



**Andreia Mariana  
Valinho Dias**

**Análise estrutural de farinhas e alguns dos seus  
componentes**



**Andreia Mariana  
Valinho Dias**

**Análise estrutural de farinhas e alguns dos seus  
componentes**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química e qualidade dos alimentos, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor José António Lopes da Silva, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus Pais.

## **O júri**

Presidente

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro.

Vogais

Doutora Maria Luísa Beirão da Costa, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Doutora Ana Maria Pissarra Coelho Gil, Professora Associada da Universidade de Aveiro (orientadora).

Doutor José António Lopes da Silva, Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro (Co-orientador).

## **Agradecimentos**

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Doutora Ana Gil, professora e orientadora, pela disponibilidade revelada ao longo de todo o período de Mestrado e pelas críticas e sugestões tão relevantes feitas durante a orientação.

Ao Doutor António Lopes da Silva, co-orientador, pelo acompanhamento desta dissertação.

À Dr.<sup>a</sup> Paula Esculcas, pelo enorme apoio durante as sessões no espectrómetro de RMN de sólidos.

Ao Doutor Bogdan Dobraszczuk e à Doutora Weili Li, ambos do Departamento de *Food Biosciences* – Universidade de Reading UK, pela orientação dada em Reading, bem como pela disponibilidade e amizade então demonstradas.

Ao Doutor António Barros, pela colaboração ao nível da análise em componentes principais.

À Cláudia Almeida, pela amizade, apoio, compreensão e ânimo dados durante todo este tempo.

A todos os meus colegas e amigos da Universidade de Aveiro, pelo apoio e disponibilidade, em especial, a Joana Barata, Carla Santos, Sandra Pinto, Regina Monteiro e Luís Vale.

Aos colegas do Mestrado pela boa relação pessoal que criámos e que espero que não se perca.

Aos meus Pais e aos meus irmãos, Márcia Dias e Mário Dias, pela compreensão, ternura e amor incondicionais, sempre manifestados apesar do “débito” de atenção, e pela excitação e orgulho com que sempre reagiram aos meus resultados académicos.

Por último, mas não menos importante, ao Gonçalo Ramalhosa, pelo amor, força e apoio sempre demonstrados.

**palavras-chave**

Farinha, Glúten, Amido, Glucose, FTIR, Raman, RMN, Quimiometria.

## resumo

Com o presente trabalho pretende-se contribuir para uma melhor compreensão da conformação das proteínas do trigo, através de técnicas de espectroscopia vibracional, mais precisamente a espectroscopia de Infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) e a espectroscopia de Raman. Pretende-se também explorar o potencial de FTIR e espectroscopia de Raman para a caracterização rápida de farinhas para a detecção do grau de dureza ou ocorrência de doença. Pretende-se, finalmente, avaliar o comportamento ao nível da organização e dinâmica moleculares, da glucose, amido e farinha, partindo do sistema mais simples para o mais complexo, através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de sólidos.

No capítulo 1 estão apresentados os diversos objectivos gerais desta dissertação. Segue-se o desenvolvimento dos vários conceitos teóricos que servem de base a este estudo. Ainda neste capítulo é relatada a composição do trigo, sendo dada especial ênfase ao amido e glúten e são ainda descritos, de uma forma resumida, os fundamentos e os métodos de espectroscopia de FTIR, Raman, RMN de sólidos e quimiometria.

No capítulo 2 é apresentada uma análise estrutural de diferentes amostras de farinha e respectivo glúten, através das técnicas de espectroscopia vibracional, FTIR e Raman, no estado seco e no estado hidratado. Os espectros obtidos permitem obter informação acerca da conformação das proteínas das amostras em estudo. Através de análise directa dos espectros é possível também observar diferenças a nível conformacional entre amostras hidratadas e amostras secas. Ainda no decorrer deste capítulo, é descrita a aplicação de dois métodos quimiométricos, a análise em componentes principais (PCA) e regressão parcial em mínimos quadrados – análise discriminante (PLS-DA) para correlacionar os dados espectrais de FTIR das farinhas, com propriedades específicas tais como tipo de dureza e ocorrência de doença (especificamente, presença do fungo do género *Tilletia*). Para determinadas zonas do espectro é possível separar as amostras extra-duras e duras das amostras extra-suaves e suaves, bem como separar amostras com doença das respectivas saudáveis, com base nas proteínas e nos carboidratos.

No capítulo 3 aplicou-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de sólidos para avaliar o comportamento (organização e dinâmica moleculares) da glucose, amido e farinha, partindo do sistema mais simples para o mais complexo. Todos os sistemas, desde o mais simples ao mais complexo são submetidos a hidratação e a um ciclo de variação de temperatura, para assim se observar o tipo de resposta dada por estes sistemas ao nível da dinâmica e organização moleculares. Através de espectroscopia de RMN do estado sólido é possível fazer a atribuição dos principais sinais dos espectros para as 5 formas de glucose, amido e farinha e fazer a distinção das formas através dos resultados dinâmicos. A aplicação deste método espectroscópico, na glucose vidro, permitiu pela primeira vez caracterizar esta forma, de tanta importância na realidade alimentar. A análise do espectro da glucose vidro evidencia que ambos os anómeros  $\alpha$  e  $\beta$  coexistem naquele sistema, nas mesmas proporções (numa proporção relativa de cerca de 50:50). Os dados da análise directa dos espectros em conjunto com os dados dinâmicos permitem concluir que das formas de glucose estudadas, a glucose –  $\alpha$  é aquela que apresenta crescente instabilidade sob condições de humidade, à temperatura ambiente.

No entanto, quando as diferentes formas de glucose são submetidas a variações de temperatura, a glucose monohidratada é aquela que das formas cristalinas, sofre mais alterações a nível estrutural e dinâmico. Ainda nesta experiência a glucose vidro apresenta um resultado interessante e ainda não explorado. Após ser submetida a um ciclo térmico, a glucose vidro recupera a forma em termos estruturais, o que não acontece a nível dinâmico. O aumento da complexidade química do sistema, em associação com estudos térmicos e de hidratação, evidencia os efeitos de novos componentes e novas ligações intermoleculares ausentes no sistema mais simples.

Por fim, no capítulo 4 foram elaboradas as conclusões finais e gerais de toda a dissertação

**keywords**

Flour, Gluten, Starch, Glucose, FTIR, Raman, NMR, Quimiometry.

## abstract

The main goal of the present work is to contribute to the knowledge of the conformation of wheat proteins through the application of spectroscopic techniques, mainly Fourier transform infrared (FTIR) and Raman. Secondly, it is intended to explore the potential of the same methods for rapid evaluation of hardness and disease in flours. A third and final aim is to evaluate the behavior to the level of the molecular organization and dynamics, of glucose, starch and flour, starting with the simplest system and ending with the most complex one, using the Nuclear magnetic resonance (NMR) in the solid state.

In chapter 1 are presented all the general goals of this dissertation and, some theoretical concepts that serve of bases of this study are presented. The wheat composition is summarized, being given special emphasis to starch and gluten, and the principles of the methods of spectroscopy of FTIR, Raman, NMR in the solid state and quimiometry are described.

In chapter 2, a structural analysis of different flours and respective glutes is presented, through the techniques of vibrational spectroscopy, FTIR and Raman, in the dry and hydrated states. The spectra allow information concerning the conformation of proteins to be obtained. With the direct analysis of the spectra is also possible to observe conformational differences between dry and hydrated samples. Also in this chapter, the application of two quimiometric methods, the Principal components analysis (PCA) and the Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) is described, in order to correlate the FTIR spectral data flours with specific properties such as type of hardness and illness occurrence (specifically, presence of *Tilletia* fungus). For certain spectral zones, it is possible to separate the extra-hard and hard samples of the extra-soft and soft ones, as well as to separate samples with illness from the corresponding healthful ones.

In chapter 3, solid state NMR was employed to evaluate the behaviour (molecular organization and dynamics) of glucose, starch and flour, starting with the simplest system to the most complex one. All the systems are submitted to hydration and to temperature variations for studying the type of reply of these systems in terms of dynamics and molecular organization. With solid state NMR it is possible to carry out the assignment of the main signals of the spectra of 5 different glucose forms ( $\alpha$ ,  $\beta$ , monohydrated, lyophilized, and glass) starch and flour and to characterize the different forms in terms of dynamic parameters. The application of this method in glucose glass, for the first time, allows characterizing this form of such importance in food industry. The analysis of spectra and dynamic data showed that  $\alpha$  glucose is the glucose form that presents greater instability towards hydration, at room temperature. When the samples are submitted to temperature variations, the glucose monohydrate is the crystalline form that suffers more structural and dynamic alterations. Glass glucose shows an interesting result since, after the temperature cycle, the spectral profile is recovered but the same doesn't happen in dynamic level. The increase of the complexity of the system, from glucose to starch and to flour, studied by the effects of heating-cooling and hydration on structure and dynamics, is expressed by the effects of additional components and intermolecular interactions show evidences of possible interchains and intermolecular linkages not verified in the simplest system.

Finally, in chapter 4, it had been elaborated all the general conclusions of this dissertation.

## Índice

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS E SIMBOLOGIA</b> .....	<b>3</b>
<b>1 OBJECTIVOS E INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>4</b>
1.1 OBJECTIVOS .....	4
1.2 O TRIGO E OS SEUS COMPONENTES .....	4
1.2.1 <i>Amido</i> .....	6
1.2.2 <i>Proteínas</i> .....	8
1.2.3 <i>Lípidos e outros componentes</i> .....	11
1.3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DAS TÉCNICAS UTILIZADAS .....	12
1.3.1 <i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) e Espectroscopia de Raman</i> 12	
1.3.2 <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do estado sólido</i> .....	19
1.3.2.1 Técnicas de RMN de alta resolução para a observação de núcleos de baixa abundância .....	22
1.3.2.2 O processo de relaxação nuclear .....	25
1.3.3 <i>Análise Quimiométrica</i> .....	30
1.4 ESTUDOS DE COMPONENTES DA FARINHA DE TRIGO POR TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL E DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO ESTADO SÓLIDO.....	33
<b>2 ANÁLISE ESTRUTURAL DE FARINHAS E GLÚTEN</b> .....	<b>37</b>
2.1 OBJECTIVOS ESPECÍFICOS.....	37
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
2.2.1 <i>Reagentes e amostras</i> .....	38
2.2.2 <i>Métodos</i> .....	40
2.3 INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS DE FTIR E DE RAMAN DE FARINHAS.....	41
2.4 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DE FARINHAS DE DIFERENTES VARIEDADES NO ESTADO SECO .....	46
2.4.1 <i>FTIR e Raman de farinhas de origens Polaca e Portuguesa</i> .....	46
2.4.2 <i>Análise quimiométrica dos espectros de FTIR de um conjunto de farinhas de origem Portuguesa</i> .....	60
2.5 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DE FARINHAS DE DIFERENTES VARIEDADES NO ESTADO HIDRATADO	69
2.5.1 <i>FTIR de farinhas de origens Polaca e Portuguesa</i> .....	69
2.5.2 <i>Análise quimiométrica dos espectros de FTIR de um conjunto de farinhas de origem Portuguesa</i> .....	74
2.6 ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DE FARINHAS COM DOENÇA .....	79
<b>3 ESTUDO DA ESTRUTURA E DINÂMICA MOLECULAR DE GLUCOSE, AMIDO E FARINHA: EFEITO DA COMPLEXIDADE DO SISTEMA</b> .....	<b>86</b>

3.1	OBJECTIVOS ESPECÍFICOS.....	86
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	87
3.2.1	Reagentes e amostras.....	87
3.2.2	Métodos.....	88
3.3	CARACTERIZAÇÃO DE VÁRIAS FORMAS DE GLUCOSE POR RMN DO ESTADO SÓLIDO.....	90
3.3.1	Espectros de CP/MAS de $^{13}\text{C}$ .....	90
3.3.2	Tempos de relaxação de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ .....	95
3.3.3	O efeito da hidratação.....	101
3.3.4	O efeito do aquecimento – arrefecimento.....	107
3.4	CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO DE UMA FARINHA DE BAIXA DUREZA POR RMN DO ESTADO SÓLIDO 117	
3.4.1	Espectros de CP/MAS de $^{13}\text{C}$ e tempos de relaxação de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ .....	117
3.4.2	O efeito da hidratação.....	119
3.4.3	O efeito do aquecimento – arrefecimento.....	121
3.5	CARACTERIZAÇÃO DE UMA FARINHA DE BAIXA DUREZA POR RMN DO ESTADO SÓLIDO.....	126
3.5.1	Espectros de CP/MAS de $^{13}\text{C}$ e tempos de relaxação de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ .....	126
3.5.2	O efeito da hidratação.....	129
3.5.3	O efeito do aquecimento – arrefecimento.....	130
3.6	COMPARAÇÃO SUMÁRIA DOS SISTEMAS GLUCOSE, AMIDO E FARINHA.....	136
4	CONCLUSÕES FINAIS.....	138
5	REFERÊNCIAS.....	142

## **Abreviaturas e Simbologia**

FTIR – do inglês “Fourier Transform InfraRed” – Infravermelho com Transformadas de Fourier

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

LMW – do inglês “Low molecular weight” – baixo peso molecular

HMW – do inglês “High molecular weight” – elevado peso molecular

LB – do inglês “Line Broadening”

NS – do inglês “Number of Scans” – numero de aquisições

Tg – Temperatura de Transição Vítreia

IRE – do inglês “Internal Reflection Element” – Elemento de reflexão interno

ATR – do inglês “Attenuated Total Reflection” – Reflexão total atenuada

CP/MAS – do inglês “Cross polarization and magic angle spinning” – Polarização cruzada com rotação segundo o ângulo mágico

PCA – do inglês “Principal components analysis” – Análise em componentes principais

PCs – do inglês “Principal components” – Componentes principais

NIPALS – do inglês “Non Iterative Partial Least Squares”

SVD – do inglês “Singular Value Decomposition”

N.d. – Não determinado

DSC – do inglês “Differential Scanning Calorimetry” – Calorimetria Diferencial de Varrimento

N.a. – Não atribuído

FID – do inglês “Free Induction Decay” – Decaimento Livre Induzido

PLS-DA – do inglês “Partial Least Squares Discriminant Analysis” – Regressão parcial em mínimos quadrados – análise discriminante

# **1 OBJECTIVOS E INTRODUÇÃO GERAL**

## **1.1 Objectivos**

Com o trabalho apresentado nesta dissertação pretende-se analisar ao nível da estrutura e dinâmica molecular a farinha de trigo e alguns dos seus componentes principais, através do auxílio de métodos espectroscópicos.

Na primeira parte desta dissertação irá se caracterizar as conformações proteicas em farinhas e glúten no estado seco e no estado hidratado, e deste modo contribuir para a caracterização das farinhas de trigo a nível estrutural e conformacional o que poderá conduzir a um melhor entendimento da sua funcionalidade na área da panificação, dado que as proteínas parecem determinar as propriedades reológicas das massas e serem responsáveis pela qualidade da panificação. Para este propósito, recorreu-se às técnicas de espectroscopia vibracional infravermelho com transformadas de Fourier (FTIR) e Raman. Pretende-se também correlacionar os dados obtidos em FTIR das farinhas com propriedades específicas tais como, tipo de dureza e ocorrência de doença, através de métodos quimiométricos e assim iniciar a exploração da possibilidade de usar estes meios espectroscópicos para detecção rápida deste tipo de propriedades.

Na segunda parte desta dissertação, e dando continuidade ao âmbito da mesma, pretende-se avaliar o comportamento ao nível da organização e dinâmica moleculares, da glucose, amido e farinha, partindo do sistema mais simples para o mais complexo, através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de sólidos. Desta forma, pretende-se comparar as propriedades moleculares destes sistemas e avaliar os efeitos da presença de cadeia polimérica (amido) e presença de vários componentes (farinha) na estrutura e dinâmica moleculares do monómero da glucose.

## **1.2 O Trigo e os seus componentes**

Os grãos de cereais proporcionam a principal fonte de proteína para todo o mundo tanto directamente, pelo seu processamento em alimentos para humanos, como também indirectamente, na alimentação animal que por sua vez resulta em produtos alimentares

humanos tal como ovos e carne. Os grãos de cereais são plantados em todos os continentes do globo com a óbvia exceção da Antártica (Wrigley 2001). Estes formam o alimento base da dieta da maioria da população mundial e contribuem de forma importante para a dieta do mundo desenvolvido.

O trigo, em particular, tem vindo a ser reconhecido desde há centenas de anos, como uma importante planta em termos da sua produção e utilização. O trigo comparado com outros cereais é uma planta que sobrevive melhor em diferentes climas, produz sementes comestíveis e é o único grão apropriado para pão levedado, devido à presença de um complexo proteico elástico único – glúten – que proporciona uma matriz para os gases, de maneira a criar a textura aberta característica deste tipo de pão (Cornell 1998).

Novas variedades de trigo são obtidas através de programas de melhoramento de plantas. Estes programas são criados com o intuito de maximizar as propriedades de resistência a doenças e maximizar a qualidade de panificação pretendida.

O grão do trigo – fruto da planta – contém apenas uma semente que no amadurecimento não cai. Este consiste numa epiderme e numa hipoderme, seguida de uma camada de células de paredes finas e inúmeras outras células. De seguida, encontra-se outra capa também esta fina, que cobre a epiderme nucelar e depois uma camada aleurona antes do endosperma rico em amido (material do qual a farinha é feita). Este compreende grânulos de amido embebidos numa matriz de proteínas. A combinação de gliadinas e gluteninas é conhecida como complexo de glúten – já referido anteriormente – e é considerado como proteína de armazenamento (Cornell 1998). Os grânulos de amido, além de carboidratos, também contêm proteínas e lípidos em menor percentagem estando as suas quantidades relacionadas com o tamanho dos grânulos.

Os principais componentes da farinha de trigo são: carboidratos (69 – 82% de farinha seca), proteínas (8 – 13,6% de farinha seca), lípidos (1 – 2,5% de farinha seca), minerais (cerca de 1% de farinha seca), vitaminas e enzimas (Scade 1981). Qualquer um destes componentes contribui para as propriedades funcionais das massas usadas em panificação, no entanto, a proteína e o amido são os componentes mais importantes na panificação, e são a base para o estudo das propriedades funcionais do sistema considerado neste trabalho. As razões pelas quais a proteína é considerada um componente essencial na farinha devem-se às suas propriedades viscoelásticas na massa, à retenção de gás e à textura. O amido é também um componente com muita importância pois os processos de

gelatinização e de retrogradação em que participa são marcantes no que diz respeito à textura do produto final e ao tempo de armazenamento. Durante o processo tradicional de preparação de massa para panificação, a mistura da farinha com água fornecendo energia mecânica leva à formação de uma rede contínua e homogênea de proteína na qual se incorporam os grânulos de amido (e também os outros componentes minoritários). O glúten, na panificação, retém o dióxido de carbono produzido durante o processo fermentativo e faz com que o pão aumente de volume durante o cozimento. Uma farinha de trigo dura possui, em geral, maior capacidade de retenção de dióxido de carbono, enquanto que uma farinha suave apresenta deficiência nesta característica. A expressão "dureza de uma farinha" normalmente é utilizada para designar a maior ou menor capacidade de uma farinha sofrer um tratamento mecânico ao ser misturada com água, associada à maior ou menor capacidade de absorção de água pelas proteínas do glúten e combinadas com a capacidade de retenção do dióxido de carbono, resultando num bom produto final de panificação, ou seja, pão com elevado volume, de textura interna sedosa e de granulometria aberta (Cornell 1998). A presença de carboidratos é de grande importância nos processos de panificação pois servem de substrato para o fermento biológico que produz o dióxido de carbono responsável pelo crescimento da massa. Os açúcares, juntamente com as proteínas, são responsáveis pela cor, sabor e aroma dos produtos de panificação devido à reação de escurecimento não enzimático (reação de Maillard) que ocorre durante o cozimento da massa.

Nos subcapítulos seguintes apresenta-se um breve sumário acerca da estrutura e propriedades dos principais componentes das farinhas, com especial destaque para as proteínas e sua relação com a qualidade das farinhas, já que este é um assunto com importância na primeira parte desta tese.

### **1.2.1 Amido**

O componente maioritário (65-70%) do trigo é o amido proporcionando uma excelente fonte de energia à planta e seus consumidores. Este carboidrato é composto por dois homopolímeros de D – glucose diferentes: amilose – fig.1.1 (a) – e amilopectina – fig. 1.1

(b). a quantidade relativa de amilose e amilopectina varia entre espécies, e entre diferentes cultivos da mesma espécie. Por exemplo, o amido do milho tem cerca de 85% de amilose, enquanto que o amido de milho ceroso é constituído por mais de 99% de amilopectina. Mas de forma geral, o amido tem cerca de 20-30% de amilose e 70-80% de amilopectina.

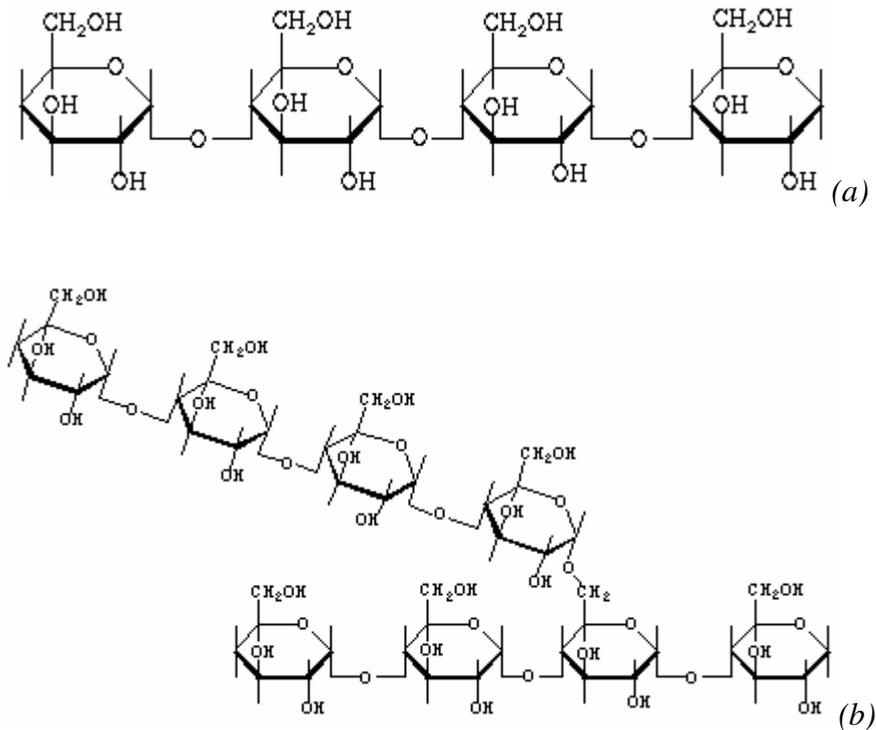


Figura 1.1 – (a) Amilose e (b) Amilopectina (Karim 2000)

A amilose é um polímero linear constituído por unidades de glucopiranosose com ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$  entre elas. A amilopectina por sua vez é um polímero ramificado que possui um dos maiores pesos moleculares conhecidos de entre todos os polímeros que ocorrem na natureza. Este é constituído por unidades de glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha(1\rightarrow4)$ . De aproximadamente 20 a 30 resíduos de glucopiranosose, surge uma ramificação, onde uma cadeia de unidades de  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucopiranosal está ligada à posição C-6 hidroximetil de um resíduo de glucose através de uma ligação glicosídica  $\alpha(1\rightarrow6)$  (Karim 2000).

A humidade e temperatura provocam modificações nestas estruturas resultando para o amido diferentes propriedades químicas e físicas. O comportamento do amido em presença de água depende da temperatura. Uma das propriedades físicas mais importantes do amido

é sua capacidade de formar uma pasta aquando o aquecimento na água (Cauvain 2003). Quando os grãos de amido ficam suspensos na água e se aumenta a temperatura gradualmente, nada acontece até se atingir uma determinada temperatura, mais exactamente um intervalo de temperatura, que é chamado de temperatura de gelatinização. Nesta temperatura, específica para amidos de diferentes origens, as ligações de hidrogénio mais fracas entre as cadeias de amilose e de amilopectina são rompidas e os grãos de amido nessas regiões começam a inchar e a formar uma solução consideravelmente viscosa. O inchamento dos grãos e, portanto, o aumento de viscosidade da solução está relacionado com a quantidade de água presente. Após o intervalo de gelatinização, as pontes de hidrogénio continuam a ser rompidas, o grânulo a inchar, e a amilose começa a sair. Como consequência directa do intumescimento, ocorre um aumento na solubilidade do amido e viscosidade da pasta. O intumescimento dos grânulos continua até que estes sejam rompidos, e a estrutura granular deixa de existir. Com o rompimento total dos grânulos, a viscosidade decresce abruptamente (Cauvain 2003). Após a gelatinização do amido, quando a temperatura é reduzida à temperatura ambiente, ocorre um rearranjo das moléculas através de ligações de hidrogénio, factor que favorece a recristalização, a retrogradação. Esta acontece com a formação de ligações de hidrogénio entre moléculas de amilose e moléculas de água. A retrogradação do amido é um fenómeno que deve ser minimizado por se tratar da reconstrução de uma estrutura mais rígida devido às cadeias de amilose ficarem mais disponíveis para se rearranjarem durante o tempo de prateleira do produto alimentício, resultando em maior perda de água do sistema e endurecimento do produto final (Cauvain 2003).

### **1.2.2 Proteínas**

As proteínas nos grãos de cereais podem ser divididas em dois grandes grupos com base nas suas funções biológicas: enzimas e proteínas de reserva (Chung 1999). Este último grupo, que forma a maioria da proteína total (até 80%), pode por sua vez, ser dividido em dois grupos: um formado por albuminas e globulinas (15% da proteína total) e outro grupo, do qual fazem parte a gliadina e a glutenina (restantes 85%) (Adkins 2001). É importante

salientar que no grupo das gliadinas existem  $\omega$ -gliadinas,  $\alpha$ ,  $\beta$ -gliadinas and  $\gamma$ -gliadinas e no grupo das gluteninas fazem parte subunidades de gluteninas de baixo peso molecular (LMW) e subunidades de gluteninas de elevado peso molecular (HMW). A figura seguinte apresenta um diagrama que descreve esta classificação das proteínas.

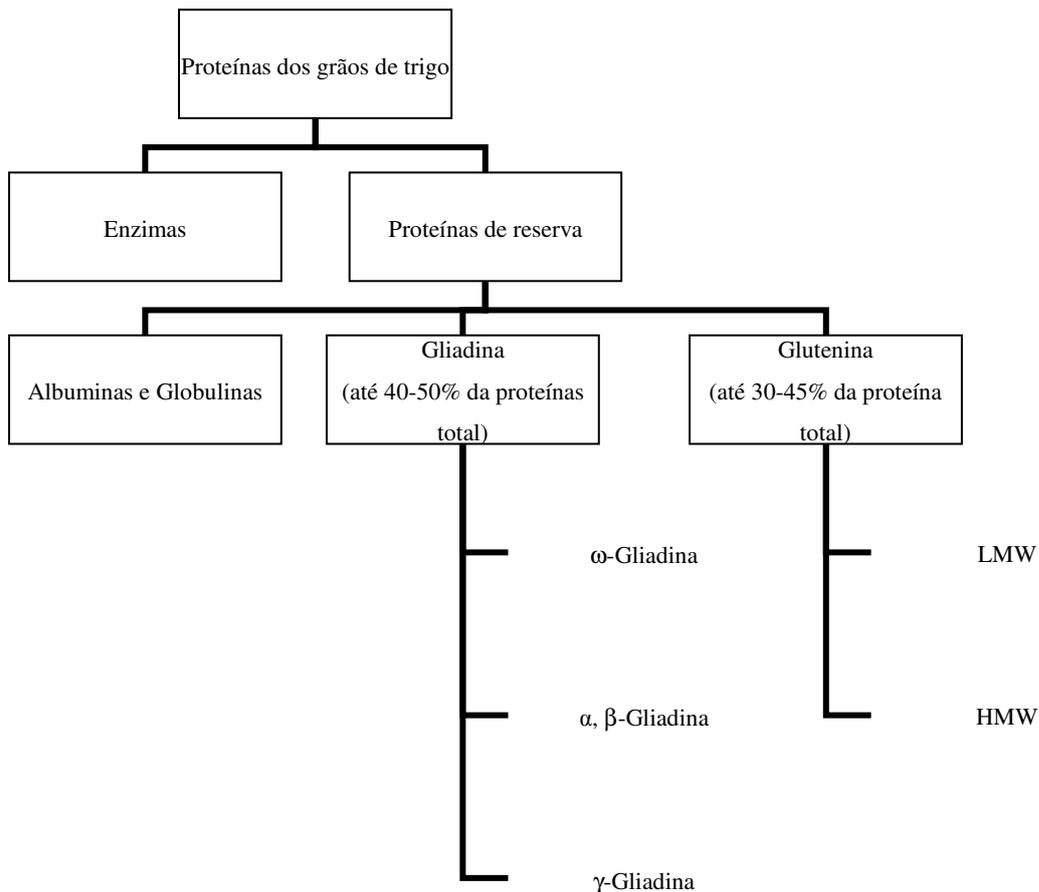


Figura 1.2 – Classificação das proteínas dos grãos de trigo de acordo com a sua composição molecular (Cauvain 2003).

A sequência específica dos aminoácidos ligados por ligações peptídicas constitui a estrutura primária da proteína. À medida que o tamanho da molécula aumenta ocorre um rearranjo espacial dos radicais dos aminoácidos que estão perto uns dos outros na sequência linear. Os dois tipos de estruturas secundárias mais conhecidos são a conformação  $\alpha$ -hélice e a folha  $\beta$ . No primeiro caso, a estrutura é estabilizada por pontes de hidrogénio entre os grupos NH e CO da cadeia principal. O grupo CO de cada aminoácido forma uma ponte de hidrogénio com o grupo NH do aminoácido que está situado a quatro

unidades depois na sequência linear, e todos os grupos NH e CO formam pontes de hidrogénio. No caso da estrutura tipo folha  $\beta$ , esta é estabilizada por pontes de hidrogénio entre grupos NH e CO que se encontram em sequências peptídicas diferentes, ao contrário do referido para a  $\alpha$ -hélice. Outras estruturas formam-se por interações entre cadeias laterais, criando dobras nas estruturas, que podem ser numerosas e resultar numa estrutura terciária (Cauvain 2003).

Estruturalmente as gluteninas são constituídas por cadeias proteicas ligadas por ligações dissulfeto intermoleculares, com regiões  $\alpha$ -hélice, estrutura  $\beta$  e desordenadas. Quanto às gliadinas, estas são constituídas por cadeias únicas de polipéptidos capazes de formar algumas ligações dissulfeto intramoleculares. E abundam a estrutura  $\alpha$ -hélice e estruturas desordenadas, bem como  $\beta$ -turns (Cauvain 2003).

A combinação de gliadinas e gluteninas com água, acompanhada de energia mecânica, tem o poder de formar uma rede viscoelástica tridimensional denominada de glúten, que é de particular importância na qualidade da panificação. A glutenina é responsável pela força e estabilidade da estrutura do pão e a gliadina é a substância macia e colante à qual os restantes materiais se agregam. As ligações de hidrogénio das cadeias laterais do amido são umas das responsáveis na coesão do glúten quando à farinha é adicionada água (Cornell 1998).

O glúten, na panificação, retém o dióxido de carbono produzido durante o processo fermentativo e faz com que o pão aumente de volume. Uma farinha de trigo duro possui, em geral, maior capacidade de retenção de dióxido de carbono. Uma farinha suave, por sua vez, apresenta deficiência nesta característica. A dureza é uma característica física que mede a resistência do grão à deformação, e conseqüentemente, designa a maior ou menor capacidade de uma farinha para sofrer uma pressão mecânica ao ser misturada com água, e está associada à maior ou menor capacidade de absorção de água pelas proteínas e com a capacidade de retenção do dióxido de carbono. Um bom produto final de panificação é um pão de bom volume, de textura interna sedosa e de granulometria aberta (Scade 1981). A dureza é controlada por um gene localizado no cromossoma 5D do trigo. Este gene está intimamente relacionado com duas puroindolinas designadas por puroindolina-a (pina) e por puroindolina-b (pinb). Os trigos suaves apresentam pina e pinb enquanto que nos trigos duros a pina está ausente ou ocorreram várias mutações na pinb (Brites 2005).

### **1.2.3 Lípidos e outros componentes**

Embora, nos cereais, os lípidos estejam presentes em pequena extensão (1-2.5%), estes têm um efeito significativo na qualidade e textura dos alimentos. No trigo predomina o ácido linoleico, seguido dos ácidos oleico e palmítico. Além da sua enorme importância como principais componentes nas biomembranas, onde regulam a passagem dos materiais para dentro e fora das células, os lípidos fornecem textura aos alimentos por causa da especial capacidade de se associarem com proteínas, pela sua natureza anfipática (presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos) influenciando a qualidade do glúten e com o amido. Parece existir uma maior concentração de lípidos na superfície do amido do que dentro do grânulo (Cornell 1998).

As propriedades reológicas da massa são afectadas pelo lípidos (que não os dos grânulos de amido) enquanto que os lípidos constituintes dos grânulos de amido parecem afectar as propriedades dos produtos panificados. Por exemplo, há estudos de panificação com farinhas de diferentes cultivos de trigo, em que a adição de lípidos não pertencentes aos grânulos de amido resulta num volume de pão insatisfatório. Em contraste, os glicolípidos proporcionam um aumento positivo do volume do pão (Alberti 2000).

O trigo conta entre os seus componentes com diversos minerais, a maioria em proporções pouco representativas, mas podem-se mencionar o potássio (K), assim como o magnésio (Mg), o fósforo (P) e o enxofre (S). O trigo inteiro é uma boa fonte de vitaminas do complexo B – tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina – assim como ácido pantotênico, ácido fólico e vitamina E. A maioria das vitaminas encontram-se no salvado e no gérmen da semente de trigo. A quantidade de várias vitaminas solúveis em água na farinha é somente 15 a 40% das existentes no trigo inteiro (Cornell 1998).

### **1.3 Fundamentos teóricos das técnicas utilizadas**

#### **1.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) e Espectroscopia de Raman**

A espectroscopia de infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção que utiliza radiações na gama de radiações denominada de infravermelho do espectro electromagnético. Esta técnica espectroscópica baseia-se no facto de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, às quais correspondem níveis de energia da molécula (níveis vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento de vibração (Pavia 1996; Smith 1996).

No processo de absorção, as frequências de radiação de IR que se igualam com as frequências vibracionais naturais da molécula (origem nos modos de extensão – simétrica e assimétrica, de flexão e outros) em questão são absorvidas, e a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula (Pavia 1996). Mas nem todas as ligações numa molécula são capazes de absorver a energia de IR, mesmo se a frequência da radiação se iguala exactamente aquela frequência do movimento da ligação. Apenas as ligações que têm momento dipolar que se altera em função do tempo são capazes de absorver radiação IR. As ligações simétricas, como as que acontecem por exemplo no  $H_2$  ou no  $Cl_2$ , não absorvem radiação de IR. De forma à energia ser transferida, uma ligação deve apresentar um dipolo eléctrico que se altera à mesma frequência que a nova radiação. Como exemplo tem-se a molécula de água que apresenta três modos vibracionais activos em IR (extensão simétrica, assimétrica e flexão) e a molécula de dióxido de carbono, com apenas dois modos activos em IR (extensão assimétrica e flexão). Considerando o exemplo da molécula de água (figura 1.3) (Banwell 1983), note-se que os átomos de oxigénio e de hidrogénio não estão em linha recta, e fazem um ângulo de  $105^\circ$ . Os 10 electrões da molécula tendem a permanecer mais próximos do núcleo de oxigénio do que do núcleo de hidrogénio, fazendo com que o “lado” do oxigénio seja ligeiramente mais negativo do que o “lado” do hidrogénio. O momento dipolo varia na direcção do movimento dos átomos de oxigénio como apresentado pelas setas na figura.

Na tabela 1.1 apresentam-se as frequências típicas para os diferentes grupos funcionais.

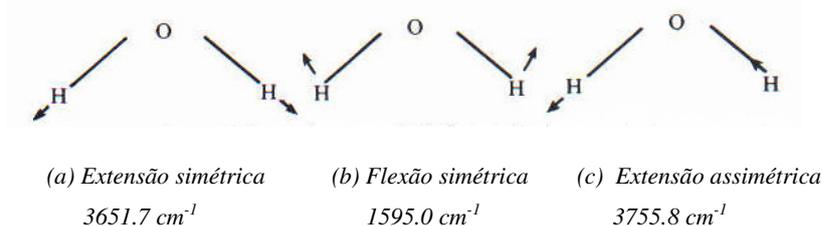


Figura 1.3 – As três vibrações fundamentais da molécula de água. O movimento do átomo de oxigénio, que deve ocorrer para manter estacionário o centro da gravidade da molécula, é aqui ignorado (Banwell 1983).

**Tabela 1.1** – Frequências de absorção características no espectro de infravermelho (Morrison 1992).

Ligação	Tipo de composto	Intervalo de número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
C–H	Alcanos (-C-C-)	2850-2960
		1350-1470
C–H	Alcenos (-C=C-)	3020-3080
		675-1000
C–H	Anéis aromáticos (  )	3000-3100
		675-870
C–H	Alcinos (-C≡C-)	3300
C=C	Alcenos	1640-1680
C≡C	Alcinos	2100-2260
C–C	Anéis aromáticos	1500 e 1600
C–O	Álcoois (R-OH), éteres (R-O-R'), ácidos carboxílicos (R-COOH) e ésteres (R-COO-R')	1080-1300
C=O	Aldeídos (R-C(=O)H), cetonas (R-C(=O)-R'), ácidos carboxílicos e ésteres	1690-1760
O–H	Álcoois monoméricos, fenóis (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH)	3610-3640
	Álcoois e fenóis com OH em ligação de hidrogénio	3200-3600
	Ácidos carboxílicos	2500-3000
N–H	Aminas (R <sub>1</sub> -NR <sub>3</sub> -R <sub>2</sub> )	3300-3500
C–N	Aminas	1180-1360
C≡N	Nitrilos (R — C ≡ N)	2210-2260
–NO <sub>2</sub>	Compostos de nitrofló	1515-1560
		1345-1385

Actualmente, o sistema mais comum de registo de um espectrofotómetro de transformadas de Fourier é composto por três componentes básicos: a fonte de radiação, o interferómetro e o detector (Settle 1997). Na figura seguinte apresenta-se através de um esquema simples o interferómetro mais utilizado em FTIR: o interferómetro de Michelson.

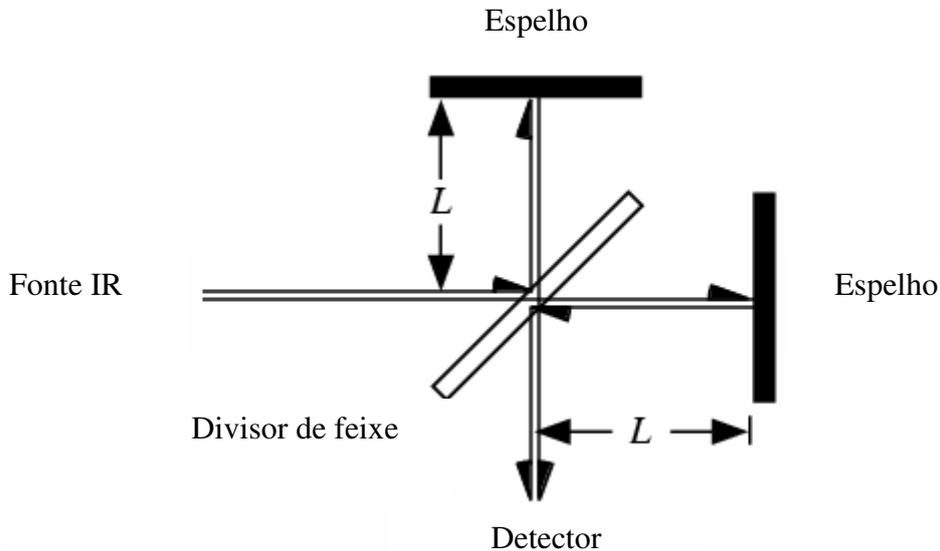


Figura 1.4 – Esquema de um interferómetro de Michelson (Settle 1997).

O interferómetro de Michelson consiste em três principais componentes: espelho móvel, espelho fixo e divisor de feixe. Os dois espelhos estão perpendicularmente um ao outro. O divisor de feixe é um componente semi-reflector. A radiação da fonte de infravermelho é colmatada e direccionada para o interferómetro, mais especificamente para o divisor de feixe. Metade dessa radiação é transmitida para o espelho fixo, e a restante é reflectida para o espelho móvel. Depois dos dois feixes serem reflectidos dos espelhos, são então recombinados no divisor de feixe. Devido a alterações na posição relativa do espelho móvel em relação ao espelho fixo, é gerado uma interferência. A radiação resultante passa então através da amostra e dirige-se posteriormente para o detector. São obtidos assim vários interferogramas (conduzindo a diminuição no ruído), obtendo-se no final um interferograma médio (Settle 1997). São então aplicadas as Transformadas de Fourier (tratamento matemático que utiliza uma transformada integral expressando uma função em termos de funções de base sinusoidal), obtendo-se um espectro de transmitância em função

de frequência. Este pode ser convertido num espectro de absorvância em função da frequência ou número de onda.

No presente estudo, o FTIR foi realizado usando uma célula de reflexão atenuada total – do inglês “attenuated total reflection” – ATR. Esta técnica baseia-se na aplicação da amostra numa superfície de material com índice de refração elevado (por exemplo: um cristal), conhecido como elemento de reflexão interno (IRE). Quando a radiação de IR penetra no IRE, a um ângulo abaixo do ângulo de incidência crítico, a reflexão total interna desta radiação incidente produz uma onda que se dissipa no limite entre o IRE e a amostra (Singh 2000). A radiação reflectida penetra através do cristal, podendo ser absorvida por amostras em contacto com a sua superfície (tal como se observa na figura 1.5 (Smith 1996)). A profundidade da penetração varia, dependendo do material do IRE e do comprimento de onda a que absorve.

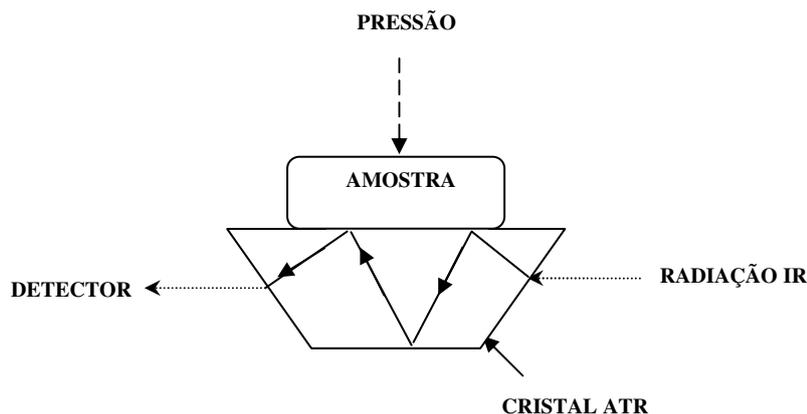


Figura 1.5 – Diagrama esquemático do mecanismo da técnica de reflexão total atenuada (Adaptação de Smith, 1996)

Esta técnica permite uma análise rápida e não destrutiva porque não requer qualquer preparação prévia da amostra. Os espectros de FTIR, de amostras intactas, opacas e/ou de origem biológica, podem ser obtidos por ATR e desta forma não é necessário o uso de qualquer tipo de células de suporte especiais. Estes factores resultam numa análise muito simples de executar de forma que os erros de origem no operador são mínimos e a análise pode ser realizada por pessoal não especializado. O facto de não se usar, neste método, pré – tratamento químico das amostras, é um especial atractivo para a consciência ambiental deste novo século (Osborne 1993).

Outra forma de obtenção de espectros também frequentemente utilizada, mas mais tradicional, é a técnica por transmissão. As amostras sólidas podem ser misturadas com KBr e prensadas, formando uma “pastilha” que pode ser atravessada pela radiação medindo-se a transmissão. Em amostras líquidas a amostra pode ser colocada numa célula específica ou, em amostras mais viscosas, entre duas janelas de KBr. No entanto, todas estas técnicas de transmissão têm (pelo menos) uma desvantagem: a espessura da amostra é uma variável a controlar, uma vez que o feixe tem de atravessar completamente a amostra e, de acordo com a lei de Beer-Lambert, diferentes espessuras implicam diferentes absorções de energia.

Outra técnica vibracional muito utilizada no estudo da estrutura de sistemas moleculares é a espectroscopia Raman. A nível molecular a radiação pode interagir com a matéria por processos de absorção ou de dispersão, e este último pode ser elástico ou inelástico. A dispersão elástica de fotões pela matéria é denominada de dispersão Rayleigh, enquanto que a dispersão inelástica, relatada pela primeira vez em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Raman, é chamada de dispersão Raman (Long 1977; Anderson 2000). Na dispersão inelástica de luz a componente de campo eléctrico do fotão disperso perturba a nuvem electrónica da molécula e pode ser entendido como um processo de excitação do sistema para um estado virtual de energia. Suponhamos que a molécula se encontra num estado vibracional, não necessariamente fundamental, e absorve um fotão de energia  $h\nu_i$  que a excita para um estado intermediário (ou virtual) (Figura 1.6). Imediatamente a molécula efectua uma transição para um estado de energia mais alta que o estado inicial emitindo um fotão  $h\nu_s$ , de maneira que  $h\nu_s < h\nu_i$ . A fim de conservar a energia, a diferença  $h\nu_s - h\nu_i = h\nu_{cb}$  excita a molécula para um nível de energia vibracional mais elevado. Se a molécula está inicialmente num estado estado vibracional excitado (o que pode ocorrer em amostras aquecidas), depois de absorver e emitir um fotão, pode decair para um estado de energia mais baixa. Neste caso,  $h\nu_s > h\nu_i$ , o que significa que alguma energia vibracional da molécula foi convertida em energia do fotão dispersado de tal forma que  $h\nu_s - h\nu_i = h\nu_{ba}$ .

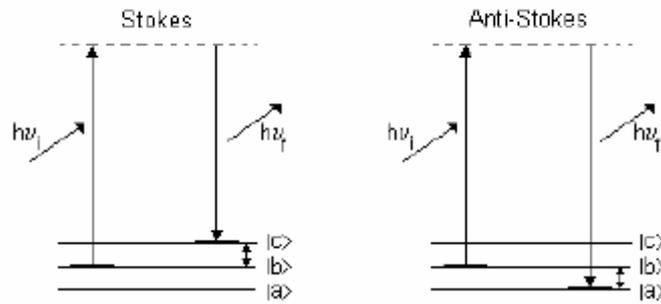


Figura 1.6 – Esquema dos níveis de energia moleculares nos processos de dispersão Raman Stokes e anti-Stokes (Anderson, 2000).

Em ambos os casos a diferença de energia entre os fótons dispersado e incidente é denominada de deslocamento Raman e corresponde a diferenças de níveis de energia específicos da amostra em estudo. Dependendo se o sistema perde ou ganha energia de vibração (ou de rotação) a frequência do deslocamento Raman dá-se acima e/ou abaixo da energia do fóton dispersado, em relação ao fóton incidente. As componentes deslocadas para baixo e para cima são chamadas de Stokes e anti-Stokes, respectivamente. Um gráfico do número de fótons dispersados detectados (ou da intensidade de luz dispersada) versus o deslocamento Raman em torno de um comprimento de onda laser incidente origina o espectro de Raman.

Quando uma molécula é sujeita a um campo eléctrico estático, sofre alguma distorção, os núcleos carregados positivamente são atraídos em direcção ao pólo negativo do campo e por sua vez os electrões aproximam-se do pólo positivo. Esta separação de cargas causa um momento dipolo eléctrico induzido e diz-se que a molécula está polarizada (Banwell 1983). Em espectroscopia de Raman, apenas as ligações que têm alterações na polarizabilidade durante uma vibração é que absorvem radiação IR (Karim 2000), diferindo assim da espectroscopia de IR. Se uma molécula tem pouca ou nenhuma simetria é bastante simples decidir que modo vibracional irá ser activo ou inactivo em Raman: na realidade o mais correcto será assumir que todos os modos são activos em Raman. Mas quando a molécula tem uma considerável simetria nem sempre é fácil tomar uma decisão, pois às vezes não é claro, se houve ou não alteração da polarizabilização durante a vibração. Na figura 1.7 está ilustrado em (a), (b) e (c) os três modos de vibração fundamentais (extensão simétrica, flexão e extensão assimétrica, respectivamente) da água, sendo a configuração de equilíbrio aquela que se apresenta no centro, e as configurações

extremas na direita e na esquerda. As formas aproximadas das elipsóides correspondentes são também apresentadas.

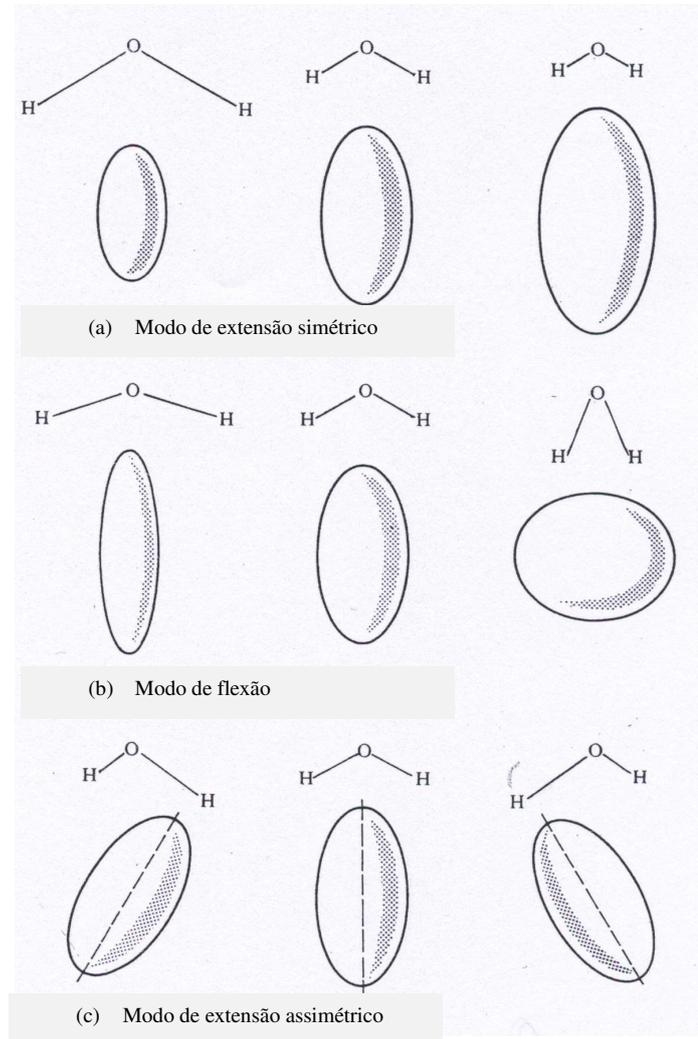


Figura 1.7 – as alterações de tamanho, forma e direcção da elipsóide de polarizabilidade da molécula de água durante os seus três modos vibracionais. (Banwell 1983).

Durante a extensão simétrica (a) a molécula aumenta e diminui de tamanho no seu todo; quando uma ligação é estendida, os electrões que a formam estão menos firmemente seguros pelo núcleo e por isso a ligação torna-se mais polarizável. Assim a elipsóide correspondente à molécula de água diminui de tamanho enquanto a ligação estende, e aumenta quando a mesma ligação é comprimida, no entanto mantém uma forma aproximadamente constante. Por outro lado, no modo de torção (b) é a forma da elipsóide que sofre maior alteração. Assim, se imaginarmos vibrações de elevada amplitude, no

extremo esquerdo a molécula aproxima-se de uma configuração linear, com um eixo horizontal, enquanto que no extremo direito aproxima-se de uma molécula diatómica com um eixo vertical. Finalmente, no modo representado em (c) tanto o tamanho como a forma da elipsóide permanece praticamente constante, mas a direcção dos eixos principais (representados com linha descontinua) alteram-se fortemente. Em suma, os três modos de vibração envolvem alterações obvias em pelo menos um aspecto da elipsóide de polarizabilidade, e são todos activos em Raman.

A espectroscopia de Raman complementa a informação adquirida por FTIR. Em FTIR apenas são detectadas as vibrações ocorridas por alteração do momento dipolar, enquanto que em Raman são visíveis as vibrações resultantes de alterações da polarizabilidade eléctrica (Walker 1976; Smith 1996; Anderson 2000). Por exemplo, moléculas diatómicas homonucleares não têm espectro de absorção de infravermelho, pois não têm momento dipolar, mas têm um espectro de Raman, porque o alongamento e contracção da ligação altera as interacções entre os electrões e o núcleo, conduzindo a alteração da polarizabilidade molecular. Outro exemplo interessante acontece com a molécula de CO<sub>2</sub>. O alongamento simétrico desta molécula não é activo em IR mas já em Raman, pois não há alteração do momento dipolar mas há diferença na polarizabilidade da molécula (Banwell 1983; Anderson 2000).

### **1.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do estado sólido**

A base teórica para a espectroscopia de RMN foi proposta por W. Pauli, em 1924, que sugeriu que certos núcleos atómicos deveriam possuir propriedades de spin e momento magnético, e como consequência, a exposição a um campo magnético conduziria à separação dos seus níveis de energia. No entanto, em 1946, M. Purcell na Universidade de Harvard e por F. Bloch na Universidade de Stanford, nos Estados Unidos da América, em investigações independentes, demonstraram que os núcleos absorvem radiação

electromagnética num campo magnético forte em consequência da separação dos níveis de energia que é induzida pelo campo magnético. Desde então até hoje, importantes avanços nos métodos experimentais da RMN tornaram esta técnica numa das mais importantes, não só ao nível da química mas também na física, na medicina e na biologia (Skoog 1992).

Apenas alguns núcleos são activos em RMN. Estes núcleos possuem uma propriedade conhecida como spin e pode ser imaginada como um movimento giratório do núcleo sobre si mesmo. Associado ao spin está o momento magnético ( $\mu$ ), de tal forma que o núcleo pode ser visto como uma pequena barra magnética com o seu eixo ao longo do eixo de rotação. Se um campo magnético estático  $B_0$  for aplicado a uma amostra que contém núcleos activos, o núcleo magnético vai-se alinhar ao longo do referido campo, fazendo um ângulo com este e adaptando um movimento de rotação em torno de  $B_0$  (figura 1.8 (a)). Aliás, núcleos como  $^1\text{H}$  que têm um número quântico de spin  $I=1/2$  podem ter, relativamente ao campo aplicado, uma das duas orientações seguintes: orientação antiparalela,  $-1/2$  ( $\beta$ ) ou orientação paralela,  $1/2$  ( $\alpha$ ), como se pode observar na figura 1.8 (b).

