

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO CAMPOS DA SILVA

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DOS  
POLISSACARÍDEOS DE GOMA DE ACÁCIA-NEGRA ORIUNDA DE PLANTAÇÕES  
BRASILEIRAS

CURITIBA  
JULHO 2014

BRUNO CAMPOS DA SILVA

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES DOS  
POLISSACARÍDEOS DE GOMA DE ACÁCIA-NEGRA ORIUNDA DE PLANTAÇÕES  
BRASILEIRAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Química da Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título  
de Mestre em Química, subárea Físico-Química.

Orientadora: Dra. Izabel Cristina Riegel-Vidotti

CURITIBA  
JULHO 2014

*À Amanda, o amor de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente aos meus pais, Odair Barbosa da Silva e Bernadeth Campos da Silva, pelo apoio e incentivo, que, mesmo longe, estão sempre perto.

À minha esposa, Amanda Wagner, que está sempre ao meu lado me apoiando e trilhando comigo esta caminhada dura, mas prazerosa de troca e aprendizado.

À minha sogra, Juçara Wagner, por estar sempre torcendo por minhas conquistas.

À professora doutora Izabel Cristina Riegel-Vidotti, pela valiosa amizade que conquistamos, pela confiança e orientação que vem desde minha graduação e que evoluirá para meu doutorado.

Ao professor doutor Marcio Eduardo Vidotti Miyata, pelas aulas de eletroquímica que me ajudaram a ingressar no mestrado, pela amizade e por tornar as discussões mais descontraídas.

À Mariana de Oliveira, por vir me acompanhando desde o período de graduação, sempre me ajudando nos experimentos e torcendo por minhas vitórias.

À professora doutora Maria Rita Sierakowski, por ter aberto as portas de seu laboratório a um aluno de iniciação científica e apresentado à físico-química, tornando este trabalho possível.

Ao José Guilherme Lopes Ferreira, que realizou as medidas de  $pK_a$  e à professora doutora Elisa Souza Orth, pelas estimadas discussões dos resultados e por ter aceito ser avaliadora da qualificação de mestrado, na qual contribuiu para que as discussões deste trabalho se tornassem mais ricas.

À professora doutora Fernanda F. Simas Tosin, pelas longas conversas e pela ajuda na metodologia de determinação de AGP, juntamente com a Juliana Maurer, que cedeu o espaço, reagentes e conhecimento para a realização dos experimentos.

Ao grupo GPMIn, que compõem minha família científica, principalmente aos *gomeiros*.

Ao grupo Biopol, pela parceria, espaço e equipamentos cedidos.

Aos professores doutores Mateus Borba Cardoso, do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), e Paulo Vitor Farago, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), por conceder o espaço e equipamento para a realização das medidas de potencial zeta.

Aos professores doutores Paulo Vitor Farago, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Fernanda F. Simas Tosin, do departamento de Bioquímica da

Universidade Federal do Paraná (UFPR) e Elisa Souza Orth, do departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) por terem aceitado o convite para compor a banca avaliadora de defesa de mestrado.

Ao Msc. Renato Konrath, da Empresa Seta, por fornecer as gomas de acácia-negra.

A todos os professores e colegas do Departamento de química que contribuíram para minha formação e desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química da UFPR e a todos os demais colaboradores do Programa.

À CAPES e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

*“O conhecimento é o processo de acumular dados. A sabedoria reside na sua simplificação.”*

Martin H. Fischer

## RESUMO

A goma arábica é um biopolímero utilizado desde a antiguidade e que continua sendo um importante insumo para diversas indústrias até os dias atuais. O Brasil possui uma das maiores plantações florestais de *Acacia mearnsii* de Wild, concentrada na região sul, com a finalidade de extração de tanino e produção de carvão vegetal. Esta árvore exsuda goma, que é desperdiçada e, em determinados casos, vista como um foco de problemas. Este trabalho visa o estudo das propriedades emulsificantes da goma de acácia-negra de árvores plantadas no Rio Grande do Sul, a fim de permitir a proposição de utilização deste biopolímero como substituinte da goma arábica das espécies *A. senegal* e *A. seyal*, amplamente importadas pela indústria brasileira. Para isto, goma *in natura* de árvores de acácia-negra foi coletada e submetida a processo de extração resultando em duas amostras (GNF e GNA), posteriormente caracterizadas e aplicadas em emulsões O/A para avaliação do potencial de estabilização de emulsões. Uma goma arábica de origem comercial (GAC) foi submetida aos mesmos ensaios para fins comparativos. Como resultado pode-se observar que os polissacarídeos extraídos da goma de acácia negra mostraram-se mais eficientes em estabilizar emulsões do que GAC, onde o perfil de distribuição do conteúdo proteico entre as moléculas de alta massa (AGP) e baixa massa (GP) exerceu papel de extrema importância na propriedade estabilizante. O potencial zeta, em função da concentração salina e pH do meio, em conjunto com o perfil de fases, indicou que GAC estabiliza as emulsões pela combinação do efeito estérico e repulsão eletrostática, enquanto que GNF atua unicamente por estabilização estérica. Por outro lado revelou que GNA atua por vários mecanismos de estabilização, exercendo estabilização eletroestérica e, quando em presença de eletrólito, forma uma estrutura semelhante a um gel, aumentando a viscosidade do meio e reduzindo a velocidade de separação de fases. Com isso, a goma de acácia-negra apresentou resultados promissores indicando que pode ser empregada em processos industriais como possível substituinte da goma arábica comercial ou como matéria-prima nova, podendo contribuir no desenvolvimento econômico da cadeia de exploração de produtos e subprodutos da *Acacia mearnsii* De Wild no Brasil.

Palavras chave: goma arábica, *Acacia mearnsii*, acácia-negra, emulsão, propriedade emulsificante.

## ABSTRACT




Gum arabic is a biopolymer used since ancient times and remains as an important ingredient for many industries until the present day. Brazil has one of the largest *Acacia mearnsii* de Wild forest plantations, concentrated in the southern region, exploited for charcoal and tannin extraction. This tree exudes gum, which is wasted and in some cases seen as a focus of problems. This work aims to study the emulsifying properties of black-wattle gum from trees planted in Rio Grande do Sul, in order to allow the proposal of using this biopolymer as a substituent of gum acacia from species *A. senegal* and *A. seyal*, widely imported by Brazilian industry. For this, black-wattle crude gum was collected and submitted to extraction procedure, giving rise to two samples (GNF and GNF), subsequently characterized and applied in O/W emulsions and evaluated to determine the emulsifier potential. As comparative purposes, commercial gum arabic (GAC) was submitted to the same tests. As result the polysaccharides extracted from black-wattle gum were more efficient in stabilizing emulsions than GAC, where the distribution profile of the protein content between molecules of high mass (AGP) and low mass (GP) showed to be very important in emulsifier property. The zeta potential, as a function of salt concentration and pH of medium, together with the phase's profile indicated that GAC stabilize emulsions by the combination of steric and electrostatic repulsion, while GNF acts solely by steric stabilization. On the other hand, GNA stabilizes by several mechanisms, generating electrostatic and steric stabilization and, when in the presence of electrolyte, forms a gel-like structure, which increases the medium viscosity reducing the phase separation rate. With that black-wattle gum showed promising results indicating that it can be used in industrial processes as a possible substituent of commercial gum arabic or as a new ingredient and may contribute to the economic development of exploration chain of products and by-products of *Acacia mearnsii* de Wild in Brazil.

