente ilustrativa para melhor visualizar as regiões características, em termos de η e de idade de amostra, de comportamento Newtoniano e não-Newtoniano. Ela delimita de forma muito aproximada a região de transição entre esses dois regimes de fluxo.

Fig. 2.24 – Diagrama indicando dependência do tipo de comportamento de fluxo com idade da amostra e concentração (0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7; 9 (0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7; 9 e 10%) (0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7; 9 e 10%) e 10% m/v) de proteína, para gliadina em DMSO, a 20°C. Concentrações estão indicadas pelos símbolos identificados no próprio diagrama.

Fig. 2.25 – Curvas de fluxo de gliadina a 1% em DMSO: (a) a várias temperaturas (amostra com idade de 12 dias, ordem de cisalhamento 20, 30, 10, 40, 0 e 60°C); (b) para amostras de diferentes idades, a uma temperatura constante de 30°C.

A presença da gliadina em meio de DMSO afeta a viscosidade do solvente puro, como seria de se esperar. A evolução da viscosidade das dispersões com a idade da amostra e com a temperatura é mostrada na Fig. 2.25 para uma dispersão de gliadina a 1% naquele solvente. Fora de certos limites de temperatura, o comportamento quasi-newtoniano das dispersões pode ser afetado: por exemplo, o comportamento da amostra de gliadina a 0°C, a partir de 1%, evolui para um comportamento pseudoplástico. A cinética de dispersão é bem mais acelerada nos primeiros dias após o preparo das amostras e favorecida com o aumento da temperatura (dentro do intervalo de não ocorrência de alterações irreversíveis nas amostras, conforme discutido adiante). Observa-se ainda uma intensificação nos efeitos de histerese à medida que o comportamento se afasta do newtoniano e avança para o pseudoplástico.

A energia de ativação de fluxo foi calculada a partir dos dados obtidos para os sistemas na região de fluxo newtoniano ou quasi-newtoniano (faixa de concentração de 0,5% a 7,0% em gliadina), através da equação $\eta = A e^{-E_a/RT}$. Foram obtidos graficamente os valores das energias de ativação de fluxo, E_a , para diferentes concentrações de gliadina nas dispersões, traçando-se curvas (Fig. 2.26) $\ln \eta \times 1/T$ ($\ln \eta = \ln A - E_a/RT$). Foi obtida também a curva para o DMSO puro. O coeficiente angular da reta corresponde a $-E_a/R$.

Fig. 2.26 – Variação de $\ln \eta$ em função do inverso da temperatura para dispersões de gliadina em DMSO, a diversas concentrações da proteína.

A dependência da energia de ativação de fluxo com a concentração da proteína mostrou o perfil indicado na Figura 2.27. Nessa figura, encontram-se também dados de energia de ativação referentes à amostra em meio de formamida, que serão adiante discutidos.

Fig. 2.27 – Energia de ativação de fluxo da gliadina em formamida e DMSO

A faixa de variação observada nos valores calculados de energia de ativação para esse intervalo de concentração de proteína permite concluir que os sistemas encontram-se organizados na rede macromolecular através de interações intermoleculares fracas, não covalentes. Não obstante, não só a concentração, mas também o tempo de vida é um fator que eleva sua energia de ativação.

Para concentrações mais elevadas da proteína, 20% a 30%, em amostras de 11 dias em DMSO, o comportamento observado de decréscimo na viscosidade com o aumento da temperatura também foi o esperado. As curvas de fluxo mostram-se pseudoplásticas, como se vê para a amostra apresentada na Fig. 2.28.

Fig. 2.28 – Curvas de fluxo de gliadina a 20% em DMSO (11 dias) a diferentes temperaturas, (cisalhamento na ordem 20, 30, 10, 40, 0 e 60°C).

A temperatura foi uma variável que determinou o comportamento de dispersões de gliadina quanto a seu comportamento reopéxico ou tixotrópico. Para uma amostra de 27 dias, o comportamento se caracterizou como reopéxico para a temperatura de 40°C, tanto em alíquota nova quanto naquela já cisalhada, enquanto mostrou-se tixotrópico para as demais temperaturas testadas: 0; 5; 12,5 e 20 °C (Fig 2.29.)

Fig. 2.29 – Comportamento tixotrópico e reopéxico de gliadina a 20% em DMSO (amostra de 27 dias), a diversas temperaturas. Taxa de cisalhamento constante ($dy/dt = 1000s^{-1}$).

Essa observação revela o notável efeito da temperatura sobre a organização estrutural do gel, causando uma inversão no comportamento de fluxo como função do tempo quando o sistema é aquecido acima de uma temperatura limite. Também se

observa na Figura 2.29 um aspecto intrigante na curva referente à temperatura de 5⁰C: após a acentuada queda da viscosidade com o início do cisalhamento, um leve aumento da mesma é observado, o qual parece tender a uma estabilidade após cerca de 550 s.

Para se esclarecer esse efeito, decidiu-se observar o efeito de tempos longos de cisalhamento sobre o comportamento de fluxo da gliadina em DMSO. Determinações a duas temperaturas distintas, 5⁰C e 20⁰C, revelaram um comportamento peculiar cíclico para a viscosidade, como mostrado na Fig. 2.30.

Fig. 2.30 – Variação da viscosidade com o tempo (tempos longos) para gliadina a 20% em DMSO, com taxa de cisalhamento constante ($dy/dt = 1000s^{-1}$). Amostra com 27 dias.

O padrão de variação no tempo a 20⁰C (em que a resposta do sistema foi monitorada por cerca de 3 horas) é relativamente regular, com ciclos de cerca de 10 a 15 min de duração, em média. Para o sistema a 5⁰C, um padrão mais complexo de variação é observado, com o comportamento periódico se sobrepondo a uma tendência decrescente global. Os resultados mostraram-se reproduzíveis.

Tais resultados constituem manifestações mecânicas atípicas, que, dentro do melhor de nosso conhecimento, não têm sido relatadas na descrição do comportamento de sistemas. Tendo nos assegurado da não ocorrência de efeitos de deslizamento da amostra no acessório de medida empregado, que invalidariam qualquer especulação a respeito de seu significado, fomos levados a conjecturar a respeito das possíveis causas de tal comportamento.

Assim, nossa atribuição tentativa do comportamento cíclico observado recai sobre a possível ocorrência de movimentos periódicos de distensão/contração de estruturas de gliadina no meio dispersante, induzida pelo próprio cisalhamento. Trabalhos de simulação¹⁸ propõem um modelo de estrutura interpenetrante para

gliadina, compatível com a ocorrência de pequenos deslocamentos espaciais internos da estrutura protéica, sem perda, contudo de seu padrão global de enovelamento característico.

Resultados sobre essa ocorrência para outros sistemas binários (proteína e solvente orgânico puro) e ternários (proteína, solvente orgânico e água) serão apresentados no item 4.1.4 e 4.5, adiante neste capítulo.

4.1.2 - Gliadina em formamida

A gliadina em formamida foi estudada na mesma faixa de concentração empregada nos estudos com DMSO, isto é, de 0,5% a 30% (w/w). De um modo geral, observou-se que a consistência dos géis formados é menor e o tempo de gelificação maior, em relação ao observado em DMSO. Das concentrações estudadas, mostraram comportamento newtoniano as amostras de concentração igual ou menor que 5%. As temperaturas empregadas situaram-se na faixa de 15 a 35°C. Foram ensaiadas amostras com idade de 5 a 13 dias.

Na Fig. 2.31, perfis pseudoplásticos característicos são observados para as curvas de fluxo de gliadina a 20% em formamida, a várias temperaturas. A dependência segue o perfil decrescente esperado para a variação da viscosidade com a temperatura, exceto para curvas registradas a 15°C e 20°C, em que se observa dependência contrária àquela esperada para fases condensadas. Como a ordem em que as temperaturas foram estudadas foi: 20, 25, 15, 30 e 35°C, devemos considerar o provável efeito do cisalhamento sobre a resposta observada.

Fig. 2.31 – Curvas de fluxo de gliadina a 20% em formamida (amostra de 27 dias).

Em comparação à solução em DMSO (Fig. 2.28), a gliadina 20% em formamida (Fig. 2.31) apresenta um valor de viscosidade aproximadamente 50% do apresentado naquele solvente para a mesma concentração e temperatura. Esses resultados indicam que as dispersões nesse meio constituem microestruturas mantidas por interações intermoleculares significativamente mais fracas do que em DMSO. É importante notar que a idade da amostra da Fig.2.31 é significativamente maior do que a da Fig. 2.28, o que torna a diferença observada ainda mais relevante.

Medidas de variação de viscosidade para amostras de gliadina em formamida em função da temperatura foram realizadas na região de fluxo newtoniano dos sistemas, à semelhança do que já foi descrito para a proteína em DMSO (Fig. 2.27). Essas medidas levaram à determinação das energias de ativação de fluxo naquele solvente, que estão apresentadas na Figura 2.27 juntamente com os valores determinados para a proteína em DMSO.

As energias de ativação de fluxo, para as dispersões diluídas tanto em DMSO como em formamida, são bastante baixas (da ordem de 8-19 kJ/mol), indicando que as associações supramoleculares se dão através de forças fracas, certamente não envolvendo ligações cruzadas.

Em confronto com os resultados do espalhamento de luz para a gliadina nestes dois solventes, vemos que no regime de baixa concentração a dimensão molecular não interfere significativamente na termodinâmica de escoamento, já que os raios hidrodinâmicos para dispersões da proteína em DMSO (Tab. 4.10) apresentam tamanhos praticamente o dobro dos tamanhos dos mesmos sistemas em formamida, enquanto as energias de ativação mostram pouca variação. A viscosidade no entanto mostra-se significativamente maior para os sistemas em DMSO, como esperado.

4.1.3 – Gliadina em DMF

As dispersões de gliadina na faixa de concentração de 0,5 a 10% em DMF não se mantiveram homogêneas, separando em duas fases após repouso.

A variação da viscosidade com um longo tempo de cisalhamento, para as concentrações mais altas, resultou nas curvas da Fig. 2.32. Embora as curvas apresentem ondulações periódicas, o fenômeno cíclico não é tão evidente neste solvente.

Fig. 2.32. Viscosidade da gliadina a 20% em DMF, de 20 dias, cisalhada por longos períodos às taxas de 500 e recisalhada a 1000s^{-1} .

Observa-se que o recisalhamento em DMF (Fig. 2.32) leva a uma queda na viscosidade (comportamento tixotrópico), diferentemente do observado para a proteína em um dos ensaios em DMSO (Fig. 2.29).

4.1.4 - Dependência cíclica da viscosidade com o tempo

A variação cíclica da viscosidade de amostras, apresentada e discutida no item 4.1.1 para o DMSO, cisalhadas em tempos longos, repetiu-se em várias situações para dispersões de gliadina nos demais solventes puros.

Para amostras novas, Fig. 2.33, o fenômeno começa a se manifestar após os primeiros 5000s de cisalhamento nas frequências testadas. Em amostras recisalhadas, o efeito é mais pronunciado a frequências mais baixas, como se vê nas Figs. 2.34 e 2.35. Um terceiro cisalhamento torna o efeito mais acentuado em relação ao segundo, e este em relação ao primeiro, Fig. 2.35.

Fig. 2.33 –Variação da viscosidade em função do tempo para amostras novas de gliadina a 20% em DMF puro (11 dias), cisalhadas a 500, 1000 e 2000 Hz.

Fig. 2.34 – Variação da viscosidade com a frequência de dispersão a 20% de gliadina em DMF cisalhada a 500Hz. Amostra de 11 dias.

Fig. 2.35 - Curvas de variação de viscosidade com o tempo para dispersão a 20% de gliadina em DMF, cisalhada e recisalhada a 2000Hz. Amostra de 11 dias.

No sistema em formamida, o fenômeno se revela já em velocidades de cisalhamento menores, Fig. 2.36. O perfil da curva, a um cisalhamento de 1000Hz, é formado por dois segmentos de curva por ciclo, Fig. 2.37, sugerindo a ocorrência de movimentos da cadeia a duas frequências distintas.

Fig. 2.36 - Curva de variação da viscosidade com o tempo para amostras novas de gliadina a 20% em formamida, cisalhadas a 500, 1000 e 2000 s^{-1} . Amostra de 12 dias.

Fig. 2.37 - Curva de variação da viscosidade com o tempo para amostra de gliadina a 20% em formamida, cisalhada a 1000Hz. Amostra de 12 dias.

O cisalhamento rotacional aparentemente impõe mudanças nos arranjos nas polidispersões protéicas, de caráter periódico, gerando uma repetição cíclica de sua viscosidade, com periodicidade de cerca de 15 min. É interessante notar que para cada solvente o perfil de curva é característico. O efeito é mais marcante para amostras recisalhadas.

4.2 – Testes dinâmicos – Varredura de amplitude

O comportamento dos géis, a partir da concentração de 20% de gliadina nos vários solventes, mostrou-se caracteristicamente pseudoplástico desde os primeiros ensaios, nos primeiros dias de existência das amostras, com uma forte contribuição elástica.

G como função dos solventes

Conforme mostra a Fig. 2.38, os valores dos módulos de perda e de armazenamento em função da amplitude de deformação para a gliadina em DMF mostram-se maiores que em DMSO, embora a proporção entre G'' e G' , ou seja, $\tan \delta$, seja de mesma ordem que para este último solvente, na faixa linear de deformação. A diferença entre os valores limites de deformação na faixa linear ($\gamma_{\text{máx.}}$ de 5,56% para DMF e 57,9% para DMSO) indica que a estrutura da rede de gliadina em DMSO é 10 vezes mais resistente à deformação do que aquela em DMF, nas condições do teste.

Fig. 2.38 – Varredura de amplitude de gliadina 20% em DMSO (20 dias) e DMF (8 dias)

Para a formamida, tentativas de determinações em amostras de 5, 20 e 27 dias não mostraram região viscoelástica linear nas curvas (Fig. 2.39). Tal região possivelmente se encontra em valores de deformação inferiores a 0.1%, não acessíveis experimentalmente para essas amostras em razão dos limites de torque do equipamento. Esse aspecto afeta a viabilidade da realização de ensaios de fluência e de relaxação.

G como função da concentração

Na formamida, a amplitude de deformação em função da concentração de gliadina apresenta um comportamento em que a componente viscosa é predominante. As componentes G' e G'' variam inversamente com a concentração em proteína, além do que a razão G''/G' ($=\text{tg } \delta$) aumenta, indicando um acréscimo do caráter viscoso com o aumento da concentração em proteína nas amostras (Fig. 2.39). Em DMF, que tem a componente elástica predominante, conforme mostrado nas curvas da Fig. 2.35, as componentes G' e G'' aumentam com a concentração da proteína, embora mantenham a proporção constante entre elas na faixa de deformação linear, entre 20 e 30% de concentração da proteína. Observa-se o mesmo para o DMSO (Fig. 2.42). Nesses dois últimos casos, a $\text{tg } \delta$ mantém-se conseqüentemente constante.

Fig. 2.39– Varredura de amplitude da gliadina a 25% (3 dias) e 30% (7 dias) em formamida.

Fig. 2.40 – Varredura de amplitude da gliadina a 20% (7 dias), 25% (3 dias) e 30% (8 dias) em DMF, a 20°C.

G como função da idade

Os resultados obtidos em DMF e mostrados na Fig 2.41 revelam uma relação direta dos parâmetros G' e G'' com a idade da amostra, embora constante entre eles ($\tan \delta$ invariável com a idade), mostrando que as duas componentes variam com a mesma velocidade.

Fig. 2.41 – Varredura de amplitude da gliadina 20% em DMF a 20°C, de amostras com 7 e 20 dias.

Para o DMSO (Fig. 2.42) as curvas G' e G'' se deslocam para baixo com a idade da amostra entre 7 e 81 dias, mas mantém a proporcionalidade entre elas, porquanto as curvas $\text{tg } \delta$ são coincidentes nessas duas idades. Entre os dois parâmetros mencionados, é o módulo viscoso (G'') que apresenta a maior perda com a idade da amostra. Como resultado, a amostra vai tendo uma maior contribuição elástica relativa ao seu envelhecimento. É talvez importante considerar que a hidrofilicidade relevante do DMSO pode resultar em significativa absorção de umidade em amostras muito antigas, como é o caso da amostra de 81 dias, o que poderia ter um papel na interpretação desses resultados.

Fig 2.42 - Varredura de amplitude da gliadina a 20% em DMSO, a 20°C. Amostras com 20 e 81 dias.

G como função da temperatura

A dependência com a temperatura dos sistemas em fase gel mostrou ser não trivial. Não foi possível a partir dos resultados obtidos para amostras em DMSO, generalizar-se um padrão de comportamento para dispersões de gliadina nesse solvente. A varredura de amplitude de amostra de 81 dias de gliadina a 20% em DMSO apresentou aumento de G' quando a temperatura foi elevada de 20°C para 23°C e a partir daí mostrou-se decrescente com o aumento da temperatura (Fig. 2.43). Para uma outra amostra (Fig. 2.44), a uma concentração de 25% em proteína (amostra de 58 dias), também a resposta a 20°C mostrou-se destacada das demais; os aquecimentos subsequentes não produziram, no entanto um padrão consistente de variação em G' . As componentes G'' comportam-se da mesma maneira.

Fig. 2.43 – Módulo de armazenamento de gliadina a 20% em DMSO (81 dias). (vide máximo em G' a 23°C).

Fig. 2.44 – Módulo de armazenamento da gliadina a 25% em DMSO (58 dias) (vide máximo em G' a 26 e 29°C).

Outras amostras ensaiadas que mostraram dependência complexa com a temperatura incluíram uma amostra de gliadina a 1% em DMSO (12 dias) (Fig. 2.25) e a 20% em formamida (amostra de 27 dias) (Fig. 2.31).

Observa-se que o comportamento atípico frente à temperatura envolve, sobretudo a região em torno de 20°C-25°C, o que poderia refletir a presença de algum lipídeo residual na amostra, uma vez que esta é a região de transição sol-gel para vários desses compostos. Por outro lado, a idade das amostras parece também ter algum efeito, uma vez que aquelas um pouco mais velhas têm maior tendência a exibir o efeito. A possível correlação com a ordem de cisalhamento das amostras nos experimentos, que chegou a ser considerada, não parece guardar correlação com o comportamento observado.

Houve grande dificuldade na obtenção de curvas de varredura de amplitude para dispersões de gliadina nas concentrações entre 20-30% em formamida, provavelmente devido à formação de microfases, o que prejudicou os demais testes previstos (oscilatórios e transientes).

4.3 - Testes dinâmicos – Varredura de frequência

A investigação utilizando a varredura de frequência, através da análise das tangentes das curvas, nos aponta um comportamento exponencialmente mais tendente

ao monodispersivo e à ocorrência de maiores tamanhos nas partículas do colóide com o aumento da concentração da proteína em DMSO. Essa tendência se percebe ao se analisar as tangentes das curvas na região dos cinco primeiros pontos das curvas respectivas. Os resultados estão na Tabela 2.1.

Tab. 2.1 – Variação das tangentes das curvas de varredura de frequência de gliadina em DMSO.*

Concentração em proteína (%)	$\Delta G'/\Delta \omega$
20	6,04
25	12,38
30	33,39

* Idades respectivas das amostras: 20, 8 e 9 dias (de cima para baixo).

Khatkar²⁵ e equipe, trabalhando com as frações purificadas de gliadina, observaram que a inclinação nos primeiros pontos da curva log-log G' versus frequência mostra a ordem $\beta > \gamma > \alpha = \omega_1 > \omega_2$ -gliadina, o que nos dá uma idéia da proporção dos tamanhos dos agregados formados por estas espécies. Esta também é a ordem decrescente de número de ligações cruzadas nessas sub-frações de gliadina.

Outra informação obtida dessas curvas é o fato dessas espécies menos polidispersas apresentarem massas molares médias menores nas concentrações mais elevadas, devido ao fato das intersecções das componentes G' e G'' (Fig. 2.45) se apresentarem a maiores frequências com o aumento da concentração.

Tab. 2.2 – Variação da polidispersividade com a concentração de gliadina em DMSO.*

Concentração (%)	$G' \times G''$ (Pa)	Freq. ang. (s^{-1})
20	35	60
25	110	100
30	500	120

* Idades respectivas das amostras: 7, 8 e 9 dias (de cima para baixo).

Fig. 2.45 - Teste de varredura de frequência de gliadina 20% em DMSO (amostra de 20dias).

Mudanças no grau de polidispersão, que se encontram relacionadas à posição de interseção das curvas de G' e G'' (a polidispersão aumenta com a diminuição do ponto de cruzamento das curvas G' e G'' em relação ao eixo y) assim como alterações na massa molar média dos agregados, relacionadas à posição de interseção das curvas em relação a ω (massa molar média aumenta com o deslocamento do ponto de cruzamento das curvas G' e G'' para valores menores de ω) foram observadas como função da concentração da proteína e do tempo. Segundo essas observações, os grandes agregados se fragmentariam (diminuição da massa molar) em tamanhos mais uniformes (menor polidispersão), com o aumento da concentração. O resultado da baixa polidispersividade do sistema observada nos experimentos acima é confirmado pelos testes de relaxação, que mostram a contribuição de duas espécies dinamicamente distintas.

Para o DMF, a variação do $\Delta G'/\Delta\omega$ é bem mais acentuada em relação ao DMSO (Tab. 2.1), indicando uma menor polidispersão do soluto no DMF em relação ao DMSO e maiores tamanhos dos agregados. Esta tendência torna-se mais acentuada com o aumento da concentração da proteína (Tab. 2.3).

Tab. 2.3 – Variação da relação $\Delta G'/\Delta\omega$ com a concentração de gliadina em DMF.*

Concentração (%)	$\Delta G'/\Delta\omega$
20	33,28
25	134,33
30	175,29

* Idade das amostras: 3 dias.

4.4 - Testes Transientes

4.4.1 – Tempo de relaxação

As curvas de relaxação para as diversas amostras foram ajustadas segundo um decaimento bi-exponencial regido pela equação:

$$G(t) = G_0 + G_1 e^{(-t/tr1)} + G_2 e^{(-t/tr2)} \quad (\text{eq. 2.80})$$

Uma curva de relaxação típica é apresentada na Fig. 2.46. Os valores dos tempos de relaxação obtidos através do ajuste desta e das demais curvas em função da variação da concentração de DMSO são apresentados na tabela 2.4.

Fig. 2.46 – Relaxação de gliadina 20% em DMSO (amostra de 20 dias), (valores de G_1 e G_2 na equação 2.80: 19,0956 e 26,85138, respectivamente)

Para o DMSO fica evidente que o fator idade da amostra é o que define o quanto de deformação a amostra suporta. Para 70 dias a deformação máxima, ainda dentro da região viscoelástica linear, foi de 10% contra 0,5% para 9 e 10 dias. Esta diferença torna o perfil das curvas de retorno bem diferenciado. A redução de 50% nos valores de um dos tempos de relaxação, mostrado na Tab. 2.4 (t_{r2} entre 9 e 70 dias) significa possivelmente um afrouxamento das estruturas inicialmente emaranhadas, o que confere ao sistema a flexibilidade final.

Tab. 2.4 – Tempos de relaxação para dispersões de gliadina a diferentes concentrações, em DMSO*.

Conc. proteína (%)	Deformação (%)	t_{r1} (s)	t_{r2} (s)
20	10	2,67	65,98
25	10	6,88	102,59
30	0,5	4,51	70,23
30	0,5	4,46	69,91
30	10	5,27	35,29

* Idades respectivas das amostras: 20, 8, 9, 10 e 70 dias (de cima para baixo).

A Fig. 2.47 nos mostra os efeitos do envelhecimento da amostra a 30% na curva de relaxação

Fig. 2.47 - Teste de relaxação da gliadina 30% em DMSO (idades 9 e 70 dias), a 20°C.

Para o DMF a evolução no tempo do gel de gliadina 20% está representada na Fig. 2.48 e os tempos de relaxação na Tab. 2.5.

Fig. 2.48 – Curvas de relaxação para gliadina 20% em DMF, em função da idade da amostra.

Tab. 2.5 – Tempos de relaxação para gliadina 20% em DMF, em função da idade da amostra.*

Idade (dias)	t_{r1} (s)	t_{r2} (s)
3	2,76	51,55
7	2,49	50,41
8	3,21	60,33
20	4,89	59,67

* Deformações aplicadas (%): 10; 10; 0,5; 0,5 e 10 (de cima para baixo)

Para o DMF, a variação do tempo de relaxação com a idade da amostra não é expressiva, desconsiderando-se portanto, a ocorrência de mudança significativa nos tamanhos dos agregados em função dessa variável.

4.4.2 – ‘Creep’ ou fluência

‘Creep’ como função d cisalhamento

Em uma amostra de 20 dias de gliadina a 20% em DMSO, uma sequência de três testes de fluência a 20°C, com cisalhamento a um valor de torque de 50μNm, verificou-se uma queda de 0.2% na componente elástica no segundo teste. Após um repouso de 20 min., a amostra registrou um acréscimo de 1% desta componente, em relação ao primeiro resultado, indicando que este sistema é dependente do cisalhamento sofrido (Fig. 2.49 e Tab. 2.6).

Fig. 2.49 - Teste de fluência da gliadina 20% em DMSO, amostra a 20°C com 20 dias, com $J_e/J_{máx}$ de (em preto) = 93,85%; (em vermelho) = 93,67%; (em verde) = 94,85% com repouso.

Tab. 2.6 - Variação de $J_e/J_{máx}$. e de $J_v/J_{máx}$. com o cisalhamento de gliadina a 20% em DMSO, 20 °C

Conc. (%)	Idade (dias)	$J_e/J_{máx}$. (%)	$J_v/J_{máx}$.(%)
20	20	93,85	6,15
20	20 (realizado imediatamente após o anterior)	93,67	6,33
20	20 (após teste anterior, c/ 20 min. repouso)	94,85	5,15

‘Creep’ como função da idade

O efeito da idade da amostra sobre o comportamento de fluência em uma amostra de gliadina a 25% em DMSO é mostrado na Fig. 2.50. Enquanto a amostra com 8 dias apresenta um comportamento que se assemelha ao modelo de fluido de Maxwell, com uma queda suave após remoção da tensão, com 42 dias a mesma amostra apresenta comportamento segundo o modelo de um sólido viscoelástico de Kelvin-Voigt, com uma queda brusca e quase completa recuperação da energia aplicada (Fig. 2.50).

Fig. 2.50 - Teste de fluência da gliadina 25% em DMSO, amostra a 20°C, com 8 e 42 dias.

Tab. 2.7 - Variação de $J_e/J_{máx.}$ e de $J_v/J_{máx.}$ com a idade de gliadina em DMSO 25%, 20 °C.

Idade (dias)	Torque (μN)	$J_e/J_{máx.}$ (%)	$J_v/J_{máx.}$ (%)
8	50	78,76	21,24
42	50	90,18	9,82

Para o DMF, as curvas dos testes de ‘creep’ em função da idade das amostras estão apresentadas na Fig. 2.51. Os valores calculados para a variação da compliância J com essa variável encontram-se na Tabela 2.8.

Tab. 2.8 – Variação de $J_e/J_{máx.}$ e de $J_v/J_{máx.}$ com a idade de gliadina em DMF 20%.

Idade (dias)	Torque (μN)	$J_e/J_{máx.}$ (%)	$J_v/J_{máx.}$ (%)
3	400	91,76	8,24
7	40	94,02	5,98
8	50	93,47	6,53
20	<0,5	-	-

Fig. 2.51 - Testes de fluência da gliadina 20% em DMF, amostra a 20°C, com 3, 7 e 8 dias

Apesar da diferença no valor do torque entre as medidas com DMSO e DMF, os valores de $\Delta J/\Delta \text{tempo}$ para os dois meios não são muito diferentes, 0,336 e 0,342 respectivamente, indicando uma velocidade de evolução das transformações de arranjos internos semelhante. O alto valor do torque suportado pela amostra recém preparada em DMF evidencia o quão rígido se encontra o gel na etapa de intumescimento. De aparência mais sólida inicialmente, torna-se gradativamente menos estruturado ao longo do tempo, enquanto no DMSO o comportamento macroscópico é o inverso.

‘Creep’ como função da concentração da proteína

A variação do comportamento de ‘creep’ em função da variação da concentração da gliadina em DMSO é mostrada na tabela 2.9 e Fig. 2.51.

Seria esperado um valor mais alto de $J_e/J_{\text{máx.}}$ para a amostra a 25% (42 dias), porém a sequência dos cisalhamentos demonstra que este tipo de sistema é muito dependente do cisalhamento anterior a que a amostra foi submetida. Observou-se também que, apesar da componente elástica continuar aumentando com a idade, a LVE se reduz drasticamente nas amostras mais antigas, mostrando a formação de uma estrutura que já não suporta as deformações impostas tão bem como as preparações mais novas.

Tab. 2.9 – Variação de $J_e/J_{máx.}$ e de $J_v/J_{máx.}$ com a concentração de gliadina em DMSO. *

Conc. (%)	Torque (μN)	$J_e/J_{máx.}$ (%)	$J_v/J_{máx.}$ (%)
20	50	93,85	6,15
25	50	78,52	21,48
25	50	90,18	9,82
30	<0,5	-	-
30	50	94,66	5,34

* Idade das amostras: 20; 8; 42; 8 e 70 dias (de cima para baixo)

Fig. 2.52 – Teste de fluência da gliadina 20, 25 e 30% em DMSO. Amostras a 20°C, com 20, 8, 42 e 70 dias.

Em amostras contendo DMF, o ‘creep’ gerou as curvas da Fig. 2.53 e os resultados da tabela 2.10.

Tab. 2.10 - Variação de $J_e/J_{m\acute{a}x.}$ e de $J_v/J_{m\acute{a}x.}$ com a concentração de gliadina em DMF

Conc. (%)	Idade (dias)	Torque (μN)	$J_e/J_{m\acute{a}x.}$ (%)	$J_v/J_{m\acute{a}x.}$ (%)
20	3	400	91,76	8,24
25	3	800	93,69	6,31
30	3	1200	94,4	5,60

Fig. 2.53 - Teste de fluência da gliadina 20, 25 e 30% em DMF. Amostras a 20°C, com 3 dias.

Na tabela 2.10 vemos a relação direta do torque com o aumento da concentração para amostras de 3 dias nessas concentrações.

4.5 - Sistemas ternários

O efeito da variação da temperatura, na faixa de 20 a 35°C, sobre as grandezas reológicas para sistemas ternários mostrou-se não significativo, tendo sido observado comportamento semelhante àquele descrito para sistemas binários. Portanto, quando não citado, serão apresentados apenas os resultados obtidos a 20 °C.

