

VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA MINIATURIZAÇÃO DO AMIDO, ESTUDO DA VISCOSIDADE E DETERMINAÇÃO DA M_w POR DLS

Andresa C. Ribeiro¹, Gisele L. Peres^{1*}, Gabriela R. Chagas¹, Nádyá P. da Silveira¹

¹Departamento de Química – UFRGS – RS - Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil
(glperes@yahoo.com.br)

Resumo – A amilopectina, um componente do amido, apresenta uma grande aplicabilidade como biomaterial. No entanto, em muitas aplicações, é necessária a utilização de polissacarídeos com baixa massa molecular devido principalmente a qualidade de difusão destes. Uma técnica eficiente para redução da massa molecular e viscosidade de um polissacarídeo sem alterar sua estrutura química é a técnica de ultrassom. Por esta razão, neste trabalho, a amilopectina foi analisada em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 90% (v/v) antes e após o tratamento de ultrassom. O objetivo foi avaliar o uso desta técnica para a miniaturização do biopolímero. Para análise antes e após o tratamento de ultrassom utilizou-se as técnicas de espalhamento de luz dinâmico e viscosidade, acompanhadas de medidas de pH, condutividade e temperatura. Observou-se uma diminuição no tamanho das moléculas e na viscosidade após o tratamento ultrasônico em todas as condições analisadas o que valida o método para a miniaturização da amilopectina.

Palavras-chave: *amilopectina, ultrassom, viscosidade, reologia, espalhamento de luz*

Introdução

A amilopectina, um dos componentes do amido, é uma molécula altamente ramificada, com massa molecular variando de 10^7 - 10^9 g.mol⁻¹ [1]. A mesma é constituída por unidades de glicose unidas em α - (1→4) e 5% de unidades α - (1→6), os quais têm um efeito profundo sobre suas propriedades físicas e biológicas [1, 2]. O amido e os seus componentes apresentam uma grande aplicabilidade, tais como: espessante ou modificador em reologia, adesivos, agente de liberação controlada de drogas, cosméticos e alimentos, para a entrega de agrotóxicos, fertilizantes e produtos químicos na agricultura, na indústria de embalagens e papéis e etc. No entanto, várias propriedades dos materiais dependerão do tamanho e da estrutura interna dos seus constituintes [3]. Para determinada aplicação, por exemplo, polissacarídeos de menor massa molecular têm vantagens sobre candidatos de alta massa molecular, devido à sua maior difusão nos tecidos biológicos [2].

Vários estudos revelaram que o encurtamento das cadeias macromoleculares de polissacarídeos pode ser obtido pelo método de ultrassom [4, 5]. Esta técnica consiste na geração de bolhas por cavitação para a quebra da cadeia polimérica. As ondas de ultrassom se propagam no meio e, durante esses ciclos, pequenas bolhas se formam e expandem devido à difusão de gás. As forças de cisalhamento criadas devido ao colapso destas bolhas podem romper as ligações covalentes em materiais poliméricos [6]. Acredita-se que a exposição prolongada das soluções de macromoléculas por ondas de ultrassom produz uma redução permanente da viscosidade, promovendo como efeito adicional à redução da massa molecular do polímero. Assim, o presente processo é eficiente porque causa a quebra apenas das ligações químicas mais susceptíveis sem alterar a sua estrutura química [2, 7].

Ao longo dos últimos anos, vários estudos têm sido feitos sobre a aplicação desta técnica no amido [2, 8, 9], no entanto, nenhum estudo tem aparecido sobre os efeitos do processo de ultrassom sobre a viscosidade e o peso molecular da amilopectina. Visando avaliar a eficácia do processo de ultrassom sobre a amilopectina em solução, utilizou-se as técnicas de espectroscopia de espalhamento de luz dinâmico e viscosimetria, acompanhadas de medidas de pH, condutividade e temperatura. A partir das análises de DLS foi possível obter o diâmetro hidrodinâmico (d_h), o índice de polidispersão ($PD.I$) e através da intensidade, foi possível calcular a massa molecular (M_w) do biopolímero. Os dados são apresentados e discutidos.