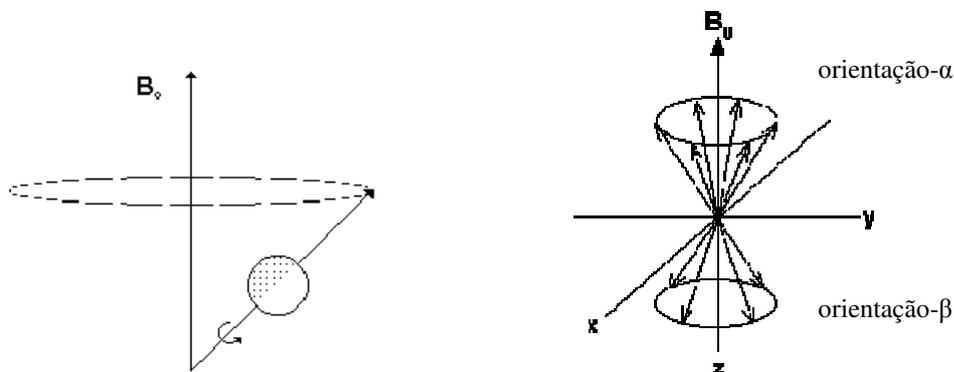


Figura 1.8 – (a) rotação de uma partícula sob influência de um campo magnético; (b) as duas orientações possíveis do núcleo de  $^1\text{H}$  no campo magnético. (Skopec 1997).

Estas duas orientações têm energias ligeiramente diferentes, e a diferença de energia entre os dois níveis é proporcional à magnitude do campo aplicado. A transferência de energia entre os 2 níveis ocorre a um comprimento de onda que corresponde ao domínio das radiofrequências e quando o spin regressa ao seu estado inicial é emitida energia na mesma frequência. O sinal equivalente a esta transferência é medido de diferentes formas e processado originando um espectro de RMN, para o núcleo em estudo.

As transições entre estes estados podem ser induzidos através da aplicação de um campo magnético oscilatório adicional. Este campo oscilatório,  $B_1$ , que é aplicado no plano perpendicular à direcção de  $B_0$ , tem uma frequência  $\nu_0$  que satisfaz a equação de Bohr,

$$|\Delta E| = h.\nu_0$$

A partir daqui chega-se à seguinte equação:

$$\nu_0 = \left( \frac{\gamma}{2\pi} \right) \times B_0$$

em que  $B_0$  é a magnitude do campo magnético estático,  $\gamma$  é a razão magnetogírica do núcleo e  $\nu_0$  é a frequência de ressonância. As razões  $\gamma$  variam de um isótopo nuclear para outro, daí que a RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , por exemplo, são realizadas a diferentes frequências para um dado campo (Gadian 1995).

Núcleos abundantes como o carbono – 12 e o oxigénio – 16 não são magnéticos, mas isto acaba por traduzir-se numa vantagem, pois, de outro modo, os espectros de RMN seriam muitíssimo difíceis de analisar, especialmente os espectros RMN de  $^1\text{H}$  das moléculas orgânicas. Os núcleos mais frequentemente encontrados em moléculas orgânicas são os prótons ( $^1\text{H}$ ) e os carbonos ( $^{13}\text{C}$ ) (Birch 1985; Gil 1990).

O que começou por tornar o fenómeno de RMN relevante na química foi o facto de núcleos da mesma espécie mas em situação diferente na molécula absorverem (e reemitirem) energias de radiofrequências diferentes. Este facto deve-se à contribuição dos electrões da molécula para o campo magnético total “sentido” pelo núcleo magnético. Por exemplo, na molécula de etanol o ambiente electrónico em torno dos núcleos H do grupo  $\text{CH}_3$  difere do ambiente dos núcleos H dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{OH}$ , e por isso estes núcleos em cada um dos grupos experimentam um campo magnético total ligeiramente diferente. Em consequência, absorvem radiações de radiofrequência também diferentes. Por outro lado, havendo três vezes mais núcleos  $^1\text{H}$  em  $\text{CH}_3$  do que em  $\text{OH}$ , contra duas vezes em  $\text{CH}_2$ , as intensidades das radiações absorvidas surgem na relação 1:2:3 respectivamente para  $\text{OH}$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . Esta relação simples entre o número de grupos diferentes de átomos de H numa molécula e o número de sinais no espectro RMN em conjunto com a possibilidade de estabelecer directamente o número de átomos de H em cada grupo pela intensidade relativa dos sinais de RMN, torna esta técnica extremamente poderosa na identificação de substâncias (Gil 1990).

Para a importância da alta resolução de RMN contribuem algumas vantagens que apresenta relativamente a outras técnicas. Um espectro de RMN contém informação sobre vários tipos de compostos presentes. Assim sendo, uma única análise permite avaliar globalmente a composição química da amostra. O facto de ser uma técnica não destrutiva possibilita a reutilização da amostra para análise por outras técnicas. A RMN apresenta ainda vantagens ao nível da preparação das amostras, sendo muitas vezes observadas sem qualquer transformação. Para além da conveniência de uma preparação simples, pelo facto de não se adicionarem reagentes à amostra evita-se a ocorrência de quaisquer possíveis interferências químicas. A rapidez de obtenção de um espectro e a possibilidade de observar a mesma amostra por varias sondas, são ainda algumas das suas vantagens. Mas o seu elevado custo e a baixa sensibilidade são, no entanto, factores que levam muitas vezes a optar por outras técnicas (Gil 1990).

### *1.3.2.1 Técnicas de RMN de alta resolução para a observação de núcleos de baixa abundância*

Ao contrário das amostras líquidas e soluções isotrópicas, a obtenção de alta resolução em sólidos e outras amostras anisotrópicas era inviável até relativamente pouco tempo atrás. Os sinais obtidos pelos métodos correntes praticados isoladamente são muito largos para este tipo de amostras. Os alargamentos dos sinais resultam das interações anisotrópicas que os vários núcleos do sólido experimentam com os seus vizinhos. Assim, foram desenvolvidas técnicas de eliminação artificial desses efeitos de alargamento nos espectros de sólidos sendo as principais a rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e o desacoplamento de alta potência.

Spins diluídos como o  $^{13}\text{C}$  com valores de  $T_1$  muito longos apresentam uma reduzida sensibilidade em RMN de estado sólido. Este problema foi ultrapassado através da técnica de polarização cruzada (CP), introduzida por Hartmann e Hahn em 1962 a qual obtém a magnetização de  $^{13}\text{C}$  a partir dos spins de  $^1\text{H}$  (Atkins 2002). A transferência ocorre no referencial rotativo de referência, através da aplicação de um pulso de  $90^\circ$  no canal de protão, e trancar a magnetização do protão na direcção  $y$  do referencial rotativo.

Seguidamente a radiofrequência no canal de  $^{13}\text{C}$  é ligada e a amplitude do campo magnético  $B_{1\text{C}}$  é ajustada pela condição de Hartmann-Hahn,  $\gamma_{\text{H}} \times B_{1\text{H}} = \gamma_{\text{C}} \times B_{1\text{C}}$ , em que  $\gamma$  é a razão magnetogrfica do núcleo. Esta condição implica que os prótons e os carbonos, nos seus referenciais rotativos respectivos, processem a igual razão e que as energias efectivas sejam comparáveis, permitindo assim uma rápida transferência de magnetização. O processo de polarização cruzada pode ser explicado através do conceito de temperatura de spin (adiante explorada). Os sistemas de spin  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão inicialmente a diferentes temperaturas e podem ser descritos quentes e frios, respectivamente. Sob as condições iniciais de equilíbrio, não existe magnetização de carbono no referencial rotativo de tal forma que o sistema  $^{13}\text{C}$  é caracterizado por uma temperatura de spin infinita. A trancagem do pulso de  $^1\text{H}$  é ligada e forma-se uma larga magnetização dos prótons ao longo do eixo y correspondendo a uma temperatura de spin baixa. Sob condições de Hartmann-Hahn, este sistema tende a equilibrar de tal forma que é obtida uma temperatura de spin comum entre os dois sistemas num determinado tempo,  $T_{\text{CH}}^{-1}$ , constante de tempo da polarização cruzada. Normalmente,  $T_{\text{CH}}$  é da ordem de grandeza de  $T_{2\text{H}}$  e é aproximadamente proporcional à força das interacções dipolares de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (Gil 1990; Alberti 2000).

Outra técnica utilizada em RMN de sólidos é a chamada rotação segundo o ângulo mágico. Grande parte das interacções que provocam o alargamento dos sinais de RMN em sólidos tem dependências geométricas do tipo  $3 \times \cos^2 \theta - 1$ , onde  $\theta$  é o ângulo entre cada spin nuclear e a direcção do eixo de rotação da amostra (figura 2.10). O movimento molecular rápido e isotrópico que ocorre em soluções não viscosas anula em média aquele factor geométrico dando origem a sinais de RMN muito estreitos. Visto a função  $3 \times \cos^2 \theta - 1$  anular-se para  $\theta = 54.74^\circ$ , o ângulo mágico, se fosse possível alinhar todos os vectores internucleares segundo este ângulo, a interacção dipolar anular-se-ia (Gil 1990). Num sólido típico não é possível orientar simultaneamente todos os vectores internucleares segundo o ângulo mágico. Porém, a rotação macroscópica rápida da amostra à volta dum eixo de rotação orienta em média qualquer vector internuclear paralelamente ao eixo de rotação e assim há redução do alargamento das bandas. Em seguida apresenta-se o esquema da rotação segundo o ângulo mágico (figura 1.9) (Hornak 2002).

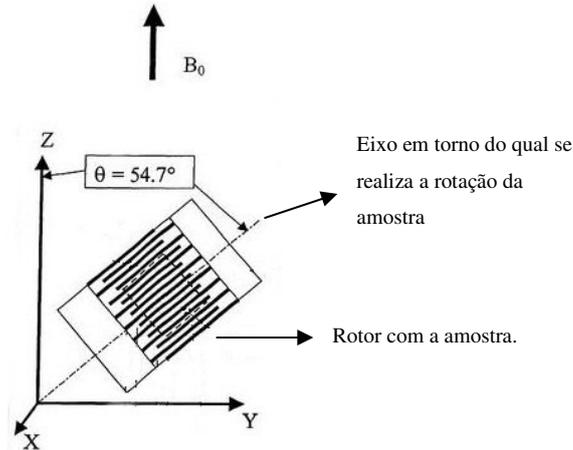


Figura 1.9 – Rotação macroscópica da amostra segundo um ângulo  $\theta$  em relação ao campo magnético aplicado  $B_0$  (Hornak 2002).

No RMN de sólidos a amostra é posta dentro de um rotor. Este é orientado segundo o ângulo mágico em relação ao campo magnético. Seguidamente é feita girar a amostra a uma razão de milhares de rotações por segundo (Hornak 2002). A força centrífuga criada através da rotação é suficiente para imitar o movimento molecular de um líquido, ou seja, tal como na difusão isotrópica, a interação dipolar terá média nula, obtendo-se uma resolução espectral muito superior, pois o alargamento dipolar é eliminado.

Finalmente o desacoplamento de alta potência é uma técnica aplicada aos sólidos para remover o acoplamento dipolar heteronuclear que tipicamente é da ordem das dezenas de kHz. O procedimento consiste na técnica de ressonância dupla na qual uma radiofrequência é utilizada para observar o sinal devido a um dado núcleo, por exemplo,  $^{13}\text{C}$ , e outra radiofrequência irradia fortemente a ressonância do núcleo que se quer desacoplar, por exemplo,  $^1\text{H}$ . Isto faz com que a componente da magnetização do próton ao longo do eixo do z experimente razões de rotação de razão elevada comparando com a força das interações dipolares. A média do efeito dipolar do próton exercida no núcleo  $^{13}\text{C}$  é então zero. Tipicamente, requerem-se campos de desacoplamento  $^1\text{H}$  de 40-60 kHz para eliminar interações dipolares  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (Gil 1990).

### 1.3.2.2 O processo de relaxação nuclear

A relaxação nuclear é o processo de recuperação do estado de equilíbrio, e conduz ao decaimento do sinal de RMN com o tempo (figura 1.10) produzindo o observado sinal FID (do inglês “free induction decay” - decaimento livre induzido). A transformada de Fourier do sinal FID produz o espectro de RMN (Gadian 1995).

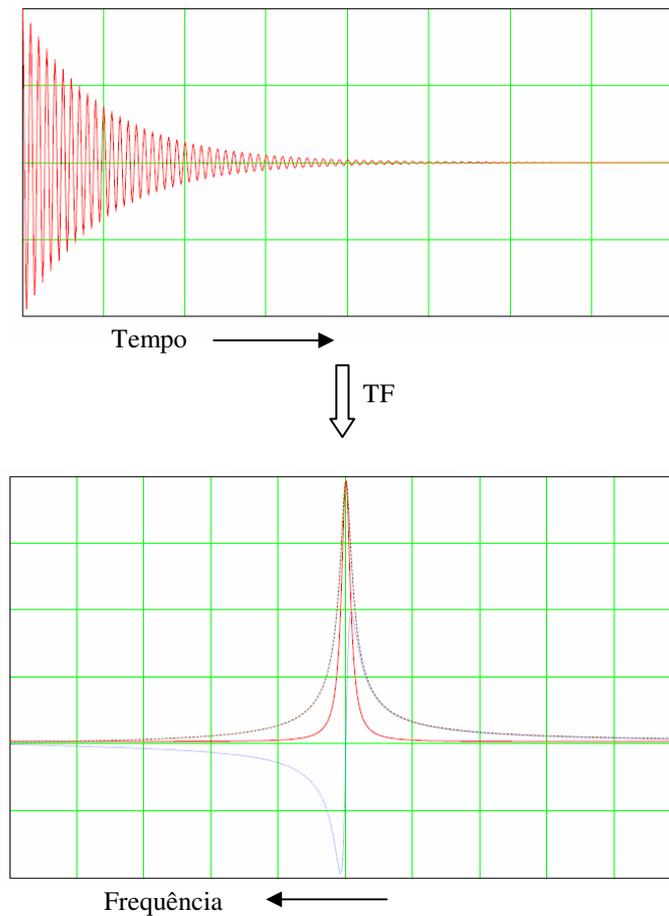


Figura 1.10 – Transformada de Fourier do FID no correspondente espectro (Gadian 1995).

Quando uma amostra é colocada num campo magnético, começa a ficar magnetizada porque mais spins nucleares alinham-se com o campo do que contra o mesmo. No equilíbrio, o componente de magnetização ao longo do campo (eixo Z) é igual a  $M_0$ , enquanto que a magnetização  $M_{xy}$  perpendicular ao campo é zero. Depois de uma qualquer perturbação desta magnetização, por exemplo, depois de aplicação de um pulso de  $90^\circ$ , a

relaxação toma lugar por meio da qual  $M_z$  e  $M_{xy}$  retornam aos seus valores de equilíbrio:  $M_0$  e zero, respectivamente.

Os processos de relaxação estão fortemente relacionados com a dinâmica do sistema e exibem fortes dependências com o tempo de correlação molecular,  $\tau_c$ , definido como sendo aproximadamente igual ao tempo médio necessário para uma molécula alterar a sua orientação. De seguida vão ser descritos de uma forma sucinta os três importantes tipos de relaxação: relaxação longitudinal ou spin – rede,  $T_1$ , relaxação transversal ou spin – spin,  $T_2$  e relaxação longitudinal em referencial rotativo,  $T_{1\rho}$ , pois irão servir de ferramenta no estudo apresentado na 2ª parte desta dissertação.

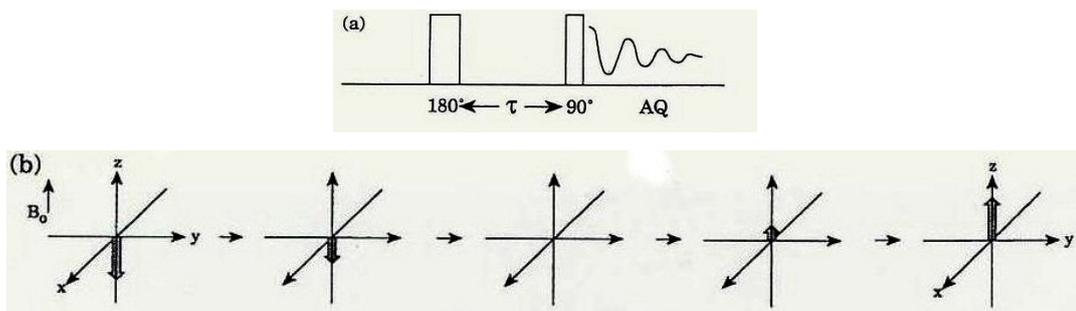
### Relaxação longitudinal, $T_1$

O regresso de  $M_z$  ao seu valor de equilíbrio  $M_0$  é caracterizado por uma constante de tempo  $T_1$  conhecida como tempo de relaxação longitudinal, ou de spin – rede. Este processo envolve uma troca de energia entre os spins nucleares e a sua rede molecular. Aqui não há magnetização transversal ( $M_x$  ou  $M_y$ ). A equação que orienta este comportamento em função do tempo,  $t$ , é a seguinte:

$$M_z = M_0 \times (1 - e^{-\frac{t}{T_1}})$$

Portanto  $T_1$  é o tempo necessário para alterar o componente Z de magnetização. O tempo de relaxação longitudinal  $T_1$  é o tempo necessário para reduzir a diferença entre a magnetização longitudinal  $M_z$  e o seu valor de equilíbrio  $M_0$  (Hornak 2002).

O  $T_1$  pode ser medido através da técnica de inversão – recuperação (figura 1.11).



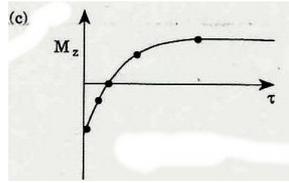


Figura 1.11 – (a) Sequência de pulsos para medir  $T_1$  pelo método de inversão – recuperação. (b) após o pulso de  $180^\circ$  a magnetização regressa ao seu valor de equilíbrio ao longo do eixo  $z$ . o estado de magnetização imediatamente antes do pulso de  $90^\circ$  é apresentado para valores crescentes de  $\tau$ . (c) O gráfico da intensidade de  $M_z$  versus tempo é utilizado para determinar o valor de  $T_1$ . Note-se que o pulso de  $90^\circ$  tem de ser utilizado para colocar a magnetização no plano  $xy$  para detecção. Os pontos apresentados em (c) correspondem aos diagramas em (b)(Colquhoun 2000).

O primeiro passo é aplicar um pulso de  $180^\circ$  à amostra. A este nível não é visível sinal porque não há componente de magnetização no plano  $xy$ . Os spins  $\beta$  (que têm orientação  $m_1 = -1/2$ ) começam a relaxar para a orientação  $m_1 = 1/2$  (spins  $\alpha$ ) e o vector de magnetização decai exponencialmente para o seu valor de equilíbrio térmico,  $M_z$ . Após um intervalo  $\tau$ , é aplicado um pulso de  $90^\circ$  que roda a magnetização para o plano  $xy$ , no qual se inicia o sinal de FID. O espectro de frequência é depois obtido por aplicação de transformadas de Fourier. A intensidade do espectro obtido desta forma depende do comprimento do vector de magnetização que é rodado para o plano  $xy$ . O comprimento desse vector regressa exponencialmente ao seu valor de equilíbrio térmico à medida que o intervalo entre os dois pulsos aumenta, de forma que a intensidade do espectro também regressa exponencialmente ao seu equilíbrio de intensidade com o aumento de  $\tau$ . Pode-se então medir  $T_1$  aproximando uma curva exponencial à série de espectros obtidos após diferentes valores de  $\tau$  (Atkins 2002).

O tempo de relaxação  $T_1$  depende dos movimentos moleculares de frequência da ordem da frequência de ressonância,  $\omega_0$ . A frequência  $\omega_0$  é cerca de 400 MHz para protão e cerca de 100 MHz para o carbono. Ou seja,  $\omega_0$  é da ordem das centenas de MHz, o que se traduz por movimentos rápidos. Quanto maior o número de movimentos rápidos, mais curto é o valor de  $T_1$ .

Nos sólidos o valor de  $T_1$  é muito mais longo que nos líquidos, e pode passar de segundos nos líquidos para centenas de segundos nos sólidos. O  $T_1$  do protão nos sólidos não depende apenas dos movimentos rápidos, mas também da difusão de spin. No caso do

protão e amostras orgânicas, os prótons estão tão próximos uns dos outros que passa a existir um  $T_1$  médio, pois os prótons rapidamente partilham a magnetização entre eles e relaxação quase ao mesmo tempo. Esta dependência até poderá servir para indicar se os componentes de uma dada amostra estão ou não muito próximos uns dos outros.

Por sua vez o  $T_1$  do carbono apenas depende dos movimentos moleculares pois há poucos  $^{13}\text{C}$  numa molécula e o efeito de difusão é negligenciável. Em contrapartida, o valor de  $T_{1\text{C}}$  é ainda mais longo que o  $T_{1\text{H}}$ , e por isso mais difícil de medir.

### Relaxação Transversal, $T_2$

O regresso de  $M_{xy}$  ao seu valor de equilíbrio é denominado de relaxação spin – spin, ou transversal, e é caracterizado por uma constante de tempo  $T_2$  – tempo de relaxação. O termo spin – spin é utilizado porque este processo de relaxação envolve interacções entre spins nucleares vizinhos sem qualquer permuta de energia com a rede. O valor de equilíbrio de  $M_{xy}$  é zero pois não há uma orientação preferida dentro do plano xy. Desta forma, a equação que descreve o retorno ao equilíbrio é a seguinte (Gadian 1995),

$$M_{xy} = M_{xy0} \times e^{-\left(\frac{t}{T_2}\right)}$$

O  $T_2$  é sempre menor ou igual a  $T_1$ . A magnetização da rede no plano xy dirige-se para zero e a magnetização longitudinal aumenta até  $M_0$  ficar ao longo de Z. O componente transversal roda na direcção da magnetização aplicada e desfasa. Em suma, o  $T_2$  é o tempo necessário para reduzir a magnetização transversal por um factor  $e$ . (Hornak 2002).

Há dois factores que contribuem para o decaimento da magnetização transversal:

- i. Interacções moleculares.
- ii. Variações no  $B_0$ .

A combinação destes dois factores é o que realmente provoca este decaimento. Neste trabalho admite-se que as variações de  $B_0$  são pequenas.

Para medir o  $T_2$  é utilizada a sequência spin-eco ou CPMG (inventado por Carr and Purcell e modificado por Meiboom and Gill) (figura 1.12). Este método consiste num pulso de  $90^\circ$  inicial seguido por uma série de pulsos de  $180^\circ$  separados por tempos de espera fixos. A magnetização transversal gerada pelo pulso de  $90^\circ$  começa a desfasar sob

influência do campo inhomogéneo. O pulso de  $180^\circ$  no tempo  $\tau$  faz com que os componentes lentos e os rápidos, após algum tempo  $\tau$ , regressem à fase ao longo do eixo  $y$  do referencial rotativo. O pulso de  $180^\circ$  é repetido a intervalos  $2\tau$ , alinhando a magnetização cada vez no ponto médio entre pulsos. A medição de cada máximo origina uma série de valores de  $M_y(t)$  permitindo que seja determinado o valor real de  $T_2$  (Colquhoun 2000).

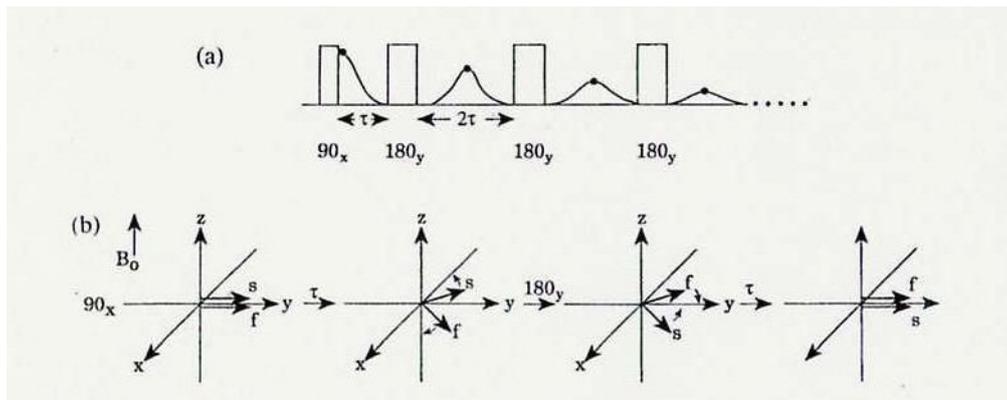


Figura 1.12 – (a) Sequência CPMG para medir o  $T_2$ . (b) imediatamente após o pulso de  $90^\circ$  todos os spins estão em fase. Após um tempo  $\tau$ , os spins de diferentes partes da amostra giram a diferentes frequências e estão desfasados. O efeito do pulso de  $180^\circ$  aplicado ao longo do eixo  $y$  é virar os spins para as posições das suas imagens espelho no plano  $xy$ . A seguir ao pulso de  $180^\circ$  os spins continuam a girar à mesma razão ( $f$ -do inglês fast (rápido) e  $s$ -do inglês slow (lento)) e na mesma direcção e desta forma começam a convergir ao longo do eixo  $y$ , ficando completa ao tempo  $2\tau$  após o pulso de  $90^\circ$ . (Colquhoun 2000).

O tempo de relaxação  $T_2$  depende do  $\omega_0$  (movimentos rápidos) mas também depende de movimentos mais lentos. Daí que este tempo de relaxação forneça informação acerca da mobilidade geral da amostra. Num sólido os valores de  $T_2$  são muito mais curtos que num líquido, são na ordem de  $\mu s$ .

### Relaxação longitudinal em referencial rotativo, $T_{1\rho}$

Esta relaxação é similar à relaxação longitudinal no sentido em que envolve uma troca de energia entre os spins nucleares e a rede molecular. Neste caso, ocorre quando a magnetização se alinha no campo magnético rotativo  $B_1$ . Então  $B_1$  alinha com  $M$  ao longo

de  $y$ . Como  $M$  foi obtido de  $B_0$ , o qual é bastante maior que  $B_1$ , então  $M$  relaxa exponencialmente com  $T_{1\rho}$ .

Em soluções pouco viscosas geralmente  $T_{1\rho} = T_1 = T_2$ , embora a permuta química possa alterar esta igualdade. Em soluções viscosas e em sólidos,  $T_{1\rho}$  é geralmente diferente de  $T_1$  e de  $T_2$ , uma vez que depende do valor da densidade espectral  $J(\omega_1)$  para o valor  $\omega_1 = \gamma B_1$  (~ kHz) ou seja, na ordem das dezenas de kHz e por isso mais lentos, ao passo que  $T_1$  depende de  $J(\omega_0)$ , com  $\omega_0 = \gamma B_0$  (~ MHz) (Gil 1990). Tal como  $T_1$ , o  $T_{1\rho}$  nos sólidos não depende apenas dos movimentos lentos, mas também da difusão de spin.

### **1.3.3 Análise Quimiométrica**

A técnica de análise em componentes principais (PCA), inicialmente descrita por Karl Pearson em 1901, recebeu contribuições matemáticas de Hotelling na década de 1930, mas teve de esperar pelo aparecimento dos computadores para ser largamente aplicada no domínio das ciências sociais, naturais e exactas, estabelecendo-se como uma peça base da análise multivariada (Manly 1997).

O objectivo principal da análise de componentes principais é a obtenção de um pequeno número de combinações lineares (componentes principais) de um conjunto de variáveis, que retenham o máximo possível da informação contida nas variáveis originais. Como técnica exploratória, permite a visualização dos dados após a projecção das amostras no espaço multi-dimensional determinado pela factorização. Não sendo supervisionada, não se propõe nenhuma relação a priori entre os objectos e/ou as variáveis, procurando ela própria as relações entre os diferentes parâmetros (objectos e variáveis), permitindo observar eventuais agrupamentos entre objectos ou variáveis.

Geometricamente, a PCA pode ser compreendida como uma rotação/projecção dos eixos do espaço multivariado de uma matriz, de forma a maximizar a variação ao longo de cada eixo. Estes novos eixos são denominados componentes principais ou variáveis latentes. Matematicamente, este processo consiste numa simples transformação linear das  $a$  variáveis de partida, para criar  $k$  variáveis características das fontes de variabilidade dos

dados. O método de PCA decompõe uma matriz  $X$  em duas matrizes: uma de contribuições factoriais (“*Loadings*”)  $P$  e outra de coordenadas factoriais (“*Scores*”)  $T$ :

$$X(n,a) = T(n,k) \cdot P'(k,a) + E(n,a)$$

A matriz de contribuições factoriais define o novo sistema de eixos e a de coordenadas factoriais representa a posição de cada amostra quando projectada nesse novo espaço vectorial.

As contribuições factoriais são obtidas para cada uma das variáveis (coluna) da matriz  $X$  e representam a relação entre as variáveis originais e os componentes principais. As coordenadas factoriais – projecção de cada amostra no espaço dos componentes principais – podem ser obtidos para todos os objectos em todos os componentes principais, da seguinte forma:

$$T(n,k) = X(n,a) \cdot P(a,k)$$

Os gráficos das coordenadas factoriais podem mostrar relações entre as amostras, agrupando-as ou dispendo-as ao longo dos componentes principais. Sobrepondo os gráficos de dispersão das coordenadas factoriais com os das contribuições factoriais correspondentes às mesmas dimensões, pode relacionar-se o comportamento das amostras com as variáveis que têm maior importância em cada componente principal. Estas dimensões são as que maximizam a variabilidade entre as amostras, devendo ser desprezadas as outras dimensões, que contêm apenas informação desinteressante proveniente do ruído, reduzindo-se a dimensionalidade dos dados.

A cada um dos componentes principais está associada uma percentagem de variância. Quando se usa o algoritmo SVD/NIPALS (Singular Value Decomposition/Non Iterative Partial Least Squares) para a PCA (são os algoritmos mais comuns), a percentagem de variância é decrescente à medida que vão sendo calculados novos componentes. Esta variância é denominada de valor próprio e é, para cada componente principal, a soma dos quadrados das coordenadas factoriais.

A matriz dos valores próprios é uma matriz diagonal, cujas posições são ocupadas pelos valores próprios de cada componente principal. Como estes não estão correlacionados

entre si (são ortogonais), os valores fora da diagonal principal são zero (matriz diagonal). Esta ortogonalidade (os vectores são mutuamente perpendiculares) significa basicamente que a coordenada factorial de uma amostra num dos componentes principais não influencia a posição da amostra noutra qualquer (Johnson 1998).

Numa regressão de mínimos quadrados parciais ou PLS, pretendem-se encontrar relações entre variáveis independentes características das amostras, como as frequências de um espectro e variáveis dependentes, como a sua composição ou outras propriedades. Pode-se pensar, como exemplo, no conteúdo em amido de uma determinada amostra (Y) e a sua relação com o espectro FTIR da mesma (X). O vector X pode, de forma semelhante, conter espectros, cromatogramas, dados electroquímicos, conjuntos de dados univariados (temperatura, pressão, viscosidade, densidade, índice de refração, etc...). O objectivo é, através de um conjunto de amostras de calibração, obter um modelo que permita prever, com um erro estimado, a composição ou outras propriedades de novas amostras (Geladi 2002).

A regressão em mínimos quadrados parciais (PLS) baseia-se em variáveis latentes ortogonais obtidas a partir dos dados iniciais, minimizando o problema da correlação entre as variáveis e reduzindo o ruído no modelo por eliminação dos componentes principais menos importantes. O modelo PLS usa a informação simultaneamente em X e Y, o que permite o desenvolvimento de modelos mais eficientes e robustos.

Este modelo procura atingir dois objectivos: minimizar a variância das previsões e maximizar a covariância entre as matrizes X e Y, que são decompostas da seguinte forma:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}' + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{Q}' + \mathbf{F}$$

sendo as matrizes P e Q compostas pelas variáveis latentes que definem o espaço e as matrizes T e U as projecções das amostras nesse espaço vectorial. No caso da matriz Q não ser normalizada, a relação linear entre as coordenadas factoriais T e U é dada por

$$\mathbf{U} = \mathbf{T} + \mathbf{H}$$

e portanto

$$Y = T \cdot Q' + F^*$$

sendo as matrizes E, F, F\* e H as matrizes de resíduos.

As matrizes X e Y são assim projectadas num sub-espço na forma das matrizes das coordenadas factoriais T e U, minimizando desta forma a colinearidade.

#### ***1.4 Estudos de componentes da farinha de trigo por técnicas de espectroscopia vibracional e de ressonância magnética nuclear do estado sólido***

Segue-se uma revisão dos estudos das proteínas de cereais por espectroscopia de FTIR.

Em 1987, Purcell analisou as estruturas secundárias das proteínas  $\alpha$  e  $\omega$  gliadinas do endosperma do trigo por espectroscopia de FTIR (Purcell 1987). Posteriormente, em 1991, Sarver criou uma base de dados de FTIR com as estruturas secundárias de proteínas em solução, na região da Amida I (Sarver 1991). Após apenas um ano, Pézolet analisou o comportamento das proteínas do glúten a nível conformacional, por FTIR – ATR, comparando o estado sólido hidratado com a mesma amostra em solução (Pézolet 1992). Verificou que no sólido hidratado, a banda da amida I revelou que além das estruturas “ $\beta$  turn” e  $\alpha$  hélice, estas proteínas continham uma quantidade significativa de estruturas folha  $\beta$  intra e intermoleculares estendidas. E observaram também que a solubilização destas proteínas resulta numa diminuição de estruturas folha  $\beta$  acompanhada por aumento de “ $\beta$  turn” e  $\alpha$  hélice.

Em 1993, Surewicz realizou uma avaliação crítica sumária acerca da determinação da estrutura secundária de proteínas por FTIR, coleccionando assim muita informação obtida até essa data acerca da estrutura secundária das proteínas (Surewicz 1993). No ano de 1994, o investigador Fen Ni Fu baseou-se apenas na região da Amida III, através do desenvolvimento de um método de espectroscopia de FTIR, para quantificar a estrutura secundária das proteínas (Fen-Ni Fu 1994), observando bandas referentes a diferentes conformações de estruturas proteicas, beneficiando do facto de não ter interferências de

bandas referentes à vibração da água. Em 1995, Belton e a sua equipa estudaram os efeitos da hidratação da subunidade de elevada massa molecular da glutenina através de FTIR e RMN, a nível da estrutura secundária, interações moleculares e mobilidade (Belton 1995). Wellner estudou a hidratação das  $\omega$  gliadinas por espectroscopia de FTIR, de forma a observar as alterações a nível estrutural e conformacional (Wellner 1996) e verificou que, à medida que a amostra era hidratada, as pontes de hidrogénio existentes entre as cadeias laterais de glutamina eram substituídas por pontes de hidrogénio com as moléculas de água, resultando em estruturas hidratadas em estruturas folha  $\beta$  intermoleculares. Os mesmo autores verificaram que, para elevados teores de água (acima de 35% (m/m) de água), o conteúdo em estruturas folha  $\beta$  diminuiu bastante em comparação com o estado sólido hidratado (baixo teor de hidratação), sendo estas substituídas por muitas estruturas hidratadas estendidas.

Em 2003, a espectroscopia de FTIR foi usada para analisar as estruturas e interações moleculares das subunidades de glutenina do trigo. Observou-se, tal como Wellner em 1996, que a hidratação até determinado nível, provoca aumento do número de estruturas folhas  $\beta$  mas acima de 76% de humidade relativa, estas parecem converter-se em estruturas “ $\beta$  turn” (Feeney 2003). Posteriormente, em 2005, Wellner utilizou a espectroscopia de FTIR para verificar alterações na estrutura das prolaminas do trigo durante a deformação mecânica numa série de ciclos de extensão e relaxação (Wellner 2005). Observou-se que, no glúten, a razão entre folha  $\beta$  e estrutura desordenada e beta  $\beta$  alterava-se durante a extensão. Logo após retirar a força aplicada, a amostra recuperou alguma da sua forma e estrutura originais, mas o material tornou-se mais duro com os consecutivos ciclos de extensão. A relação entre a estrutura do glúten e as propriedades mecânicas foi discutida em termos de um modelo no qual a conversão de “ $\beta$  turn” em folha  $\beta$  é a resposta à extensão e o meio pelo qual a energia elástica é armazenada no sistema. Nesta dissertação, e em colaboração com a Universidade de Reading, analisou-se a conformação e estruturas de proteínas de trigo e sub fracções do glúten por FTIR-ATR conseguindo-se identificar as diferentes conformações e verificar que as suas proporções diferem entre farinha seca, farinha hidratada, glúten seco e glúten hidratado. Este trabalho deu origem a um artigo já publicado (Li 2005).

Relativamente à espectroscopia de Raman no estudo de proteínas de cereais, em 1996, foi estudada a conformação de duas proteínas isoladas do trigo (puroindolina -a e -b), por espectroscopia de Infravermelho e Raman, através das zonas espectrais referentes a amida I, II e III. Os resultados de infravermelho mostraram que a puroindolina -a e -b são compostas por estruturas secundárias similares (30%  $\alpha$  hélice, 30% folha  $\beta$  e 40% estrutura desordenada). A espectroscopia de Raman confirmou a similaridade entre as referidas estruturas, apenas diferindo no ambiente de cadeias laterais (Pézolet 1996). No decorrer do ano de 1999, a equipa de investigadores liderada por Phillips desenvolveu um método analítico utilizando a espectroscopia de Raman para a determinação da concentração de amilose nos amidos de milho. Para isso criaram uma curva de calibração para a banda de Raman da amilose versus conteúdo em amilose (Phillips 1999). No ano de 2001, um grupo de investigadores, estudou a globulina da aveia por espectroscopia de Raman e realizaram algumas tentativas de atribuição de bandas. Os espectros apresentaram, para pH extremos, aumento das bandas amida I e III e banda da vibração do alongamento C-H, indicando alterações nas estruturas secundárias da proteína devido à desnaturação. Testaram igualmente os efeitos da temperatura (aquecimento perto da temperatura de desnaturação da globulina da aveia) e observaram os mesmos resultados que para a situação anterior (Ching-Yung 2001). Chan Kong em 2002 publicou uma revisão acerca de Raman e as suas aplicações na ciência dos cereais. Este documento ilustra a espectroscopia de Raman como uma ferramenta para medir o grau de modificação química de amidos modificados quimicamente, bem como uma técnica para determinar alterações estruturais nas proteínas de plantas, sob diferentes condições ambientais (Chan 2002).

Em 2003, Thygesen e a equipa, utilizaram a espectroscopia de Raman e de FTIR para a determinação de amido e pectina em células de batata, conseguindo eficazmente quantificá-los directamente a partir das células da amostra (Thygesen 2003). Também durante o mesmo ano, outro grupo de investigadores, tendo como objectivo conhecer melhor o mecanismo do teste de NaOH (usado para a determinação da classe de cor do trigo), analisou o espectro de Raman do farelo de trigo, do amido de trigo, de sementes inteiras de trigo, antes e depois do referido teste, e realizaram uma atribuição dos principais picos do espectro para as três diferentes amostras (Ram 2003). Foram observadas algumas diferenças a nível de intensidade e desvios de número de onda relativos na sua maioria ao ácido ferúlico, antes e depois do teste de NaOH nos espectros de Raman, mas não foi

possível detectar diferenças no que se refere a diferentes cores de sementes, mesmo após a aplicação do teste de NaOH. Finalmente, em 2006 um grupo de investigadores (Kizil 2006), conjuntamente com duas técnicas quimiométricas (CVA – “canonical variate analysis” e SIMCA – “soft modeling of class analogy”), discriminou vários tipos de géis de amido irradiados (por radiação  $\gamma$ ) de géis de amido não irradiados.

## 2 ANÁLISE ESTRUTURAL DE FARINHAS E GLÚTEN

### 2.1 Objectivos específicos

No presente capítulo pretende-se caracterizar as distribuições das conformações proteicas em farinhas e glúten, no estado seco e no estado hidratado, através de técnicas de espectroscopia vibracional: espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) e espectroscopia de Raman. Pretende-se contribuir, assim, para a caracterização das farinhas de trigo a nível estrutural/conformacional o que poderá conduzir a um melhor entendimento da sua funcionalidade na panificação.

Este estudo terá como principal foco de interesse a zona vibracional referente às moléculas de proteínas, visto esta fornecer bastante informação acerca da estrutura secundária das mesmas e também porque, como foi já referido anteriormente, as proteínas do glúten e a sua estrutura secundária têm um papel importante na qualidade dos produtos finais (Pézolet 1992; Belton 1995; Belton 1999; Shewry 2002). Pretende-se, também, compreender como e até que ponto a hidratação afecta a estrutura secundária das proteínas da farinha. Além do estudo detalhado dos espectros vibracionais, tentar-se-á, numa segunda fase do trabalho, correlacionar os espectros de FTIR das farinhas, com propriedades específicas tais como tipo de dureza e ocorrência de doença (especificamente, presença do fungo do género *Tilletia*), de forma a explorar a possibilidade de usar estes meios espectroscópicos para detecção rápida de doença na planta ou tipo de dureza. A doença do trigo destas farinhas denomina-se de “Karnal bunt”, tratando-se de uma doença provocada pelo fungo *Tilletia indica*. Normalmente, apenas uma parte da semente é afectada, deixando uma área corroída ou "bunted" e um número considerável de esporos pretos que produzem um odor a peixe desagradável (TDA 2004). Estas características conduzem a perda de qualidade do trigo, resultando em perdas financeiras enormes (DEFRA 2005). Esta doença espalha-se através dos esporos, por movimento das plantas infectadas, por acção do vento, ou ainda através do equipamento agrícola. Para este estudo será utilizada a análise em componentes principais, para investigar a possibilidade de detecção rápida do fungo e examinar até que ponto a presença de doença afectam as moléculas proteicas e/ou nas moléculas de amido.

## 2.2 Materiais e métodos

### 2.2.1 Reagentes e amostras

Neste estudo foram utilizados três conjuntos distintos de amostras de farinhas e, nalguns casos, respectivos glúten. Os grupos I e II referem-se, respectivamente, a amostras de origem Polaca e Portuguesa com diferentes características de dureza (tabela 2.1). Para o grupo I estudaram-se as farinhas e respectivos glúten (secos e hidratados), enquanto que para o grupo II, se estudaram apenas as farinhas (secas e hidratadas). As amostras de origem Polaca têm origem no Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roslin (IHAR) Krakow na Polónia, e foram amavelmente cedidas pela Universidade de Reading. As amostras de origem Portuguesa são oriundas da Estação Nacional de Melhoramento de Plantas de Elvas.

**Tabela 2.1** – Grupo I, constituído por 6 farinhas de origem Polaca e respectivas amostras de glúten e Grupo II, constituído por 30 farinhas de origem Portuguesa.

Variedades grupo I	Variedades grupo II	Classe de dureza
Kobra	Amazonas e Centauro	Extra suave
Almari e Lyrika	Alva, Arieiro, Dourado, Fiúza e Libero	Suave
Tonacja e Korweta.	Abental, Anza, Areal, Arnie, Arpain, Arpége, Bonpain, Búfalo, Castan, Cóa, Eufrates, Fitti, Greina, Guadalupe, Jordão, Lancer e Lima	Dura
Zyta	Almanson, Argueil, Golia, Sorraia e Roxo	Extra dura
	Idra	Indeterminada

O grupo III (tabela 2.2) de farinhas destina-se ao estudo dos efeitos do fungo do género *Tilletia* na farinha, por espectroscopia de FTIR em conjunto com a análise em componentes principais. Estas amostras têm origem da Estação Nacional de Melhoramento de Plantas de Elvas e foram analisadas apenas no seu estado seco.

**Tabela 2.2** – Farinhas doentes (com fungo do género *Tilletia*) e saudáveis, de origem Portuguesa. \* - Doença causada pelo fungo do género *Tilletia*.

Variedades grupo III	Classe de dureza	Características da planta
Sever	Extra suave	1. Saudável
		2. Doente *
Oderzo	Suave	1. Saudável
		2. Doente *
Idra	Indeterminada	1. Saudável
		2. Doente *

Para a obtenção dos glútenos, as várias farinhas do grupo I (10g) foram misturadas com água destilada (6 mL) e lavadas num aparelho próprio Glutomatic 2100 (Pertena AB, Suécia) sob um fluxo de 6 mL/minuto de água destilada durante 8 minutos à temperatura ambiente (20°C). Todo este procedimento ocorreu na Universidade de Reading.

Relativamente às análises por espectroscopia de FTIR e de Raman foram realizadas análises para as amostras secas e para amostras com 50% de humidade. As amostras secas não foram submetidas a nenhum procedimento, apenas foram mantidas seladas no excicador até serem analisadas (Grupos I, II e III, farinhas e glútenos). Para obter as amostras a 50% de humidade foi realizado o método que de seguida se expõe. Foi pesada uma determinada quantidade de cada amostra bem como o mesmo peso em água destilada, separadamente. Ambas as porções foram congeladas em azoto líquido e seguidamente moídas. De seguida, as porções moídas foram bem misturadas. Durante todo este processo, a amostra pesada e a água estiveram sempre em ambiente de azoto líquido, de forma a manterem-se congeladas, através de um recipiente que estava mergulhado em azoto líquido. A mistura resultante ficou em repouso durante a noite a 4°C. A razão para a realização deste método de hidratação advém do facto de assim as amostras ficarem com uma hidratação mais homogénea, ou seja, as moléculas de água chegarem de forma equivalente a todos os componentes da amostra. Este procedimento foi realizado para as farinhas dos grupos I e II e para os glútenos correspondentes às farinhas do grupo I.

## 2.2.2 Métodos

Os espectros de FTIR foram obtidos com um espectrofotómetro IFS55 da marca Bruker com célula Golden-Gate de reflexão única com cristal de reflexão total atenuada (ATR). Todos os espectros foram adquiridos com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 128 varrimentos. Para cada amostra foi utilizada uma pequena porção suficiente para cobrir a célula e de seguida a amostra foi pressionada contra a mesma. Foram realizadas cinco réplicas para cada amostra, do seguinte modo: após aquisição do primeiro espectro, a amostra foi remexida com ajuda de uma espátula, de forma a alterar o empacotamento da mesma e novamente colocada sobre o cristal sendo depois realizada nova análise. Este procedimento foi elaborado cinco vezes.

Os espectros de Raman foram obtidos com um espectrofotómetro FT Raman da marca Bruker, modelo RFS 100/S, com laser de potência de 450 mW e comprimento de onda de 1064 nm, resolução  $4\text{ cm}^{-1}$  e 512 varrimentos. As amostras foram colocadas directamente dentro de porta amostra próprio e este colocado em local específico no aparelho, de forma a ser atingido pelo laser. Foram realizadas duas réplicas para cada amostra apenas para verificação de boa reprodutibilidade. Entre réplicas a amostra foi retirada do porta amostra e novamente acondicionada no mesmo, para provocar alteração do empacotamento da amostra e seguidamente efectuou-se de novo o procedimento atrás descrito.

Na PCA construíram-se matrizes, de diferentes dimensões, relativas aos espectros das amostras em estudo. A cada matriz corresponde uma zona do espectro, de forma a facilitar a recuperação de informação. As três zonas escolhidas foram: zona das proteínas  $1800 - 1200\text{ cm}^{-1}$ , zona dos hidratos de carbono  $1200 - 800\text{ cm}^{-1}$ , e zona que abrange as duas anteriores, de  $1800 - 600\text{ cm}^{-1}$ . Cada linha da matriz foi centrada e reduzida. O tratamento estatístico foi realizado através do programa informático *Cats 97*®, desenvolvido em parceria pela Universidade de Aveiro e o Institut National Agronomique Paris-Grignon.

### 2.3 Interpretação dos espectros de FTIR e de Raman de farinhas

As figuras 2.1 e 2.2 apresentam os espectros de FTIR e de Raman, respectivamente, de uma amostra de farinha denominada Abental, que pertence ao grupo II (farinha Portuguesa), escolhida aleatoriamente como representativa das restantes. Chama-se a atenção para as diferentes escalas de número de onda dos dois espectros.

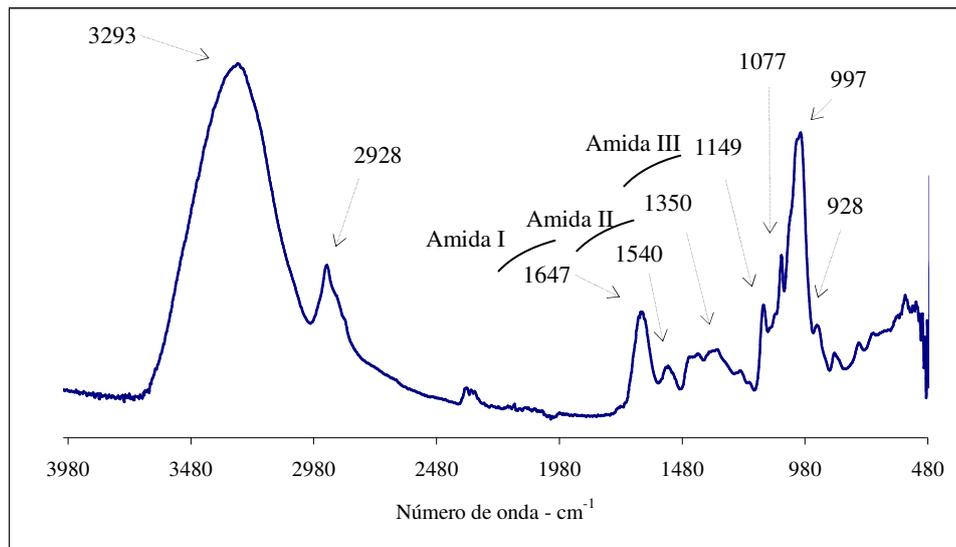


Figura 2.1 – Espectro de FTIR-ATR da farinha Abental no estado seco.

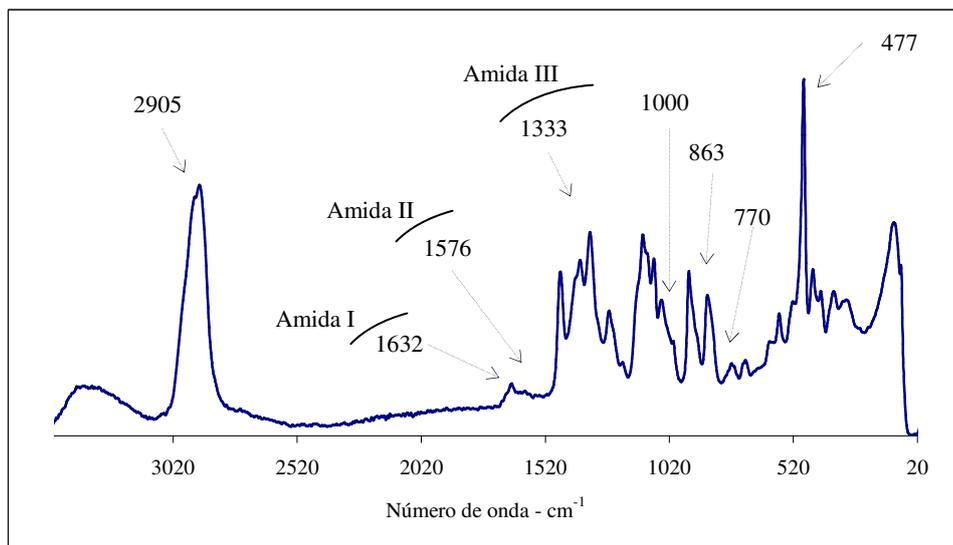


Figura 2.2 – Espectro de Raman da farinha Abental no estado seco.

Note-se para já as diferentes intensidades relativas das bandas da amida I, II e III em FTIR e Raman sendo, no espectro de Raman, a banda III que predomina relativamente às restantes. De forma a ajudar à identificação dos sub-espectros de FTIR dos dois componentes principais componentes de farinha, glúten e amido, apresentam-se na figura 2.3 os espectros de glúten e amido de uma farinha (Amazonas, estado seco).

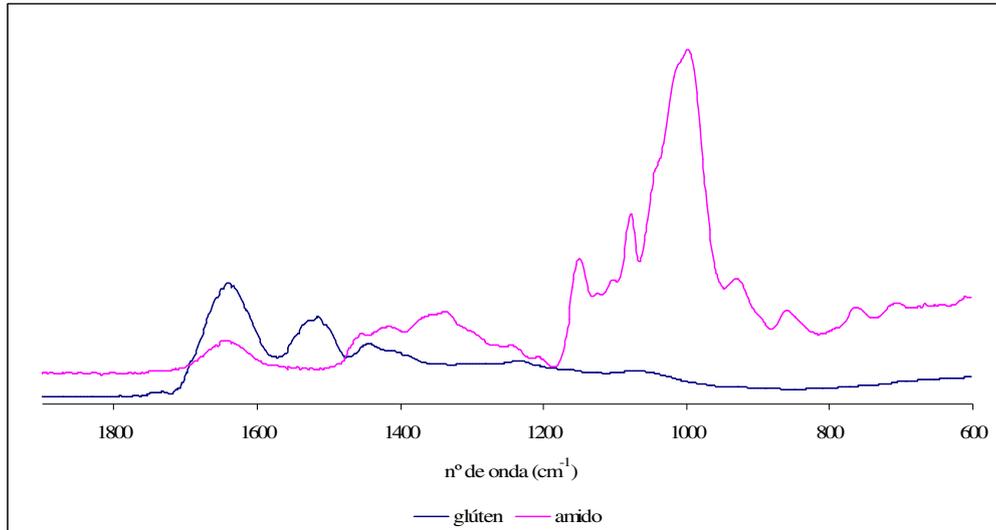


Figura 2.3 – Espectro de FTIR-ATR do glúten e do amido, ambos da variedade Amazona, no estado seco.

Como se pode observar, há zonas referentes a apenas amido, outras apenas de proteínas e ainda outras zonas em que há influências destes dois componentes. Em Raman (exemplo não mostrado) também se verificam observações semelhantes.

As tabelas 2.3 e 2.4 apresentam, respectivamente, as atribuições das principais bandas de vibrações, observadas nos espectros de FTIR e de Raman de farinha Abental (atribuições sugeridas com base na literatura).

**Tabela 2.3** – Atribuições para as principais bandas dos espectros de FTIR da farinha Abental, com base na literatura (Banwell 1983; Purcell 1987; Sarver 1991; Morrisson 1992; Pézolet 1992; Surewicz 1993; Fen-Ni Fu 1994; Popineau 1994; Belton 1995; Wellner 1996; Bryson 2000; Feeney 2003; Thygesen 2003; Li 2005; Wellner 2005). As bandas ou regiões indicadas com \* apresentam-se menos claras e com algumas sobreposições.