Algumas propriedades drasticamente distintas, como veremos aqui, estão presentes quando se tem a introdução de água como um terceiro componente nos sistemas. À semelhança do comportamento já descrito para dispersões de gliadina nos solventes puros a baixas concentrações, também nos sistemas ternários o comportamento de fluxo das dispersões é pseudoplástico.

Propriedades dos sistemas ternários como função da fração molar do solvente

O confronto dos resultados dos testes dinâmicos, varredura de amplitude de deformação em função da fração molar dos solventes, mostrado na Fig. 2.54, chama a atenção para a brusca elevação da tangente δ e do módulo elástico, G' , nas concentrações $\chi=0,3$ $\chi=0,6$ (em fração molar do solvente (DMSO), χ_{DMSO}), respectivamente.

Fig. 2.54 - Curva de variação de G' , G'' e $\text{tg } \delta$ em função da fração molar de DMSO em H₂O: $\chi_{\text{DMSO}}=0,8$, amostra com 14 dias, $\chi_{\text{DMSO}}=0,6$, amostra com 13 dias, $\chi_{\text{DMSO}}=0,4$, amostra com 70 dias; e $\chi_{\text{DMSO}}=0,3$, amostra com 8 dias, todas com gliadina a 20%.

Para a formamida, a crescente presença de água no meio é indiferente para o módulo de armazenamento (G'), enquanto para DMF o G' cresce com o aumento do teor de água (Fig. 2.55).

Fig. 2.55 – Variação de G' em função da fração molar de DMF e formamida nas dispersões contendo gliadina a 20%.

Em relação aos sistemas ternários em DMSO, a concentração de $\chi=0,3$ mostra-se de fato peculiar e bem diferenciada do restante dos grupos de sistemas ternários ensaiados nesta Tese. A viscosidade complexa nesta concentração é crescente com a frequência angular para os sistemas contendo DMSO, enquanto para os demais é decrescente (Fig. 2.56). Esta particular proporção DMSO – água deve afetar estados de solvatação da proteína de tal modo que com o cisalhamento, a amostra passa de um comportamento bastante viscoso para outro intensamente elástico, aumentando o fator de amortecimento ($\tan \delta$) em cerca de 100 vezes; Fig. 2.57.

Fig. 2.56 – Curvas de variação da viscosidade complexa com a frequência angular, para gliadina a 20% em DMSO/H₂O, a diversos valores de fração molar de DMSO.

Fig. 2.57 - Curvas de varredura de amplitude de DMSO em água ($\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$), com gliadina a 20% (20°C) - efeito do cisalhamento sobre a amostra nova ($\gamma_{\text{máx}} = 1,16\%$) e recisalhada ($\gamma_{\text{máx}} = 59,6\%$). Amostra com 7 dias.

A viscosidade complexa de dispersões de gliadina em DMF/água a diversas frações molares mostrou dependência inversa com a frequência, para as diferentes composições do solvente misto ensaiadas (Fig. 2.58).

Fig. 2.58 – Dependência da viscosidade complexa com a frequência para dispersões a 20% em gliadina na mistura DMF/água ($\chi_{\text{DMF}} = 0,3; 0,4; 0,6$ e $0,8$). Amostra de 13 dias.

Em formamida/água, grandes instabilidades nos sistemas contendo gliadina a 20% foram notadas. Apenas foi possível obter-se algum dado mais consistente para os sistemas a frações molares de formamida iguais a 0,4 e 0,6. Os sistemas na verdade são pouco homogêneos e disso resultam as inomogeneidades de resposta.

Um pequeno pico na viscosidade foi observado próximo à frequência de 60 (s^{-1}), Fig. 2.59. Nós o atribuímos à frequência da rede de alimentação elétrica.

Fig. 2.59– Variação da viscosidade complexa com a frequência para dispersões a 20% de gliadina em formamida/água ($\chi_{\text{formamida}} = 0,4$ e $0,6$). Amostra de 13 dias.

Uma característica do sistema em formamida é a tendência a aumentar a viscosidade complexa com a frequência, comportamento inverso ao observado para o sistema em DMF/água. Não se esperaria em princípio padrões de solvatação semelhantes para esses dois compostos, uma vez que formamida é um solvente polar prótico enquanto DMF é um solvente apolar aprótico. Dentre os meios solventes ensaiados, a formamida é de fato aquele menos semelhante aos demais quando aspectos de micropolaridade são considerados.

O efeito do cisalhamento sobre amostra em DMSO/água, $\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$, é corroborado pelas observações do teste de viscosidade versus tempo ou versus taxa de cisalhamento. Enquanto o resultado aponta valores de viscosidade mais baixos para maiores taxas de cisalhamento em amostras virgens (curvas de 500 e 1000 s^{-1}), o resultado para uma mesma amostra que tinha sido cisalhada previamente a 500 s^{-1} , recisalhada a 2000 s^{-1} , mostra uma viscosidade crescente, com valores que se situam entre os anteriores (Fig. 2.60). Aqui é observado, também, o fenômeno de ciclos em cisalhamentos longos, a exemplo do sistema binário apresentado no item 4.1.1.

Fig. 2.60 – Curva da variação da viscosidade com o tempo, para gliadina a 20% em DMSO/H₂O ($\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$), a diferentes taxas de cisalhamento. Cisalhamento a 2000 s⁻¹ efetuado após cisalhamento prévio da amostra a 500 s⁻¹. Cisalhamento a 500 s⁻¹ e 1000 s⁻¹ efetuado sobre amostras virgens. Amostra com 7 dias

Ainda nesta mesma fração molar de 0,3, é interessante notar o resultado do teste de relaxação em DMSO/água, que mostra essa mistura binária com a gliadina dispersa a uma concentração de 20% portando-se como um líquido Newtoniano; Fig. 2.61.

Fig. 2.61 - Curvas de relaxação da gliadina a 20 % em DMSO/H₂O, a $\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$ (12 dias), 0,4 (13 dias), 0,6 (13 dias) e 0,8 (13 dias).

Os tempos de relaxação para as soluções ensaiadas encontram-se na tabela 2.11.

Tab. 2.11 – Tempos de relaxação de sistemas de gliadina em DMSO/H₂O em função da fração molar do solvente em água.*

χ_{DMSO}	t_1 (s)	t_2 (s)
0,8 (def=10%)	1,57	72,02
0,6 (def=0,5%)	41,86	614,05
0,4 (def=10%)	2,39	30,65
0,3 (def=50%)	<0,1	<0,1

* Idade das amostras: 13; 13; 13; 12 dias (de cima para baixo).

O tempo de relaxação para a mistura de DMSO/H₂O (com gliadina a 20%) $\chi=0,3$ ficou abaixo do mínimo detectável pelo reômetro.

As curvas de relaxação tiveram como melhor ajuste uma função exponencial de segunda ordem.

Segundo Murthy²⁶, o tempo de relaxação cresce com o aumento do conteúdo de água em misturas binárias DMSO/água, devido a ligações de hidrogênio mais fortes na mistura binária, em relação às que ocorrem somente entre moléculas de água. Embora a forma desta interação não seja bem conhecida, sabe-se que ela é máxima na faixa de 0,3-0,4 de fração molar de DMSO em água, o que levaria a se esperar um maior tempo de relaxação nessa região de concentração. Estudos feitos através de diagramas de fases e tempo de relaxação dielétrica indicam a formação de complexos metaestáveis 1:2 e 1:3 de DMSO em água, em torno de $x_m = 0,33$.

É notável que gliadina dispersa nesse meio a uma concentração tão alta quanto 20% exiba comportamento de fluxo semelhante ao de um sistema quasi-newtoniano, com tempo de relaxação próximo de zero. Considerando-se que o comportamento Newtoniano, ou ideal, é verificado quando o fluxo se dá em condições de não interação (mecânica, sobretudo) entre os componentes do sistema, pode-se especular que a proteína exiba uma conformação proximamente esférica nessa região de concentração do meio dispersante. Em concentrações mais altas de DMSO em água, o sistema volta a exibir os conhecidos desvios de idealidade. A $\chi_{\text{DMSO}} = 0,6$, no entanto, o gel formado é significativamente mais rígido do que em concentrações da mistura solvente acima ou abaixo de $\chi=0,6$. Isso se reflete no grande aumento observado para o tempo de relaxação de uma das populações do gel e no menor valor de deformação suportado pelo mesmo dentro da região viscoelástica linear (Tab. 2.11).

Ensaio semelhantes foram desenvolvidos com amostras de gliadina dispersas em meio de DMF/água e formamida/água. Os resultados são mostrados a seguir, nas Figs. 2.62 e 2.63 e Tabelas 2.12 e 2.13:

Fig.2.62 – Curvas de relaxação de gliadina a 20% em DMF/H₂O, nas frações molares χ_{DMF} 0,3; 0,4; 0,6 e 0,8. Amostra de 13 dias.

Tab. 2.12 - Tempos de relaxação de sistemas de gliadina em DMF/H₂O em função da fração molar do solvente em água.*

χ_{DMF}	t_1 (s)	t_2 (s)
0,8 (def = 10%)	4,45	65,08
0,6 (def = 1%)	3,19	57,87
0,4 (def = 10%)	2,51	53,19
0,3 (def = 10%)	1,13	56,70

Idade das amostras: 13 dias

Tab. 2.13 - Tempos de relaxação de sistemas de gliadina em formamida/H₂O em função da fração molar de formamida em água. *

$\chi_{\text{formamida}}$	t_1 (s)	t_2 (s)
0,4 (def = 10%)	0,18	92,05
0,3 (def = 10 %)	0,17	139,52

* Idade das amostras: 1 dia

Fig. 2.63 - Curvas de relaxação de gliadina 20% em formamida/H₂O, 1 dia, nas frações molares 0,3 e 0,4.

Os géis em DMF/H₂O mostram-se mais frágeis que em DMF puro e por isso as deformações suportadas pelo sistema são comparativamente menores também. Observa-se para o primeiro a mesma “anomalia” de comportamento a $\chi=0,6$ que para o sistema gliadina/DMSO/H₂O, embora um pouco mais sutil no primeiro caso, com um valor uma ordem de grandeza mais baixo na deformação linear suportada pelo gel (Tabs. 2.11 e 2.12). No entanto, essa menor resistência à deformação não se refletiu nos valores de tempos de relaxação no caso do sistema gliadina/DMF/H₂O, contrariamente ao observado para gliadina /DMSO/H₂O (Tabs. 2.11 e 2.12).

O comportamento da gliadina em formamida é oposto ao comportamento em DMF e ao DMSO, com um tempo de relaxação aumentado justamente em $\chi_{\text{formamida}} = 0,3$. Ficou claro que ao se elevar a fração molar de formamida em água e a idade das amostras deste sistema, maior a dificuldade de se obterem as curvas. O comportamento experimental observado revela aspectos de organização peculiares nas dispersões, como

se microfases lamelares se formassem e deslizassem umas sobre as outras sob cisalhamento. Esses aspectos dificultam ou mesmo impedem o registro dos dados reológicos, como no nosso caso.

As curvas de fluxo de dispersões de gliadina a 20% em DMSO puro e neste solvente em mistura com a água a $\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$ estão mostradas na Fig. 2.64. De fato, é interessante observar que apenas a partir da apreciação das curvas de fluxo não é possível antecipar-se o distinto comportamento do sistema a $\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$ quando submetido a ensaios dinâmicos. As curvas de fluxo da Fig. 2.64 mostram um mesmo comportamento do tipo pseudoplástico para todos os sistemas ensaiados, a despeito de suas respostas de ‘creep’ (Figs. 2.65 e Fig. 2.49) serem bastante distintas entre si.

Fig. 2.64 - Curvas de fluxo e variação da viscosidade de gliadina a 20% em DMSO puro (amostra de 11dias) e em DMSO/H₂O, a $\chi_{\text{DMSO}}=0,3$ (amostra de 7dias).

Corroborando o perfil de variação observado para G' em função da fração molar, $\chi_{\text{DMSO}} = 0,6$ (Fig. 2.54), os testes de fluência também denotam uma forte contribuição elástica ($J_e/J_{\text{máx.}}$) nesta concentração, ultrapassando em intensidade os valores das concentrações vizinhas ensaiadas, Fig. 2.65.

Fig. 2.65 - Curvas de fluência ('creep') de gliadina a 20% em DMSO/H₂O, a $\chi_{\text{DMSO}}=0,8$ (13 dias), $\chi_{\text{DMSO}}=0,6$ (12 dias) e $\chi_{\text{DMSO}}=0,4$ (13 dias).

Tab. 2.14 - Variação de $J_e/J_{\text{máx.}}$ e de $J_v/J_{\text{máx.}}$ com a fração molar de DMSO em água

$\chi_{\text{DMSO}}(\text{torque})$	$J_e/J_{\text{máx.}}$	$J_v/J_{\text{máx.}}$
1,0 (50 μ N)	93,85	6,15
0,8 (50 μ N)	96,21	3,79
0,6 (50 μ N)	96,72	3,28
0,4 (0,5 μ N)	54,74	45,26

Idade das amostras: 20; 13; 12; 13 dias (de cima para baixo).

Este comportamento nesta concentração ($\chi_{\text{DMSO}} = 0,6$) já era esperado, pois visualmente o gel já aparentava uma 'solidez' maior do que nas outras concentrações. Infelizmente, não foi possível obter-se a curva para $\chi_{\text{DMSO}} 0,3$, com idade em torno das idades das demais amostras, uma vez que os baixos valores de torque requeridos encontram-se abaixo do limite inferior de torque do aparelho. A significativa diminuição da contribuição elástica à compliância, J_e , para $\chi_{\text{DMSO}} = 0,4$, já aponta para a tendência do sistema em mostrar-se menos elástico a menores concentrações do solvente orgânico em água.

As curvas de 'creep' para os sistemas em DMF/H₂O mostram o alto caráter elástico das amostras de proteína nas diversas frações molares (Fig. 2.66) desse meio dispersante.

Fig. 2.66 - Curvas de fluência ("creep") de gliadina a 20% em DMF/H₂O, a $\chi_{\text{DMSO}}=0,8$, $\chi_{\text{DMSO}}=0,6$, $\chi_{\text{DMSO}}=0,4$, e $\chi_{\text{DMSO}}=0,3$.

Tab. 2.15 – Variação de $J_e/J_{\text{máx.}}$ e de $J_v/J_{\text{máx.}}$ com a fração molar de DMF em água

$\chi_{\text{DMSO}}(\text{torque})$	$J_e/J_{\text{máx.}}$	$J_v/J_{\text{máx.}}$
0,8 (670 μN)	96,70	3,30
0,6 (55 μN)	96,16	3,84
0,4 (50 μN)	91,10	8,90
0,3 (35 μN)	95,61	4,39

Idade das amostras: 13 dias.

Os valores da Tab. 2.17 mostram uma ligeira redução da componente elástica para a fração molar de 0,4 que é de certo modo recuperada a $\chi_{\text{DMSO}} = 0,3$.

Para a formamida, as curvas de 'creep' não puderam ser obtidas devido ao baixo torque requerido, situado abaixo do mínimo operacional do instrumento.

5. Conclusões

- gliadinas mostram excelente capacidade de dispersão em DMSO, gerando sistemas homogêneos pseudoplásticos e viscoelásticos, cujo caráter mecânico mostra-se dependente da concentração da proteína, da temperatura, e do cisalhamento a que estejam submetidas. A transição sol-gel, induzida unicamente pelo solvente, originou géis de variada rigidez nesse solvente.

- b) em DMF, gliadina foi capaz de gerar dispersões homogêneas, com posterior evolução para fase gel, a partir de uma concentração mínima limite, abaixo da qual separação de fases foi observada. Os géis formados mostraram-se menos rígidos que em DMSO. Diminuem a rigidez com o tempo.
- c) em formamida, são geradas dispersões homogêneas em fase sol. Géis frágeis são formados, mais lentamente que nos outros dois solventes e apenas a concentrações maiores que 20% de gliadina. O envelhecimento desses géis conduz à perda de consistência dos sistemas. Em nenhum caso observou-se ocorrência de região viscoelástica linear. O comportamento consistentemente distinto apresentado pelas dispersões de gliadina nesse solvente, em relação aos outros dois estudados, sugere que seu caráter polar (em contraposição à natureza mais apolar do DMSO e DMF), é crítico no que se refere à forma como a gliadina é capaz de estruturar-se no meio líquido.
- d) um comportamento cíclico na viscosidade é consistentemente observado como função do tempo para géis sob cisalhamento de longa duração. Tal comportamento sugere a ocorrência de lentos movimentos de extensão e contração das cadeias, ocasionados pela força imposta no cisalhamento. Tal possibilidade é compatível com um modelo de gliadina gerado por técnicas de simulação computacional em trabalho anterior do laboratório.
- e) o comportamento tixotrópico ou reopéxico mostrou-se dependente da temperatura, sugerindo a ocorrência de transformações químicas irreversíveis acima de 40°C para géis em DMSO.
- f) as energias de ativação de fluxo, da ordem de uma a duas dezenas de kJ para concentrações até 8% de gliadina nos solventes, indicam que a manutenção da estrutura tridimensional do gel se dá às custas de forças intermoleculares de caráter necessariamente cooperativo.
- g) As unidades formadoras dos géis em DMSO mostram-se mais monodispersas, e de menor massa molar, com o aumento da concentração da proteína e com o tempo.
- h) a presença da água modula de forma complexa o comportamento mecânico dos sistemas, como a observação de comportamento newtoniano para dispersões contendo altas concentrações da proteína, a certas composições específicas da mistura binária solvente.

- i) duas populações dinamicamente distintas foram identificadas nos testes de relaxação.

6 - Bibliografia

Leitura recomendada sobre fundamentos de Reologia:

- a) R. G. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids*, Oxford University Press, Oxford, 1999.
b) Barnes, H.A., Hutton, J.F. e Walters, K. *An Introduction to Rheology*, Elsevier, Amsterdam, 1989.

-
- ¹ Macritchie, F., J. Food Tech., 1979, **14**, 595.
² Graaf, E.M.; Madeka, H.; Cocero, A.M.; Kokini, J.L., Biotechnol. Prog., 1993, **9**, 210.
³ van Vliet, T.; Martin, A.H.; Bos, M.A., Curr Opin Colloid Inter Sci, 2002, **7**, 462.
⁴ Khatkar, B.S.; Bell, A.E.; Schofield, J.D., J. Cereal Sci, 1995, **22**, 29.
⁵ Keller, R.C.A.; Orsel, R.; Hamer, R.J., J Cereal Sci, 1997, **25**, 175.
⁶ Hunter, R.J. Introduction to Modern Colloid Science, Oxford University Press, 1994.
⁷ Everett, D.H., Basic Principles of Colloid Science, Royal Society of Chemistry, 1994.
⁸ Wells, S.M., Langille, B.L., Lee, J.M., Adamson, S.L. Amer. J. Physiol. – Heart & Circulatory Physiol. 1999, **277**, H 1385.
⁹ Maksym, G.N., Fredberg, J.J., Bates, J.H.T., J. Appl. Physiol., 1998, **85**, 1223.
¹⁰ Dickinson, E. *Int. Dairy J.*, 1999, **9**, 305.
¹¹ Hill, S.E. Emulsions. In Hall, G.M. Methods of Testing Protein Functionality, Chapman & Hall, Londres, 1996.
¹² Belton, P.S. J. Cereal Science, 1999, **29**, 103.
¹³ Larson, R.G. The structure and rheology of complex fluids, Oxford University Press, 1999.
¹⁴ Goldsmith, H.L. Microvasc. Res., 1986, **31**, 121.
¹⁵ Zayas, J.G. e King, M. Am. Rev. Respir. Dis., 1990, **141**, 1107.
¹⁶ Van Duk, A.A., Van Wijk, L.L., Van Vliet, A., Haris, P., Van Swieten, E., Tesser, G.I. e Robillard, G.T. Protein Science, 1997, **6**, 637.
¹⁷ Belton, P.S., Colquhoun, I.J., Grant, A., Wellner, N., Field, J.M., Shewry, P.R. e Tatham, A.S. Int. J. Biol. Macrom., 1995, **17**, 74-80.
¹⁸ Arêas, E.P.G. e Cassiano, M. M., Biophys. Chem., 2001, **90**, 135.
¹⁹ Shewry, P.R., Miles, M.J. e Tatham, A.S. Progr. Biophys. Mol. Biology, 1994, **61**, 37.
²⁰ Belton, P.S., Gil, A.M. e Tatham, A.S. J. Chem Soc. Faraday Trans., 1994, **90**, 1099.
²¹ Wellner, N., Belton, P.S. e Tatham, A.S. Biochem. J., 1996, **319**, 741.

-
- ²² Ewart, J.A.D. J. Sci. Food Agric., 1977, **28**, 191.
- ²³ Ewart, J.A.D. J. Sci. Food Agric, 1987, **38**, 277.
- ²⁴ Singh, H; MacRitchie, F, J. Cereal Sci., 2001, **33**, 231.
- ²⁵ Khatkar, B.S.; Fido, R.J.; Tatham, A.S.; Schofield, J.D., J. Cereal Sci, 2002, **35**, 307.
- ²⁶ Murthy, S.S.N., J. Phys. Chem., B1997, **101**, 6043.

III. Gliadina em Sistemas Organizados

O estudo da presença de gliadina em sistemas organizados deveu-se ao nosso interesse em observar suas interações com bicamadas fosfolipídicas^{1,2}, no que se refere às modificações das propriedades elásticas de membrana. Objetivou-se o estudo de sua interação com vesículas unilamelares de dioleilfosfatidilcolina (DOPC), bem como a observação das possíveis alterações impostas à organização de um surfactante em fase lamelar, pentaetilenoglicol mono N-dodecil éter (C₁₂E₅) em hexanol, considerando as propriedades interfaciais relevantes da gliadina, em especial as que envolvem interações com lipídeos.

1 - Vesículas de fosfolipídios

A relevância do estudo de sistemas organizados, como aqueles envolvendo fosfolipídios, é reconhecida de longa data e encontra-se ligada ao fato desses sistemas constituírem excelentes modelos de estruturas biológicas compartimentalizadas, permitindo a investigação de padrões de comportamento em diversas situações experimentais de interesse. Em particular, a ocorrência natural desses sistemas, como componentes da dupla camada lipídica³ na membrana celular, torna o estudo de suas interações com sistemas de proteínas de particular relevância. Tais sistemas vêm sendo mais recentemente apontados como participantes de mecanismos de desencadeamento de sérias patologias, sobretudo pulmonares^{4,5,6}, em que proteínas são também participantes. No caso particular de nosso projeto, a interação de bicamadas com sistemas supramoleculares protéicos não globulares, complexos, como as gliadinas do glúten do trigo e possíveis relações entre essas interações e a etiologia da doença celíaca, constituem ponto central de nosso interesse.

Vários estudos têm sido desenvolvidos na tentativa da compreensão do funcionamento celular diante de condições específicas, quer seja em condições específicas de nutrição, reprodução, degeneração ou de um estado anômalo. Sistemas-modelo auto-organizados, como membranas e lipossomas, permitem que se abordem questões dentro dos vários contextos biológicos e médicos em que o papel dessas estruturas é relevante e se investiguem aspectos dinâmicos e estruturais de seu comportamento. Estudos têm mostrado que lipossomas são muito bons modelos para o estudo das interações de substâncias farmacologicamente ativas ou proteínas com membranas biológicas^{7,8,9,10}, assim como interações colesterol-fosfolipídeo¹¹.

Nas membranas celulares animais observam-se que a maior parte das cadeias de fosfolipídios apresenta-se saturada ou monoinsaturada¹². A partir dessa observação, sistemas-modelo foram montados utilizando-se fosfolipídios sintéticos que apresentassem tais características, como ponto de partida para a simulação de sistemas biológicos naturais.

Neste trabalho, microvesículas de DOPC foram preparadas através de técnica de pulsação de campo elétrico sobre placas metalizadas, e estudadas sob o ponto de vista microrreológico, através da técnica de aspiração por micropipetas, adiante apresentada. A finalidade do estudo foi desenvolver um trabalho comparativo sobre propriedades mecânicas das membranas desses sistemas (módulos de curvatura ou de elasticidade), na ausência e presença de gliadina. Em princípio, as preparações serviriam também para a investigação dos efeitos de fases lamelares confinadas no espaço aquoso interno das microvesículas sobre as propriedades mecânicas dessas vesículas, avaliadas na presença e ausência de proteína, assim como de eventuais efeitos do sistema vesicular sobre características da fase lamelar.

É bem conhecida a propriedade de proteínas do glúten, em particular gliadinas, de induzir o aparecimento da doença celíaca no organismo humano. A doença caracteriza-se por provocar uma aparente inflamação nas paredes do intestino delgado, fazendo com que este perca suas vilosidades pelo intumescimento do tecido¹³ afetando sua capacidade de absorção do alimento, o que leva a consequências devastadoras para o estado nutricional do paciente. Maiores detalhes sobre essa patologia estão expostos no item a seguir.

O questionamento é: a gliadina, ou partes integrantes dela, interage com os fosfolipídios das membranas das células da parede intestinal por ocasião de sua absorção como alimento? Se sim, como isto poderia afetar propriedades elásticas da membrana da célula que eventualmente poderiam se manifestar como alterações morfológicas do tecido da mucosa?

A investigação desses sistemas de microvesículas de fosfolipídio pressupõe a incorporação da gliadina nessas estruturas e o estudo das interações decorrentes. Conhecer o comportamento dessa família de proteínas, suas interações com o meio e modificações nas propriedades mecânicas da superfície das microvesículas de fosfolipídio torna-se assim um meio de se avançar na compreensão de uma complexa fenomenologia de relevância biológica e médica.

A seguir apresentamos algumas considerações a respeito da doença celíaca em seus vários aspectos biológicos e de implicações clínicas, de modo a subsidiar a melhor apreciação dos resultados desta parte de nosso trabalho.

2. - Doença celíaca e as proteínas do glúten

A doença celíaca caracteriza-se por uma alteração histológica importante da mucosa intestinal, com a perda de suas microvilosidades características e conseqüente alteração de sua função absorptiva normal, por ação de certas proteínas do glúten.

Gliadinas encontram-se entre as principais frações do glúten do trigo responsáveis por essas modificações na mucosa entérica. Apesar de identificada e investigada desde 1888, pouco se conhece, no entanto, sobre o mecanismo de ação das gliadinas no desenvolvimento dessa patologia. Por este motivo, ainda atualmente se define a doença como ‘uma condição anormal da mucosa do intestino delgado, que melhora quando da abstinência de glúten na dieta e piora quando ele é re-introduzido’¹⁴, ou ‘é uma desordem intestinal com uma etiologia multifatorial’¹⁵.

Essa patologia aumenta a predisposição dos indivíduos afetados a doenças auto-imunes ou de natureza alérgica^{5,6}. Embora as circunstâncias que levam à deflagração da doença e o seu mecanismo de desenvolvimento ainda permaneçam obscuros, o envolvimento de algumas tendências genéticas e a ocorrência de doenças associadas à doença celíaca já foram observadas, como desenvolvimento de psoríase, vitiligo, lúpus eritematoso e doença de Parkinson.

Em 1992, Marsh¹⁶ já observara o que classificou de três estágios da doença: o infiltrante, o hiperplásico e o de lesões destrutivas. Em 1996, Wieser¹⁷ verificou que a toxicidade da gliadina não é destruída pela digestão com as enzimas gastropancreáticas.

Uma das razões para o avanço lento nos estudos da doença é a dificuldade na identificação dos componentes tóxicos devido ao pouco conhecimento das características químicas do glúten. Contribui para isto a complexa diversidade de polipeptídios (cerca de cem) que o compõem, na sua maioria com baixa solubilidade em água.

As gliadinas têm atuação relevante nessa patologia. Essas prolaminas constituem fração heterogênea do glúten e exibem algumas características de solubilidade em comum como veremos no capítulo seguinte. Experimentos de eletroforese com as gliadinas revelam que a pH ~ 4,0 a sub-fração α -gliadina possui a mais alta mobilidade, enquanto a ω -gliadina a mais baixa¹⁴. Sabe-se que a maior parte das gliadinas possui

ponto isoelétrico (pI) no intervalo de pH entre 6,4-8,5. Alguns dados ligados à atividade interfacial de gliadinas merecem menção. Com relação à adsorção a uma superfície hidrofóbica de sílica, observa-se¹⁴ uma adsorção lateral da ω -gliadina e perpendicular das demais (α , β e γ). A adsorção lateral implica necessariamente numa menor quantidade de proteína adsorvida. As frações α , β e γ , adsorvendo perpendicularmente, levam a uma adsorção quantitativamente mais significativa, pela razão geométrica apontadas. As frações β e γ podem permutar entre duas posições em relação à superfície. Na competição pela adsorção na superfície, os tipos α , β e γ -gliadina bloqueiam a adsorção da ω -gliadina, podendo mesmo substituí-la quando numa camada já formada.

Skerrit¹⁸ e equipe observaram diferenças nas toxicidades de cereais estudados clinicamente: milho, arroz e, provavelmente, sorgo são atóxicos; a toxicidade da aveia é discutível; a cevada é medianamente tóxica; trigo para pão, triguilho ou trigo sarraceno (trigo para quibe) e centeio são muito tóxicos. Eles concluíram que as diferenças eram devidas às diferentes seqüências de aminoácidos e conseqüentes estruturas das prolaminas nestes cereais e às suas quantidades. O centeio e a cevada, no entanto, não contem famílias de proteínas muito semelhantes às da α e β -gliadinas do trigo, tidas como as mais agressivas ao intestino delgado no processo inflamatório. Seus resultados apontaram que a seqüência Pro-Ser-Gln-Gln (PSQQ) no domínio amino terminal da α -gliadina foi a mais ativa. Observaram que para os peptídeos sintetizados, esta seqüência isolada era inativa, enquanto que no peptídeo B (CPQP**PSQQ**PLYLQLQ) era muito ativa, com baixa atividade no peptídeo A (CPQLQPQN**PSQQ**QPQEQ) e inativo no peptídeo D (GSFR**PSQQ**NPQAQG). A pouca atividade, ou inatividade, se deve às vizinhanças de aminoácidos carregados e suas seqüências. O peptídeo A é somente encontrado na α -gliadina.

Auricchio e equipe, perseguindo os mesmos objetivos de Skerrit¹², encontraram na α e γ -gliadinas um motivo repetitivo (PQQPY) ativo, também localizado no domínio N-terminal.

Trabalhos mais recentes na área médica relatam também o envolvimento específico da seqüência octapeptídica PQQPFPQQ da ω -gliadina¹⁹, semelhante a PQQPFPQ da γ -gliadina, na indução da reação imunológica característica da doença celíaca⁸².