Keywords: gum arabic, *Acacia mearnsii*, black-wattle, emulsion, emulsifying property.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da origem da tensão interfacial ( $\gamma$ ). 1) Fase oleosa. 2) Fase aquosa 2') Moléculas da fase aquosa. d) Força resultante ( $\delta$ ) .....	20
Figura 2 – Emulsão O/A obtida a partir da mistura de óleo de soja e água vista em microscópio óptico em aumento de 100x .....	20
Figura 3 – Forças atuantes em uma gotícula emulsionada: tensão interfacial ( $\gamma$ ) e pressão de Laplace (P) .....	21
Figura 4 – Esquema dos processos de desestabilização de emulsões (O/A) <sup>17</sup> .....	23
Figura 5 – Micrografia de emulsão O/A com presença de floculação em aumento de 100x .....	23
Figura 6 – A) Esquema da dupla camada elétrica formada em gotículas emulsionadas na presença de tensoativos iônicos. B) Esquema da repulsão eletrostática entre duas gotículas estabilizadas ...	24
Figura 7 – Esquema do efeito de impedimento estérico em sistemas emulsionados estabilizados por macromoléculas.....	25
Figura 8 – Esquema de estabilização eletroestérica .....	26
Figura 9 – Esquema de separação por sedimentação (A) e decantação (B) mediados pela ação da gravidade e diferença de densidade entre as fases dispersa e contínua .....	26
Figura 10 – A) Esquema de desestabilização de emulsões via envelhecimento por <i>Ostwald ripening</i> . B) Esquema de estabilização de emulsões mediada pela adição de coestabilizante contra desestabilização por <i>Ostwald ripening</i> .....	28
Figura 11 – Árvore de <i>Acacia senegal</i> com goma exsudada em seu tronco <sup>31</sup> .....	30
Figura 12 – Modelo estrutural proposto para a fração arabinogalactana da goma arábica <sup>63</sup> .....	31
Figura 13 – Estrutura proposta para AGP: modelo "wattle blossom" .....	32
Figura 14 – Esquema de estabilização interfacial pela AGP - modelo "wattle blossom" .....	33
Figura 15 – Árvore de acácia-negra com goma exsudada em seu tronco <sup>51</sup> .....	34
Figura 16 – Esquema do processo de extração das frações GNF e GNA a partir da goma <i>in natura</i> de árvores de <i>Acacia mearnsii</i> de Wild (acácia-negra).....	35
Figura 17 – Curva analítica do método de determinação de proteína usando solução aquosa de proteína de soro bovino (BSA) como padrão, com leitura em comprimento de onda de 650 nm ...	38
Figura 18 – Esquema de medida dos halos de difusão para quantificação da fração AGP pela metodologia de difusão radial .....	39
Figura 19 – Curva analítica do método de determinação de AGP .....	39
Figura 20 – Curva analítica do método de determinação de ácidos urônicos usando solução aquosa de ácido galacturônico como padrão, com leitura em comprimento de onda de 525 nm .....	40
Figura 21 – Esquema de determinação das fases da emulsão .....	43
Figura 22 – Perfil cromatográfico da análise de GPC. Linhas pretas representam sinal de índice de refração; linhas azuis representam sinal de índice de refração deconvoluído; linhas vermelhas representam sinal do detector de UV – sinal captado no comprimento de onda de 280 nm. A) Amostra GAC. B) Amostra GNF. C) Amostra GNA.....	45
Figura 23 – A) Resultados da determinação do conteúdo proteico. B) Resultados da determinação do teor de ácidos urônicos .....	47
Figura 24 – Medidas de tensão interfacial dos polissacarídeos em água pelo método da gotícula pendente. As linhas sólidas correspondem às curvas ajustadas pela equação de Boltzmann. Setas sólidas correspondem aos valores de CAC e seta tracejada ao valor de CMC .....	48
Figura 25 – Esquema da influência do tamanho das partículas na velocidade de difusão para interfaces .....	49

Figura 26 – Curvas de titulação potenciométrica de GAC, GNA e GNF (25 mg mL <sup>-1</sup> à 25°C) com KOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> . As linhas sólidas correspondem às curvas de ajuste obtidas pelo programa BEST7 .....	50
Figura 27 – Variação do potencial zeta das emulsões no período de 12 h das amostras GAC, GNF e GNA em água.....	52
Figura 28 – Potencial zeta das emulsões em função da concentração de NaCl. As linhas sólidas correspondem às curvas de ajuste. Setas tracejadas indicam o limite de estabilização eletrostática contra floculação irreversível .....	53
Figura 29 – Esquema das forças atuantes na teoria DLVO. A curva em vermelho representa o potencial de repulsão gerado pela dupla camada elétrica. A curva em azul representa o potencial atrativo gerado por forças de van der Waals. A soma das duas curvas (repulsão e atração) dá origem à curva do potencial resultante (preto).....	54
Figura 30 – Medida do potencial zeta das emulsões O/A estabilizadas com GAC, GNF ou GNA em função do pH do meio. Linhas sólidas correspondem às curvas ajustadas pela equação de Boltzmann. Setas tracejadas indicam o pH limite para ocorrência da estabilização eletrostática contra floculação irreversível .....	55
Figura 31 – Imagem do acompanhamento da separação de fases das emulsões em função do tempo ao longo de 22 dias em repouso a temperatura ambiente.....	56
Figura 32 – Separação de fases das emulsões em função do tempo.  Aqu%;  Emu% e  Esp% A) Emulsões preparadas em água. B) Emulsões preparadas em NaCl 0,9% .....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Métodos aplicados para obtenção de emulsões e respectivas características de eficiência energética, tipo de processo e mecanismo de emulsificação.....	22
Tabela 2 – Composição de aminoácidos da Goma Arábica (resíduos/1000 resíduos).....	32
Tabela 3 – Dados de GPC deconvoluídos das amostras GAC, GNF, e GNA.....	46
Tabela 4 – Valores de $pK_a$ e ponto de equivalência (P.E.) determinado para as amostras GAC, GNF e GNA (25 mg mL <sup>-1</sup> a 25°C).....	51
Tabela 5 – Determinação do potencial zeta das emulsões estabilizadas com GAC, GNF e GNA em água nos tempos 0 e 12 h .....	51

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**A/O:** emulsão água-em-óleo

**AG:** arabinogalactana

**AGP:** complexo arabinogalactana-proteína

**Ala:** alanina

**Aqu%:** fase aquosa

**Arg:** arginina

**Asp:** ácido aspártico

**BSA:** albumina de soro bovino

**BVO:** óleo vegetal bromado

**CAC:** concentração de agregação crítica

**C<sub>i</sub>:** concentração no volume de eluição i

**CMC:** concentração micelar crítica

**Cys:** cisteína

**dn/dc:** incremento de índice de refração

**Emu%:** fase emulsionada

**ESI:** índice de estabilidade de emulsificação

**Esp%:** fase de espuma

**FC<sub>RALS</sub>:** fator de calibração do detector de espalhamento de luz a 90°

**FC<sub>RI</sub>:** fator de calibração do detector de índice de refração

**GAC:** goma arábica comercial

**Glu:** glutamina

**Gly:** glicina

**GNA:** goma arábica de acácia-negra derivada da extração alcalina

**GNF:** goma arábica de acácia-negra derivada da extração aquosa

**GP:** glicoproteína

**GPC:** cromatografia de permeação em gel

**His:** histidina

**Hyp:** hidroxiprolina

**Ile:** isoleucina

**Leu:** leucina

**Lys:** lisina

**Met:** metionina

$\bar{M}_n$ : massa molar numérica média

$\bar{M}_w$ : massa molar ponderal média

$M_{w_i}$ : massa molar no volume de eluição  $i$

**O/A**: emulsão óleo-em-água

**O/O**: emulsão óleo-em-óleo

**P.E**: ponto de equivalência

**PD**: índice de polidispersão

**Phe**: fenilalanina

**Pro**: prolina

**RALS**: sinal do detector de espalhamento de luz a  $90^\circ$

**RALS<sub>i</sub>**: sinal do detector de espalhamento de luz a  $90^\circ$  no volume de eluição  $i$

**RI**: sinal do detector de índice de refração

**RI<sub>i</sub>**: sinal do detector de índice de refração no volume de eluição  $i$

**SAIB**: acetato isobutirato de sacarose

**Ser**: serina

**Thr**: triptofano

**Tyr**: tirosina

**Val**: valina

$\gamma$ : tensão interfacial

$\zeta$ : potencial zeta

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
3.1	EMULSÕES.....	19
3.1.1	<i>ESTABILIDADE DE EMULSÕES .....</i>	<i>22</i>
3.1.1.1	<i>FLOCULAÇÃO.....</i>	<i>23</i>
3.1.2	<i>CREMEAÇÃO / SEDIMENTAÇÃO .....</i>	<i>26</i>
3.1.3	<i>DESPROPORCIONALIZAÇÃO OU ENVELHECIMENTO POR OSTWALD RIPENING .....</i>	<i>27</i>
3.1.4	<i>COALESCÊNCIA .....</i>	<i>28</i>
3.2	GOMAS NATURAIS .....	29
3.3	GOMA ARÁBICA.....	30
3.4	ACÁCIA-NEGRA .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1	MATERIAIS .....	35
4.2	MÉTODOS .....	35
4.2.1	<i>EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE ACÁCIA-NEGRA .....</i>	<i>35</i>
4.2.2	<i>CARACTERIZAÇÃO DA MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (M<sub>w</sub>) E POLIDISTRIBUIÇÃO (PD) DOS POLISSACARÍDEOS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA.....</i>	<i>36</i>
4.2.3	<i>ESTUDO DO CONTEÚDO PROTEICO E DA FRAÇÃO ARABINOGALACTANA-PROTEÍNA (AGP) NAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA .....</i>	<i>37</i>
4.2.4	<i>ESTUDO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS URÔNICOS NAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA .....</i>	<i>40</i>
4.2.5	<i>ESTUDO DA ATIVIDADE TENSOATIVA DAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR TENSIOMETRIA .....</i>	<i>40</i>
4.2.6	<i>DETERMINAÇÃO DO pK<sub>a</sub> DAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA.....</i>	<i>41</i>
4.2.7	<i>PREPARO DAS EMULSÕES.....</i>	<i>41</i>
4.2.8	<i>DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DAS EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS PELAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA .....</i>	<i>42</i>
4.2.9	<i>ACOMPANHAMENTO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS PELAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR ANÁLISE DO PERFIL DE FASES.....</i>	<i>42</i>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>

5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	44
5.1.1	CARACTERIZAÇÃO DA MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA (Mw) E POLIDISTRIBUIÇÃO (PD) DOS POLISSACARÍDEOS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA.....	44
5.1.2	ESTUDO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS URÔNICOS, PROTEÍNA E FRAÇÃO ARABINOGALACTANA-PROTEÍNA (AGP) NAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA .....	46
5.1.3	ESTUDO DA ATIVIDADE TENSOATIVA DAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR TENSIOMETRIA .....	48
5.1.4	DETERMINAÇÃO DO pKa DAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA.....	49
5.2	CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS PELAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA .....	51
5.2.1	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DAS EMULSÕES.....	51
5.2.2	ACOMPANHAMENTO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS PELAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR ANÁLISE DO PERFIL DE FASES .....	56
<b>6</b>	<b><u>CONCLUSÃO.....</u></b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b><u>REFERÊNCIAS .....</u></b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As gomas naturais são matérias primas de grande importância, por apresentarem características como atoxicidade, baixa imunogenicidade e boa biocompatibilidade<sup>1-3</sup>. Um exemplo é a goma de acácia, conhecida como goma arábica, um polieletrólito de origem vegetal, usada desde a antiguidade há cerca de 4000 anos pelos egípcios no processo de mumificação e como espessante e estabilizante de pigmentos<sup>4-7</sup>.