Número de onda – literatura ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Número de onda – nesta dissertação ( $\text{cm}^{-1}$ )
~3500	Alongamento simétrico e assimétrico da ligação O-H ( $\text{H}_2\text{O}$ ).	3293 (valor médio)
3000 – 2800	Alongamento C-H das moléculas da amostra.	2928
2200	Alongamento assimétrico das ligações O=C=O.	2373
1750	Alongamento da ligação C=O dos grupos éster dos lípidos.	*
1720 – 1600	Amida I – alongamento da ligação C=O do grupo Amida das proteínas (FTIR).	1647 (valor médio)
	Flexão da ligação O-H ( $\text{H}_2\text{O}$ )	1643
1600 – 1500	Amida II – flexão da ligação N-H do grupo Amida das proteínas.	1540 (valor médio)
1466	Possível contribuição de lípidos (torção tipo tesoura) e glúten.	1446
1350 – 1200	Amida III – alongamento da ligação N-H e da flexão N-H do grupo Amida das proteínas.	1350 (valor médio)
1300 - 1050	Distensão C-O grupo éster dos lípidos (duas bandas).	*
1153	Alongamento da ligação C-O carboidratos.	1149
1014	Alongamento da ligação C-OH amido.	1077
~ 900	Alongamento da ligação C-O-C da forma $\beta$ glucose.	*
858	Vibração da ligação C-O-C da forma glucose- $\alpha$ .	*

**Tabela 2.4** – Atribuições para as principais bandas dos espectros de Raman da farinha Abental, com base na literatura (Banwell 1983; Purcell 1987; Sarver 1991; Morrisson 1992; Pézolet 1992; Surewicz 1993; Fen-Ni Fu 1994; Popineau 1994; Belton 1995; Wellner 1996; Bryson 2000; Feeney 2003; Thygesen 2003; Li 2005; Wellner 2005). As bandas ou regiões indicadas com \* apresentam-se menos claras e com algumas sobreposições.

Número de onda – literatura (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	Número de onda – nesta dissertação (cm <sup>-1</sup> )
~3500	Alongamento simétrico e assimétrico da ligação O-H (H <sub>2</sub> O).	3349 (valor médio)
3000 – 2800	Alongamento C-H das moléculas da amostra.	2905
1720 – 1600	Amida I – alongamento da ligação C=O do grupo Amida das proteínas (FTIR).	1647 (valor médio)
	Alongamento da ligação C=C dos lípidos – formas <i>Cis</i> e <i>Trans</i> .	*
1543	Amida II – flexão da ligação N-H do grupo Amida das proteínas.	1576 (valor médio)
1466	Possível contribuição de lípidos (torção tipo tesoura) e proteínas.	1449
1350 – 1200	Amida III – alongamento da ligação N-H e da flexão N-H do grupo Amida das proteínas.	1333 (valor médio)
1300 - 1050	Alongamento C-O grupo éster dos lípidos (duas bandas).	1079 e 1123
1153	Alongamento da ligação C-O carboidratos.	*
~ 1000	Contribuição proteica com possível contribuição de grupos aromáticos	1000
~ 950	Vibração da ligação α – (1→4) do amido.	938
~ 900	Alongamento da ligação C-O-C da forma glucose- β.	863
858	Vibração da ligação C-O-C da forma glucose-α .	*
474	Amido	477

Segue-se uma discussão das bandas observadas na figura 3.1, i.e. no espectro de FTIR de uma farinha. A banda a 3293 cm<sup>-1</sup> refere-se aos modos de alongamento simétrico e assimétrico das ligações O-H maioritariamente da molécula de água, que aparece teoricamente pelos 3500 cm<sup>-1</sup> (Banwell 1983). A banda a 2928 cm<sup>-1</sup> resulta do alongamento das ligações C-H. Enquanto que a banda a 2373 cm<sup>-1</sup> corresponde ao alongamento assimétrico da ligação O=C=O (Shields 1968). Esta banda sofre alteração ao

longo do tempo de aquisição do espectro (aumenta de intensidade) devido à respiração do operador que provoca um aumento do teor em dióxido de carbono no ambiente circundante ao aparelho.

As bandas características dos lípidos surgem a  $1715 - 1740 \text{ cm}^{-1}$  (alongamento C=O dos ésteres),  $1700 - 1725 \text{ cm}^{-1}$  (alongamento C=O dos ácidos carboxílicos) e a  $1050 - 1300 \text{ cm}^{-1}$  (alongamento da ligação C-O, duas bandas) (Morrisson 1992). Na farinha os alongamentos da ligação C=O (éster e ácido) estão sob a amida I.

Entre  $1600$  e  $1720 \text{ cm}^{-1}$  encontra-se a banda amida I, referente ao grupo amida das proteínas, particularmente do alongamento da ligação C=O. A referida banda pode sobrepor-se à banda do modo de flexão da ligação O-H da água, observada a  $1643 \text{ cm}^{-1}$ .

Outra banda característica das vibrações do grupo amida denomina-se de amida II, situada entre  $1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ , tratando-se da flexão da ligação C-N-H acoplada com o alongamento da ligação C-N (Belton 1995; Singh 2000). A  $1446 \text{ cm}^{-1}$  surge uma banda que sofre sobreposição com outras bandas, que com base em Bryson, terá contribuição de lípidos e glúten. Trata-se certamente de uma banda que reflecte a torção tipo tesoura de ligações dos lípidos (Bryson 2000). A terceira banda mais importante no que se refere às proteínas é a amida III que aparece entre  $1200 - 1350 \text{ cm}^{-1}$  (Singh 2000). Esta surge do alongamento da ligação C-N e da flexão da ligação N-H do grupo amida das proteínas.

A região situada entre  $1200 - 400 \text{ cm}^{-1}$  é denominada como região de impressão digital e tem origem principalmente nas vibrações dos carboidratos, contendo também contribuições do glúten, como facilmente se verifica pela observação da figura 3.3. Nesta zona surge a banda a  $1149 \text{ cm}^{-1}$  referente ao alongamento da ligação C-O dos carboidratos. A  $1077 \text{ cm}^{-1}$  encontra-se a vibração do alongamento da ligação C-OH das moléculas de amido.

Como será de esperar verificam-se algumas diferenças entre os espectros de FTIR e os de Raman, que serão de seguida enunciadas. A primeira é a melhoria de resolução do espectro de Raman relativamente ao de FTIR (figuras 2.1 e 2.2). Em relação à água presente na amostra, as vibrações das ligações desta molécula são praticamente imperceptíveis em Raman, pois as ligações OH são fracamente polarizáveis.

Relativamente à amida I, em Raman, esta banda não sofre influência da banda de vibração da água, pelas razões supracitadas, mas é significativamente mais fraca. Apenas se sobrepõe à banda relativa à ligação C=C dos lípidos, referente à forma *cis* e à forma *trans*

(Thygesen 2003). A banda da amida II está presente no espectro de Raman mas é muito fraca relativamente aos restantes componentes da amostra.

Ao contrário da amida I e II, a zona da amida III é bem mais intensa no espectro de Raman do que no de FTIR, a 1350-1200  $\text{cm}^{-1}$ .

Pelos 1000  $\text{cm}^{-1}$  aparece a contribuição dada pelo glúten com possível contribuição de grupos aromáticos (Thygesen 2003). Trata-se de uma banda de intensidade forte no espectro de Raman mas inexistente em FTIR.

Também apenas visível no espectro de Raman, aparece a 938  $\text{cm}^{-1}$  a vibração da ligação  $\alpha$  – (1→4) do amido. Por último, surge uma banda relacionada com o amido a 477  $\text{cm}^{-1}$ , activa em Raman (com intensidade forte) mas inactiva em FTIR.

Observou-se que todos os principais componentes dos alimentos (água, lípidos, proteínas e carboidratos) absorvem tanto em Raman como em FTIR, mas com intensidades relativas diferentes. A utilização da espectroscopia de Raman apresenta a vantagem de evitar a interferência das vibrações das moléculas de água e de utilização da amida III para determinação de conformação de proteínas. A nível de conformação de proteínas, a espectroscopia de FTIR, pela análise da amida I, continua a ser preferida devido à boa intensidade da banda e apesar da possível interferência com a banda da água.

Nos próximos capítulos, será dada mais ênfase à análise das bandas vibracionais das proteínas (Amida I, II e III) e a relação da posição com o tipo de conformação adoptado, pois o seu papel é fundamental na qualidade do produto final de panificação.

## ***2.4 Estudo espectroscópico de farinhas de diferentes variedades no estado seco***

### **2.4.1 FTIR e Raman de farinhas de origens Polaca e Portuguesa**

Neste capítulo é inicialmente apresentado o estudo das amostras do grupo I (Polacas) e que deu origem à publicação de um artigo (Li 2005). De seguida, apresenta-se de forma sumária o estudo semelhante com as amostras do grupo II (Portuguesas). Pretendeu-se assim analisar os espectros de FTIR-ATR e Raman de farinhas e respectivos glútenes para obter informação a nível conformacional das proteínas. Na figura 2.4 apresentam-se os

espectros de FTIR-ATR de farinha e glúten no estado seco de uma das farinhas do grupo I (Polacas).



Figura 2.4 – Região entre 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de FTIR-ATR da farinha Korweta (cor azul) e respectivo glúten (cor vermelha), no estado seco.

No espectro da farinha podem-se distinguir claramente as três bandas referentes às proteínas: amida I (1720-1580  $\text{cm}^{-1}$ ), amida II (1580-1477  $\text{cm}^{-1}$ ) e amida III (1200-1350  $\text{cm}^{-1}$ ). As bandas entre 1185 e 750  $\text{cm}^{-1}$  referentes a vibrações de ligações da molécula de amido, aparecem no espectro de farinha mas não são observadas no espectro de glúten indicando que o amido foi removido eficazmente aquando a lavagem do glúten. Na figura 2.5 apresenta-se uma expansão da figura 2.4, entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  que mostra as bandas amida I e II para as amostras de farinha e respectivo glúten.

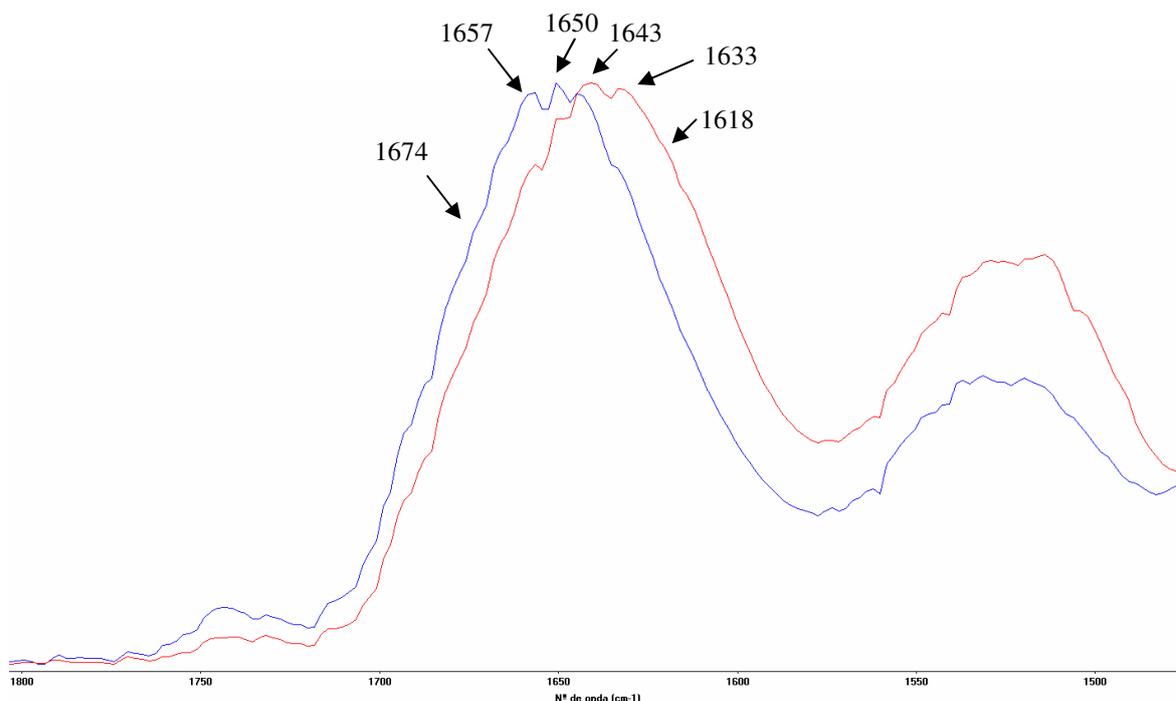


Figura 2.5 – Região entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de FTIR-ATR da farinha Korweta (cor azul) e respectivo glúten (cor vermelha), no estado seco.

O pico típico da estrutura “ $\beta$  turn” situa-se entre 1660 e 1675  $\text{cm}^{-1}$  (Popineau 1994; Belton 1995; Xiao 2005). No presente estudo este tipo de estrutura surge a 1674  $\text{cm}^{-1}$  sob a forma de um pequeno ombro. Para o pico a 1657  $\text{cm}^{-1}$  foi sugerida por vários grupos de investigadores a atribuição à estrutura hélice  $\alpha$  (Surewicz 1993; Popineau 1994; Belton 1995; Chittur 1997; Singh 2000). O pico a 1650  $\text{cm}^{-1}$  não admite só uma atribuição; advém da estrutura hélice  $\alpha$  (segunda banda na amida I referente a esta estrutura) e de estruturas desordenadas (Singh 2000; Li 2005; Nikolaus Wellner 2005). A banda a 1643  $\text{cm}^{-1}$  advém da vibração da flexão da ligação O-H ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Os ombros a 1633 e 1618  $\text{cm}^{-1}$  são indicadores de existência da conformação estrutural folha  $\beta$  nas proteínas, intramolecular e intermolecular, respectivamente (Popineau 1994; Belton 1995; Belton 2005; Nikolaus Wellner 2005).

Observa-se que a intensidade relativa dos picos a 1633 e 1618  $\text{cm}^{-1}$ , aumenta do espectro da farinha para o de glúten. Em contrapartida, a intensidade relativa dos picos a 1674  $\text{cm}^{-1}$  e 1657  $\text{cm}^{-1}$  diminuem da farinha para o glúten. Estes fenómenos verificam-se também nas restantes 5 amostras, e mostram que o glúten apresenta mais estruturas folha  $\beta$  intermolecular e intramolecular, mas menos estruturas “ $\beta$  turn” e hélice  $\alpha$  que a farinha correspondente.

Nesta fase do estudo, exploraram-se as possíveis diferenças entre os espectros de FTIR de farinhas de diferentes variedades sobre as quais apenas se conhece o tipo de dureza. O mesmo se fez com as amostras de glúten. Nas figuras seguintes estão representados os espectros de FTIR-ATR das 6 amostras de farinha Polacas no estado seco (figura 2.6) e dos respectivos glúten (figura 2.7), ambos na zona espectral compreendida entre 1800 e 800  $\text{cm}^{-1}$ .

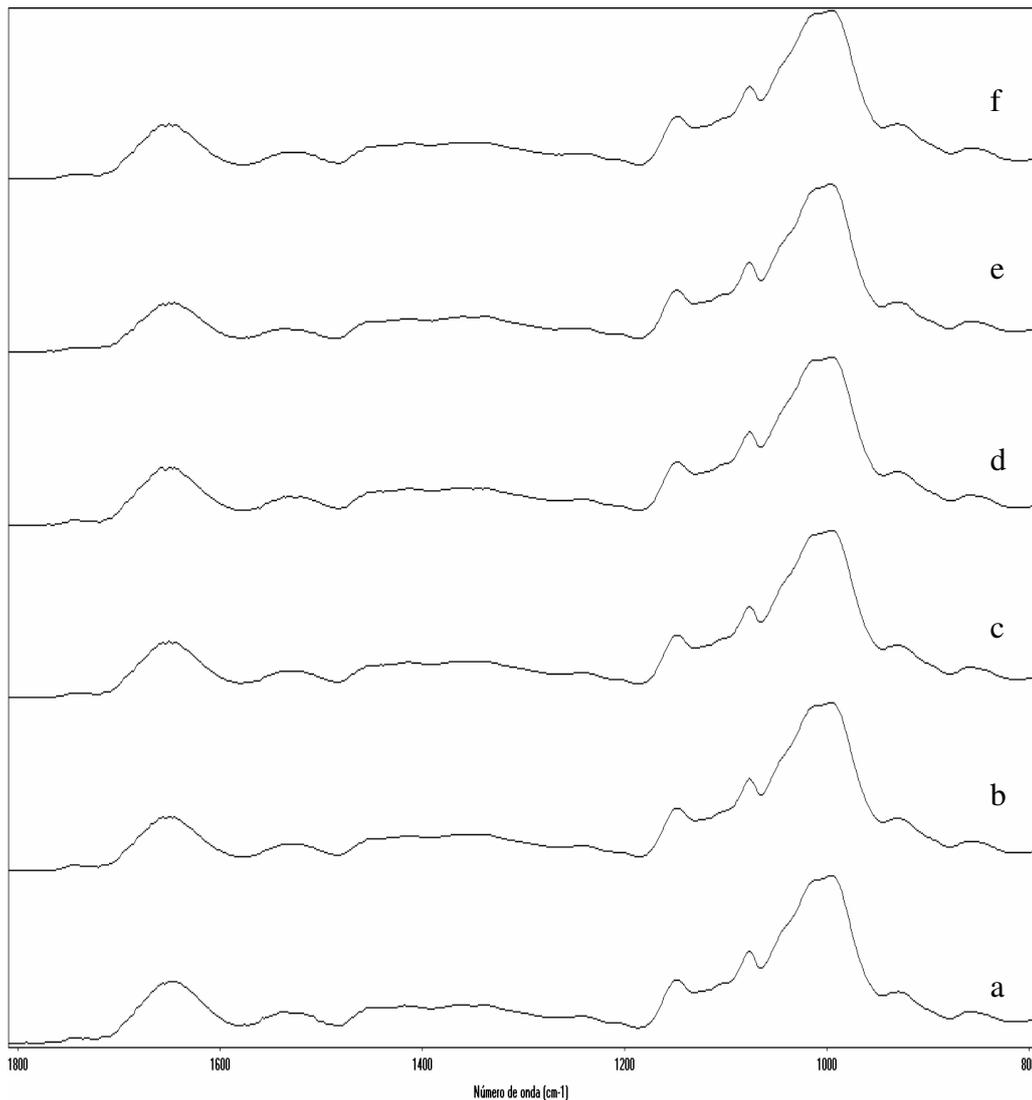


Figura 2.6 – Região entre 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de FTIR-ATR das farinhas do grupo I, no estado seco. A legenda de ambas as figuras é a seguinte: a – Zyta (extra-dura); b – Almari (suave); c – Kobra (extra-suave); d – Korweta (dura); e – Likyka (suave); f – Tonacja (dura).

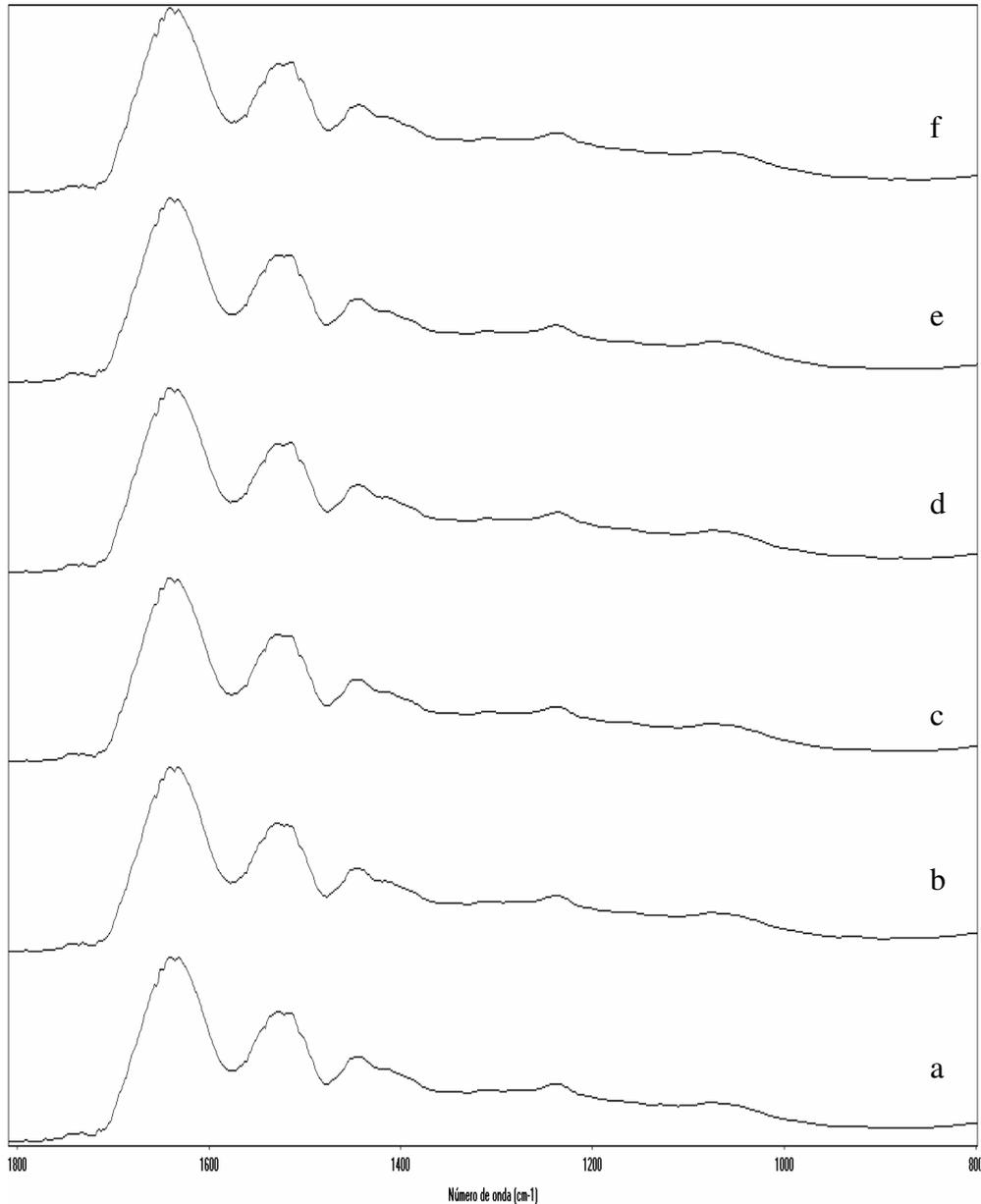


Figura 2.7 – Região entre 1800-800  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de FTIR-ATR dos glútenos do grupo I, no estado seco. A legenda de ambas as figuras é a seguinte a – Zyta (extra-dura); b – Almari (suave); c – Kobra (extra-suave); d – Korweta (dura); e – Likyka (suave); f – Tonacja (dura).

Na zona das proteínas, em particular amida I ( $\sim 1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ ), apenas se observam ligeiras diferenças entre amostras, em ambos os espectros. Para uma melhor visualização da zona da amida I apresenta-se a expansão dessa zona na figura 2.8.

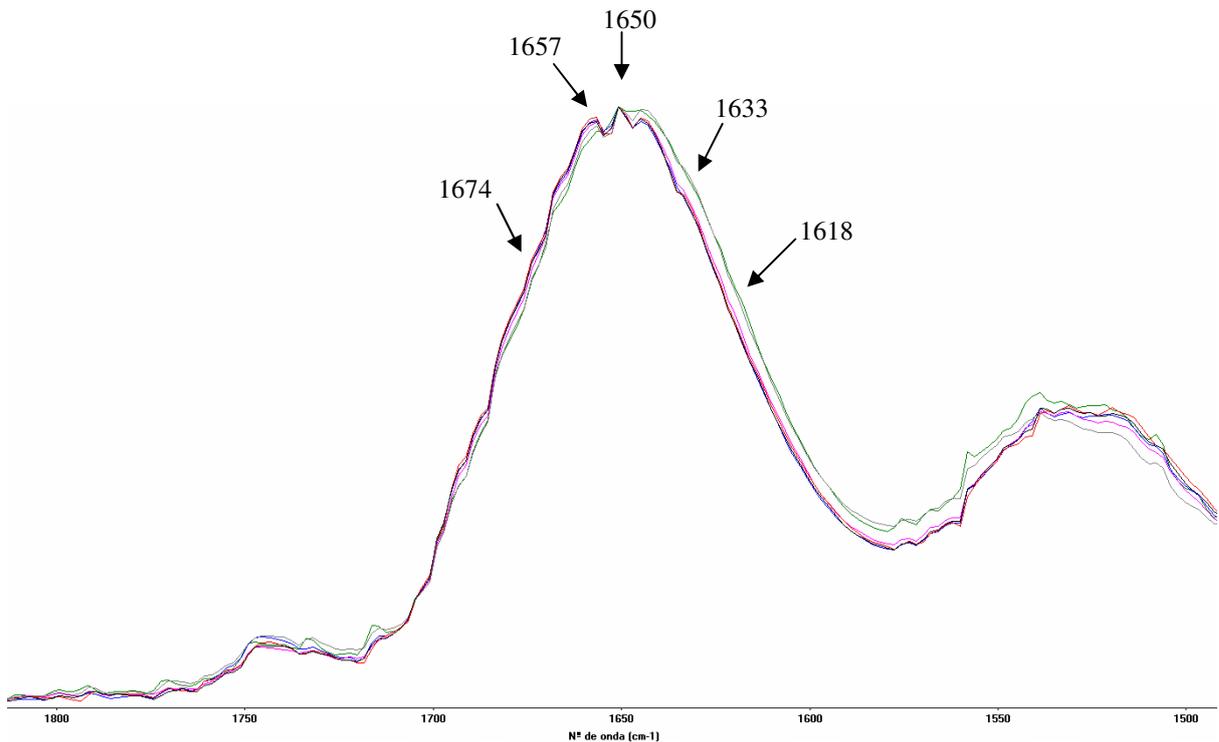


Figura 2.8 – Expansão do espectro de FTIR-ATR das farinhas do grupo I entre 1800 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ .

A legenda da figura é: verde – Zyta; azul – Almari; rosa – Kobra; vermelho – Korweta; cinzento – Likyka; preto – Tonacja.

A estrutura “ $\beta$  turn” ( $1674 \text{ cm}^{-1}$ ) apresenta-se sob a forma de um ombro muito fraco na amostra Zyta. Nas amostras Korweta e Almari este ombro é ligeiramente mais visível que nas restantes amostras (figura 2.8). Nas farinhas Zyta e Likyka o ombro a  $1633 \text{ cm}^{-1}$  (folha  $\beta$  intra molecular) é mais ténue em relação às restantes amostras (figura 2.8).

As razões de intensidade (tabela seguinte) calculadas entre os principais picos da amida I dos espectros de FTIR-ATR das farinhas em estudo podem permitir realizar uma análise semi – quantitativa das diferenças observadas

**Tabela 2.5** – Razões entre os principais picos da amida I dos espectros de FTIR-ATR das farinhas do Grupo I.

	$I(1657\text{ cm}^{-1})$ $/I(1650\text{ cm}^{-1})$	$I(1674\text{ cm}^{-1})$ $/I(1633\text{ cm}^{-1})$	$I(1674\text{ cm}^{-1})$ $/I(1618\text{ cm}^{-1})$	$I(1657\text{ cm}^{-1})$ $/I(1633\text{ cm}^{-1})$	$I(1657\text{ cm}^{-1})$ $/I(1674\text{ cm}^{-1})$
Zyta	0.97	0.82	1.01	1.06	1.29
Korweta	0.99	0.94	1.19	1.16	1.24
Almari	0.99	0.92	1.15	1.15	1.25
Kobra	0.99	0.92	1.16	1.14	1.24
Tonacja	0.98	0.93	1.19	1.13	1.22
Likyka	0.97	0.85	1.06	1.07	1.26

Analisando os valores de  $I_{1657\text{ cm}^{-1}}/I_{1650\text{ cm}^{-1}}$  (que reflectem as conformações hélice  $\alpha$  e estruturas desordenadas, respectivamente), verificam-se valores próximos de 1 (quantidades comparáveis destas conformações) para todas as amostras.

Pelas restantes razões calculadas, todas as amostras têm em supremacia a estrutura hélice  $\alpha$ , seguida de folha  $\beta$  intramolecular, “ $\beta$  turn” e por fim folha  $\beta$  intermolecular.

Relativamente à razão entre o pico de número de onda  $1674\text{ cm}^{-1}$  (“ $\beta$  turn”) e o de  $1633\text{ cm}^{-1}$  (folha  $\beta$  intramolecular), a razão mais elevada decai sobre a amostra Korweta e a mais baixa refere-se à amostra Zyta. Assim, conclui-se que a Korweta é a amostra com maior percentagem de estrutura “ $\beta$  turn” e por sua vez a amostra Zyta parece apresentar a menor percentagem da mesma estrutura. O mesmo acontece com a razão entre o pico de número de onda  $1674\text{ cm}^{-1}$  (“ $\beta$  turn”) e o de  $1618\text{ cm}^{-1}$  (folhas  $\beta$  intermolecular).

A razão entre o pico relativo às estruturas hélice  $\alpha$  ( $1657\text{ cm}^{-1}$ ) e o pico da “ $\beta$  turn” ( $1674\text{ cm}^{-1}$ ) apresenta máximo valor para a amostra Zyta e valor mínimo para a amostra Tonacja, mas a nível de análise directa do espectro não é possível notar diferenças significativas.

A existência de maior percentagem de estruturas folhas  $\beta$  em relação a “ $\beta$  turn”, poderá ser indicador de se estar perante farinhas favoráveis para uma boa “performance” no fabrico de pão. Isto porque a conformação folha  $\beta$  poderá ser a responsável pela elasticidade da farinha hidratada (massa para o pão) (Belton 1999; Li 2005). A interligação entre a conformidade das proteínas e a dureza não é objectiva e linear. Por análise directa dos espectros não é possível obter informação tão detalhada. E as razões entre as intensidades mostram que as diferenças entre as farinhas são ténues, sendo necessário quantificar as conformações para assim se tentar correlacionar com a dureza.

O mesmo grupo de amostras foi posteriormente submetido a análise por espectroscopia de Raman. Na figura 2.9 apresentam-se os espectros de Raman da farinha Almari e respectivo glúten, onde facilmente se verifica a ausência das várias bandas características do amido (exemplo, a banda a  $447\text{ cm}^{-1}$ ) no espectro b.

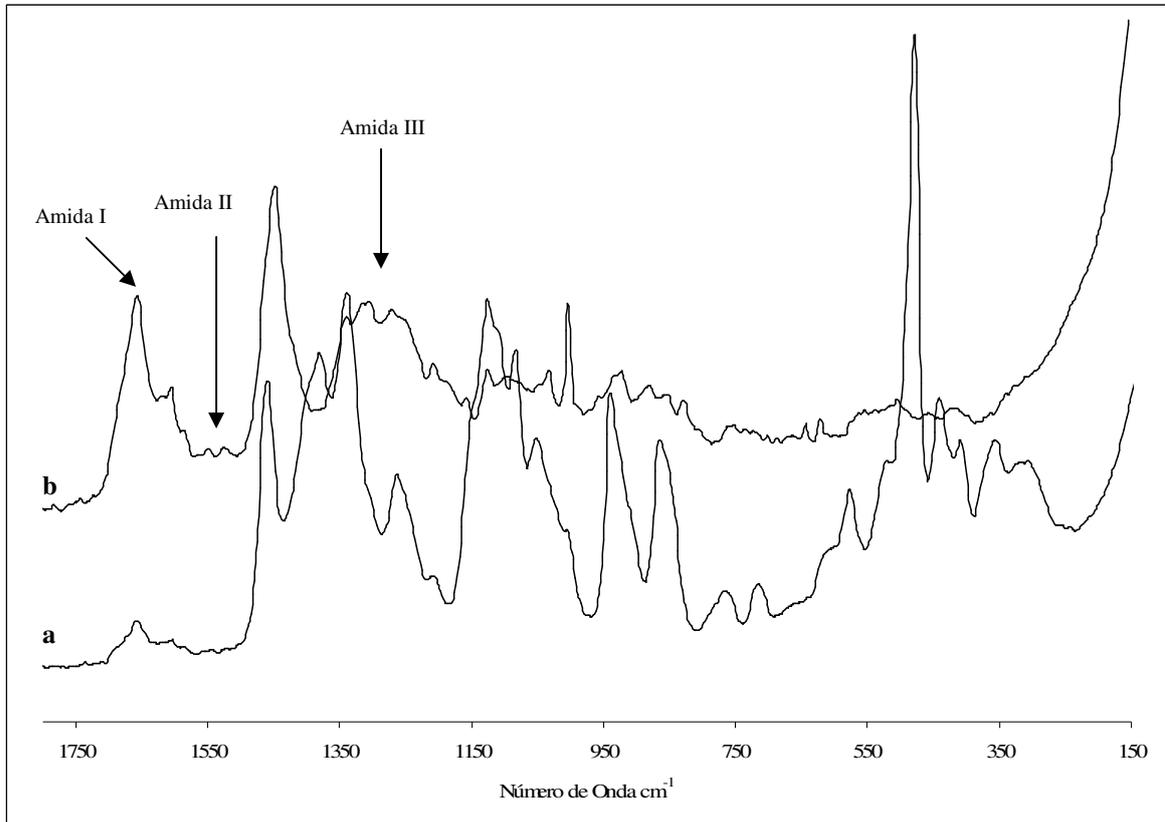


Figura 2.9 – Região entre  $1800\text{-}150\text{ cm}^{-1}$  do espectro de Raman da farinha Almari (a) e respectivo glúten (b) do grupo I, no estado seco.

Como já foi indicado atrás observa-se que a amida III é mais intensa em Raman do que em FTIR-ATR.

Na figura 2.10, apresenta-se uma expansão dos mesmos espectros mas na zona das bandas amida I e II.

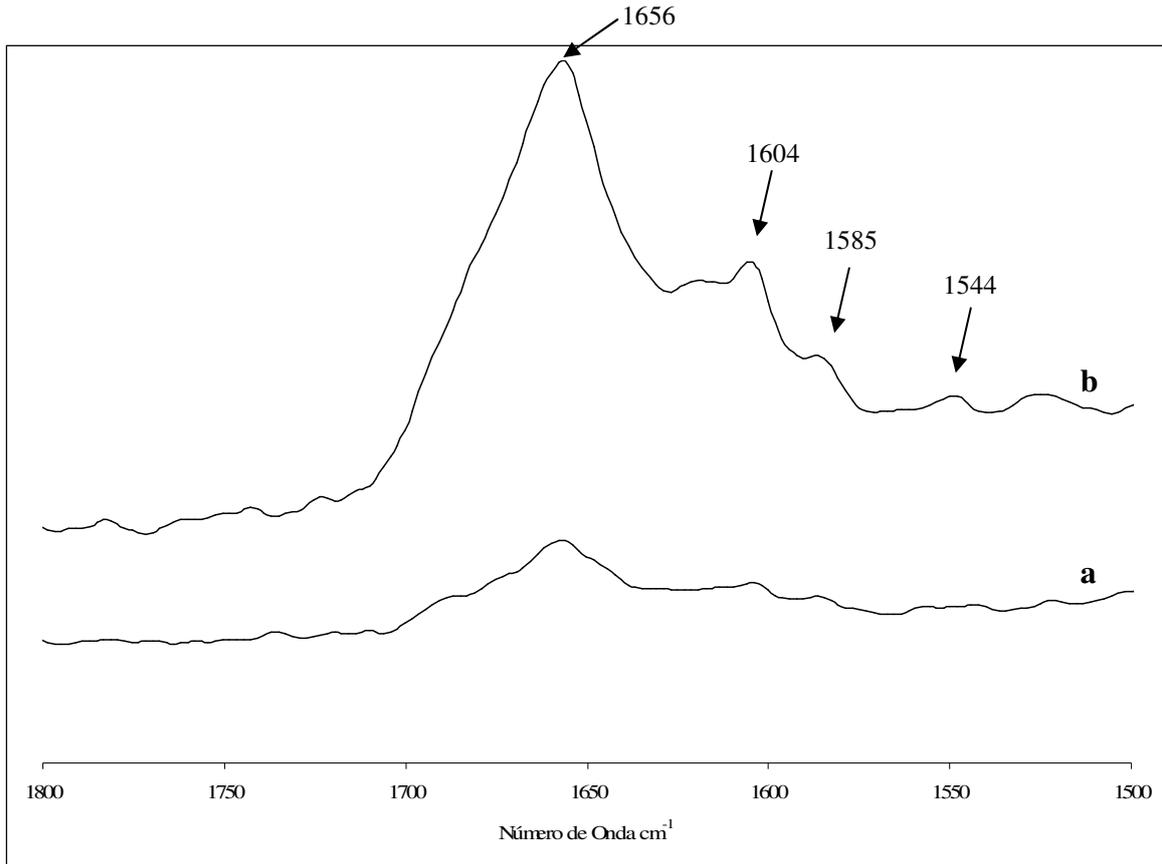


Figura 2.10 – Região entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de Raman da farinha Almari (a) e respectivo glúten (b) do grupo I, no estado seco.

A amida I reforça o observado para o FTIR-ATR, ou seja, há predominância de conformação hélice  $\alpha$ , pois o centro desta banda encontra-se a  $1656 \text{ cm}^{-1}$ , típico deste tipo de conformação (Pézolet 1996). A  $1604 \text{ cm}^{-1}$  observa-se uma pequena banda (ausente em FTIR) que, possivelmente, se deve ao ácido ferúlico. Este composto é o principal ácido fenólico do trigo, e no espectro de Raman tem duas bandas: a referida anteriormente e outra pelos  $1633 \text{ cm}^{-1}$  (esta deverá estar sob a amida I) (Ram 2003).

Embora a amida II no espectro de Raman seja menos intensa que em FTIR-ATR, observam-se duas bandas, uma a  $1585 \text{ cm}^{-1}$  e outra a  $1544 \text{ cm}^{-1}$  (figura 3.10 (b)). Com base num estudo anterior (Belton 1995) no qual foi analisado o comportamento da glutenina com a hidratação por FTIR e RMN, sugere-se que estes dois números de onda sejam relativos às regiões de cadeias desordenadas e regiões de cadeias helicoidais, respectivamente, embora não haja ainda nenhum estudo que relate a presença destas duas regiões em espectroscopia de Raman.

Na figura 2.11, apresenta-se uma expansão dos espectros em estudo mas na zona entre 1500 e 1150  $\text{cm}^{-1}$  que inclui a banda amida III.

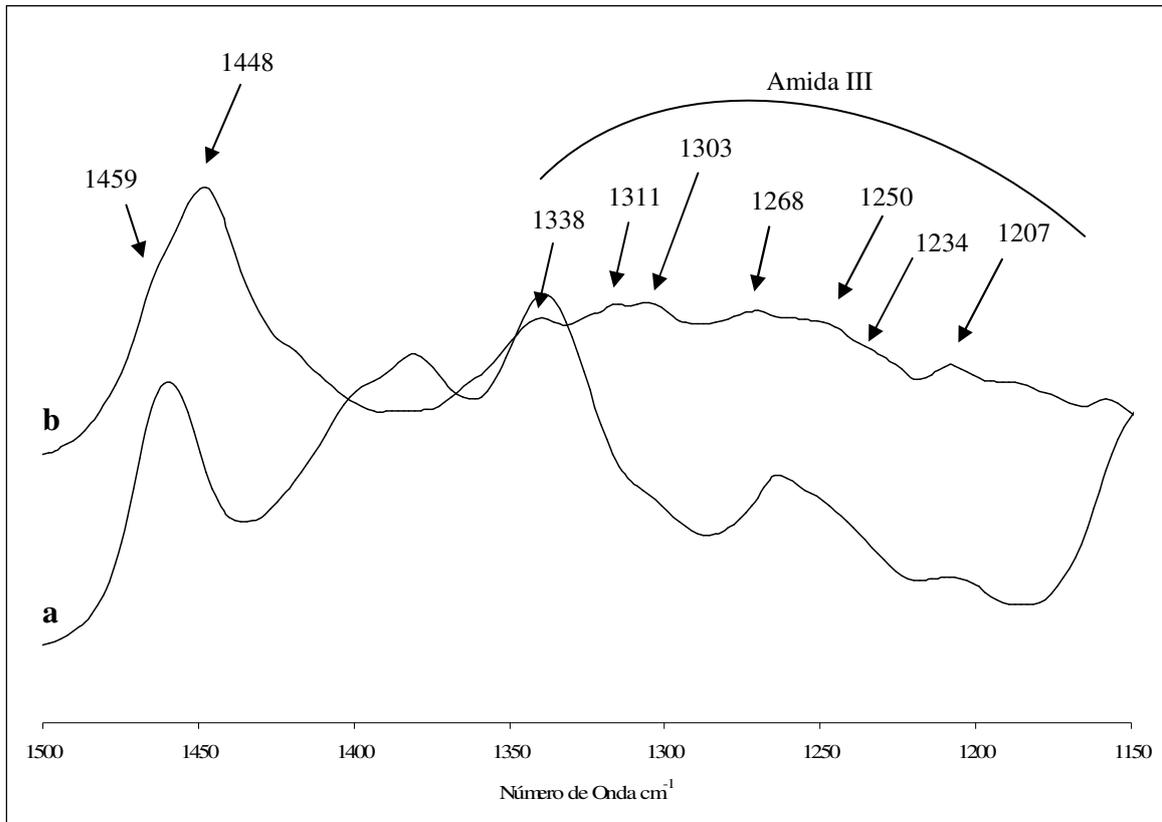


Figura 2.11 – Região entre 1500-1150  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de Raman da farinha Almari (a) e respectivo glúten (b) do grupo I, no estado seco.

Nesta zona do espectro de Raman, observa-se uma banda a 1448  $\text{cm}^{-1}$  (no glúten) que estava escondida sob bandas do amido no espectro da farinha (a), mas que se evidencia no espectro de glúten (b). Esta banda refere-se às vibrações de torção das ligações C-H. Note-se que poderão haver alguns vestígios de amido nas amostras de glúten, pois a banda que aparece a 1459  $\text{cm}^{-1}$  no espectro de farinha (a), parece surgir sob a forma de um ombro muito ligeiro no espectro de glúten (b). Para reforçar esta sugestão, observa-se a 1338  $\text{cm}^{-1}$  um pico intenso no espectro de farinha e de intensidade muito mais fraca no espectro de glúten. Facto este que conduz à dedução que, possivelmente, ainda restam vestígios de amido na amostra de glúten.

A amida III do espectro de Raman do glúten, entre 1320 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ , consegue fornecer alguma informação no que se refere a conformações proteicas. A 1303  $\text{cm}^{-1}$  surge uma banda que se refere à conformação hélice  $\alpha$ . Outra banda referente a este tipo de

conformação surge a  $1268\text{ cm}^{-1}$  (Pézolet 1996; Ching-Yung 2001). As estruturas desordenadas apresentam uma banda pelos  $1250\text{ cm}^{-1}$  (Pézolet 1996; Ching-Yung 2001). Finalmente no intervalo entre  $1250$  e a  $1197\text{ cm}^{-1}$  situam-se as duas bandas referentes à conformação folha  $\beta$ . Sugerem-se o ombro a  $1234\text{ cm}^{-1}$  e a banda a  $1207\text{ cm}^{-1}$ .

Na figura 2.12 apresentam-se os espectros das 6 amostras de glúten, no estado seco, na zona entre  $1800$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$ .

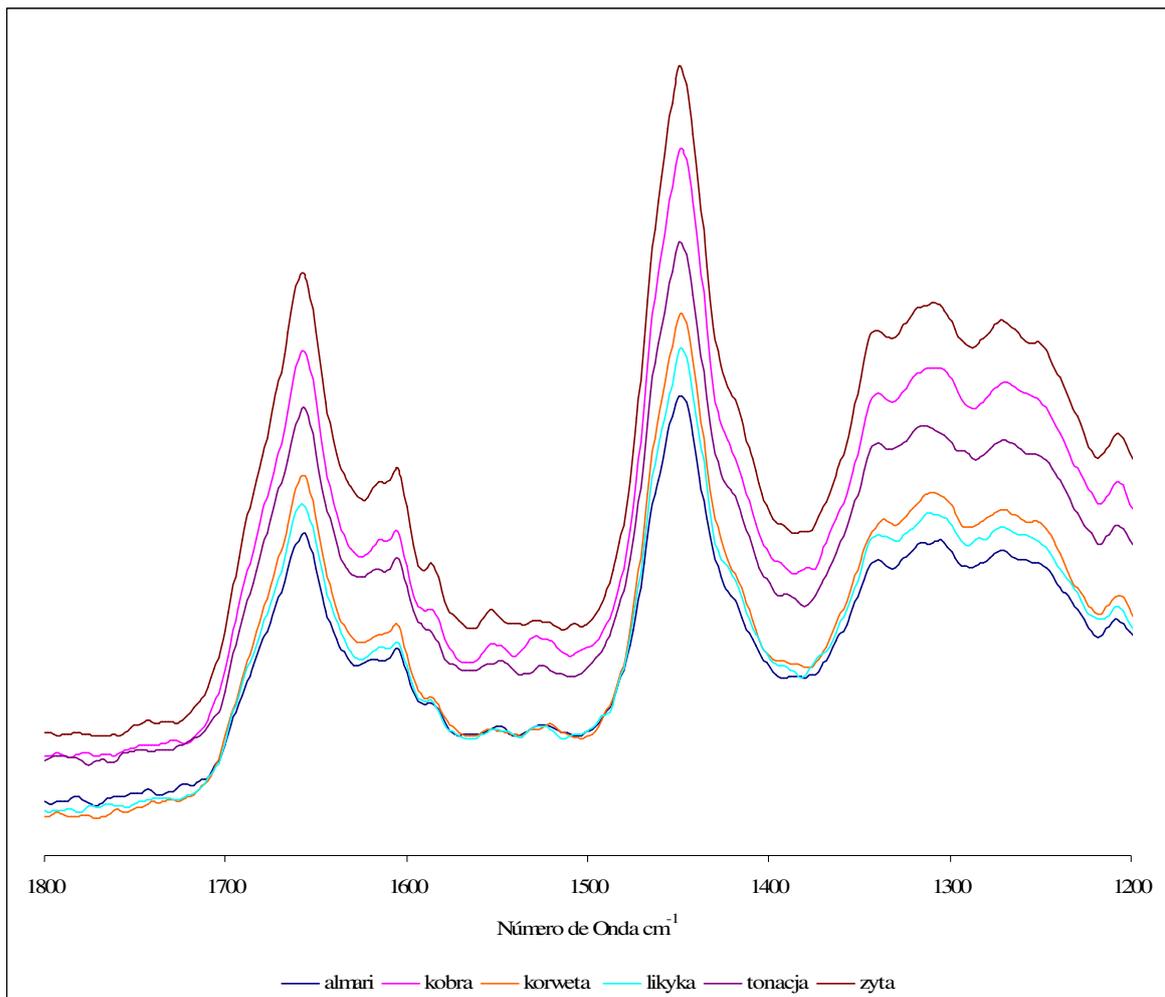


Figura 2.12 – Região entre  $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  do espectro de Raman dos glútenos do grupo I, no estado seco.

Quanto ao perfil dos espectros dos glútenos estes são muito similares entre si. Apenas na amida III ( $1350\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ) se observam ligeiras diferenças (figura 2.13).

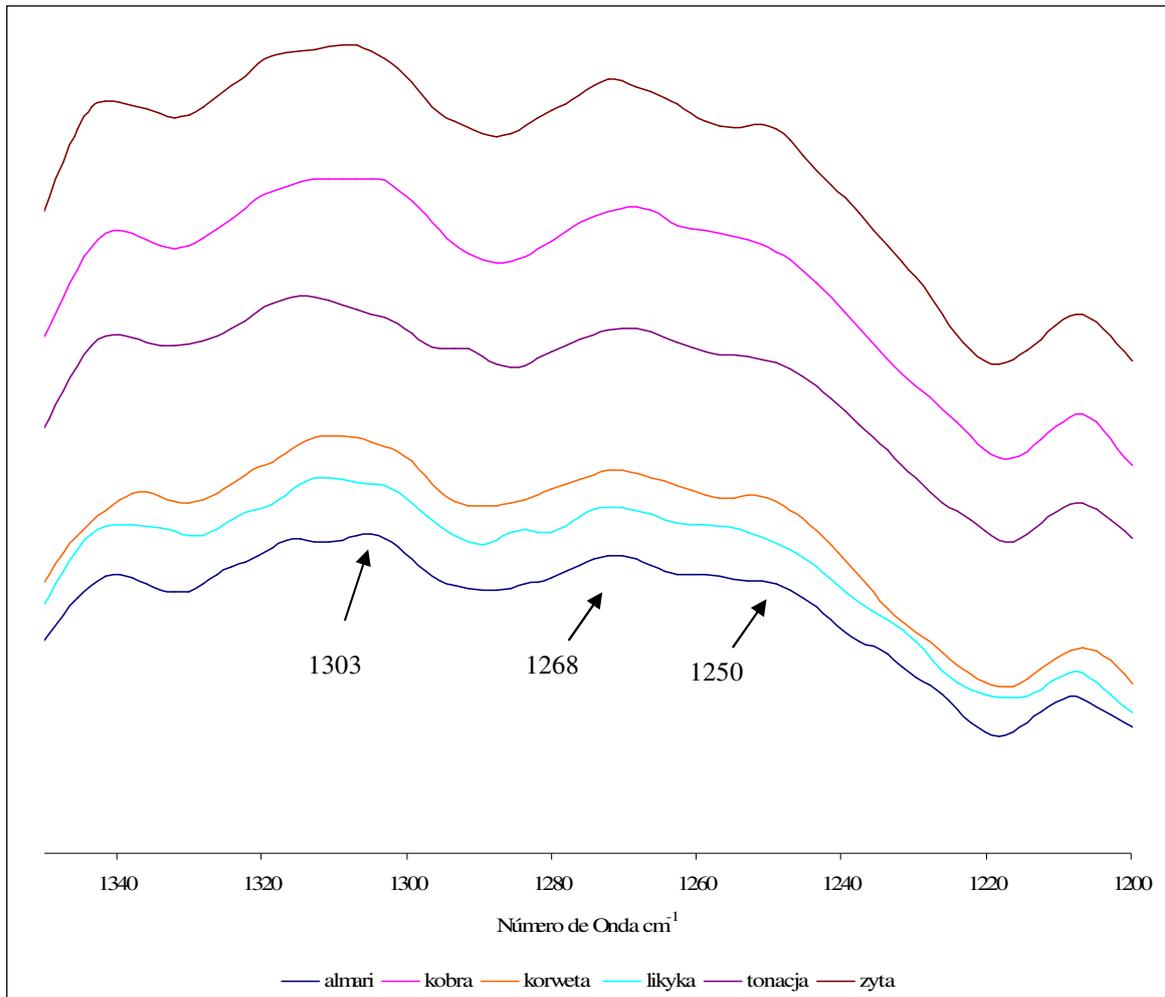


Figura 2.13 – Região entre 1350-1200  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de Raman dos glútenos do grupo I, no estado seco.

Concretamente, verifica-se na amostra Zyta (extra-dura), que as bandas da estrutura hélice  $\alpha$  sofrem um desvio de 4  $\text{cm}^{-1}$  comparativamente com as restantes amostras, passando de 1303 e 1268  $\text{cm}^{-1}$  para 1307 e 1272  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Mas de uma forma geral as amostras apresentam perfis espectrais de Raman similares.

Em suma, o FTIR-ATR apresenta-se como a técnica essencial para a análise conformacional das estruturas proteicas. A técnica de Raman, além de se ter mostrado concordante, serve como complemento do FTIR-ATR na análise das conformações, por observação da amida III e poderá ser uma mais valia a nível de vibração das ligações do amido. No entanto não foi possível observar uma relação estreita entre a conformação proteica e a dureza da farinha. Apenas a amostra Zyta, farinha extra-dura, evidenciou algumas diferenças espectrais, comparativamente às restantes amostras (e durezas).

Nesta fase da dissertação, fez-se um estudo equivalente ao realizado anteriormente mas apenas com farinhas de origem portuguesa (grupo II), também no estado seco. Do extenso grupo analisado, escolheram-se, para representação, 4 farinhas de diferentes classes de dureza: Abental, Argueil, Alva e Amazona, que fazem parte das seguintes classes de dureza: dura, extra – dura, suave e extra – suave, respectivamente. A figura 2.14 apresenta a zona entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  que inclui a amida I e II para as 4 amostras, de forma a se verificar se há diferenças a nível conformacional entre amostras.

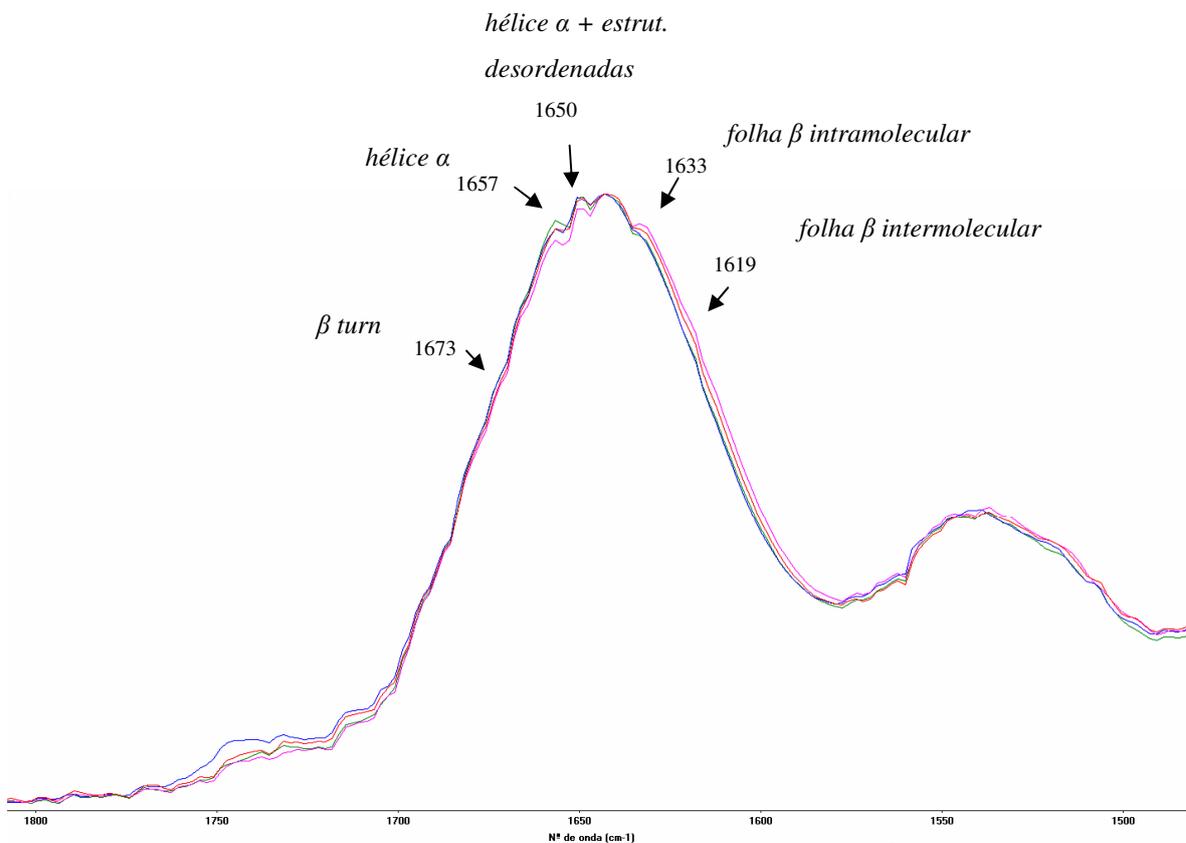


Figura 2.14 – Região entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de FTIR das farinhas Abental, Argueil, Alva e Amazonas no estado seco. Legenda: verde – Abental; azul – Argueil; rosa – Alva; vermelha – Amazonas.