Outros estudos²⁰ com gliadinas e gluteninas purificadas por salting-out mostraram que, em média, a ordem de reatividade das frações é a seguinte: frações ricas em gluteninas > frações ricas em gliadinas >> fração solúvel em sal. O motivo

repetitivo QQQPP da glutenina de baixa massa molar foi o mais reativo, seguido pela α e γ -gliadinas, quando genes das proteínas foram expressos em *Escherichia coli*. Para Morita²¹ e equipe a ω -gliadina rápida foi a mais agressiva em relação às α , β , γ -gliadinas, ω -gliadina lenta, gluteninas de alto e baixo peso molecular, quando avaliadas por teste de sensibilidade na pele em pacientes com anafilaxia induzida por exercícios.

Existem atualmente vários outros estudos^{22,23}, sobre essas questões, mas como os exemplificados aqui, o resultado é muito variável e depende do método empregado, tipo, número e epitopo dos alérgenos. Portanto, estudos ligados às interações, estados de agregação e demais aspectos estruturais e mecânicos desses sistemas podem, em princípio, ampliar a compreensão de aspectos ligados à sua ação deletéria sobre a superfície mucosa

No contexto deste trabalho, a investigação de propriedades reológicas das membranas de lipossomas mostrou-se de grande interesse, em vista de nossas conjecturas acerca do possível envolvimento de gliadinas com as características de elasticidade das membranas. Apesar de pouco se conhecer sobre o comportamento das diferentes famílias de gliadina nas interfaces, sabe-se que elas possuem alta atividade superficial, aderindo prontamente a superfícies hidrofóbicas²⁴.

3. Fundamentos da técnica de aspiração de microvesículas

Para a realização dos experimentos dessa parte do trabalho, empregou-se a técnica de aspiração de microvesículas por micropipetas. Essa técnica, desenvolvida por Evans e equipe há mais de duas décadas, permite a obtenção das constantes de elasticidade de curvatura k_c e do módulo de estiramento de área, k_A . As células vermelhas do sangue humano estão entre os primeiros sistemas estudados pela técnica²⁵. Suas propriedades elásticas foram investigadas determinando-se o módulo de compressibilidade de área e o módulo de cisalhamento. Medidas de expansividade térmica de área da membrana de células vermelhas também significaram um grande avanço para o conhecimento de propriedades mecânicas de membranas biológicas¹⁵.

Nessa técnica, as medições se dão através da aspiração da membrana das vesículas gigantes por micropipetas, com monitoramento através de videocâmara acoplada a microscópio ótico. Devido às ondulações produzidas por efeito térmico (Browniano)²⁶ na superfície da membrana vesicular, o diâmetro da vesícula observado ao microscópio, e conseqüentemente a área da sua superfície, são aparentes. A aparente

expansão da área de superfície da vesícula produzida pela micropipeta sob tensões de sucção muito baixas (0,001-0,5 mN/m)¹², se deve ao abrandamento destas flutuações.

Como as membranas com espessura de poucas moléculas têm uma estrutura lamelar, seu comportamento elástico é caracterizado pelo módulo de compressibilidade de área, K , que representa a reserva de energia elástica produzida pela dilatação ou compressão de sua área, e pelo módulo de cisalhamento, μ , que representa a reserva de energia elástica produzida pela extensão da membrana em uma superfície plana, sem alteração na área da membrana. Pode-se determinar experimentalmente o valor de K plotando-se em um gráfico os valores da tensão isotrópica, $\bar{T}$, versus a fração de mudança na área da membrana, α , dada em percentagem, para uma dada célula ou vesícula²⁷.

Fig. 3.1 – Curva da tensão versus variação percentual de área da vesícula

$$\alpha = \Delta A / A_0 = \frac{A - A_0}{A_0} (\%) \quad (\text{eq. 3.1})$$

onde, A_0 é a área da vesícula sob tensão zero e A é a área da vesícula sob tensão. A reta é obtida da regressão linear dos valores medidos e o seu coeficiente angular representa o valor de K . O coeficiente linear representa a pressão de sucção inicial na micropipeta necessária para capturar a vesícula, sem contanto deformá-la.

O valor de $\bar{T}$ é obtido da equação:

$$\bar{T} = \frac{1}{2} \Delta P \cdot r \left(1 - \frac{r}{R} \right) \quad (\text{eq. 3.2})$$

onde: ΔP é o acréscimo de pressão aplicada para produzir um apêndice da vesícula de comprimento L no interior da micropipeta,

Fig. 3.2 – Vesícula antes de ser capturada (a) e após sucção pela micropipeta (b).

Sendo, r o raio interno da micropipeta, e R , o raio da porção esférica exterior da vesícula.

A relação $\Delta A/A_0$, que depende do movimento de projeção da vesícula no interior da micropipeta (L) e da variação do volume da vesícula (ΔV), é calculado pelo termo de primeira ordem da expansão da série de Taylor, por possuir uma variação de pequena magnitude.

$$\Delta A/A_0 \cong 2\pi[r.L(1 - r/R) + \Delta V/\pi R]/A_0 \quad (\text{eq. 3.3})$$

Desta equação, a única variável que não pode ser medida experimentalmente é o ΔV , por ter um valor muito pequeno para ser aferido por sistema ótico, precisando ser determinado por uma relação independente:

$$\Delta V/V_0 \cong -\bar{T}/c_i \quad (\text{eq. 3.4})$$

que relaciona a pressão osmótica c_i criada na célula/vesícula, devida à saída de água e não de íons, imposta pela sucção da micropipeta, com o seu volume inicial V_0 e tensão isotrópica $\bar{T}$.

Estudos¹⁶ da variação da área da célula versus temperatura demonstram que, a uma dada temperatura, as variações de volume devidas à migração de água podem ser eliminadas para uma pequena variação de área e esta variação de área da vesícula se torna uma função linear do seu comprimento de projeção:

$$\Delta A \cong 2\pi.r.L(1 - r/R) \quad (\text{eq. 3.5})$$

Desta equação pode-se chegar à variação da área da membrana como uma função da temperatura a uma tensão constante da membrana.

A condição de volume constante²⁸ pode ser verificada medindo-se o volume da vesícula anterior e posteriormente às medições de L e, se não há diferença entre eles, a equação acima poderá ser utilizada.

Pela conservação de volume, o volume inicial V_0 será igual ao volume V em qualquer momento das medições. Igualando-se $V_0 = V$, chega-se à eq. 3.8.

$$V_0 = 4/3 \pi R_0^3 \quad (\text{eq. 3.6})$$

$$V = 4/3 \pi R^3 + \pi r^2 (L - r) + 2/3 \pi r^3 \quad (\text{eq. 3.7})$$

$$R = (R_0^3 + 1/4 r^3 - 3/4 r^2 L)^{1/3} \quad (\text{eq. 3.8})$$

Por causa das flutuações da membrana, em baixas tensões, o gráfico apresenta-se em curva, que é linearizada através da curva logarítmica, conforme Rawicz.

Evans e Rawicz relacionaram matematicamente a compressibilidade aparente da área de membranas lipídicas (α), devida às superposições das suaves ondulações da superfície oriundas da energia térmica, com a constante de módulo elástico da bicamada k_c .

$$\alpha = \Delta A / A_0 = (k_B T / 8 \pi k_c) \ln(1 + c \bar{T} A / k_c) + \bar{T} / K_A \quad (\text{eq. 3.9})$$

onde,

$\Delta A / A_0$, fração de acréscimo da área aparente da vesícula

K_A , módulo elástico de estiramento direto da área

$k_B T$, energia térmica (em torno de 4×10^{-21} J, para $T = 289\text{K}$), onde k_B é a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta.

c , cte. que depende do tipo de ondulação, se harmônicos esféricos ou ondas planas ($\sim 0,1$)

Em regime de baixa tensão e temperatura, a eq. 3.9 pode ser reduzida à:

$$\ln(\bar{T} / \bar{T}_0) \approx (8 \pi k_c / k_B T) \Delta A / A_0 \quad (\text{eq. 3.10})$$

onde $\bar{T}_0$ é a tensão onde a deformação da superfície é zero.

$$k_c = \frac{k_B T}{8\pi\alpha} \ln \frac{\bar{T}}{\bar{T}_0} \quad \text{ou} \quad \alpha = \frac{k_B T}{8\pi k_c} \ln \frac{\bar{T}}{\bar{T}_0} \quad (\text{eq. 3.11})$$

Essas expressões também são conhecidas como lei de Helfrich²⁹. Na prática, o α pode ser determinado pelas relações com as dimensões medidas:

$$A = 4\pi R_L^2 - \pi r^2 + 2\pi r(L - r) + 2\pi r^2 \quad (\text{eq. 3.12})$$

$$A_0 = 4\pi R_0^2 \quad (\text{eq. 3.13})$$

$$\alpha = \frac{R_L^2 + rL/2 - r^2/4}{R_0^2} - 1 \quad (\text{eq. 3.14})$$

4 - Fase lamelar

Nesta parte do trabalho, foram estudados sistemas envolvendo fases lamelares, com a finalidade última de estudá-las em situação confinada em microvesículas de fosfolípidios. O estudo foi pensado visando-se verificar o efeito da fase lamelar confinada sobre a membrana fosfolipídica e desta última sobre as próprias características da fase lamelar, na presença e ausência de gliadina. O surfactante usado nesses estudos foi o pentaetilenoglicol mono N-dodecil éter (C12E5), em hexanol/H₂O.

Uma bicamada de surfactante pode ser comparada a uma fina superfície na qual a forma e o comportamento dependem somente da competição entre suas propriedades elásticas e a entropia. Em outras palavras, a competição entre a energia elástica da membrana e a energia térmica $k_B T$ é um dos fatores que determina a estabilidade da membrana. As propriedades elásticas da membrana são, deste modo, descritas pelas duas constantes elásticas:

k = módulo elástico de curvatura principal, e

Erro! Indicador não definido. = módulo elástico de curvatura Gaussiana,

O módulo elástico k é a energia necessária para curvar a membrana em torno do seu ponto de equilíbrio.

Quando k é da mesma ordem de $k_B T$, observa-se significativa flutuação da membrana em torno do seu ponto de equilíbrio elástico e estas flutuações têm consequências importantes sobre a existência das fases e sobre suas propriedades estáticas e dinâmicas³⁰.

A constante de curvatura Gaussiana $\bar{k}$ define a topologia da membrana, a saber:

$\bar{k} < -2k$ = a forma esférica é preferencial, favorecendo a formação de vesículas.

$-2k < \bar{k} < 0$ (para valores de k positivos) = formam-se membranas planas preferencialmente, tendendo a formar fase lamelar

$0 < \bar{k}$ = a membrana toma a forma recurvada, tendendo a formar fase esponja ou cúbica.

Freyssingeas e equipe¹⁹, que estudaram o comportamento de fases de C₁₂E₅ com hexanol por diversos métodos de espalhamento, constataram que a elevação da temperatura causa um leve acréscimo sobre a constante k , devido a um aumento da espessura da membrana advindo do alongamento da cabeça polar das moléculas do C₁₂E₅.

Segundo Jonströmer³¹, a presença do álcool mostra um comportamento de partição que se assemelha à lei de Henry, de pressão parcial de vapor de misturas binárias de líquidos:

$$C_a^s = C_a^{s,0} \cdot X^f \quad (\text{eq. 3.15})$$

onde:

X^f é a fração molar do álcool no filme do surfactante,

C_a^s é a concentração de álcool na subfase aquosa, e

$C_a^{s,0}$ é a constante de mesma dimensão de C_a^s .

De acordo com suas observações, a solubilidade de álcoois de cadeia média é baixa para as frações volumétricas na bicamada da ordem de 0,01- 0,03.

Com relação às ondulações das bicamadas, Jonströmer diz que devido a elas, a área real projetada (A_{xy}) da fase lamelar é substancialmente menor que a área da bicamada total (A_s) calculada geometricamente, dada por:

$$\left(\frac{A_{xy}}{A_s}\right)^{-1} = 1 + \frac{k_B T}{4\pi k_0} \ln \frac{q_{máx}}{q_{min}} \quad (\text{eq. 3.1.6})$$

onde k_0 é o módulo de curvatura e q_{min} e q_{max} são os limites no IR e UV. Ao se adicionar álcool à bi-camada, sua rigidez diminui¹⁷, conseqüentemente o k_0 aumenta a ondulação e a diferença entre as áreas. Isto pode ser comprovado pela mudança da repetibilidade das distâncias entre camadas, medidas experimentalmente por espalhamento³².

5– Metodologia

5.1 - Geração das vesículas

Nesta etapa, vesículas de fosfolipídios são geradas em meio de sacarose ou de fase lamelar, a partir da passagem de corrente elétrica (5V, 10Hz) entre duas lâminas de vidro metalizadas, entre as quais se deposita solução do fosfolipídio em clorofórmio (1 mg/5 ml). Nas experiências com gliadina, em lugar de se usar somente a solução de DOPC (Avanti Lipids) em clorofórmio, utilizou-se o filtrado de uma solução etanólica de gliadina (37,037µg/ml) numa proporção de 1:20v/v, 2:20v/v e 3:20v/v em solução de DOPC em clorofórmio (1 mg/ 5ml). Após a deposição nas placas, procedeu-se à secagem em câmara sob vácuo. O objetivo foi obter-se vesículas em cujo interior encontra-se o meio de sacarose ou a fase lamelar.

Para a geração das vesículas em fase lamelar, o meio foi testado em temperaturas acima e abaixo da temperatura de transição da amostra. Para atingir este objetivo, foi adaptada uma câmara digital em um microscópio sobre uma câmara aquecedora com controle programável de temperatura, para se monitorar a fase de crescimento das vesículas.

Na etapa que envolveu preparações de vesículas gigantes de fosfolipídeos com gliadina incorporada, o desafio era incorporar as gliadinas em um meio conhecido insolúvel para elas, o clorofórmio, que iria carrear o fosfolipídio. A primeira tentativa a ser testada foi a dissolução de gliadina 0,1% em misturas binárias etanol/água nas proporções indicadas⁶³ como sendo duas das ideais para esta finalidade, ou seja, nas proporções EtOH/H₂O = 52/48 e 62/38. Se esta tentativa viesse a dar certo, um novo

problema teria que ser solucionado posteriormente, o da miscibilidade parcial da água com o clorofórmio.

Como a proposta anterior de solubilização não encontrou na prática os resultados teóricos esperados, tentou-se a extração de gliadina com etanol (PA), considerando-se sua compatibilidade com o meio clorofórmico empregado para a dispersão dos fosfolipídeos. A extração da gliadina foi feita sob agitação contínua da proteína nesse solvente, por 7h, à temperatura ambiente, na proporção de 1mg de gliadina / 1 ml de etanol. O rendimento da extração foi de 3,7%.

5.1.1 - Solução do fosfolipídio.

Durante a execução dos ensaios, alguns fosfolipídios foram testados quanto à dureza das membranas formadas. Dos fosfolipídios utilizados, DLPC – 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina; SOPC – estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina; POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina; OSPC – 1-oleoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina e DOPC – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, todos da Avanti Polar Lipid Inc, este último apresentou uma resistência mecânica maior em relação aos demais. Por este motivo foi o escolhido para se trabalhar.

Concentrações de solução de DOPC em clorofórmio foram ensaiadas, com o objetivo de verificar-se qual(ais) dela(s) geraria(m) vesículas em tamanho e quantidade desejada. As concentrações ensaiadas, de 17,3%; 17,5% e 20% de DOPC em HCCl_3 , não apresentaram resposta linear dessas propriedades com a concentração, mostrando comportamento aleatório.

Também foram aplicados diferentes volumes destas soluções sobre as lâminas metalizadas, no intuito de se observar se o efeito de uma maior dispersão do fosfolipídio sobre a superfície seria mais favorável à formação das vesículas. Dos volumes ensaiados de 10; 15; 20; 30; 40; 50 e 60 μl espalhados em uma área de 3,1416 cm^2 , o volume de 20 μl apresentou uma tendência a um melhor resultado.

5.1.2 -Aplicação do fosfolipídio sobre a lâmina metalizada/espaçadores

O espalhamento das soluções de DOPC sobre as lâminas metalizadas foi feito através de seringas de volumes micrométricos, espalhando-se ao máximo o volume a ser testado em toda a superfície disponível. No início, pares de lâminas retangulares (cerca de 2,0 x 5,0 cm) foram utilizados e a massa Vitrex empregada como espaçador. Posteriormente, com a necessidade de se controlar a temperatura de produção das vesículas, estas lâminas foram substituídas por pares de lâminas quadradas (cerca de 3,0

x 3,0 cm) e o Vitrex substituído por espaçadores de teflon (Molecular Probe) com orifício circular de diâmetro de 2 cm.

Foram feitas combinações de espaçadores de 0,5; 1,0 e 2,0 mm de espessura, obtendo-se afastamentos de 0,5 a 3,5mm entre as lâminas metalizadas. Estes diferentes espaçamentos não só alteram a relação volumétrica fosfolipídio / sacarose, mas também a faixa de variação da corrente elétrica circulante entre as lâminas.

5.1.3 - Secagem do HCCl_3 .

A princípio, a secagem das lâminas metalizadas com a solução de fosfolipídio era processada durante 1 – 2h, em dessecador sob vácuo, a partir de trompa d'água. Uma experiência com uma estufa acoplada a uma bomba a vácuo mostrou uma melhor eficiência de secagem, com duração média de 20-30 min.

5.1.4 - Solução de sacarose 0,1M

Obtida a lâmina seca, o volume da cavidade do espaçador é então preenchido com a solução de sacarose 0,1M. A segunda lâmina é colocada sobre a primeira, com o cuidado de não se permitir formação de bolhas no interior.

5.1.5 - Aplicação da tensão elétrica

Os terminais do gerador de tensão, 5V e 10Hz, são acoplados a estas lâminas induzindo uma corrente elétrica entre as finas camadas metálicas.

Como a produção das vesículas é muito irregular, quanto à quantidade e tamanho (~30-60 μm de diâmetro), para uma mesma condição de corrida, as intensidades dessas correntes foram medidas para se verificar se havia alguma correlação com as irregularidades observadas.

Não foi possível estabelecer nenhuma correlação entre corrente e variação da quantidade ou diâmetros de vesículas geradas.

A formação das vesículas é observada quase que instantaneamente à passagem da corrente elétrica, porém, para que elas se tornem estáveis é necessário, ao menos, um tempo de 2 horas de permanência sob tensão.

A partir deste ponto, as vesículas requerem o máximo de delicadeza e suavidade em todas as etapas posteriores de sua manipulação.

5.2 - Confeção das micropipetas

5.2.1 - Limpeza dos capilares

Procedimento obrigatório prévio à confecção das micropipetas, para assegurar a não aderência das membranas de fosfolípido nas paredes internas do capilar, esta etapa consiste na imersão dos tubos de vidro de dimensões capilares ($\varnothing_{\text{int}}$: 0,78mm; $\varnothing_{\text{ext}}$: 1,0mm – Clark Capillaires) em álcool etílico PA e posterior passagem por ultra-som, com uma sessão de 20 min de degaseificação máxima e 20min de potência máxima de limpeza. A remoção do álcool e a secagem dos capilares ao ar completam esta etapa.

5.2.2 - Extrusão das micropipetas

Após uma rápida limpeza externa com álcool isopropílico ou etílico, cada capilar é inserido por vez na câmara da extrusora, com o programa de extrusão já pré-definido. Para este tipo de capilar os parâmetros utilizados foram:

Temperatura do feixe de laser: 280°C

Filamento: 4

Velocidade de repuxo: 50m/s

Tempo de espera: 85s

Força aplicada: 80N.

A incidência do raio laser sobre a região central do tubo capilar, por um período de espera, principia uma fusão pontual do vidro. O repuxo, segundo as características pré selecionadas, faz com que a parte semi fundida seja estirada, diminuindo as dimensões de parede e diâmetros do tubo, obtendo-se duas micropipetas cujas seções mais estreitas tenham diâmetros internos na faixa de 5 a 16 μm .

Algumas das pontas das micropipetas, assim confeccionadas, saem abertas, com diâmetros variados. Outras saem fechadas, por causa da não homogeneidade dos tubos capilares na sua grande maioria, havendo necessidade da quebra manual das pontas. Por ser uma quebra grosseira, acompanhada somente de uma inspeção ao microscópio da dimensão e perfil da ponta obtida, antes e depois da quebra, o resultado deste procedimento é de baixíssimo rendimento, em tempo e qualidade. Um dispositivo de microfusão, que faz o corte perfeito da ponta da micropipeta por resfriamento súbito, empregando uma gota de um vidro especial de ponto de fusão mais baixo do que o da micropipeta, resolveria esta dificuldade operacional se estivesse disponível no

laboratório onde esses procedimentos foram executados, o que não ocorreu. Desse modo, a quebra foi efetuada manualmente como descrito, tendo sido selecionadas as micropipetas com diâmetros na faixa desejada e com características geométricas mais uniformes, conforme inspeção microscópica.

5.3 - Manipulação das vesículas

Aqui nesta etapa são medidas as propriedades viscoelásticas das membranas das vesículas do fosfolipídio geradas com e sem solução etanólica de gliadina, em presença de solução de sacarose 0,1M.

Após sua geração, as vesículas são transferidas para a célula de medição, com auxílio de pipeta Pasteur, onde se encontra solução de glicose 0,1M.

A viscoelasticidade é usualmente medida através de sucção da membrana da vesícula por meio de micropipeta¹⁶, conectada a um sistema de geração e medição de pressão bastante sensível. São medidos: o diâmetro interno da micropipeta, o diâmetro inicial da vesícula, e, a cada pressão, seu novo diâmetro e a porção succionada. Esses valores são tratados segundo as equações do item 2.2 deste capítulo e os resultados plotados em gráfico dos valores da tensão contra os valores de $\alpha = \Delta A/A$. Da curva $\ln$ da tensão versus α podemos obter os valores dos módulos elásticos de curvatura, k_c .

A partir da comparação entre os valores obtidos de k_c da membrana vesicular com e sem a gliadina, podemos comprovar a incorporação ou não da gliadina na estrutura da membrana fosfolipídica e quantificar o efeito promovido sobre sua elasticidade.

5.3.1 - Transferência das vesículas

Uma parte das vesículas geradas é transferida para uma célula de suporte metálico retangular vazado, em cujo fundo foi colada, com parafina derretida, uma lâmina de microscópio previamente limpa com álcool etílico e acetona.

Esta célula é então preenchida com solução de glicose, na concentração isotônica em relação à solução de sacarose que preenche o interior da vesícula.

Para se efetuar a transferência, utiliza-se uma pipeta Pasteur, fazendo-se uma sucção suave de maneira a promover o mínimo choque mecânico possível entre as vesículas.

5.3.2 - Solução de glicose.

O equilíbrio osmótico durante a manipulação das vesículas em presença das soluções de sacarose e glicose é essencial para garantir a não distensão ou flacidez da membrana que separa os dois meios.

Para o cálculo das concentrações isotônicas destes solutos, tomam-se os valores da pressão osmótica³³ versus a concentração, para cada um dos solutos, determinando-se as equações das retas:

Tab. 3.1 – Pressão osmótica* X concentração das soluções.

Sacarose		Glicose	
Com (g/L)	P.Osmótica	Com (g/L)	P.Osmótica
20,1	0,060	5	0,025
25,2	0,076	10	0,057
30,3	0,091	15,1	0,085
35,4	0,107	20,1	0,115
40,6	0,123	25,2	0,145
45,7	0,140	30,3	0,174
50,9	0,156	35,4	0,202

* Pressão osmótica em os.kg⁻¹

Fig. 3.3 - Curvas de variação da pressão osmótica em função da concentração de glicose e sacarose.

Calcula-se a concentração de solução de glicose que teria a mesma pressão osmótica da sacarose 0,1M: ($C_{12}H_{22}O_{11}$), $PM = 342,3g$, cuja solução 0,1M possui 34,23 g/l, que pela segunda equação resulta na pressão osmótica de 0,103113 Os/kg.

Para a glicose: $0,103113 = 0,0058X - 0,0025 \Rightarrow$ o valor da concentração X é 18,20914 g/l. Calculando-se $X/180,16g$ (pela massa molar da glicose) ($C_6H_{12}O_6$), encontra-se a concentração de 0,1M.

Tomando-se as purezas de cada soluto, 99,5% para a sacarose (Sigma) e 99,5% para a glicose (Fluka), obtém-se as massas respectivas de 0,34402 e 0,18106 para 10 ml de solução.

5.3.3 - Tempo de decantação

Após a colocação das vesículas em contato com a solução de glicose se faz necessário aguardar ao menos 30 min, para que as vesículas decantem ao fundo da célula.

Nas concentrações de soluções utilizadas de sacarose e glicose, observa-se uma pequena diferença de densidade, o que ocasiona a lenta decantação das vesículas.

Durante o período de decantação, a célula permanece tampada com outra lâmina de vidro, sobre um selo de Parafilm, que facilitará um deslize mais suave da lâmina, minimizando o revolvimento da solução no seu interior no momento de abrir a célula para dar acesso à entrada da micropipeta.

5.3.4 - Medição da pressão 0 e do L0

Ao microscópio, uma vez focadas as vesículas, é escolhida uma delas com dimensões adequadas de proporcionalidade em relação à micropipeta – ideal de no mínimo 4 vezes o diâmetro da micropipeta – e afastada das demais. Neste ponto é necessária uma operação casada de aproximação da micropipeta, perpendicular em relação ao eixo focal do microscópio, e de controle do equilíbrio das pressões interna e externa a ela, até que seja possível quase tocar a superfície da parede da vesícula com a ponta da micropipeta, sem que ela seja, contudo, succionada ou empurrada para longe. Neste momento registra-se a pressão lida no monitor de pressão, como pressão de referência (pressão 0) e faz-se uma série de imagens, de onde posteriormente se medirá o diâmetro original da vesícula (L0).

‘Captura’ das vesículas

(a)

(b)

Fig. 3.4 – Micropipeta e amostra acima da objetiva do microscópio (a) e sistema de medição de pressão (b).

Fig. 3.5 - Desenho esquemático da manipulação das vesículas ao microscópio

Uma das etapas mais difíceis e trabalhosas de toda a manipulação, a ‘captura’ deve ser bem suave, com o meio não apresentando sinais de fluxo. Uma aproximação mais descuidada pode significar a ruptura da membrana fosfolipídica ou a fuga da vesícula.

Uma vez tocada a superfície da vesícula com a micropipeta, promove-se uma leve depressão no seu interior, através do controlador de pressão, até que a membrana fique presa à micropipeta.

5.3.5 - Medição da série de depressões/tempo de estabilização

A cada depressão aplicada à micropipeta corresponderá, após um período de estabilização, uma porção da vesícula succionada para seu interior, e conseqüentemente, um volume de vesícula remanescente no exterior.

No ponto em que não for mais observado nenhum avanço do menisco, da porção succionada no interior da micropipeta, registra-se a pressão e uma série de imagens do conjunto.

Fig. 3.6 - Vesículas de DOPC em meio de solução 1M glicose, contendo em seu interior solução 1M de sacarose.

5.4 - Preparação da fase lamelar

5.4.1 - Verificação das propriedades físicas de micro-vesículas de fosfolipídios, derivados da fosfatidilcolina, em presença de meio anisotrópico de C₁₂E₅ e em meio de gliadina.

Visou-se a incorporação de gliadina ou de C₁₂E₅ na fase de formação de vesículas, com o correspondente acompanhamento do comportamento físico-químico dos sistemas formados e de suas características. Este estudo envolve etapas de trabalho, a seguir descritas:

5.4.1.1 - Determinação da melhor concentração de solução de C₁₂E₅ para a manipulação da fase lamelar, em função da temperatura de transição.

Esta etapa consiste na preparação de soluções do surfactante pentaetilenoglicol mono N-dodecil éter (C₁₂E₅), com hexanol (ou heptanol), em concentrações em torno de 10 – 15% em vol. de fase lamelar, de forma que a concentração do hexanol na solução (em torno de 15-20% em massa da quantidade do surfactante)¹⁹ traga a temperatura de transição entre as fases isotrópica e anisotrópica para a faixa de 25 – 33° C, sem contudo permitir que a concentração do hexanol fragilize as vesículas.

As equações desenvolvidas para se chegar a estes valores são:

$$R_m = \left(\frac{x \cdot px}{y \cdot py} \right) \quad \text{ou} \quad x = \frac{R_m \cdot y \cdot py}{px} \quad (\text{eq. 3.16})$$

$$\frac{(x \cdot px)}{dx} + \frac{(y \cdot dy)}{dy} = \frac{V_{sol}}{100} \cdot \%lamelar \quad (\text{eq. 3.17})$$

Substituindo a equação 3.13 na 3.14 teremos:

$$y = \frac{V_{sol} \cdot \%lam \cdot dx \cdot dy}{100 \cdot py (R_m \cdot dy + dx)} \quad (\text{eq 3.18})$$

onde:

y = massa do surfactante a ser medida, em g.

% lam = % vol. de lamelas na solução.

V_{sol} = volume da solução a se preparar, em ml.

d_x = densidade do álcool.

d_y = densidade do surfactante.

R_m = relação mássica entre o álcool e o surfactante.

x = massa do álcool a ser medida, em g.

p_x = pureza do álcool.

p_y = pureza do surfactante (considerada 100%).

Foram feitos 13 experimentos em heptanol e 32 em hexanol. As soluções foram preparadas numa proporção molar de 0,69 a 5,41 em heptanol, com a concentração lamelar percentual de 13,82 a 57,44 e na proporção molar de 0,78 a 1,78 em hexanol, com a concentração lamelar percentual de 11,0 a 45,7. As temperaturas de transição de fase foram determinadas macroscopicamente através de observação visual, com polarizadores cruzados, em banho termostatzado.

Outra variável controlada foi a estabilidade do surfactante durante todo o período de manipulação e estocagem: produção da fase lamelar, determinação da temperatura de transição e geração das vesículas.

Foram testados surfactantes de dois fabricantes: da Nikko (japonesa) e Sigma-Aldrich (norte americana), tendo o primeiro apresentado melhor reprodutibilidade de resultados, sendo portanto o escolhido para se trabalhar.

A partir deste ponto as vesículas foram geradas como no item 4.1, tendo a fase isotrópica como meio circundante e posteriormente ultrapassando-se a temperatura de transição ainda na placa da câmara térmica de geração das vesículas.

6 - Resultados e discussão

6.1 – Sistema de gliadina em vesículas de fosfolipídeos

Extração de proteínas executada com etanol a 70%, sob agitação por 4h, procedida conforme Hussein e Lukow, demonstra que o procedimento arrasta α -, β -, γ -gliadinas e glutenina de baixo peso molecular na fração alcoólica³⁴. Pela incompatibilidade de mistura da água com o clorofórmio, solvente do DOPC, esta técnica foi substituída por extração com etanol PA.