Atualmente a goma arábica é amplamente utilizada nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, têxtil, dentre outras, por ser facilmente solúvel em água, apresentar baixa viscosidade em grandes concentrações, por ser um excelente emulsificante, estabilizante, dispersante e ser facilmente obtida de fonte renovável<sup>5-10</sup>.

O Brasil é um grande importador de goma arábica, tendo despendido cerca de US\$ 7,5 milhões (1775 toneladas) no ano de 2012 e US\$ 7,8 milhões (1940 toneladas) no ano de 2013 com a importação desta goma<sup>11</sup>.

A goma arábica comercial provém, principalmente, das espécies *Acacia senegal* (L.) Willdenow e *Acacia seyal* Delile. Porém, há uma grande variedade de espécies do gênero *Acacia*, compreendendo cerca de 1200 espécies espalhadas pelas áreas tropicais e subtropicais ao redor do mundo. Dentre estas, a maioria ainda não são exploradas e, portanto, não possuem importância comercial<sup>4, 12</sup>. A espécie *Acacia mearnsii* De Wild, conhecida como acácia-negra, é plantada com múltiplos propósitos, tais como restauração de ambientes degradados, fixação de nitrogênio, extração de tanino e produção de carvão vegetal para geração de energia, dentre outros. No Brasil, a espécie *A. mearnsii* é cultivada principalmente com a finalidade de extração de tanino e produção de carvão vegetal<sup>13-15</sup>, se concentrando no estado do Rio Grande do Sul. Essa árvore também é produtora de goma. Baseando-se na produção anual média de 250 g de goma por árvore da espécie *A. senegal*<sup>16</sup>, e uma densidade de plantio de 2000 árvores por hectare<sup>14</sup>, pode se estimar que o Brasil possua o potencial de produzir anualmente de cerca de 100 mil toneladas de goma *in natura*. Este exsudato gomoso não é aproveitado economicamente, sendo muitas vezes considerado um problema, principalmente para o processo de extração de taninos, pois pode contaminar o produto final.

Considerando as aplicações da goma arábica em processos de interesse industrial, o presente trabalho visa o estudo das propriedades emulsificantes da goma de acácia-negra, a fim de propor a utilização deste biopolímero como substituinte da goma arábica das espécies *A. senegal* e *A. seyal*, atualmente importadas pela indústria brasileira. Espera-se



que os resultados obtidos contribuam para a agregação de valor tecnológico e comercial à goma arábica obtida de plantações brasileiras, somando-se aos diversos esforços atuais de fomento à cadeia produtiva da acácia-negra no Brasil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, caracterizar e elucidar o potencial de uso dos polissacarídeos da goma de acácia negra como substituinte da goma arábica na estabilização de emulsões.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair polissacarídeos do exsudato gomoso de árvores de acácia negra via extração aquosa seguida por extração alcalina;
- Caracterizar físico-quimicamente as gomas de acácia-negra, em comparação com a comercial por:
  - Cromatografia de permeação em gel;
  - Quantificação de conteúdo proteico;
  - Quantificação de teor de ácidos urônicos;
  - Determinação da presença de fração AGP;
  - Determinação do  $pK_a$ ;
  - Determinação da tensão superficial;
- Preparar e caracterizar as emulsões com as gomas de acácia-negra, em comparação com a comercial:
  - Preparar emulsões O/A, com óleo de soja, estabilizada com os polissacarídeos em presença e ausência de NaCl;
  - Avaliar macroscopicamente o perfil de fases das emulsões (fase espuma, fase emulsionada e fase aquosa) em função do tempo;
  - Determinar o potencial zeta das emulsões em função de concentração de NaCl e variação de pH;
- Correlacionar as propriedades emulsificantes com as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 EMULSÕES

Emulsões estão presentes no nosso cotidiano como, por exemplo, a maionese, o leite, cremes cosméticos e/ou medicinais, hidratantes para pele. O mecanismo de ação do detergente na remoção de gorduras também é um processo de emulsificação, no qual a água, a gordura e o detergente formam uma emulsão, com o detergente agindo como emulsificante e auxiliando na remoção da gordura. As emulsões também podem ser utilizadas como veículo/excipiente de liberação de múltiplos fármacos e cosméticos com diferentes solubilidades, ou apresentar uma composição que melhora a distribuição e/ou a permeação na pele<sup>17</sup>.

Emulsões são sistemas heterogêneos, obtidos pela mistura de dois líquidos imiscíveis entre si, sendo um dos componentes é dividido no interior do outro em formas de gotículas, cujos diâmetros variam entre nanômetros e micrômetros. O líquido dividido recebe o nome de fase dispersa, enquanto que o outro é chamado de fase contínua. A natureza química da fase dispersa e da fase contínua determina o tipo de emulsão formada, que pode ser óleo em água (O/A), onde a fase contínua é aquosa; água em óleo (A/O), onde a fase contínua é oleosa<sup>18-22</sup>; ainda pode-se obter emulsão do tipo óleo em óleo (O/O), pela mistura de compostos orgânicos com baixa miscibilidade entre si como, por exemplo, óleo de rícino e polimetil siloxanos<sup>23</sup>.

Ao se observar o interior de um líquido puro, as forças coesivas atuam sobre as moléculas em todos os sentidos, gerando uma resultante nula. Porém, quando situadas em uma interface, estas sofrem efeito das forças de coesão entre as moléculas semelhantes e de adesão entre as moléculas da outra fase. Estas forças possuem intensidades diferentes, gerando uma resultante diferente de zero<sup>18-22, 24</sup>. No caso de fases imiscíveis entre si, as forças coesivas são maiores que as adesivas, portanto a resultante será perpendicular à interface voltada para o seio da fase de origem (Figura 1). Esta força dirigida pela elevada coesão e baixa adesão dos componentes, recebe o nome de tensão interfacial ( $\gamma$ )<sup>18-22, 24</sup>.

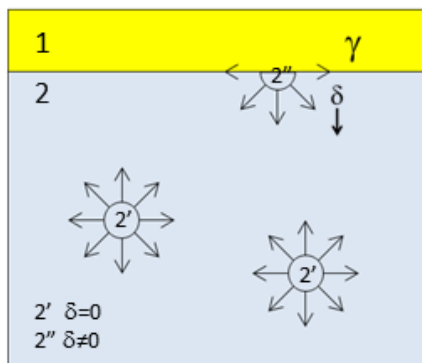


Figura 1 – Esquema da origem da tensão interfacial ( $\gamma$ ). 1) Fase oleosa. 2) Fase aquosa 2') Moléculas da fase aquosa. d) Força resultante ( $\delta$ )

Ao se formar uma emulsão a área de contato entre as fases é aumentada consideravelmente. Como há dispersão de uma das fases, há o aumento da entropia. A  $\gamma$  atua no sentido de reduzir ao máximo a área de contato entre as fases na tentativa de reduzir a energia livre do sistema. Esta energia livre pode ser estimada pelo produto da variação de área ( $\Delta A$ ) de contato entre as fases pela tensão interfacial ( $\gamma$ )<sup>18-22, 24</sup>:

$$\Delta G = \Delta A\gamma - T\Delta S$$

Equação 1

Em emulsões convencionais, a redução do tamanho das gotículas não é muito grande, portanto o aumento da entropia não é significativo:

$$\Delta A\gamma \gg T\Delta S$$

Equação 2

Dessa forma, emulsões são termodinamicamente desfavoráveis, necessitando de gasto de energia para serem formadas. O que faz com que estes sistemas tenham estabilidade limitada é a tendência de redução da área interfacial, o que leva à separação de fases.