Parte Experimental

Material

O amido de mandioca Amidex 40003, do tipo Waxy, foi fornecido pela CornProducts Brazil Ingredientes Industriais Ltda. (Jundiaí, SP, Brazil). O biopolímero utilizado foi extraído a partir do Amidex 40003, contendo 20% de amilose e 80% de amilopectina. Os solventes empregados, de grau analítico, foram o dimetilsulfóxido (DMSO) e água (H₂O). Os reagentes de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company e utilizados tais como recebidos.

Métodos de preparo da amostra e análise

Preparação da solução de amilopectina (solução estoque)

Solução de amilopectina (solução estoque) na concentração $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi preparada por dissolução do Amidex 40003 usando solução aquosa de DMSO 90% como solvente. A solução foi mantida sob agitação magnética a uma temperatura de 30°C , durante 65 h até a sua dissolução total, com NaN_3 (azida de sódio) adicionado como um agente antibacteriano. A dispersão foi da coloração opaca para translúcida depois de 30 h (o tempo foi dependente do nível de conversão de amido), e não foram encontrados agregados residuais. Os resultados da média e desvio padrão obtidos no controle do processo de solubilização da solução estoque (4mg.mL^{-1}) para abs (620 nm), pH, Índice de refração e Condutividade (μS) foram respectivamente: $0,0410 \pm 0,009$, $8,78 \pm 0,083$, $1,4653 \pm 0,001$ e $0,819 \pm 0,071$.

Preparação da solução de amilopectina tratada

As soluções estoque ($15 \text{ mL} - 4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) de amilopectina foram submetidas a ultrassom utilizando um Digital Sonifier model 250 e 450 da Branson Ultrasonic Corporation. Após este processo, a solução estoque passou a se chamar amilopectina tratada. A irradiação foi aplicada a intervalos de tempo variando de 0,5 a 3,0 min em amplitudes que variam entre 10% e 100%.

Determinação do pH

As medições de pH foram realizadas a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ usando um medidor de pH Digimed modelo MS-23, com um eletrodo de vidro combinado. O medidor de pH foi previamente calibrado com soluções padrão, a $\text{pH} = 7,0$ e $\text{pH} = 10$.

Medidas de condutividade

As medidas de condutividade foram realizadas a $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ usando um Condutivímetro de Bancada Microprocessado Bel Engineering srl, modelo W12D.

Medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As amostras das soluções de amilopectina sonificadas foram diluídas a partir de 1 mL da solução de amilopectina (4mg.mL^{-1}), em 5mL do solvente (DMSO/ H_2O), logo em seguida as soluções foram colocadas em cubetas óticas e centrifugadas por 40 min, sob rotação de 2600 rpm (ALC Centrifuge PK120). As mesmas foram analisadas em um espectrômetro do espalhamento de luz Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-900), com laser de He-Ne ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$) como fonte de radiação à temperatura de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. O incremento do índice de refração (dn/dc), foi determinado em um refratômetro diferencial BI-DNDC da Brookhaven Instruments Corporation, com um software DNDCW WindowsTM, com laser de 620,0 nm. Usou-se a razão de Rayleigh [10-12], e através das flutuações temporais na intensidade de luz espalhada devido a flutuações de concentração e densidade na amostra (causas do movimento Browniano), foi possível calcular a M_w da solução. Isto correspondente a uma solução diluída ideal, em que não há dependência angular: $K_c/R_\theta = 1/M_w$. Estudos posteriores foram realizados por Espalhamento de Luz Estático (SLS) usando o método de Berry para determinação da M_w utilizada. Os valores encontrados foram semelhantes aos obtido por DLS o que corrobora a validade do método.

Medidas de viscosidade

As amostras foram avaliadas em um viscosímetro Digital Brookfield (Modelo DV-II+PRO) utilizado como spindle a ULA. O viscosímetro foi acoplado a um banho termostático, permitindo assim mensurar a viscosidade das soluções no intervalo de 10°C a 70°C , com precisão de temperatura de $0,5^\circ\text{C}$, sempre que necessário. 20 mL de amostra com velocidade inicial de 40 rpm, num intervalo de tempo de 15 s e 15 medidas foram utilizados. Os valores de η reportados neste trabalho referem-se aos valores médios, obtidos por triplicata em cada valor de velocidade de rotação.