Dos fosfolípidios testados com sacarose - DLPC, SOPC, POPC, DOPC - o DOPC apresentou uma maior resistência da membrana da vesícula à temperatura ambiente, portanto as melhores condições para o manuseio.

Os valores aqui encontrados são resultado das medidas das vesículas feitas através do software LabWindows CVI vs .5.0, configurado para esta manipulação.

Algumas considerações experimentais foram feitas para pequenas inserções da vesícula na micropipeta:

Raio:

$$\text{Se } L - r < 0 \Rightarrow R = \{R_0^3 - 3/8 (r^2 + L^2) L [1 - L/6((r^2 + L^2)/L)]\}^{1/3} \quad (\text{eq.3.19})$$

$$\text{Se } L - r \geq 0 \Rightarrow R = (R_0^3 + 1/4 R_p^3 - 3/4 R_p^2 L)^{1/3} \quad (\text{eq. 3.20})$$

Área aparente:

$$\text{Se } L - r < 0 \Rightarrow A = 2\pi R^2 \{1 + [1 - (r/R)^2]^{1/2}\} + \pi (r^2 + L^2) \quad (\text{eq. 3.21})$$

$$\text{Se } L - r \geq 0 \Rightarrow A = 2\pi R^2 \{1 + [1 - (r/R)^2]^{1/2}\} + 2\pi r L \quad (\text{eq. 3.22})$$

Área externa aparente:

$$A = 2\pi R^2 \{1 + [1 - (r/R)^2]^{1/2}\} \quad (\text{eq. 3.23})$$

α - Evans

$$\alpha = \frac{R_L^2 + rL/2 - r^2/4}{R_0^2} - 1 \quad (\text{eq. 3.24})$$

Tensão

$$\bar{T} = \Delta P.r/2(1 - r/R) \quad (\text{eq. 3.25})$$

Módulo elástico de curvatura (k_c)

$$k_c = \frac{k_B T}{8\pi\alpha} \ln \frac{\bar{T}}{\bar{T}_0} \quad (\text{eq. 3.26})$$

Podemos obter o módulo elástico de curvatura k_c a partir das tangentes das retas traçadas sobre os primeiros pontos das curvas apresentadas na Fig. 3.7. Observa-se um aumento em k_c com o aumento da concentração de gliadina no meio de geração da vesícula (símbolos cheios na Fig.3.8), embora os resultados mostrem tendência a uma saturação já a baixas concentrações. Comparando-se as curvas referentes ao sistema com e sem gliadina nessa Figura, vê-se que os módulos elásticos são distintos, o que interpretamos como indicação de que a gliadina interage com o DOPC na bicamada da vesícula.

O comportamento do módulo elástico de curvatura é coerente com o observado por Marion e equipe, em estudos sobre interação entre fosfolipídios naturais do glúten com suas proteínas³⁵. Esses autores também mostraram, através de microscopia eletrônica de criofratura, que os lipídios se associam apenas às redes de proteínas do grão quando organizados em vesículas, caracteristicamente com diâmetros entre 60 e 300nm. Essas estruturas fosfolipídicas mostram-se muito sensíveis às modificações do microambiente, como indicam resultados de estudos por ^{31}P NMR³⁶

Fig. 3.7 – Curvas de $\ln \sigma$ em função de α em vesículas de DOPC, com gliadina nas proporções gliadina / DOPC em massa indicadas.

Fig. 3.8 - Variação do módulo elástico de curvatura k_c de vesículas gigantes de DOPC em função da concentração de gliadina.

A curva superior mostra o acréscimo da constante elástica de curvatura da membrana formada com o aumento da concentração de gliadina na formação da vesícula. O aumento é acentuado até aproximadamente 2%, tendendo a um valor constante após este limite. A Tabela 3.2 apresenta os valores obtidos para as diferentes condições de ensaio.

Tab. 3.2 – Valores de k_c calculados e suas médias.

	Média	Desv pad
Gliadina 0%	22,00	8,46
Gliadina 1%	34,73	10,04
Gliadina 2%	52,16	9,96
Gliadina 3%	49,06	11,72
Branco 1%	21,59	7,36
Branco 2%	20,22	9,00
Branco 3%	19,85	9,70

6.2 - Fase lamelar

Os melhores resultados (Fig 3.9) relativos à obtenção de temperatura de transição de fase abaixo dos 35°C em função da faixa de produção de lamelas em hexanol (ver Tab. 3.3), foram em torno de % lam = 15 e $R_m = 0,25$.

Fig. 3.9 - Fase lamelar de C₁₂E₅

Fig. 3.10 – Corpos não esféricos observados na pulsação de DOPC em meio de fase lamelar de C₁₂E₅

Tab. 3.3 - Amostras de fase lamelar e respectivas temperaturas de transição.

Am	Vol (mL)	C12E5 (g) (*)		Hp.ol 98% (g) (*)		Hx.ol 98% (g) (*)		Alc/C12 (γ)	Alc/C12 (m/m)	Conc Lam (% Vol)	T _{tr} (°C)
1	5	0,279	280	X							
2	2	0,1113	112	X							
2	2	0,1113	112	X							73
3	2	0,742	745	0,332	404			1,43	0,537	57,44	
3	2	0,742	745	0,332	404			1,43	0,537	57,44	33
4	2	0,1942	195	0,086	105			1,41	0,443	14,98	
5	2	0,2154	216	0,069	84			1,02	0,319	15,00	
6	2	0,1920	193	0,332	404			5,41	1,729	29,83	
7	2	0,1920	193	0,086	105			1,40	0,448	14,87	
8	2	0,1920	193	0,069	84			1,23	0,358	13,82	
9	2	0,2420	243	0,072	87			1,02	0,297	16,51	52
10	2	0,3207	322	0,064	78			0,69	0,200	20,00	
11	2	0,3058	307	0,076	93			0,86	0,250	20,00	25
12	2	0,3010	302			0,0813	100	1,05	0,270	20,00	23
13	2	0,3190	320			0,0638	78	0,78	0,196	19,85	
14	2	0,3355	337			0,0504	62	0,59	0,147	19,87	
15	2	0,2681	269			0,0724	89	1,05	0,265	17,82	
16	2	0,2672	268			0,1052	129	1,54	0,386	19,75	
17	3	0,3365	338			0,0909	112	1,05	0,265	14,91	
18	3	0,3600	361			0,0720	88	0,78	0,196	14,94	28
19	4	0,4782	480			0,0956	117	0,78	0,196	14,88	30,5
20	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	34
21	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	41
22	4	1,1759	1181			0,5374	660	1,78	0,448	45,69	30
23	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	35
24	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	34
25	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	30
26	2	0,2400	241			0,0480	59	0,78	0,196	14,94	34
27	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	>40
28	2	0,2400	241			0,0480	59	0,78	0,196	14,94	30
29	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	
30	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	
31	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	
32	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	
33	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	31
34	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	< 0-28
35	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	42
36	4	0,4151	417			0,1522	187	1,43	0,359	15,00	
37	4	0,3044	306			0,1116	137	1,43	0,359	11,00	
38	4	0,4365	438			0,1343	165	1,20	0,302	15,00	
39	4	0,3201	321			0,0985	121	1,20	0,302	11,00	
40	4	0,4801	482			0,0960	118	0,78	0,196	14,94	35,3
41	4	0,4570	459			0,1172	144	1,00	0,2513	15,00	27
42	4	0,4570	459			0,1172	144	1,00	0,2513	15,00	37
43	4	0,4570	459			0,1172	144	1,00	0,2513	15,00	29
44	4	0,4570	459			0,1172	144	1,00	0,2513	15,00	32,5

(*) μL

Hexanol (102.18 g/mol; dens = 0.814), Heptanol (116.2 g/mol; dens = 0.822), C₁₂E₅ (406.6 g/mol; dens = 0.996)

6.3 - Geração de vesícula em presença de fase lamelar

A obtenção da vesícula em fase lamelar, em relação à sacarose, se mostrou bem mais difícil, possivelmente em função dos grandes blocos lamelares que já estão presentes quando da formação das vesículas, dificultando assim o envolvimento de uma porção destes pela película do fosfolípido.

Em uma primeira etapa foi possível obter-se corpos aproximadamente esféricos em fase anisotrópica, embora se tenha questionado a comprovação de que fossem realmente vesículas. Os corpos formados em meio de fase lamelar (Fig. 3.10), em temperatura em torno da temperatura de transição da amostra, mostraram uma geometria não esférica que sugeria tratar-se de microvesículas. No entanto, os pesquisadores Carlos Marques e André Schröder, da equipe do laboratório francês sob cuja supervisão essa parte do trabalho foi desenvolvida, não confirmaram o fato, afirmando tratar-se mais provavelmente de um evento de micro separação de fases.

A sequência de fotos a seguir mostra o meio lamelar em diversas situações: (Fig. 3.11), puro à temperatura ambiente e sem presença de tensão elétrica, onde fica evidente a sua organização planar orientada; (Fig. 3.12), em presença do DOPC, tensão elétrica, à temperatura ambiente e com polarizadores cruzados, caracterizando as multidireções das diminutas porções; (Fig. 3.13), sem polarizadores cruzados, evidenciando as vesículas de DOPC geradas neste meio.

Fig. 3.11 – Fase lamelar de $C_{12}E_5$, puro à temperatura ambiente, sem tensão elétrica.

Fig.3.12 – Vesículas preenchidas de fase lamelar de $C_{12}E_5$ sob tensão elétrica à temperatura ambiente com polarizadores cruzados

Fig. 3.13 - Vesículas preenchidas de fase lamelar de $C_{12}E_5$, à temperatura ambiente, sem polarizadores cruzados

No teste de resistência mecânica do DOPC à ação da temperatura, as vesículas de diâmetros em torno de 25 μm , formadas à temperatura ambiente, apresentaram excelente resistência em solução de sacarose (0,3423g/20mL de água), até 60°C. É importante considerar-se que a manipulação das vesículas em meio lamelar envolve elevação de temperatura acima da temperatura de transição, e, como o aumento da temperatura favorece a passagem de corrente elétrica, tem-se que a formação de vesículas de DOPC em presença de sacarose, à temperatura acima da ambiente, mostra-se mais efetiva.

O mesmo resultado, porém, não foi verificado com a presença da fase lamelar. A 35°C a formação das vesículas só foi observada uma única vez, não mais sendo reproduzido este resultado em diversas tentativas (Fig. 3.12 e 3.13).

Outra dificuldade encontrada nesse sistema foi quanto à transferência das vesículas formadas em meio lamelar para a solução de glicose. Estas se rompem frente às tensões geradas pela alta viscosidade do meio no processo de escoamento para dentro e para fora da pipeta Pasteur, ou frente às diferentes tensões dos meios lamelares e glicose.

7- Conclusão

A afinidade da gliadina com a bicamada de fosfolipídio ficou evidenciada num aumento significativo do módulo elástico (ou constante de curvatura) k_c dos sistemas vesiculares em DOPC, a partir de pequenas concentrações de gliadina, tendendo a uma saturação entre os valores de 2-3% de gliadina/DOPC.

Esta variação no módulo elástico de curvatura reflete mudanças estruturais na bicamada fosfolipídica imposta pela presença da proteína. Sendo a ω -gliadina, a fração predominante nos ensaios gliadina/microvesículas de DOPC, isenta de ligações dissulfeto intermoleculares, o que lhe confere uma maior flexibilidade e considerando-se seu caráter hidrofóbico, supõe-se que ela possa penetrar na região apolar da membrana. Esta situação é supostamente mais provável do que a ancoragem superficial, considerando-se que nesta última ela é preterida pelas outras espécies de gliadina com ligação dissulfeto³⁷. Essa propriedade lhe permitiria a formação de uma rede, conferindo a alta resistência mecânica desses sistemas observada ao microscópio em nosso trabalho, bem acima dos padrões de comportamento da membrana pura.

Esses resultados inéditos apontam para uma possível correlação entre alterações na elasticidade da membrana celular da mucosa intestinal induzidas por gliadina no processo da doença celíaca. No organismo vivo, onde tomam parte respostas imunológicas específicas, estas modificações podem contribuir para as mudanças morfológicas e funcionais nas propriedades da superfície celular. Vale salientar que estes resultados abrangem baixas tensões da membrana, responsáveis apenas pela atenuação das flutuações. Não foi objeto deste trabalho averiguar tensões maiores, responsáveis também pelo estiramento da membrana, avaliado pela constante de elasticidade de estiramento K_A , pois entendemos que no processo inflamatório, os movimentos de flutuação da membrana sejam os primeiros afetados. Podemos supor que esta constante também deva aumentar com a presença da gliadina, uma vez que as pressões atingidas em sua presença alcançaram ordem de grandeza 100 vezes maior que a da membrana na ausência da gliadina, sem, contudo, uma expansão de área desta magnitude.

O estudo da incorporação das fases lamelares no interior das vesículas de fosfolipídios mostrou-se de difícil realização prática, sendo obtida uma única vez ao longo do trabalho desenvolvido nesta Tese. A continuidade deste aspecto do trabalho é, no entanto, de grande valor e interesse, devido a sua importância nas aplicações

farmacológicas, como por exemplo na detecção de tumores cancerosos, liberação seletiva de princípios ativos, etc.

8- Bibliografia

- ¹ Monteiro, A.M.F; Arêas, E.P.G.; Schröder, A.; Fa, N., Colloids Suf. B, 2004, **34**, 53.
- ² Monteiro, A.M.F.; Fa, N.; Arêas, E.P.G.; Schröder, A.; Marques, C., 11thInternational Conference on Surface and Colloid Science, no prelo.
- ³ Sackmann, E., Science, 1996, 271, **5**, 43.
- ⁴ Palaniyar, N; Ridsdale, RA;Holterman, CE; Inchley, K;Possmayer,F; Haraudz,G – J. Structural Biol., 1998, **122**, (3), 297.
- ⁵ Ridsdale, RA; Palaniyar, N; Possmayer,F; Haraudz,G – J. Membrane Biol, 2001; **180** (1) , 21.
- ⁶ Palmblad, M;Gustafsson, M;Curstedt, T; Johansson, J; Schurch,S – Biochim Biophys Acta Biomembranes , 2001; **1510**(1-2), 106.
- ⁷ Hotz, J.;Meier, W., America Chemical Society 1998, **14**, 1031.
- ⁸ Gudi, S.; Nolan, J.P.; Frangos, J.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Medical Sci, 1998, **95**, 2515.
- ⁹ Pramanik, A.; Thyberg, P.; Rigler, R., Chem. Phys. Lipids, 2000, **104** , 35.
- ¹⁰ Magzoub, M.; Kilk, K.; Göran Eriksson, L.E.; Langel, Ü.; Gräslund, A., Biochimica et Biophysica Acta, 2001, **1512**, 77.
- ¹¹ Hianik, T.; Haburcak, M.; Lohner, K.; Prenner,E.; Paltauf, F.; Hermetter, A., Colloids & Surfaces A, 1998, **139**, 189.
- ¹² Rawicz, W.; Olbrich, K.C.; McIntosh,T.; Needham, D.; Evans, E., Biophys J., , 2000, **79**, 328.
- ¹³ Sollid, L.M., Ann.l Rev. Immunology, 2000, **18**, 53.
- ¹⁴ Ciclitira, P.J.; Moodie, J.M., Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2003, **17**, 181.
- ¹⁵ Sollid, L.M., Ann Rev Immunology, 2000, **18**, 53.
- ¹⁶ Marsh, MN; Ensari, A; Moore, CM; Fido,R; Tatham, AS;. Gastroenterology, 1995 **108**, A871.
- ¹⁷ Wieser, H., Acta Paediatrica, 1996, **239**, 3.
- ¹⁸ Skerrit, J.H.; Devery, J.M.; Hill, A.S., Panminerva Medica, 1991, **33**, 65.

-
- ¹⁹ Ensari, A.; Marsh, M.N.; Moriarty, K.J.; Moore, C.M.; Fido, R.J.; Tatham, A.S., *Clinical Science*, 1998, **95**, 419.
- ²⁰ Maruyama, N.; Ichise, K.; Katsube, T.; Kishimoto, T.; Kawase, S.; Matsumura, Y.; Takeuchi, Y.; Swada, T.; Utsumi, S., *Eur.J.Biochem.*, 1998, **255**, 739.
- ²¹ Morita.E.; Matsuo, H.; Mihara, S.; Morimoto, K.; Savage, A.W.J.; Tatham, A.S., *J. Dermatological Sci.*, 2003, **33**, 99.
- ²² Lindsay, M.P.; Skeritt, J.H., *Cereal Chem.*, 2000, **77**, 360.
- ²³ Terreaux, C.; Walk, T.; van de Wal, Y.; Koning, F.; Jung, G.; Fleckenstein, B., *Bioorganic & Medicinal Chem. Letters*, 1998, **8**, 2039.
- ²⁴ Örnebro, J.; Wahlgren, M.; Eliasson, A.-C.; Fido, R.J.; Tatham, A.S., *J.Cereal Sci*, 1999, **30**, 105.
- ²⁵ Waugh, R.; Evans, E.A., *Biophys J.*, 1979, **26**, 115.
- ²⁶ Manneville, J.-B.; Basserreau, P.; Ramaswamy, S.; Post, J., *Phys Rev E*, The American Physical Society, 2001, **64**, 021908.
- ²⁷ Yang, B.-S.; Lal,J.; Richetti, P.; Marques, C.M.; Russel, W.B.; Prud'homme, R.K., *Lungmuir* 2001, **17**, 5834..
- ²⁸ Svetina, S.; Zeks, B.; Waugh, R.E.; Raphael, R.M., *Eur. Biophys. J.*, 1998, **27**, 197.
- ²⁹ Helfrich, W., *Naturforsch*, 1973, **28c**, 693.
- ³⁰ Freyssingeas, E.; Nallet, F.; Roux, D, *Langmuir* 1996, **12**, 6028.
- ³¹ Jonströmer, M.; Strey, R., *J. Phys Chem*, 1992, **96**, 5993.
- ³² Stray, R.; Schomäcker, R.; Roux, D.; Nallet, F.; Olsson, U., *J. Chem., Soc. Faraday Trans.* 1990, **86**, 2253.
- ³³ *Handbook Chemistry and Physics* 65th Ed. (1984/85)
- ³⁴ Hussain, A.; Lukow, O.M., *Cereal Chem*, 1997, **74**, (6), 791.
- ³⁵ Marion, D.S.; Le Roux, C.; Akoka, S.; Tellier, C.; Gallant, D., *J.Cereal Sci*, 1987, **5**, 101.
- ³⁶ Yeagle, P.C., *Biophys. J.*, 1982, **37**, 227.
- ³⁷ Örnebro, J.; Nylander, T.; Eliasson, A.-C, *J Cereal Sci*, 2000, **31**, 195.

IV - Proteínas do glúten – Gliadinas - Composição e Estrutura

1 - Introdução

1.1 – Ocorrência e composição

Proteínas de reserva de cereais envolvem misturas complexas de componentes. Os componentes de uma mistura para uma dada espécie de cereal são freqüentemente similares a outras em composição, estrutura e propriedades. Em certos casos, entretanto, as diferenças podem ser mais significativas, como no caso do trigo e do milho¹. Como a estrutura da proteína é determinante de muitas propriedades funcionais importantes, ela acaba por afetar o uso do cereal². As proteínas podem servir como marcadores na reprodução ou seleção para a melhoria de variedades e podem revelar a origem genética e o inter-relacionamento de cereais.

A farinha de trigo possui aproximadamente 10% de proteínas, dos quais 80% são de glúten, uma pequena quantidade de lipídios, sais minerais, pequenas moléculas de açúcares e vitaminas e o restante de amido³. Portanto, os principais constituintes da farinha de trigo, amido e proteínas, são polímeros⁴.

Quando a farinha de trigo é lavada com solução salina diluída, a parte solúvel, constituída basicamente de amido, é extraída e a massa viscoelástica remanescente é o glúten. O primeiro a fazer registro do isolamento das proteínas do glúten a partir da farinha de trigo foi Beccari⁵ em 1728 na Itália, obtendo 80% de proteínas, 8% de lipídeos e o restante de carboidratos e cinzas. As proteínas encontradas no glúten, cerca de 70% em massa segundo alguns trabalhos^{6,7}, foram classificadas em 1907 por Osborne em dois grandes grupos: monoméricas (gliadinas) e poliméricas (gluteninas). Consistem de sistemas protéicos insolúveis em água, que segundo Hargreaves⁸ e equipe, encontram-se associados através de ligações fracas. Essas proteínas foram chamadas por Mifflin⁹, Shewry¹⁰ e equipes, de *prolaminas*, por possuírem funções de estocagem de C e N e compartilharem seqüências semelhantes de aminoácido.

De uma maneira geral, para as diversas variedades de trigo, a composição do glúten apresenta aproximadamente igual proporção de gliadina e glutenina. A variação qualitativa da gliadina é considerada como insignificante para os efeitos reológicos da

massa alimentar, mas a ela é atribuído o papel de governar a qualidade do uso final, pois a glutenina sozinha não explica as diferenças da qualidade do uso final do trigo^{11,12}.

As gluteninas constituem a fração de prolaminas de alta massa molar, podendo chegar à faixa de 1000 kg/mol, altamente associada por ligações S-S cruzadas intercadeia, heterogênea, ácido-solúvel, que responde pelo componente elástico do glúten. Elas se subdividem em gluteninas de baixo peso molecular (LMW) e de alto peso molecular (HMW).

As gliadinas constituem a fração formada por estruturas protéicas monoméricas, de menor massa molar (na faixa de 30 000 a 80 000 g/mol), solúveis em soluções etanólicas aquosas, que responde primordialmente pelo componente viscoso do glúten. As gliadinas – monômeros associados por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas - são separáveis das gluteninas por sua solubilidade em solução áquo-alcoólica 70%. Para Robertson e equipe o etanol é o solvente com maior poder de solubilização para os componentes do grão do trigo¹³.

De acordo com a sua mobilidade em eletroforese, a baixo pH, as gliadinas são classificadas em α , β , γ e ω -gliadina. Segundo suas propriedades físico-químicas, observadas em estudos mais recentes, elas se dividem, de acordo com a presença de pontes de dissulfeto intramolecular, em ω -gliadina pobre em enxofre e α , β e γ -gliadina ricas em enxofre, segundo a Tab. 4.1.

Tab. 4.1 – Características das proteínas da gliadina

Proteínas	Massa molar (g/mol)	Dimensão (nm) (c)	Ligações dissulfeto
α -gliadina	31 000 ^(a)	11,7 X 3,1	3 ^(d)
β -gliadina	32 000 ^(a)	11,7 X 3,1	3 ^(d)
γ -gliadina	33 000 ^(a)	12,5 X 3,2	4 ^(d)
ω -gliadina	44 000-74 000 ^(b)	15,4 X 3,2	0 ^(e)

(a) Baseado em sequência genética¹; (b) determinações feitas por PAGE-SDS¹; (c) considerando geometria cilíndrica (bastões); determinações feitas por STM¹⁴; (d) determinado por Müller e Wieser^{15,16}; (e) determinado por Tatham e Shewry¹⁷.

Fonte: baseada na Tab. 1 de Örnebro e equipe¹⁸

Na realidade, cada grupo reunido pela característica de mobilidade em eletroforese compõe-se de diversas proteínas diferentes. Análises de sequência de aminoácidos e a sequência de DNA posteriormente confirmaram a existência de três

tipos de grupos estruturais principais: a α , γ e ω -gliadinas. A β -gliadina, neste caso, faria parte do grupo das α -gliadinas¹⁹.

A determinação da composição dessas proteínas é dificultada pelo grande número de diferentes proteínas para cada uma das famílias (vale lembrar ser o trigo hexaplóide). Estima-se de 50 a 150 diferentes genes de α -gliadina em um único cultivar de trigo²⁰. Por exemplo, o cultivar Primavera chinesa apresenta aproximadamente 46 tipos de gliadinas por eletroforese bi-dimensional¹⁹.

1.2 – Procedimentos de separação e caracterização de sub-unidades do glúten

1.2.1 Algumas propriedades gerais de proteínas

Iremos definir alguns termos e conceitos de uso corrente em Bioquímica antes de proceder à descrição dos procedimentos de isolamento protéico efetuados.

Ponto isoelétrico: o ponto isoelétrico de uma proteína é definido como o pH no qual a proteína não possui carga líquida. À medida que o pH se eleva do ponto isoelétrico a carga negativa livre da proteína aumenta. O inverso é verdadeiro para a carga positiva. No ponto isoelétrico, além da interação com água ou outras moléculas carregadas ficar prejudicada, a proteína tende a precipitar.

Denaturação: Refere-se à perda da conformação original (nativa) de uma proteína associada à perda total ou parcial de sua atividade ou função biológica, sem alteração, contudo, da estrutura covalente da molécula.

Coagulação: utiliza-se o termo coagulação para indicar o estágio final da denaturação, onde moléculas de proteínas denaturadas se unem para formar um sistema densamente empacotado, com energia correspondente ao mínimo termodinâmico de energia, caracterizando, portanto, um estado de caráter irreversível. A coagulação pode ser provocada por fatores como elevação de temperatura, tensão mecânica, mudanças de pH e de concentração de eletrólitos no meio.

Degradação: diferentemente da denaturação, na degradação a molécula sofre uma quebra da ligação peptídica (hidrólise), por ação de aquecimento, de alterações de pH ou de enzimas proteolíticas.

Valor Biológico: o conceito de valor biológico de uma proteína está relacionado à ocorrência de aminoácidos ditos essenciais em sua estrutura. Aminoácidos essenciais são definidos como aqueles que devem ser obtidos de fontes exógenas (alimentação), pois não podem ser sintetizados. Para seres humanos os aminoácidos essenciais são: *fenilalanina*, *valina*, *treonina*, *triptofano*, *isoleucina*, *metionina*, leucina, *lisina*, *histidina* e *arginina* (este último apenas na fase de crescimento infantil). Como regra geral, as proteínas animais são tidas como superiores às proteínas vegetais, em termos nutricionais, por possuírem os aminoácidos essenciais em quantidade e proporção adequadas, enquanto que nas fontes de proteínas vegetais pode faltar um ou mais destes aminoácidos. Contudo, algumas proteínas vegetais possuem um alto valor biológico, como glutenina do milho e glicinina da soja.

1.2.2 Isolamento das frações do glúten.

A baixa resolução da maior parte das separações das prolaminas deve-se em geral à sua complexidade e similaridade estrutural – possuem ancestral comum e são codificadas por “clusters” de gens²¹. Esta semelhança é também responsável pelo alto número de reações imunológicas cruzadas, tornando difícil sua purificação mesmo pelos métodos imunoquímicos. Elas têm propriedades de extração fora dos padrões normais e tendência considerável para agregação²². Também a forte interação lipídio-proteína contribui para a maior dificuldade na extração dos fosfolípidios do glúten²³.

Os métodos mais usuais para o isolamento e caracterização de proteínas de cereais são: extração por solventes, cromatografia e eletroforese.

Para o glúten, dos métodos eletroforéticos [de limites móveis, de gel de amido (SGE), de gel de poliacrilamida (PAGE) e PAGE em pH ácido (A-PAGE), de gel de poliacrilamida–dodecil sulfato de sódio(SDS-PAGE), eletroforese capilar (método analítico), focalização isoeletrica (IEF) e bidimensional], esta última apresentou os melhores resultados, sendo uma das melhores combinações a eletroforese bidimensional combinada de IEF (separação por carga) com o SDS-PAGE (separação por tamanho)²⁴. Wrigley^{25,26} associou a este, IEF e SGE para separar albuminas e gliadinas.

Dentre os métodos cromatográficos, o de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (FR-CLAE) apresentou o melhor desempenho^{22,27}, menos efetivo apenas em relação ao PAGE bidimensional (método eletroforético). Outros métodos cromatográficos para isolamento das proteínas do glúten incluem o de interação hidrofóbica (HIC), a líquida de alta eficiência (CLAE), líquida de exclusão molecular de

alta eficiência (EM-CLAE) e líquida de troca iônica de alta eficiência (TI-CLAE). Desenvolvimentos recentes têm apontado novos métodos de determinação quantitativa para as proteínas do glúten, como o de turbidimetria²⁸.

A extração das proteínas do trigo, método preparativo, é um procedimento de manipulação simples. Segundo Bietz²⁴, Osborne já demonstrara em sua época (início do século XX) que sucessivas extrações, com diferentes solventes, separam proteínas de quatro grupos distintos (Tab. 4.2):

Tab. 4.2 – Classes das proteínas da farinha de trigo

Classe	Conformação genérica	Extração com solvente
Albuminas e Globulinas		Solução Salina
Gliadinas		Solução Alcoólica 70%
Gluteninas		Solução de Acido Acético 1%
Resíduos		Agente Redutor ou Álcali

Fonte: Bietz²⁴

Uma separação posterior de subclasses de proteínas pode ser executada, através da seleção e adição de outros solventes.

Em seus experimentos utilizando planta de extração piloto, Bérot⁷ e equipe constataram que a seletividade nas separações dos diversos componentes do glúten é limitada porque as gliadinas e as gluteninas de média massa molar têm solubilidades similares em soluções ácidas, de tal modo que não será qualquer processo que irá separá-las. Esta partição da proteína entre as frações solúvel e não solúvel é extremamente dependente do pH da fração não solúvel, o qual depende da molaridade da solução ácida e da relação de massa solvente/glúten. Para o sistema de Bérot, as condições ideais foram 0,01M de ácido acético e relação mássica solvente/glúten de 16.

A extração das frações de glutenina por solução hidro-alcoólica somente se verifica após a quebra das ligações dissulfeto²⁹. Adição de agentes redutores leva à redução da massa molar, pela quebra das ligações dissulfeto e conseqüente formação da ligação SH, com uma acentuada diminuição da viscosidade intrínseca³⁰.

No presente estudo não se efetuou a extração a partir do glúten por se ter partido de amostra de gliadina comercial (dados do produto encontram-se na seção de Metodologia do capítulo II). Os procedimentos no presente trabalho visaram a separação das sub-unidades da gliadina, através de procedimentos preparativos descritos a seguir.

1.2.3 – Sub-fracionamento das gliadinas

Os fundamentos da técnica cromatográfica FPLC (Fast Polymer Liquid Chromatography), empregada no isolamento das sub-frações de gliadina, estão apresentados a seguir (item 1.2.1). As técnicas utilizadas na identificação qualitativa e na quantificação dos aminoácidos presentes nas amostras de gliadina empregadas nos estudos das interações gliadina/microvesículas de fosfolipídio encontram-se descritas em seus aspectos básicos no item 2.1.