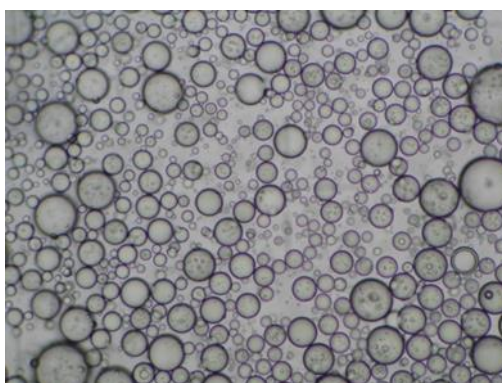


Figura 2 – Emulsão O/A obtida a partir da mistura de óleo de soja e água vista em microscópio óptico em aumento de 100x

Outro fator que contribui para o aumento da energia livre em sistemas emulsionados é a formação de superfícies curvas<sup>18</sup> (Figura 2). Essa conformação promove o surgimento de uma diferença de pressão, que é maior na face côncava, ou seja, no interior da gotícula formada (Figura 3), originada pela ação da tensão interfacial. A variação de pressão ( $\Delta P$ ) é determinada pela equação de Laplace<sup>18-22, 24</sup>:

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $r$  corresponde ao raio da gotícula. Quanto menor o raio da gotícula formada, maior será a diferença de pressão na interface.

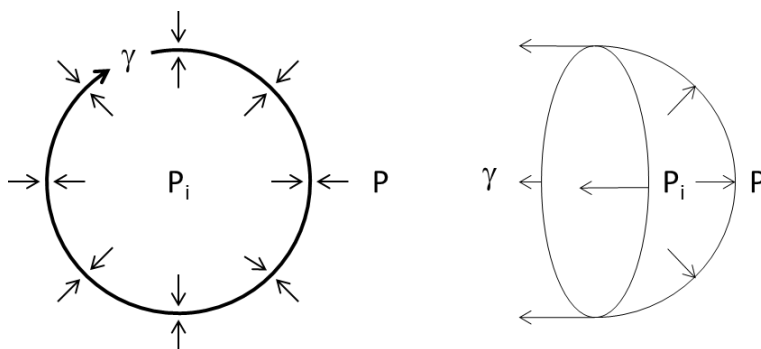


Figura 3 – Forças atuantes em uma gotícula emulsionada: tensão interfacial ( $\gamma$ ) e pressão de Laplace ( $P$ )

A formação de emulsões necessita que energia seja entregue ao sistema para que ocorra o aumento da área interfacial. Esta energia é transferida através da realização de um trabalho. O trabalho ( $W$ ) necessário para se formar um centímetro quadrado ( $1 \text{ cm}^2$ ) de nova interface é dado por:

$$W = \gamma \Delta A \quad \text{Equação 4}$$

Para que ocorra redução do tamanho das gotículas, o trabalho aplicado deve ser grande o suficiente para produzir um gradiente de pressão superior à pressão de Laplace das gotículas do sistema:

$$\frac{dP}{dr} \geq \frac{\Delta P}{r} = \frac{2\gamma}{r^2} \quad \text{Equação 5}$$

O trabalho pode ser exercido no sistema de diversas maneiras. A Tabela 1 traz os principais métodos de emulsificação utilizados com a respectiva eficiência de transferência de energia ao sistema<sup>18</sup>.

Tabela 1 – Métodos aplicados para obtenção de emulsões e respectivas características de eficiência energética, tipo de processo e mecanismo de emulsificação<sup>18</sup>

<b>Método</b>	<b>Eficiência na transferência energética</b>	<b>Processo</b>	<b>Formação da gotícula</b>
<b>Agitação</b>			
Manual	Baixa	Batelada	Turbulência
Simplex	Baixa	Batelada/ contínuo	Turbulência/ forças viscosas em fluxo laminar
Rotor–estator	Média/Alta	Batelada/ contínuo	Turbulência/ forças viscosas em fluxo laminar
Vibrador	Baixa	Batelada/ contínuo	Turbulência/ forças viscosas em fluxo laminar
Raspador	Baixa/Média	Batelada/ contínuo	Forças viscosas em fluxo laminar
<b>Fluxo em Tubos</b>			
Laminar	Baixa/Média	Contínuo	Forças viscosas em fluxo laminar
Turbulento	Baixa/Média	Contínuo	Turbulência
<b>Moinho coloidal</b>	Média/Alta	Contínuo	Forças viscosas em fluxo laminar
<b>Moinho de rolo/bolas</b>	Média	Batelada/ contínuo	Forças viscosas em fluxo laminar
<b>Homogeneizador de alta pressão</b>	Alta	Batelada/ contínuo	Turbulência/ cavitação/ forças viscosas em fluxo laminar
<b>Ultrassom</b>	Média/Alta	Batelada/ contínuo	Turbulência/ cavitação
<b>Injeção</b>	Baixa	Batelada/ contínuo	Turbulência/ forças viscosas em fluxo laminar

Para facilitar o preparo das emulsões, são usadas substâncias que interagem com a interface líquido-líquido promovendo redução da  $\gamma$ , facilitando a obtenção de dispersões com gotículas de tamanhos menores. Porém, para que o sistema atinja a estabilidade termodinâmica faz-se necessário que a tensão interfacial seja reduzida a zero, ou seja, não há a necessidade de realização de trabalho. Isso ocorre nas chamadas microemulsões, existentes a custo de elevadas concentrações de agentes tensoativos<sup>18-22, 24-25</sup>.

### 3.1.1 ESTABILIDADE DE EMULSÕES

Emulsões convencionais são instáveis no ponto de vista termodinâmico. A separação de fases é mediada pela tendência de reduzir a área interfacial entre os líquidos. Esta separação ocorre por floculação, cremeação/sedimentação, desproporcionalização e

coalescência<sup>17-20, 22</sup>, conforme ilustrado na Figura 4. Todos os processos ocorrem simultaneamente e aleatoriamente.

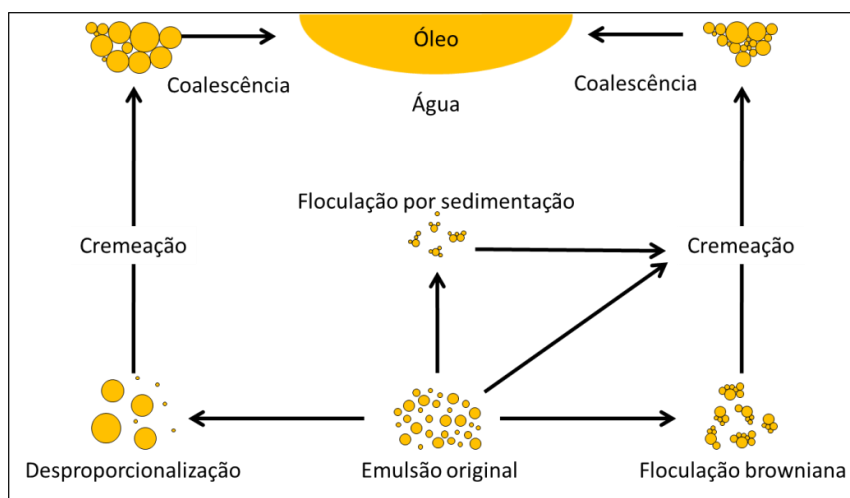


Figura 4 – Esquema dos processos de desestabilização de emulsões (O/A)<sup>17</sup>

### 3.1.1.1 FLOCULAÇÃO

A floculação é o fenômeno de adesão entre gotículas, que formam agregados tridimensionais. Todas as gotículas mantêm sua integridade existindo como entidades totalmente separadas (Figura 5). O contato ocorre mediado pelo movimento das gotículas no meio. Este movimento pode ter como força motriz a gravidade, que atua mediante a diferença de densidade entre as fases e tamanho das gotículas. Em sistemas emulsionados polidispersos, as gotículas menores se movimentam com velocidades maiores em relação às gotículas maiores, propiciando a colisão entre as partículas com velocidades diferentes. Este mecanismo é chamado de *floculação por sedimentação*<sup>17-20, 22</sup>.

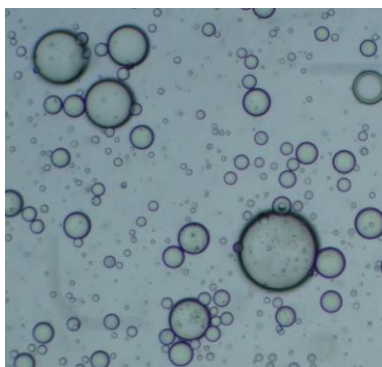


Figura 5 – Micrografia de emulsão O/A com presença de floculação em aumento de 100x

A difusão aleatória das gotículas mediada pelo movimento browniano também contribui para este fenômeno, agora chamado de *floculação browniana*, na qual a força motriz vem da colisão entre as moléculas presentes no fluido entre si e com as partículas presentes no meio<sup>17-20, 22</sup>.

Os agregados formados podem ser reversíveis ou irreversíveis e podem ser precursores da quebra da emulsão.