O perfil dos espectros é bastante similar entre amostras. É de notar apenas que a banda e ombro típicos das folhas  $\beta$  das amostras Argueil e Abental parecem ser menos salientes que nas restantes amostras e a banda das estruturas hélice  $\alpha$  é mais proeminente para a amostra Abental. Por sua vez, a amostra Alva apresenta essa mesma banda com menor intensidade que as restantes amostras.

O cálculo de razões de intensidades (tabela 2.6) confirma que a percentagem das estruturas hélice  $\alpha$  e desordenadas é semelhante entre amostras, tal como já se havia verificado para o grupo anterior de amostras.

**Tabela 2.6** – Razões entre os principais picos da amida I dos espectros de FTIR-ATR das farinhas Abental, Argueil, Alva e Amazonas.

	I (1657 $\text{cm}^{-1}$ ) /I (1650 $\text{cm}^{-1}$ )	I (1673 $\text{cm}^{-1}$ ) /I (1633 $\text{cm}^{-1}$ )	I (1673 $\text{cm}^{-1}$ ) /I (1619 $\text{cm}^{-1}$ )	I (1657 $\text{cm}^{-1}$ ) /I (1633 $\text{cm}^{-1}$ )	I (1657 $\text{cm}^{-1}$ ) /I (1673 $\text{cm}^{-1}$ )
<b>Abental</b> ( <i>dura</i> )	0.97	0.79	0.94	1.03	1.30
<b>Argueil</b> ( <i>extra-dura</i> )	0.95	0.76	0.92	1.01	1.32
<b>Alva</b> ( <i>suave</i> )	0.95	0.75	0.88	0.98	1.30
<b>Amazonas</b> ( <i>extra-suave</i> )	0.96	0.77	0.91	1.00	1.29

As amostras portuguesas têm em maior quantidade a conformação hélice  $\alpha$ , a par da conformação folha  $\beta$  intra molecular, seguindo-se a conformação folha  $\beta$  inter molecular, e por fim “ $\beta$  turn”, diferindo das amostras polacas em relação à hélice  $\alpha$  e folha  $\beta$  intra molecular. Através das razões e com a ajuda da análise directa dos espectros, pode-se concluir que a farinha Abental é aquela que tem menor percentagem de folha  $\beta$  e a amostra alva é aquela que terá mais da referida estrutura. Uma vez mais, não é directa a relação entre a conformação e a dureza das farinhas. Tal como se verificou com as amostras polacas, a diferença das razões entre amostras é muito reduzida.

Como já se tinha verificado no capítulo anterior, não é possível obter informação acerca das zonas amida I e amida II, no espectro de Raman das farinhas secas, por causa da abundante sobreposição de bandas relativas a carboidratos. Relativamente à amida III, esta zona também, em parte, afectada pela vibração das ligações dos carboidratos, no entanto, observou-se que não há alterações significativas comparativamente com as amostras do grupo I, e por isso não será aqui apresentado o espectro.

## **2.4.2 Análise quimiométrica dos espectros de FTIR de um conjunto de farinhas de origem Portuguesa**

Neste capítulo pretende-se avaliar até que ponto é possível separar um conjunto de farinhas de origem portuguesa (grupo II), no estado seco, com base no seu tipo de dureza, utilizando para o efeito a análise em componentes principais (PCA) e a regressão parcial em mínimos quadrados – análise discriminante (PLS-DA).

A PCA foi realizada para as seguintes regiões do espectro de FTIR: 1800-600  $\text{cm}^{-1}$  – zona característica das proteínas e hidratos de carbono; 1800-1200  $\text{cm}^{-1}$  – zona característica das proteínas; 1200-800  $\text{cm}^{-1}$  – zona característica dos hidratos de carbono. Com o intuito de maximizar as separações aplicou-se, posteriormente, a PLS-DA aos dados espectrais para as mesmas regiões supracitadas.

O universo de amostras utilizado foi o grupo II constituído por 29 farinhas de origem Portuguesa no estado seco. As amostras dividem-se em quatro cores, conforme a classe de dureza: vermelho – extra-dura; verde – dura; azul – suave; rosa – extra-suave; amarelo – não definida.

A primeira análise foi realizada para a região entre 1800-600  $\text{cm}^{-1}$ . Na figura 2.15 estão representadas as coordenadas factoriais dos dois primeiros componentes principais PC1 e PC2 que contam com 86.4% da variabilidade total. Na figura 2.16 está representado o gráfico das contribuições factoriais dos PC1 e PC2. Os PC's mais elevados não contêm informação relevante, e por isso não são apresentados.

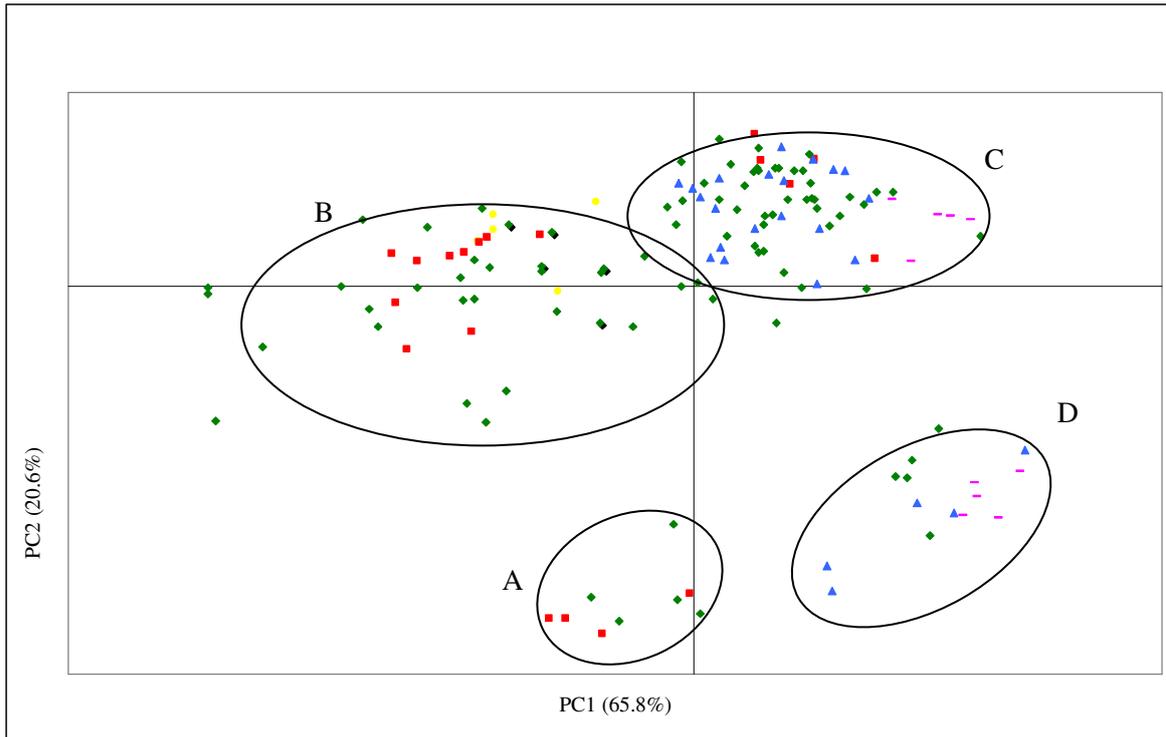


Figura 2.15 – Coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR 1800-600  $\text{cm}^{-1}$  (classe de dureza: vermelho – extra dura; verde – dura; azul – suave; rosa – extra suave; amarelo – não definida).

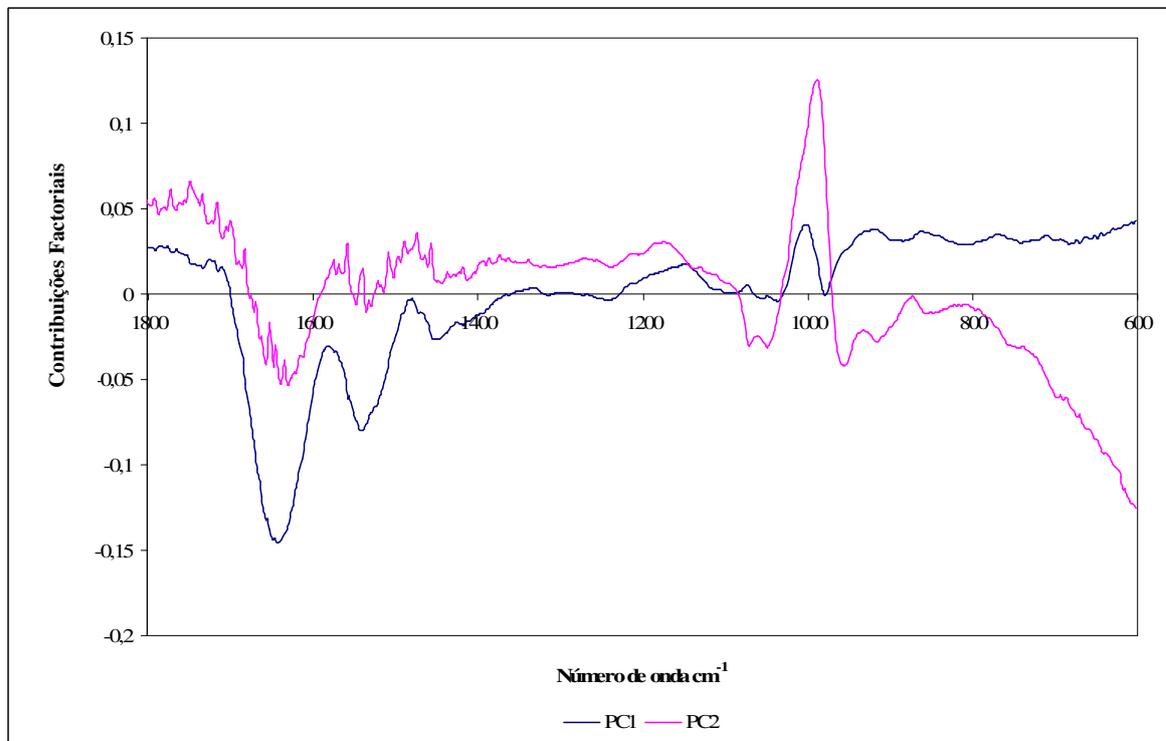


Figura 2.16 – Contribuições factoriais de PC1 e PC2 da região de FTIR 1800-600  $\text{cm}^{-1}$ .

Analisando a figura 2.15 verifica-se que as amostras não se agrupam por classe de dureza, mas podem identificar-se quatro grupos de amostras: grupo A – PC1 e PC2 negativos, grupo B – PC1 positivo e negativo e PC2 negativo, grupo C – PC1 e PC2 positivos, grupo D – PC1 positivo e PC2 negativo. Estes grupos podem, no entanto, relacionar-se com outros factores, sendo provável que as características inerentes a cada variedade contribuam mais na separação das amostras que o grau de dureza. As bandas responsáveis por esta separação (fig. 2.16) são as bandas amida I e II (esta última em menor extensão), o grupo B é influenciado pelas principais bandas negativas do PC2, ou seja também pela amida I, II, e pelas bandas a  $1056\text{ cm}^{-1}$ ,  $952\text{ cm}^{-1}$  e  $912\text{ cm}^{-1}$  (vibrações das ligações das moléculas de amido). Os grupos C e D são influenciados por vibrações relativas às ligações do amido. Especificamente, para o grupo C, pela vibração do alongamento da ligação C-OH do amido (banda perto dos  $1000\text{ cm}^{-1}$ ). Em suma, as características dos componentes dos grupos A e B são diferentes dos restantes 2 grupos.

Utilizando-se a região entre  $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  (zona típica de proteínas) para o estudo de PCA tentou-se separar melhor as amostras em grupos, para fornecer informação adicional ao estudo anterior. Na figura 2.17 apresenta-se o diagrama de coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2) que contam com 91.5% da variabilidade total.

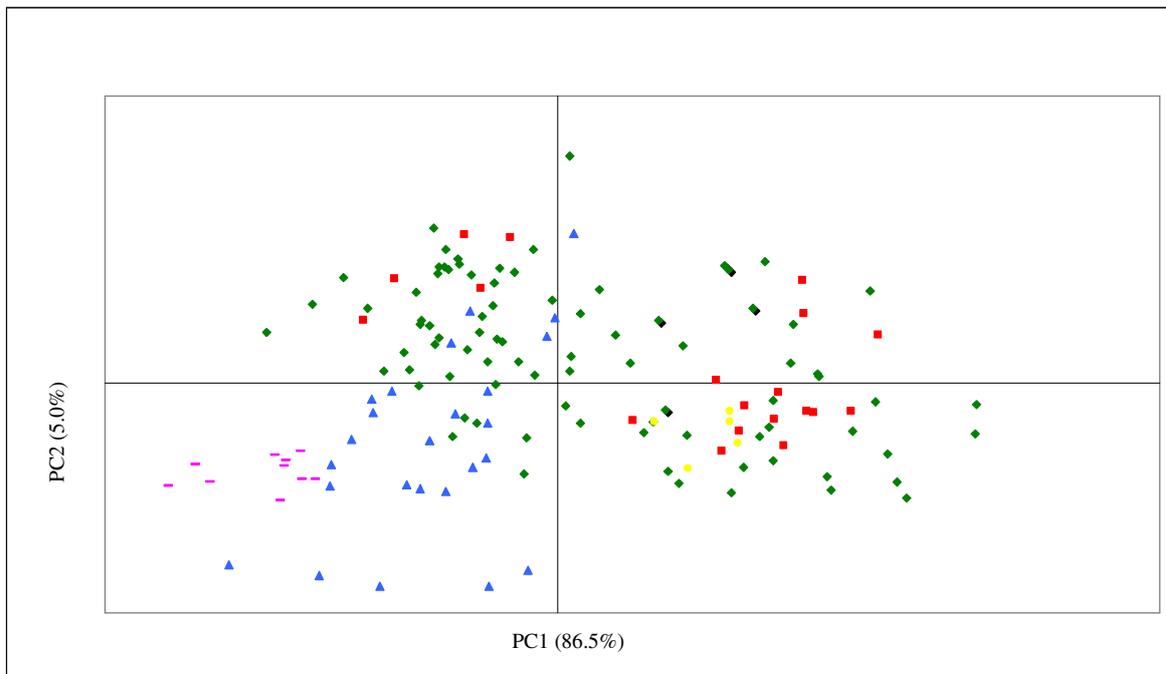


Figura 2.17 – Coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR  $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  (classe de dureza: vermelho – Extra dura; verde – Dura; azul – Suave; rosa – Extra Suave; amarelo – não definida).

Observa-se assim que, a maioria das farinhas do tipo suave (cor azul) e todas do tipo extra suave (cor rosa) estão separadas das farinhas do tipo duro (cor verde) e extra duro (cor vermelha). De facto, as farinhas representadas de cor rosa e de cor azul separam-se das restantes pelos PC1 e PC2 negativos (figura 2.18).

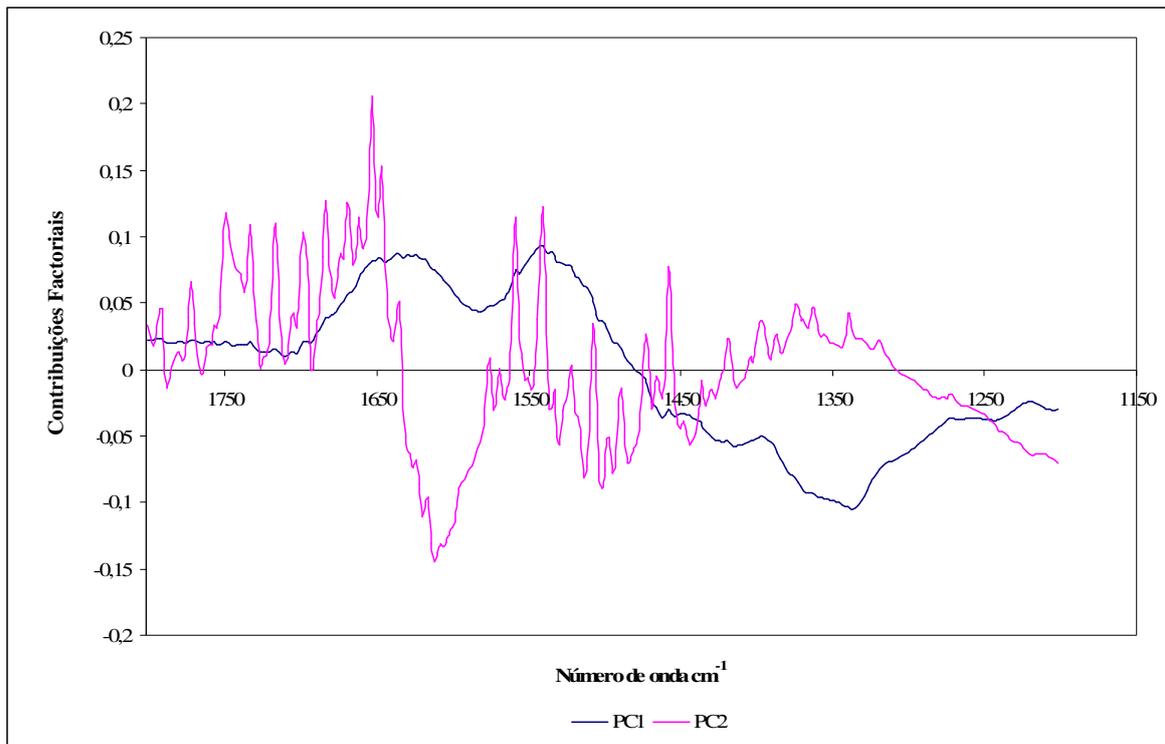


Figura 2.18 – Contribuições factoriais para o PC1 e PC2 da região de FTIR 1800-1200  $\text{cm}^{-1}$ .

Note-se que o gráfico das contribuições factoriais do PC2 é bastante ruidoso (figura 2.18), impossibilitando por isso a análise completa para este PC. A zona responsável pelos PC1 e PC2 negativos encontra-se entre 1454 e 1451  $\text{cm}^{-1}$ , que poderá estar relacionada com a vibração de ligações de moléculas de lípidos e proteínas.

Em suma, não há uma separação fina em função do tipo de dureza, mas conseguem-se separar as amostras extra dura e dura das suave e extra suave, que se separam devido a diferenças a nível proteico e lipídico. Como as puroindolinas contêm uma região anfífilica que é responsável pela ligação destas proteínas com os fosfolípidos da membrana dos grânulos de amido (Brites 2005), provavelmente a separação observada na figura 2.17 deve-se a este tipo de proteínas.

De seguida aplicou-se a PCA a mais uma zona restrita do espectro, entre 1200 e 800  $\text{cm}^{-1}$  (região típica de carboidratos), que deu origem ao seguinte gráfico de coordenadas

factoriais (PC1 vs. PC2), apresentado na fig. 2.19, que contam com 81.1% da variabilidade total. Na figura 2.20 está representado perfil das contribuições factoriais para os mesmos PC's.

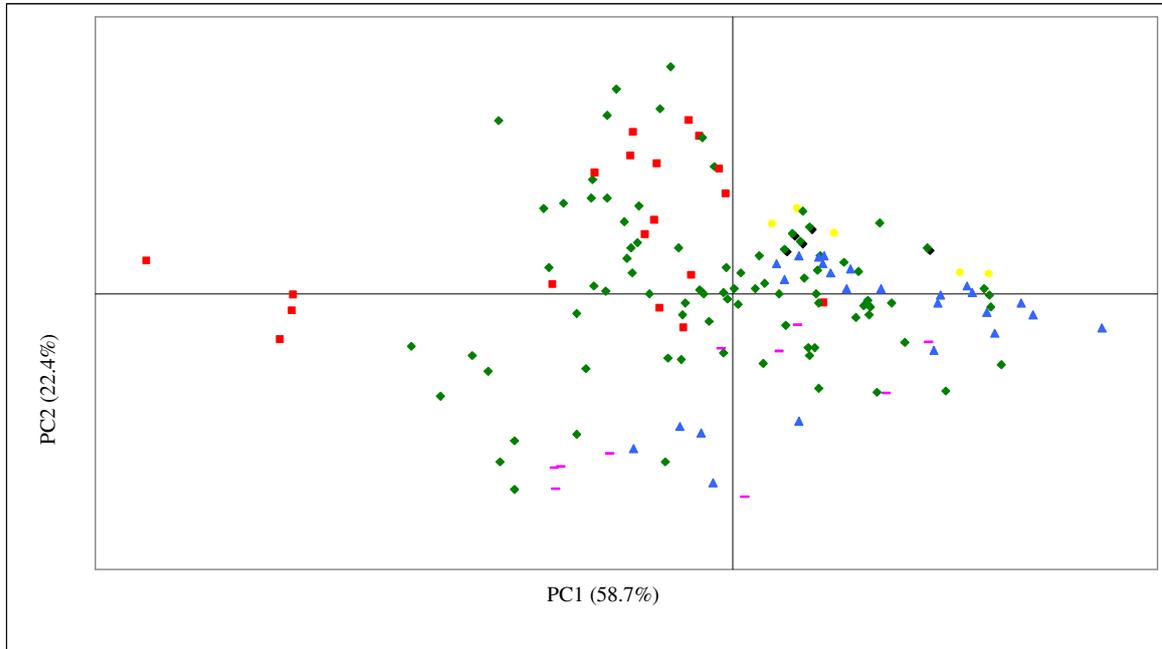


Figura 2.19 – Coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR 1200-800  $\text{cm}^{-1}$  (classe de dureza: vermelho – Extra dura; verde – Dura; azul – Suave; rosa – Extra Suave; amarelo – não definida).

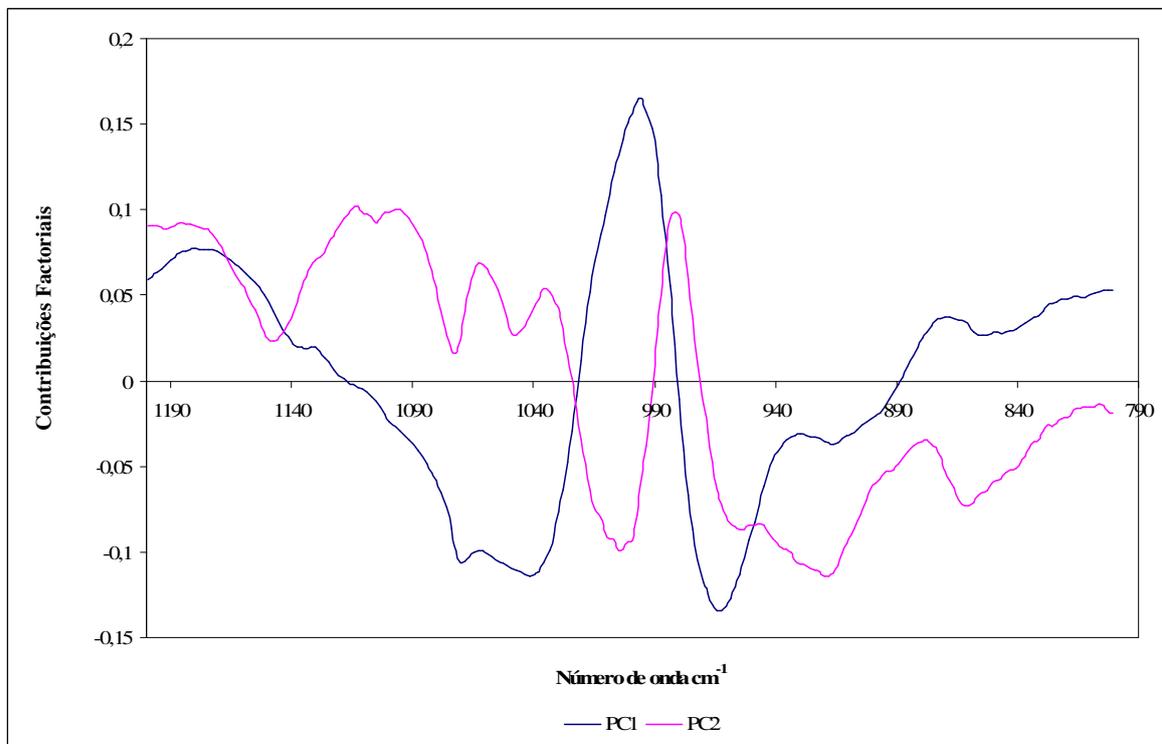


Figura 2.20 – Contribuições factoriais para o PC1 e PC2 da região de FTIR 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ .

Analisando a figura 2.19, verifica-se que as amostras vermelhas (extra duras) separam-se das amostras rosa (extra suaves), em PC2, e da maioria das amostras azuis (suaves) em PC1. Mas note-se que as amostras de cor verde (duras) se misturam com todas as outras. As farinhas assinaladas a cor vermelha encontram-se em PC1 negativo e PC2 positivo, por isso, pelas contribuições factoriais (figura 2.20), conclui-se que separam-se das amostras rosa, pela região de centro a  $1060\text{ cm}^{-1}$  e devido também aos números de onda  $1002\text{ cm}^{-1}$  (sugere-se alguma contribuição de proteínas e amido),  $916\text{ cm}^{-1}$  (amido),  $860\text{ cm}^{-1}$  (alongamento da ligação C-O-C da forma  $\beta$  da glucose). Relativamente às amostras extra dura vs. suave, são as bandas a  $995\text{ cm}^{-1}$  e a  $869\text{ cm}^{-1}$  (PC1 positivo) e a região já atrás mencionada inerente à posição do grupo vermelho (extra dura) que ditam as diferenças entre grupos.

Em suma, parece haver uma separação das farinhas do tipo extra dura, das farinhas de dureza extra suave e somente suave. Sendo as vibrações relativas ao amido a principal justificativa, embora pareça haver alguma contribuição das proteínas, possivelmente das puroindolinas, visto estas estarem relacionadas com as membranas dos grânulos de amido.

Com o intuito de melhorar alguma eventual separação das amostras, consoante o tipo de dureza, aplicou-se o método PLS-DA, às zonas espectrais entre  $1700\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1700\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  e  $1200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ . Esta última zona, como não evidenciou resultados melhores relativamente aos da PCA, não irá ser apresentada. Para LV's (variáveis latentes, que são equivalentes a PC's) superiores a 2, não se obtiveram resultados pertinentes, em todas as zonas exploradas. Para a zona que inclui, proteínas e amido,  $1700\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ , as coordenadas factoriais, LV1 vs. LV2, do PLS-DA são as que se seguem, figura 2.21. E na figura 2.22 apresentam-se as contribuições factoriais referentes ao LV1 vs. LV2.

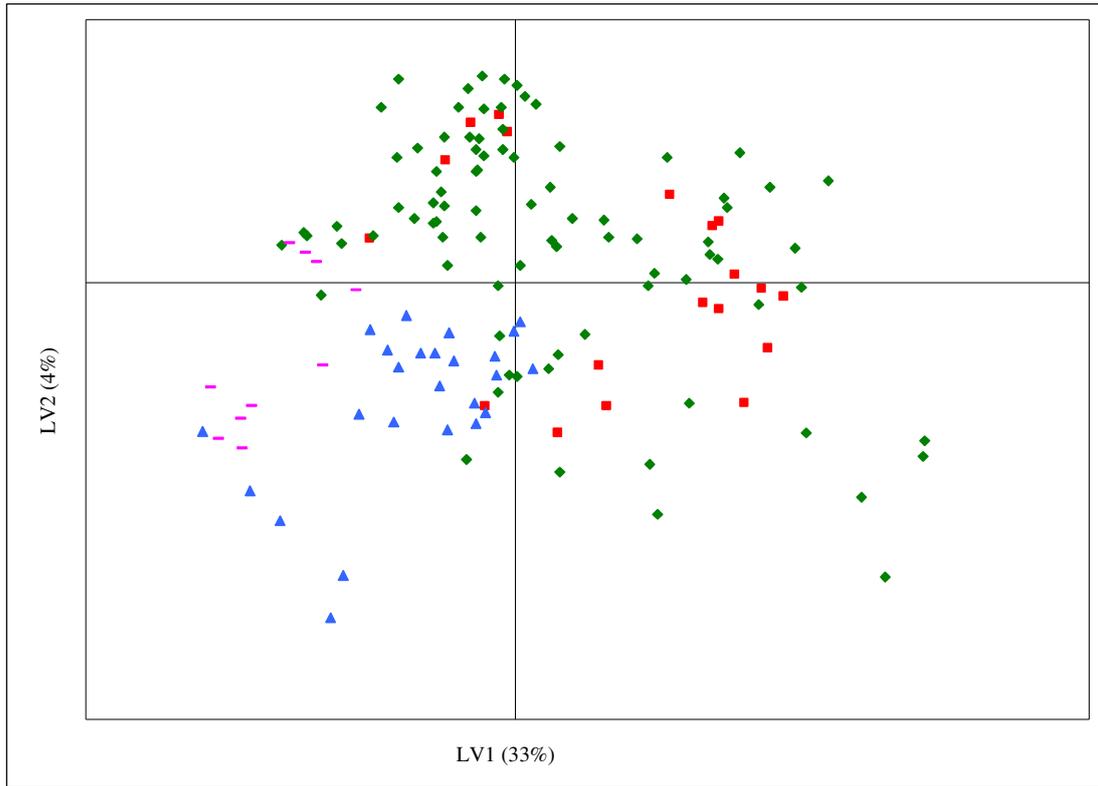


Figura 2.21 – Coordenadas factoriais, LV1 vs. LV2, da região de FTIR 1700-600  $\text{cm}^{-1}$  (classe de dureza: vermelho – Extra dura; verde – Dura; azul – Suave; rosa – Extra Suave).

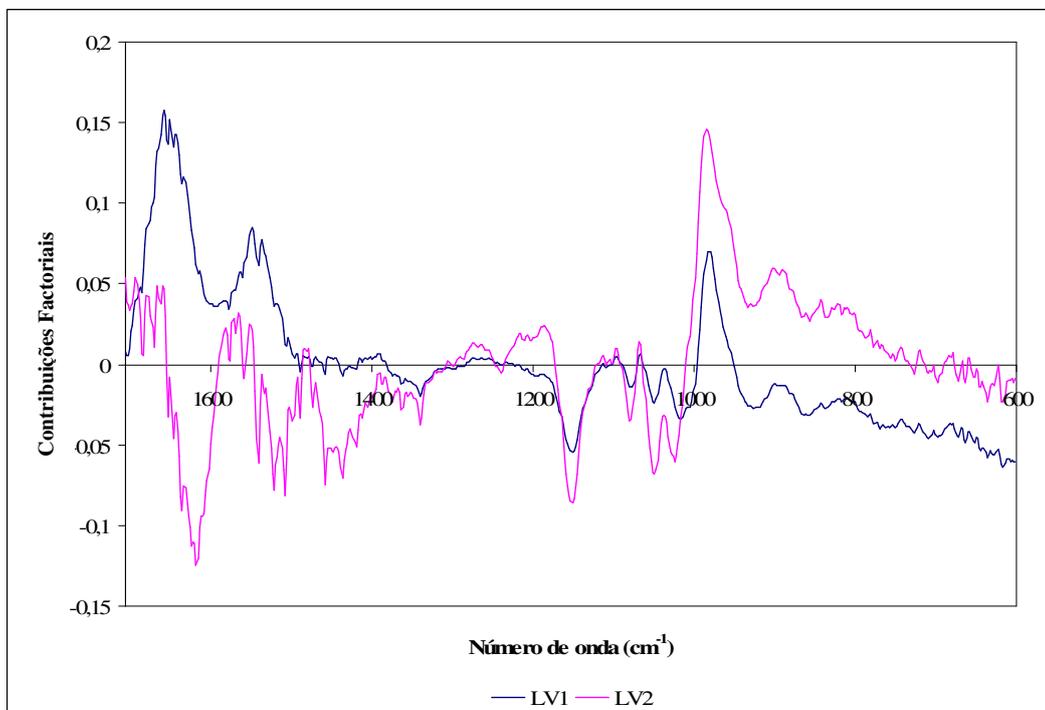


Figura 2.22 – Contribuições factoriais para o LV1 e LV2 da região de FTIR 1700-600  $\text{cm}^{-1}$ .

Observando a figura 2.21 há sugestão de uma leve separação das amostras consoante o tipo de dureza. Assim as farinhas extra suaves e as suaves separam-se das restantes por se aglomerarem no LV1 e LV2 negativos. Analisando o gráfico de contribuições factoriais (figura 2.22), verifica-se que são as bandas a 1049, 1078 (alongamento C-OH do amido), 1149  $\text{cm}^{-1}$  (alongamento da ligação C-O dos carboidratos) e a banda entre 1390-1307  $\text{cm}^{-1}$  (parte da amida III) responsáveis pela separação das amostras de farinha do tipo suave e extra suave.

Aplicando agora o mesmo método mas apenas à zona característica das proteínas (1700-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) obtêm-se as seguintes coordenadas factoriais, figura 2.23. As contribuições factoriais respectivas apresentam-se na figura 2.24.

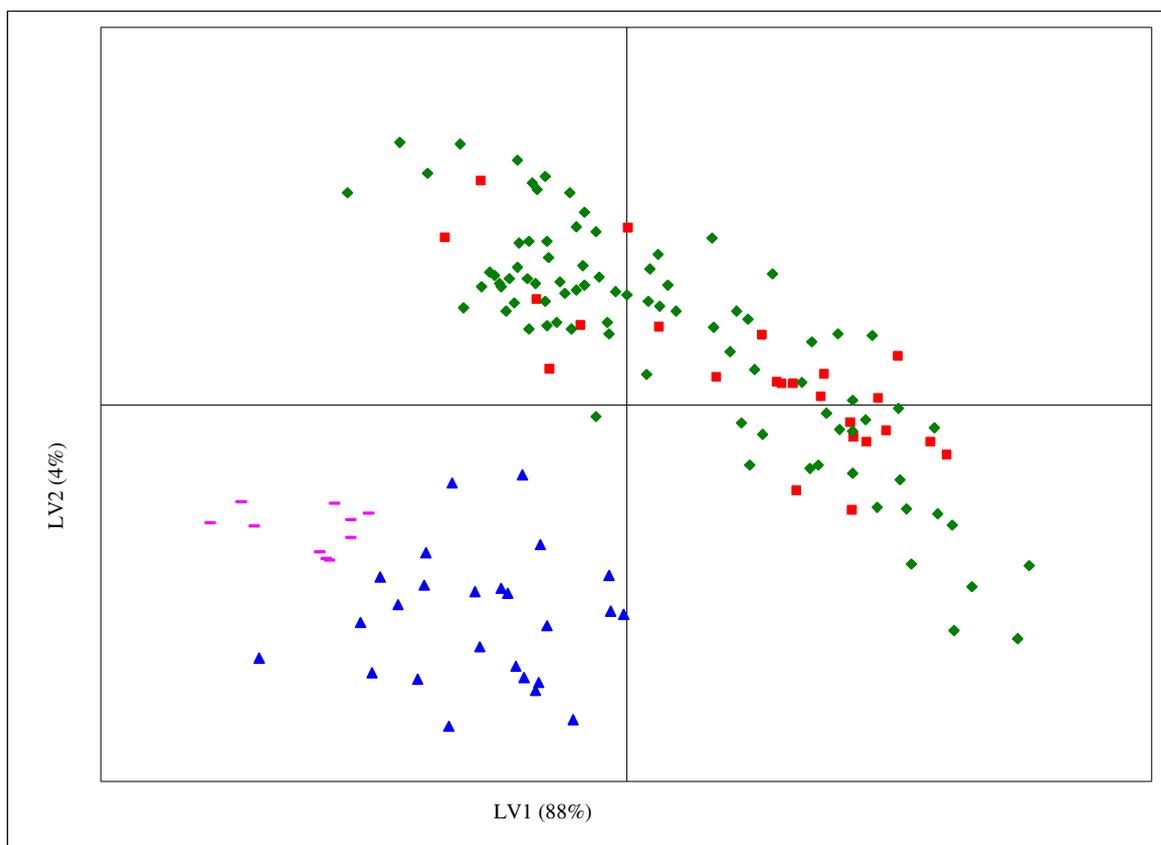


Figura 2.23 – Coordenadas factoriais, LV1 vs. LV2, da região de FTIR 1700-1200  $\text{cm}^{-1}$  (classe de dureza: vermelho – Extra dura; verde – Dura; azul – Suave; rosa – Extra Suave).

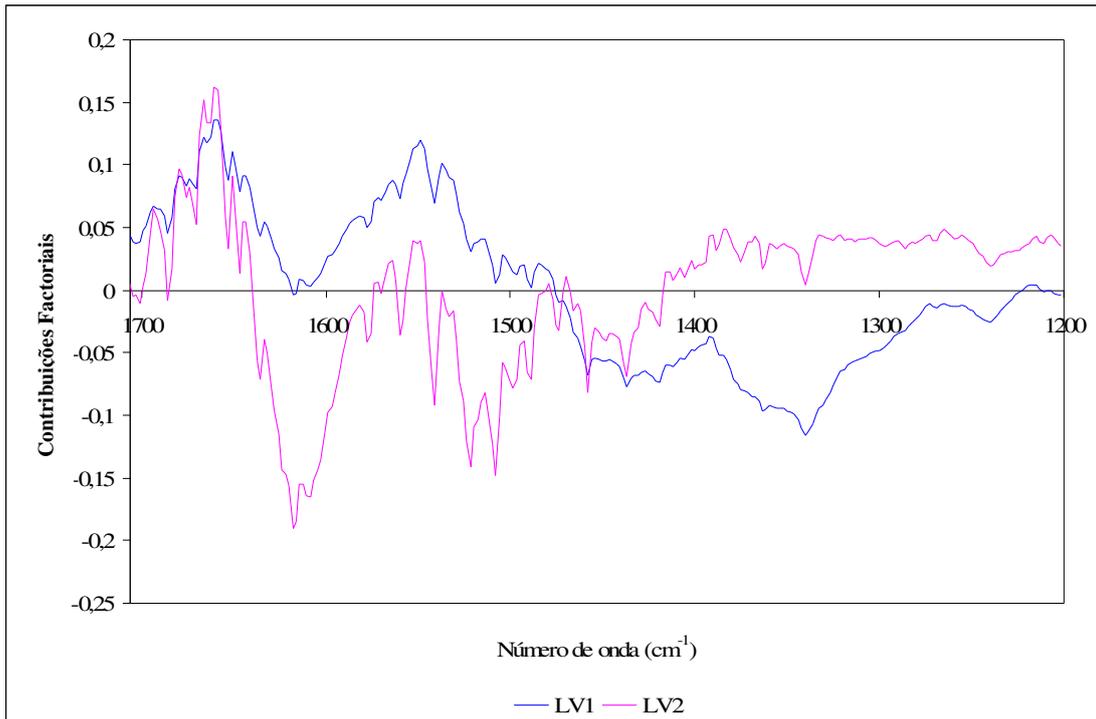


Figura 2.24 – Contribuições factoriais para o LV1 e LV2 da região de FTIR 1700-1200  $\text{cm}^{-1}$ .

Desta vez as amostras do tipo extra suave e suave separam-se claramente das restantes (extra duras e duras). Esta separação mostra que as contribuições das proteínas e lípidos são importantes, aliás mais importantes que as dos carboidratos.

Analisando as contribuições factoriais para LV1 e LV2 negativos (figura 2.24), as bandas responsáveis são duas que surgem a 1457 e a 1436  $\text{cm}^{-1}$ . Não se conseguiu fazer nenhuma atribuição a estas bandas. Sabe-se apenas que a 1449  $\text{cm}^{-1}$  surge uma banda que é devida a uma contribuição de lípidos e proteínas. Poderemos sugerir apenas, que também estas bandas poderão advir de lípidos e proteínas, que uma vez mais poderão ser as puroindolinas, pelo seu envolvimento com os lípidos.

## **2.5 Estudo Espectroscópico de farinhas de diferentes variedades no estado hidratado**

### **2.5.1 FTIR de farinhas de origens Polaca e Portuguesa**

Nesta fase do trabalho, as amostras Polacas do grupo I foram submetidas a hidratação como referenciado em “Materiais e métodos” e foram realizadas leituras espectroscópicas de FTIR-ATR, de forma a estudar o efeito da hidratação na conformação das proteínas do glúten. Pois a hidratação poderá alterar a resolução e desta forma observarem-se características novas ou mais claramente que no estado seco.

Para analisar as diferenças entre farinhas secas e farinhas hidratadas escolheu--se uma farinha do grupo I – farinha Korweta. O efeito da hidratação nos espectros foi o mesmo para todas as amostras, tanto nas Polacas (farinhas e glúten) como nas Portuguesas. A figura 3.28 representa os espectros da farinha Korweta no estado seco e no estado hidratado (50% de água), na região entre 1800 – 1200  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros apresentados não sofreram subtração da água, pois quando subtraído o espectro referente à água, não se notaram alterações significativas, com exceção de uma diminuição na intensidade de parte da banda amida I.

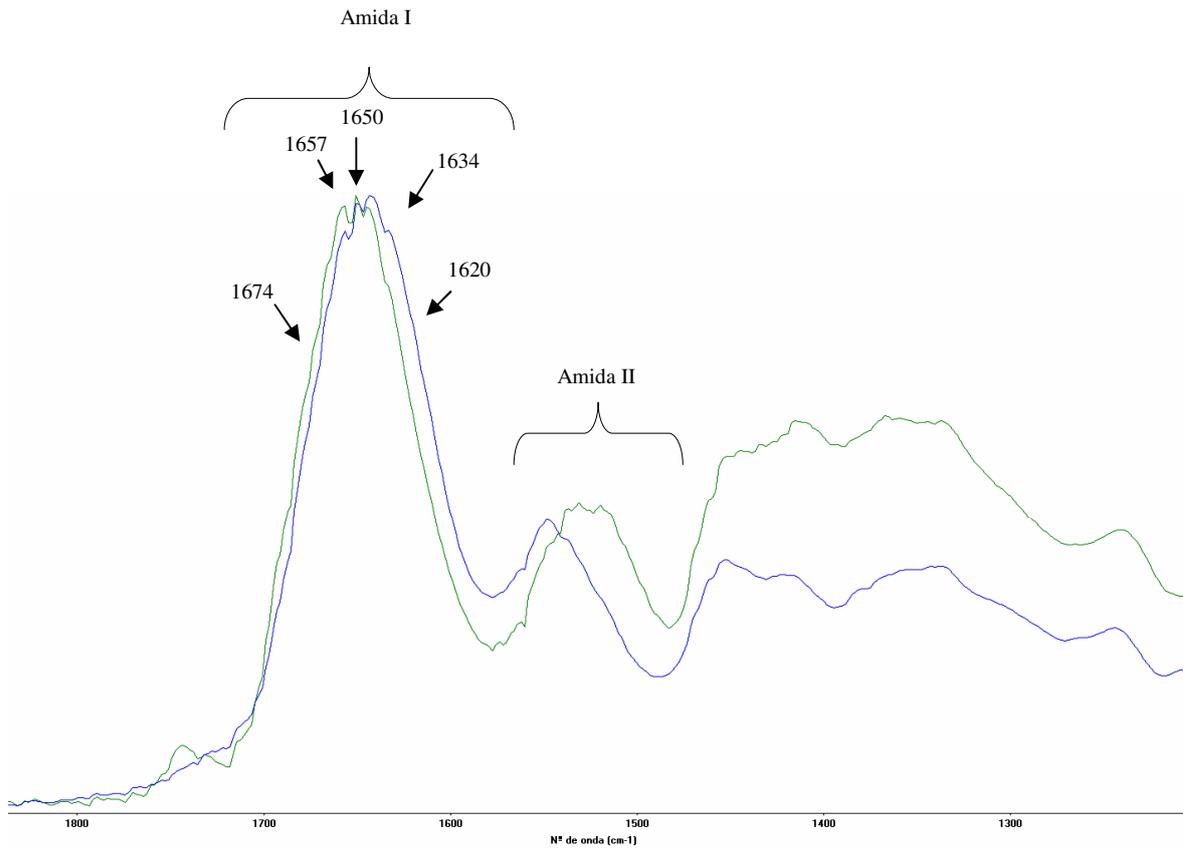


Figura 2.25 – Região entre 1800-1200  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de FTIR da farinha Korweta no estado seco (cor verde) e no estado hidratado (cor azul).

A figura 2.25 mostra que as principais alterações são ao nível das bandas da amida I e principalmente amida II. Para auxiliar a análise da amida I, apresenta-se de seguida as razões calculadas para os principais picos da amida I desta farinha no estado seco e no estado hidratado (50% hidratação).

**Tabela 2.7** – Razões entre os principais picos da amida I dos espectros de FTIR da farinha Korweta, no estado seco e no estado hidratado (50% de hidratação).

	$I (1657 \text{ cm}^{-1})$ $I (1650 \text{ cm}^{-1})$	$I (1674 \text{ cm}^{-1})$ $I (1634 \text{ cm}^{-1})$	$I (1674 \text{ cm}^{-1})$ $I (1620 \text{ cm}^{-1})$	$I (1657 \text{ cm}^{-1})$ $I (1634 \text{ cm}^{-1})$	$I (1657 \text{ cm}^{-1})$ $I (1674 \text{ cm}^{-1})$
<b>Korweta (estado seco)</b>	0.99	0.94	1.19	1.16	1.24
<b>Korweta (estado hidratado)</b>	0.95	0.74	0.89	1.00	1.35

Após hidratação, verificou-se que a quantidade de estruturas do tipo “ $\beta$  turn” ( $1674\text{ cm}^{-1}$ ), diminui em detrimento das estruturas folha  $\beta$  inter moleculares ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ), como se verifica pela diminuição da razão entre estas duas bandas, de 1.19 para 0.89. O mesmo comportamento se verifica em relação com as estruturas folhas  $\beta$  intra moleculares ( $1634\text{ cm}^{-1}$ ), pois a razão entre “ $\beta$  turn” e estas estruturas passou de 0.94 para 0.74.

Observando-se a razão entre hélice  $\alpha$  ( $1657\text{ cm}^{-1}$ ) e folha  $\beta$  intra molecular facilmente se conclui que estas estruturas com a hidratação (na percentagem estudada) apresentam-se em quantidades semelhantes. Possivelmente o número de folhas  $\beta$  aumentou, e as estruturas hélice  $\alpha$  mantiveram-se. Pois, como a estrutura “ $\beta$  turn” diminuiu, e a razão entre hélice  $\alpha$  e “ $\beta$  turn” aumentou ligeiramente, há indicação que as hélice  $\alpha$  não sofreram alterações quantitativas. Estas alterações estruturais com a hidratação foram já observadas, dando origem ao modelo “Loop and Train” (Belton 1999; Wellner 2005).

Observando-se a amida II, fig. 2.25, no espectro da farinha seca aparece entre  $1575 - 1481\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que a mesma zona, no espectro da farinha hidratada surge no intervalo de  $1576$  a  $1489\text{ cm}^{-1}$ . As bandas de centros a  $1518$  e  $1532\text{ cm}^{-1}$ , sofrem um desvio (que ainda não tinha sido referenciado), quando a amostra é submetida a hidratação, e passam a situar-se a  $1537$  e  $1547\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A banda amida II corresponde maioritariamente à vibração da torção no plano das ligações C-N-H emparelhada com o alongamento C-N (Belton 1995). Esta zona é bastante sensível a associação molecular por ligações de hidrogénio, que provocam um aumento na frequência das bandas no espectro. Este desvio pode ser causado sobretudo pela hidratação de grupos amida, na cadeia principal da proteína e nas cadeias laterais da glutenina, que ainda não tinham ligações de hidrogénio.

Resumidamente, do estado seco para o estado hidratado (50% de água), verifica-se uma diminuição do número de estruturas “ $\beta$  turn” e aumento das folhas  $\beta$ , enquanto que as estruturas hélice  $\alpha$  e folhas  $\beta$  intra moleculares se mantêm e observa-se também um aumento n° de onda do intervalo típico da amida II. Note-se que além da hidratação também o acto de misturar e de amassar a massa (fornecimento de energia mecânica) conduz ao aumento da quantidade de estruturas folha  $\beta$  em detrimento de estruturas “ $\beta$  turn”, através do alongamento das zonas “loop” e o descompacto das zonas “train” (Li 2005; Nikolaus Wellner 2005).

Seguidamente vão ser estudadas possíveis diferenças entre as diferentes variedades de farinhas e glúten de origem Polaca no estado hidratado, através de análise directa dos espectros de FTIR-ATR, e deste modo investigar o efeito da variedade, tal como realizado para as mesmas amostras no estado seco. Os espectros das seis farinhas polacas, no estado hidratado (50% H<sub>2</sub>O) não são aqui apresentados pois não há alterações significativas entre os perfis das amostras em questão, tanto para a farinha hidratada como para o glúten no mesmo estado. Apresenta-se de seguida a tabela com as razões calculadas para as farinhas. As razões calculadas para os glúten desenvolveram resultados similares aos das farinhas e por isso não são aqui mostrados.

**Tabela 2.8** – Razões entre os principais picos da Amida I dos espectros de FTIR das farinhas do grupo I hidratadas (50% de água).

	I (1657 cm <sup>-1</sup> ) /I (1650 cm <sup>-1</sup> )	I (1674 cm <sup>-1</sup> ) /I (1634 cm <sup>-1</sup> )	I (1674 cm <sup>-1</sup> ) /I (1620 cm <sup>-1</sup> )	I (1657 cm <sup>-1</sup> ) /I (1634 cm <sup>-1</sup> )	I (1657 cm <sup>-1</sup> ) /I (1674 cm <sup>-1</sup> )
Zyta	0.95	0.70	0.83	0.95	1.36
Korweta	0.95	0.74	0.89	1.00	1.35
Almari	0.96	0.73	0.88	1.00	1.37
Kobra	0.95	0.73	0.87	0.97	1.33
Tonacja	0.95	0.73	0.87	1.00	1.38
Likyka	0.96	0.73	0.88	1.00	1.37

Analisando a tabela e os espectros de FTIR, verifica-se apenas que as razões entre estruturas das várias amostras são bastante idênticas, excepto para a amostra Zyta, para as razões entre 1674/1634, 1674/1634 e 1657/1634 (cm<sup>-1</sup>). A amostra Zyta, em relação às restantes amostras será constituída provavelmente, por mais estrutura folha β intramolecular (1634 cm<sup>-1</sup>) e intermolecular (1620 cm<sup>-1</sup>) o que poderá mostrar estar-se perante uma farinha indicada para o fabrico de pão (Belton 1999; Li 2005). Ou seja, poderá tratar-se de uma amostra com características superiores para a panificação relativamente às restantes.

No que respeita à análise do efeito da hidratação sobre as farinhas de origem portuguesa, os resultados são similares aos obtidos para as farinhas de origem polaca. A análise directa da região entre 1800 – 1500  $\text{cm}^{-1}$  (figura 2.26) mostra que não há alterações significativas entre os perfis das amostras hidratadas, apenas ligeiras diferenças que vão ser de seguida analisadas, com o auxílio das razões entre os principais picos de amida I do espectro de FTIR das 4 farinhas hidratadas em estudo

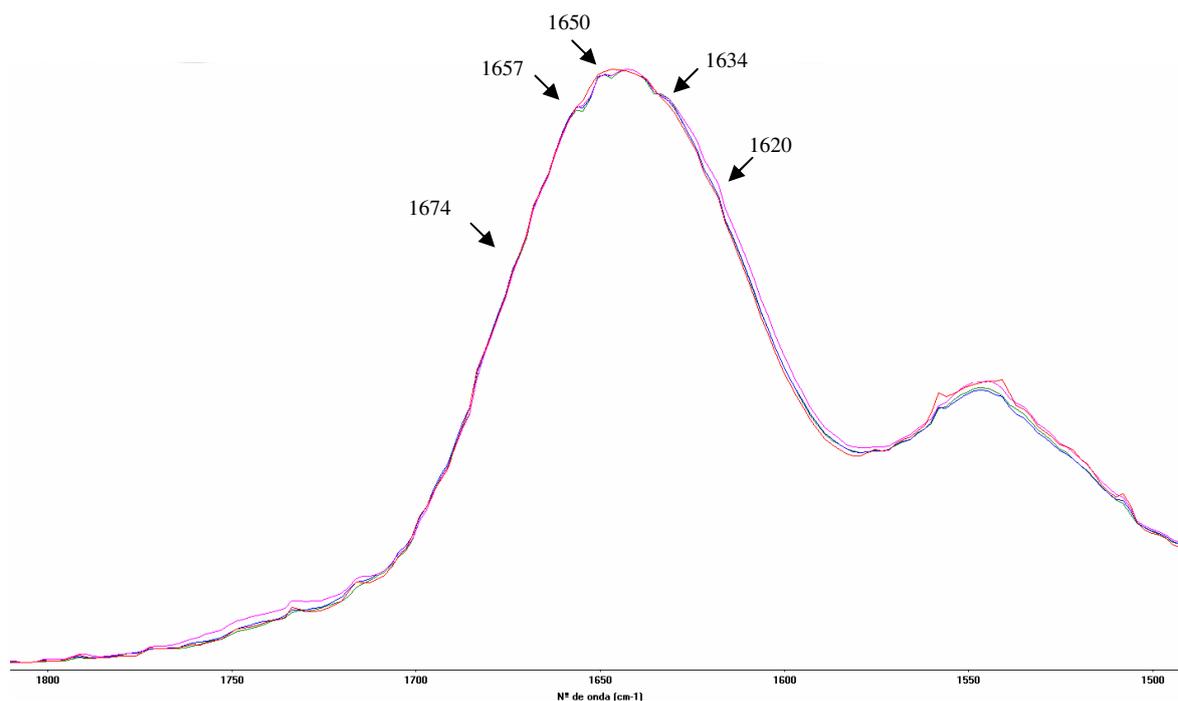


Figura 2.26 – Região entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  do espectro de FTIR das farinhas Abental, Almansor, Alva e Amazonas no estado hidratado (50%  $\text{H}_2\text{O}$ ). Legenda: verde – Abental; azul – Argueil; rosa – Alva; vermelho – Amazonas.