1.2.3.1 – Cromatografia por FPLC

A cromatografia constitui usualmente etapa seguinte à extração por solvente durante os procedimentos de isolamento e purificação de proteínas de cereais. A cromatografia, em suas várias modalidades, utiliza critérios diversos para separação de componentes, entre eles: tamanho de molécula, carga, partição entre as fases fluidas, adsorção e outras interações específicas.

Fig. 4. 1 – Colunas cromatográficas: por filtração a gel (esq.) e por troca iônica (dir)³¹

A técnica cromatográfica mais versátil é a de filtração em gel, que seleciona a proteína pelo tamanho e forma da molécula. A permeação se dá através de uma fase gel estacionária, que funciona como uma “peneira” molecular. Moléculas grandes demais para atravessar os poros são excluídas do volume do solvente que se encontra dentro das “esferas” (poros) do gel e atravessam a matriz da coluna sem penetrar nos poros, sendo assim facilmente lixiviadas ou eluídas da coluna, enquanto as menores são retidas pela matriz porosa. Desse modo, a travessia ocorre para as moléculas maiores de modo mais rápido do que para as menores, as quais atravessam os poros do gel e tem em consequência sua trajetória retardada.

A melhor separação observada se obtém pelo uso de HPLC de fase reversa, porém com pequena quantidade de proteína recuperada. O FPLC é uma alternativa ao HPLC, com quantidades recuperadas expressivamente maiores, constituindo-se, portanto, em técnica apropriada a finalidades preparativas.

Através da filtração em gel, pode-se separar o grupo das α -, β -, γ -gliadinas das ω -gliadinas. A cromatografia de filtração em gel é bastante apropriada para o isolamento de proteínas de cereais à temperatura ambiente. A tecnologia atual tem obtido géis filtrantes com propriedades físicas e químicas estáveis e bem definidas, proporcionando resultados com boa resolução.

Um segundo tipo de coluna cromatográfica – de troca iônica – à direita na Fig. 4.1, propicia a purificação das α -, β -, γ -gliadinas e também a purificação do grupo das ω -gliadinas. Essa coluna permite a separação dos componentes de uma mistura pela afinidade iônica que estes possuam pelo material da fase estacionária.

Embora a cromatografia por FPLC seja bem conhecida, não são encontrados na literatura muitos trabalhos envolvendo esta técnica e proteínas do glúten.

1.2.3.2 - Teste da ninidrina

O teste de Kaiser^{32,33} é um método simples e rápido para a determinação de grupos amino livres de aminoácidos, peptídeos e proteínas. Devido à sua alta sensibilidade, ele tem sido extensivamente aplicado no monitoramento da síntese de peptídeos. No presente trabalho, ele foi empregado na identificação dos aminoácidos de amostras etanólicas de gliadina, as quais foram empregadas em ensaios envolvendo esta proteína e vesículas. O teste se baseia na reação controlada dos grupamentos amino livres dos aminoácidos com a ninidrina, resultando em cromóforos. As aminas primárias dos aminoácidos desenvolvem cromóforos de cor púrpura, e, portanto, sua concentração em solução pode ser determinada colorimetricamente a 570nm. Já a amina secundária da prolina reage com a ninidrina formando um cromóforo amarelo e a sua concentração pode ser determinada a 440nm. Para a faixa de utilização do teste entre 0,005-1 μ mol a precisão dos resultados é de $\pm$ 3%. O limite inferior de sensibilidade é abaixo de 0,001 μ mol de amina. O teste pode ser quantitativo se utilizada uma curva-padrão construída a partir de aminoácidos de concentrações conhecidas.

2 – Características estruturais e comportamento físico-químico das proteínas do glúten

As proteínas do glúten apresentam-se como estruturas não globulares e altamente associadas em seu estado original no grão^{34,35}, coexistindo como formas monoméricas e poliméricas (resultantes de ligações intercadeias) e constituindo complexos sistemas supramoleculares. O interesse no estudo dessa categoria de proteínas refere-se ao fato de se tratar de sistemas macromoleculares com propriedades viscoelásticas marcantes, às quais se deve a relevância biotecnológica do glúten. Aspectos de sua estruturação tridimensional, no entanto, são ainda muito pouco compreendidos.

A composição complexa, o alto grau de seqüências homólogas entre as diferentes proteínas do glúten e a conseqüente dificuldade de se obter suas frações puras têm sido apontadas como as principais razões para as dificuldades no desenvolvimento de estudos sobre suas propriedades físico-químicas, funcionais, caracterização imunoquímica, seqüência de aminoácidos, etc^{18,22}. Alia-se a isto a sua baixa solubilidade em água e a dependência complexa da conformação molecular em função do meio.

Sabe-se que, de um modo geral, o meio é capaz de afetar aspectos estruturais e dinâmicos de sistemas em solução. A extensão com que essas influências se manifestam depende das características particulares de cada sistema e do tipo de influência a que ele esteja sujeito. A resposta macromolecular ao meio reflete aspectos de sua organização interna, tais como eventos de auto-associação e orientação molecular. Por exemplo, as gliadinas constituem sistemas tipicamente insolúveis em água capazes, entretanto, de incorporação de grandes quantidades desse líquido, gerando massas viscoelásticas com propriedades incomuns. A estrutura primária de algumas dessas frações inclui motivos repetitivos de seqüência, que se encontram aparentemente relacionados a peculiaridades de enovelamento³⁶.

No que se refere a proteínas de um modo geral, questões ligadas a seu enovelamento ou ‘folding’ constituem hoje uma grande questão teórico-experimental na área biológica³⁷. Ainda não são suficientemente conhecidos e descritos, sob o ponto de vista físico-químico, os fatores que levam uma proteína a enovelar-se até atingir seu estado nativo conformacional estável. Trata-se de um processo complexo, que envolve tanto aspectos inerentes à estrutura covalente da macromolécula como influências do meio, estas últimas em particular ainda muito insuficientemente compreendidas. Da obtenção desse conhecimento depende a ampliação do entendimento da dinâmica de diversos processos em que estão envolvidas essas biomacromoléculas.

Diversos estudos têm se dedicado à compreensão dos fenômenos de interface entre filmes dessas proteínas com diversos meios. As experiências têm demonstrado que as propriedades das camadas de proteínas formadas na interface ar-água são afetadas pelo seu grau de desenovelamento, podendo levar à ocorrência de interações como formação de ligações dissulfeto¹⁸. De fato, segundo observações experimentais de Lundh e equipe³⁸, as altas concentrações de proteínas do glúten desenoveladas nas interfaces ar-água favorecem o aparecimento de ligações de dissulfeto intermolecular, que também podem aumentar com o aumento da temperatura, segundo experimentos de Eliasson e Silverio³⁹. Dentro de certa extensão, a proteína modifica a sua estrutura em

um dado meio, buscando sua estabilidade no mínimo de energia livre. Este comportamento pode expor ou proteger grupamentos hidrofílicos ou hidrofóbicos, ácidos ou básicos, da molécula, facilitando interações intermoleculares com o meio presente⁴. Tais interações vão depender de aspectos como carga da molécula, pH e força iônica do meio. As questões fundamentais envolvendo estabilidade de dispersões de proteínas estão inseridas no contexto de estabilidade coloidal, a qual encontra-se bem desenvolvida na teoria DLVO (ou Teoria da Estabilidade de Colóides Liofóbicos), adiante exposta de forma resumida.

Ao contrário do meio aquoso, em certos meios orgânicos observamos que sistemas de proteínas, como aquelas estudadas neste trabalho, são capazes de gerar fluidos homogêneos⁴⁰ que sofrem transição sol-gel, originando redes transientes frágeis, se comparadas aos sistemas gerados na presença de água incorporada⁴¹.

2.1 – Fracionamento, composição e seqüência de aminoácidos das proteínas do glúten do trigo

Charbonnier⁴² observou que o conteúdo da primeira fração obtida por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G100) da fração etanólica (etanol 55%) extraída de farinha de trigo não desengordurada mostrava-se dependente da interação lípide-proteína e era composto por 40% de gliadina ω e algumas outras proteínas álcool-solúveis. Quando a farinha de trigo era desengordurada, a porcentagem dessa fração caía para 29% e as demais permaneciam praticamente constantes. A segunda fração obtida da cromatografia era constituída somente por gliadina e a terceira e a quarta eram constituídas de albumina. Charbonier também utilizou a técnica de cromatografia de troca iônica com SE-Sephadex C-50, caracterizou os aminoácidos das proteínas álcool-solúvel (PAS) da primeira fração da farinha de trigo não desengordurada e obteve principalmente gluteninas de baixo peso molecular e ω -gliadinas. A análise dos aminoácidos desta fração evidenciou composição semelhante à das α -gliadinas (em sua maioria) e das albuminas. Os resultados são apresentados na Tab. 4.3.

Está claro que o seqüenciamento dos aminoácidos na cadeia polipeptídica seria essencial para uma melhor compreensão das características de cada família de proteínas e até serviria para uma melhor reclassificação: sabe-se que várias α -, β -, e γ -gliadinas possuem seqüências praticamente idênticas (Tab. 4.4), enquanto que as γ_1 , γ_2 e γ_3 que possuem mobilidade semelhantes, diferem significativamente em suas seqüências²⁴.

Tab. 4.3 - Composição dos aminoácidos, em número de resíduos por 1000 das sub-frações de gliadina ⁴².

Aminoácidos	PAS *	ω	γ	β	β'	β1	α1
Asx - D/N	28	6	22	25	29	29	35
Thr - T	26	13	21	20	21	23	32
Ser - S	58	39	51	54	54	57	74
Glx - G	344	515	396	374	382	370	317
Pro -P	148	212	163	175	162	149	129
Gly - G	41	18	31	33	30	31	51
Ala - A	36	9	34	32	33	38	45
Cys - C	29	1	21	24	29	24	31
Val - V	47	6	44	45	49	49	42
Met - M	14	1	12	6	8	13	13
Ile - I	40	30	42	42	44	43	34
Leu - L	71	32	67	70	72	70	75
Tyr - Y	24	11	16	15	14	22	24
Phe - F	42	82	46	54	43	39	36
Lys - K	10	5	5	5	4	5	14
His - H	17	8	14	11	10	17	18
Arg - R	26	12	15	14	15	19	30
Total básicos	53	25	34	30	29	41	62

- PAS: proteínas álcool-solúveis

Tab. 4.4 – Sequência de aminoácidos amino-terminais de gliadinas e gluteninas solúveis em etanol

Proteína	Resíduos														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
α8, β5, γ1-gliadina	Val	Arg	Val	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Pro	Gln	Asn	Pro	Ser	Gln
γ3-gliadina*	Asn	Met	Gly	Val	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Val	Gln	Trp	Val	Pro	Gln
	Pro		Gln	Gln	Val	Gln	Gln					Leu	Pro	Gln	
Gliadina HMW reduzida*	Asn	His	Ile	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Pro	Gln	Gln		Pro		Leu
										Val					Gln
Glutenina reduzida solúvel em etanol*	Asn	His	Ile	Pro	Val	Leu	Gln	Gly	Pro	Gln	Gln		Gln		Leu
	Glu				Gly	Pro							Pro		

Fonte: Bietz ²⁴

* as 2as. linhas mostram variações de aminoácidos na mesma posição da cadeia polipeptídica

Pela diferença na composição de aminoácidos de três frações obtidas por RP-HPLC e SDS-PAGE, Khan e equipe puderam analisar as razões para o melhor desempenho observado para um dado cultivar do trigo (ND 643), entre quatro cultivares estudados ⁴³, quanto às propriedades reológicas no processo de panificação.

Dentre as gliadinas que apresentam enxofre em sua estrutura, a α - e β - gliadinas possuem 3 ligações dissulfeto, enquanto a γ -gliadina possui 4 . O domínio N-terminal tem seqüências repetitivas ricas em glutamina e prolina e o domínio C-terminal tem caráter não repetitivo, apresentando resíduos de cisteína e a maior parte dos resíduos carregados. O domínio repetitivo da γ -gliadina, rico em voltas β , pode formar estruturas estendidas, enquanto o domínio não repetitivo é rico em estruturas helicoidais¹⁹ . A α -gliadina difere da γ -gliadina sobretudo por apresentar uma distribuição irregular de voltas β ¹⁹.

A gliadina ω , a sub-fração monomérica não associada por ligações dissulfeto, apresenta uma composição incomum de aminoácidos, basicamente constituída de quatro tipos de resíduos, assim representados: 40 a 53% de glutamina + glutamato, 20 a 31% de prolina, 7 a 9 % de fenilalanina e 4% de leucina. Esses resíduos ocorrem numa forma peculiar na molécula, formando um motivo repetitivo ao longo da proteína, representado pela seguinte seqüência octapeptídica: Pro-Gln-Gln-Pro-Phe-Pro-Gln-Gln. Os resíduos de glutamina representam importante papel no comportamento dinâmico da proteína, devido ao fato de conterem um grupamento amídico em sua cadeia lateral, o qual se associa extensivamente, por interações fracas, na proteína seca do grão. Ao se hidratar a semente, ou a proteína isolada, regiões de alta mobilidade de cadeia⁴⁴ são formadas por se romper tais ligações pela água presente.

Em relação aos aminoácidos, as gliadinas são muito similares entre si, possuindo alto teor de aminoácidos ácidos, como ácido glutâmico⁴⁵, e baixo para os básicos, como a lisina. Também apresentam alta concentração de prolina, que possui estrutura cíclica e ligação peptídica não flexível. Pequenas diferenças, como permuta, inserção ou ausência de alguns poucos aminoácidos são observadas entre as cadeias.

2.2 – Comportamento em solução das proteínas de cereais

As proteínas de cereais apresentam diferenças marcantes de comportamento frente à solubilidade. Nesse aspecto, grupos distintos podem ser reconhecidos, a saber, albuminas, globulinas, gliadinas, gluteninas e resíduos de proteínas. As prolaminas – proteínas de reserva do glúten do trigo, que representam 50% das proteínas totais da semente⁴⁶ – são proteínas de caráter heterogêneo, com forte tendência associativa e solubilidades incomuns, o que acarreta uma maior dificuldade na fase de isolamento e caracterização. Por esta razão, as frações obtidas são freqüentemente contaminadas com proteínas de outras classes mascarando os resultados posteriores²⁴.

O glúten é composto por agregados insolúveis em água incluindo proteínas e lipídeos, que interagem em sistemas polifásicos proteína-proteína, lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína⁴⁷. Aspectos de sua interação com a água são relevantes, uma vez que ela constitui o meio dispersante e plastificante por excelência em sistemas biológicos e em sistemas de alimentos. Grande parte das propriedades funcionais desses sistemas biocoloidais⁴⁸ é definida a partir das interações de proteínas e outras macromoléculas, como polissacarídeos, entre si, com a água, e com outras espécies relevantes no meio biológico, como lípidos.

Além das interações intermoleculares acima mencionadas, a composição de aminoácidos incomum e as peculiaridades ligadas à ocorrência de motivos repetitivos de sequência em sua estrutura tornam o comportamento das proteínas do glúten frente à solubilidade em meio aquoso pouco trivial. Quando se aborda a questão da solubilidade de proteínas, vale lembrar que esses compostos contêm uma mistura de cadeias laterais de aminoácidos polares (ionizáveis ou neutros) e não-polares. Os aminoácidos apolares tendem a se concentrar no interior das proteínas solúveis em água, enquanto que os polares permanecem na superfície⁴⁹. Os aminoácidos apolares são os responsáveis por sua insolubilidade neste solvente. Esta insolubilidade não é devido a uma interação entálpica desfavorável, mas devido a uma variação entrópica negativa: quando uma molécula de hidrocarboneto é introduzida em água, as ligações de hidrogênio das moléculas de água adjacentes ao hidrocarboneto são quebradas e são re-agrupadas de forma mais ordenada⁴.

Numerosos são os estudos dedicados à investigação de aspectos de solubilidade do glúten. Em 1907, Osborne já registrava o aprimoramento de um método de 1896 de Fleurent para solubilizar as proteínas do trigo, agrupando-as em três classes diferentes na dependência de sua solubilidade nos solventes: água, para albuminas; solução de NaCl, para globulinas e álcool, para gliadinas (segundo Nicolas⁶). Com objetivo de conhecer a extratibilidade desses sistemas, Huebner estudou em 1971 a solvatação das proteínas do glúten em solução de LiCl⁵⁰, um sal caotrópico, e Charbonnier⁴² propôs um sistema de solventes para solubilizar as proteínas da farinha de trigo: etanol-éter-água na proporção 2-2-1.

2.2.1 – Dispersões de proteínas: aspectos termodinâmicos^{51,52,53}

Como discutido anteriormente, um dos problemas do estudo das proteínas do glúten é a sua dificuldade de solubilização, o que se torna em certos casos um pré-requisito para sua purificação e caracterização.

A condição para que haja dispersão de um soluto em um determinado solvente, pelas leis fundamentais da termodinâmica, é que a energia livre da dissolução seja inferior à do sistema não disperso⁴.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{eq. 4.1})$$

onde: ΔG = variação da energia livre de Gibbs (J/mol); ΔH = variação da entalpia (J/mol); T = temperatura (K); ΔS = variação de entropia (J.mol⁻¹K⁻¹).

A variação de entalpia para soluções ideais é nula ($\Delta H=0$). A liberação de calor ($\Delta H<0$) para o meio está correlacionada à ocorrência de interações fortes entre as espécies interagentes, o que pode ser percebido pelo aumento da temperatura do recipiente onde o sistema se encontra, com uma conseqüente diminuição da energia térmica do sistema. Por outro lado, uma variação positiva de entalpia ($\Delta H>0$) corresponde a evento de solubilização com consumo de energia do meio, o que se dá quando as interações entre os componentes do sistema são relativamente menos favoráveis. A variação da entropia reflete o grau de desordem do sistema, o que, para os sistemas em questão, pode ser conseqüência de mudanças na conformação espacial das moléculas de proteína e/ou de sua distribuição no meio em decorrência de sua dispersão no meio.

A variação molar da energia-livre constitui o potencial químico, μ , o qual, para soluções ideais (diluídas) é expressa como:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln C_i \quad (\text{eq. 4.2})$$

onde C_i é a concentração da espécie i , μ_i , o seu potencial químico e μ_i^0 , o potencial químico de referência (correspondente a uma concentração arbitrária do soluto, no caso de uma solução); T e R , a temperatura absoluta e a constante dos gases, respectivamente.

A condição de não-idealidade pode ser indicada formalmente na equação do potencial químico, introduzindo-se um coeficiente de atividade, γ . Assim,

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln C_i \gamma_i \quad (\text{eq. 4.3})$$

onde γ_i é uma função de T , de P e de todas as concentrações do soluto. A condição de idealidade é em geral atingida quando C_i tende a zero: $\lim_{C \rightarrow 0} \gamma_i = 1$

As considerações acima dizem respeito a soluções quaisquer, porém ao se tratar de sistemas em solução contendo macromoléculas, como as estudadas aqui, a situação se torna mais complexa. Macromoléculas têm grandes tamanhos, podem interagir fortemente entre si e com o solvente, além do que muitas vezes mostram-se eletricamente carregadas. Essas fontes extras de não idealidade são relevantes e devem ser levadas em conta.

As bases termodinâmicas desses efeitos podem ser entrópicas, como no caso do efeito de volume excluído, o qual decorre do grande tamanho das macromoléculas e da impossibilidade de interpenetração dos espaços ocupados; ou entálpicas, como as interações intermoleculares em sistemas de macromoléculas dispersas em solventes fracos ou que são atraídas umas pelas outras em função de suas cargas.

É definida uma temperatura ideal, temperatura θ , na qual esses dois efeitos, entrópico e entálpico, se cancelam, e a solução passa a se comportar idealmente. São chamados, analogamente, de solventes θ , aqueles capazes de promover essa mesma condição em uma dispersão macromolecular.

Grande parte dos estudos apresentados nesta Tese envolveu sistemas em regime concentrado, portanto, sistemas nos quais tais efeitos não podem ser ignorados. Nesses regimes de alta concentração, espera-se que os coeficientes de atividade devam ser anormalmente distantes de 1,0 para que as dispersões possam ser adequadamente descritas. Isso exige na verdade uma visão termodinâmica distinta daquela com a qual sistemas mais simples são usualmente tratados. Nessas soluções concentradas, as cadeias polipeptídicas expandidas e em contato extensivo com o solvente perdem sua identidade e o poder de serem distinguidas entre si, devido à extensiva interpenetração das cadeias.

Embora originalmente desenvolvida para descrever a termodinâmica de soluções de polímeros (não particularmente proteínas), a teoria de Flory-Huggins aplica-se a sistemas poliméricos cuja conformação possa ser representada por um modelo de rede em que segmentos monoméricos da macromolécula e do solvente são distribuídos

aleatoriamente. Segundo Flory, em um sistema macromolécula-solvente, a energia-livre é expressa por⁵⁴:

$$G_m = RT[(n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2) + \chi \phi_1 \phi_2 (n_1 + m n_2)] \quad (\text{eq. 4.4})$$

sendo n_1 e n_2 os números de moles do solvente e soluto, respectivamente, ϕ_1 e ϕ_2 a fração dos volumes de solvente e polímero, respectivamente, χ parâmetro de interação de Flory-Huggins, que mede a interação de um dado polímero em um dado solvente, $m = V_2/V_1$ fração de volume molar entre polímero-solvente. O parâmetro de Flory é uma medida da energia de interação por molécula de solvente dividida por kT . Apresenta valores relativamente baixos para bons solventes e altos para solventes pobres. Um valor de $\chi = 1/2$ corresponde às condições de idealidade, igualmente promovidas pela temperatura θ (em que as contribuições entálpicas e entrópicas se igualam), anteriormente citada.

Cécile Duclairoir^{55,56}, em trabalhos sobre nanopartículas de gliadina, aplicou os fundamentos da teoria de Flory, utilizando métodos de espalhamento de luz e de nêutrons para avaliar o parâmetro χ . Nas considerações sobre solubilização da proteína, ela emprega o parâmetro de Hildebrand, δ , que guarda relação com o parâmetro de Flory, conforme a expressão:

$$\chi_{AB} = V_m (\delta_A - \delta_B)^2 / RT \quad (\text{eq. 4.5})$$

em que V_m é o volume molar. As expressões são propostas para misturas endotérmicas simples, levando em consideração as diferenças globais de energia de interação, independentemente de suas origens. O parâmetro de Hildebrand está relacionado à densidade de energia coesiva, i.e., a energia necessária para a separação de duas moléculas em um dado volume no estado líquido. A grandeza encontra-se naturalmente relacionada à entalpia de vaporização.

A expressão para a variação da entalpia de uma mistura de dois componentes encontra-se relacionada aos parâmetros de solubilidade de Hildebrand de acordo com a expressão:

$$\Delta^M H = V \cdot \phi_1 \cdot \phi_2 (\delta_1 - \delta_2)^2 \quad (\text{Eq. 4.6})$$

em que ϕ_i são as frações de volume de cada uma das duas espécies da mistura e V , o volume total da suspensão. Para que os compostos sejam miscíveis é necessário que o

valor de $\Delta^M H$ na expressão acima tenda a zero, ou seja, os valores de δ_1 e δ_2 deverão ser próximos um do outro. Como nem sempre se encontra um solvente que atenda a essa condição, é possível obterem-se misturas de solvente que tenham valores próximos do valor do δ desejado, utilizando-se misturas de solventes segundo a equação:

$$\delta_{AB} = \phi_A \cdot \delta_A + \phi_B \cdot \delta_B \quad (\text{eq. 4.7})$$

2.2.2.- Estabilidade coloidal e a teoria DLVO

A teoria DLVO será aqui muito brevemente mencionada. Esta teoria deriva seu nome das iniciais dos nomes de seus autores (Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek), componentes de duas equipes que desenvolveram de forma independente as bases de uma mesma teoria.^{57,58} Essa teoria descreve as condições de estabilidade de sistemas coloidais de sólidos hidrófobos.

Os sistemas estudados nesta Tese são sistemas macromoleculares protéicos com apreciável afinidade pelo meio dispersante, não podendo desse modo ser exatamente classificados na categoria de sólidos liófilos. Na verdade o que em geral se observa em sistemas biomacromoleculares estudados em química coloidal é o contrário disto: são sistemas que constituem sólidos liófilos em razão da dispersão ocorrer em geral em meio aquoso. Em nosso caso, estamos tratando de sistemas macromoleculares de considerável caráter hidrofóbico, dispersos em meios orgânicos ou aquo-orgânicos. Interações de caráter predominantemente líofilo estão envolvidas. De fato, a afinidade desses sistemas por seus meios solventes é apreciável, envolvendo aspectos distintos como intumescimento e transições sol-gel, por sua vez decorrentes de aspectos de microestrutura das redes espaciais formadas. Tais características tornam o contexto do presente estudo muito mais afim com o tratamento desenvolvido por Flory para sistemas poliméricos, descrito em maior detalhe no item 2.2.1.

A exposição de alguns aspectos da teoria DLVO pode, no entanto, ser de interesse para a apreciação de questões relativas a estabilidade em sistemas correlacionados. Ela baseia-se no reconhecimento da existência de duas forças em qualquer sol eletrostaticamente estabilizado: a repulsão eletrostática que impede a agregação e a força atrativa universal que atua de modo a ligar as partículas quando elas se aproximam suficientemente^{59,60}.

A força atrativa que ocorre entre quaisquer duas partículas do mesmo material quando imersas em um meio solvente é chamada força de van der Waals de longo alcance. Essa força tem sua origem naquelas mesmas forças que atuam entre átomos e moléculas e que levam à condensação de um gás em líquido, a saber, as forças de dispersão de London. No caso de partículas coloidais, essas forças são tratadas como sendo aproximadamente aditivas, de modo que para se calcular a interação entre duas partículas, são computadas as várias interações entre os átomos de cada uma delas. O resultado é uma força que tem um alcance muito maior do que aquele entre os átomos ou moléculas individualmente tratados. Essa força decresce com o inverso do quadrado da distância de separação entre as partículas e tem um alcance que atinge distâncias da ordem do tamanho da partícula.

A força de repulsão é de natureza eletrostática e resulta da superposição das duplas camadas elétricas das partículas consideradas.

Em uma primeira aproximação, o potencial de interação de van der Waals é praticamente insensível a variações nas concentrações de eletrólitos e de pH, podendo ser considerado constante. A atração de van der Waals deve sempre exceder a repulsão da dupla camada elétrica em distâncias suficientemente pequenas, uma vez que ela segue uma lei de potências, isto é, $W \propto -1/D^n$, onde D é a distância entre as partículas e W é a força de van der Waals; enquanto isso, a energia de interação da dupla camada mantém-se finita ou aumenta muito mais lentamente à medida que $D \rightarrow 0$.

Diferentes perfis de curvas potenciais de interação poderão ocorrer entre duas superfícies de partículas coloidais sob a ação dessas duas forças combinadas. Essas curvas apresentarão sempre um mínimo primário de energia, que nem sempre, no entanto será alcançado, caso exista uma barreira energética suficientemente grande a ser vencida. Esse é o caso que usualmente ocorre para sistemas com altas concentrações de eletrólitos. Nesses casos, na impossibilidade de atingirem a condição termodinamicamente mais favorável do mínimo primário, as partículas ou permanecem dispersas na solução ou ficam retidas em um mínimo secundário de energia, em uma situação referida usualmente como cineticamente estável.

Se a densidade de cargas ou o potencial do colóide for baixo, a barreira de energia será necessariamente menor. Essa condição propicia agregação, também conhecida nesse caso como coagulação. Se a concentração do colóide for muito alta, excedendo um limite conhecido por concentração de coagulação crítica, a barreira

energética cai abaixo de zero e o sistema então coagula muito rapidamente. É a situação de instabilidade do colóide.

Conforme a carga de superfície ou o potencial se aproxima de zero a curva potencial se aproxima da curva de van der Waals pura (somente atração) e as duas superfícies passam então a se atrair fortemente qualquer que seja a distância de separação entre elas.

Esses eventos são descritos quantitativamente pela teoria DLVO já mencionada.^{57,58} Os autores calcularam teoricamente as interações envolvidas em duas situações hipotéticas, a primeira considerando duas placas paralelas de área e espessura infinitas e a segunda considerando duas esferas carregadas. Essas condições tratadas são bons modelos para o estudo de estabilidade em sistemas coloidais como filmes finos de detergente, no primeiro caso e dispersões, no segundo, sendo observada boa concordância entre os modelos e as medidas experimentais⁶⁰.

Nesta Tese, iremos nos limitar apenas a essa visão qualitativa da teoria DLVO. Além dos artigos originais já referidos,^{57,58} apresentações comentadas da mesma com algum tratamento quantitativo de maior ou menor extensão podem ser encontradas em diversos livros-texto da área coloidal, entre os quais indicamos alguns^{59,60,61,62}.

2.2.3 - Hidrofobicidade

Alguns parâmetros comparativos que medem a polaridade ou hidrofobicidade de proteínas baseados na composição de aminoácidos tem sido propostos na literatura. Um deles é chamado de *freqüência de cadeia lateral não-polar* (NPS). Ele é definido como o número dos resíduos de aminoácidos não-polares (*triptofano, isoleucina, tirosina, fenilalanina, prolina, leucina e metionina*) dividido pelo número total de resíduos. A idéia é de que a hidrofobicidade da molécula determine parcialmente a estrutura da proteína. Para as proteínas do glúten, o NPS da gliadina é de 0,39 contra 0,34 para a glutenina.

Similarmente, o parâmetro *freqüência de grupo carregado* (CHF), definido como a razão do número de resíduos polares ionizáveis (*ácidos aspártico e glutâmico, histidina, lisina e arginina*) pelo número total de resíduos, mede a capacidade da proteína interagir com a água. Para as proteínas do glúten o CHF da gliadina é de 0,08 contra 0,13 para a glutenina, bem abaixo das proteínas mais comuns (Tab. 4.5).

A relação CHF/NPS nos dá uma noção do quão hidrofóbicas são as proteínas do glúten frente às demais proteínas, em função do baixo número de resíduos ionizáveis. Esta alta hidrofobicidade da gliadina é confirmada pelos resultados do estudo de Popineau e Godon⁶³, utilizando cromatografia de interação hidrofóbica, em comparação com o solvente heptano. Neste estudo eles constatarem ser a gliadina uma das mais hidrofóbicas proteínas já pesquisadas. Inúmeras tentativas para a melhoria da solubilidade vêm sendo feitas usando diferentes procedimentos de modificação da estrutura da proteína, como proteólise, tratamento alcalino, succinilação e ligações cruzadas⁶³.