Para melhorar a estabilidade frente a este fenômeno, o contato entre as gotículas deve ser minimizado ao máximo. Dessa forma, duas abordagens podem ser feitas, uma explorando o efeito da *repulsão eletrostática* e outra pelo *efeito estérico*:

**Repulsão eletrostática:** O uso de um agente emulsificante carregado, positiva ou negativamente, irá formar uma camada elétrica na superfície da gotícula. Esta primeira monocamada carregada recebe o nome de camada de *Stern* e depende diretamente das características do tensoativo aplicado. Adjacente a essa monocamada, existe uma segunda camada, formada por contra íons, dando origem à camada difusa, na qual a concentração iônica depende dos efeitos de difusão e eletrostático dos íons presentes no meio. Essa movimentação de íons forma um plano de cisalhamento no qual o potencial elétrico diminui exponencialmente em função da distância da camada de *Stern*. O potencial zeta ( $\zeta$ ) é a medida do potencial elétrico no plano de cisalhamento<sup>18-22, 24, 26</sup> (Figura 6 – A).

Quando duas gotículas carregadas se aproximam, as camadas difusas se sobrepõem, gerando uma força repulsiva entre as gotículas emulsionadas, evitando o contato íntimo entre elas (Figura 6 – B). A eficiência desta força depende da carga presente na superfície da gotícula, pois esta precisa ser maior ou superior à energia cinética fornecida pelo movimento browniano para evitar a ocorrência de *floculação irreversível*. Quanto maior o  $\zeta$ , maior a estabilidade da emulsão<sup>18-22, 24, 26</sup>.

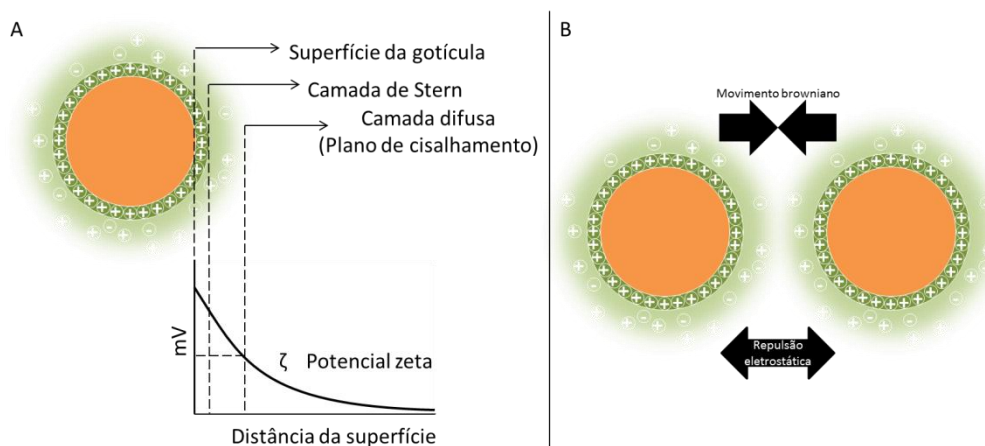


Figura 6 – A) Esquema da dupla camada elétrica formada em gotículas emulsionadas na presença de tensoativos iônicos. B) Esquema da repulsão eletrostática entre duas gotículas estabilizadas



**Efeito estérico:** Este efeito ocorre quando se utiliza macromoléculas na estabilização de sistemas emulsionados. Estas moléculas possuem longas cadeias que se posicionam na superfície das gotículas de um sistema emulsionado, interagindo parcialmente com a interface óleo-água, ocupando um espaço no entorno da partícula estabilizada (Figura 7). Ao passo que ocorre a aproximação de duas interfaces ocorre a aproximação das cadeias poliméricas até a ocorrência de interpenetração entre as moléculas. Quanto mais próxima uma superfície da outra, menor o espaço existente para a acomodação das macromoléculas, restringindo o número de conformações possíveis para cada macromolécula (Figura 7 – zona sombreada). Quanto maior a proximidade entre as gotículas, maior a constrição imposta, e conseqüentemente, a entropia diminuirá, ocasionando o aumento da energia livre tornando a aproximação termodinamicamente desfavorável, promovendo estabilidade à emulsão<sup>18-22, 24, 26</sup>.

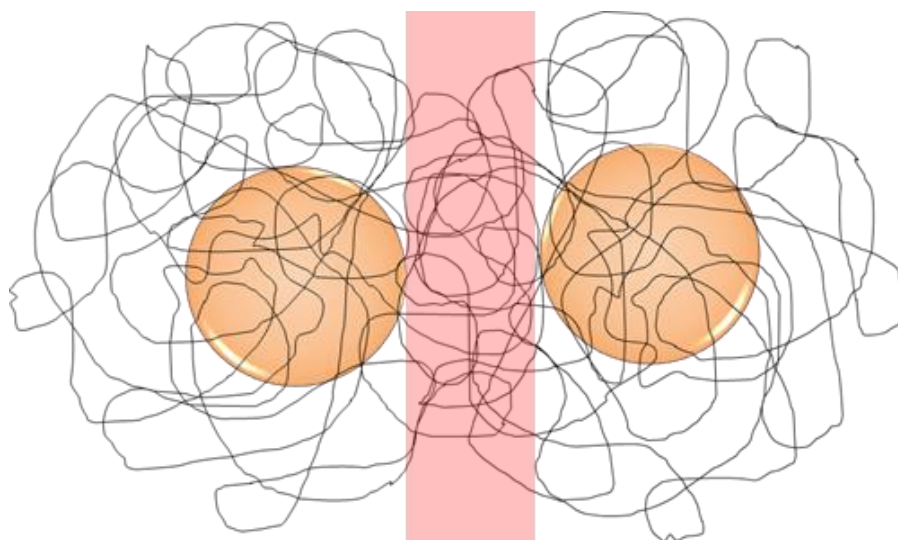


Figura 7 – Esquema do efeito de impedimento estérico em sistemas emulsionados estabilizados por macromoléculas

É possível associar o efeito estérico e o efeito eletrostático com a utilização de polieletrólitos. Polieletrólitos são polímeros que apresentam grupos funcionais carregados, ou seja, possuem cadeias longas que atuam exercendo estabilização via efeito estérico e grupos carregados que promovem repulsão eletrostática. A combinação desses efeitos é conhecida por *estabilização eletroestérica*<sup>18-22, 24, 26</sup> (Figura 8).

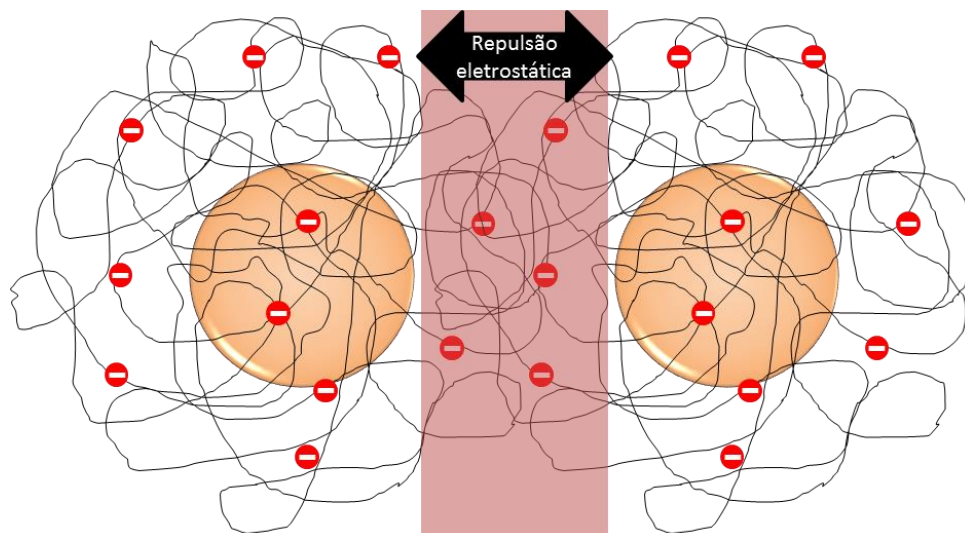


Figura 8 – Esquema de estabilização eletroestérica

### 3.1.2 CREMEÇÃO / SEDIMENTAÇÃO

A cremação (ou sedimentação) ocorre devido à diferença de densidade entre as fases que compõem a emulsão. Chama-se de cremação quando a fase dispersa é menos densa (Figura 9 – A) e sedimentação quando mais densa (Figura 9 – B). Este fenômeno facilita a ocorrência dos outros mecanismos de separação de fases, pois promove a concentração da fase emulsionada, diminuindo a distância entre as gotículas e aumentando a frequência das colisões<sup>18-22, 24</sup>.