**Tabela 2.9** – Razões entre os principais picos da amida I dos espectros de FTIR das farinhas Abental, Almansor, Alva e Amazonas.

	$I(1657 \text{ cm}^{-1}) / I(1650 \text{ cm}^{-1})$	$I(1674 \text{ cm}^{-1}) / I(1634 \text{ cm}^{-1})$	$I(1674 \text{ cm}^{-1}) / I(1620 \text{ cm}^{-1})$	$I(1657 \text{ cm}^{-1}) / I(1634 \text{ cm}^{-1})$	$I(1657 \text{ cm}^{-1}) / I(1674 \text{ cm}^{-1})$
Abental	0.95	0.71	0.83	0.98	1.37
Almansor	0.95	0.69	0.81	0.97	1.40
Alva	0.95	0.70	0.81	0.98	1.40
Amazonas	0.95	0.72	0.85	0.99	1.39

Não se denotam diferenças significativas entre amostras, levando a concluir que no estado hidratado, a 50% de água, as amostras em estudo tornam-se, a nível estrutural, muito semelhantes entre si. A maioria das amostras apresentam proporções equiparáveis de folhas  $\beta$  intra moleculares ( $1634\text{ cm}^{-1}$ ) e estruturas hélice  $\alpha$  ( $1657\text{ cm}^{-1}$ ). E o tipo de estrutura em menor proporção nestas farinhas hidratadas é a conformação “ $\beta$  turn” ( $1674\text{ cm}^{-1}$ ). Porém, há a referir, a título sugestivo, uma ligeira diferença, para as amostras Almansor e Alva em relação às restantes, ao nível da conformação folhas  $\beta$  inter moleculares ( $1620\text{ cm}^{-1}$ ). Estas duas amostras apresentam, possivelmente, uma maior proporção desta conformação do que as restantes amostras.

### **2.5.2 Análise quimiométrica dos espectros de FTIR de um conjunto de farinhas de origem Portuguesa**

De novo, realizou-se uma análise em componentes principais para verificar se a hidratação altera de algum modo significativo os resultados obtidos para as amostras no estado seco (capítulo 2.4.2). Tentou-se aplicar também o método PLS-DA mas sem resultados interessantes e por isso estes não serão apresentados nesta dissertação.

Esta PCA foi realizada, tal como nas farinhas no estado seco, para as seguintes regiões do espectro de FTIR:  $1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  – zona característica das proteínas e hidratos de carbono;  $1800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  – zona característica das proteínas;  $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  – zona característica dos hidratos de carbono.

A análise da zona entre  $1800\text{ – }1200\text{ cm}^{-1}$ , deu origem às coordenadas factoriais dos dois primeiros PC's que contam com 97.7% da variabilidade total, representado na figura 2.27. Na figura 2.28 apresenta-se o respectivo perfil das contribuições factoriais. Os PC's mais elevados não são apresentados por não conterem informação relevante.

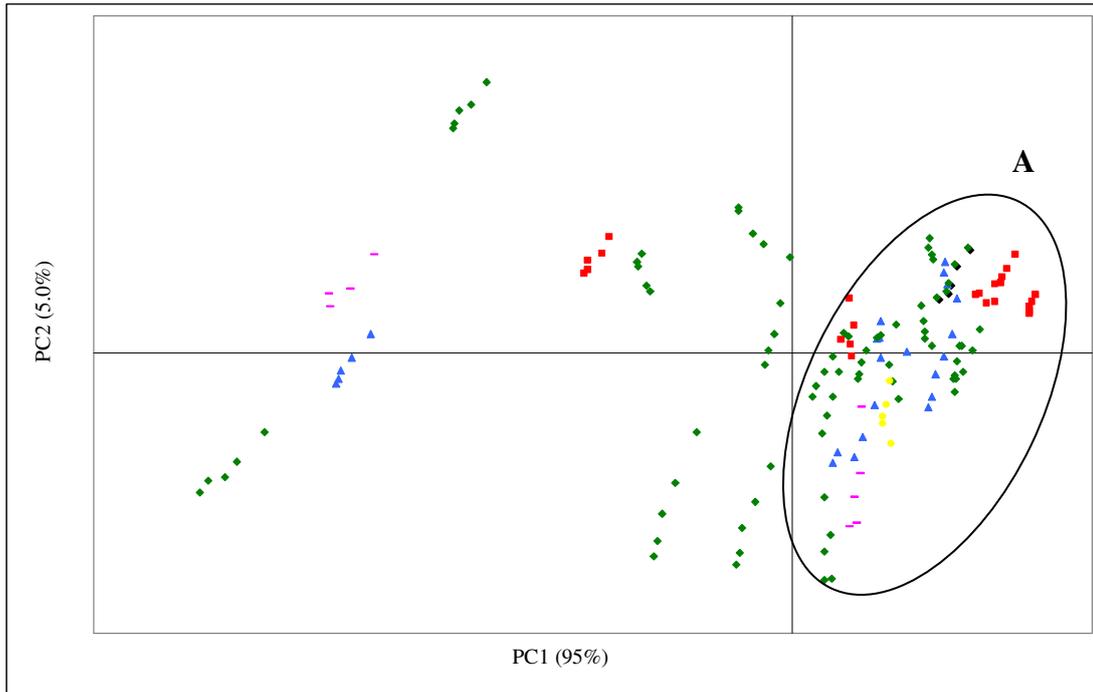


Figura 2.27 – Coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR 1800-1200  $\text{cm}^{-1}$  (classe de dureza: vermelho – Extra dura; verde – Dura; azul – Suave; rosa – Extra Suave; amarelo – não definida).

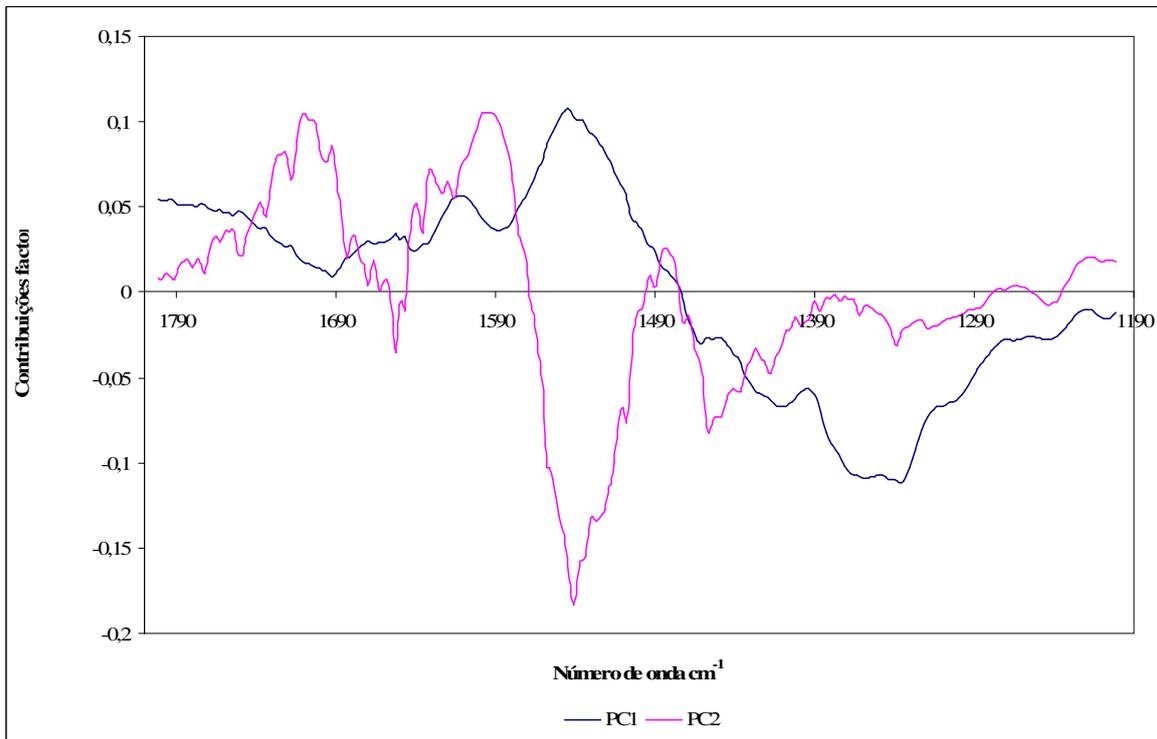


Figura 2.28 – Contribuições factoriais para o PC1 e PC2 da região de FTIR 1800-1200  $\text{cm}^{-1}$ .

O PC2 está fortemente condicionado pela dispersão das réplicas. Por isso, para este estudo, este eixo não tem significado.

Pela análise da figura 2.27 pode-se identificar um grupo (definido com a letra A), que se distingue das restantes amostras, e se situa no PC1 positivo. Analisando as coordenadas factoriais (figura 2.27), verifica-se que a separação para a zona entre 1800-1200  $\text{cm}^{-1}$  não acontece devido ao tipo de dureza. A dureza até poderá ter alguma influência, mas a variedade sobrepõe-se muito a essa característica. As bandas responsáveis pelo PC1 positivo são: 1660  $\text{cm}^{-1}$  (deverá ser a sobreposição da banda típica da estrutura “ $\beta$  turn” com a banda da conformação  $\alpha$  hélice), 1616  $\text{cm}^{-1}$  (possivelmente, conformação folha  $\beta$  intermolecular) e 1542  $\text{cm}^{-1}$  (zonas helicoidais das estruturas proteicas). Em suma, o grupo A difere das restantes amostras devido a diferenças em determinadas conformações proteicas.

Comparando estes resultados com os obtidos para as amostras no estado seco, para a mesma zona do espectro (1800-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) – figura 2.17, verifica-se que há maior variabilidade entre amostras no estado seco (mais especificamente entre duras e suaves), enquanto que no estado hidratado, as amostras tornam-se mais semelhantes entre si. A hidratação tem um papel directo na estrutura das proteínas das amostras, tornando-as conformacionalmente mais idênticas.

Passando agora aos resultados da PCA na zona entre 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ , apresenta-se na figura 2.29 o gráfico das coordenadas factoriais dos dois primeiros PC's que contam com 91.9% da variabilidade total. Na figura 2.30 está representado o respectivo perfil das contribuições factoriais.

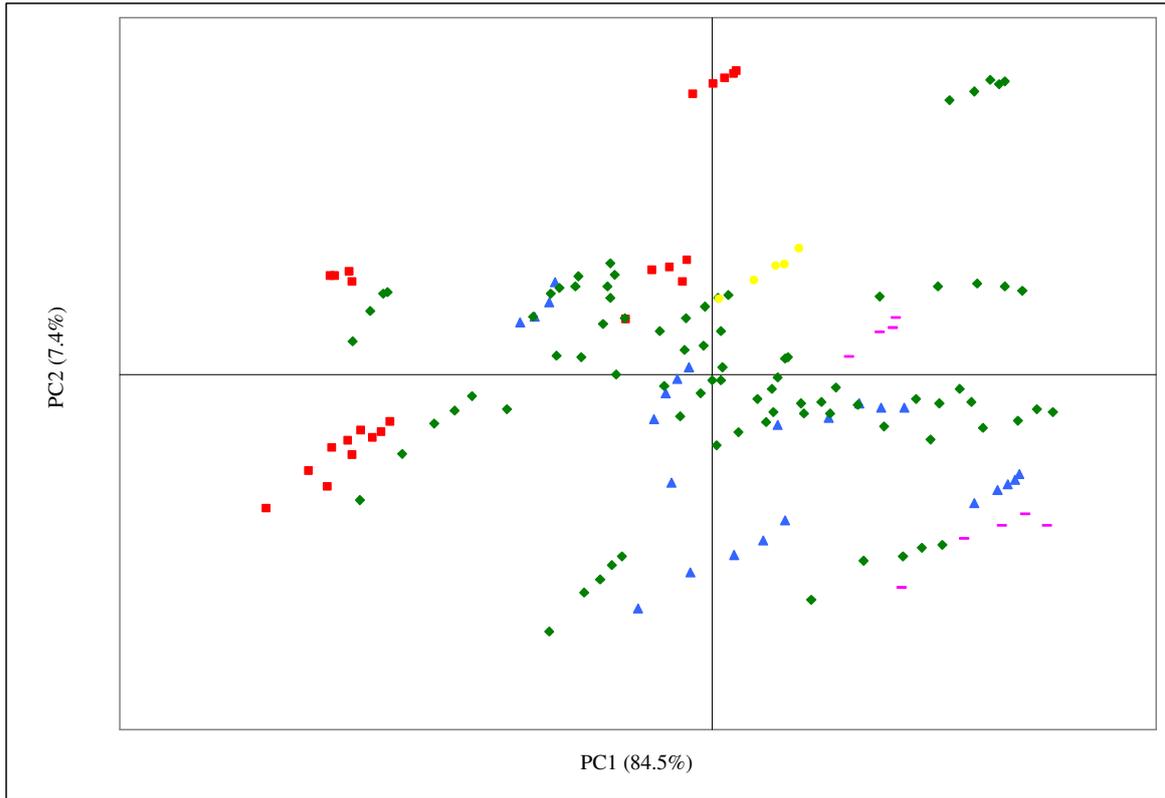


Figura 2.29 – Coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR 1200-800  $\text{cm}^{-1}$  (classe de dureza: vermelho – Extra dura; verde – Dura; azul – Suave; rosa – Extra Suave; amarelo – não definida).

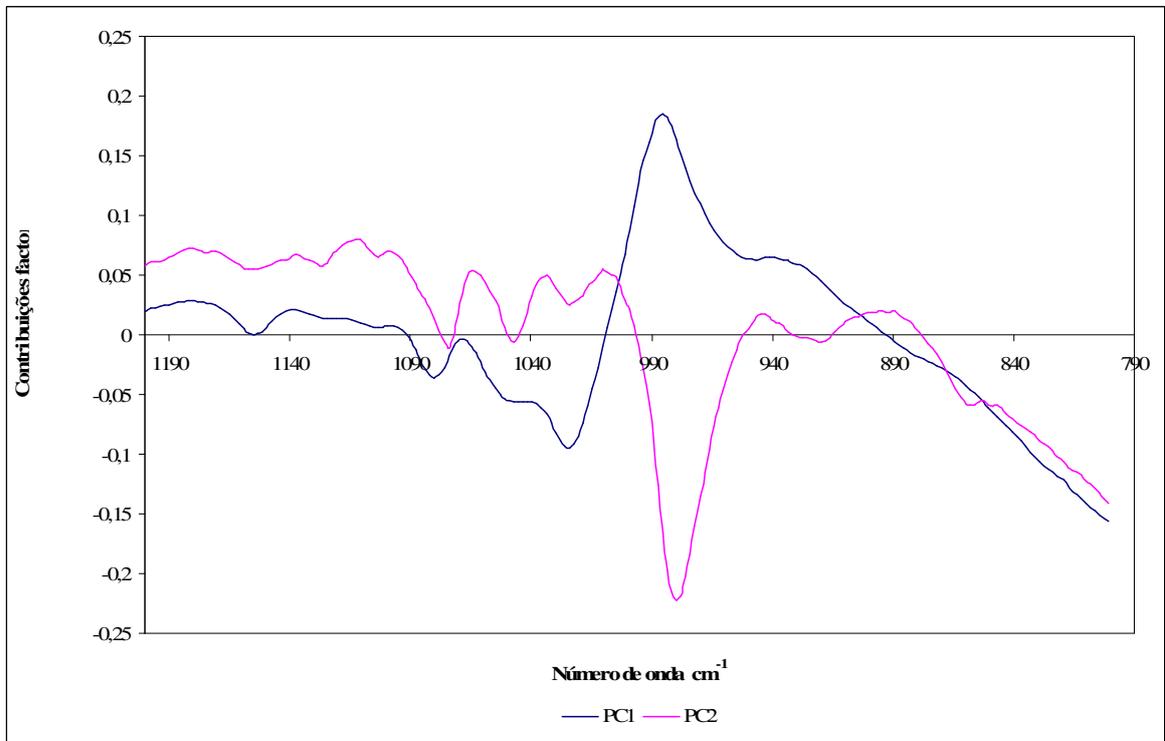


Figura 2.30 – Contribuições factoriais para o PC1 e PC2 da região de FTIR 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ .

Observando a figura 2.29, verifica-se que as amostras extra – duras (a vermelho) separam-se das amostras extra – suaves (a rosa), devido ao PC1. As primeiras, farinhas hidratadas extra duras, situam-se pelo PC1 negativo enquanto que as farinhas hidratadas extra suaves estão pelo PC1 positivo. Pelas contribuições factoriais respectivas (figura 2.30) as bandas a  $1078$  e  $1024\text{ cm}^{-1}$ , ambas referentes a vibrações causadas pelas ligações de amido (zona negativa) e  $983$  e  $933\text{ cm}^{-1}$ , possivelmente referentes a alguma contribuição das proteínas e vibração da ligação  $\alpha - (1\rightarrow4)$  do amido, respectivamente (zona positiva), são as responsáveis pela referida separação.

Comparando com as amostras no estado seco (figura 2.19), continua a ser evidente a separação entre tipo de dureza: extra-dura e extra-suave, embora essa separação nas amostras no estado hidratado seja mais evidente que no estado seco. Ou seja ao nível dos carboidratos, a hidratação provoca alterações mais fortes, que se evidenciam mais manifestamente na PCA.

Resumindo, na zona das proteínas ( $1800-1200\text{ cm}^{-1}$ ), no estado seco havia uma tendência para a separação das amostras relativamente ao tipo de dureza, que com a hidratação se perde, observando-se que as amostras se tornam estruturalmente mais semelhantes. Já na região dos carboidratos ( $1200-800\text{ cm}^{-1}$ ), a ligeira separação entre amostras extra-duras das amostras extra-suaves, que se verificava no estado seco, torna-se mais evidente com a hidratação. Isto porque os grânulos de amido de uma farinha dura absorvem mais água que os grânulos de amido de uma farinha suave. E as alterações estruturais do grânulo de amido são também bastante diferentes entre farinhas de durezas diferentes.

Dependendo da zona do espectro a analisar: zona de proteínas ou zona de carboidratos, tanto o estado seco como o estado hidratado, respectivamente, servem para separar amostras relativamente ao seu tipo de dureza.

## 2.6 Estudo espectroscópico de farinhas com doença

O grupo III (ver tabela 2.2) é constituído por amostras de farinha cuja planta foi afectada pela doença de *Karnal bunt* e por amostras saudáveis. Embora esta doença ainda não tenha sido encontrada nos países da Europa, facilmente poderá surgir através de trigo importado (em especial dos Estados Unidos da América), e por isso torna-se importante encontrar uma forma rápida e eficiente de separação de farinhas doentes e respectivas farinhas saudáveis. Pretende-se então verificar se as alterações provocadas por este fungo são visíveis por análise directa de espectros de FTIR, e posteriormente através de análise em componentes principais, concluir se se pode distinguir, rapidamente, uma farinha doente de uma saudável, e quais factores que regulam essa separação, ou seja, a que nível a doença provoca modificações, se nas proteínas, e/ou amido.

A figura seguinte apresenta o espectro de FTIR da farinha Sever saudável e Sever doente na região entre 1800 – 800  $\text{cm}^{-1}$ .

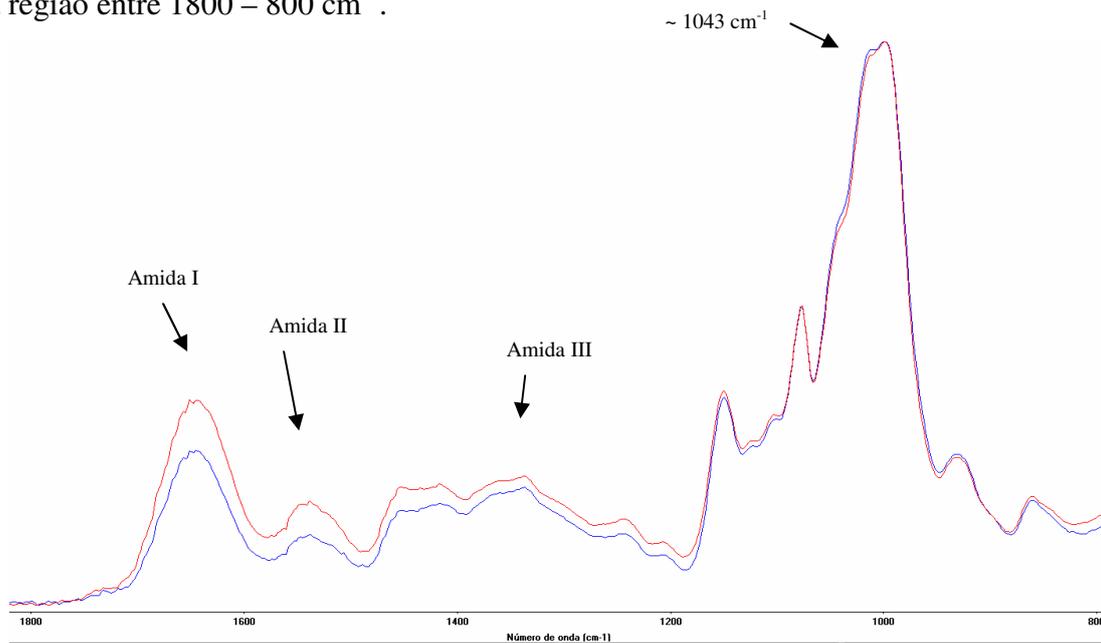


Figura 2.31 – Espectro de FTIR da farinha Sever saudável (linha azul) e da farinha Sever doente (linha vermelha) no estado seco, 1800 – 800  $\text{cm}^{-1}$ .

As diferenças entre os espectros das duas farinhas são muito ténues e pouco significativas. Observa-se que o pico a cerca de 1043  $\text{cm}^{-1}$  (possivelmente vibração do alongamento da ligação C-OH amido) é mais proeminente na farinha saudável do que na farinha doente. Na figura 2.31, apresenta-se uma expansão entre 1750 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ , dos mesmos espectros da

figura anterior, para tentar-se encontrar alguma diferença na zona da amida I, através de análise directa do espectro.

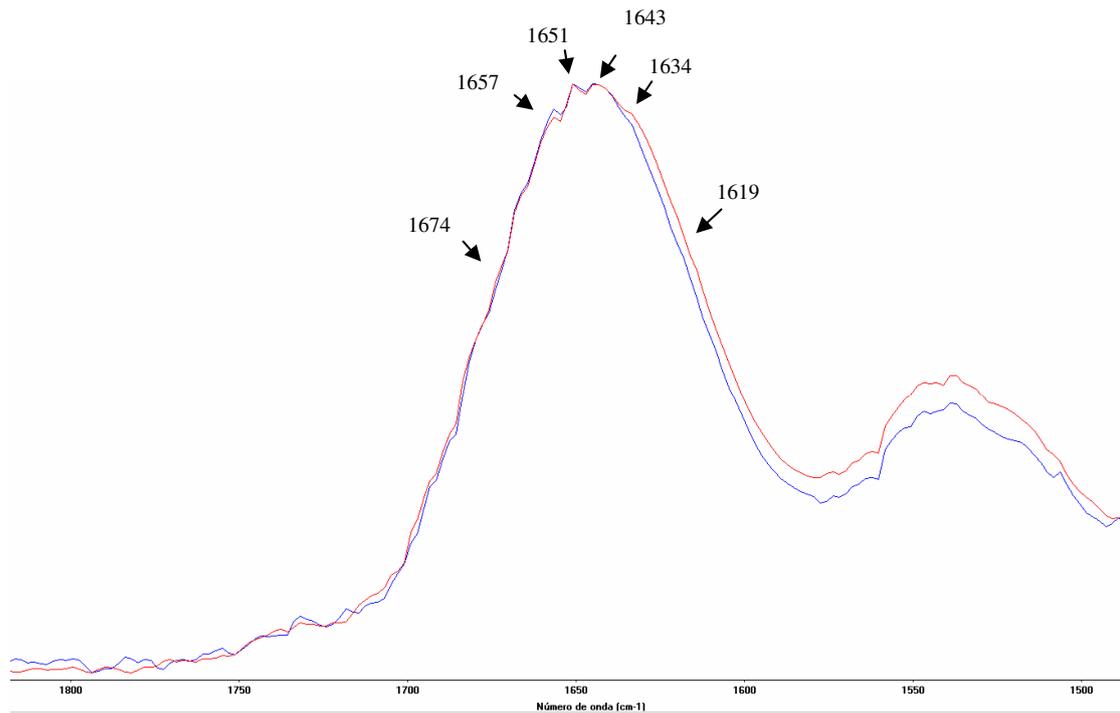


Figura 2.31 – Espectro de FTIR da farinha Sever saudável (linha azul) e da farinha Sever doente (linha vermelha) no estado seco, 1750 – 1550  $\text{cm}^{-1}$ .

Uma vez mais, as diferenças encontradas entre a farinha saudável e a doente são ligeiras. Apenas há a referir que a farinha doente poderá ter menor proporção de estruturas hélice  $\alpha$  em relação a folha  $\beta$ , enquanto que na farinha saudável parece ocorrer o contrário.

Segue-se uma análise quimiométrica dos espectros de forma a tentar encontrar diferenças significativas entre as amostras. Foram analisadas três zonas dos espectros registados para as farinhas do grupo III: a zona característica das proteínas (1800-1200  $\text{cm}^{-1}$ ), a zona típica dos carboidratos (1200-800  $\text{cm}^{-1}$ ) e finalmente toda a zona que inclui as duas atrás mencionadas (1800-800  $\text{cm}^{-1}$ ).

Iniciando a discussão pelos resultados de PCA na zona mais abrangente, 1800-800  $\text{cm}^{-1}$ , na figura 2.32, apresenta-se o gráfico de coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, que contam com 93.0% da variabilidade total. Na figura 3.41 aparece o respectivo perfil das contribuições factoriais.

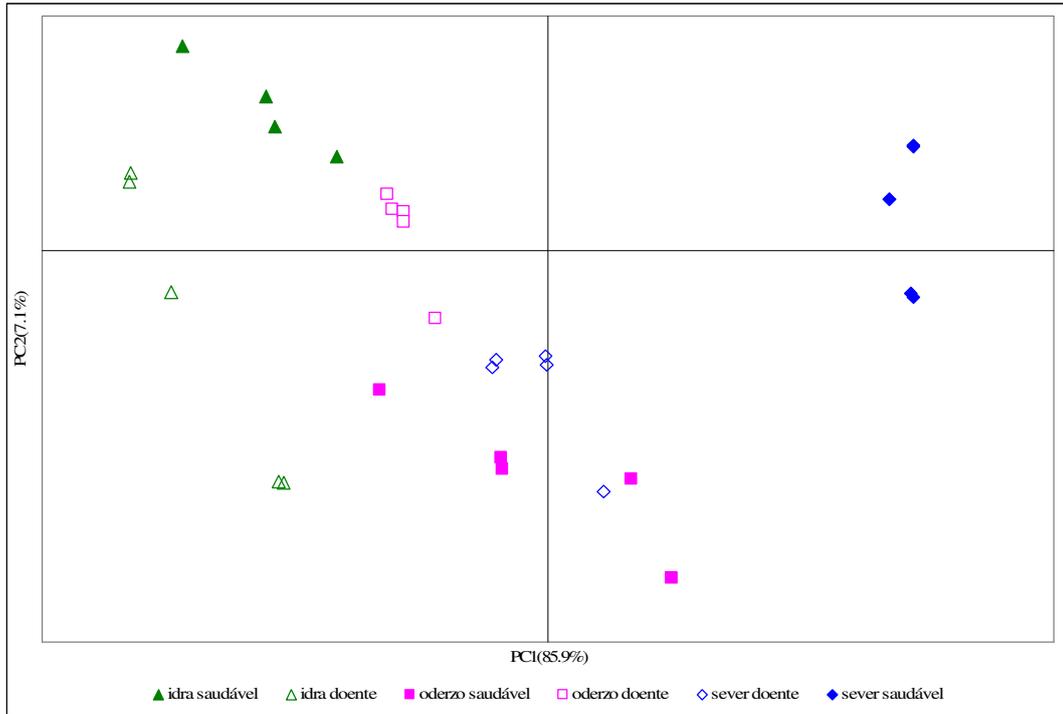


Figura 2.32 – Coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR 1800-800  $\text{cm}^{-1}$ .

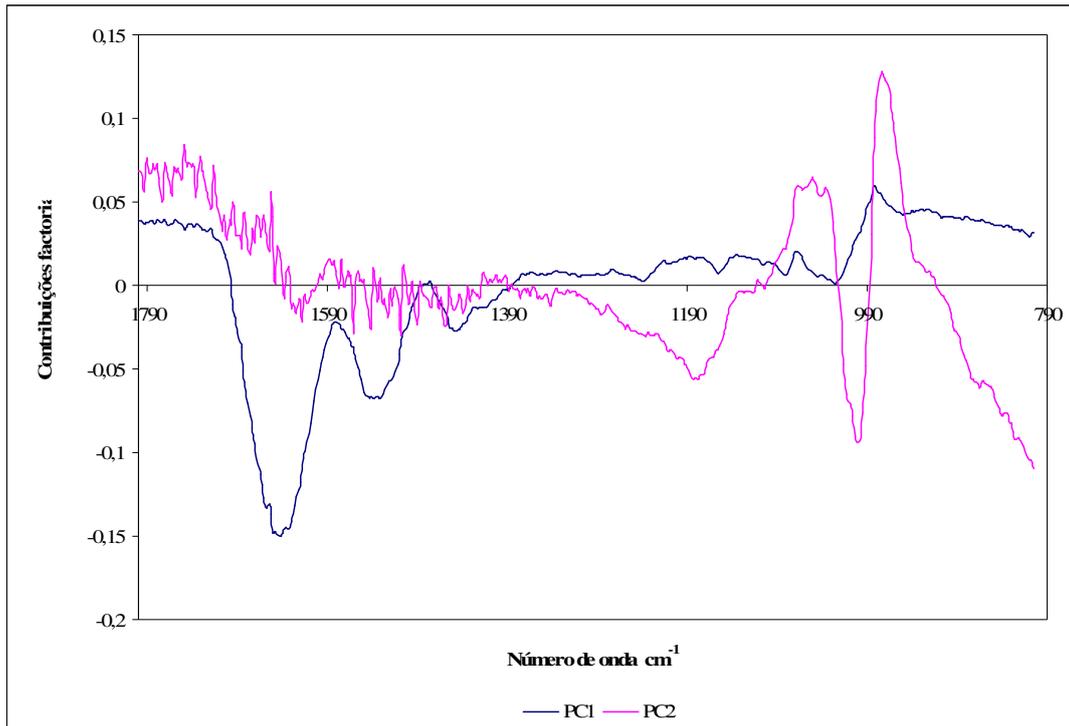


Figura 2.33 – Contribuições factoriais para o PC1 e PC2 da região de FTIR 1800-800  $\text{cm}^{-1}$ .

Analisando a figura 2.32, observa-se que, dentro da mesma variedade, as amostras doentes se distinguem das saudáveis. No caso da variedade Idra (verde), as duas amostras distinguem-se pelo PC2: a farinha saudável em PC2 positivo e a farinha doente maioritariamente em PC2 negativo. Pelas contribuições factoriais (figura 2.33), verifica-se que os principais picos/bandas responsáveis pela posição da Idra saudável se localizam entre 1697-1631  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a grande parte da amida I que inclui as bandas responsáveis pelas estruturas hélice  $\alpha$  e “ $\beta$  turn” (que por análise directa dos espectros se verificaram umas ténues diferenças). Já a doente tem contribuições factoriais, com maior relevância, referentes também a parte da amida I mas entre 1631 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  (onde se localizam os picos relativos à folha  $\beta$ ).

Para a variedade Oderzo (rosa), a amostra saudável está em PC2 negativo e PC1 considerado zero e a amostra doente em PC2 positivo e PC1 negativo. Deste modo, a amostra saudável é influenciada pela parte espectral da amida I entre 1631 e 1600  $\text{cm}^{-1}$ , e os picos referentes aos carboidratos a sensivelmente 1190 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que a amostra doente é influenciada pela amida I na zona entre 1697-1631  $\text{cm}^{-1}$ .

Finalmente, para a variedade Sever (azul), a amostra saudável está em PC1 positivo e PC2 zero, e a amostra doente encontra-se em PC1 zero e PC2 negativo. Ou seja, as amostras

saudáveis sofrem influência das vibrações das ligações dos carboidratos e as amostras doentes além da influência pelos carboidratos ( $1174$  e a  $1000\text{ cm}^{-1}$ ), são influenciadas pela amida I.

Em suma, no intervalo de  $1800$  e  $800\text{ cm}^{-1}$ , as amostras doentes vs. saudáveis das variedades Oderzo e Sever, separam-se principalmente devido a alterações ao nível da amida I ( $\alpha$  hélice, “ $\beta$  turn” e folha  $\beta$ ) e dos carboidratos que as constituem. Quanto à farinha Idra, as amostras saudáveis e doentes, distinguem-se, unicamente pelas proteínas. Note-se que é necessário ter em consideração que se tratam de sugestões, pois o gráfico de PC2 esta afectado de muito ruído.

Passando agora à análise da região entre  $1800$ - $1200\text{ cm}^{-1}$  (proteínas) apresenta-se na figura 2.34, o gráfico de coordenadas factoriais (PC1 vs. PC2, que contam com 95.8% da variabilidade total).

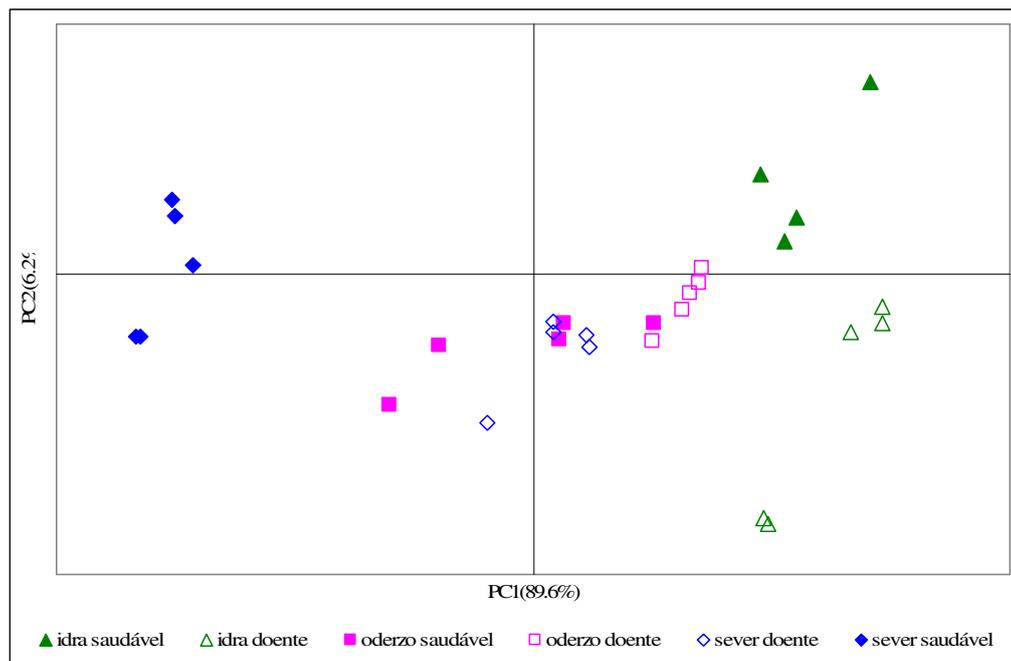


Figura 2.34 – Coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR  $1800$ - $1200\text{ cm}^{-1}$ .

Nas coordenadas factoriais a separação saudável vs doente apenas foi possível para as amostras Idra e Sever. Seria de esperar para a amostra Idra, pois na análise anterior verificou-se que a presença/ausência de doença era influenciada apenas pela zona proteica. No entanto, se a variedade Sever doente e saudável se separam, na região das proteínas, indica que o teor proteico tem um papel importante na separação dentro desta variedade. E

na variedade Oderzo observa-se que a contribuição das proteínas têm um papel secundário na separação dos dois tipos de amostras.

Continuando a análise em componentes principais, mas agora na zona típica dos carboidratos, 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ , apresenta-se na figura 2.35 o gráfico das coordenadas factoriais, PC1 e PC2, com 90.7% da variabilidade total.

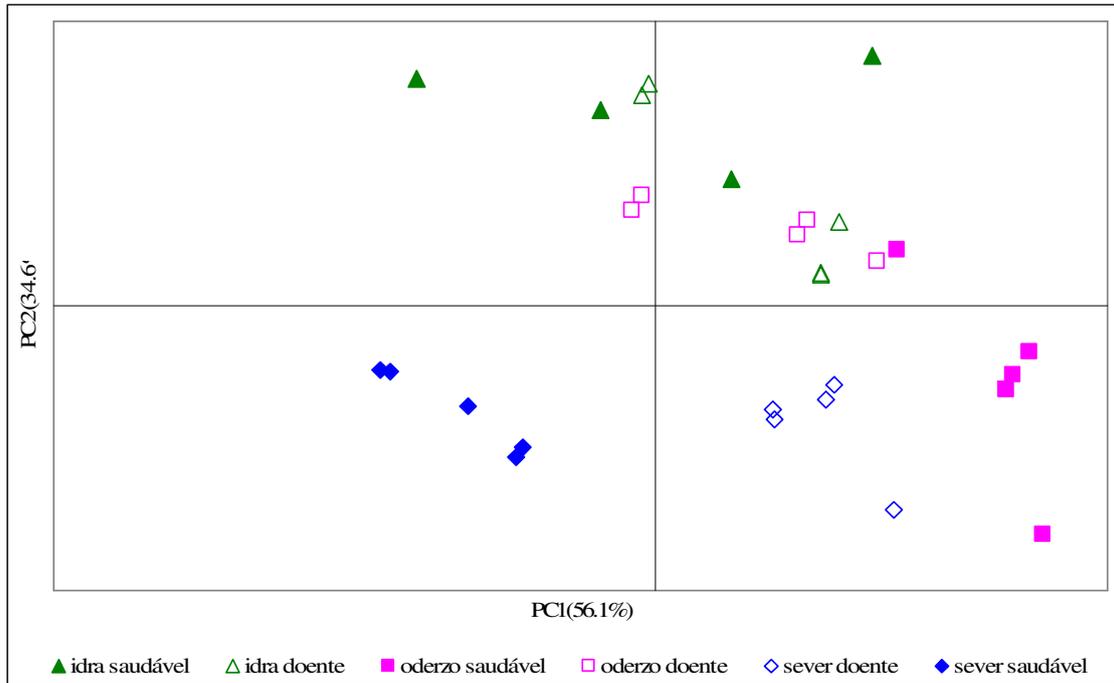


Figura 2.35 – Coordenadas factoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ .

Na figura 2.36 está representado o respectivo perfil das contribuições factoriais.

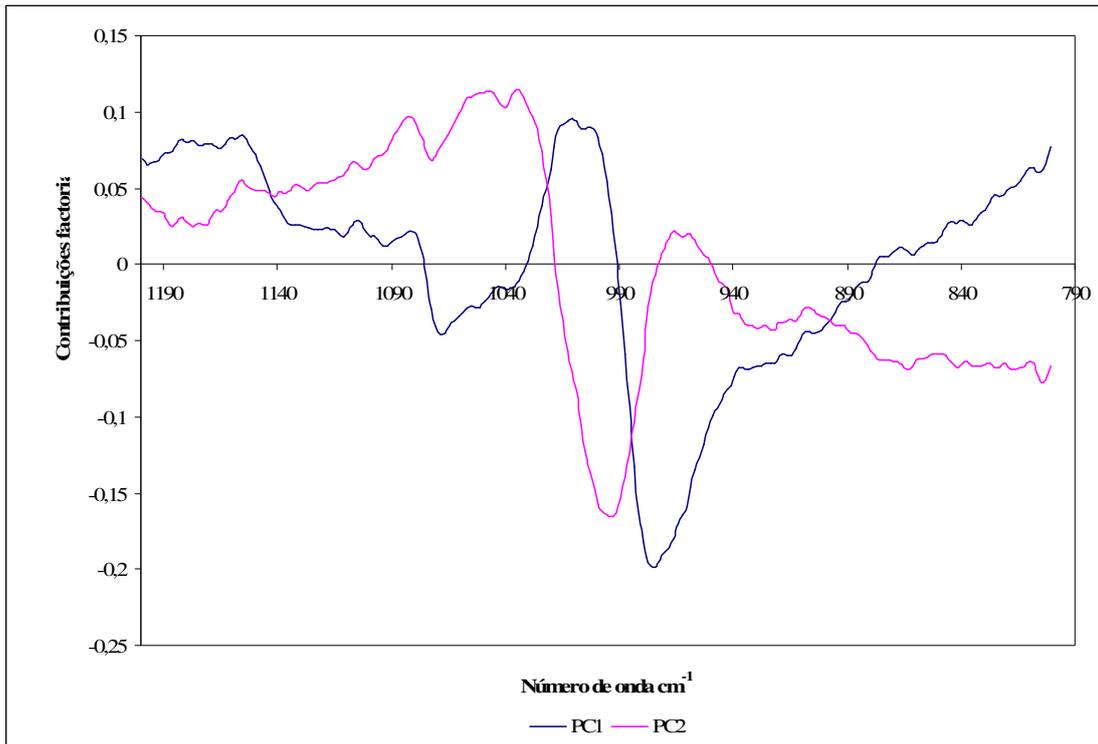


Figura 2.36 – Gráfico das contribuições factoriais, para o PC1 e PC2 da região de FTIR 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ .

Dentro da mesma variedade, entre amostras doentes e saudáveis, observa-se separação das amostras, excepto para a variedade Idra. Como a separação das amostras da variedade Idra acontece devido às proteínas, seria de esperar o observado, quando a análise é realizada apenas à zona típica dos carboidratos. Conclui-se que a amostra Sever quando doente sofre alterações importantes ao nível tanto das proteínas como dos carboidratos. Todavia, o mesmo não acontece para a variedade Oderzo, que estará mais influenciado pelas alterações ao nível de carboidratos do que de proteínas.

Em conclusão, este estudo sugere que será possível separar, dentro da mesma variedade, uma amostra doente pelo fungo *Tilletia indica* de uma amostra saudável. Este trabalho também permitiu concluir que possivelmente este fungo utiliza tanto proteínas como carboidratos para a sua sobrevivência, dependendo da variedade de farinha em questão. Nas amostras estudadas neste trabalho, observou-se que o fungo provocou maiores alterações a nível do amido, para a amostra Oderzo; na amostra Idra, as alterações foram ao nível das proteínas e por fim, a amostra Sever sofreu tanto a nível proteico como de hidratos de carbono. Demonstrando-se desta forma que as alterações ao nível dos componentes da farinha depende em grande parte da variedade.

### **3 ESTUDO DA ESTRUTURA E DINÂMICA MOLECULAR DE GLUCOSE, AMIDO E FARINHA: EFEITO DA COMPLEXIDADE DO SISTEMA**

#### ***3.1 Objectivos específicos***

Nesta parte da dissertação, e após realizada a caracterização estrutural e conformacional das proteínas de farinhas e respectivos glútenos, pretende-se avaliar o comportamento (organização e dinâmica moleculares) da glucose, amido e farinha, partindo do sistema mais simples para o mais complexo, com o objectivo de comparar as respectivas propriedades ao nível molecular, e avaliar os efeitos da presença de cadeia polimérica (amido) e presença de vários componentes (farinha) na estrutura e dinâmica moleculares do monómero de glucose. Este conhecimento ao nível molecular poderá vir a ser útil para a compreensão dos comportamentos funcionais dos diferentes sistemas, como por exemplo, a nível da panificação, complementando o estudo da primeira parte. No caso da glucose, pretende-se analisar as suas diferentes formas: glucose- $\alpha$ , glucose- $\beta$ , glucose monohidratada, glucose liofilizada e glucose vítrea, esta última com grande importância dado que se encontra presente na grande parte dos produtos alimentares.

Todos os sistemas, desde o mais simples (monómero) ao mais complexo (farinha) irão ser submetidos a hidratação e a um ciclo de variação de temperatura, para assim se observar o tipo de resposta dada por estes sistemas ao nível da dinâmica e organização molecular. A gama de hidratações utilizada situa-se entre 1 e 10% de humidade (g água/g amostra) para os sistemas mais simples e entre 1 e 20% de humidade para os sistemas mais complexos. A razão da escolha desta gama é o tratar-se de uma gama pouco estudada e que se equipara às condições de armazenamento da farinha nas empresas e grandes superfícies comerciais. Uma outra razão, de ordem mais prática, refere-se à dificuldade em analisar amostras, como o amido e a farinha, com hidratações inferiores a 30% de humidade por métodos comuns, como por exemplo, métodos reológicos, podendo assim ser vantajoso o uso de uma técnica alternativa, por exemplo, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do estado sólido, que possibilite a análise de farinhas com baixo teor de água. Esta técnica foi escolhida, pois fornece informação acerca da estrutura e dinâmica molecular da

amostra podendo-se, numa fase posterior a este trabalho, tentar correlacionar as propriedades moleculares com propriedades macroscópicas do sistema.

## **3.2 Materiais e métodos**

### **3.2.1 Reagentes e amostras**

Neste estudo foram utilizados dois grupos de amostras que se descrevem de seguida, e que se destinam, respectivamente a estudos dos sistemas simples e estudos dos sistemas complexos.

**Grupo A** – glucose- $\alpha$ , glucose- $\beta$ , glucose monohidratada, glucose liofilizada e glucose vítrea. As glucoses  $\alpha$  e  $\beta$  provêm da Sigma e a glucose monohidratada da Riedel de Haen e foram utilizadas tal como recebidas.

O vidro de glucose foi obtido através do seguinte procedimento: aqueceu-se cerca de 1,5g de glucose anidra durante 20 minutos a 170°C (temperatura acima do seu ponto de fusão, 158°C (Fennema 1996)) dentro do rotor de RMN. No final do referido período de tempo, o rotor foi colocado imediatamente sob água fria corrente para arrefecer de uma forma rápida. A glucose obtida apresentava-se dura, e com aspecto tipo rebuçado ou vidro. A glucose liofilizada foi obtida saturando uma solução de glucose, seguindo-se a congelação da amostra e posteriormente foi submetida a um período de cerca de 3-4 dias no liofilizador.

Para a hidratação das amostras (com excepção da forma vítrea, que não foi submetida a hidratação), entre 1 e 10% de água (g água/ g amostra) foi realizado o seguinte procedimento: para cada percentagem de humidade foi destinada uma caixa de pesagem de vidro, todas de igual forma e tamanho. Introduziu-se em cada caixa cerca de 2g de amostra, semelhante para todas as hidratações. Sem tampa, cada caixa foi colocada dentro de uma outra caixa de pesagem de maiores dimensões com água até  $\frac{1}{4}$  da sua altura e todas as caixas exteriores foram então seladas com tampa e filme. Durante 24 horas, ao final de períodos de cerca de 4 horas, as caixas interiores foram retiradas e tapadas com tampa

própria e seladas com filme. No final da experiência, todas as caixas de pesagem foram pesadas e calculados os teores de humidade através de:

$$\% = \frac{W_b - W_a}{W_a} \times 100,$$

em que  $W_a$  é o peso inicial da amostra e  $W_b$  o peso final da amostra, sendo a percentagem expressa em massa de água/massa de amostra seca.

**Grupo B** – amido e farinha Amazonas (tipo suave em termos de grau de dureza), obtidas na Estação Nacional de Melhoramento de Plantas (ENMP) de Elvas.

Para a hidratação das amostras foram utilizados dois métodos, consoante a gama de humidade pretendida. Para teores de humidade entre 1 e 10% utilizou-se o método supracitado para o grupo de amostras A. Para teores de humidade superiores a 10% realizou-se o seguinte procedimento: através da equação anterior, para uma determinada percentagem de água, foi calculada a massa de água e massa de amostra necessárias. Num porta amostras foi colocada a massa de amostra seca, e de seguida adicionada directamente a massa de água. Deixou-se em repouso durante pelo menos 24h a 4°C, permitindo a migração da água pela amostra e conseqüente homogeneização.

Todas as amostras (ambos os grupos) no estado seco foram conservadas nos frascos de origem à temperatura ambiente (20 - 25°C) e protegidas de humidade. Para todas as amostras hidratadas, foram verificados os seus teores em humidade (por pesagem) antes e depois das experiências de RMN, de forma a verificar se mantinham o valor de humidade.

### **3.2.2 Métodos**

Os espectros de polarização cruzada com rotação segundo o ângulo mágico – CP/MAS – de  $^{13}\text{C}$  (definição no capítulo 1.3.2.1) foram obtidos usando um espectrómetro Bruker, operando a uma frequência de campo  $B_0$  de 100.6 MHz para o carbono e de 400.13 MHz para o protão, utilizando uma sonda Bruker de polarização cruzada de 7 mm com rotação segundo o ângulo mágico. Para cada amostra, o rotor foi pesado antes e depois de cada ensaio, de forma a verificar se existiu perda de água durante a rotação da amostra. A

variação da massa foi em todos os casos, considerada desprezável (<0,0005g) concluindo-se que não ocorreram perdas de água significativas.

Os ensaios com temperatura variável foram realizados na gama de temperaturas de 20 a 80 °C, em passos de 20°C. A temperatura máxima utilizada foi de 80°C por razões de ordem prática relacionadas com o material da tampa do rotor, havendo além disso, o risco de abertura do rotor durante a experiência. A temperatura foi controlada utilizando uma unidade de aquecimento do próprio espectrómetro e foi admitida uma variação de temperatura de ± 0,2 °C. O aquecimento das amostras foi realizado directamente dentro da sonda e foi usado um tempo de equilíbrio de 10 a 15 minutos a cada temperatura e antes de cada ensaio. Os espectros de CP/MAS de <sup>13</sup>C foram registados utilizando impulsos de 90° de 4µs e com um tempo de intervalo entre scans de 5-10s, a uma velocidade de rotação de 5 kHz. Os valores de T<sub>CH</sub> e T<sub>1ρH</sub> foram calculados a partir de curvas de tempo de contacto variável obtidas para valores de tempo de contacto, τ, numa gama de 50 µs – 15 ms (8-12 pontos experimentais). Os parâmetros foram avaliados através da seguinte equação,

$$M(\tau) = M_0 \times \left( e^{\left(\frac{-\tau}{T_{1\rho H}}\right)} - e^{\left(\frac{-\tau}{T_{CH}}\right)} \right)$$

adaptada ao gráfico experimental de intensidade em função

do tempo de contacto M(τ). M<sub>0</sub> é a magnetização ou intensidade máxima do sinal, T<sub>CH</sub> é o tempo necessário para ocorrer a polarização cruzada e T<sub>1ρH</sub> é o tempo de relaxação longitudinal do próton em referencial rotativo.

O tempo de relaxação T<sub>1C</sub> foi obtido utilizando a sequência desenvolvida por Torchia (a magnetização é transferida ao <sup>13</sup>C a partir do <sup>1</sup>H) (Dria 2002) com tempos entre pulsos de 0,01 a 200 s, 10 a 12 valores experimentais e a uma velocidade de rotação de 5 kHz. O tempo de relaxação T<sub>1H</sub> foi obtido usando a sequência de inversão – recuperação (180°<sub>x</sub> – τ – 90°<sub>x</sub>), seguida de polarização cruzada para medição do sinal de <sup>13</sup>C. Utilizaram-se 10 a 12 valores de tempo entre pulsos, τ, numa gama de 0,01 – 200 s, e a uma velocidade de rotação de 5 kHz. Os valores de T<sub>1H</sub> e T<sub>1C</sub> foram calculados por ajuste exponencial das intensidades M(τ) dos picos do espectro registadas versus o tempo (τ), de acordo com a

equação,  $M(\tau) = M_0 \times (1 - 2e^{\frac{-\tau}{T_1}})$  na qual M(τ) é a intensidade do sinal no tempo τ e M<sub>0</sub> a intensidade máxima, e T<sub>1</sub> é o tempo de relaxação longitudinal.

Os tempos de relaxação T<sub>2H</sub> foram obtidos usando a sequência de pulsos Carr – Purcell – Meiboom – Gill (90°<sub>x</sub> – τ – 180°<sub>y</sub>) seguida de polarização cruzada para medição do sinal de

<sup>13</sup>C. Utilizaram-se 10 a 12 valores de tempos entre pulsos, numa gama de 1 – 16 μs, e a uma velocidade de rotação de 5 kHz. Os valores de intensidade  $M(\tau)$  de cada pico foram representados graficamente em função do tempo entre pulsos,  $\tau$ . O comportamento de relaxação foi descrito de acordo com a seguinte equação,  $M(\tau) = M_0 \times e^{-\frac{\tau}{T_2}}$  em que  $M(\tau)$  é a intensidade do sinal no tempo  $\tau$ ,  $M_0$  o valor máximo de intensidade de cada pico e  $T_2$  o tempo de relaxação transversal .

### **3.3 Caracterização de várias formas de glucose por RMN do estado sólido**

#### **3.3.1 Espectros de CP/MAS de <sup>13</sup>C**

As cinco formas do monossacarídeo glucose mais comuns são glucose- $\alpha$  anidra, glucose- $\beta$  anidra, glucose monohidratada, glucose liofilizada e glucose vítrea, e estas foram analisadas por CP/MAS de <sup>13</sup>C, inicialmente à temperatura ambiente e no estado seco. Na figura 3.1, estão representados os espectros de CP/MAS de <sup>13</sup>C das 5 formas de glucose supracitadas.