Tab. 4.5 - Capacidade de solubilização de Proteínas⁴

Proteína	NPS*	CHF**
Gliadina	0,39	0,08
Glutenina	0,34	0,13
Mioglobina	0,32	0,34
Hemoglobina	0,35	0,27
Ovoalbumina	0,34	0,24

*frequência de cadeia lateral não-polar; ** frequência de grupo carregado

Segundo Popineau e Godon⁶³, em 1964, Fisher definiu o parâmetro *polaridade* (p) = volume dos resíduos polares/volume dos resíduos não-polares, buscando correlacionar este parâmetro com a massa molar e a forma mais provável da molécula.

Em 1967, Bigelow introduziu, como uma estimativa mais precisa que o NPS, o conceito da *hidrofobicidade média* $HO_{méd}$, definido como hidrofobicidade total dos aminoácidos das cadeias laterais/nº total de resíduos, dado em calorias. Para cada aminoácido era atribuído o valor da energia necessária para solubilizá-lo em etanol, como o valor de sua hidrofobicidade.

Como as prolaminas são proteínas não globulares, elas possuem grande área específica total e podem ser diferenciadas das demais proteínas vegetais pelo tamanho de suas superfícies hidrofóbicas. Embora alguns autores defendam a idéia de que o alto teor de prolina nas cadeias laterais proporcione menos formas helicoidais, e com isto

permita que as cadeias laterais apolares fiquem expostas ao solvente, Popineau e Godon⁶³ acreditam que as relações de hidrofobicidade não dependem necessariamente da estrutura tridimensional da proteína.

Dentro de um grupo de mesma mobilidade eletroforética (α -, β - e γ -gliadinas), são encontrados componentes de diferentes hidrofobicidades. A ω -gliadina se destaca por ser mais homogênea (elui nos dois primeiros picos P₁ e P₂ da Fig. 2.3) e menos hidrofóbica do que as demais, pelo seu alto conteúdo de prolina e fenilalanina. Charbonnier⁶⁴ e Caldwell⁶⁵ defendem a idéia de que este comportamento se deve ao baixa acessibilidade das áreas hidrofóbicas em função do impedimento estérico devido ao seu alto peso molecular, enquanto que Arêas e Cassiano³⁷ propõem por simulação computacional um modelo de ω -gliadina de estrutura tubular, com regiões hidrofóbicas e hidrofílicas segregadas na superfície externa, de forma espiralada, e resíduos hidrofílicos internalizados na estrutura. Quando a ω -gliadina é purificada por precipitação seletiva⁶⁶, o seu potencial de ligação com o heptano é quatro vezes o do extrato total ou da mistura de α -, β - e γ -gliadinas, obtidas por separação em Sephadex G 100, o que não é observado para os resultados de Popineau e Godon⁶³ com a técnica HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography)⁵⁴.

Mimouni e equipe⁶⁷, trabalhando com quebra de ligações dissulfeto no glúten, observaram resultados distintos, tendo notado solubilidade em água para as gluteninas de baixo peso molecular (LMW) e para ω -gliadinas, e solubilidade parcial para α -, β - e γ -gliadinas e gluteninas de alto peso molecular (HMW), desde que não ligadas ao glúten por ligações dissulfeto.

De maneira geral, os solventes normalmente utilizados para a gliadina são soluções hidro-alcoólicas ou soluções aquosas de solventes orgânicos polares miscíveis em água ou substâncias denaturantes, como a uréia, tida por Huebner⁵⁰ como um excelente solvente para a gliadina. O uso de solventes orgânicos muito apolares em sínteses enzimáticas tem proporcionado baixas solubilidades para importantes reagentes e problemas associados à agregação de enzimas. Já os solventes orgânicos polares têm-se mostrado excelentes meios para muitas transformações químicas, contudo eles com frequência reduzem drasticamente a estabilidade e atividade das enzimas. Em trabalho de simulação computacional da subtilisina, Toba e Merz Jr⁶⁸ observaram que a terminação N da proteína em DMF é ligada às várias moléculas de DMF através de ligações hidrogênio, as quais encapsulam e imobilizam esta região da proteína. Isto se explica pelo fato do DMF poder agir somente como receptor de ligações hidrogênio os quais são disponibilizados na porção N-terminal carregada. Esta característica das

moléculas do DMF pode prevenir o início do desenovelamento na região terminal da proteína pela promoção da interação intramolecular, portanto, estabilizando a proteína em solventes não-aquosos. O DMF também não pode, naturalmente, ser doador de prótons para formação de ligações de hidrogênio com a terminação C da proteína. O mesmo comportamento não é observado na simulação da mistura DMF/H₂O. Como a água tem a capacidade de ser doador ou receptor de hidrogênio, sendo considerada por isso um lubrificante molecular, a proteína pode permutar com a maior parte da água.

Um estudo do comportamento do íon Na⁺ em DMF e DMF-água foi desenvolvido por Kobara⁶⁹ e equipe. Eles puderam observar que devido ao alto poder de doação eletrônica do DMF (n° doador = 26,6), este interage preferencialmente com o Na⁺, formando raramente uma ligação de hidrogênio com as moléculas de água (n° doador = 18,0) ou cluster de DMF-água. Como existem alguns solventes orgânicos com capacidade doadora maior do que a da água, íons positivos são mais facilmente solvatados por estes solventes. A solubilização preferencial de solutos hidrofóbicos em misturas de água/solventes orgânicos é atribuída às interações fracas e específicas entre água e moléculas hidrofóbicas. Isto fornece uma nova visão do desempenho dos íons nos processos de auto-estruturação das moléculas biológicas. Esse estudo⁶³ proporcionou também a constatação da forte afinidade das moléculas de DMF pela rede de ligação de hidrogênio da água em regiões de concentração de DMF abaixo de 10% em peso.

2.3 - Fundamentos das técnicas óticas empregadas no estudo estrutural

2.3.1 - Espalhamento de raios-X de baixo ângulo – SAXS

Técnicas de espalhamento são amplamente utilizadas na determinação de arranjos espaciais de macromoléculas^{70,71}. Para sistemas amorfos, no entanto, as correlações intermoleculares são mais difusas do que para sistemas cristalinos e as informações obtidas das medidas de espalhamento menos precisas.

Uma das técnicas utilizadas nesta Tese foi o espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS). A técnica permite em princípio a obtenção de importantes parâmetros geométricos da molécula, ligados à sua forma e tamanho, a partir da análise de sua curva de espalhamento. Na Figura abaixo, um esquema mostra o tipo de interação que ocorre entre a radiação e a partícula espalhadora e na qual a técnica se baseia.

Fig. 4.2 – Espalhamento de raios X⁶⁸

No espalhamento de raios X, diferentemente do de luz, que veremos adiante, os elétrons da molécula são os centros espalhadores. Em uma solução com diferentes densidades eletrônicas entre soluto (ρ_2) e solvente (ρ_1), a amplitude da radiação espalhada é proporcional a $(\rho_2 - \rho_1)$ e a intensidade, proporcional a $(\rho_2 - \rho_1)^2$.

A intensidade de espalhamento medida em um experimento de SAXS, $I(q)$ resulta da contribuição de uma função de forma, $P(q)$, e de uma função de interferência, $S(q)$:

$$I(q) = N_p P(q) S(q) \quad (\text{eq. 4.8})$$

onde N_p é a densidade numérica de partículas espalhadoras.

Para sistemas monodispersos, $P(q)$ é o fator de forma da partícula. No caso de sistemas polidispersos, $P(q)$ envolve uma distribuição de tamanhos. A função de interferência, $S(q)$, está relacionada à função de distribuição radial ou função de correlação de pares, $g(r)$.

$S(q)$ é aproximadamente igual a 1 para o caso de sistemas não interagentes. Nesses casos, a intensidade de espalhamento passa a ser função apenas do número de partículas espalhadoras e de $P(q)$ e diferentes aspectos podem ser analisados em diferentes regiões da curva de espalhamento. Assim, na região de baixos q , determinam-se os raios de giro, R_g , através de gráficos obtidos a partir da lei de Guinier, segundo a qual:

$$I(q) = N_p \Delta \rho^2 V^2 \exp(-q^2 R_g^2 / 3) \quad (\text{eq. 4.9})$$

onde $\Delta \rho$ é o contraste de densidade eletrônica entre a partícula e o meio, V é o volume da partícula, R_g é o raio de giro e q é o vetor de espalhamento, dado por:

$$q = (4\pi / \lambda) \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{eq. 4.10})$$

Portanto, através de um gráfico de $\ln I \times q^2$ ($q \rightarrow 0$), obtém-se o R_g da partícula espalhadora através do coeficiente angular da reta resultante.

O raio de giro, R_g , é definido por:

$$R_g^2 = \frac{\sum_i m_i r_i^2}{\sum_i m_i}, \quad (\text{eq. 4.11})$$

sendo r_i a distância de cada elétron constituinte da partícula ao centro de massa, m_i , da mesma.

Os valores de R_g relacionam-se com as dimensões da partícula. De acordo com as formas geométricas das partículas, essas relações podem ser expressas pelas seguintes equações⁷²:

$$R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} r \quad \text{esfera de raio } r \quad (\text{eq. 4.12})$$

$$R_g = \frac{L}{\sqrt{12}} \quad \text{bastão muito longo, de lado } L \quad (\text{eq. 4.13})$$

$$R_g = \sqrt{2 + y^{-2} / 5a} \quad \text{elipsóide alongado de eixos } 2a, 2a, y2a \quad (\text{eq. 4.14})$$

$$R_g = \left(\frac{h^2}{6} \right)^{1/2} \quad \text{espiral aleatória de distância média entre extremidades } h \quad (\text{eq. 4.15})$$

de onde se poderá ter uma estimativa das dimensões geométricas da partícula mensurada.

As medidas a ângulos bastante baixos, características da técnica da SAXS, são realizáveis em razão da possibilidade de colimar-se muito bem um feixe de raios X, em relação, por exemplo, ao que se consegue obter para um feixe luminoso. Desse modo, medidas a ângulos muito baixos tornam-se viáveis, permitindo uma extrapolação satisfatória para $\theta = 0$.

Além de fornecer informações sobre os raios de giro da partícula espalhadora, a curva de espalhamento $I(q)$ também pode ser descrita por uma transformada de Fourier

da função de distribuição de distâncias, $p(r)$, que nos dá informações sobre a dimensão máxima e a forma do objeto espalhador.

Informações sobre a forma da partícula e sobre a tipo de interface entre a partícula e o meio podem ainda ser obtidas da região mediana e final da curva de espalhamento (região de Porod), respectivamente.

Para sistemas interagentes, portanto em que $S(q)$ não é nulo, devem ser utilizados procedimentos de modelagem e através do melhor ajuste à curva de espalhamento, obtêm-se os parâmetros estruturais relevantes.

O comprimento de onda da radiação de Cu- α , comumente usada como radiação incidente na técnica de SAXS, é de 1,54 Å.

Supondo-se uma geometria em bastão para as gliadinas e considerando os valores das dimensões L mostradas na Tab.1, vemos que $L \cong 75$ a 80λ para as α - β - e γ -gliadinas, enquanto que $L \cong 100\lambda$ para a ω -gliadina, não se considerando a possível ocorrência de agregados ou formas associadas, o que tornaria as dimensões da partícula espalhadora um múltiplo ainda maior de λ .

Enquanto no espalhamento de luz os efeitos de interferência são de segunda ordem, aqui eles não podem ser ignorados. Aproximações aplicáveis ao espalhamento de objetos com dimensões muito próximas às de λ devem ser portanto descartadas.

2.3.2 – Espalhamento de luz

As medidas de espalhamento de luz neste trabalho incluíram medidas de espalhamento de luz estático e dinâmico, este último também conhecido como espalhamento de luz quasi-elástico ou espalhamento de luz por correlação de fótons. A seguir, expomos os fundamentos da técnica em suas duas modalidades.

2.3.2.1 Espalhamento de luz estático

Quando um feixe de luz incide em uma solução ou em uma dispersão coloidal, parte dela poderá ser absorvida, parte sofrerá espalhamento e o restante será transmitido através da solução. O segundo efeito é aquele no qual se baseia a técnica de espalhamento de luz.

Em 1871, Rayleigh estabeleceu os fundamentos do espalhamento de luz. Quando uma onda eletromagnética incide sobre uma partícula, induz nela a formação de dipolos oscilantes. A partícula passa a funcionar como uma fonte secundária para a emissão de radiação no mesmo comprimento de onda da luz incidente (espalhamento elástico).

As medidas de espalhamento de luz estático são adequadas ao estudo de sistemas coloidais, uma vez que existe uma proporcionalidade entre a turbidez e a massa molecular da partícula⁷³. A técnica permite que se determine a massa molar média ponderal (M_m) e o coeficiente virial estático (B_{est}), que informa a respeito das interações intermoleculares presentes no sistema. Essa abordagem é aplicável a partículas com massas molares no intervalo 10^3 a 10^6 g/mol.

Embora as leis que governam o espalhamento das radiações eletromagnéticas (entre essas a luz visível e os Raios X) sejam as mesmas, o tratamento dos dados difere conforme a radiação empregada.

No espalhamento de luz, a relação entre a intensidade da luz espalhada e aquela da luz incidente é dada por:

$$\frac{i_s}{I_0} = \frac{2\pi^2 [n_0 (dn/dc)]^2 c}{N_A r^2 \lambda^4 (1/M_m + 2B_{est}c)} (1 + \cos^2 \theta) \quad (\text{eq. 4.16})$$

onde :

i_s = intensidade da luz espalhada;

I_0 = intensidade da luz incidente (colimada e polarizada);

n_0 = índice de refração do solvente, no comprimento de onda utilizado no experimento;

dn/dc = contraste ótico ou variação do índice de refração com a concentração da solução;

c = concentração da solução, em g/L;

N_A = Número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ moléculas/mol);

r = distância entre o fotodetector e a amostra, em m;

λ = comprimento de onda, no vácuo, da luz incidente, em nm (neste trabalho, 632,8nm);

M_m = massa molar média do soluto ponderada pela massa, em g/mol;
 B_{est} = coeficiente virial estático (descreve o desvio da idealidade);
 θ = ângulo entre o observador e o eixo de propagação da luz incidente.

Esta equação se aplica estritamente a soluções diluídas. Alguns parâmetros constantes são reunidos em um único K , chamado de constante ótica:

$$K = \frac{2\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{N_A \lambda^4} \quad (\text{eq. 4.17})$$

Outros parâmetros da eq. 4.16 formam a chamada razão de Rayleigh, R_θ :

$$R_\theta = \frac{i_s r^2}{I_0 (\sin^2 \theta)} \quad (\text{eq. 4.18})$$

onde:

θ = ângulo da medida. Para $\theta = 90^\circ$, o cálculo seria:

$$R_\theta = \frac{i_s r^2}{I_0} \quad (\text{eq. 4.19})$$

Embora a eq. 4.19 envolva parâmetro instrumental (r), R_θ independe do equipamento, porque i_s e r se compensam. Em geral, é feita uma medida com tolueno nos mesmos ângulos nos quais se faz a medida da luz espalhada pelas soluções da amostra a ser analisada. R_θ é conhecido e igual⁷⁴ a $13,59 \times 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$, o que dispensa a medida de I_0 e de r (valores difíceis de serem obtidos experimentalmente com a necessária precisão) para a determinação do valor de R_θ da amostra

Substituindo as equações 4.18 e 4.17 na 4.16, teremos:

$$R_\theta = \frac{Kc}{1/(P_\theta M_m) + 2B_{est}c} \quad (\text{eq. 4.20})$$

$$\text{ou} \quad \frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{P_\theta M_m} + 2B_{est}c \quad (\text{equação de Debye}) \quad (\text{eq. 4.21})$$

O termo P_θ é conhecido como fator de forma e nele está compreendido todo o tratamento matemático advindo das interações (construtivas ou destrutivas) entre os

feixes de luz espalhados pela mesma macromolécula, quando essa possua alguma de suas dimensões características $> \lambda/20$).

Para partículas pontuais (diâmetro $< \lambda/20$), R_θ é independente de θ , o que pode ser verificado experimentalmente. Neste caso corresponde a cerca de 32nm, para uma radiação incidente de $\lambda = 632,8$ nm, caso do laser de He/Ne), o valor de P_0 tende a um e o tratamento de Debye é empregado. Para estes casos, o espalhamento é usualmente coletado a um único ângulo, uma vez que, dado o pequeno tamanho da partícula, as questões referentes a interferência entre raios espalhados de diferentes pontos da mesma não precisam ser consideradas. Sendo assim, plotando-se Kc/R_θ contra a concentração da amostra, obtém-se uma reta de coeficiente linear $= 1/M$ e coeficiente angular $= 2B_{est}$. A partir da análise da inclinação ($=2B_{est}$), pode-se inferir aspectos ligados à interação interpartículas: inclinação positiva aponta para interações repulsivas e inclinação negativa para interações atrativas, com a reta de inclinação próxima de 0 indicando ausência de interações significativas.

A aproximação de Debye para o espalhamento, utilizando conceitos de interferência (construtivas ou destrutivas) de ondas da luz espalhada, é muito mais complexa do que a de Rayleigh, porém é também mais flexível, pois admite partículas de dimensões comparáveis ao λ . As condições de validade para aplicação do tratamento de Debye podem ser expressas como:

$$\frac{2\pi D}{\lambda}(n-1) \ll 1 \quad (\text{eq. 4.22})$$

onde:

n = índice de refração

D = distância característica do material; D/λ = interferência.

Para que a aproximação de Debye continue válida, $n-1$ deve ser cada vez menor, à medida que D aumenta. Assim, quando n se aproxima de 1, a teoria torna-se aplicável às grandes partículas.

Para a aplicação das equações de espalhamento, as grandezas n e dn/dc devem ser determinadas experimentalmente com o máximo de rigor, para evitar-se a propagação dos erros, pois o dn/dc é elevado à potência 2. Essas determinações devem ser feitas à mesma temperatura e comprimento de onda do experimento de espalhamento.

Para sistemas polidispersos, é importante considerar-se a maior contribuição das partículas de maior tamanho no espalhamento. Tal fato pode mascarar a contribuição das partículas menores na amostra.

Em um experimento de espalhamento de luz estático para partículas com dimensões $>\lambda/20$, são feitas medidas da intensidade da luz espalhada a vários ângulos e para diferentes concentrações da amostra. Os dados obtidos permitem uma construção (gráfico de Zimm), que se mostra particularmente interessante, pois permite que em princípio se anulem, ou ao menos se minimizem os efeitos de interações interpartículas (devidos a efeitos de concentração) e de efeitos eletromagnéticos (devidos à interferência entre as radiações espalhadas em ângulos diferentes de zero), através de uma dupla extrapolação dos dados para concentração nula e ângulo nulo, respectivamente.

Para obtermos o gráfico de Zimm partimos da equação 4.21, sendo que, na mesma, P_0 é igual a:

$$P_{\theta} = \left[1 + \frac{16\pi^2 \bar{R}_g^2}{3\lambda^2} \sin^2\left(\frac{\theta}{2}\right) \right] \quad (\text{eq. 4.23})$$

Sendo R_g igual ao raio de giro da partícula.

É colocada em gráfico a variação de Kc/R_{θ} contra $\sin^2(\theta/2) + kc$, em que k é um fator que visa ajustar o adequado espaçamento gráfico dos dados.

Quando $\theta \rightarrow 0$, não há efeito de interferência na luz espalhada e o valor de P_0 tende a um. No gráfico de Zimm, a intersecção com a ordenada das retas obtidas pela extrapolação de todos os pontos para $\theta = 0$ e $c=0$ é igual a $1/M$. A inclinação da reta $\theta = 0$ representa $2B$, tal qual para pequenas partículas, e suas inclinações são interpretadas de modo análogo.

A partir dos valores do coeficiente angular e linear da reta $C=0$, obtém-se o valor de R_g pela equação:

$$\bar{R}_g^2 = \frac{3\lambda^2}{16\pi^2} \left(\frac{\text{coef. angular}}{\text{coef. linear}} \right)_{c=0} \quad (\text{eq. 4.24})$$

Desse modo, o raio de giro da partícula espalhadora pode ser conhecido através da análise desses parâmetros de reta no gráfico de Zimm.

2.3.2.2 Espalhamento de luz dinâmico (espalhamento quasi-elástico ou de correlação de fótons)

O espalhamento de luz dinâmico baseia-se (no domínio de frequência) no efeito Doppler de deslocamento da frequência em função do movimento do objeto, permitindo desse modo a determinação do coeficiente de difusão (D) de partículas em solução e a partir dele o raio hidrodinâmico da partícula (R_H)^{75,76}. O efeito de deslocamento de frequência aplica-se tanto a ondas eletromagnéticas como mecânicas, fazendo com que o observador parado perceba uma frequência de onda diferente daquela de fato emitida pelo objeto em movimento. A magnitude do deslocamento é pequena, na faixa de alguns kHz, o que aproxima condições de espalhamento elástico (de onde o termo quasi-elástico), em que não se tem alteração na energia da radiação espalhada em relação à incidente.

A determinação do coeficiente de difusão por essa técnica envolve a utilização da função de autocorrelação, $G(\tau)$ (no domínio do tempo).

$$G(\tau) = \langle i(t) \cdot i(t+\tau) \rangle \quad (\text{eq. 4.25})$$

em que:

$i(t)$ = intensidade de luz espalhada no tempo t ; τ = tempo de espera entre duas leituras consecutivas.

O coeficiente de difusão translacional está relacionado com $G(\tau)$ através da expressão:

$$G(\tau) = A(1 + Be^{-2q^2 D \tau}) \quad (\text{eq. 4.26})$$

onde:

q é o vetor de onda, definido como:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{eq. 4.27})$$

e:

A = quadrado da média da intensidade de luz espalhada;

B = termo empírico relacionado ao instrumento;

n = índice de refração da solução;

θ = ângulo de observação do espalhamento

Para que se possa determinar D , é preciso que se calcule a constante de decaimento exponencial, τ_c , conforme expresso na relação abaixo:

$$D = \frac{1}{2q^2\tau_c} \quad (\text{eq. 4.28})$$

A polidispersão da amostra faz com que $G(\tau)$ seja uma soma de exponenciais. Um dos métodos para análise de $G(\tau)$ é o método dos cumulantes de Koppel⁷⁷, onde se ajustam os dados de $\ln G(\tau)$ a uma equação polinomial de segunda ou terceira ordem. O método dos cumulantes é inadequado para a análise de distribuições polimodais, exigindo outros métodos de análise⁷⁸, como o Contin⁷⁹, empregado nesta Tese.

A relação entre o coeficiente de difusão, D , e a fração de volume, ϕ , da fase monodispersa, para $\phi \rightarrow 0$, é dada pela equação seguinte:

$$D = D_0(1 + B_{din}\phi) \quad (\text{eq. 4.29})$$

onde: D_0 = coeficiente de difusão intrínseco à diluição infinita; B_{din} = coeficiente virial dinâmico.

O coeficiente virial dinâmico, B_{din} , encontra-se relacionado com o potencial de interação entre as partículas. Um valor de B_{din} igual a 1,45 indica esferas rígidas não interagentes⁸⁰. Valores maiores que 1,45 indicam interações repulsivas e valores menores, interações atrativas^{81,82}.

O raio hidrodinâmico está relacionado com o coeficiente de difusão, D , através da equação de Stokes-Einstein, supondo partículas esféricas^{74,75}:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (\text{eq. 4.30})$$

onde: k_B = constante de Boltzmann; T = temperatura (K); η = viscosidade de solvente

3 - Metodologia

3.1 -Separação das gliadinas por FPLC

A coluna utilizada neste trabalho foi a Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech), de 28,5 X 1,5 cm, que permite a separação das gliadinas em duas frações: ω -gliadina (massa molar entre 60.000 – 80.000 g/mol) e gliadinas de baixa massa molar, incluindo α , β e γ (30.000 – 40.000 g/mol).

O solvente utilizado nos procedimentos cromatográficos como eluente, assim como dispersante inicial para a gliadina, foi uma solução composta de 0.1M de ácido acético e 3M de uréia (solução AU, pH = 4,1). A proporção de diluição de gliadina para a solução AU foi de 7,5mg /1 mL.

A gliadina, diluída, foi injetada (em alíquotas de 1 mL) na coluna, numa corrente de eluente com uma taxa de vazão de 0,5 mL/min e as proteínas foram monitoradas a 280nm por um analisador Pharmacia LKB / controlador LCC- 501 Plus do sistema Pharmacia de FPLC. A programação (do coletor FRAC-100) de coleta de frações foi feita para o volume fixo de 0,5 mL / tubo. Após várias cromatografias, foram reunidas as frações referentes a um mesmo pico.

A segunda etapa foi dialisar exaustivamente, em membrana Spectra/Por com massa molar de exclusão 6-8000, cada uma das frações contra ácido acético 0,01M e proceder à liofilização.

Para separar as sub-frações de α , β e γ -gliadina, a porção referente a esta fração foi submetida a uma cromatografia de troca iônica. Este método, também aplicável às proteínas de outros cereais, baseia-se no princípio de adsorção a uma superfície sólida de troca (como a metil celulose) utilizando após, um eluente individual por proteína ou mistura deles, variando-se o pH ou força iônica. Nesta etapa foi empregada uma coluna de metil celulose (Biogel, da Pharmacia), utilizando-se como eluente solução tampão de glicina / acetato / uréia 3M a pH = 4,6, eluindo-se em gradiente linear de 0 – 0,25 mol/L de NaCl no mesmo sistema FPLC da Pharmacia.

Outra etapa em que se lançou mão da cromatografia de troca iônica foi na purificação da ω -gliadina, em que se utilizou como eluente solução tampão de acetato de sódio 5mM / dimetilformamida (DMF) 1M a pH = 3,5, em coluna Biogel1 e sistema FPLC Pharmacia.

Como se trata de troca iônica, o pH neste tratamento deve encontrar-se abaixo do ponto isoelétrico da ω -gliadina, mantendo-a com carga líquida positiva.

Após estas etapas de cromatografia de troca iônica, as frações obtidas foram submetidas a novas seções de diálise e liofilização.

3.2 - Análises das gliadinas

3.2.1 - Teste qualitativo com ninidrina

Foram tomados 50 μ L de solução da amostra (filtrado de uma solução etanólica de gliadina 0,1%), aos quais foram adicionados 50 μ L de uma solução de fenol (76% em etanol), 50 μ L de uma solução 0,0002M KCN em piridina (para se elevar o pH) e 100 μ L de solução 0,28M de ninidrina em etanol.

Esta mistura e o branco (solução etanólica sem gliadina) foram colocados por 10 minutos em bloco de aquecimento, pré-aquecido a 110°C. Após esse tempo, os tubos foram resfriados em água corrente. A coloração amarela indicava a ausência de grupos amino ou a presença de prolina. A cor púrpura indicava a presença de grupos amino de aminas primárias.

3.2.2 Composição de aminoácidos

Para a estimativa da massa molar média da mistura das gliadinas foram utilizados os valores de massa molar da tabela 1, considerando 52.000 g/mol para a ω -gliadina, e as áreas dos cromatogramas do FPLC obtidos (35%, 45%, 15% e 5% para a α , β , γ e ω -gliadina, respectivamente – vide item 4.1 deste capítulo), e obteve-se o valor de 32.350g/mol. A partir desse valor calculou-se a massa correspondente a 30 nmol de proteína/50 μ L de solução (concentração ideal para o método de determinação de aminoácido), que foi igual a 0.9705mg, ou seja $\sim$ 1,0 mg.

Para se obter a massa de 1,0mg no extrato etanólico (ensaios de interação gliadina/microvesícula de DOPC - ver capítulo 3), considerou-se o rendimento de 3,3% observado em experimentos prévios de extração de gliadina pelo etanol a partir da proteína bruta seca. Para tanto, suspendeu-se 0,1g de gliadina em 100mL de etanol. Esta suspensão foi submetida a 7h de agitação contínua à temperatura ambiente, e após filtração, o filtrado foi liofilizado.

O resíduo assim obtido foi transferido para um tubo de ensaio através de 3 lavagens de 50 μ L com etanol 96%. O material seco foi submetido à hidrólise ácida gasosa com HCl 6N, em presença de alguns cristais de fenol e sob atmosfera de N₂ a 110°C por 24 h em uma estação de trabalho Pico Tag da Waters. O hidrolisado total foi seco a vácuo na mesma estação de trabalho e posteriormente diluído em 300 μ L de tampão citrato (pH 2,2). 100 μ L desta solução foram injetados em um analisador automático (Beckman Instruments, Inc., modelo 7300). Esse sistema emprega o método

de derivatização pós-coluna, no qual os aminoácidos provenientes da hidrólise ácida são separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) empregando uma coluna de troca iônica de poliestireno sulfonada (Beckman Instruments, Inc., 0,40 cm x 12,00 cm) e detectados como produtos de uma reação com ninidrina a 440nm ou 570nm, segundo procedimentos descritos por Anizon-Lopez e colaboradores⁸³. As quantidades de cada aminoácido foram calculadas baseando-se na análise de 19 padrões de aminoácidos com concentrações conhecidas. A proporção molar foi calculada considerando-se como referência a concentração de alanina, a qual sofre menos interferência nas condições de hidrólise.

Além da determinação da composição de aminoácidos no extrato etanólico acima descrito, procedeu-se também, sob condições experimentais semelhantes, à análise de aminoácidos da gliadina bruta.

3.3 - Solubilização

Os estudos de solubilidade da gliadina visaram examinar seu comportamento frente a diferentes solventes e sua evolução para fase gel, de modo a se estabelecerem possíveis relações entre comportamento de solvatação e comportamento de fluxo ou deformação. Foram preparadas dispersões de cerca de 10 e 20% (m/v) que, após agitação manual, foram deixadas em repouso para observação da evolução temporal do sistema. Outras concentrações de dispersões da proteína foram preparadas pelo mesmo procedimento, onde não indicado diferentemente.

O efeito da temperatura (na faixa de 40 a 60°C) sobre a solubilidade da gliadina nos solventes ensaiados foi verificado, mantendo-se as amostras sob aquecimento por 8h, em amostras com a idade de 24h.

Também foram efetuados ensaios a tempos longos após o preparo das amostras, para acompanhamento do efeito de envelhecimento no comportamento reológico. As amostras empregadas nesses ensaios foram armazenadas sob refrigeração nos períodos entre os testes.

3.4 – Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS)

As curvas de SAXS foram obtidas a partir de soluções de gliadina em água (100mg/30µL), e nos demais solventes (DMF, formamida, TMU e uréia) a 20%, utilizando-se uma fonte de anodo de raios X, operando a 50kV/200mA, comprimento de

onda de 1,54Å a 25°C. Para as leituras, as amostras foram acondicionadas em capilares de vidro borosilicato de 1,5 mm de diâmetro.