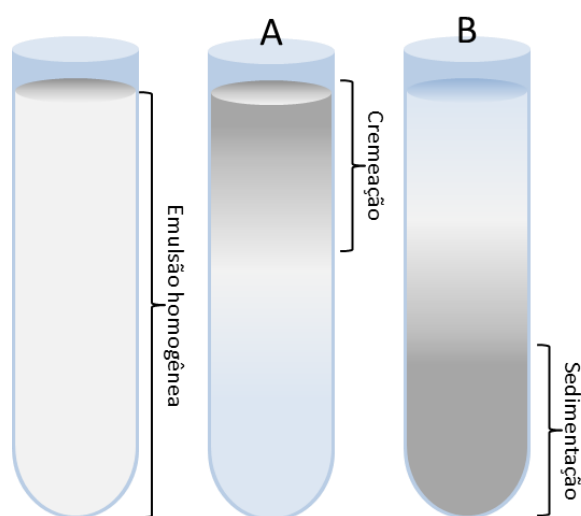


Figura 9 – Esquema de separação por sedimentação (A) e decantação (B) mediados pela ação da gravidade e diferença de densidade entre as fases dispersa e contínua

Para contrapor a ocorrência desses processos de desestabilização há a necessidade de reduzir a mobilidade das partículas, alterando a viscosidade do meio dispersante pelo uso de agentes de viscosidade ou agentes gelificantes, como polímeros (carboximetilcelulose, goma guar) ou cadeias graxas sólidas à temperatura ambiente (álcool cetosteárfico). Outra forma de reduzir a mobilidade é diminuir a diferença de densidade entre as fases. Isto pode ser obtido pela adição de agentes de peso à fase menos densa. Estes compostos possuem densidade elevada e são adicionados em concentrações suficientes para se igualar as densidades e anular o efeito da gravidade, aumentando a estabilidade do sistema. Alguns exemplos desses compostos são os óleos vegetais bromados (BVO), acetato isobutirato de sacarose (SAIB) e resinas, como goma damar<sup>7, 27</sup>.

### 3.1.3 DESPROPORCIONALIZAÇÃO OU ENVELHECIMENTO POR OSTWALD RIPENING

Este é o fenômeno no qual a distribuição de tamanhos das gotículas muda progressivamente para tamanhos maiores. É um processo que depende da difusão da fase dispersa na fase dispersante e possui como potencial químico a diferença de pressão de Laplace (Equação 6). Moléculas da fase dispersa situadas nas gotículas de raios menores (maior pressão) difundem para gotículas com raios maiores (menor pressão) na tentativa de aumentar seu diâmetro e minimizar a energia do sistema<sup>17-22, 24</sup> (Figura 10 – A):

$$P_{r_2} - P_{r_1} = 2\gamma \left( \frac{1}{r_2} - \frac{1}{r_1} \right) \quad \text{Equação 6}$$

Quanto maior for a diferença entre os raios, maior será o potencial gerado pelas diferentes pressões, acelerando a ocorrência deste fenômeno, que se intensifica cada vez mais, pois quanto mais moléculas difundem, maior será a diferença de raios, de tal forma que levará à extinção as gotículas com raios pequenos. Este fenômeno cessará quando existir somente um raio, ou seja, após separação total de fases.

A estabilização contra este fenômeno é feita pela utilização de um coestabilizante que deve apresentar elevada afinidade à fase dispersa. No caso de emulsões O/A, deve-se utilizar moléculas ultra-hidrófobas<sup>24, 26</sup>. Essa característica é de fundamental importância, pois a grande afinidade pela fase dispersa e baixíssima solubilidade na fase dispersante faz com que estes compostos migrem para o interior das gotículas e permaneçam por elevados períodos de tempo sem sofrer difusão. Quando as moléculas da fase dispersa tentam difundir das partículas menores para as maiores na tentativa de reduzir a pressão interna, o volume das gotículas diminui. Como o coestabilizante permanece no interior da gotícula sem se difundir, a concentração aumenta e altera a pressão osmótica, que contrabalança

a pressão de Laplace (Figura 10 – B). Este fenômeno ocorre até que se atinja o equilíbrio entre as duas pressões e, conseqüentemente reduzindo a velocidade do envelhecimento por *Ostwald ripening*<sup>23, 26</sup>.

A obtenção de emulsões com baixa polidispersão de tamanhos também reduz a velocidade de ocorrência deste fenômeno. Porém, mesmo após atingir a igualdade entre os raios e balanço entre as pressões osmótica e de Laplace, este mecanismo vai continuar ocorrendo, em menor escala, devido à contribuição da tensão interfacial.

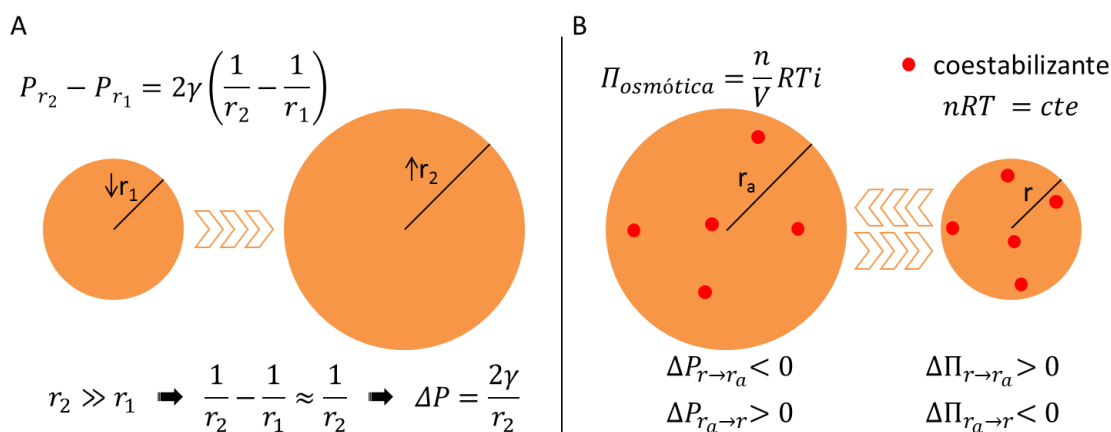


Figura 10 – A) Esquema de desestabilização de emulsões via envelhecimento por *Ostwald ripening*. B) Esquema de estabilização de emulsões mediada pela adição de coestabilizante contra desestabilização por *Ostwald ripening*

### 3.1.4 COALESCÊNCIA

A coalescência é o fenômeno no qual há a diminuição do número de partículas dispersas por fusão entre duas ou mais gotículas, resultando em raios maiores, e, conseqüentemente levando à quebra da emulsão. Este mecanismo ocorre mediado pelo equilíbrio termodinâmico, conforme representado na Equação 1, uma vez que  $\Delta G$  diminui ao passo que a coalescência reduz a área interfacial, que tende reduzir até o valor mínimo possível, ou seja, formação de duas fases distintas. A coalescência é o resultado final de todos os outros fenômenos citados anteriormente.

### 3.2 GOMAS NATURAIS

Polímeros naturais têm atraído a atenção de vários setores da indústria por possuírem uma vasta aplicabilidade, com características interessantes, tais como a biocompatibilidade, facilidade de obtenção, baixa toxicidade, baixo custo, tornando-os mais atrativos do que os polímeros sintéticos e semissintéticos, sendo utilizados pelas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, tintas, têxtil, adesivos dentre outras. A demanda destes biopolímeros está aumentando e novas fontes estão sendo exploradas a fim de suprir esta necessidade do mercado<sup>7</sup>.

Os biopolímeros podem ser obtidos a partir de diversas fontes<sup>7</sup>:

- a) **Origem marinha/algas:** ágar, carragenanas, ácido algínico e laminarina;
- b) **Origem vegetal:**
  - i) **Exsudatos gomosos de arbustos/árvores:** goma arábica, goma *ghatti*, goma *karaya*, goma tragacanta, goma *khaya*, goma albizia;
  - ii) **Gomas de semente:** goma guar, goma alfarroba, amido, amilose e celulose;
  - iii) **Extratos:** pectina, goma lariço;
  - iv) **Tubérculos e raízes:** amido de batata;
- c) **Origem animal:** quitina e quitosana, sulfato de condroitina, ácido hialurônico;
- d) **Origem microbiana (bacteriana e fúngica):** xantana, dextrana, curdlana, pululana, *zanflo*, *emulsan*, *Baker's yeast glycan*, esquizofilana, lentinano, *krestin* e escleroglucana<sup>7</sup>.

Gomas de exsudato estão entre as gomas naturais mais antigas, que são usadas desde a antiguidade como agentes espessante e estabilizante, como por exemplo a goma de acácia, conhecida como goma arábica, usada pelos egípcios no processo de mumificação e como espessante e estabilizante de pigmentos<sup>4-7</sup>. Exsudatos gomosos são produzidos por várias árvores e arbustos sendo considerados um produto patológico, formado como resposta fisiológica à injúria sofrida pelo vegetal ou por condições desfavoráveis, tais como escassez de água, rompimento de parede celular, como um mecanismo de defesa natural, particularmente em regiões semiáridas<sup>6-7, 28</sup>.