Resultados e Discussão

Efeito da técnica de ultrassom sobre o pH, condutividade, temperatura, massa molecular (M_w), diâmetro hidrodinâmico (d_h) e índice de polidispersão (PD.I) da amilopectina tratada

Como pode ser visto na Tabela 1, é observada uma ligeira diminuição no pH das soluções tratadas com a técnica de ultrassom em comparação com a solução estoque. Além disso, é observado um aumento na condutividade. Sugere-se que durante o ultrassom ocorre a formação de radicais livres que causam um aumento na condutividade e uma diminuição no pH. Ou seja, o aumento da intensidade do ultrassom causou um aumento da intensidade da cavitação, responsáveis pela formação dos radicais livres.

Tabela 1. Diâmetro hidrodinâmico (d_h), o índice de polidispersidade (PD.I), o peso molecular (M_w), pH e temperatura da solução estoque e amilopectina tratada. Para a amilopectina tratada as medidas foram realizadas em diferentes tempos e amplitudes.

Amostras	pH	Condutividade (μS)	T ($^\circ\text{C}$)	M_w (g/mol)	d_h (nm)	PD.I
Solução estoque	8,78	0,819	22,0	$5,12 \times 10^6$	342,6	0,391

Solvente	8,46	1,194				
1 min 30%	8,14	1,261	23,8	$5,97 \times 10^{-5}$	158,6	0,146
1 min 60%	7,90	1,255	28,9	$5,76 \times 10^{-5}$	111,4	0,176
1 min 80%	7,71	1,241	35,3	$7,15 \times 10^{-5}$	105,4	0,183
1 min 100%	7,20	1,144	45,9	$1,23 \times 10^{-5}$	103,4	0,196
2 min 30%	7,63	1,130	30,3	$9,68 \times 10^{-5}$	107,6	0,186
2 min 60%	7,42	1,128	37,5	$3,98 \times 10^{-5}$	87,7	0,185
2 min 80%	7,31	1,115	41,2	$5,44 \times 10^{-5}$	84,5	0,207
2 min 100%	7,11	1,047	45,8	$3,88 \times 10^{-5}$	75,3	0,249
3 min 30%	7,59	1,251	39,2	$8,07 \times 10^{-5}$	88,7	0,190
3 min 60%	7,57	1,234	43,2	$4,47 \times 10^{-5}$	80,1	0,216
3 min 80%	7,56	1,226	47,2	$4,48 \times 10^{-5}$	85,7	0,253
3 min 100%	7,56	1,195	52,0	$4,67 \times 10^{-5}$	85,9	0,259

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

A M_w foi analisada em função do tempo e amplitude de vibração (Tabela 1). Observou-se que houve uma redução superior a 50% em relação à M_w das soluções tratadas em comparação com a solução estoque. A redução, após a utilização da técnica de ultrassom, é devido à clivagem da espinha dorsal de amilopectina, que resulta em uma diminuição da M_w , reduzindo o volume eficaz das cadeias de polissacarídeos, ou seja, as forças hidrodinâmicas que resultam da aplicação de ultrassom são suficientes para causar a ruptura da cadeia polimérica. Uma tendência semelhante é observada para outros polímeros e biopolímeros, tais como o pululano, a quitosana e etc [13, 14].

Para confirmar estes resultados, o d_h e o $PD.I$ também foram medidos (Tabela 1). Os resultados mostraram claramente uma ruptura das partículas de grandes dimensões e a formação de distribuição de tamanho de partícula mais estreitas o que resulta em partículas menores em todos os tempos e amplitudes. Observou-se também que a solução estoque mostrou um $PD.I$ mais elevado do que a amilopectina tratada (após ultrassom). Quanto menor for o $PD.I$ mais estreita a distribuição da massa molecular [14]. Apesar disso, o $PD.I$ é variável no tempo e amplitudes. Isto pode estar relacionado com as diferentes unidades de amilopectina formadas após a técnica de ultrassom.