O tempo decorrido entre a preparação da amostra e início de leitura foi de:

- Uréia e formamida, em torno de 24h
- DMF e TMU, em torno de 4 dias, para atingir estabilidade macroscópica
- Água, recém-preparada

Devido ao baixo potencial espalhador apresentado pelos sistemas, o tempo de acumulação foi superior a 12h.

3.5 – Espalhamento de luz

As medidas foram feitas no Sistema 4700 de Espalhamento de Luz da Malvern Instruments, que constitui um instrumento de alto ângulo (WALS), equipado com fonte laser He-Ne com potência de 25mW a 632.8nm, com limite de detecção de raio hidrodinâmico de 10nm – 1µm e massa molar 1000-10⁶ g/mol. A temperatura de medida foi de 25°C.

As amostras consistiram de dispersões de gliadina em diversos meios solventes. Todo o cuidado foi tomado com relação à remoção de impurezas, o que incluiu filtração prévia das várias amostras (dispersões da proteína e solventes puros) em membrana Millipore de poro de 20 µm (filtros com porosidade inferior a esse tamanho não permitiram a passagem das soluções) além de pré-lavagem das celas de amostra com solução ácida (HCl/H₂SO₄ 1:1 a 50%) seguida de abundante enxágüe.

O procedimento de medida consistiu no registro do espalhamento das amostras de dispersão da proteína, contidas em celas de quartzo, contra um branco do solvente puro. Foram realizados experimentos de espalhamento de luz estático (para determinação da massa molar média ponderal, M_w) e espalhamento de luz dinâmico (para a determinação dos raios hidrodinâmicos e coeficientes de difusão). Mais particularmente, as medidas efetuadas envolveram os seguintes procedimentos:

a) espalhamento de luz estático: foram feitas medidas em uma faixa de ângulo que se estendeu de 50° a 130°, em intervalos de 10°, para três concentrações de amostras de proteína na faixa de 0,02% a 0,08%. Foram medidos os índices de refração (n) das

amostras em função da concentração do soluto (proteína), no refratômetro Bellingham & Stanley Ltd., modelo 60/ED. A determinação da derivada da curva de variação do índice de refração com a concentração da proteína (dn/dc) é necessária para o cálculo do termo K, que aparece na equação de Debye (eq. 4.21) e de Zimm (eq. 4.23). Na prática, dn/dc foi calculado a partir da tangente do gráfico $n \times \text{conc.}$.

b) espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons ou espalhamento de luz quasi-elástico): foram coletadas medidas em ângulo fixo de 90° . Para que se pudessem calcular os raios hidrodinâmicos a partir dos coeficientes de difusão, empregando-se a equação de Stokes-Einstein, procedeu-se à determinação das viscosidades cinemáticas das amostras, em viscosímetro do tipo Ubbelohde, marca Schott, a 25°C e sua posterior transformação em viscosidades dinâmicas, através da determinação das densidades (em densímetro digital Chempro-PAAR-DMA 40) considerando-se que:

$$\eta = \nu \cdot \rho \quad (\text{eq. 4.31})$$

onde: η = viscosidade dinâmica, em N.s/m^2 ;

ν = viscosidade cinemática, em mm^2/s ;

ρ = densidade, em g/L

A viscosidade cinemática, ν , é expressa como:

$$\nu = K (t - \nu) \quad (\text{eq. 4.32})$$

onde: ν = viscosidade cinemática, em mm^2/s ;

K = constante do equipamento = $0,003173 \text{ mm}^2/\text{s}^2$.

t = tempo de escoamento, em s;

ν = correção de Hagenbach, em s, obtida por extrapolação a partir de tabela do manual do aparelho.

O densímetro empregado para determinação dos valores de ρ utiliza a seguinte equação:

$$\rho = A(T^2 - B) \quad (\text{eq. 4.33})$$

$$\text{onde: } A = \frac{\rho_{H_2O} - \rho_{ar}}{T_{H_2O}^2 - T_{ar}^2} \quad (\text{eq. 4.34})$$

T = período da vibração;

$$B = T_{ar}^2 - \frac{\rho_{ar}}{A} = 10,628743 \quad (\text{eq. 4.35})$$

4 - Resultados e discussão

4.1 -Separação das frações da gliadina por FPLC

As etapas de separação das frações de gliadina por FPLC (filtração em gel e troca iônica) geraram curvas como as apresentadas a seguir:

Fig. 4.3 – Cromatograma da primeira etapa (permeação em gel) de separação das gliadinas por FPLC: α , β , γ e ω -gliadina.

Fig. 4.4 – Cromatograma da segunda etapa (troca iônica) de separação por FPLC: α , β e γ -gliadinas

Fig. 4.5 – Cromatograma da purificação (troca iônica) da ω -gliadina por FPLC.

A separação mostrou reprodutibilidade nas diversas corridas executadas. Em comparação com a literatura²⁴ o perfil da curva obtida na primeira fase de separação (Fig. 4.3) assemelha-se ao da gliadina obtida de farinha desengordurada⁸⁴, embora estudos comprovem que não há diferenças nas frações correspondentes de amostras desengorduradas ou não, exceto pela menor intensidade da banda da glutenina HMW para as corridas com gliadina desengordurada, diferença que se dá na partição dos polímeros de glutenina na fase de precipitação por pH.

Na Fig. 4.3, o 1º pico (P1) é atribuído por Carcea a materiais não protéicos, enquanto Bietz o atribui a agregados de gliadinas (100000 – 200000 g/mol), agregados de subunidade LMW (gluteninas de baixo peso molecular), gluteninas intermediárias, gluteninas HMW (de alto peso molecular) e polipeptídios de baixo peso molecular. O segundo pico (P2) é atribuído à ω -gliadina e gluteninas LMW, enquanto o P3 à mistura de α -, β - e γ -gliadinas. Os demais picos (P4 e P5) são provavelmente fragmentos de proteínas e resíduos de menores pesos moleculares (12 000 - 25 000 g/mol). Este padrão de separação assemelha-se aos de outros trabalhos da literatura^{7,24,78}.

A mistura de α , β e γ -gliadina foi obtida em uma só fração, livre de outras frações indesejadas, após gradiente iônico, conforme mostrado no terceiro pico da Fig.4.4. O mesmo ocorre com a ω -gliadina, exemplificada no cromatograma da Fig. 4.5.

A técnica de FFF (Field-flow fractionation) seguida de SE-HPLC, utilizada por Stevenson e Preston⁸⁵, mostrou que a fração extraída pelo etanol 70% apresentou dois picos, sendo o primeiro e maior a 4,3 min., com um diâmetro de Stokes (diâmetro de uma partícula esférica com a mesma densidade e velocidade de deslocamento que a partícula em questão) de 7,4nm e o segundo a 5,5min. com um diâmetro de Stokes de 9,9nm. Da concentração do primeiro pico submetido ao A-PAGE eles obtiveram a confirmação da presença das α -, β -, γ - e ω -gliadinas. Se comparado o diâmetro médio desta fração ($\varnothing$ =7.4nm) com o de BSA (soroalbumina bovina), $\varnothing$ =7,3nm e massa molar de 67000 g/mol, o valor da massa molar seria bem maior do que os cerca de 40000 g/mol sugeridos para a maior parte (α -, β -) em outros trabalhos, o que sugere que em eluentes ácidos estes componentes possuem uma estrutura estendida. O segundo pico, que mostrou um diâmetro maior que o da aldolase ($\varnothing$ =9,3nm e massa molar de 158000 g/mol), demonstrou ser glutenina LMW, com sequência primária de aminoácidos similar à maioria das α -gliadinas, que também se apresenta estendida em meios ácidos ($\varnothing$ =6,7nm quando em meio não ácido).

Em nosso trabalho, como a quantidade de proteína injetada é extremamente pequena, 1 mL, e em cada corrida há perdas de material naturais ao processamento, o rendimento final da purificação é baixo. As outras técnicas citadas também obtêm frações contendo mais de um componente, ou pequena quantidade de cada componente individualmente²². Este baixo rendimento, que levou a que não obtivéssemos em tempo hábil quantidade suficiente de proteína purificada para suprir todas as futuras etapas do estudo, norteou as etapas posteriores para o processamento da mistura de gliadinas em lugar de cada fração purificada.

4.2 - Teste Qualitativo com Ninidrina

Os sistemas, quando foram deixados reagir a 110°C apenas por 2 min., apresentaram pequena diferença de coloração esverdeada entre os tubos 1 (filtrado alcoólico de gliadina) e o tubo 2 do branco, que se apresenta um pouco mais amarelado, conforme resultado mostrado na Fig. 4.6(a). A pouca diferença entre as colorações sugere que a proteína está presente em pequena quantidade. Os tubos 3 (branco) e 4 (gliadina pura acrescentada) serviram para verificar se a reação estava respondendo positivamente à presença da proteína.

(a)

(b)

Fig. 4.6 – Reação com a ninidrina (a) durante 2 min. e (b) durante 10 min.

A reação por 10 min. a 110°C evidenciou um tom amarelo mais forte para a solução contendo a amostra protéica (6), em relação à solução do branco(5) (vale lembrar que os aminoácidos derivatizados com ninidrina tem seus máximos de absorção em 570nm, com exceção daquele da prolina, cujo λ_{max} encontra-se em 440nm). Isto sugere a presença de prolina e, portanto, que o etanol eluiu preferencialmente proteínas do complexo gliadina com um maior percentual deste aminoácido (Fig. 4.6b). Para a verificação desta hipótese, foi realizada a quantificação dos aminoácidos, como já descrito no item 3.2.2.

4.3 - Quantificação de aminoácidos

Os cromatogramas obtidos das análises de aminoácidos das amostras de gliadina bruta e da fração etanólica são mostrados na Figura 4.7. A composição dessas mesmas amostras é mostrada nas Tab. 4.6, 4.7 e 4.8.

Fig. 4.7 - Cromatogramas do extrato de gliadina em etanol (acima) e da gliadina bruta (em baixo). Condições de análise de aminoácidos: solvente NaE = tampão citrato, pH 3,28 (0 a 23,8 min); solvente NaF = tampão citrato, pH 4,25 (23,8 a 36,0min); solvente NaD = tampão citrato, pH 6,30 (36,0 a 66 min); coluna = poliestireno sulfonada de troca iônica Beckman, 0,40 cm x 12,00 cm; gradiente de aquecimento = 48 a 65 °C em 11 min, 65 a 77 °C em 34 min e 77°C por 21 min; fluxo = 0,35 mL/min e λ = 440 e 570 nm.

Tab. 4.6 – Composição de aminoácidos no extrato alcoólico de gliadina

Aminoácidos	Extrato A-1		Extrato A-2		Média	
	nmol	Prop mol*	nmol	Prop mol*	nmol	Prop mol*
Asx - D/N	3,27	0,5	3,27	0,5	3,27	0,5
Thr - T	3,20	0,4	3,40	0,5	3,30	0,5
Ser - S	6,48	0,9	6,44	0,9	6,46	0,9
Glx - E/Q	20,80	2,9	20,88	2,9	20,84	2,9
Pro - P	7,56	1,1	7,76	1,1	7,66	1,1
Gly - G	11,50	1,6	11,65	1,6	11,58	1,6
Ala - A	7,12	1,0	7,12	1,0	7,12	1,0
Cys - C	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
Val - V	5,97	0,8	5,83	0,8	5,90	0,8
Met - M	0,96	0,1	0,92	0,1	0,94	0,1
Ile - I	5,94	0,8	5,77	0,8	5,86	0,8
Leu - L	10,41	1,5	10,38	1,5	10,40	1,5
Tyr - Y	2,41	0,3	2,40	0,3	2,41	0,3
Phe - F	4,94	0,7	4,96	0,7	4,95	0,7
Lys - K	4,45	0,6	4,34	0,6	4,40	0,6
His - H	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0
Arg - R	1,98	0,3	2,04	0,3	2,01	0,3

* A proporção molar foi calculada considerando como referência a concentração de alanina.

Tab. 4.7 – Composição de aminoácidos na gliadina bruta

Aminoácidos	Bruta B-1		Bruta B-2		Bruta B-3		Média	
	nmol	Prop mol*	nmol	Prop mol*	nmol	Prop mol*	nmol	Prop mol*
Asx - D/N	8,64	0,7	8,59	0,7	8,60	0,7	8,61	0,7
Thr - T	9,15	0,8	9,00	0,7	8,94	0,7	9,03	0,7
Ser - S	20,49	1,7	20,37	1,7	20,37	1,7	20,41	1,7
Glx - E/Q	2,95	0,2	3,01	0,2	3,01	0,2	2,99	0,2
Pro - P	19,80	1,6	38,28	3,2	38,04	3,1	32,04	2,6
Gly - G	17,74	1,5	17,62	1,5	17,62	1,5	17,66	1,5
Ala - A	12,10	1,0	12,10	1,0	12,10	1,0	12,10	1,0
Cys - C	2,64	0,2	2,41	0,2	2,43	0,2	2,49	0,2
Val - V	14,68	1,2	14,77	1,2	14,80	1,2	14,75	1,2
Met - M	3,82	0,3	3,82	0,3	3,88	0,3	3,84	0,3
Ile - I	12,20	1,0	12,21	1,0	12,28	1,0	12,23	1,0
Leu - L	21,83	1,8	24,59	2,0	24,80	2,1	23,74	2,0
Tyr - Y	8,46	0,7	8,44	0,7	8,42	0,7	8,44	0,7
Phe - F	15,44	1,3	15,26	1,3	15,21	1,3	15,30	1,3
Lys - K	2,63	0,2	2,61	0,2	2,63	0,2	2,62	0,2
His - H	11,01	0,9	10,80	0,9	10,78	0,9	10,86	0,9
Arg - R	7,27	0,6	7,34	0,6	7,29	0,6	7,30	0,6

* A proporção molar foi calculada considerando como referência a concentração de alanina

Tab. 4.8 - Composição de aminoácidos (em proporções molares) das sub-frações de gliadina, segundo Charbonier⁴²

Aminoácidos	PAS	ω	γ	β	β'	$\beta 1$	$\alpha 1$
Asx - D/N	0,78	0,67	0,65	0,78	0,88	0,76	0,78
Thr - T	0,72	1,44	0,62	0,63	0,64	0,61	0,71
Ser - S	1,61	4,33	1,50	1,69	1,64	1,50	1,64
Glx - E/Q	9,56	57,22	11,65	11,69	11,58	9,74	7,04
Pro - P	4,11	23,56	4,79	5,47	4,91	3,92	2,87
Gly - G	1,14	2,00	0,91	1,03	0,91	0,82	1,13
Ala - A	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Cys - C	0,81	0,11	0,62	0,75	0,88	0,63	0,69
Val - V	1,31	0,67	1,29	1,41	1,48	1,29	0,93
Met - M	0,39	0,11	0,35	0,19	0,24	0,34	0,29
Ile - I	1,11	3,33	1,24	1,31	1,33	1,13	0,76
Leu - L	1,97	3,56	1,97	2,19	2,18	1,84	1,67
Tyr - Y	0,67	1,22	0,47	0,47	0,42	0,58	0,53
Phe - F	1,17	9,11	1,35	1,69	1,30	1,03	0,80
Lys - K	0,28	0,56	0,15	0,16	0,12	0,13	0,31
His - H	0,47	0,89	0,41	0,34	0,30	0,45	0,40
Arg - R	0,72	1,33	0,44	0,44	0,45	0,50	0,67

* A proporção molar foi calculada considerando como referência a concentração de alanina

Pela Tab. 4.8, que foi obtida a partir da Tab. 4.3, é possível perceber a notável prevalência dos aminoácidos glutamina e prolina na fração omega da gliadina, aspecto muito peculiar que permite distingui-la das demais sub-frações. Fenilalanina é o aminoácido seguinte em relevância quantitativa na fração omega, seguindo-se alguns aminoácidos apolares (como leucina, por exemplo).

A figura 4.7 mostra um teor extremamente alto em Glx nas amostras dos extratos etanólicos. Por esta mesma Figura, é possível verificar que o pico referente a Glx está muito acima do limite superior de detecção do aparelho empregado. A alta intensidade desse pico interfere no pico referente à prolina, acarretando sobreposição considerável de ambos. Desse modo, é possível registrar que o extrato etanólico possui a marcante predominância de Glx e provavelmente também de Pro. No entanto essas análises não permitiram quantificar o teor real desses dois aminoácidos. Essa predominância de Glx e Pro sugere que o etanol tenha extraído seletivamente a fração omega.

Os teores relativos elevados de alguns aminoácidos da fração omega em relação às demais também se revelam nos conteúdos de leucina, serina, isoleucina, treonina e glicina, no extrato etanólico. Estes aminoácidos ocorrem em proporções de duas a três vezes maiores na fração omega em relação às demais. O teor nulo de cistina nos extratos corrobora a sugestão de uma extração seletiva do componente omega, pois se sabe que esta fração é destituída de resíduos de cisteína e de pontes dissulfeto. Os dados de Charbonier⁴² confirmam essa observação e mostram que a ocorrência desses aminoácidos pode ser um aspecto diferencial entre a fração omega e as demais.

Resta inconclusiva a questão relativa à presença de fenilalanina, que se esperava estivesse presente em teores mais elevados do que aqueles observados na análise. Para a obtenção destes resultados não foram consideradas variações de proporção molar em torno de valores muito baixos, pois estas podem estar ligadas à heterogeneidade das amostras. A presença de alguma pequena parcela de frações de glutenina, não raramente carreadas nos processos de isolamento, não foi descartada.

Os resultados da análise sugerem que o meio etanólico favorece a dissolução preferencial de sub-frações de mais alta massa molar da gliadina, tipicamente a fração ω -gliadina.

4.4 – Solubilização de gliadina em solventes orgânicos

Nas primeiras horas de mistura o soluto passa a incorporar o solvente, lenta e gradualmente, intumescendo-se e dispersando-se em alguns dos solventes orgânicos (DMSO, DMF, Formamida). Nas concentrações $\geq 15\%$, as dispersões evoluem para gel diretamente, sem passar pela fase sol. Em alguns casos, elas apresentam duas fases concomitantes: a fase gel, em que o soluto incorpora o solvente até seu ponto de saturação e o sobrenadante, formado somente pelo solvente ($\text{DMF} \leq 10\%$) ou por uma dispersão líquida turva (etanol, em qualquer proporção).

Para a água o comportamento muda radicalmente. O soluto intumescce mais rapidamente e evolui para uma massa muito elástica, de sólida e bem agregada, separada do sobrenadante líquido leitoso.

Dos solventes testados, somente o DMSO apresentou solubilidade em todas as proporções de mistura e boa capacidade para a formação de gel para concentrações mais

baixas, como as utilizadas para as determinações reológicas. A formamida e o DMF apresentaram a formação de gel sem separação de fases para concentrações acima de 15% de gliadina, porém, somente após um longo tempo de contato. Nas corridas reológicas, onde foram utilizadas concentrações abaixo de 10% de gliadina em formamida e em DMF, o comportamento não foi o mesmo.

O efeito da temperatura acima de 40°C não representou melhora na dispersão da gliadina nos meios solventes. A partir dos testes reológicos observou-se uma não reversibilidade total em tempos curtos para os sistemas ensaiados a temperatura acima de 40°C, o que pode significar a ocorrência de alterações químicas (ligações cruzadas) nas amostras. Procurou-se trabalhar a temperaturas bem abaixo da temperatura de polimerização da gliadina, que é de 90°C^{4,86}.

A partir desses resultados pudemos definir melhor os solventes possíveis para se trabalhar nas etapas seguintes do estudo.

4.5 - Espalhamento de raios X a baixo ângulo (técnica SAXS)

As curvas de intensidade de espalhamento (curvas de SAXS) versus vetor de espalhamento para gliadina nos diversos solventes estão apresentadas na Figura 4.8a. Devido ao grande fator de atenuação do DMSO, não se pôde observar o comportamento da gliadina neste solvente por esta técnica.

Os resultados revelam claramente a polidispersividade dos sistemas nos diversos solventes ensaiados. As inclinações das retas obtidas por regressão linear a partir dos gráficos de Guinier ($\ln I \times q^2$) (Fig. 4.8) permitem o cálculo de R_g , através da equação 4.9. Os valores desse parâmetro, apresentados na Tab. 4.9, refletem as variações nos tamanhos das moléculas de gliadina e seus agregados nos diferentes meios.

Tab. 4.9 – Raios de giro (R_g) de gliadina em diversos solventes, obtidos por SAXS

Meios de dispersão	ϵ	R_{g1}^* (Å)	$L1^{**}$ (Å)	r (Å)	R_{g2}^* (Å)	$L2^{**}$ (Å)	r (Å)	R_{g3}^* (Å)	$L3^{**}$ (Å)	r (Å)
Uréia 8M	-	18,6	64,4	14,4	25,8	89,4	33,3			
Formamida	84	15,2	52,7	11,8	51,2	177,4	66,1			
DMF	38,25	15,6	54,0	12,1	62,0	214,8	80,0			
TMU	3,47	12,3	42,6	9,5				>161,6	>559,8	>208,6
Água	80	16,7	57,9	12,9				>145,6	>504,4	>188,0

*1, 2 e 3 – região fora de agregação, intermediária e de agregação, respectivamente.

**L = comprimento do cilindro (ver item 2.3).

Os resultados de R_g não mostram correlação com a constante dielétrica. Entretanto, o caráter aprótico (H_2O , formamida, uréia e DMF) ou aprótico (TMU) dos meios solventes, assim como a existência e a extensão dos domínios apolares (metílicos) nas moléculas de alguns deles, podem ter papel relevante na conformação da proteína dispersa e na sua maior ou menor tendência à formação de agregados.

Podemos extrair destas curvas duas informações importantes: a gliadina se apresenta associada nestes meios e, na tetrametiluréia e água os clusters são significativamente maiores do que nos demais meios.

Em TMU a gliadina apresentou o menor valor de R_g para a região de agregação 1, indicando uma forma espacial bem enovelada, e o maior valor de R_g na região 3, dos grandes agregados. O comportamento da gliadina em água se aproxima daquele observado em tetrametiluréia, em termos dos tamanhos das espécies presentes, em particular na região de ângulos muito baixos.

Em água, o comportamento da gliadina é bastante característico: ela não se dispersa no meio aquoso, mas incorpora prontamente a água quando em contato com ela, intumescendo e gerando uma massa sólida notavelmente elástica. As amostras de gliadina em água ensaiadas consistiram no sobrenadante aquoso destes sistemas. Esta fração contém a proteína dispersa sob a forma de uma suspensão com aspecto ligeiramente leitoso.

Em DMF e formamida, os R_g 's das espécies na região 1 são semelhantes, com um valor ligeiramente maior na faixa intermediária de R_g para o DMF.

Os resultados de SAXS para γ -gliadina em ácido acético 1%, obtidos por Thomson e equipe⁸⁷, mostram dimensões de 10,1 x 3,1 nm (ou seja, 101Å x 31Å), para uma geometria considerada como bastão, o que demonstra uma certa coerência com os valores médios de L_1 (altura do bastão) encontrados em nosso trabalho (Tab. 4.9). É preciso levar em conta que no trabalho de Thomson a γ -gliadina se encontrar distendida, pelos fatores de baixa concentração e meio ácido. A razão entre os tamanhos das espécies monoméricas no nosso trabalho, considerada em bastão, para os diversos meios (Tab. 4.10), e os de Thomson e equipe⁸¹ é de 0,5, o que sugere que em baixas concentrações e em meio ácido a gliadina encontra-se mais distendida do que nos meios por nós ensaiados. Na região dos agregados (R_g3) essa razão é de 5 vezes. Devemos também levar em consideração que a concentração de gliadina nos solventes aqui investigados é da ordem de 20%.

Fig.4.8 – Curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo de gliadina 20% em diversos meios solventes (a); Gráficos de Guinier para gliadina 20% em formamida (b); em DMF (c); em água (d) e em TMU (e).

No trabalho de Thomson, a variação do R_g com a concentração é ligeiramente decrescente para a α -gliadina, praticamente constante para a γ -gliadina, e se eleva linearmente para a ω -gliadina⁸⁸. Na dissolução com etanol 70%, Thomson encontrou os valores de R_g de 3,55nm; 3,80nm e 4,60nm para α , γ e ω -gliadinas, respectivamente.

4.6 – Espalhamento de luz quasi elástico

Medidas de espalhamento dinâmico de luz foram realizadas para diversas amostras de gliadina em vários meios solventes. A Fig. 4.9 apresenta os resultados obtidos para um desses experimentos, realizado com uma amostra de gliadina 0,01% em formamida/H₂O ($\chi_{\text{formamida}} = 0,3$). Os raios hidrodinâmicos e coeficientes de difusão (D_0) das partículas, calculados a partir desses dados, são apresentados na Tab. 4.10.

Fig. 4.9 – Espalhamento de luz dinâmico da gliadina 0,01% em formamida / H₂O 0,3.

Os dados de espalhamento de luz quasi-elástico de gliadina em meios solventes orgânicos e aquo-orgânicos, como mostrado na tabela 4.10, revelam a presença de agregados com raios hidrodinâmicos já próximos do limite de aplicação da técnica em

alguns casos. Como se pode observar, o ajuste dos dados oscila nos vários experimentos entre uma e duas populações com dinâmicas e tamanhos distintos, com valores de R_H na região de centenas de nanômetros e em alguns casos adentrando a região micrométrica. Os coeficientes de difusão são de ordem de grandeza de $10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, revelando uma difusão lenta quando comparada, por exemplo, com a difusão de tensoativos ($10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), calculada pela mesma técnica⁸⁹. De um modo geral, os dados apresentam grande flutuação, o que aparentemente se deve à heterogeneidade da amostra, fato que tem se revelado um problema na análise de certos biopolímeros polidispersos, como alguns polissacarídeos naturais.

Tab. 4.10 – Raios hidrodinâmicos e coeficientes de difusão obtidos por espalhamento de luz dinâmico para amostras de gliadina a diferentes concentrações em diversos solventes

Solvente	η solvente (mPa.s) 25°C	Conc gliad (%)	Idade amostra (dias)	Expto	Pico	Área (%)	R_H (nm)	$10^9 \times D_o$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
DMSO	1,987	0,5	36	1	1	49,5	696,5	1,6
					2	50,5	1060	1,0
				2	1	100	745,3	1,5
					1	44,1	603,2	1,8
				3	2	55,9	5442	0,2
					1	100	793	1,4
Form/H ₂ O $\chi_{\text{Form}}=0,3$	1,1937	0,01	4	1	1	29,7	174	10,5
					2	70,3	1536	1,2
Formamida	1,1334	0,5	4	1	1	29,7	379,9	5,1
					2	70,3	3353	0,6
		0,05	14	1	1	32,1	280	6,9
					2	67,9	2154	0,9
				2	1	36,8	362,3	5,3
					2	63,2	2979	0,7

Em alguns casos verificam-se algumas oscilações nesses parâmetros em função do tempo, como no caso das dispersões em DMSO. As observações sugerem existência de correlação entre idade da amostra e grau de polidispersão dos agregados, já que se observa evolução do sistema inicialmente monodisperso em tempos curtos para uma distribuição bimodal de populações de agregados em tempos mais longos.

A flutuação dos resultados dos raios hidrodinâmicos encontra-se acima do erro da técnica (5-10%). A análise de dispersões de gliadina em DMSO foi realizada apenas por espalhamento de luz e não pela técnica de SAXS, em razão da forte absorção de raios X, observada para esse solvente em experimentos anteriores, impedindo a observação de qualquer espalhamento da proteína dispersa nesse solvente que fosse minimamente significativo. É possível, no entanto, compararmos valores obtidos por

espalhamento de luz para dispersão de gliadina a 0,5% em formamida pura com os valores obtidos por SAXS para a mesma proteína nesse solvente. Nesse último caso, vale lembrar que a concentração em proteína da dispersão foi de 20%. A questão das concentrações distintas utilizadas nos dois métodos justifica-se em razão do baixo espalhamento de raios X observado para essa proteína, o que nos levou a elevar a concentração até obtenção de intensidades minimamente aceitáveis para o experimento. No espalhamento de luz, os requisitos de baixa concentração da espécie espalhadora foram plenamente atendidos.

Os valores dos raios de giro, determinados por SAXS, para gliadina dispersa em formamida, nos permitiram estimar o tamanho da partícula espalhadora. Assim, supondo-se uma geometria aproximadamente cilíndrica para a gliadina, chegamos a dimensões correspondentes a 52,6 Å e 177,3 Å para L (lado do cilindro) (ver Tab. 4.9) para a concentração de 20%. Assumindo-se alternativamente uma geometria esférica, os valores de raio seriam de cerca de 11,8 e 66,1 Å.

O aparente conflito entre esses dados, obtidos para um mesmo tipo de dispersão, pode, no entanto, ser interpretado baseado em alguns aspectos diferenciais entre as duas técnicas. Por SAXS, investiga-se o espalhamento em uma região de valores de q (vetor de espalhamento) muito mais altos do que aquela em espalhamento de luz. Altos valores de q correspondem à sondagem dos objetos espalhadores em maior grau de resolução. Grandes q , à semelhança de uma lente de aumento, nos informam sobre aspectos de estrutura interna dos objetos espalhadores, enquanto menores q nos informam sobre contornos e formas dos objetos vistos em menor resolução.

Em espalhamento de luz trabalha-se em regiões de valores mais baixos de q , portanto obtém-se informações a respeito dos grandes agregados, sem possibilidade de discernirmos seus detalhes internos ou a presença de espécies monoméricas presentes, enquanto que por SAXS obtém-se informações a respeito dos objetos espalhadores de tamanhos relativamente menores, em maior detalhe, sem possibilidade para detecção de formas associadas de maior dimensão.

Desse modo, as técnicas de espalhamento de raios X e de luz aqui empregadas podem complementar-se, fornecendo um conhecimento mais amplo e completo, com mais detalhes sobre nossas amostras. Somos assim levados a considerar que as dispersões de gliadina estudadas constituem conjuntos de espécies monoméricas de gliadina (de dimensões da ordem de algumas dezenas de Å) coexistentes com formas

associadas, representadas por agregados distribuídos em não mais do que duas populações dinamicamente distinguíveis.

Quanto à região de ângulo sondada por cada uma das técnicas (baixo ângulo, no caso de raios X e alto ângulo, no caso de luz), vale lembrar que, embora a dependência entre vetor de espalhamento q e ângulo θ se dê com o quadrado do seno do segundo, (portanto uma relação direta em ambos os casos), a presença de partículas contaminantes (como poeira, por ex.), pode seriamente interferir nos experimentos de espalhamento de luz, pelo fato de grandes partículas serem detectadas nessa região. Experimentos de luz em alto ângulo exigiriam, portanto, recursos de grande rigor na eliminação de qualquer traço de partículas estranhas à amostra, fato que deixa de ser tão relevante na região de ângulos mais baixos. Na técnica de raios X, o efeito é menos importante, uma vez que por essa técnica detecta-se o espalhamento de objetos de dimensões muito menores, sendo que eventuais partículas de grandes dimensões não representam perturbações de maior relevância.