As gomas de exsudato são uma potencial fonte de obtenção de agentes emulsificantes naturais, como por exemplo a goma tragacanta oriunda da *Astracantha gossypina* (Fisch.)<sup>229</sup>, goma odina obtida da espécie *Odina wodier* (Roxb.)<sup>30</sup>, goma de *Moringa oleífera* (Lam.)<sup>31</sup>, goma *ghatti* da espécie *Anogeisus latifolia* (Roxb. ex DC.) Walich ex Bedome<sup>32</sup>, goma *karaya* (*Sterculia urens* Roxb)<sup>33</sup> e goma arábica obtida das espécies *Acacia senegal* (L.) Willdenow e *Acacia seyal* Delile<sup>34</sup>.

### 3.3 GOMA ARÁBICA

A goma arábica, também conhecida como goma acácia, é a mais antiga e a mais conhecida das gomas naturais.

É um heteropolissacarídeo complexo, altamente ramificado, ligeiramente ácido obtido como uma mistura de sais de cálcio, magnésio e potássio, pertencente ao grupo das arabinogalactanas obtida a partir de exsudato gomoso de árvores das espécies *A. senegal* e *A. seyal*<sup>5-6, 9, 34-35</sup>.



Figura 11 – Árvore de *Acacia senegal* com goma exsudada em seu tronco<sup>31</sup>

Esta goma pode ser dividida em três frações: fração arabinogalactana, fração arabinogalactana-proteína e fração glicoproteica.

*Arabinogalactana (AG)*: Representa cerca de 85% da composição total da goma arábica. É composta por uma cadeia principal de  $\beta$ -D-galactopiranosose com ligação 1 $\rightarrow$ 3 e cadeias laterais compostas por duas a cinco unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose ligadas à cadeia principal por ligações 1 $\rightarrow$ 6. Ambas as cadeias contêm unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranose,  $\alpha$ -L-ramnopiranosose,  $\beta$ -D-glucuronopiranosose, e 4-O-metil- $\beta$ -D-glucuronopiranosose, sendo os dois últimos principalmente como unidades terminais<sup>4, 6, 28, 35-43</sup> (Figura 12). É classificada como um polieletrólito pertence ao grupo das arabinogalactanas.

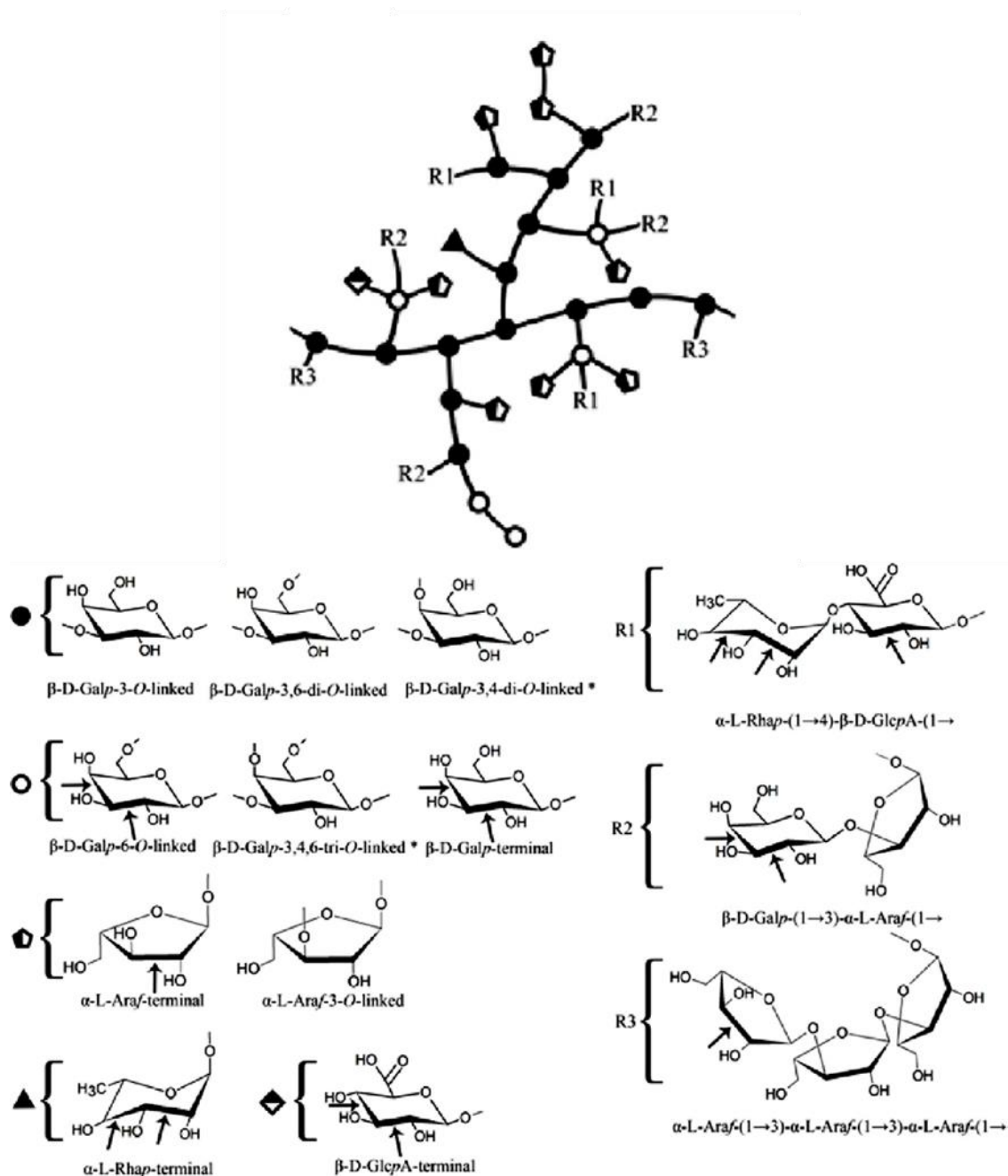


Figura 12 – Modelo estrutural proposto para a fração arabinogalactana da goma arábica<sup>63</sup>.

*Arabinogalactana-proteína (AGP)*: Representa cerca de 10% da composição total da goma arábica. Este complexo é composto por um complexo formado por várias cadeias polissacarídicas ligadas a uma cadeia de proteína, formando uma estrutura conhecida como “wattle blossom” (Figura 13) com valores de  $\bar{M}_w$  por volta de  $1 \times 10^6$  a  $2 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup><sup>34</sup>.

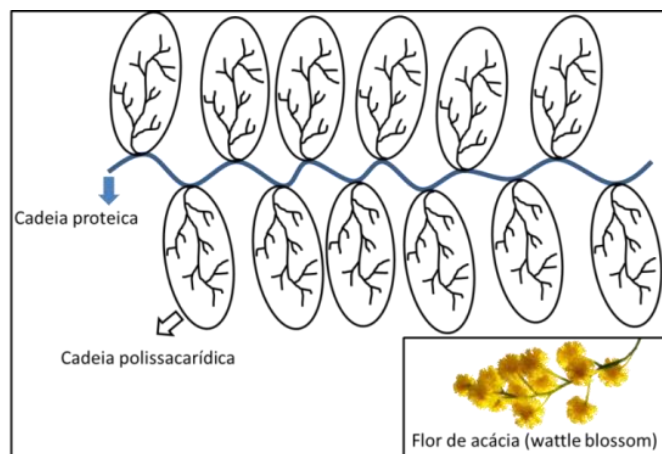


Figura 13 – Estrutura proposta para AGP: modelo "wattle blossom"

A cadeia proteica possui caráter anfótero devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos provenientes dos resíduos de aminoácido que a compõe (Tabela 2), enquanto que a cadeia polissacarídica é hidrofílica. Por causa destas características a fração AGP possui um importante papel na estabilização de interfaces.

Tabela 2 – Composição de aminoácidos da Goma Arábica (resíduos/1000 resíduos)

Classificação <sup>a</sup>	Aminoácidos	PHILLIPS e WILLIAMS, 2000	RENARD <i>et al.</i> , 2006
Apolar	Ala	28	44
	Ile	11	33
	Leu	70	68
	Phe	30	40
	Val	35	46
	Pro	64	72
	Gly	53	55
Polar	Ser	144	108
	Thr	72	72
	Tyr	13	13
	Cys	3	0
	Met	2	0
	Hyp	256	229
Eletricamente Carregado	Asp	91	48
	Lys	27	34
	Glu	36	47
	Arg	15	30
	His	52	61

<sup>a</sup> Classificação dos aminoácidos segundo composição da cadeia lateral - Pennsylvania State University



Quando presente em uma emulsão, o complexo migra e muda de conformação na interface óleo/água para que os aminoácidos hidrofóbicos da cadeia proteica interajam com a fase oleosa e os aminoácidos hidrofílicos, juntamente com as cadeias polissacarídicas interajam com a fase aquosa, formando um filme coloidal na gotícula emulsionada, promovendo a estabilização do sistema via mecanismo estérico e por hidratação<sup>44-47</sup> (Figura 14). Os grupos ácidos, presentes na porção polissacarídica, quando ionizados aumentam a estabilidade do sistema por repulsão eletrostática, evitando a aproximação das partículas estabilizadas enquanto que as hidroxilas interagem favoravelmente com o meio aquoso.