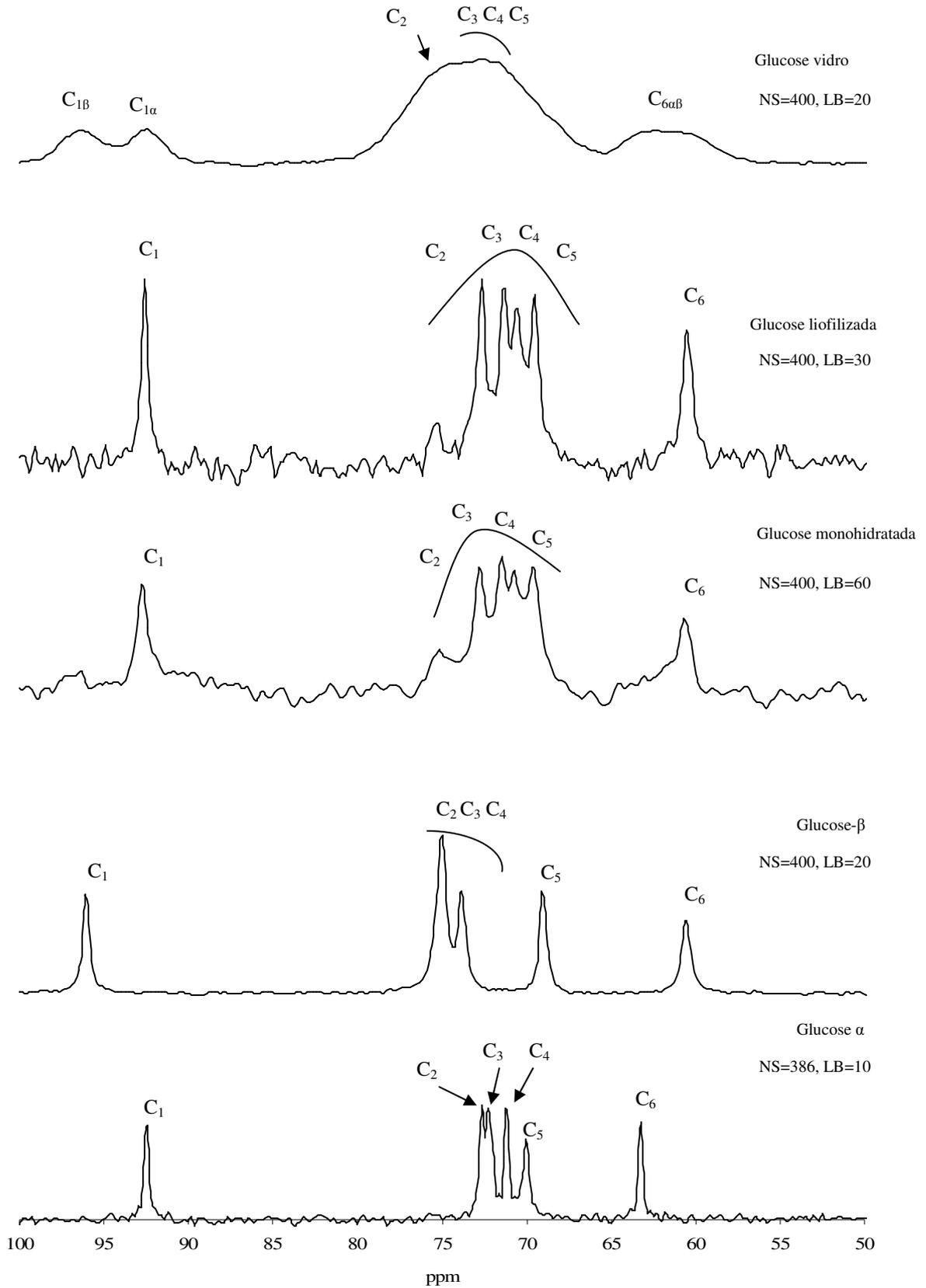


Figura 3.1 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da Glucose  $\alpha$ ,  $\beta$ , monohidratada, liofilizada e vítrea anidras, à temperatura ambiente. NS – número de aquisições; LB – line broadening factor. As indicações  $\text{C}_i$  correspondem à numeração dos carbonos representada na figura 3.2.

Todos os espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  foram processados com um factor de LB (“line-broadening”), que dependendo da razão de sinal/ruído do espectro, variou entre 10 e 60 Hz. Este tratamento dos espectros torna-se útil pois aumenta a razão sinal/ruído.

A atribuição de picos nos espectros de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$  foi levada a cabo através de comparação das posições dos picos observados, com os desvios químicos das glucoses  $\alpha$  e  $\beta$  em solução, obtidos a partir da base de dados “Spectral Data Base System”. Assume-se inicialmente que não ocorrem desvios significativos entre os desvios químicos que caracterizam a glucose em solução e os que a caracterizam no estado sólido, para as formas  $\alpha$  e  $\beta$ . A atribuição completa dos picos dos espectros de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$  para as diferentes amostras está apresentada na tabela 3.1, tendo em conta a numeração usualmente usada para os diferentes átomos de carbono (figura 3.2).

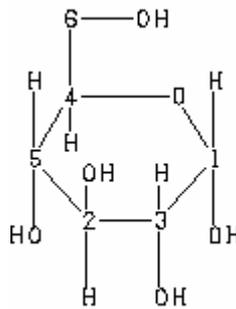


Figura 3.2 – Estrutura molecular da glucose- $\alpha$ , mostrando a numeração dos átomos de carbono.

Tabela 3.1 – Atribuição de picos observados nos espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose- $\alpha$ ,  $\beta$  glucose, glucose monohidratada, glucose liofilizada e glucose vítrea no estado sólido e na glucose em solução (SBDS).

	$\delta$ de $^{13}\text{C}$ / ppm	
	Solução (Ref. SBDS)	Sólido (Observado)
<b>Glucose-<math>\alpha</math></b>	93.18 – C1	92.39 – C1
	73.87 – C2	72.63 – C2
	72.57 – C3, C4	72.23 – C3
		71.26 – C4
	70.75 – C5	70.08 – C5
	61.76 – C6	63.23 – C6
<b>Glucose-<math>\beta</math></b>	97.00 – C1	96.11 – C1
	77.01 – C2	74.97 – C2, C3
	76.88 – C3	
	75.25 – C4	73.80 – C4
	70.75 – C5	69.10 – C5
	61.90 – C6	60.49 – C6
<b>Glucose monohidratada</b>	-----	92.63 – C1
		75.01 – Não atribuído
		72.67 – C2
		71.30 – C3
		70.52 – C4
		69.54 – C5
	60.54 – C6	
<b>Glucose liofilizada</b>	-----	92.56 – C1
		75.14 – Não atribuído
		72.60 – C2
		71.43 – C3
		70.45 – C4
		69.47 – C5
	60.47 – C6	
<b>Glucose vítrea</b>	-----	96.28 – C1 ( $\beta$ )
		92.56 – C1 ( $\alpha$ )
		74.56 – C2
		72.21 – C3, C4, C5
	61.84 – C6	

No espectro da amostra glucose- $\alpha$  (figura 3.1) observam-se os 6 picos relativos aos carbonos da molécula de glucose. Foi possível separar os picos dos carbonos 3 e 4, enquanto que em solução, pelos dados de referência, estes dois picos surgem incluídos

numa única banda. Os restantes desvios químicos dos carbonos não diferem muito entre solução e sólido. Observa-se, apenas, cerca de 1 ppm menos para C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> e 1 ppm mais para C<sub>6</sub> no espectro do sólido.

No espectro referente à glucose- $\beta$  (fig. 3.1), os sinais dos carbonos 2 e 3 estão muito próximos um do outro, reflectindo-se num só pico a 74.97 ppm. No espectro em solução estes dois carbonos originam dois picos próximos mas distintos. Todos os desvios químicos dos carbonos da molécula, no sólido, têm valores ligeiramente mais baixos em relação à glucose em solução.

O espectro da glucose monohidratada tem características interessantes, de alguma forma intermédias às formas anoméricas  $\alpha$  e  $\beta$ . Por um lado, o ambiente de C<sub>1</sub> assemelha-se ao da forma  $\alpha$ , assim como os sinais predominantes da zona central do espectro, embora se note um desvio do pico C<sub>3</sub> na forma  $\alpha$ , de 72.2 ppm para 71.3 ppm. Por outro lado, o ambiente predominante dos carbonos C<sub>6</sub> assemelha-se, não ao da forma  $\alpha$ , mas ao da forma  $\beta$ . Este facto, deverá indicar uma interacção específica do grupo CH<sub>2</sub>OH com a água e que parece aproximar o ambiente C<sub>6</sub> ao característico da forma  $\beta$ , na forma hidratada. Finalmente, notando os sinais fracos e largos a cerca de 96, 75 e 63 ppm, é possível sugerir que exista uma quantidade vestigial da forma  $\beta$  e da forma  $\alpha$ , em estado amorfo, na amostra de glucose monohidratada.

Em relação ao espectro da glucose liofilizada, na mesma figura, o perfil é muito semelhante ao da glucose monohidratada.

A análise do espectro da glucose vítrea evidencia que ambos os anómeros  $\alpha$  e  $\beta$  coexistem naquele sistema numa proporção relativa de cerca de 50:50. Este facto justifica-se pela existência do pico centrado a 96.3 ppm, referente ao C<sub>1</sub> da glucose- $\beta$  e de outro pico a 92.6 ppm, referente ao mesmo carbono mas da conformação  $\alpha$ . Entre 78 e 68 ppm, observa-se uma banda larga que pelo seu perfil poderá envolver os picos referentes aos carbonos 2, 3, 4 e 5 em desvios químicos típicos das glucoses  $\alpha$  e  $\beta$ . Entre 60 e 65 ppm, aparece uma banda larga onde podem coexistir os picos referentes ao carbono 6 de ambas as formas de glucose. Os picos são todos bastante mais largos que os observados para as restantes formas, indicando a forma vítrea como a mais amorfa de entre todos os sistemas considerados. As formas mais cristalinas são as de glucose  $\alpha$ ,  $\beta$  como indica a boa resolução dos respectivos espectros.

### **3.3.2 Tempos de relaxação de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$**

O cálculo dos tempos de relaxação dos átomos  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  é uma ferramenta útil para um melhor conhecimento da dinâmica molecular do sistema. Através dos tempos de relaxação podem-se discernir diferentes tipos de movimentos moleculares. Assim, realizaram-se neste trabalho, ensaios de RMN de sólidos de forma a determinar os tempos de relaxação  $T_{1\rho\text{H}}$ ,  $T_{1\text{H}}$ ,  $T_{1\text{C}}$  e  $T_{2\text{H}}$  para diferentes tipos de glucose ( $\alpha$ ,  $\beta$ , monohidratada, liofilizada e vítrea) no estado seco à temperatura ambiente.

De seguida, relembra-se o leitor acerca da complementaridade e significado dos diferentes tempos de relaxação, através de uma breve explicação. O tempo de relaxação  $T_1$  depende dos movimentos moleculares de frequência da ordem da frequência de ressonância  $\omega_0$ , da ordem das centenas de MHz, o que se traduz por movimentos rápidos. O  $T_1$  do próton ( $T_{1\text{H}}$ ) nos sólidos não depende apenas dos movimentos rápidos, mas também da difusão de spin. Os prótons estão tão próximos uns dos outros que passa a existir um  $T_1$  médio, resultante de partilha de magnetização entre prótons. Por sua vez o  $T_1$  do carbono ( $T_{1\text{C}}$ ) apenas depende dos movimentos moleculares pois há poucos  $^{13}\text{C}$  vizinhos numa molécula. E o  $T_{1\rho\text{H}}$  nos sólidos depende dos movimentos lentos e também da difusão de spin. O tempo de relaxação  $T_2$  do próton ( $T_{2\text{H}}$ ) depende do  $\omega_0$  (movimentos rápidos) mas também depende de movimentos mais lentos. Daí que este tempo de relaxação forneça informação acerca da mobilidade geral da amostra. O  $T_{\text{CH}}$  é o tempo necessário para se efectuar a transferência de magnetização dos prótons para os carbonos. E daí que quanto mais elevado for este valor maior é o tempo necessário para se realizar a transferência de magnetização.

Os resultados estão apresentados na tabela 3.2. Para o tempo de relaxação  $T_{1\text{C}}$  não foi possível determinar alguns valores por serem demasiado longos (na ordem das centenas de segundos).

Tabela 3.2 – Tempos de relaxação  $T_{CH}$ ,  $T_{1\rho H}$ ,  $T_{1C}$ ,  $T_{1H}$  e  $T_{2H}$  da glucose- $\alpha$ ,  $\beta$  glucose, glucose monohidratada, liofilizada e vítrea. n.d. – não determinado; n.a. – não aplicável.

Carbono	$\delta$ (ppm)	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1\rho H}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
<b><math>\alpha</math> Glucose</b>						
C1	92.79	0,0903 $\pm$ 0,0111	68,2 $\pm$ 10,7	n.d.	129 $\pm$ 2,02	9,75 $\pm$ 0,278
C2	72.63	0,101 $\pm$ 0,0112	65,7 $\pm$ 9,17	n.d.	123 $\pm$ 2,54	9,80 $\pm$ 0,251
C3, C4	71.65	0,0965 $\pm$ 0,0120	79,2 $\pm$ 14,1	n.d.	127 $\pm$ 3,93	9,83 $\pm$ 0,299
C5	70.48	0,0997 $\pm$ 0,0134	74,9 $\pm$ 13,9	n.d.	121 $\pm$ 4,48	9,79 $\pm$ 0,418
C6	63.63	0,0693 $\pm$ 0,00612	72,3 $\pm$ 8,02	46,1 $\pm$ 0,00552	121 $\pm$ 3,66	9,22 $\pm$ 0,350
<b><math>\beta</math> Glucose</b>						
C1	96.31	0,0898 $\pm$ 0,0101	85,9 $\pm$ 14,5	n.d.	42,2 $\pm$ 1,13	9,39 $\pm$ 0,354
C2, C3	75.37	0,0873 $\pm$ 0,00750	83,2 $\pm$ 10,4	n.d.	39,9 $\pm$ 0,856	9,30 $\pm$ 0,228
C4	74.20	0,0988 $\pm$ 0,00962	78,3 $\pm$ 10,8	n.d.	39,2 $\pm$ 1,54	9,39 $\pm$ 0,264
C5	69.30	0,0927 $\pm$ 0,00871	115 $\pm$ 20,5	n.d.	38,4 $\pm$ 0,758	9,36 $\pm$ 0,279
C6	60.89	0,0783 $\pm$ 0,00773	90,8 $\pm$ 13,7	n.d.	40,9 $\pm$ 1,26	9,59 $\pm$ 0,418
<b>Glucose Monohidratada</b>						
C1	93.03	0,0818 $\pm$ 0,0144	10,2 $\pm$ 1,96	n.d.	282 $\pm$ 42,3	7,01 $\pm$ 0,964
C2	73.07	0,0582 $\pm$ 0,0116	9,51 $\pm$ 1,79	n.d.	247 $\pm$ 28,0	6,79 $\pm$ 0,715
C3	71.70	0,0671 $\pm$ 0,0112	10,8 $\pm$ 1,87	n.d.	245 $\pm$ 38,2	7,13 $\pm$ 0,630
C4	71.12	0,0680 $\pm$ 0,00855	8,45 $\pm$ 1,07	n.d.	216 $\pm$ 29,9	5,83 $\pm$ 0,361
C5	69.94	0,0698 $\pm$ 0,00977	9,39 $\pm$ 1,33	n.d.	217 $\pm$ 21,3	9,30 $\pm$ 0,868
C6	60.94	0,0583 $\pm$ 0,00646	8,19 $\pm$ 0,842	n.d.	227 $\pm$ 27,9	6,79 $\pm$ 0,754
<b>Glucose Liofilizada</b>						
C1	92.96	0,107 $\pm$ 0,00741	3,55 $\pm$ 0,336	8,93 $\pm$ 3,77	37,7 $\pm$ 2,36	8,51 $\pm$ 0,575
n.a.	75.54	0,0207 $\pm$ 0,00726	4,07 $\pm$ 0,570	n.d.	n.d.	n.d.
C2	73.00	0,0583 $\pm$ 0,00604	3,49 $\pm$ 0,322	20,1 $\pm$ 6,94	38,6 $\pm$ 2,90	8,78 $\pm$ 0,448
C3	71.63	0,0601 $\pm$ 0,00804	3,74 $\pm$ 0,443	8,13 $\pm$ 1,94	40,9 $\pm$ 1,36	8,47 $\pm$ 0,698
C4	71.04	0,0714 $\pm$ 0,00799	3,59 $\pm$ 0,376	1,71 $\pm$ 0,576	40,9 $\pm$ 1,85	8,13 $\pm$ 0,585
C5	69.87	0,0725 $\pm$ 0,0115	4,03 $\pm$ 0,587	8,30 $\pm$ 2,48	43,7 $\pm$ 1,44	8,41 $\pm$ 0,641
C6	60.87	0,0424 $\pm$ 0,00683	3,59 $\pm$ 0,376	13,2 $\pm$ 3,11	35,2 $\pm$ 0,742	8,38 $\pm$ 0,568
<b>Glucose Vidro</b>						
C1 ( $\beta$ )	96.09	0,101 $\pm$ 0,0105	9,85 $\pm$ 1,06	44,2 $\pm$ 9,28	18,4 $\pm$ 1,45	9,52 $\pm$ 0,607
C1 ( $\alpha$ )	92.37	0,101 $\pm$ 0,00866	10,3 $\pm$ 0,919	53,6 $\pm$ 12,1	17,2 $\pm$ 1,81	9,80 $\pm$ 0,490
C2	74.37	0,0812 $\pm$ 0,00688	12,1 $\pm$ 1,11	29,3 $\pm$ 2,59	16,3 $\pm$ 0,220	10,1 $\pm$ 0,255
C3, C4, C5	72.02	0,0837 $\pm$ 0,00795	12,2 $\pm$ 1,27	31,1 $\pm$ 2,93	18,3 $\pm$ 1,13	10,4 $\pm$ 0,263
C6	61.65	0,0608 $\pm$ 0,0111	15,5 $\pm$ 3,22	5,99 $\pm$ 1,07	17,6 $\pm$ 1,60	10,3 $\pm$ 0,758

A figura 3.3 representa, a título exemplificativo, o gráfico de intensidade em função do tempo de contacto do pico 75.37 ppm ( $C_2$  e  $C_3$ ), da glucose- $\beta$  anidra. É a partir desta representação que se determinam o  $T_{CH}$  e  $T_{1\rho H}$ .

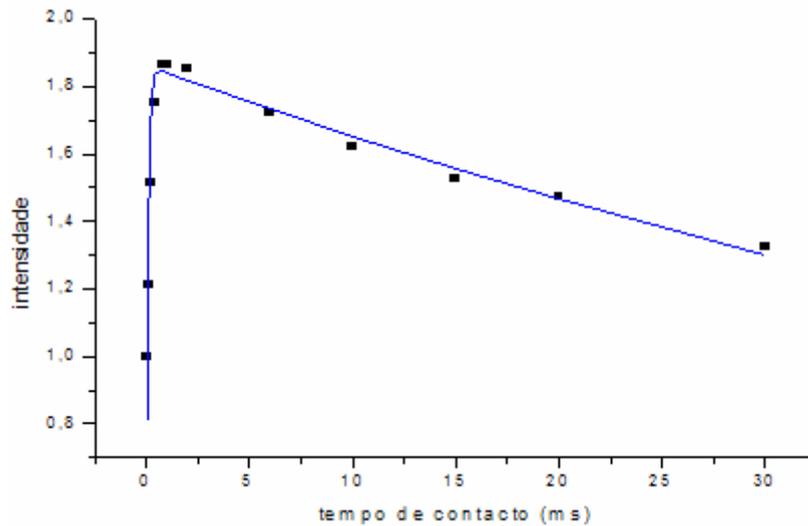


Figura 3.3 – Gráfico de intensidade em função do tempo de contacto, do pico 75.35 ppm da glucose- $\beta$  anidra.

Inicialmente, discutir-se-ão os resultados referentes às formas cristalinas, seguindo-se a discussão relativa às formas amorfas vítrea e liofilizada.

Com base na tabela 3.2, analisando o  $T_{CH}$  de cada uma das amostras verificam-se, em geral, valores mais elevados para a glucose- $\alpha$  (que variam entre 0,0693 – 0,101 ms), seguida de muito perto pela glucose- $\beta$  (gama entre 0,0783 – 0,0988 ms) e finalmente glucose monohidratada (0,0583 – 0,0818 ms). Assim verifica-se que os prótons da glucose monohidratada utilizam menos tempo para transferir a magnetização para os carbonos. Este facto pode justificar-se pelo maior número de prótons que advêm da presença das moléculas de água em redor de cada molécula de glucose, facilitando assim a transferência de magnetização. Como o  $T_{CH}$  depende também da mobilidade geral do sistema, e adiantando também que o  $T_{2H}$  (este tempo de relaxação será discutido mais adiante) para a glucose monohidratada é o mais baixo das três formas cristalinas (indicando maior rigidez molecular), podemos concluir que além do maior número de prótons, a baixa mobilidade da glucose monohidratada pode também justificar os mais curtos valores de  $T_{CH}$ . Quanto mais móvel for um sistema molecular, mais lenta se torna a transferência de magnetização

dos prótons para os carbonos. Nas três formas cristalinas da glucose:  $\alpha$ ,  $\beta$  e monohidratada, verifica-se que os valores de  $T_{CH}$  do carbono 6 do anel glucosídico ( $0,0693 \pm 0,00612$  ms,  $0,0783 \pm 0,00773$  ms e  $0,0583 \pm 0,00646$  ms, respectivamente) são sempre um pouco mais baixos relativamente aos restantes carbonos. Esta observação indica que este carbono está ligado a mais um próton, acelerando, o processo de magnetização.

O efeito de difusão de spin no  $T_{1\rho H}$  de cada uma das amostras (tabela 3.2) traduz-se num único valor de  $T_{1\rho H}$  para todos os carbonos. Verifica-se que a glucose monohidratada tem os valores mais baixos (8,19 – 10,8 ms) comparativamente às glucose  $\alpha$  e  $\beta$  (valores acima dos 60 ms), tendo esta última os valores mais elevados. Os valores baixos de  $T_{1\rho H}$  da glucose monohidratada devem-se à existência de maior número de movimentos da ordem de frequência das dezenas de kHz, que são os movimentos que activam este processo de relaxação. Os movimentos existentes na molécula podem derivar das ligações do próprio anel ou dos grupos terminais. Neste caso, pode-se avançar que as ligações do anel são as principais responsáveis por este processo de relaxação, pois tratam-se de movimentos relativamente lentos. A maior cristalinidade das formas  $\alpha$  e  $\beta$  poderá originar sistemas mais rígidos, na gama de frequências das dezenas de kHz. Os valores  $T_{1\rho H}$  ligeiramente mais elevados para a glucose- $\beta$  (78,3 – 115 ms, comparativamente a 65,7 – 79,2 ms para a forma  $\alpha$ ) sugerem que a forma  $\beta$  se caracteriza por menor mobilidade do anel.

Os valores de  $T_{1C}$  e  $T_{1H}$  (tabela 3.2) são determinados por movimentos da gama das centenas de MHz (movimentos rápidos). O único valor de  $T_{1C}$  que foi possível calcular foi para o carbono 6 da glucose- $\alpha$  (46,1 s). Relativamente aos valores de  $T_{1H}$  (tabela 4.2), observa-se difusão de spin para os sistemas em estudo e por isso os valores são muito semelhantes entre si. Os tempos mais elevados são os referentes à glucose monohidratada (na ordem das duas centenas de segundos), seguidos da glucose- $\alpha$  (121-129 s) e finalmente glucose- $\beta$  (na ordem das dezenas de segundos). Tendo em conta que quanto mais curto o  $T_{1H}$ , maior número de movimentos rápidos estão presentes, conclui-se que a glucose- $\beta$  é a forma mais móvel em termos de movimentos rápidos enquanto que a glucose monohidratada é a forma menos móvel. Isto é concordante com a observação de que os valores de  $T_{2H}$  são mais curtos na glucose monohidratada (5,83 – 9,30  $\mu$ s) comparativamente às formas  $\alpha$  e  $\beta$  (9,23 – 9,83  $\mu$ s). Entre a glucose  $\alpha$  e  $\beta$ , a diferença de valores não é significativa.

Em suma, no que diz respeito às formas cristalinas, a glucose monohidratada exibe uma velocidade de polarização cruzada maior devido ao maior número de moléculas de água na vizinhança dos seus carbonos e/ou maior rigidez do sistema. Esta mesma forma é caracterizada por maior predominância de movimentos lentos do anel e menor mobilidade respeitante a movimentos rápidos.

Discutem-se, em seguida, os parâmetros de relaxação medidos para as formas amorfas, glucose liofilizada e glucose vítrea. A título de exemplo, apresenta-se na figura seguinte o gráfico de intensidade em função do tempo de contacto do pico 92.96 ppm ( $C_2$  e  $C_3$ ), da glucose liofilizada e que mostra o ajuste satisfatório dos pontos experimentais à curva teórica traduzida pela equação apresentada na página 90.

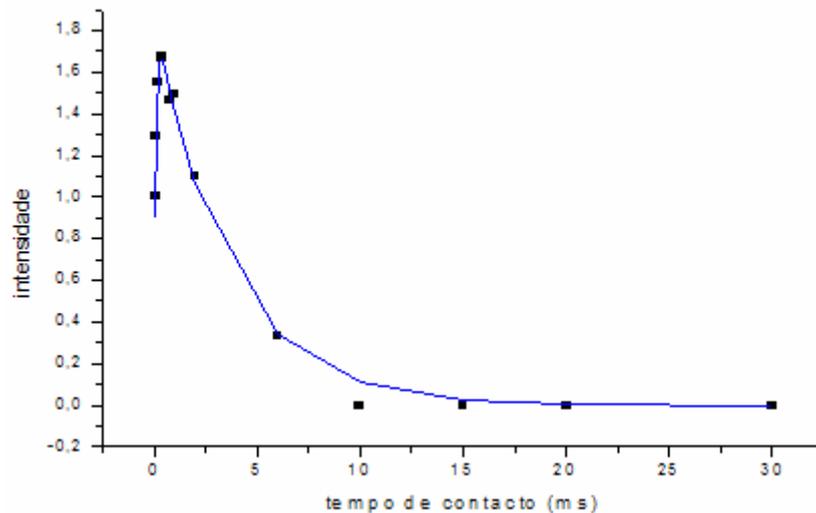


Figura 3.4 – Gráfico de intensidade em função do tempo de contacto, para o pico 92.96 ppm da glucose liofilizada anidra.

Comparativamente ao gráfico da figura 3.3, esta curva evidencia uma relaxação longitudinal no referencial rotativo ( $1/T_{1\rho H}$ ) bastante mais rápida (segundo parte da curva). Analisando o parâmetro  $T_{CH}$  de cada uma das formas (tabela 3.2) verifica-se apenas alguma propensão para os valores referentes aos carbonos não anoméricos na glucose vítrea serem mais elevados que os correspondentes na glucose liofilizada. Esta tendência poderá indicar maior mobilidade geral no vidro ou pode também sugerir que estas duas

formas de glucose difiram na densidade de protões no seu sistema, indicando que a glucose liofilizada terá um sistema mais denso do que a forma vítrea.

Relativamente aos valores de  $T_{1\rho H}$ , os valores mais elevados verificam-se para a glucose vítrea (9,9 – 15,5 ms), indicando menor mobilidade na ordem das dezenas de kHz (movimentos lentos do anel) do que na glucose liofilizada (3,5 e 4,1 ms).

Os tempos  $T_{1C}$ , embora associados de um erro superior a 10% indicam uma gama mais elevada para a forma vítrea (5,99 e 53,6 s), comparativamente à forma liofilizada (1,71 e 20,1 s). Isto sugere que a glucose vítrea não contém grande mobilidade em termos de movimentos rápidos (centenas de MHz), i.e. de grupos terminais. Os mais baixos valores de  $T_{1H}$  observados para a forma vítrea parecem, à primeira vista, contradizer a sugestão avançada com base nos valores de  $T_{1C}$ . No entanto, os curtos valores de  $T_{1H}$  apenas reflectem a difusão de spin muito eficiente na glucose vítrea e que comunica a relaxação mais rápida que caracteriza os protões na posição 6 (aliás confirmada também pelos valores  $T_{1C}$ ) aos restantes ambientes. O resultado é um valor médio de  $T_{1H}$  mais curto do que seria de esperar, na ausência de difusão.

Finalmente, os valores de  $T_{2H}$ , não são significativamente diferentes para a forma vítrea e liofilizada.

Comparando agora os tempos de relaxação das formas amorfas e cristalina verifica-se que os valores de  $T_{1\rho H}$ , são ligeiramente mais elevados para as formas cristalinas com excepção da glucose monohidratada que exhibe valores semelhantes aos registados para a forma vítrea. Conclui-se então que as formas amorfas tendem a ter maior mobilidade na ordem das dezenas de kHz, i.e. movimentos de anel, relativamente às formas cristalinas.

As formas amorfas têm também tempos de relaxação  $T_{1C}$  relativamente mais curtos o que denota maior mobilidade também na gama das centenas de MHz, ou seja, movimentos rápidos de grupos terminais. Os valores de  $T_{1C}$  são, em geral, coerentes com os de  $T_{1H}$ .

Finalmente, os valores de  $T_{2H}$  são bastante semelhantes entre as diferentes formas de glucose o que mostra que, embora as formas amorfas tenham maior mobilidade em termos de movimentos lentos (dezenas de kHz) e mais rápidos (centenas de MHz), o parâmetro  $T_2$  não parece ser muito sensível a estas diferenças.

### 3.3.3 O efeito da hidratação

Neste sub capítulo, pretende-se analisar como evoluem as formas glucose- $\alpha$ , glucose- $\beta$ , glucose monohidratada e glucose liofilizada na presença de água. A forma vítrea não foi estudada por dificuldade de hidratar de forma homogénea a amostra preparada no próprio rotor.

A figura 3.5 apresenta os espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose- $\alpha$  a 0%, 6% e 10% de humidade m/m.

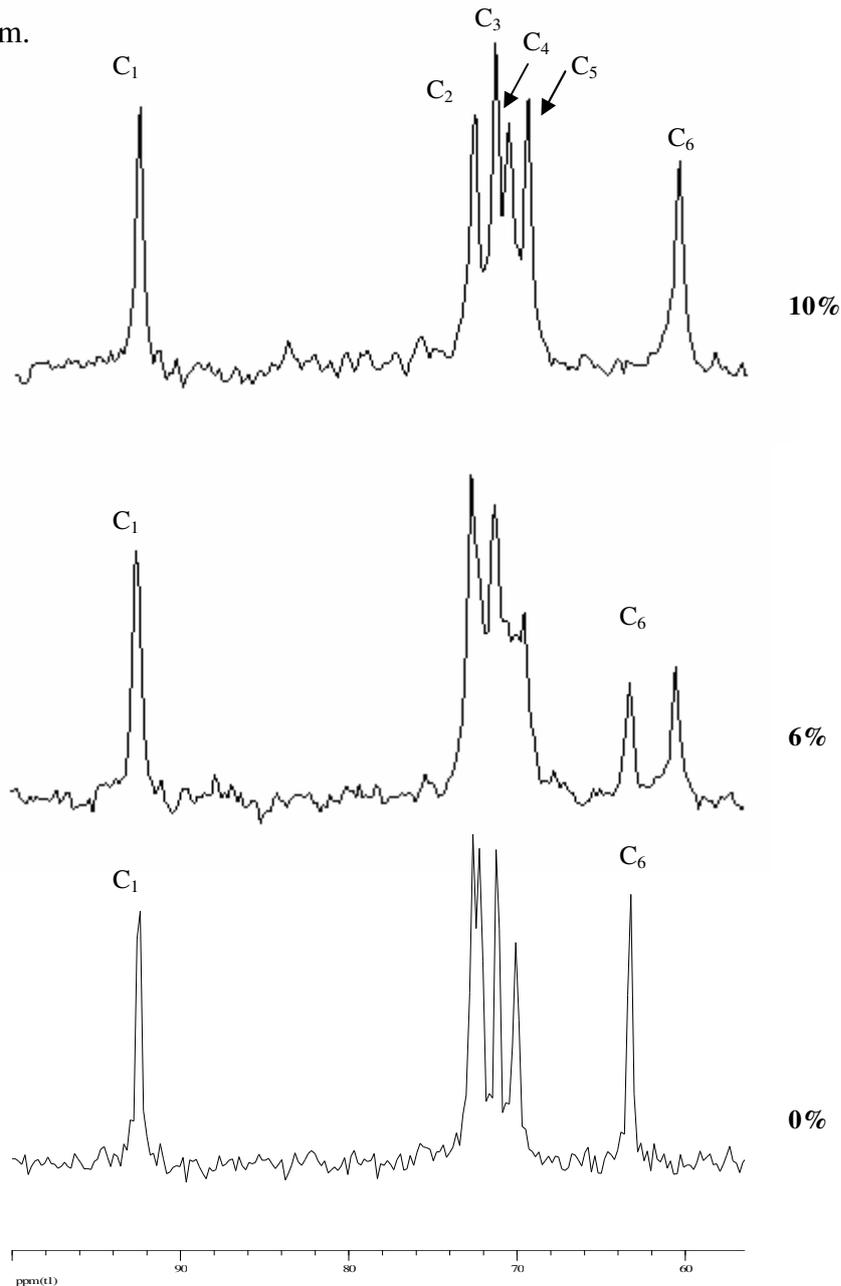


Figura 3.5 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose- $\alpha$  a 0%, 6% e 10% de humidade, à temperatura ambiente (LB=20, NS=400).

De 0% de humidade para 6% de humidade verifica-se o aparecimento de um pico a 60,5 ppm (desvio semelhante ao do carbono 6 da  $\beta$  glucose) que permanece no nível de 10% de humidade. A 10%, desaparece também o pico a 63,5 ppm (desvio típico do carbono 6 da forma  $\alpha$ ). No final, observa-se uma forma ligeiramente menos cristalina (picos mais largos), cujo perfil é idêntico ao da glucose monohidratada no estado seco (figura 3.1), indicando assim a conversão de glucose- $\alpha$  anidra em glucose monohidratada.

Na figura 3.6, estão representados os espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose- $\beta$  a 0%, 6% e 10% de humidade m/m.

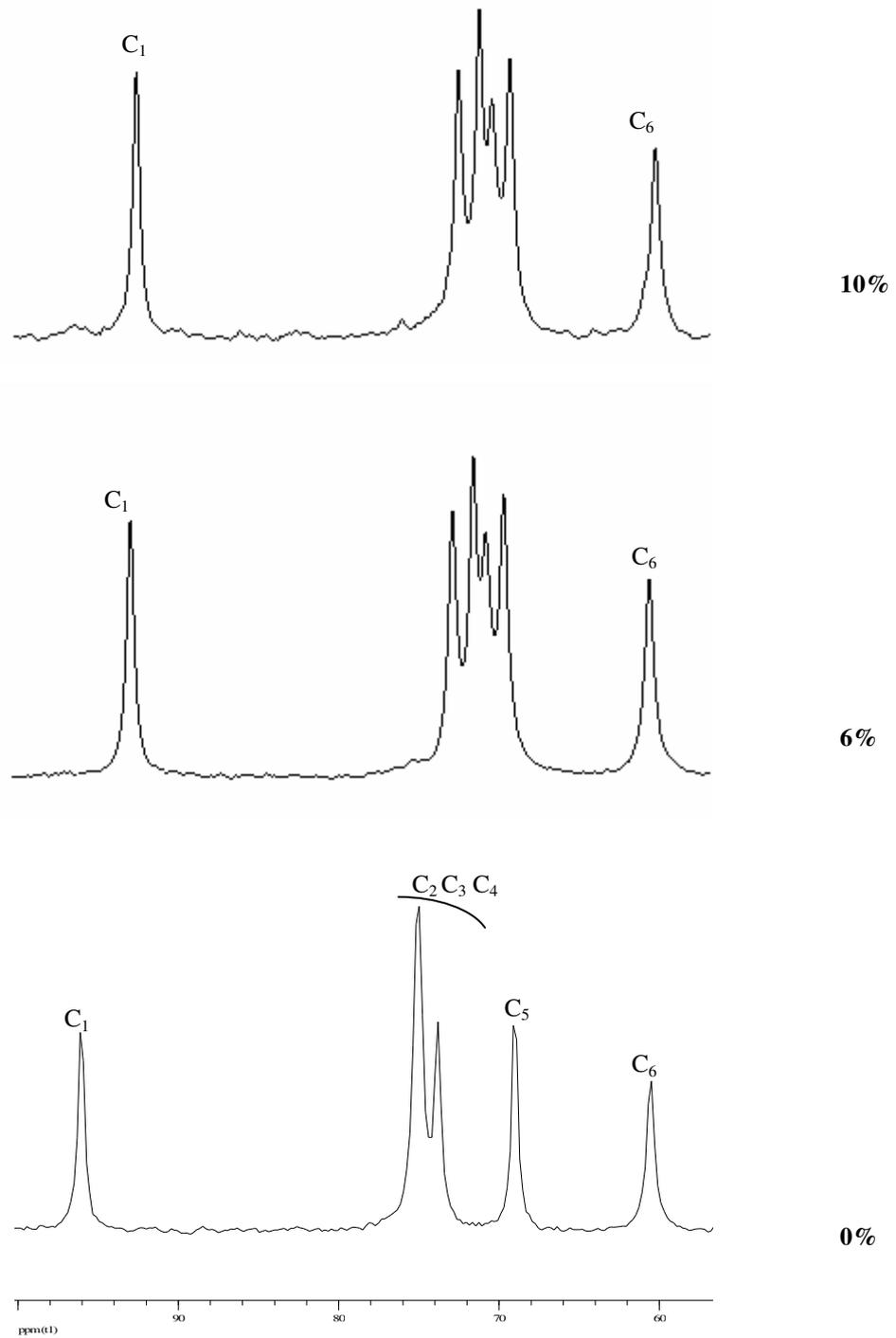


Figura 3.6 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose- $\beta$  a 0%, 6% e 10% de humidade, à temperatura ambiente (LB=20, NS=400).

De 0% de humidade para 6% de humidade, verifica-se que aparece o perfil espectral fica semelhante ao da glucose monohidratada. O mesmo se mantém para 10% de humidade.

Na figura 3.7 observam-se os espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose monohidratada a 0%, 6% e 10% de humidade m/m.

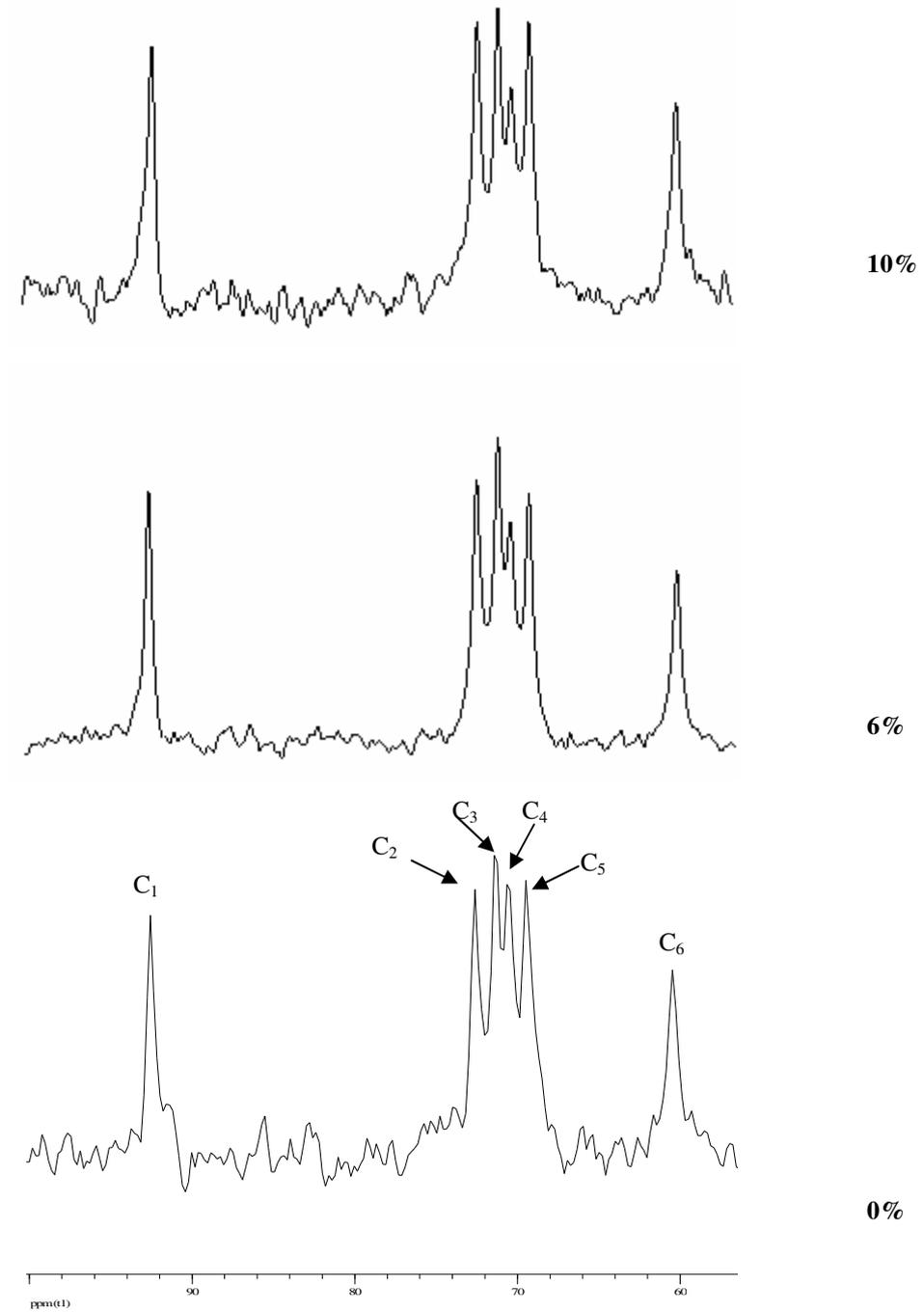


Figura 3.7 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da Glucose monohidratada a 0, 6% e 10% de humidade, á temperatura ambiente (LB=60, NS=400).

Analisando os espectros da glucose monohidratada na mesma gama de hidratações (figura 3.7), verifica-se que não há alterações significativas, indicando a aparente inalteração daquela forma, face a hidratações baixas.

Os espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose liofilizada a 0%, 6% e 10% de humidade m/m (figura 3.8) indicam que a forma predominante é a glucose monohidratada, notando-se, com o aumento gradual de humidade, o desaparecimento do pico a ~ 75 ppm, presente no espectro para 0% de humidade.

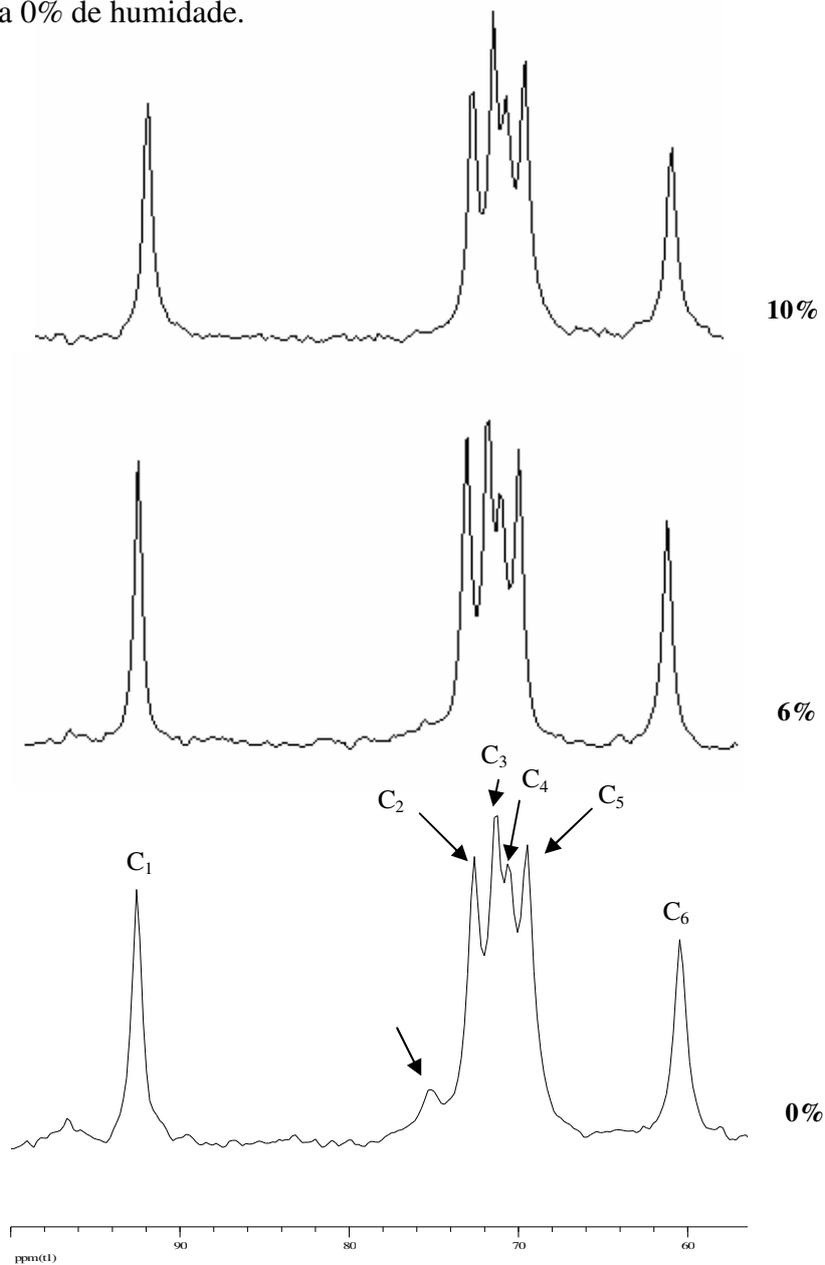


Figura 3.8 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da Glucose liofilizada a 0%, 6% e 10% de humidade, à temperatura ambiente (LB=20, NS=400).

Assim, a hidratação até 10% provoca a conversão das formas da glucose- $\alpha$  e - $\beta$  na forma de glucose monohidratada. Aparentemente as formas monohidratada e a liofilizada não apresentam alterações significativas com a hidratação, podendo no entanto ocorrer alterações ao nível da dinâmica, o que será de seguida discutido.

Para o estudo da dinâmica geral dos sistemas hidratados, calculou-se apenas o tempo de relaxação  $T_{2H}$ , como indicador da mobilidade geral das amostras. Na tabela 3.3 estão representados os valores de  $T_{2H}$  para as quatro formas de glucose:  $\alpha$ ,  $\beta$ , monohidratada e liofilizada e para os graus de hidratação 0, 6 e 10% m/m, à temperatura ambiente.

Tabela 3.3 – Tempos de relaxação  $T_{2H}$  da glucose- $\alpha$ , glucose- $\beta$ , glucose monohidratada e liofilizada, para 0, 6 e 10% de hidratação m/m.

$\delta$ (ppm)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)		
	0% H <sub>2</sub> O m/m	6% H <sub>2</sub> O m/m	10% H <sub>2</sub> O m/m
<b>Glucose <math>\alpha</math></b>			
92.85	9,75 $\pm$ 0,278	7,47 $\pm$ 0,921	5,43 $\pm$ 0,517
72.89	9,80 $\pm$ 0,251	8,60 $\pm$ 0,830	7,24 $\pm$ 0,902
72.60	n.d.	n.d.	5,15 $\pm$ 0,636
71.52	9,83 $\pm$ 0,299	8,50 $\pm$ 0,775	5,71 $\pm$ 0,747
70.44	9,79 $\pm$ 0,419	7,13 $\pm$ 1,15	n.d.
63.64	9,22 $\pm$ 0,350	7,59 $\pm$ 1,26	n.d.
60.79	n.d.	n.d.	8,04 $\pm$ 1,35
<b>Glucose <math>\beta</math></b>			
96.50	9,39 $\pm$ 0,354	n.d.	n.d.
92.97	n.d.	9,19 $\pm$ 0,267	9,51 $\pm$ 0,642
75.56	9,30 $\pm$ 0,228	n.d.	n.d.
74.19	9,39 $\pm$ 0,264	n.d.	n.d.
73.01	n.d.	8,58 $\pm$ 0,342	9,39 $\pm$ 0,594
71.64	n.d.	8,57 $\pm$ 0,332	9,10 $\pm$ 0,505
71.06	n.d.	8,65 $\pm$ 0,355	8,86 $\pm$ 0,532
69.49	9,36 $\pm$ 0,279	8,63 $\pm$ 0,375	9,09 $\pm$ 0,584
60.88	9,59 $\pm$ 0,418	8,45 $\pm$ 0,274	8,64 $\pm$ 0,661
<b>Glucose .H<sub>2</sub>O</b>			
92.93	7,01 $\pm$ 0,964	5,65 $\pm$ 0,643	n.d.
72.99	6,79 $\pm$ 0,715	7,64 $\pm$ 0,896	n.d.
71.72	7,13 $\pm$ 0,630	7,45 $\pm$ 0,938	n.d.
70.96	5,83 $\pm$ 0,361	6,63 $\pm$ 0,740	n.d.
69.81	9,30 $\pm$ 0,868	7,47 $\pm$ 0,833	n.d.
60.81	6,79 $\pm$ 0,754	6,80 $\pm$ 0,993	n.d.
<b>Glucose Liofilizada</b>			
92.95	8,51 $\pm$ 0,575	8,19 $\pm$ 0,359	8,69 $\pm$ 0,375
72.99	8,78 $\pm$ 0,448	8,41 $\pm$ 0,388	8,62 $\pm$ 0,418
71.62	8,47 $\pm$ 0,698	8,11 $\pm$ 0,311	8,99 $\pm$ 0,405
71.03	8,13 $\pm$ 0,585	8,27 $\pm$ 0,312	n.d.
69.86	8,41 $\pm$ 0,641	8,45 $\pm$ 0,416	8,64 $\pm$ 0,256
60.86	8,38 $\pm$ 0,568	8,36 $\pm$ 0,296	9,07 $\pm$ 0,481

Na glucose- $\alpha$  nota-se um decréscimo de  $T_{2H}$  com o aumento da hidratação, embora essa diminuição seja mais acentuada de 6 para 10% de hidratação. Esta variação indica uma diminuição da mobilidade geral do sistema. Este resultado é, aparentemente, surpreendente pois esperar-se-ia que a hidratação induzisse maior mobilidade molecular. Uma possível explicação assenta no facto das moléculas de água, a estes baixos teores de hidratação, serem conduzidas a estabelecer pontes de hidrogénio com as moléculas de glucose, nomeadamente com os grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$ , sendo usada como água de cristalização. A estrutura organizada resultante é mais rígida e firme. De facto, os valores de  $T_{2H}$  para a glucose- $\alpha$  a 10% de humidade são semelhantes aos da glucose monohidratada no estado seco, reforçando a ideia de que a presença de moléculas de água transformou a primeira forma na segunda não sendo suficiente para aumentar a mobilidade geral do sistema.

Relativamente aos valores obtidos para a glucose- $\beta$  não há alterações significativas nos valores de  $T_{2H}$ , embora se tenha verificado a conversão para a forma de glucose monohidratada, tal como para a glucose- $\alpha$ . Esta observação indica que, interessantemente, os sistemas de glucose monohidratada podem exibir mobilidade geral distinta, consoante foram obtidos da forma - $\alpha$  ou - $\beta$ .

Os erros associados aos valores de  $T_{2H}$  da glucose monohidratada estão na sua maioria um pouco acima do valor máximo aceitável (10% do valor de  $T_{2H}$ ) devido à baixa razão sinal/ruído. Mesmo assim, verifica-se uma possível tendência para um aumento dos tempos de relaxação com a hidratação, ou seja, ligeiro aumento de mobilidade geral.

Quanto aos valores determinados para a glucose liofilizada, estes mantêm-se pelos 8  $\mu\text{s}$  para 0, 6 e 10% de humidade, mostrando a estabilidade desta amostra à hidratação nesta gama.

### **3.3.4 O efeito do aquecimento – arrefecimento**

Nesta fase do estudo, pretende-se observar os efeitos da temperatura ao nível da organização e dinâmica moleculares da glucose, e para posteriormente comparar com o que se sucede em sistemas mais complexos. Para isso, adquiriram-se espectros de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$  a cada temperatura, usando uma mesma amostra e levado a cabo o ciclo de

aquecimento – arrefecimento no próprio espectrómetro. As figuras 3.9 e 3.10 apresentam os espectros referentes a cada temperatura para a glucose- $\alpha$  e a glucose- $\beta$ , respectivamente.

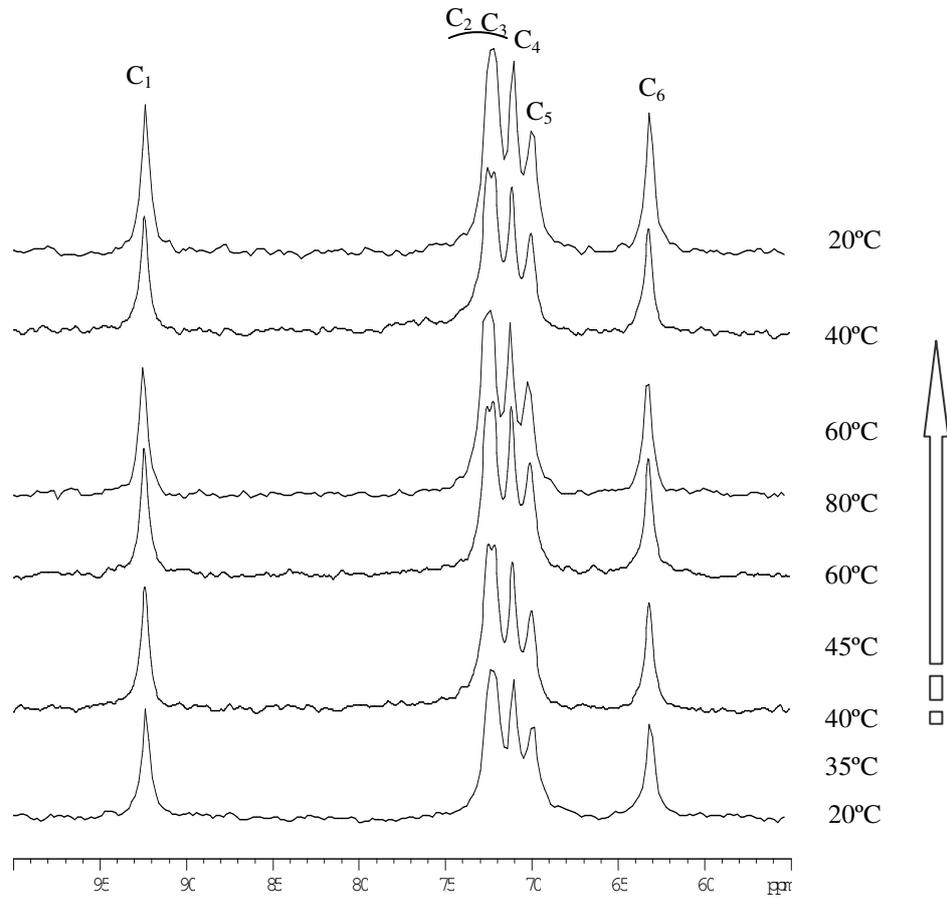


Figura 3.9 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose- $\alpha$  para diferentes temperaturas (LB=30, NS=300,  $\tau=1\text{ms}$ ).