Por ser um sistema polidisperso, deve-se mencionar também o efeito de partículas de maiores tamanhos que mascaram o espalhamento da luz pelas partículas menores. Um detalhe experimental que seria ainda conveniente relembrar é o fato da filtração das amostras de gliadina somente ter sido possível através de membranas de porosidade $\varnothing = 20\mu\text{m}$, condições nas quais não se pode descartar a possibilidade da ocorrência de algum carreamento de partículas interferentes não desejáveis.

O método do espalhamento de luz se aplica muito bem a partículas com raios de giro acima de $100 \text{ \AA}$. Seu emprego, no entanto, é limitado para partículas de baixo poder de espalhamento e, pelas dificuldades inerentes à interpretação, para macromoléculas muito grandes. Para estas, não haverá a dependência angular com o raio de giro, que reflete também o formato da partícula⁶⁵. Quanto maior o tamanho da partícula, maior a necessidade de se medir a ângulos mais baixos e na prática, os efeitos de difração impedem medições em ângulos abaixo de 5° . Se estas condições experimentais se verificam ou se não se conhece seu formato, a extrapolação para $\theta = 0$ pode não ser possível.

Sendo a sensibilidade deste método dependente de λ^{-4} , a solução seria diminuir o comprimento de onda. Porém, abaixo de 300nm as proteínas começam a absorver fortemente ao invés de espalhar, até que na região de raios X voltam novamente a espalhar.

A Tab. 4.11 apresenta valores de medidas por espalhamento de raios X e de luz a baixo ângulo de algumas proteínas. Nela podemos observar que a β -lactoglobulina possui valores de peso molecular e raio de giro próximos aos das gliadinas, obtidos por espalhamento de raios X.

Tab. 4.11 - Medidas de espalhamento de raios X e de luz a baixo ângulo⁶⁷

Proteínas	M _w	R _g (Å)
Lizosima	14100*	15,2*
β -Lactoglobulina	36000	
	36700*	21,7*
Soroalbumina	70000	29,8*
Miosina	493000	468

(*) Valores obtidos por espalhamento de raios X a baixo ângulo

4.7 Espalhamento de luz estático

Foram feitas medidas de espalhamento de luz estático para dispersões de gliadina em DMSO. Os resultados obtidos em função da concentração da proteína e do ângulo de espalhamento foram extrapolados para concentração e ângulo nulos, de modo a se determinar a massa molar média ponderal. Verificou-se, no entanto, que o valor extrapolado correspondeu a um valor negativo, o que torna sem sentido físico a determinação da massa molar. Por essa razão, o gráfico de Zimm gerado não está sendo incluído nesta Tese.

Valores de extrapolação muito próximos de zero apontam para altos valores de massa molar, uma vez que o valor extrapolado no eixo y corresponde ao inverso da massa molar média. Assim, interpretamos o resultado da extrapolação, já na região negativa do eixo das ordenadas, como uma indicação de que o valor de M_m para nosso sistema situa-se em valor bastante alto, acima do limite de aplicação da técnica.

A despeito do não significado físico do valor específico extrapolado, conforme mencionado, é importante mencionar que se obteve regularidade do padrão gráfico. Essa observação indica que os experimentos foram conduzidos adequadamente e que o resultado “anômalo” não resulta de algum problema relativo às amostras (situação que deveria gerar resultados sem padrão reconhecível no gráfico de Zimm), mas apenas que a massa molar média das formas associadas ultrapassa o limite de aplicação da técnica.

5 –Conclusões

A técnica de FPLC, envolvendo etapas de filtração em gel e de troca iônica, mostrou-se adequada para um primeiro fracionamento das gliadinas. Sub-fracionamento posterior, para o isolamento das três frações mais leves, α -, β - e γ -gliadina mostrou dificuldades experimentais relevantes. Essa maior dificuldade de separação das sub-frações de gliadina evidencia a semelhança de tamanho e de características iônicas de seus componentes. A ω -gliadina, a única isenta de ligações de dissulfeto, foi separada das demais numa primeira separação por tamanho (filtração em gel). A técnica, porém, mostrou-se de muito baixo rendimento, comprometendo a obtenção de quantidades suficientes de frações puras para a execução dos experimentos previstos, sobretudo considerando-se o caráter destrutivo das técnicas empregadas, em particular as reológicas. As informações geradas no fracionamento permitiram, contudo, reconhecer-se o perfil cromatográfico característico da gliadina em termos de suas frações componentes e avaliar as contribuições relativas de cada uma delas na massa molar média protéica (cabe lembrar, a esse respeito, que apesar de estarmos tratando de proteínas, as quais constituem sistemas monodispersos por definição, falamos em massa molar média pelo fato de estarmos nos referindo a um complexo protéico heterogêneo, nesse caso).

As dispersões de gliadina nos meios orgânicos ensaiados mostraram-se polidispersas, com espécies monoméricas coexistindo com formas associadas de maior massa molar.

Os coeficientes de difusão das espécies associadas são da ordem de $10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, indicando mobilidade relativamente restrita.

As espécies associadas mostram distribuição unimodal ou bimodal de raios hidrodinâmicos (R_H), na dependência do meio de dispersão, com valores em sua maior

parte ainda dentro da faixa nanométrica (centenas de nm a unidades de μm em alguns casos).

As espécies monoméricas presentes nas dispersões apresentam raios de giro na faixa de uma a duas dezenas de $\text{\AA}$, correspondentes a cilindros de alturas de 4,2-6,4 nm ou a esferas de raio 1,0-1,4 nm.

Apesar das gliadinas apresentarem fator de grupos não polares (NPS) de 0.39 e de grupos ionizáveis (CHF) de 0.08, sua dispersão foi mais favorecida em meio solvente de DMSO⁹⁰ ($\epsilon=47,24$) onde ocorre dispersão homogênea e mais rápida, com formação de gel translúcido em todas as proporções ensaiadas.

Mesmo com uma constante dielétrica próxima à do DMSO, o DMF⁸⁴ ($\epsilon=38.25$) constitui um meio dispersante muito menos efetivo para gliadina. Observa-se uma separação entre o gel formado e a fase sobrenadante, para dispersões a concentrações de proteína $\leq 10\%$. A formamida⁸⁴, ($\epsilon=84$), assim como o DMF, dispersa a gliadina muito mal. Os géis não se formam com facilidade, porém uma vez formados em formamida são mais homogêneos macroscopicamente que em DMF, não ocorrendo separação de fases nas concentrações mais baixas.

O TMU, com constante dielétrica igual a 3.47, segrega o gel formado mesmo a uma concentração de 20% em proteína. Etanol a 70%, que não dispersa a gliadina completamente, e uréia 8M não se mostraram capazes de promover a adequada gelificação da gliadina, sendo por isso descontinuada a investigação com estes três últimos solventes.

O comportamento frente à solubilidade não mostrou desse modo correlação com a constante dielétrica do meio. Conclui-se que aspectos ligados ao caráter prótico ou aprótico dos solventes e à existência e extensão de seus domínios moleculares metílicos desempenham papel relevante nesse comportamento, com os solventes próticos e com domínios apolares menores ou ausentes apresentando menor eficiência na solubilização da proteína.

Ressalta dos estudos de solubilidade a verificação da notável capacidade dispersante das gliadinas em meios orgânicos diversos, revelando sua capacidade de estabelecer interações de caráter hidrofóbico nesses meios ao mesmo tempo em que exibem notável afinidade pela água, através de sua capacidade de incorporação desse líquido em sua estrutura. A geração de sistemas de comportamento mecânico de interesse é um aspecto marcante resultante dessas interações.

6 - Bibliografia

- ¹ Kasarda, D.D.; Autran, J-C.; Lew, E.J-L.; Nimmo, C.C.; Shewry, P.R, *Biochim Biophys ACTA*, Elsevier, 1983, **747**, 138.
- ² Taha, S.A., *Acta Alimentaria*, 1997, **26**, 117.
- ³ Skerrit, J.H.; Devery, J.M.; Hill, A.S., *Panminerva Medica*, 1991, **33**, 65.
- ⁴ Singh, H.; MacRitchie, F., *J. Cereal Sci.*, 2001, **33**, 231.
- ⁵ Beccari, J.B., *De Bononiensi Sci Artium – Instituto Atque Commentaru*, 1745, **2**, 122.
- ⁶ Nicolas, Y.; Martinant, J-P; Denery-Papini, S.; Popineau, Y., *J Sci Food Agric.*, 1998, **77**, 96.
- ⁷ Bérot, S.; Gautier, S.; Nicolas, M.; Godon, B.; Popineau, Y., *Inter J Food Sci Tech*, 1994, **29**, 489.
- ⁸ Hargreaves, J.; Popineau, Y.; Meste, M.L.; Hemminga, M.A., *FEBS Letters*, 1995, **372**, 103.
- ⁹ Mifflin, B.J.; Field, J.M.; Shewry, P.R., *Seed Proteins*, Academic Press, 1983, 255.
- ¹⁰ Shewry, P.R.; Tatham, A.S.; Forde, J.; Kreis, M.; Mifflin, B.J., *J. Cereal Sci*, 1986, **4**, 97.
- ¹¹ Hussain, A.; Lukow, O.M., *Cereal Chemistry*, 1997, **74**, 791.
- ¹² Weegels, P.L.; Marseille, J.P.; Bosveld, P.; Hamer, R.J., *J. Cereal Sci.*, 1994, **20**, 253.
- ¹³ Robertson, G.H.; Cao, T.K.; Ong, I, *Cereal Chem*, 1999, **76**, 843.
- ¹⁴ Thomson, N.H., *Ph.D. Thesis*, University of Bristol, 1994.
- ¹⁵ Müller, S.; Wieser, H., *J Cereal Sci*, 1995, **22**, 21.
- ¹⁶ Müller, S.; Wieser, H., *J Cereal Sci*, 1997, **26**, 169.
- ¹⁷ Tatham, A.S.; Shewry, P.R., *J. Cereal Sci*, 1985, **3**, 103.
- ¹⁸ Örnebro, J.; Nylander, T.; Eliasson, A.-C, *J Cereal Sci*, 2000, **31**, 195.
- ¹⁹ Örnebro, J.; Wahlgren, M.; Eliasson, A.-C.; Fido, R.J.; Tathan, A.S., *J. Cereal Sci.*, 1999, **30**, 105.
- ²⁰ Anderson, O.D.; Litts, J.C.; Greene, F.C.; *Theor. Appl. Genet.*, 1997, **95**, 50.
- ²¹ Rumbo, M.; Chirido, F.G.; Giorgieri, S.A.; Fossati, C.A.; Anón, M.C, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3243.
- ²² Chirido, F.G.; Fossati, C.A.; Anón, M.C, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 2460.
- ²³ Marion, D.S.; Le Roux, C.; Akoka, S.; Tellier, C.; Gallant, D., *J. Cereal Sci.*, 1987, **5**, 101.
- ²⁴ Bietz, J.A., *Foods World*, Amer Ass. Cereal Chem, 1979, **24**, 5, 199.
- ²⁵ Wrigley, C.W., *Biochem. Gen.*, 1970, **4**, 509.
- ²⁶ Wrigley, C.W., Shepherd, K.W., *Ann N.Y. Sci.*, 1973, **209**, 156.
- ²⁷ Bietz, J.A., *Cereal Chem*, 1985, **62**, 201.
- ²⁸ Wieser, H., *Cereal Chem.*, 2000, **77**, 48.

-
- ²⁹ Larre', C.; Nicolas, Y.; Desserre, C.; Courcoux, P.; Popineau, Y., J. Cereal Sci., 1997, **25**, 143.
- ³⁰ Shomer, I.; Lookhart, G.L.; Vasiliver, R.; Bean, S., Journal of Cereal Science, 1998, **27**, 27.
- ³¹ Stryer, L. Biochemistry, 3rd. ed., Freeman, New York, 1988.
- ³² Sarin, V.K.; Kent, S.B.H.; Tam, J.P.; Merrifield, R.B., Anal. Biochem., 1981, **117**, 147.
- ³³ Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Anal. Biochem. 1970, **34**, 595.
- ³⁴ Tatham, A.S.; Shewry, P.R., J. Cereal Sci., 1995, **22**, 1.
- ³⁵ Dreese, P.C. and Hoseney, R.C., Cereal Chem , 1990, **67**, 400.
- ³⁶ Arêas, E.P.G.; Cassiano, M.M., Biophys. Chem. 2001, **90**, 135.
- ³⁷ Voet, D.; Voet, J.G., Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1990.
- ³⁸ Lundh, G.; Eliasson, A-C; Larsson, K., J. Cereal Sci., 1988, **7**, 1.
- ³⁹ Eliasson, A-C; Silverio, J., Ame. Ass. Cereal Chem., 1990, 11.
- ⁴⁰ Lamas, W. T. e Arêas, E. P. G. Resumos da 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, Vol 1, FQ-026, 2000.
- ⁴¹ Monteiro, AMF, Itri, R. e Arêas, E. P. G. – resultados não publicados.
- ⁴² Charbonnier, L., Biochimie, 1973, **55**, 1217.
- ⁴³ Khan, K.; Huckle, L.; Jones, B.L., Cereal Chem., 1991, **69**, 270.
- ⁴⁴ Belton, P.S.; Gil, A.M.; Grant, A.; Alberti, E.; Tatham, A.S., Spectrochim. Acta A, 1998, **54**, 955.
- ⁴⁵ Sollid, L.M., Ann. Rev. Immunology, 2000, **18**, 53.
- ⁴⁶ Elmoriani, K.; Thiévin, M.; Michon, T.; Popineau, Y.; Hallet, J-N.; Guéguen, J., Biochem Biophys Research Comm., 1997, **239**, 240.
- ⁴⁷ Marion, DS.; Le Roux, C.; Akoka, S.; Tellier, C.; Gallant, D., Journal of Cereal Science, 1987, **5**, 101.
- ⁴⁸ Matveev, Y.I.; Grinberg, V.Y.; Tolstoguzov, B.V., Food Hydrocolloids, 2000, **14**, 425.
- ⁴⁹ Cacace, M.G.; Landau, E.M.; Ramsden, J.J., Quarterly Rev. Biophys, 1997, **30**, 241.
- ⁵⁰ Huebner, F.R., Cereal Chem, 1994, **71**, 513.
- ⁵¹ Murrell, J.N.; Jenkins, A.D., Properties of Liquids and Solutions, John Wiley & Sons, Chichester, 1994.
- ⁵² Challa, G., Polymer Chemistry - An Introduction, Ellis Horwood, New York, 1993.
- ⁵³ Munk, P., Introduction to Macromolecular Science, John Wiley & Sons, New York, 1989.
- ⁵⁴ Rabek, J.F., Physical Properties of High Polymers Chemistry, Wiley, NY, 1980, 527.

-
- ⁵⁵ Duclairoir, C., thèse : Université de Caen, 2000.
- ⁵⁶ Duclairoir, C.; Nakache, E.; Marchais, H.; Orecchioni, A.M., *Colloids Polym Sci*, 1998, **276**, 321.
- ⁵⁷ Derjaguin, B.V. e Landau, L. *Acta phys.-chim.URSS*, 1941, **14**, 633.
- ⁵⁸ Verwey, E.J.W. e Overbeek, J.Th.G., *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Elsevier, 1948.
- ⁵⁹ Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*, 2a. ed., Academic Press, 1997.
- ⁶⁰ Shaw, D.J. *Introdução à química dos colóides e de superfícies*, Editora Edgard Blucher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo, 1975.
- ⁶¹ Hunter, R.J. *Introduction to Modern Colloid Science*, Oxford University Press, 1994.
- ⁶² Everett, D.H., *Basic Principles of Colloid Science*, Royal Society of Chemistry, 1994.
- ⁶³ Popineau, Y.; Godon, B., *Cereal Chem*, 1982, **59**, 55.
- ⁶⁴ Charbonnier, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, **359**, 142.
- ⁶⁵ Caldwell, K., A., *J Sci Food Agric.*, 1979, **30**, 185.
- ⁶⁶ Bietz, J.A.; Wall, J.S., *Cereal Chem.*, 1975, **52**, 145.
- ⁶⁷ Mimouni, B.; Robin, J.M.; Azanza, J-L.; Raymond, J., *J Sci Food Agric.*, 1998, **78**, 423.
- ⁶⁸ Toba, S.; Merz, K.M.Jr, *J Ame Chem Soc*, 1997, 119, 9939.
- ⁶⁹ Kobara, H.; Wakisaka, A.; Takeuchi, K.; Ibusuki, T., *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 11827.
- ⁷⁰ Mark, J.E, ed., *Physical Properties of Polymers*, ACS, 1993.
- ⁷¹ Glatter, O. e Kratky, O. *Small angle X-ray scattering*, Academic Press, London, 515 p., 1982.
- ⁷² Van Holde, K.E., *Bioquímica Física*, Edgard Blucher, 1975.
- ⁷³ Hiemenz, P.C., *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Marcel Dekker Inc., NY, 1986.
- ⁷⁴ Pike, E.R.; Pomeroy, W.R.M.; Vaugham, J.M.; *J. Chem. Phys.*, 1975, **62**, 3188.
- ⁷⁵ McConnell, M.L. (1981) *Anal. Chem.* **53**, 1007.
- ⁷⁶ Ruf, H., Georgalis, Y., Grell, E., *Methods Enzymol.* 1989, **172**, 364.
- ⁷⁷ Koppel, D.E., *J. Chem. Phys.*, 1972, **57**, 4841.
- ⁷⁸ Stock, R.S., Ray, W.H., *J. Polym. Sci.: Polym. Phys.*, 1985, **23**, 1393.
- ⁷⁹ Ju, R.T.C., Frank, C.W., Gast, A.P., *Langmuir*, 1992, **8**, 2165.
- ⁸⁰ Hou, M. J., Kim, M., Shah, D.O. *J. Colloid Interface Sci.*, 1988, **123**, 398.
- ⁸¹ Jada, A., Lang, J., Zana, R., Makhkoufi, R., Hirsch, E., Candau, S. J. *J. Phys. Chem.*, 1990a, **94**, 381.
- ⁸² Jada, A., Lang, J., Zana, R., Makhkoufi, R., Hirsch, E., Candau, S. J., *J. Phys. Chem.* 1990b, **94**, 387.

-
- ⁸³ Mant, C.T.; Hodges, R.S., High Performance liquid Chromatography of Peptides and Proteins, CRC Press.
- ⁸⁴ Carcea, M.; Schofield, J.D., J. Cereal Sci., 1996, **24**, 101.
- ⁸⁵ Stevenson, S. G; Preston, K. R., J. Cereal Sci., 1996, **23**, 121.
- ⁸⁶ Booth, M.R.; Botomley, R.C., Ellis, J.R.S, Malloch, G, Schofield, J.D.; Timms, M.F., Annales de Technologie Agricole, 1980, **29**, 399
- ⁸⁷ Thomson, N.H.; Miles, M.J., Tatham, A.S.; Shewry, P.R, Ultramicroscopy, 1992, **42**, 1204.
- ⁸⁸ Thomson. N.H.; Miles, M.J.; Popineau, Y.; Harries, J.; Peter Shewry, P.; Tatham, A.S., Biochim. Biophys. Acta, 1999, **1430**, 359.
- ⁸⁹ Pires, P.A.R., Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2002.
- ⁹⁰ CRC Handbook of Chemistry and Physics, 76th ed., D.R. Lide, ed., CRC Press, New York, 1995-1996.

V - Conclusões gerais e perspectivas

Os resultados do trabalho desta Tese tiveram suas conclusões específicas relatadas em cada um dos capítulos correspondentes. De um modo geral, porém, poderíamos condensá-las indicando que:

- a) gliadinas exibiram um comportamento viscoelástico complexo e em certos casos bastante peculiar quando dispersos nos meios orgânicos e aquo-orgânicos ensaiados. Alguns aspectos interessantes de seu comportamento mecânico incluíram a dependência do comportamento tixotrópico ou reopéxico com a temperatura e a ocorrência de um comportamento cíclico para a viscosidade em função do tempo.
- b) foi possível correlacionar aspectos da estrutura molecular e polaridade do solvente com sua capacidade de formação de gel: solventes apróticos com regiões apolares expressivas como DMSO e DMF (constantes dielétricas, ϵ , iguais a 47,24 e 38,25, respectivamente) induziram a formação de géis rígidos, enquanto um solvente prótico de alta polaridade ($\epsilon = 84$) como formamida, destituído de domínio apolar minimamente significativo, mostrou capacidade significativamente menor de promover a formação de géis com as mesmas características.
- c) gliadina ω , preferencialmente extraída por tratamento com etanol, mostrou-se capaz de reduzir a elasticidade de membranas de microvesículas de fosfolípidos, aumentando o valor de sua constante elástica de curvatura, k_c . Um efeito de saturação do efeito foi observado, para uma razão de massa tão baixa quanto gliadina/DOPC ~2-3%.
- d) Coeficientes de difusão para as dispersões de gliadina foram da ordem de $10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, com raios hidrodinâmicos na faixa nm- μm . Duas populações dinamicamente distintas foram identificadas nos géis produzidos.
- e) O grau de polidispersão e o tamanho dos agregados mostraram dependência com a concentração da proteína e sofreram variação com o tempo, indicando a ocorrência de rearranjos estruturais na fase de envelhecimento.

O presente trabalho coloca desafios a serem vencidos, como a necessidade de encontrar formas mais adequadas para o encaminhamento de uma abordagem experimental que permita o estabelecimento de correlações entre funcionalidade e estrutura. Em sistemas complexos, no entanto, esse objetivo confronta-se com a limitação representada pela própria complexidade dos sistemas. É preciso não esquecer que a resposta do sistema complexo não é uma simples função aditiva das respostas dos seus componentes. Assim, se tornamos o sistema menos complexo (em nosso caso, por exemplo, pelo isolamento de todas as sub-frações da gliadina), perdemos a complexidade da resposta, a qual resulta da complexidade estrutural e que constitui justamente o ponto de interesse. Se, no entanto, abordamos os sistemas em seu conjunto, embora tenhamos a resposta dinâmica global, esta é pouco resolvida em termos das correlações com aspectos de estrutura, que é a finalidade última da investigação. Cumpre assim considerar a necessidade de encontrarmos caminhos para, partindo-se de dados para os componentes isolados, evoluirmos para a construção de modelos para os sistemas complexos. Este é um desafio certamente mais intelectual do que prático, embora a experimentação exigida venha a tornar-se também necessariamente mais extensa do ponto de vista de procedimentos preparativos e de caracterização.

Outro aspecto que nos parece relevante no contexto desta Tese, no que se refere a perspectivas para sua continuidade a longo prazo, é o conjunto de questões de natureza biológica e físico-química pouco triviais que se colocam. Na abordagem de sistemas protéicos de relevância biomecânica, dentre as quais se situam as proteínas do glúten, algumas dessas questões seriam:

- a) de que modo proteínas sujeitas a campos de cisalhamento em microambientes biológicos respondem a esses estímulos? Que efeito tais respostas podem ter na resposta biológica esperada? Como aspectos fisiológicos/patológicos podem ser reconsiderados à luz dessas informações?
- b) considerando-se que estruturas de proteínas são determinadas em condições de não perturbação mecânica, seria razoável esperar-se que nas situações *in vivo* em que o fluxo seja um fator relevante (p. ex. corrente sanguínea nos grandes vasos ou nas vias capilares; em regiões sujeitas a movimentos peristálticos, como no trato digestivo, entre outros) tais estruturas sejam distintas a um nível capaz de afetar nossa atual compreensão de suas funções?

- c) sob um ponto de vista de aplicação: como proteínas podem ser manipuladas do ponto de vista de seu papel como materiais de interesse (bio) tecnológico, considerando-se sua capacidade potencial como elementos de grande plasticidade, aliada ainda ao vantajoso aspecto de sua biocompatibilidade?

Esses e outros aspectos constituem pontos para reflexão e certamente tornam ainda mais interessante a investigação das muitas questões emergentes nessa área do conhecimento.

CURRICULUM VITAE

- Nome Angela Maria Ferreira Monteiro
- Nascimento Niterói, Rio de Janeiro, 01.06.53
- Registro Profissional CRQ 03311140 3a Região

FORMAÇÃO

Doutorado-sandwich - Institut Le Bel/CNRS – França, Estrutura Dinâmica e Propriedades Mecânicas de Membranas de Fosfolípidos e Proteínas, ago/02.

Mestrado em Química - Puc-RJ, “Estudo da Aplicação da Espectroscopia NIR FT-Raman no Diagnóstico de Câncer de Pele”, ago/98.

Engenharia Química - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, dez/75.

IDIOMAS

Inglês e Francês para leitura, escrita e conversação.
Alemão e Espanhol para leitura de textos técnicos.

SUMÁRIO DA EXPERIÊNCIA

Experiência diversificada, incluindo micromanipulação, em microscópio ótico, de vesículas gigantes de fosfolípidos em presença de proteína vegetal; purificação de proteínas vegetais em FPLC; reologia de soluções vegeto-protéicas viscoelásticas; implantação de laboratório de metrologia, sistema de garantia da qualidade, normalização; supervisão de projeto de norma de âmbito nacional para o meio-ambiente; supervisão de processo em área petroquímica e alcoolquímica; pesquisa de combustíveis alternativos e produtos para tratamento de água; melhorias operacionais (com uso de análise estatística) para a fabricação de graxas lubrificantes; projeto básico de estações de distribuição de combustíveis; experiência em engenharia de instrumentação/automação, com ênfase em petróleo on-shore e off-shore; professora de Tecnologia Química e Termodinâmica em Universidade Federal. Conhecimentos em micro informática e uso de redes. Estudo privado de plantas medicinais.

PUBLICAÇÕES

- A.M.F. Monteiro; E.P.G.Arêas; A. Schröder; N. Fa - Gliadin effect on fluctuation properties of phospholipid giant vesicles, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2004; 34: 53-57.
- A.M.F. Monteiro; N. Fa; ; E.P.G.Arêas; A. Schröder; C. Marques - Gliadin effect on giant vesicle elastic modulus, Progr. Colloid Polym. Sci. 2004; 128: 184-186.
- H.G.M. Edwards; D.W. Farwell; D.LA. de Faria; A.M.F. Monteiro; M. Coutinho; P. de Blasis; S. Eggers - Raman spectroscopic study of 3000-year-old human skeletal remains from sambaqui, Santa Catarina, Brazil – J. Raman Spectrosc. 2001; 32: 17-22

TRABALHOS APRESENTADOS

- Gliadin effects on giant vesicle elastic modulus, A.M.F. Monteiro; N. Fa; A. Schröder; C. Marques; E.P.G.Arêas – 11th International Conference on Surface and Colloid Science, IACIS, set/03.
- Comportamento reológico de gliadina em meio orgânico - A.M.F. Monteiro; M.A. da Silva; E.P.G. Áreas - 26^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, maio/03.

- Low angle X ray scattering (SAXS) of gliadin gels in organic medium, A.M.F. Monteiro; E.P.G. Áreas; R. Itri - XXIV Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada – SBF, maio/01.
- Uso de espectroscopia Raman em arqueologia: primeiros resultados, A.M.F. Monteiro; D.L.A. de Faria; H.G.M. Edwards; D.W. Farwell; M. Coutinho; P. de Blasis; S. Eggers, 23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ, maio/00.

EXPERIÊNCIA NO EXTERIOR

Doutorado-Sandwich no Laboratoire de Dynamique des Fluides Complexes, Institut Le Bel/CNRS, Université Louis Pasteur – Strasbourg – França, pelo período de 1 ano (2001/2002), sob orientação do Dr. Carlos Marques do Institute de Physique, desenvolvendo o projeto de pesquisa, pelo convênio CAPES-COFECUB (nº312/00-II).

EMPREGO ATUAL

- INT – Instituto Nacional de Tecnologia – ingressa no concurso de 2004, na Unidade de Metrologia em Química.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- **Consultoria em projetos básicos e de instrumentação:** ECR/UTC/ PETROBRAS P-32 (Plataforma-navio Visconde de Cairu); NATRON – Projeto Alcanorte; ENGEPROTEC - fábrica de fermento biológico da Fleischmann Royal, duas plantas de tancagem de GLP (PETROBRÁS) e a duplicação da planta da LAB da DETEN; DYNA/NATRON - a planta de Argila Ativada da Cia. Química, (UPGN) da REDUC II e de Cabiúnas; SHELL Brasil - duas plantas de engarrafamento de GLP, Ampliação da Base de Cascavel.
- **Processo em Indústrias Químicas:** SALGEMA - supervisão das unidades de Dicloroetano (DCE), Eteno Alcoolquímico, Utilidades e Tratamento de Efluentes; SHELL Brasil - melhoria da qualidade de graxas; ECOLAB - Chefe de Controle de Qualidade, Tratamento de água industrial; BSB Serviços Empresariais – responsável técnica de produtos organo-clorados e organo-fosforados; CIA. FLUMINENSE INDUSTRIAL (Indústria de Papel) - regeneração de sucata e tratamento de água industrial.
- **Qualidade / Normalização / Metrologia:** CEPED - Coordenadora de Metrologia; ABNT - Supervisora Técnica do Projeto Selo Verde; ENGEPROTEC - Gerente de Departamento Técnico, implantar laboratório de Metrologia Industrial, revisar as normas existentes e elaborar outras necessárias, calibração de instrumentação industrial, implantar e manter o Sistema de Garantia da Qualidade; SHELL BRASIL - desenvolvimento de normas técnicas de engenharia, representante da Empresa na ABNT para elaboração de normas sobre o uso de gás natural comprimido como combustível automotivo.
- **Pesquisa / Análise pericial:** SHELL BRASIL - Desenvolvimento de novos testes e testes de novos materiais de embalagem, estudos exploratórios sobre degradação de lubrificantes para motores a álcool. Estudos de viabilidade técnico-econômica do uso de gás natural como combustível automotivo, incluindo anteprojeto de estação de abastecimento e desenvolvimento de lubrificantes para motores a gás. Desenvolvimento de lubrificantes para motores de dois tempos. Estudos de novos processos de extração de óleos vegetais. ECOLAB - formulações para atender necessidades de mercado de diferentes setores: naval, industrial, hospitalar, agropecuária, alimentos, etc.
- **Atividades didáticas:** UFMT - Auxiliar de Ensino, cadeiras de Termodinâmica Química, Tecnologia de Química Inorgânica e Química Geral Inorgânica.