Efeito da técnica de ultrassom sobre a viscosidade da amilopectina tratada

A Figura 1a permite avaliar o efeito de ultrassom sobre a viscosidade das amostras. Pode-se observar uma redução na viscosidade da amilopectina tratada com a técnica do ultrassom. Este fato confirma a redução da M_w acima comentada. Além disso, também podemos afirmar que o biomaterial apresentou um comportamento pseudoplástico.

Para amilopectina tratada também observamos uma ligeira diminuição na viscosidade com uma tendência a um comportamento newtoniano, com o aumento da taxa de cisalhamento. Como sugerido anteriormente, a diminuição da viscosidade é devida a diminuição da M_w da macromolécula tratada por ultrassom, isto é, crê-se que a força de cisalhamento é reduzida com a diminuição da viscosidade devido ao alongamento da cadeia de amilopectina.

Curvas tensão versus deformação (Fig. 1b) também foram descritas pelo modelo Lei da Potência, que é amplamente utilizado para descrever as propriedades de líquidos não-newtonianos em análise teórica, bem como em aplicações práticas [5].

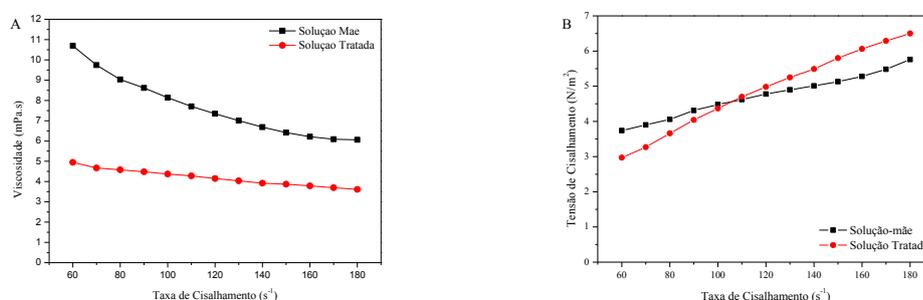


Figura 1 a e b. a) Viscosidade versus taxa de cisalhamento da solução estoque e da solução tratada na temperatura ambiente e b) Tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento para a solução estoque e solução tratada à temperatura ambiente.

Novamente podemos afirmar que as amostras apresentaram um comportamento pseudoplástico não-newtoniano com valores de índice de comportamento de fluxo (n) variando de 0,31 para solução estoque e 0,48 para

amilopectina tratada. O modelo de Lei de Potência foi adequado para descrever o comportamento do fluxo das amostras, uma vez que os coeficientes (R) medidos foram 0,97. Além disso, é possível observar que a viscosidade é mais estável para a amilopectina tratada. Sugere-se que isto ocorre porque, nesta amostra as cadeias de amilopectina são mais alongadas, ou seja, mais flexíveis. Outros estudos obtiveram resultados semelhantes, com uma diminuição da viscosidade com o aumento do taxa de cisalhamento [5]. Os coeficientes de consistência (k) também diminuíram com valores de 145,6 para solução estoque e 45,1 para a amilopectina tratada. A redução dos valores de k poderia ser atribuída à clivagem da cadeia nestas amostras quando foram sonificadas.

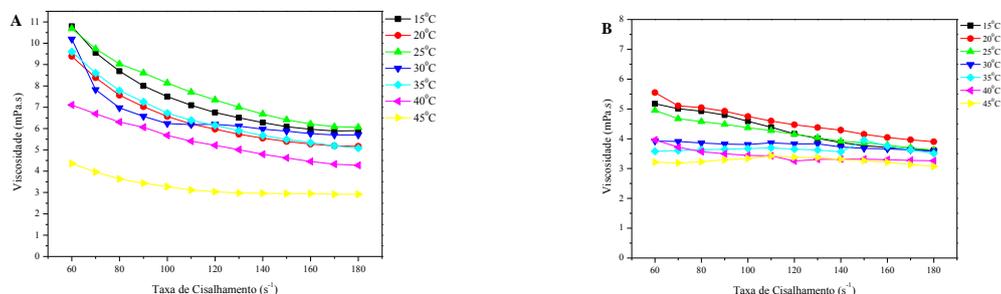


Figura 3a e b. Gráfico da viscosidade versus temperature: a) para a solução estoque e b) solução tratada.