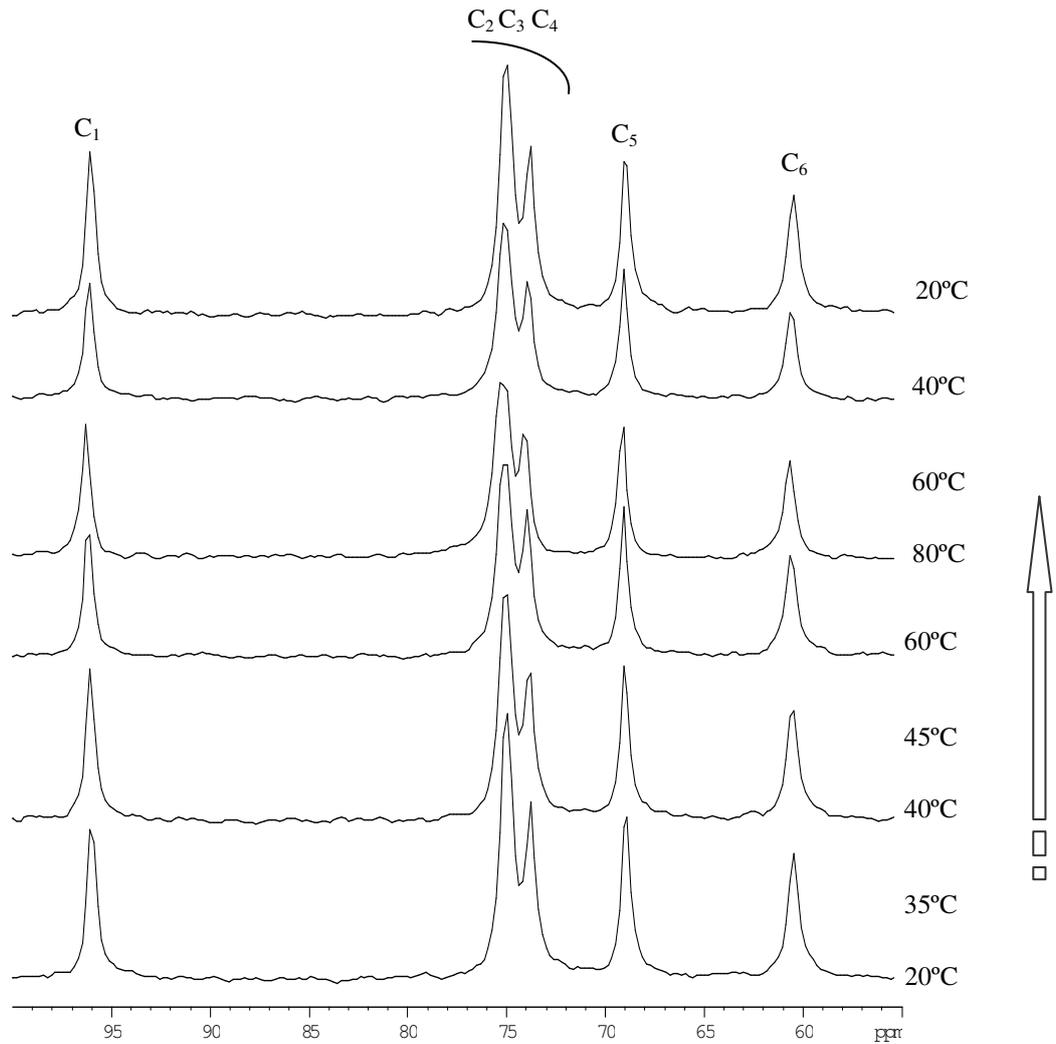


Figura 3.10 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose- $\beta$  para diferentes temperaturas ( $LB=30$ ,  $NS=300$ ,  $\tau=1\text{ms}$ ).

Para a glucose- $\alpha$  apenas se verifica uma ligeira melhoria de resolução após o ciclo de temperaturas podendo reflectir alguma melhoria na organização molecular. O mesmo se verifica para a glucose- $\beta$ . Os espectros resultantes do ciclo de temperaturas para a amostra glucose monohidratada (figura 3.11) apresentam uma fraca razão sinal/ruído, o que se explica devido à muito mais rápida relaxação  $T_{1\rho\text{H}}$  desta forma (tabela 3.2) relativamente às formas - $\alpha$  e - $\beta$ .

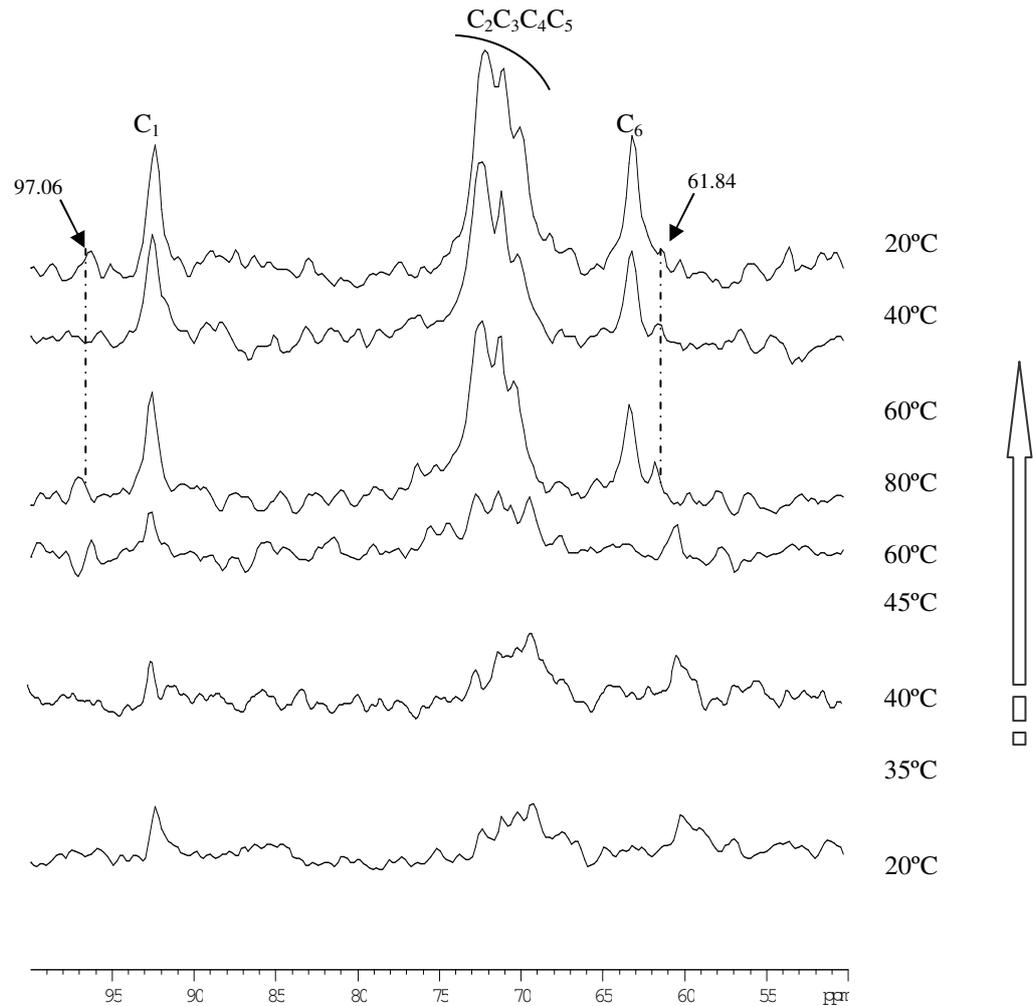


Figura 3.11 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose monohidratada, para diferentes temperaturas ( $LB=50$ ,  $NS=300$ ,  $\tau=1ms$ ).

A partir de  $80^{\circ}\text{C}$ , iniciando o arrefecimento da amostra, observa-se uma transformação da forma monohidratada na forma  $\alpha$ . O pico a  $60.27\text{ ppm}$ , típico da forma  $\beta$ , deixa de existir, e surge um pico a  $63.40\text{ ppm}$  (típico da forma  $\alpha$ ). Os picos a  $61.84\text{ ppm}$  e  $97.06\text{ ppm}$  não são muito significativos devido ao elevado ruído que se observa nestes espectros, no entanto, poderá ser indicador de vestígios da forma  $\beta$ . O perfil do espectro da glucose monohidratada no final do arrefecimento adquire semelhanças com o espectro da glucose- $\alpha$ . O empacotamento molecular da glucose monohidratada altera-se devido à saída das moléculas de água por acção do aquecimento e da rotação da amostra.

Também as propriedades dinâmicas da glucose monohidratada parecem ter sido convertidas, no final do ciclo térmico, nas propriedades dinâmicas características da glucose- $\alpha$ , dado que o aumento de intensidade sugere um aumento dos valores de  $T_{1\rho\text{H}}$ .

A figura 3.12 apresenta os vários espectros para cada temperatura resultantes do aquecimento – arrefecimento para a glucose liofilizada. Em primeiro lugar, é de notar que o espectro da amostra inicial é algo diferente daquele apresentado na figura 3.1 para a glucose liofilizada. Isto indica a baixa reprodutibilidade do processo sendo claro que a segunda amostra é mais amorfa (sinais mais largos) e apresenta dois ambientes distintos para os carbonos  $C_6$ , característicos de cada uma das formas  $\alpha$  e  $\beta$ , mas interessantemente, correspondendo a um mesmo ambiente de  $C_1$ .

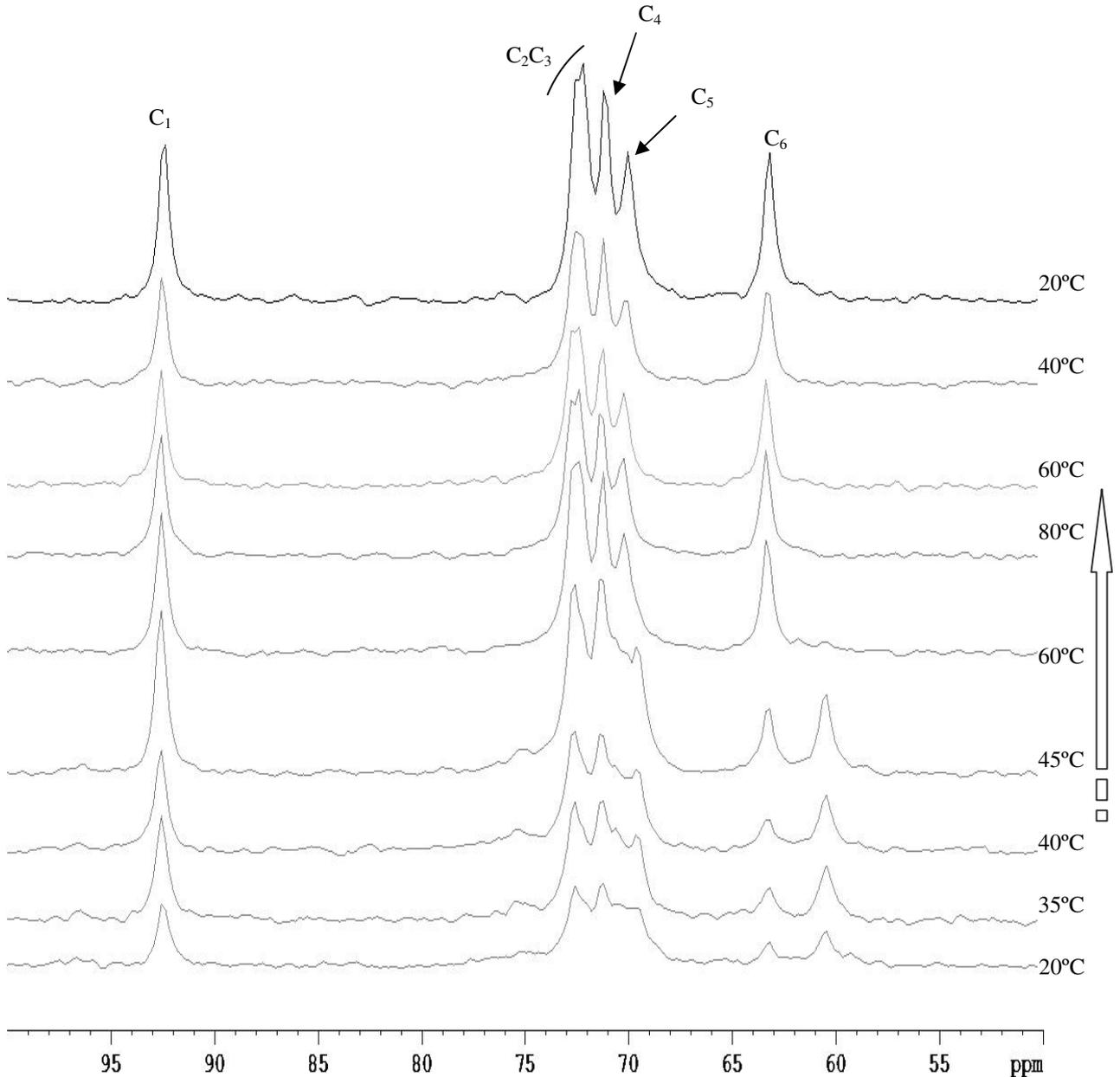


Figura 3.12 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose liofilizada, para diferentes temperaturas ( $LB=30$ ,  $NS=300$ ,  $\tau=1ms$ ).

A variação da temperatura na glucose liofilizada, provoca alguns efeitos semelhantes aos ocorridos na glucose monohidratada, sendo o principal o facto de no final do ciclo estarmos perante a forma  $\alpha$  da glucose. Durante o aquecimento, verifica-se que o pico a 60.47 ppm (pico característico do carbono 6 da glucose- $\beta$ ) desaparece a partir da temperatura de 60°C sendo o espectro final desta glucose semelhante ao espectro CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose- $\alpha$  (figura 3.1).

Finalmente, a figura 3.13, mostra os vários espectros obtidos da experiência térmica aplicada à forma vítrea da glucose.

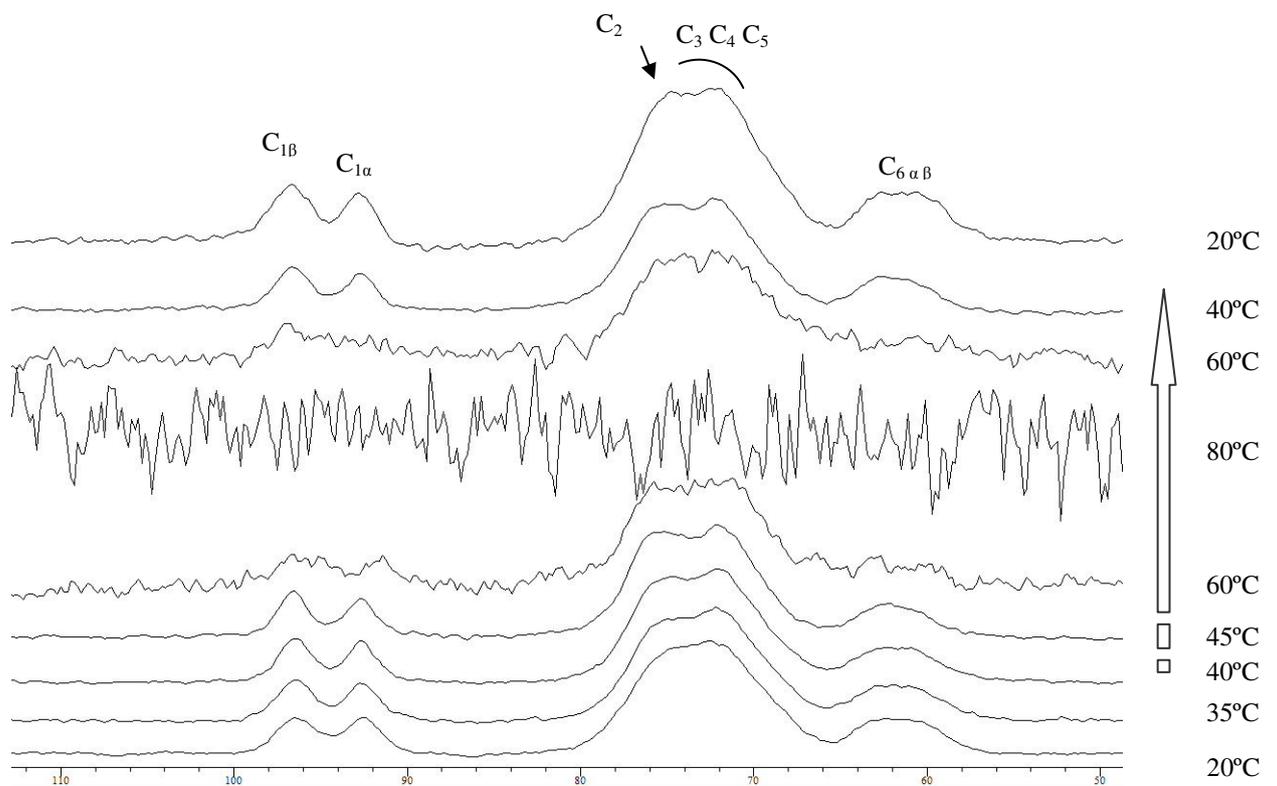


Figura 3.13 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da Glucose vítrea anidra, para diferentes temperaturas ( $LB=40$ ,  $NS=400$ ,  $\tau=1ms$ ).

No que se refere ao espectro de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da glucose vítrea, durante o aquecimento, até à temperatura de 40°C, observa-se um ligeiro aumento de resolução. No entanto, para 45°C denota-se um aumento de ruído; à temperatura de 60°C os sinais quase desaparecem, e a 80°C só há ruído. À medida que a temperatura vai diminuindo, os espectros retomam progressivamente o perfil inicial. Uma possível explicação para o desaparecimento de sinal é a passagem de estado vidro a estado “rubbery”, e na descida de temperatura o inverso.

Ou seja, a temperatura de 45°C deverá estar próxima da temperatura de transição vítrea,  $T_g$ , temperatura à qual ocorre a passagem do estado vidro a “rubbery” desta amostra em particular. O estado “rubbery” é muito móvel, de tal forma que deixa de ocorrer a polarização cruzada e conseqüentemente ausência de sinal no espectro. Com o arrefecimento do meio, a amostra retoma o estado vidro, e deste modo diminui a mobilidade, podendo assim realizar-se a polarização cruzada e deste modo reaparecimento do perfil inicial. Embora a  $T_g$  da glucose reportada na literatura se encontre no intervalo entre 31-39°C (Fennema 1996), é possível que a amostra utilizada nesta dissertação esteja mais seca (grau de hidratação mais baixo) que a utilizada por Fennema, pois com a rotação, e com o decorrer das experiências a amostra torna-se mais seca. E, a  $T_g$  de uma amostra tem uma resposta inversa ao grau de hidratação. Ou seja, quanto menor o grau de hidratação, mais elevado será a  $T_g$  de uma dada amostra.

Os resultados de medições de tempos de relaxação ( $T_{CH}$ ,  $T_{1\rho H}$ ,  $T_{1C}$ ,  $T_{1H}$  e  $T_{2H}$ ) para as diferentes formas de glucose após o ciclo de aquecimento-arrefecimento estão apresentados na tabela 3.4. Estes irão ser comparados com os resultados obtidos antes do aquecimento novamente apresentados na tabela 3.4 para facilitar a comparação.

Tabela 3.4 – Tempos de relaxação  $T_{CH}$ ,  $T_{1\rho H}$ ,  $T_{1C}$ ,  $T_{1H}$  e  $T_{2H}$  da glucose- $\alpha$ ,  $\beta$  glucose, glucose monohidratada, liofilizada e vítrea antes e depois do ciclo térmico.

Antes do ciclo térmico						Após o ciclo térmico					
$\delta$ (ppm)	TCH (ms)	$T_{1\rho H}$ (ms)	T1C (s)	$T_{1H}$ (s)	T2H ( $\mu$ s)	$\delta$ (ppm)	TCH (ms)	$T_{1\rho H}$ (ms)	T1C (s)	$T_{1H}$ (s)	T2H ( $\mu$ s)
<b><math>\alpha</math> Glucose</b>						<b><math>\alpha</math> Glucose</b>					
92.79	0,0903 $\pm$ 0,0111	68,1 $\pm$ 10,7	n.d.	129 $\pm$ 2,02	9,75 $\pm$ 0,278	92.79	0,0838 $\pm$ 0,0101	88,8 $\pm$ 16,3	226 $\pm$ 102	108 $\pm$ 6,13	8,76 $\pm$ 0,361
72.63	0,101 $\pm$ 0,0112	65,7 $\pm$ 9,17	n.d.	122 $\pm$ 2,54	9,80 $\pm$ 0,251	72.63	0,0853 $\pm$ 0,0069	74,6 $\pm$ 8,05	229 $\pm$ 81,4	110 $\pm$ 4,56	9,78 $\pm$ 0,423
71.65	0,0965 $\pm$ 0,0120	79,2 $\pm$ 14,1	n.d.	127 $\pm$ 3,93	9,83 $\pm$ 0,298	71.65	0,0942 $\pm$ 0,0104	68,3 $\pm$ 9,70	296 $\pm$ 200	106 $\pm$ 4,17	9,40 $\pm$ 0,431
70.48	0,0997 $\pm$ 0,0134	75,0 $\pm$ 13,9	n.d.	120 $\pm$ 4,48	9,79 $\pm$ 0,419	70.48	0,0909 $\pm$ 0,0128	88,5 $\pm$ 19,1	n.d.	107 $\pm$ 4,99	9,82 $\pm$ 0,360
63.63	0,0693 $\pm$ 0,00612	72,3 $\pm$ 8,02	46,0 $\pm$ 0,00552	120 $\pm$ 3,65	9,22 $\pm$ 0,350	63.63	0,0840 $\pm$ 0,0140	75,8 $\pm$ 17,1	53,2 $\pm$ 1,90	104 $\pm$ 4,63	9,29 $\pm$ 0,251
<b><math>\beta</math> Glucose</b>						<b><math>\beta</math> Glucose</b>					
96.31	0,0898 $\pm$ 0,0101	85,9 $\pm$ 14,5	n.d.	42,2 $\pm$ 1,13	9,39 $\pm$ 0,353	96.31	0,0907 $\pm$ 0,0069	122 $\pm$ 18,4	n.d.	48,7 $\pm$ 1,81	9,54 $\pm$ 0,418
75.37	0,0873 $\pm$ 0,00750	83,1 $\pm$ 10,4	n.d.	40,0 $\pm$ 0,856	9,29 $\pm$ 0,228	75.37	0,0916 $\pm$ 0,0078	77,3 $\pm$ 9,12	n.d.	48,7 $\pm$ 0,922	9,32 $\pm$ 0,234
74.20	0,0988 $\pm$ 0,00962	78,3 $\pm$ 10,8	n.d.	39,2 $\pm$ 1,53	9,39 $\pm$ 0,264	74.20	0,0949 $\pm$ 0,0074	73,5 $\pm$ 7,73	n.d.	48,5 $\pm$ 1,36	9,36 $\pm$ 0,255
69.30	0,0927 $\pm$ 0,00871	115 $\pm$ 20,5	n.d.	38,4 $\pm$ 0,758	9,36 $\pm$ 0,279	69.30	0,0895 $\pm$ 0,0091	137 $\pm$ 30,2	n.d.	48,5 $\pm$ 1,64	9,40 $\pm$ 0,338
60.89	0,0782 $\pm$ 0,00773	90,8 $\pm$ 13,6	n.d.	40,9 $\pm$ 1,26	9,59 $\pm$ 0,418	60.89	0,0668 $\pm$ 0,0091	108 $\pm$ 24,6	n.d.	49,1 $\pm$ 1,26	9,35 $\pm$ 0,349
<b>Glucose .H<sub>2</sub>O</b>						<b>Glucose .H<sub>2</sub>O</b>					
93.03	0,0818 $\pm$ 0,0144	10,2 $\pm$ 1,96	n.d.	281 $\pm$ 42,7	7,01 $\pm$ 0,964	92.93	0,104 $\pm$ 0,0249	23,3 $\pm$ 8,66	n.d.	136 $\pm$ 6,90	8,97 $\pm$ 0,622
73.07	0,0582 $\pm$ 0,0116	9,51 $\pm$ 1,79	n.d.	247 $\pm$ 28,0	6,79 $\pm$ 0,715	72.99	0,0934 $\pm$ 0,0199	18,1 $\pm$ 5,06	n.d.	129 $\pm$ 5,80	9,27 $\pm$ 0,649
71.70	0,0671 $\pm$ 0,0112	10,8 $\pm$ 1,87	n.d.	245 $\pm$ 38,2	7,13 $\pm$ 0,630	71.72	0,117 $\pm$ 0,0249	20,0 $\pm$ 6,10	n.d.	133 $\pm$ 8,50	7,93 $\pm$ 0,526
71.12	0,0680 $\pm$ 0,00855	8,45 $\pm$ 1,07	n.d.	215 $\pm$ 29,9	5,83 $\pm$ 0,361	70.96	0,0939 $\pm$ 0,0219	36,2 $\pm$ 17,8	46,5 $\pm$ 34,2	128 $\pm$ 9,48	8,39 $\pm$ 0,477
69.94	0,0698 $\pm$ 0,00977	9,39 $\pm$ 1,33	n.d.	216 $\pm$ 21,3	9,30 $\pm$ 0,868	63.40	0,0815 $\pm$ 0,0122	39,8 $\pm$ 13,2	61,0 $\pm$ 6,51	112 $\pm$ 7,88	9,12 $\pm$ 1,28
60.94	0,0583 $\pm$ 0,00646	8,19 $\pm$ 0,842	n.d.	227 $\pm$ 27,9	6,79 $\pm$ 0,754	60.81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,86 $\pm$ 1,43
<b>Glucose Liofilizada</b>						<b>Glucose Liofilizada</b>					
92.96	0,107 $\pm$ 0,00741	3,55 $\pm$ 0,336	8,92 $\pm$ 3,77	37,7 $\pm$ 2,36	8,51 $\pm$ 0,575	92.76	0,0660 $\pm$ 0,0066	32,7 $\pm$ 2,59	n.d.	23,0 $\pm$ 2,64	9,60 $\pm$ 0,352
75.54	0,0207 $\pm$ 0,00726	4,07 $\pm$ 0,570	n.d.	n.d.	n.d.						
73.00	0,0583 $\pm$ 0,00604	3,50 $\pm$ 0,322	20,1 $\pm$ 6,93	38,6 $\pm$ 2,90	8,77 $\pm$ 0,448	72.80	0,0565 $\pm$ 0,0070	31,5 $\pm$ 2,90	n.d.	23,2 $\pm$ 2,21	9,56 $\pm$ 0,401
71.63	0,0601 $\pm$ 0,00804	3,73 $\pm$ 0,443	8,13 $\pm$ 1,94	40,8 $\pm$ 1,36	8,47 $\pm$ 0,698	71.63	0,0607 $\pm$ 0,0092	33,4 $\pm$ 3,97	n.d.	22,0 $\pm$ 2,06	9,40 $\pm$ 0,295
71.04	0,0713 $\pm$ 0,00799	3,59 $\pm$ 0,376	1,71 $\pm$ 0,577	40,8 $\pm$ 1,84	8,13 $\pm$ 0,585						
69.87	0,0725 $\pm$ 0,0115	4,03 $\pm$ 0,587	8,30 $\pm$ 2,47	43,7 $\pm$ 1,44	8,41 $\pm$ 0,641	70.45	0,0582 $\pm$ 0,0098	52,3 $\pm$ 8,50	0,976 $\pm$ 0,433	22,1 $\pm$ 2,37	9,96 $\pm$ 0,398
60.87	0,0424 $\pm$ 0,00683	3,59 $\pm$ 0,376	13,1 $\pm$ 3,11	35,2 $\pm$ 0,742	8,38 $\pm$ 0,568	63.61	0,0469 $\pm$ 0,0061	31,5 $\pm$ 2,81	63,1 $\pm$ 8,75	22,2 $\pm$ 2,45	9,27 $\pm$ 0,271
<b>Glucose Vidro</b>						<b>Glucose Vidro</b>					
96.09	0,101 $\pm$ 0,0105	9,85 $\pm$ 1,06	44,2 $\pm$ 9,28	18,4 $\pm$ 1,44	9,52 $\pm$ 0,607	96.91	0,0897 $\pm$ 0,0106	76,6 $\pm$ 12,5	29,0 $\pm$ 3,38	19,5 $\pm$ 1,88	9,44 $\pm$ 0,543
92.37	0,101 $\pm$ 0,00866	10,3 $\pm$ 0,919	53,6 $\pm$ 12,1	17,2 $\pm$ 1,80	9,80 $\pm$ 0,490	92.90	0,0838 $\pm$ 0,0069	78,1 $\pm$ 8,81	37,0 $\pm$ 7,61	17,0 $\pm$ 1,20	9,08 $\pm$ 0,561
74.37	0,0812 $\pm$ 0,00688	12,1 $\pm$ 1,11	29,3 $\pm$ 2,59	16,3 $\pm$ 0,220	10,1 $\pm$ 0,255	74.41	0,0935 $\pm$ 0,0110	66,6 $\pm$ 9,91	31,5 $\pm$ 2,40	17,8 $\pm$ 0,554	9,79 $\pm$ 0,580
72.02	0,0836 $\pm$ 0,00795	12,2 $\pm$ 1,27	31,1 $\pm$ 2,93	18,2 $\pm$ 1,13	10,3 $\pm$ 0,263	72.45	0,0907 $\pm$ 0,0135	108 $\pm$ 28,9	29,1 $\pm$ 2,16	17,1 $\pm$ 0,474	9,61 $\pm$ 0,607
61.65	0,0607 $\pm$ 0,0110	15,5 $\pm$ 3,23	5,99 $\pm$ 1,07	17,6 $\pm$ 1,60	10,2 $\pm$ 0,758	62.08	0,0791 $\pm$ 0,0113	87,4 $\pm$ 18,5	3,43 $\pm$ 1,00	17,5 $\pm$ 1,39	9,28 $\pm$ 0,513

Analisando os resultados obtidos após o ciclo de temperatura verifica-se que os valores de  $T_{CH}$  são bastante semelhantes entre si, para as formas cristalinas. No entanto antes do ciclo a glucose monohidratada diferia das restantes cristalinas.

No que diz respeito aos valores de  $T_{1\rho H}$ , para as glucoses  $\alpha$  e  $\beta$  não se verificou alterações significativas com o aquecimento – arrefecimento. A glucose monohidratada mostrou um aumento dos valores de  $T_{1\rho H}$  após o ciclo térmico reflectindo a aproximação do sistema às características da forma glucose  $\alpha$ .

A análise dos valores obtidos de  $T_{1C}$ , é dificultada pela existência de número limitado de valores registados. Quanto aos valores de  $T_{1H}$ , ao contrário das formas  $\alpha$  e  $\beta$ , a glucose monohidratada mostrou uma diminuição drástica de  $T_{1H}$ , ou seja, o número de movimentos rápidos aumentou significativamente após a variação de temperatura. Este comportamento está consistente com a conversão de glucose monohidratada em glucose  $\alpha$  dado que os novos valores de  $T_{1H}$  se aproximam dos valores de  $T_{1H}$  da glucose  $\alpha$ .

Por último, os tempos de relaxação  $T_{2H}$  são bastante semelhantes para as três formas cristalinas de glucose após o ciclo térmico. Comparando com os valores determinados antes da variação da temperatura, a única alteração encontrada verifica-se para a glucose monohidratada para a qual os tempos de  $T_{2H}$  aumentaram. Este resultado mais uma vez reforça a ideia de haver conversão de glucose monohidratada na forma  $\alpha$ , após o ciclo térmico.

Em suma, a glucose monohidratada mostrou ser a forma de glucose de entre as cristalinas, que sofreu mais alterações a nível dinâmico com o ciclo térmico, como seria de esperar face à transformação na forma  $\alpha$  evidenciado pelos espectros de CP/MAS.

Discutindo agora os resultados referentes às formas amorfas (tabela 3.4), verifica-se um aumento significativo de  $T_{1\rho H}$  particularmente acentuado para a forma liofilizada e vítrea. Interessantemente, esta observação mostra que, embora o espectro inicial seja reproduzido, ocorrem diferenças importantes ao nível dos movimentos lentos.

Quanto à glucose vítrea, e tendo em conta apenas os tempos que têm erros associados aceitáveis, verifica-se que não há diferenças significativas nos valores de  $T_{1H}$  antes e depois do ciclo térmico. Quanto à forma liofilizada há diminuição de  $T_{1H}$ , ou seja, aumento da mobilidade rápida, com o ciclo de temperatura.

Finalmente, os valores de  $T_{2H}$ , após o ciclo térmico, revelaram-se muito semelhantes para as duas formas de glucose em discussão ( $\sim 9 \mu s$ ). O efeito do ciclo térmico na glucose liofilizada é aumentar ligeiramente o  $T_{2H}$  (pequeno aumento de mobilidade geral) enquanto que não há variação significativa para a forma vítrea, devido à sua reversibilidade e estabilidade.

Em suma, estes resultados levam a concluir que a forma liofilizada é das formas amorfas aquela que mais sofre alterações irreversíveis no seu sistema molecular aquando aquecimento/arrefecimento. Ao contrário do que sucedeu à glucose vítrea, que tanto a nível spectral como dinâmico não mostra sofrer alterações significativas.

### 3.4 Caracterização do amido de uma farinha de baixa dureza por RMN do estado sólido

Nesta fase da dissertação irá proceder-se a análise do amido da mesma forma que foi realizada para a glucose. Pretende-se comparar a dinâmica e a estrutura do monómero na sua forma livre e no polímero, embora o salto em complexidade seja elevado. Para um estudo mais completo aconselhar-se-á considerar oligossacarídeos de tamanho intermédio.

#### 3.4.1 Espectros de CP/MAS de $^{13}\text{C}$ e tempos de relaxação de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$

O espectro de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$  da amostra de amido da variedade Amazonas (de baixo grau de dureza), no estado seco, à temperatura ambiente está representado na figura seguinte.

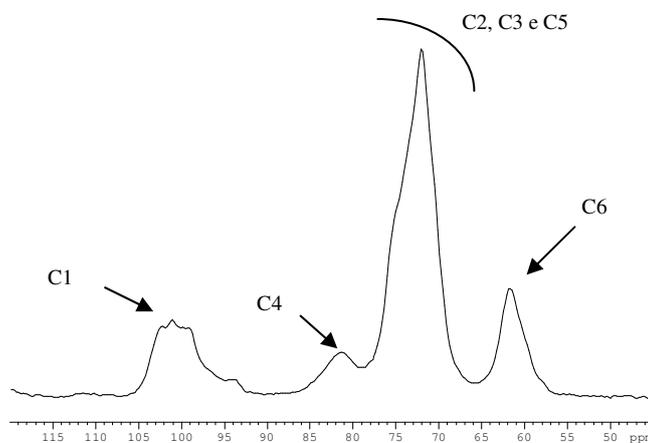


Figura 3.14 – Espectro de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$  do amido no estado seco, à temperatura ambiente ( $LB=20$ ,  $NS=400$ ).

As principais atribuições do amido foram realizadas tendo em conta trabalhos anteriores (Morgan 1995; Larsson 1997). O conjunto de pico a 101.2 ppm é atribuído aos diferentes ambientes do carbono 1 da glucose, devido aos polímeros amilose e amilopectina. A 81.7 ppm surge a banda referente ao carbono 4 da espécie supracitada. A banda, entre 78.0 ppm

e 66.0 ppm, inclui os picos característicos dos carbonos 2, 3 e 5. Por fim, o carbono 6 da glucose surge a 61.5 ppm (desvio parecido ao observado na glucose- $\beta$ ).

De forma a comparar com os resultados obtidos para a glucose, realizaram-se ensaios dinâmicos de RMN, determinando os tempos de relaxação  $T_{1\rho H}$ ,  $T_{1H}$ ,  $T_{1C}$  e  $T_{2H}$  para o amido em estudo, no estado seco e à temperatura ambiente (tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Tempos de relaxação  $T_{CH}$ ,  $T_{1\rho H}$ ,  $T_{1C}$ ,  $T_{1H}$  e  $T_{2H}$  do amido e glucose monohidratada.

Amido					
$\delta$ (ppm)	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1\rho H}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
101.227	n.d.	$0,0261 \pm 0,00872$	$5,70 \pm 2,94$	$1,18 \pm 0,0618$	$12,1 \pm 0,367$
81.658	$0,0408 \pm 0,0106$	$5,12 \pm 1,95$	n.d.	$1,20 \pm 0,0518$	$13,0 \pm 0,509$
72.069	$0,0478 \pm 0,00974$	$4,42 \pm 0,616$	$13,6 \pm 0,652$	$1,20 \pm 0,00712$	$11,8 \pm 0,289$
61.893	$0,0330 \pm 0,00498$	$6,24 \pm 1,40$	$1,53 \pm 0,238$	$1,17 \pm 0,0297$	$11,7 \pm 0,317$
Glucose Monohidratada					
$\delta$ (ppm)	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1\rho H}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
93.03	$0,0818 \pm 0,0144$	$10,2 \pm 1,96$	n.d.	$281,5 \pm 42,27$	$7,01 \pm 0,964$
73.07	$0,0582 \pm 0,0116$	$9,51 \pm 1,79$	n.d.	$247,4 \pm 28,04$	$6,79 \pm 0,715$
71.70	$0,0671 \pm 0,0112$	$10,8 \pm 1,87$	n.d.	$245,3 \pm 38,17$	$7,13 \pm 0,630$
71.12	$0,0680 \pm 0,00855$	$8,45 \pm 1,07$	n.d.	$215,5 \pm 29,92$	$5,83 \pm 0,361$
69.94	$0,0698 \pm 0,00977$	$9,39 \pm 1,33$	n.d.	$216,8 \pm 21,29$	$9,30 \pm 0,868$
60.94	$0,0583 \pm 0,00646$	$8,19 \pm 0,842$	n.d.	$226,6 \pm 27,94$	$6,79 \pm 0,754$

Para o tempo de relaxação  $T_{1C}$  do amido, não foi possível determinar alguns valores devido ao facto da baixa razão sinal/ruído sentida nestes espectros. Para proceder à comparação escolheu-se a glucose monohidratada por se tratar da forma mais estável de glucose (verificado através dos resultados das experiências de variação de temperatura e humidade) e supondo também que os componentes da farinha e do amido, em contacto com a humidade do ar se deverão encontrar hidratados em baixa extensão.

Tendo em conta os elevados erros associados aos tempos de relaxação  $T_{1\rho H}$  e  $T_{1C}$ , devido à baixa razão sinal ruído, estes parâmetros não serão aqui discutidos. Quanto ao  $T_{CH}$  será realizada uma breve discussão pois, embora não tão elevados, os erros obtidos estão fora do limite dito aceitável (até 10% do valor calculado).

Analisando os valores de  $T_{CH}$ , para o amido (entre 0.0330 e 0.0478 ms), verifica-se que estes não diferem muito entre si. Apenas se regista um valor ligeiramente inferior para o desvio a 61.9 ppm, referente ao carbono 6 da glucose. Comparando agora os valores de  $T_{CH}$  do amido com os valores obtidos para a glucose monohidratada (entre 0.0582 e 0.0818 ms), verifica-se que o primeiro apresenta valores inferiores. No entanto, eventuais diferenças no grau de hidratação destas duas amostras podem ser responsáveis pelas diferenças verificadas de dinâmica. Também é necessário ter em conta que os valores calculados de  $T_{CH}$  para o amido têm erros associados elevados devido ao elevado ruído dos espectros.

Relativamente ao tempo de relaxação  $T_{1H}$ , os valores são bastante semelhantes entre si (1.16 – 1.19 s) para uma mesma amostra, facto que se justifica pela ocorrência de eficiente difusão de spin. Do sistema de glucose para o sistema de amido, observou-se uma diminuição bastante acentuada dos valores de  $T_{1H}$  de 216 – 282 s para 1.16 – 1.19 s ou seja, existe muito mais mobilidade no amido, na ordem das centenas de MHz (movimentos rápidos).

Analisando agora os valores obtidos para o  $T_{2H}$  do amido (11.7 – 13.0  $\mu$ s) verifica-se um aumento, comparando com os valores obtidos para a glucose (5.83 - 9.30  $\mu$ s), o que confirma que o sistema mais complexo é realmente mais móvel do que o sistema simples de glucose. Esta observação é consistente com o esperado, reflectindo maior desorganização e empacotamento molecular mais pobre no amido.

### **3.4.2 O efeito da hidratação**

O efeito da hidratação no amido ao nível dos espectros de RMN de  $^{13}C$  foi analisado através da aquisição de espectros de CP/MAS de  $^{13}C$  de amostras de amido Amazonas, hidratadas numa gama de 0 a 20% de água m/m. A escolha de um máximo de 20% de humidade advém do facto de ser a percentagem máxima que foi possível utilizar no aparelho de RMN de sólidos, e para mais à frente nesta tese avaliar até que ponto a 20% e sob a acção da temperatura se evidenciam alterações devido ao processo de gelatinização,

visto que a este valor de humidade não se podem utilizar técnicas reológicas. Os espectros apresentam-se de seguida na figura 3.15.

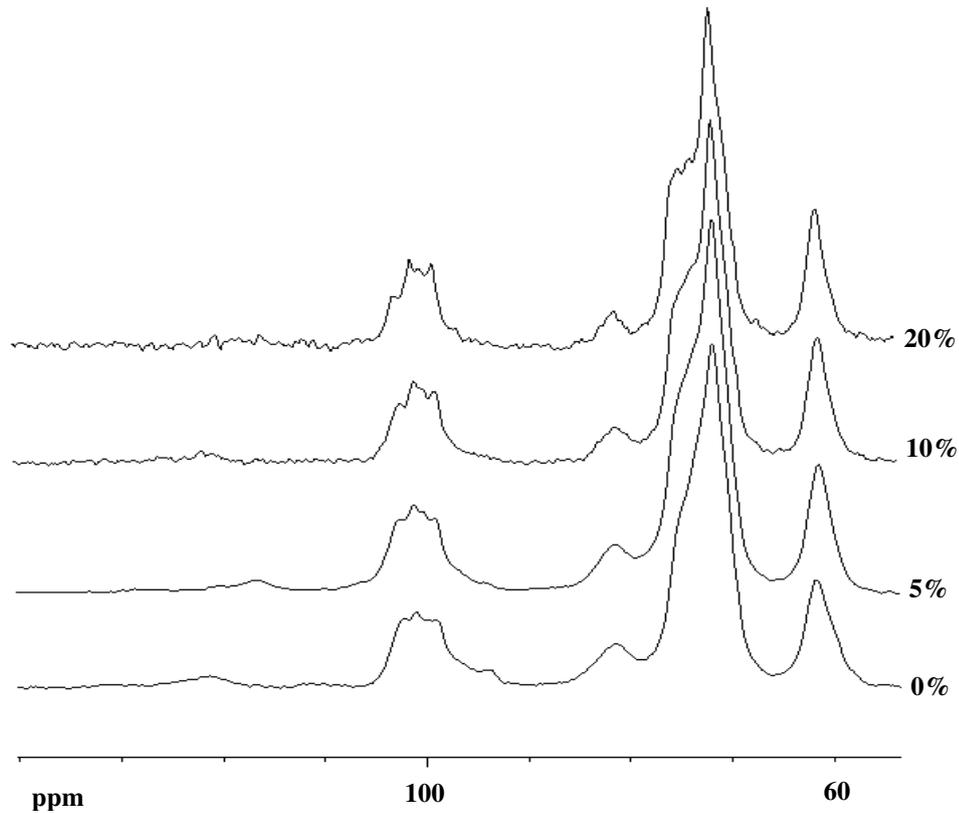


Figura 3.15 – Espectro de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  do amido com 0, 5, 10 e 20% de hidratação, à temperatura ambiente (LB=20, NS=400).

A hidratação das amostras de amido a 5, 10 e 20% de humidade (m/m) conduziu a diminuição da resolução dos espectros, resultado da plasticização da água. Observa-se uma variação no perfil do sinal do carbono 1 (banda situada pelos 100 ppm) que reflecte alterações na distribuição de conformações predominantes. É também de salientar, a diminuição da razão sinal/ruído à medida que o nível de hidratação aumenta, o que indica um aumento de mobilidade no sistema que, por sua vez, diminui a eficácia do processo de polarização cruzada. Pelos 75 ppm, surge com a hidratação um pico, parcialmente resolvido, atribuído à ressonância do carbono  $\text{C}_3$ , que é sinal característico da conformação V do amido. Estando a conformação V associada à conformação helicoidal simples das

cadeias de amilose, este resultado parece mostrar que a hidratação do amido induz a uma conformação em hélice das cadeias de amilose (Morgan 1995).

Comparando estes efeitos com os que se observaram para a glucose monohidratada (figura 3.7), denota-se que esta é mais estável que o amido quando submetida às mesmas condições. No entanto, em ambos os casos se verifica uma diminuição da razão sinal/ruído devido ao aumento de mobilidade e também se evidenciam alterações a nível da zona dos carbonos 3 e 4 o que poderá ser devido a alteração da conformação do anel de glucose.

### **3.4.3 O efeito do aquecimento – arrefecimento**

O comportamento do amido durante o tratamento térmico foi seguido através da aquisição de espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  a várias temperaturas, na gama 20-80-20°C, para 0, 10 e 20% de humidade. As condições foram as mesmas que as usadas para as amostras de glucose, no entanto, para o amido, submeteram-se a este ciclo térmico não apenas amostras com 0% de humidade, como também amostras com diferentes estados de hidratação. Pretende-se observar se há ou não alterações conformacionais e/ou dinâmicas que possam indicar mudanças na organização molecular do mesmo. Não são apresentados os espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  para 0% de humidade pois não se verificou qualquer alteração significativa, além de serem resultados muito semelhantes aos obtidos para 10% de humidade. A ausência de variações nos espectros para 0% de humidade deve-se ao facto de não haver alterações significativas a nível molecular no amido na ausência de água, pois para ocorrer gelatinização, que é um dos processos que mais efeitos provoca na estrutura e dinâmica do amido, terá de existir água em elevada percentagem. A figura 3.16 é referente ao conjunto de espectros de 10% de humidade e a figura 3.17 refere-se a 20% de humidade.

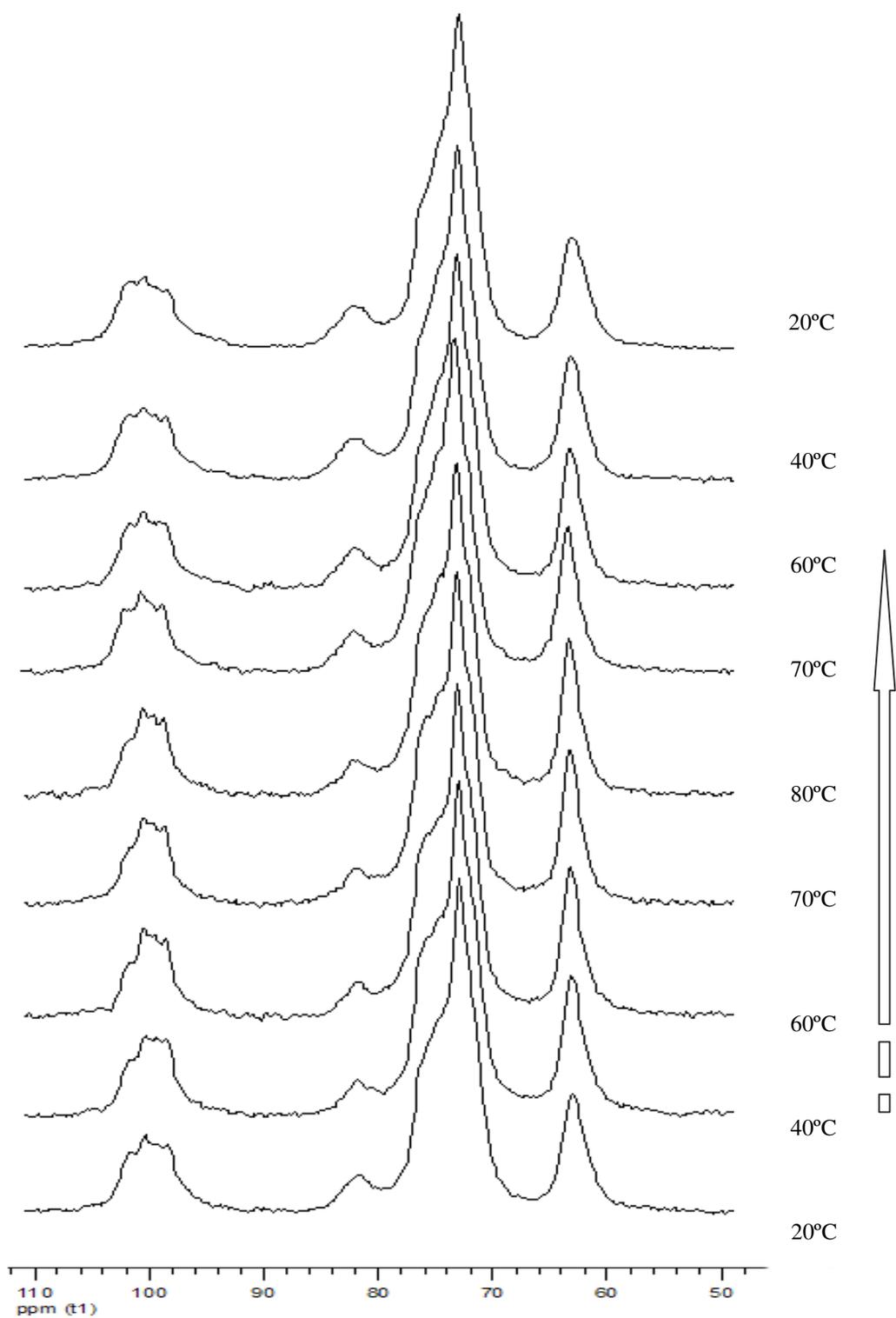


Figura 3.16 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  do amido a 10% de humidade, para diferentes temperaturas (LB=20, NS=300).

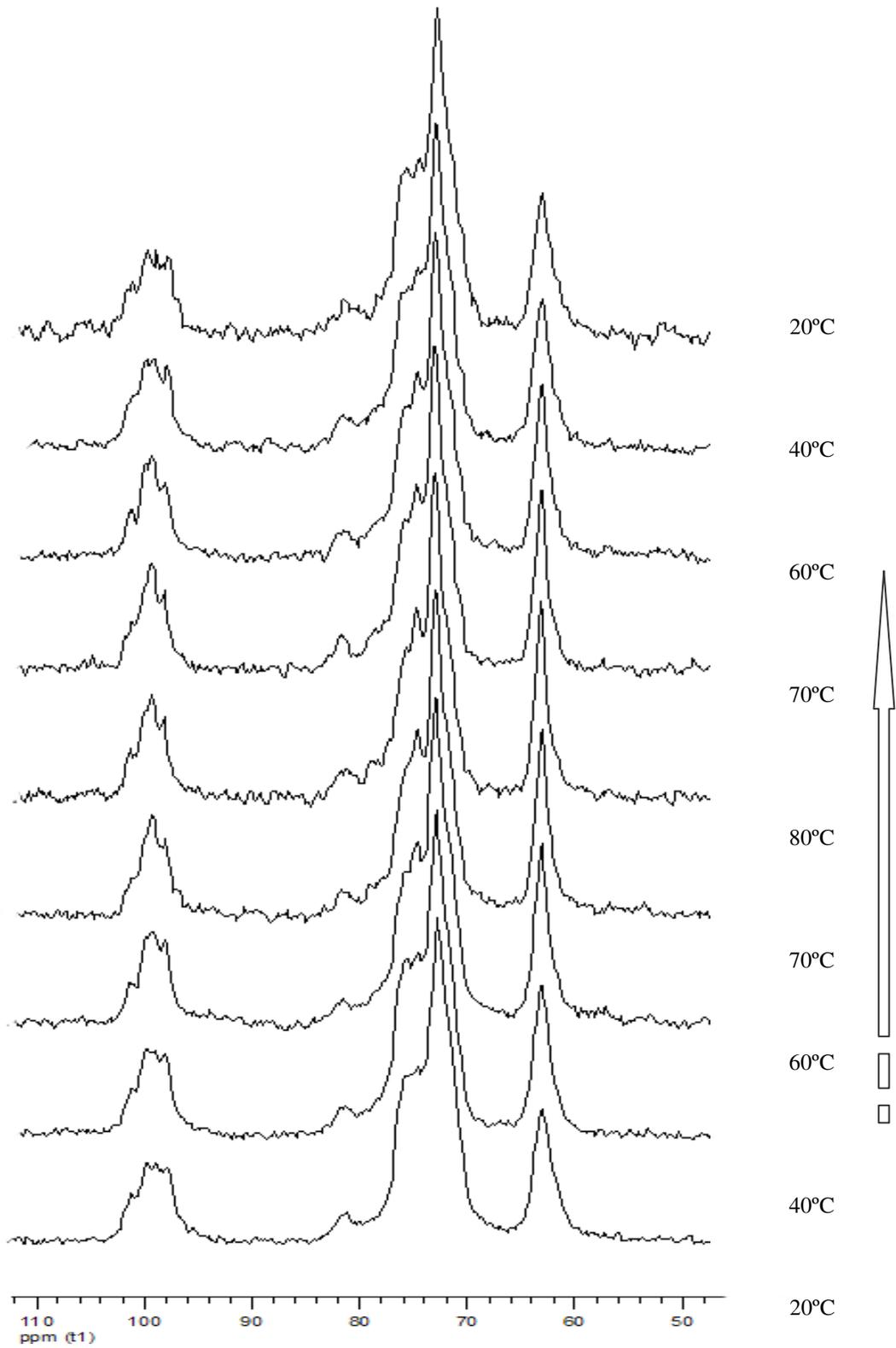


Figura 3.17 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  do amido a 20% de humidade, para diferentes temperaturas (LB=20, NS=300).

O efeito do aquecimento – arrefecimento no espectro de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$  do amido com 10% de humidade (figura 3.16), reflecte-se essencialmente ao nível do perfil da banda de  $\text{C}_1$  a  $\sim 102$  ppm. Esta banda mostra um pico mais afilado para 60, 70 e 80°C, voltando, aproximadamente, ao aspecto inicial com o arrefecimento. Isto deve-se a alteração da distribuição de conformações predominantes, sendo este efeito aparentemente reversível. O sinal a  $\sim 61.5$  ppm ( $\text{C}_6$ ) torna-se também levemente mais afilado, com o aquecimento, mas retoma o aspecto inicial com o arrefecimento. Ou seja, com o aquecimento há sugestão de alguma organização molecular em torno de  $\text{C}_6$ , que com o arrefecimento regressa ao estado inicial.

Analisando agora os espectros obtidos para o amido com 20% de humidade (figura 3.17), verifica-se que a banda entre 95 – 105 ppm e picos a 72 – 74 ppm, se alteram mais acentuadamente ao longo do tratamento térmico, e de novo, de uma forma reversível. De uma forma geral, há uma ligeira diminuição da razão sinal/ruído em todo o espectro depois de realizado o ciclo de temperaturas evidenciando perda de rigidez do sistema. Isto significa que parte do sinal se perde devido a parte do sistema se tornar demasiado móvel para o processo de polarização cruzada ocorrer com eficácia. O amido estará gelificado ou parcialmente gelificado. Esta maior mobilidade é notada apenas a 20% e não para 10% de hidratação.

Para avaliar o efeito do tratamento térmico a nível da dinâmica do sistema em estudo, calcularam-se os tempos de relaxação  $T_{\text{CH}}$ ,  $T_{1\rho\text{H}}$ ,  $T_{1\text{C}}$ ,  $T_{1\text{H}}$  e  $T_{2\text{H}}$ , registados antes do início do tratamento e no final do mesmo (tabela 3.6). Note-se que estes parâmetros descrevem apenas a parte do amido que se mantém mais rígida e, portanto, visível nos espectros de CP/MAS.

Tabela 3.6 – Tempos de relaxação  $T_{\text{CH}}$ ,  $T_{1\rho\text{H}}$ ,  $T_{1\text{C}}$ ,  $T_{1\text{H}}$  e  $T_{2\text{H}}$  do amido, antes e depois de aquecimento a temperaturas variáveis, para 10% e 20% de hidratação, à temperatura ambiente.

Antes do aquecimento - arrefecimento					
$\delta$ (ppm)	10% Hidratação				
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1pH}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
99,85	n.d.	n.d.	13,1 $\pm$ 3,9	0,614 $\pm$ 0,021	12,4 $\pm$ 0,4
81,84	n.d.	n.d.	n.d.	0,581 $\pm$ 0,049	16,1 $\pm$ 1,2
72,45	n.d.	0,0403 $\pm$ 0,008	8,10 $\pm$ 0,73	0,644 $\pm$ 0,004	13,6 $\pm$ 0,4
61,49	n.d.	0,0322 $\pm$ 0,006	0,880 $\pm$ 0,127	0,606 $\pm$ 0,017	13,2 $\pm$ 0,5
	20% Hidratação				
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1pH}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
100,73	0,0478 $\pm$ 0,0072	6,50 $\pm$ 1,02	n.d.	0,625 $\pm$ 0,029	13,8 $\pm$ 0,7
74,70	n.d.	n.d.	n.d.	0,616 $\pm$ 0,016	13,9 $\pm$ 0,5
72,16	0,0565 $\pm$ 0,0057	5,98 $\pm$ 0,51	7,38 $\pm$ 0,36	0,638 $\pm$ 0,009	14,1 $\pm$ 0,3
61,59	n.d.	n.d.	0,872 $\pm$ 0,269	0,623 $\pm$ 0,030	13,1 $\pm$ 0,5
Depois do aquecimento - arrefecimento					
$\delta$ (ppm)	10% Hidratação				
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1pH}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
101,89	0,0687 $\pm$ 0,0106	16,6 $\pm$ 13,6	n.d.	0,888 $\pm$ 0,024	12,8 $\pm$ 0,5
81,53	n.d.	n.d.	n.d.	0,818 $\pm$ 0,054	15,1 $\pm$ 0,8
72,14	0,0850 $\pm$ 0,0130	6,77 $\pm$ 0,75	10,0 $\pm$ 0,9	0,823 $\pm$ 0,003	12,6 $\pm$ 0,3
61,58	0,0654 $\pm$ 0,0080	7,28 $\pm$ 0,80	2,56 $\pm$ 0,22	0,790 $\pm$ 0,015	12,5 $\pm$ 0,4
	20% Hidratação				
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1pH}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
100,31	n.d.	n.d.	n.d.	0,697 $\pm$ 0,012	14,2 $\pm$ 1,3
75,26	n.d.	n.d.	n.d.	0,702 $\pm$ 0,015	15,4 $\pm$ 0,8
71,75	0,109 $\pm$ 0,048	3,09 $\pm$ 1,77	8,22 $\pm$ 1,08	0,735 $\pm$ 0,017	14,0 $\pm$ 0,4
61,77	0,0553 $\pm$ 0,0115	6,89 $\pm$ 3,02	n.d.	0,698 $\pm$ 0,019	14,7 $\pm$ 0,7

Muitos dos valores de tempo de relaxação  $T_{CH}$  não foram determinados devido ao elevado ruído que se fez notar nos espectros. Serão discutidos os valores de  $T_{CH}$  apenas dos picos a 72,16 ppm e 71,75 ppm, do amido com 20% de hidratação (antes e depois do ciclo de temperaturas, respectivamente). Para estes picos, verifica-se então, um aumento do  $T_{CH}$  (de 0,0565 para 0,109 ms) depois de realizado o tratamento térmico, o que poderá relacionar-se com a distribuição da água no sistema, por acção do aquecimento – arrefecimento.

Quanto aos valores de  $T_{1pH}$ , para 10% de humidade, há um aumento após o ciclo de temperatura indicando uma diminuição de mobilidade lenta, para a porção do sistema visível em CP/MAS. Quanto ao nível de humidade de 20% além de só haver um único pico para comparação, o respectivo valor de  $T_{1pH}$ , está com um erro associado muito elevado, não podendo se tido em conta.

Quanto ao tempo  $T_{1C}$ , para 10% de humidade, depois do ciclo térmico, verifica-se um aumento dos valores (passam de 0,880 – 8,09 s para 2,56 – 10,0 s). Ou seja, há uma diminuição da mobilidade na ordem das centenas de MHz – movimentos rápidos, sendo o carbono 6 o mais afectado a nível de mobilidade. A mesma tendência reproduz-se para 20% de humidade. Os resultados de  $T_{1H}$  vão de encontro aos obtidos para o  $T_{1C}$ , confirmando-os. Para ambas as hidratações, assiste-se a um aumento do  $T_{1H}$ , depois de aplicado o ciclo de temperaturas, embora mais significativo para 10% de humidade do que para 20%. Isto significa que a porção do amido que se mantém mais rígida (e visível em CP/MAS) se torna ainda mais rígida após aquecimento – arrefecimento, o que poderá reflectir algum aumento de cristalinidade. Este efeito é menos acentuado quando há mais água presente.

Apesar destas observações, o  $T_{2H}$  não é sensível às mesmas, não indicando diferenças significativas após o aquecimento/arrefecimento.

### ***3.5 Caracterização de uma farinha de baixa dureza por RMN do estado sólido***

Neste capítulo, a amostra passa a ser um sistema bem mais complexo que os anteriores. Trata-se da farinha Amazonas, da qual foi analisado, anteriormente, o respectivo amido. A análise da farinha será conduzida da mesma forma que para o amido, para comparar o comportamento, dinâmica e estrutura com os sistemas mais simples, já estudados.

Note-se que pequenas diferenças que se observem entre amido e farinha poderão ser devidas às pequenas diferenças de humidade entre estas duas amostras (na ordem dos 1-2% m/m).

#### **3.5.1 Espectros de CP/MAS de $^{13}\text{C}$ e tempos de relaxação de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$**

Analisou-se por RMN de  $^{13}\text{C}$  a farinha da variedade Amazonas, no estado seco, à temperatura ambiente, e o respectivo espectro está representado abaixo, figura 3.18.

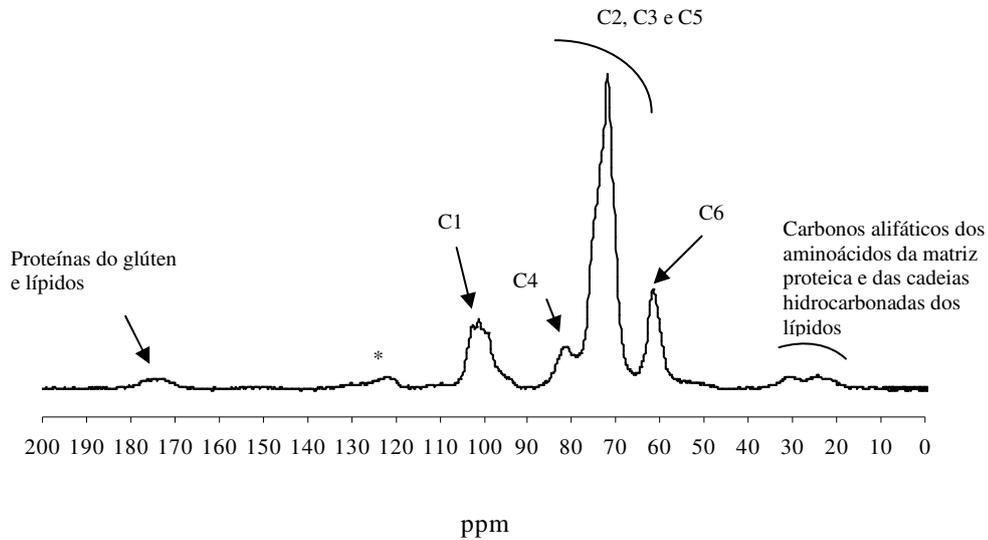


Figura 3.18 – Espectro de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da farinha anidra, à temperatura ambiente ( $LB=20$ ,  $NS=400$ ).

\* Banda lateral de rotação

As principais atribuições da farinha foram realizadas mais uma vez tendo em conta referências de investigações anteriores (Morgan 1995; Larsson 1997; Santos 2005). O espectro de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$  da amostra apresenta mais intensamente o componente maioritário da farinha, o amido. Daí que para além das atribuições já realizadas para o amido: 101.2 ppm,  $C_1$  glucose; 81.7 ppm,  $C_4$  glucose; 78.0 – 66.0 ppm,  $C_2$ ,  $C_3$  e  $C_5$  glucose e 61.5 ppm,  $C_6$  glucose, apenas se acrescentam alguns novos sinais. São estes: a banda que surge entre 167.0 – 181.2 ppm que deriva das proteínas do glúten e lípidos e as bandas de centros a 31 e 24 ppm, que são derivados da ressonância dos carbonos alifáticos da maioria dos aminoácidos constituintes da matriz proteica e das cadeias hidrocarbonadas dos lípidos.

Realizaram-se ensaios dinâmicos de RMN de forma a determinar os tempos de relaxação  $T_{\text{CH}}$ ,  $T_{1\rho\text{H}}$ ,  $T_{1\text{C}}$ ,  $T_{1\text{H}}$ , e  $T_{2\text{H}}$  para a farinha em estudo no estado anidro á temperatura ambiente e os respectivos resultados estão apresentados na tabela 3.7. Estão também representados, novamente, os tempos referentes ao amido, para facilitar a análise por parte do leitor. Para os tempos de relaxação  $T_{\text{CH}}$ ,  $T_{1\rho\text{H}}$  e  $T_{1\text{C}}$  não foi possível determinar alguns valores devido ao facto da razão sinal/ruído ser demasiado baixa.

Tabela 3.7 – Tempos de relaxação  $T_{CH}$ ,  $T_{1\rho H}$ ,  $T_{1C}$ ,  $T_{1H}$ , e  $T_{2H}$  da farinha e do amido, anidros, à temperatura ambiente.

$\delta$ (ppm)	Farinha				
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1\rho H}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
101.43	n.d.	n.d.	$4,94 \pm 0,477$	$0,941 \pm 0,0267$	$10,4 \pm 0,365$
81.92	n.d.	n.d.	n.d.	$0,968 \pm 0,0314$	$11,2 \pm 0,687$
72.27	$0,0664 \pm 0,0135$	$6,62 \pm 0,909$	$11,7 \pm 0,681$	$0,951 \pm 0,00390$	$10,5 \pm 0,426$
62.28	$0,0461 \pm 0,00848$	$7,62 \pm 1,11$	$3,77 \pm 0,639$	$0,920 \pm 0,0127$	$10,5 \pm 0,464$
	Amido				
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1\rho H}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
101.23	n.d.	$0,0261 \pm 0,00872$	$5,70 \pm 2,94$	$1,18 \pm 0,0618$	$12,1 \pm 0,367$
81.66	$0,0408 \pm 0,0106$	$5,12 \pm 1,95$	n.d.	$1,20 \pm 0,0518$	$13,0 \pm 0,509$
72.07	$0,0478 \pm 0,00974$	$4,42 \pm 0,616$	$13,6 \pm 0,652$	$1,20 \pm 0,00712$	$11,8 \pm 0,289$
61.90	$0,0330 \pm 0,00498$	$6,24 \pm 1,40$	$1,53 \pm 0,238$	$1,17 \pm 0,0297$	$11,7 \pm 0,317$

Observando os valores de  $T_{CH}$  da farinha, verifica-se que a diferença destes valores é muito pouco significativa. Poderá estar apenas relacionada com diferente hidratação entre as duas amostras, a nível de 1 – 2% de diferença de humidade. Quanto ao  $T_{1\rho H}$ , os valores da farinha (entre 6.62 – 7.61 ms) são ligeiramente mais elevados do que os referentes ao amido (na ordem dos 4.41 – 6.24 ms), ou seja verifica-se uma maior mobilidade em termos de movimentos lentos no amido em relação à farinha. Os valores de  $T_{1C}$  e  $T_{1H}$  da farinha são semelhantes aos apresentados pelo amido, apenas se observando uma muito ligeira tendência para valores mais baixos para a farinha em relação ao amido. Quanto aos valores de  $T_{2H}$ , como os valores apresentados pela farinha (entre 10.4 – 11.3  $\mu$ s) são levemente inferiores aos do amido (11.7 – 12.9  $\mu$ s), verificou-se maior mobilidade geral no amido relativamente à farinha. Em suma, com o aumento da complexidade do sistema, verificou-se alguma diminuição da mobilidade geral do sistema.

### 3.5.2 O efeito da hidratação

O efeito da hidratação na farinha ao nível dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi analisado através da aquisição de espectros de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$  de amostras de farinha Amazonas, hidratadas numa gama de 0 a 20% de água m/m, figura 3.19.

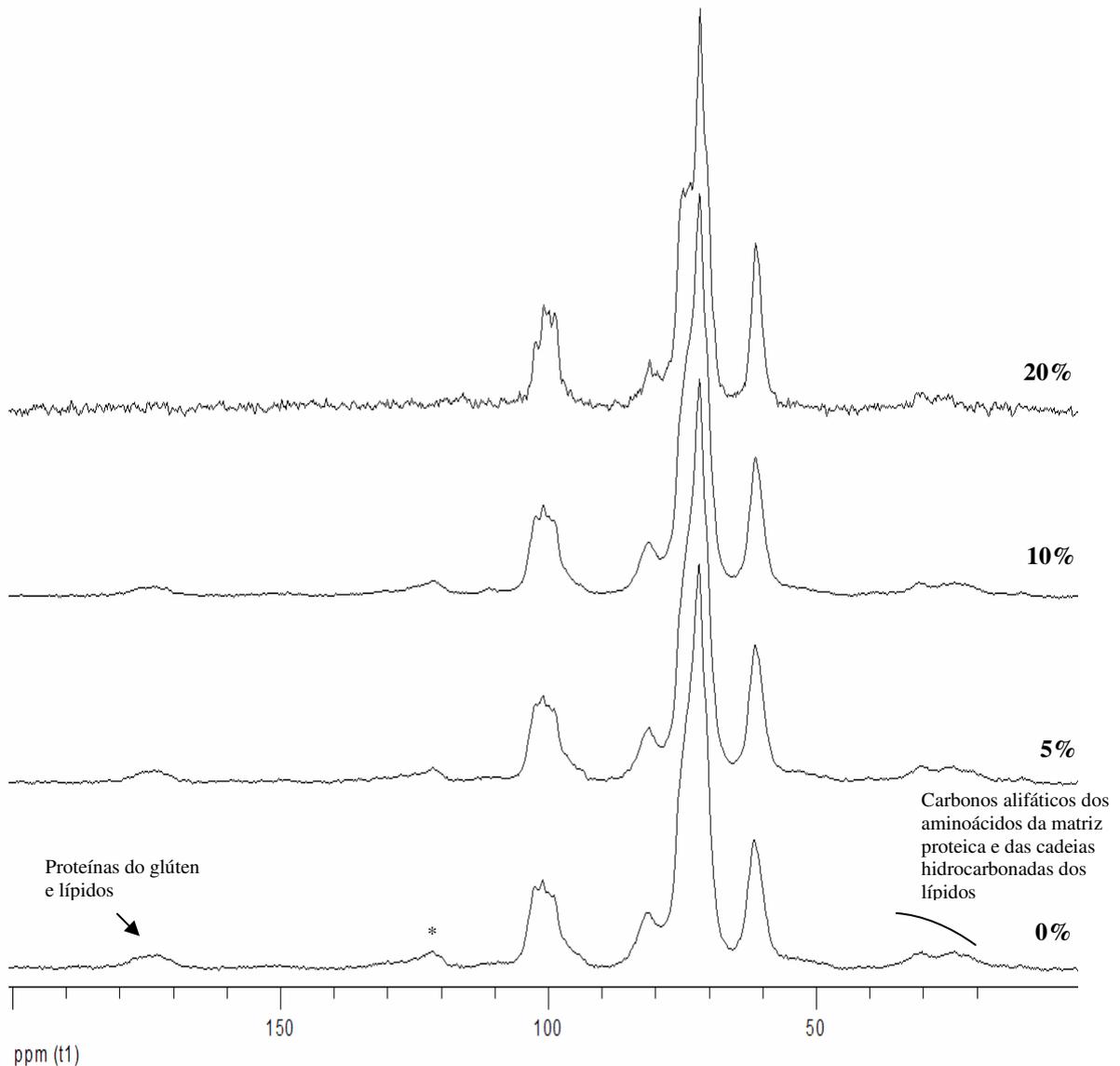


Figura 3.19 – Espectro de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da farinha com 0,5,10 e 20% de hidratação, à temperatura ambiente (LB=20, NS=400). \* Banda lateral de rotação.

A hidratação das amostras de farinha a 5, 10 e 20% de humidade (m/m) conduziu a ligeiras alterações de perfil, bem como alteração da resolução dos espectros e da razão sinal/ruído. Na banda entre 95 e 105 ppm (sinal do C<sub>1</sub>) assiste-se a uma variação do seu perfil ao longo da hidratação como resultado de uma diferente organização molecular promovida pela hidratação. A resolução do espectro aumenta com o aumento de hidratação o que mostra que o sistema se tornou mais cristalino (aumento de organização do sistema). As bandas relativas às proteínas e lípidos vão lentamente desaparecendo com o aumento dos níveis de hidratação, permanecendo apenas visível a banda entre 20 e 35 ppm no último nível de hidratação. Isto indica que estes componentes da farinha se tornam de tal modo móveis, que deixa de ser possível haver polarização cruzada, desaparecendo os sinais no espectro. Denota-se um elevado aumento do ruído para 20% de humidade, sugerindo um aumento de mobilidade em parte do sistema (visível no espectro de CP/MAS), e assim o sistema tem mais dificuldade em fazer a polarização cruzada, tal como o observado no amido.

### **3.5.3 O efeito do aquecimento – arrefecimento**

O comportamento da farinha durante o tratamento térmico foi seguido através da aquisição de espectros de CP/MAS de <sup>13</sup>C para várias temperaturas, na gama 20 – 80 – 20°C, para uma amostra de farinha a 10% e outra a 20% de humidade. Para 0% de humidade não se verificou nenhuma alteração nos espectros adquiridos e por isso esses resultados não são apresentados, tal como se estaria à espera, face aos resultados obtidos para o amido, nas mesmas condições. De seguida, apresenta-se o conjunto de espectros para as várias temperaturas, às quais as duas amostras de farinha, com 10% e 20% de humidade, foram submetidas, figuras 3.20 e 3.21, respectivamente.

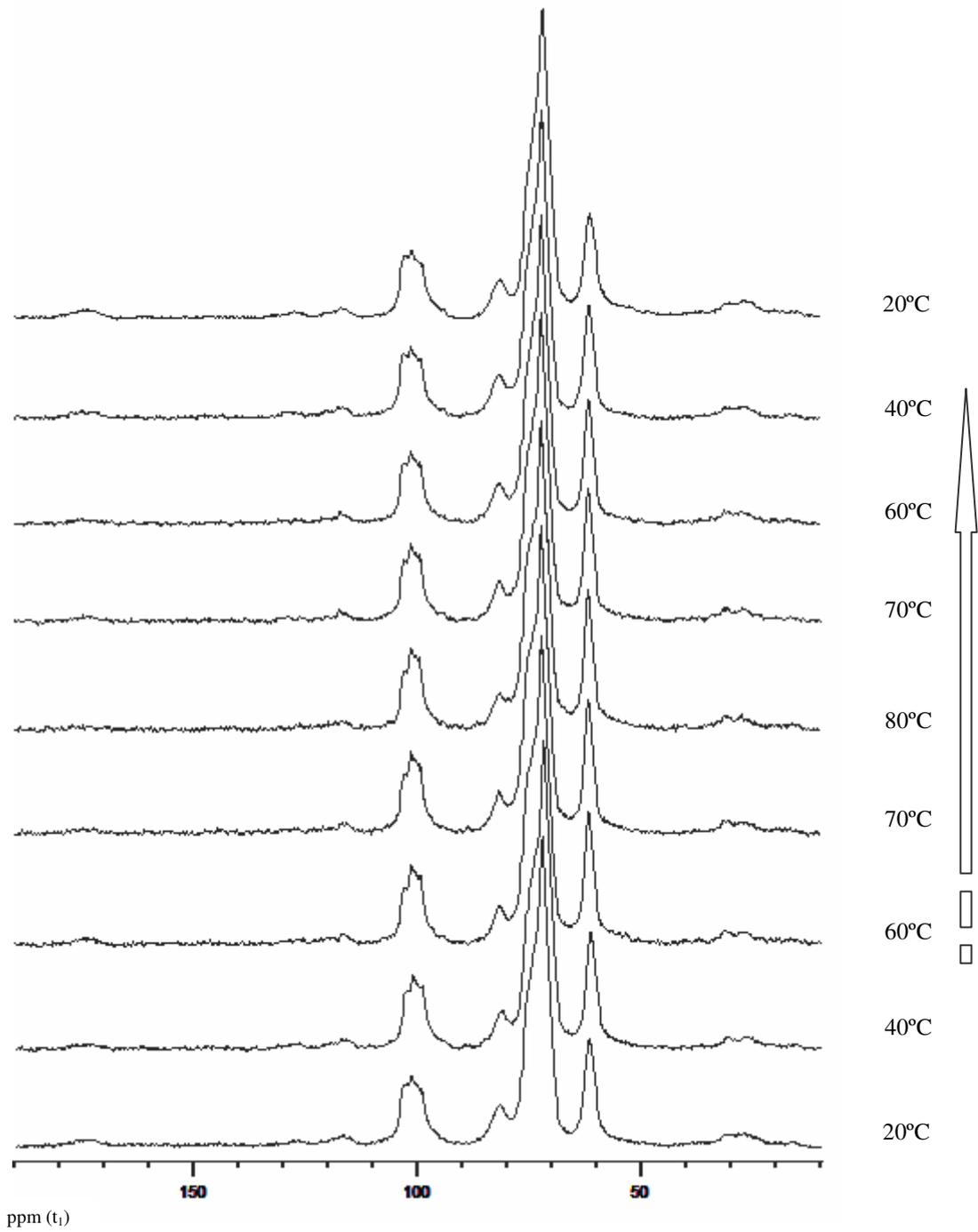


Figura 3.20 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da Farinha 10% de humidade, para diferentes temperaturas (LB=20, NS=300).

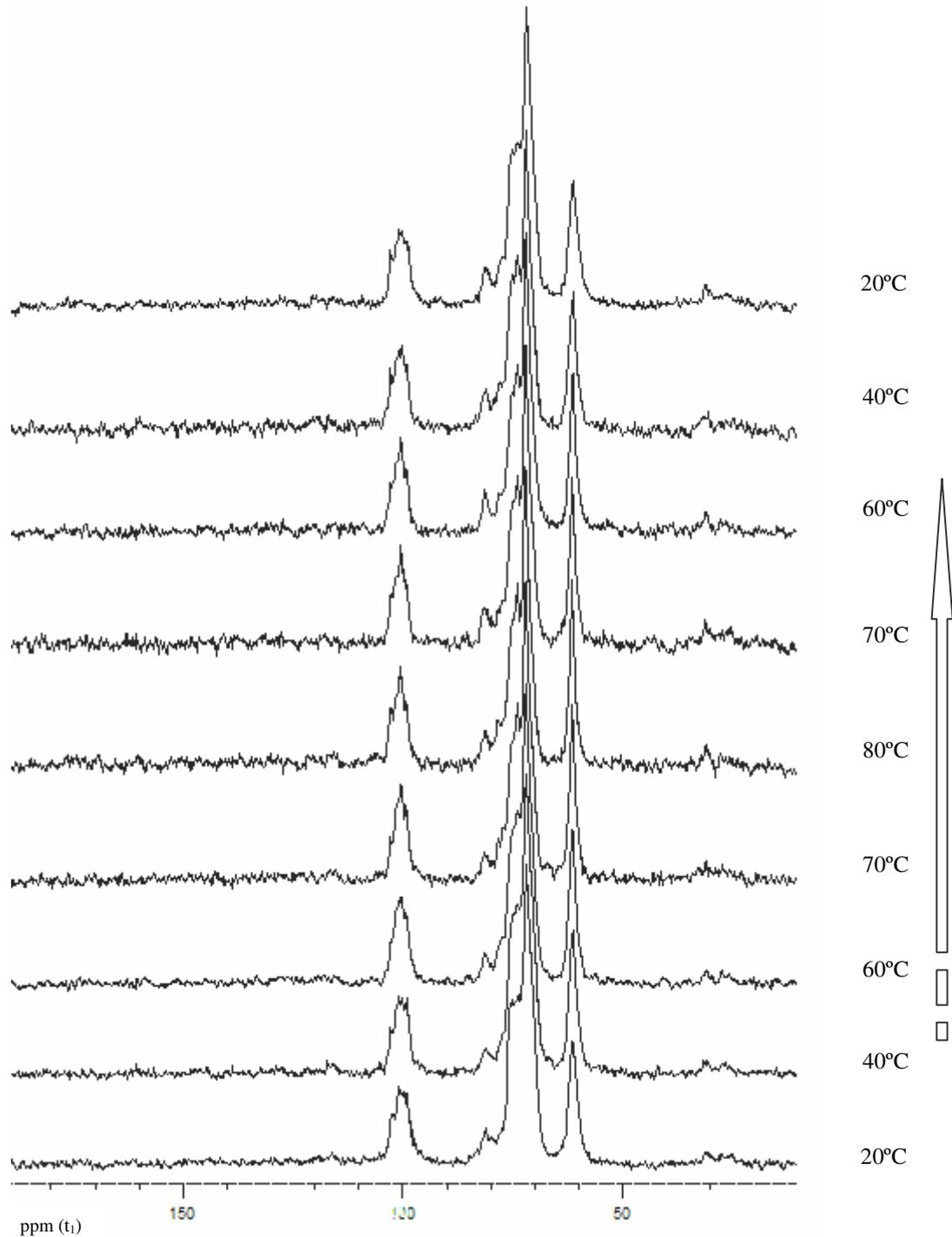


Figura 3.21 – Espectros de CP/MAS  $^{13}\text{C}$  da Farinha 20% de humidade, para diferentes temperaturas (LB=20, NS=300).

Para 10% de humidade (figura 3.20) verificam-se algumas alterações a nível do perfil dos sinais, bem como da intensidade dos mesmos, tal qual verificadas na experiência com o

amido. A única diferença é que durante o aquecimento, as ténues bandas referentes a proteínas do glúten e lípidos (~ 167 – 182 ppm) desaparecem no ruído mas, voltam a surgir durante o arrefecimento.

Relativamente à farinha com 20% de humidade (figura 3.21) observam-se alterações bastante semelhantes às observadas para 10% de humidade, mas mais intensas, e semelhantes também às observadas para o amido a 20% de humidade.

Em suma, para ambas as hidratações, o ciclo térmico, provoca transformações que se revelam quase todas reversíveis, visto que com o arrefecimento da amostra, todos os sinais, retomam o aspecto inicial. O que se conclui para ambas as amostras (10% e 20%, embora esta última em maior extensão) é que o afilamento de alguns picos e aumento de intensidades, durante o aquecimento, indicam maior organização molecular, ou seja, o aumento de temperatura está a fazer com que um número mais restrito de conformações seja adoptado levando ao efeito em  $C_1$  e ao aumento de resolução no espectro.

Entre o amido e a farinha, as alterações que ocorrem durante o ciclo térmico são bastante semelhantes, o que era de esperar visto o amido ser o constituinte maioritário da farinha. O aumento da complexidade do sistema não tem um papel fundamental nos espectros que ocorrem nas duas amostras, durante o aumento e arrefecimento destas. Apenas com base nos espectros não há evidência de gelatinização ou retrogradação, no entanto, podem ocorrer alterações irreversíveis ao nível dinâmico que, nesse caso, serão indicativas de início de gelatinização ou retrogradação mas a extensões muito baixas. Para isso foi estudado o efeito do tratamento térmico na dinâmica molecular da farinha através dos tempos de relaxação  $T_{CH}$ ,  $T_{1pH}$ ,  $T_{1C}$ ,  $T_{1H}$  e  $T_{2H}$ , registados nas temperaturas extremas, antes e depois do ciclo térmico (tabela 3.8).

Tabela 3.8 – Tempos de relaxação  $T_{CH}$ ,  $T_{1pH}$ ,  $T_{1C}$ ,  $T_{1H}$  e  $T_{2H}$  da farinha, antes e depois de aquecimento a temperaturas variáveis, para 10% e 20% de hidratação, à temperatura ambiente.

Antes de aquecimento - arrefecimento					
$\delta$ (ppm)	10% Hidratação				
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1pH}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
101.51	$0,0882 \pm 0,0105$	$12,3 \pm 5,16$	n.d.	$0,720 \pm 0,0194$	$12,6 \pm 0,644$
81.92	n.d.	n.d.	n.d.	$0,715 \pm 0,0214$	$13,7 \pm 0,578$
72.13	$0,0721 \pm 0,0119$	$6,54 \pm 0,762$	$10,2 \pm 0,820$	$0,758 \pm 0,00430$	$12,8 \pm 0,361$
61.57	$0,0473 \pm 0,00645$	$6,96 \pm 0,760$	$2,13 \pm 0,405$	$0,756 \pm 0,0145$	$12,8 \pm 0,326$
20% Hidratação					
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1pH}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
100.53	n.d.	n.d.	n.d.	$0,569 \pm 0,0412$	$13,5 \pm 1,12$
75.29	n.d.	n.d.	n.d.	$0,549 \pm 0,0138$	$13,0 \pm 0,513$
72.35	$0,515 \pm 0,0737$	$12,5 \pm 1,69$	$3,91 \pm 0,876$	$0,543 \pm 0,00894$	$13,4 \pm 0,548$
61.57	$0,271 \pm 0,0524$	$10,9 \pm 1,66$	$1,15 \pm 0,218$	$0,536 \pm 0,0247$	$12,9 \pm 0,676$
Depois de aquecimento - arrefecimento					
$\delta$ (ppm)	10% Hidratação				
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1pH}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
101.51	$0,0698 \pm 0,0119$	$7,07 \pm 1,47$	n.d.	$0,893 \pm 0,0296$	$12,7 \pm 0,567$
81.92	n.d.	n.d.	n.d.	$0,869 \pm 0,0297$	$13,4 \pm 0,444$
72.13	$0,0686 \pm 0,0111$	$5,54 \pm 0,643$	$10,6 \pm 0,767$	$0,877 \pm 0,00154$	$12,5 \pm 0,336$
61.57	$0,0475 \pm 0,00617$	$6,29 \pm 0,837$	$3,58 \pm 0,386$	$0,869 \pm 0,0170$	$12,2 \pm 0,300$
20% Hidratação					
	$T_{CH}$ (ms)	$T_{1pH}$ (ms)	$T_{1C}$ (s)	$T_{1H}$ (s)	$T_{2H}$ ( $\mu$ s)
101.51	n.d.	n.d.	n.d.	$0,511 \pm 0,0418$	$15,8 \pm 0,967$
81.92	n.d.	n.d.	n.d.	$0,607 \pm 0,143$	$15,4 \pm 2,31$
72.13	$0,0643 \pm 0,0127$	$7,54 \pm 1,82$	$5,65 \pm 1,04$	$0,562 \pm 0,00972$	$15,0 \pm 0,608$
61.57	n.d.	n.d.	n.d.	$0,525 \pm 0,0216$	$15,2 \pm 0,771$

Os erros associados aos tempos  $T_{CH}$ ,  $T_{1pH}$  e  $T_{1C}$  são muito elevados (para a maioria dos sinais), em alguns casos os erros são muito superiores a 10% do valor calculado. De qualquer forma serão na mesma discutidos esses resultados mas de uma forma breve, apenas como referência.

Na amostra com 10% de humidade, os valores de  $T_{CH}$ , antes e depois do ciclo são semelhantes. Quanto à amostra com 20% de humidade, observa-se uma tendência para o  $T_{CH}$  diminuir. Então com o aquecimento/arrefecimento, os prótons passam a necessitar de menos tempo para transferir magnetização aos carbonos, e ainda se pode concluir, que parte do sistema que se mantém visível em CP/MAS ficou mais rígido, tal como verificado para o amido.

Quanto ao tempo  $T_{1\rho H}$ , na farinha com 10% de humidade, regista-se uma ligeira tendência para a diminuição dos valores após o aquecimento/arrefecimento, assim como a 20%. Assim, nesta farinha, após o ciclo térmico, passa a existir mais mobilidade da ordem das dezenas de kHz – movimentos lentos, ao contrário do evidenciado no amido.

Para 10% e 20% de hidratação, os valores de  $T_{1C}$  aumentam depois do ciclo térmico, tal como verificado para o amido. Os valores de  $T_{1H}$  estão de acordo com os resultados de  $T_{1C}$ . Embora para 20% de humidade, não se verificam alterações significativas, entre os valores antes e após o ciclo térmico. Os valores são muito idênticos entre si, o que é indicador de existir boa difusão de spin.

O  $T_{2H}$  para a farinha com 10% de humidade, não revela alterações significativas após o aquecimento/arrefecimento. Para a farinha de 20% de humidade já se verifica um aumento da mobilidade geral, que não se observou no amido, ou seja, há predominância dos movimentos rápidos. Isto poderá ser indicador de estar a ocorrer gelatinização em baixa extensão.

### **3.6 Comparação sumária dos sistemas glucose, amido e farinha**

Para facilitar a compreensão do capítulo 3, será de seguida realizado um sumário comparativo entre os três sistemas estudados, glucose, amido e farinha. As alterações mais drásticas observam-se entre a glucose e o amido, observando-se poucas diferenças entre este e a farinha, como seria já de esperar.

No estado seco, dentro do sistema simples da glucose, a análise dos perfis espectroscópicos mostrou que a glucose monohidratada e liofilizada têm características de certa forma intermédias às formas anoméricas  $\alpha$  e  $\beta$ . Tanto para a glucose monohidratada como na forma liofilizada, o ambiente  $C_1$  assemelha-se ao da forma  $\alpha$ , bem como a maioria dos restantes sinais, excepto o  $C_6$ . O ambiente deste carbono assemelha-se ao da forma  $\beta$ , sugerindo existência de uma pequena quantidade deste anómero no estado amorfo. Em contrapartida, na forma vítrea as glucoses  $\alpha$  e  $\beta$  estão em proporções idênticas, cerca de 50:50.

A nível dinâmico, as formas amorfas têm maior mobilidade rápida como lenta (grupos terminais e anel, respectivamente) do que as formas cristalinas.

Ainda considerando o estado seco, com o aumento de complexidade do sistema, verifica-se aumento da mobilidade de grupos terminais (da glucose para o amido e deste para a farinha) e mobilidade geral (da glucose para o amido). Do amido para a farinha, assiste-se a uma ligeira diminuição da mobilidade geral (mas continuando esta a ser superior à da glucose), indicando uma maior rigidez do empacotamento molecular na farinha.

No estado hidratado, a glucose- $\alpha$  é a forma de glucose que se apresenta mais instável à hidratação na gama estudada (1 – 10% m/m). Com a hidratação assiste-se a um aumento de rigidez da forma  $\alpha$ , com o aumento do grau de hidratação, o que se poderá dever a formação de ligações do tipo pontes de hidrogénio. Esta forma parece adquirir características estruturais e dinâmicas semelhantes à da glucose monohidratada. A glucose- $\beta$  embora apresente um perfil espectral semelhante ao da glucose monohidratada a 10% de humidade, a nível dinâmico não parece apresentar alterações significativas com a

hidratação. A glucose monohidratada apresenta aumento da mobilidade geral, e que passando a sistemas mais complexos, o amido e a farinha, essa mobilidade parece aumentar mais.

Relativamente ao ciclo de aquecimento/arrefecimento, observa-se que a glucose monohidratada sofre mais efeitos da acção deste ciclo térmico que as restantes formas de glucose. No final do ciclo, a glucose monohidratada parece ter-se transformado numa forma semelhante à da glucose- $\alpha$ . Mesmo a nível dinâmico, os valores apresentados após o ciclo térmico, aproximam-se dos referentes à forma  $\alpha$ . Por sua vez, as formas  $\alpha$  e  $\beta$  apresentaram muita estabilidade nestas condições de temperatura, mesmo a nível dinâmico. Relativamente às formas amorfas, a glucose liofilizada sofre modificações semelhantes às ocorridas com a glucose monohidratada, após o ciclo térmico. Quanto à forma vítrea, esta apresenta uma reacção interessante com a variação de temperatura. Entre 60-80-60°C os sinais desaparecem no espectro de CP/MAS, observando-se a 80°C só ruído. Com a diminuição de temperatura todo o perfil inicial é retomado. Estas evidências fazem crer que ocorra transição vítrea, ou seja, do estado vidro, a glucose passa a estado “rubbery” e depois novamente a estado vidro. No estado “rubbery”, como há maior mobilidade, deixa de ocorrer polarização cruzada, conduzindo à perda integral de sinal, que só é retomado, com a diminuição de mobilidade com a passagem novamente a estado vidro. A nível dinâmico, após o ciclo térmico, observam-se alterações na mobilidade lenta. O aumento desta mobilidade poderá indicar que o estado vidro recuperado após a experiência, esta mais longe do estado “rubbery” do que no início do ciclo.

O aumento da complexidade do sistema mostrou fornecer maior estabilidade a alterações térmicas, para 0% de humidade. Mas fornecendo água (10% e 20% de m/m) ao amido e à farinha, o ciclo térmico passou a provocar alterações tanto a nível dinâmico como espectral. Entre 10 e 20% de humidade, é para o maior grau de humidade que se verificam as alterações mais intensas: observa-se uma diminuição da razão sinal/ruído depois do ciclo de temperatura, devido a parte do sistema se tornar demasiado móvel para o processo de polarização cruzada se realizar com eficácia, possivelmente devido ao amido gelificado ou parcialmente gelatinizado.

## **4 CONCLUSÕES FINAIS**

Na primeira parte desta dissertação foram estudados vários aspectos da qualidade de farinhas fazendo uso de técnicas de espectroscopia vibracional, por vezes aliada a métodos de análise multivariada, a fim de estudar a sua aplicabilidade para a análise rápida de farinhas.

Em primeiro lugar, estudaram-se conjuntos seleccionados de farinhas e glúten com a finalidade de caracterizar as conformações proteicas predominantes em cada um dos sistemas, tanto no estado seco como no estado hidratado. As alterações de conformação com a hidratação poderão estar relacionadas com a qualidade da massa, sabendo-se por exemplo que uma maior contribuição de estruturas em folha  $\beta$  se correlaciona com uma viscoelasticidade favorável à qualidade da panificação. Para este estudo, utilizaram-se técnicas de espectroscopia de FTIR e de Raman e os resultados obtidos permitiram identificar os tipos de conformações proteicas existentes nas amostras estudadas e as suas proporções relativas. Com a hidratação das farinhas e glúten, as principais alterações registadas relativamente ao estado seco foram a diminuição do número de estruturas “ $\beta$ -turn” e o aumento da contribuição da conformação em folha  $\beta$ . Além disso, verificou-se também um alargamento do intervalo espectral típico da amida II, o que reflecte a ocorrência de alterações conformacionais e a consequente alteração do sistema em termos de associações moleculares por ligações de hidrogénio.

Em segundo lugar, combinou-se a espectroscopia de FTIR com métodos de análise multivariada (PCA e PLS-DA) de forma a estudar a potencial identificação rápida de subgrupos de um conjunto de amostras de farinha, com base no seu grau de dureza, que se sabe estar relacionado com a textura do endosperma, em particular com as puroindolinas e com o poder de absorção de água. Os resultados obtidos possibilitaram a identificação de farinhas dos tipos extra-dura e extra-suave ou seja, amostras com durezas extremas, não sendo possível a distinção de amostras de dureza intermédias. Observou-se que as amostras de dureza extrema no estado seco se distinguem principalmente devido aos componentes proteínas e lípidos, possivelmente as puroindolinas, pelo seu relacionamento com os fosfolípidos das membranas dos grânulos de amido. Por seu lado, no estado hidratado é o

amido o principal componente nessa mesma distinção, pois a absorção de água é diferente consoante o tipo de dureza, implicando diferenças também estruturais. A qualidade desta separação depende da zona espectral analisada e do estado, seco ou hidratado, das amostras tendo os melhores resultados (na maioria) sido obtidos para as amostras no estado seco.

Ainda no âmbito da primeira parte desta dissertação, estudaram-se também farinhas com doença de “Karnel bunt” através dos respectivos espectros de FTIR e de Raman, com a intenção de tentar detectar alterações provocadas pelo fungo respectivo e, assim, investigar o potencial do método para detecção rápida da doença. A análise directa dos espectros indicou que a doença parece afectar as conformações predominantes das proteínas, provocando a diminuição relativa das estruturas em hélice  $\alpha$  e aumento das estruturas em folha  $\beta$ . Por aplicação de PCA aos espectros vibracionais das farinhas controlo e afectadas pela doença confirmou-se que os dois grupos são eficazmente separados em termos dos seus perfis espectrais, devendo-se tal separação tanto a alterações no perfil das proteínas como no dos hidratos de carbono. No entanto, as diferenças específicas verificadas parecem depender da variedade da farinha, sugerindo que o metabolismo do fungo responsável pela doença possa exibir algum grau de dependência para com a natureza/composição da amostra de farinha. Estes resultados preliminares sugerem a possível utilização do método de espectroscopia vibracional/PCA para detecção rápida de doenças em farinhas.

Na segunda parte desta dissertação estudaram-se a estrutura e dinâmica moleculares da glucose, amido e farinha, no estado seco, com o objectivo de comparar as características ao nível molecular destes sistemas em função da complexidade crescente dos mesmos. A técnica eleita para este estudo foi a espectroscopia de RMN do estado sólido, pretendendo-se focar a estabilidade ao nível molecular destas amostras, quer à hidratação quer ao aquecimento-arrefecimento.

Pela análise directa dos espectros de CP/MAS de  $^{13}\text{C}$ , no estado seco e à temperatura ambiente, das formas cristalinas (glucose- $\alpha$ , glucose- $\beta$ , glucose monohidratada) e amorfas (glucose liofilizada e vítrea) da glucose, concluiu-se que a glucose monohidratada parece ter características estruturais de alguma forma intermédias às formas anoméricas  $\alpha$  e  $\beta$ . A glucose liofilizada parece apresentar uma predominância da forma  $\alpha$  enquanto que a

glucose vítrea parece ser constituída por quantidades comparáveis das formas  $\alpha$  e  $\beta$  em estados bastante amorfos. Os tempos de relaxação das cinco formas de glucose, indicaram que as formas amorfas têm maior mobilidade tanto no que diz respeito a movimentos lentos (na ordem das dezenas de kHz) como a movimentos rápidos (centenas de MHz), relativamente às formas cristalinas.

Relativamente ao efeito da hidratação (entre 0 e 10% m/m) nos sistemas simples (glucose- $\alpha$ ,  $\beta$  glucose, glucose monohidratada), a forma glucose  $\alpha$  concluiu-se ser a forma de maior instabilidade, ocorrendo facilmente a conversão desta forma na forma de glucose monohidratada. Por outro lado, através do efeito do aquecimento/arrefecimento (20°C-80°C-20°C) concluiu-se que a glucose monohidratada é das formas cristalinas aquela que mais sofre alterações, sendo evidente a sua transformação na forma  $\alpha$ . Quanto às formas amorfas, a forma liofilizada é aquela que mais alterações sofre face ao aquecimento, convertendo-se na glucose  $\alpha$ , enquanto que não sofre alterações significativas por hidratação. A glucose vítrea exhibe um comportamento interessante pois, embora recupere o registo espectral após o ciclo térmico, sofre modificações irreversíveis ao nível dinâmico (aumento do número de movimentos lentos).

O mesmo tipo de experiências foi aplicado ao amido e à farinha, de modo a verificar em que medida o aumento da complexidade do sistema influi nos dados dinâmicos e estruturais dos sistemas. No estado seco e à temperatura ambiente, com o aumento de complexidade, (de glucose para amido) verificou-se que a mobilidade geral também aumenta, denotando possivelmente uma perda de organização molecular. Com a hidratação, entre 0 e 20% de m/m, o amido mostrou-se menos estável que a glucose monohidratada, ao nível de alterações do perfil espectral. O efeito da hidratação sobre a estrutura das farinhas é essencialmente idêntico ao do amido.

Quanto ao efeito do aquecimento/arrefecimento para 0% de água (m/m), tanto o amido como a farinha não evidenciaram alterações, nem estruturais nem dinâmicas, após o ciclo de temperaturas, ao contrário do que se observou para as formas de glucose. Aumentando a humidade para 10%, ambos os sistemas amido e farinha sofrem apenas ligeiras alterações dinâmicas e estruturais e, a 20% de humidade, ambos os sistemas mostram indícios da ocorrência de gelatinização, que se evidenciam por alterações a nível estrutural e dinâmico, ao longo do ciclo térmico.

A espectroscopia de RMN de sólidos possibilita assim analisar a estabilidade estrutural e dinâmica de sistemas de complexidade variável, informação que poderá ser relevante para avaliação e previsão da estabilidade das farinhas e derivados, face a diferentes tratamentos.

## **5 REFERÊNCIAS**

Alberti, E. A. (2000). Magnetic resonance studies of cereal proteins and some solid model systems. Departamento de Química. Aveiro, Universidade de Aveiro Tese de Doutoramento.

Atkins, P. W. (2000). Physical chemistry. 6th edition. Oxford, Oxford University Press.

Banwell, C. N. (1983). Fundamentals of Molecular Spectroscopy. London, McGraw-Hill.

Belton, P. S. (1995). FTIR and NMR studies on the hydration of a high-Mr subunit of glutenin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 17(2): 74-80.

Belton, P. S. (1999). On the elasticity of wheat gluten - Mini Review. *Journal of Cereal Science* 29: 103-107.

Belton, P. S. (2005). New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science* 41: 203-211.

Birch, G.G. (1985). Analysis of food carbohydrate. Essex, Lund Humphries Pub Ltd.

Brites, C. B., Muacho, M. C., Gomes, C., Antunes, P., Maças, B. (2002). Análise da produtividade e aptidão tecnológica de variedades comerciais de trigo mole. *Estação Nacional de melhoramento de plantas*. 38: 107-120.

Brites, C., Santos, C., Cruz T., Bagulho, A.S., Batista A., Beirão-da-Costa, L. (2005). Influence of puroindolines in physico-chemical composition of starch bread wheat varieties (*Triticum aestivum*). In: Proc. do 7º Congresso de Química dos alimentos - Alimentos: tradição e inovação, saúde e segurança.

Bryson, E. A., Rankin, S. A., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M., Watts, A., Pinheiro, T. J. (2000). Structure and dynamics of lipid-associated states of apocytochrome c. *European Journal of Biochemistry*. 267: 1390-1396.

Cauvain, S. P., Ed. (2003). *Bread making: improving quality*. Cambridge. Woodhead publishing.

Ching-Yung, M., Rout, M. K., Chan, W. M., Phillips, D. L., (2001). Raman spectroscopic study of oat globulin conformation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48(5): 1542-1547.

Chittur, K. K. (1999). FTIR and protein structure at interfaces. *Bulletin of the Biomedical Engineering Society* 23(3).

Chong, C. K., Xing, J., Phillips, D. L., Corke, H. (2002). Development of NMR and Raman spectroscopic methods for the determination of the degree of substitution of maleate in modified starches. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49(6): 2702-2708.

Chung, O., Pomerantz, Y., (1999). *Cereal Processing*. In *Food proteins: processing applications*. Nakai, S., Modler, H. W., Ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.

Colquhoun, I. J. G., B. J. (2000). *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy STFA*. R. Wilson.

Cornell, H. J., Hoveling, A. W. (1998). *Wheat - Chemistry and Utilization*. Lancaster, Technomic Publishing Co. Inc.

Dria, K. J., Sachleben, J. R., Hatcher, P. G. (2002). Solid state carbon 13 nuclear magnetic resonance of humic acids at high magnetic field strengths. *Journal Environmental Quality* 31: 393-401.

Feeney, K. A., Gilbert, S. M., Halford, N. G., Tatham, A. S., Shewry, P. R., Belton, P. S. (2003). Molecular structures and interactions of repetitive peptides based on wheat glutenin subunits depend on chain length. *Biopolymers* 72: 123-131.

Fen-NiFu, DeOliveira, D. B., Trumble, W. R., Sarkar, H. K., Singh, B. R. (1994). Secondary Structure Estimation of Proteins Using the Amide III Region of Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Application to Analyse Calcium Binding Induced Structural Changes in Calsequestrin. *Applied Spectroscopy* 48(11).

Fennema, R. (1996). *Food Chemistry*. 3<sup>rd</sup> edition, New York, Marcel Dekker, Inc.

Gadian, D. G. (1995). *NMR and its applications to living systems*. 2<sup>nd</sup> edition, New York, Oxford Science Publications.

Geladi, P. (2002). Some recent trends in the calibration literature. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 60: 211-224.

Gil, V., Geraldês, C. (1990). *Ressonância Magnética Nuclear, Fundamentos, Métodos e Aplicações* Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

Hornak, J. P. (1997). *The basics of NMR*, Rochester Institute of Technology.

Johnson, R. A., Wichern, D. W. (2002). *Applied multivariate statistical analysis*. 5<sup>th</sup> edition New Jersey, Prentice-Hall, Inc.

Karim, A. A. (2000). Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chemistry* 71: 9-36.

Kizil, R., Irudayaraj, J. (2006). Discrimination of Irradiated Starch Gels Using FT-Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(1): 13-18.

Larsson, P. T., Wickholm, K., Iversen, T. (1997). A CP/MAS  $^{13}\text{C}$  NMR investigation of molecular ordering in celluloses carbohydrate research 302: 19-25.

Li, W., Dobraszczyk, B. J., Dias, A., Gil, A. M. (2006). Polymer Conformation Structure of Wheat Proteins and Gluten Subfractions Revealed by ATR-FTIR. *Cereal Chemistry* 83(4): 407-410.

Long, D. A. (1977). *Raman spectroscopy*. London, McGraw-Hill.

Manly, B. F. J. (1997). *Multivariate Statistical Methods*. 3<sup>rd</sup> edition. London. Chapman & Hall/CRC.

Morgan, K. R., Furneaux, R. H., Larsen, N. G. (1995). Solid state NMR studies on the structure of starch granules. *Carbohydrate Research* 276: 387-399.

Morrisson, R., Boyd, R. (1995). *Química Orgânica*, 12<sup>a</sup> Edição. Lisboa. Fundação Calouste Gulbenkian.

Nikolaus Wellner, E. N. C. M. (2005). Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic fourier transform infrared spectroscopy *Biomacromolecules* 6: 255-261.

Osborne, B. G., Fearn, T., Hindle, P. (1993). *Practical NIR Spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, 2<sup>nd</sup> edition. Longman Scientific & Technical.

Pavia, L., Lampman, M., Kriz, S. (1996). Introduction to Spectroscopy. 2<sup>nd</sup> edition. Orlando. Harcourt College Publishers.

Pézolet, M., Bonenfant, F., Dousseau, F.; Popineau, Y. (1992). Conformation of wheat gluten proteins - Comparison between functional and solution states as determined by infrared spectroscopy. Federation of European Biochemical Societies Letters 299(3): 247-250.

Pézolet, M., Le Bihan, T., Blochet, J. E., Désormeaux, A., Marion, D. (1996). Determination of the secondary structure and conformation of puroindolines by infrared and raman spectroscopy. Biochemistry 35: 12712-12722.

Phillips, D. L., Xing, J., Liu, H., Pan, D., Corke, H. (1999). Potential use of Raman spectroscopy for the determination of amylose content in maize starch Cereal Chemistry 76(5): 821-823.

Popineau, Y., Bonenfant, S., Cornec, M., Pezolet, M. (1994). A study by infrared spectroscopy of the conformations of gluten proteins differing in their gliadin and glutenin compositions. Journal of Cereal Science 20: 15-22.

Purcell, J. M., Kasarda, D. D., Wu, C. S. (1987). Secondary structures of wheat  $\alpha$  - and  $\omega$  - Gliadin proteins: fourier transform infrared spectroscopy. Journal of Cereal Science 7: 21-32.

Ram, M., Dowel, F., Seitz, L. (2003). FT-Raman spectra of unsoaked and NaOH-Soaked wheat kernels, bran and ferulic acid. Cereal Chemistry 80(2): 188-192.

Santos, D. M. (2005). Influência das pentosanas nas propriedades funcionais do glúten e amido de trigo Aveiro, Universidade de Aveiro. Tese de Doutoramento

Sarver, R. W., Krueger, W. C. (1991). Protein secondary structure from Fourier transform infrared spectroscopy: a data base analysis. *Analytical biochemistry* 194: 89-100.

Scade, J. (1981). *Cereals*. Zaragoza. Editorial Acribia.

Settle, F. (1997). *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. Prentice Hall.

Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P.S., Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 357: 133-142.

Shields, L. D., Pecsok, R. L. (1968). *Modern Methods of Chemical Analysis* New York, John Wiley & Sons.

Singh, B. R. (2000). *Infrared Analysis of Peptides and Proteins - Principles and Applications*. Washington, American Chemical Society.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (1992). *Principles of instrumental analysis*. 5<sup>th</sup> edition. Harcourt College Publishers.

Smith, B. C. (1996). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, CRC Press.

Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., Chapman, D. (1993). Determination of protein secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32(2): 389-394.

Thygesen, L. G., Lokke, M. M., Micklander, E., Engelsen, S. B. (2003). Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs FT-IR. *Trends in food science and technology* 14: 50-57.

Walker, S., Straughan, B. P. (1976). Spectroscopy. London, Chapman and Hall. Volume 2.

Wellner, N., Belton, P. S., Tatham, A. S. (1996). Fourier transform IR spectroscopic study of hydration induced structure changes in the solid state of  $\omega$ -gliadins. *Biochemistry Journal* 319: 741-747.

Wellner, N., Mills, E. N., Belton, P. S. (2005). Changes in protein secondary structure during gluten deformation studied by dynamic Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomacromolecules* 6: 255-261.

Wrigley, C. W. (2001). *Chemical & Functional Properties of Food Proteins*. Lancaster Technomic Publishing Company, Inc.

Xiao, H., Xie, Y., Liu, Q., Xu, X., Shi, C. (2005). The studies of FT-IR and CD spectroscopy on catechol oxidase I from tobacco. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* 61: 2840-2848.