É claramente observado nas figuras 3 a e b que a viscosidade diminuiu nas duas amostras, como o aumento da temperatura. Além disso, observaram-se duas regiões no gráfico: uma região com baixa taxa de cisalhamento (onde a viscosidade diminuiu drasticamente, sugerindo um comportamento pseudoplástico) e uma região de elevada taxa de cisalhamento (em que a viscosidade tende a ser constante, indicando um comportamento newtoniano). Para a amostra tratada, esse comportamento foi mais evidente. Sugere-se que quando a temperatura aumenta ocorre uma diminuição na densidade do solvente, e, assim, a massa efetiva dos polímeros em unidade de volume de solvente também diminui. Este fato causa uma diminuição na viscosidade das amostras, devido ao aumento da flexibilidade da cadeia e compactação da molécula. No entanto, a certa temperatura, a diminuição da massa não é significativa e a viscosidade não varia.

Conclusão

A partir dos resultados alcançados é possível concluir que a técnica de ultrassom, utilizada para miniaturização da amilopectina é adequada para redução e controle do tamanho da cadeia polimérica ramificada da amilopectina natural, possuindo uma boa repetibilidade e seletividade. As análises espectroscópicas comprovaram a redução da M_w , do d_h e do $PD.I$ da amilopectina. O estudo da viscosidade permitiu caracterizar a amilopectina tratada como um fluido pseudoplástico não-newtoniano, sendo que o aumento da temperatura do sistema reduziu a viscosidade da solução.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Capes/Bolsa Reuni, a CNPq e a FAPERGS pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] V. Singh, K. Kumari, *Macromol. Symp.* 320 (2012) 81-86.
- [2] Y. Iida, T. Tuziuti, K. Yasui, A. Towata, T. Kozuka, *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 9 (2008) 140-146.
- [3] J. Szymonska, M. Targosz-Korecka, F. Krok, *J. Phys.: Conf. Ser.* 146 (2009) No pp. given.
- [4] S. Karaman, M.T. Yilmaz, M.F. Ertugay, M. Baslar, A. Kayacier, *Ultrasonics Sonochemistry* 19 (2012) 928-938.
- [5] L. Zhang, X. Ye, T. Ding, X. Sun, Y. Xu, D. Liu, *Ultrason. Sonochem.* 20 (2013) 222-231.
- [6] M. Farzi, M.M. Saari, Z. Emam-Djomeh, M.A. Mohammadifar, *Int. J. Food Sci. Technol.* 46 (2011) 849-854.
- [7] A. Grönroos, P. Pirkonen, O. Ruppert, *Ultrasonics Sonochemistry* 11 (2004) 9-12.
- [8] T.O.J. Blomfeldt, R. Kuktaite, T.S. Plivelic, F. Rasheed, E. Johansson, M.S. Hedenqvist, *RSC Advances* 2 (2012) 6617-6627.
- [9] M. Sujka, J. Jamroz, *Food Hydrocolloids* 31 (2013) 413-419.
- [10] D.P. Shelton, *Journal of Chemical Physics* 138 (2013).
- [11] R. Pecora, *Journal of Nanoparticle Research* 2 (2000) 123-131.
- [12] F.C. Giacomelli, N.P.d. Silveira, in: A.R. Pohlmann, C.O. Petter, N.M. Balzaretto, S.S.G. (Org.), (Eds.), *Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia*, Editora da UFRGS Porto Alegre, 2008 pp. 93-106.
- [13] S.M.H. Hosseini, Z. Emam-Djomeh, S.H. Razavi, A.A. Moosavi-Movahedi, A.A. Saboury, M.S. Atri, d.M.P. Van, *Food Hydrocolloids* 32 (2013) 235-244.
- [14] S. Koda, K. Taguchi, K. Futamura, *Ultrason Sonochem* 18 (2011) 276-81.