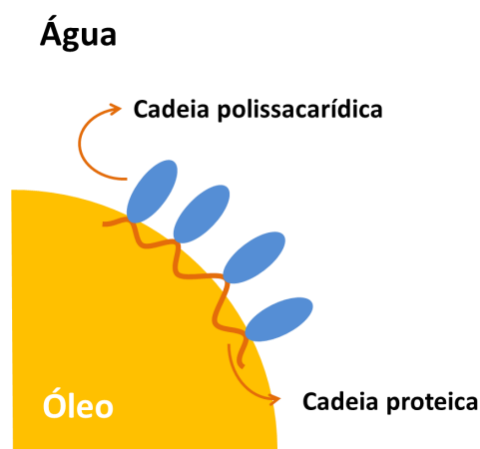


Figura 14 – Esquema de estabilização interfacial pela AGP - modelo "wattle blossom"

*Glicoproteína (GP)*: Representa cerca de 5% da composição total da goma arábica. É composta principalmente por cadeias proteicas/peptídicas livres. Estas cadeias livres também podem exercer uma função estabilizadora em sistemas emulsionados dependendo da sua composição de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos, conforme mencionado anteriormente.

Em se tratando no efeito estabilizante de sistemas emulsionados, um fator muito importante que deve ser levado em consideração é o tamanho das cadeias envolvidas no processo de estabilização interfacial, pois afeta diretamente na mobilidade das moléculas no meio, ou seja, a velocidade de difusão. Como a estabilização ocorre mediante um equilíbrio dinâmico, onde as moléculas estão em constante movimento, o coeficiente de difusão implicará em quão rápido a migração ocorrerá para que a interface óleo/água seja devidamente estabilizada. Outro fator que interfere é a acessibilidade conformacional dos grupos de aminoácidos, pois estes devem ter disponibilidade para interagirem com a interface, caso contrário não irão contribuir no processo de estabilização<sup>48-49</sup>.

### 3.4 ACÁCIA-NEGRA

A acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild) é uma espécie florestal nativa da Austrália que foi introduzida no Brasil, no Estado do Rio Grande do Sul. Sua casca é utilizada para obtenção de taninos e a madeira é utilizada para a fabricação de papel, celulose e produção de carvão, lenha, chapas de aglomerados e cavacos. Atualmente, estima-se que a área plantada seja de mais de 500 mil hectares no mundo, sendo que cerca de 200 mil hectares encontram-se no Brasil, envolvendo por volta de 10 mil pequenos produtores rurais<sup>12-14, 45</sup>. A acácia-negra produz um exsudato gomoso a partir dos galhos e troncos e contém em sua composição ramnose, arabinose, galactose, ácido glucurônico e derivados<sup>45, 49-50</sup>.

Grein *et al.* (2013) Caracterizou os polissacarídeos de acácia-negra como uma arabinogalactana ácida e heterogênea com presença de proteína que possui atividade emulsificante que foi relacionada à presença de moléculas de baixa massa molar da fração glicoproteína, que adsorvem preferencialmente em superfícies hidrofóbicas, em conjunto com a pouca quantidade de ácidos urônicos (~ 4% m/m) e alto grau de ramificação.



Figura 15 – Árvore de acácia-negra com goma exsudada em seu tronco<sup>51</sup>

Outras árvores cultivadas no Brasil também, produtoras de exsudatos gomosos já foram estudados com a finalidade de uso como matéria-prima para a indústria, como no caso do cajueiro (*Anacardium occidentale*), angico (*Anadenanthera macrocarpa*), timbaúba (*Enterolobium contortisiliquum*), Albizia lebeck, ciriguela (*Spondia purpurea*) e chichá (*Sterculia striata*)<sup>52</sup>. A acácia-negra (*Acacia mearnsii*) apresenta um grande potencial como produtora de polissacarídeo para uso em processos industriais.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

A goma arábica utilizada nesse projeto foi obtida da empresa Sigma-Aldrich. O óleo de soja utilizado foi da empresa Bunge, marca Soya – densidade 25°C: 0,914 a 0,922 g mL<sup>-1</sup>; viscosidade a 20°C: 59 cP<sup>53, 54</sup>. Membrana de diálise de éster de celulose (12–14 kDa M<sub>r</sub> cut-off, Spectra/Por<sup>®</sup>). A goma de acácia-negra foi coletada das árvores de *Acacia mearnsii* De Wild, coletada na região do Vale do Rio dos Sinos, pela Empresa Seta S.A., no primeiro trimestre de 2012 e estocada a -4°C até ser submetida aos processos de extração.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE ACÁCIA-NEGRA

Os polissacarídeos de acácia-negra foram extraídos segundo metodologia descrita por Simas Tosin<sup>28</sup>. Esta metodologia consiste na extração da goma bruta em água seguida por extração em meio alcalino, conforme descrito no esquema da Figura 16.

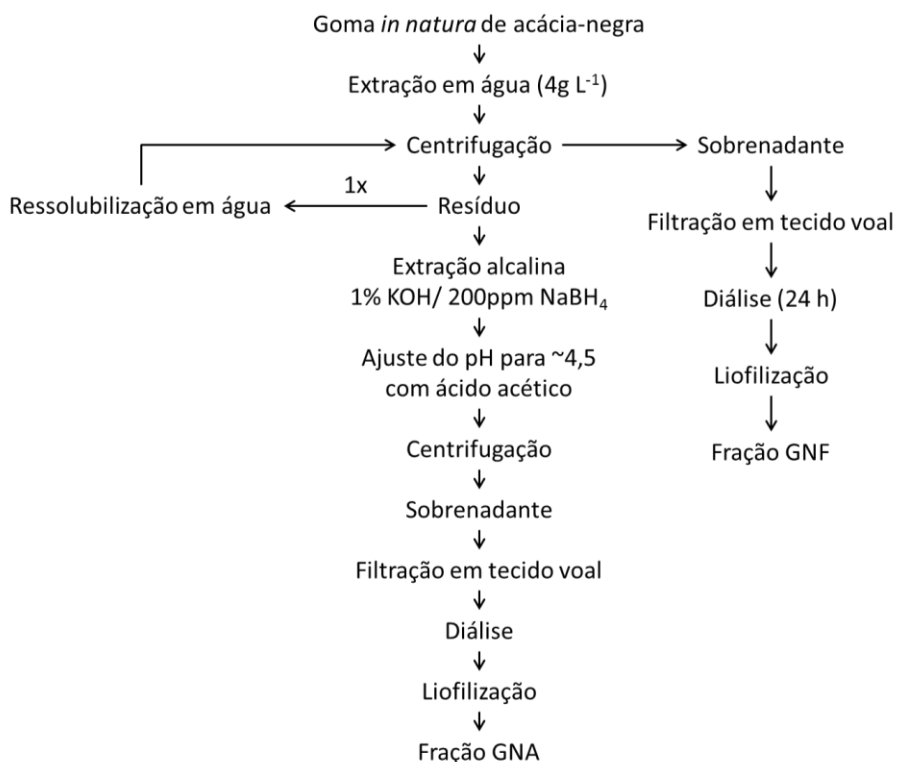


Figura 16 – Esquema do processo de extração das frações GNF e GNA a partir da goma *in natura* de árvores de *Acacia mearnsii* de Wild (acácia-negra)

#### 4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA ( $\bar{M}_w$ ) E POLIDISTRIBUIÇÃO (PD) DOS POLISSACARÍDEOS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA

A cromatografia de permeação em gel (GPC) foi realizada no Laboratório de Biopolímeros (Biopol – DQ/UFPR) em equipamento *Viscotek* com tripla detecção (índice de refração, espalhamento de luz a 90°, viscosímetro diferencial) conectado à coluna Shodex SB-806M HQ (número de pratos teóricos  $\geq 12000$ , limite de exclusão: 20000 g mol<sup>-1</sup> padrão pululana) acoplado a um detector de UV. As análises foram realizadas sob fluxo de 0,4 mL min<sup>-1</sup> com loop de 100  $\mu$ l, a 40°C com solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> como fase móvel. As amostras foram preparadas nas concentrações de 1 mg ml<sup>-1</sup> utilizando a fase móvel como solvente com 24 h de antecedência, sendo previamente filtradas em filtro de éster de celulose com porosidade de 0,22  $\mu$ m imediatamente antes da injeção no equipamento.

Os cromatogramas foram deconvoluídos a partir dos dados brutos com o auxílio dos programas *Origin* versão 8.0 para delineamento da linha de base e *Fityk* versão 0.8.9 para gerar as curvas ajustadas usando o método *Nelder-Mead simplex* e modelo gaussiano. Após as curvas serem ajustadas, a massa molar ponderal média ( $\bar{M}_w$ ) e polidistribuição (PD) foram calculados segundo Equações 7-13:

Calibração do detector de Índice de refração (RI) para determinação da concentração:

$$FC_{RI} = \frac{\eta_0 \sum RI_i^{Padr\tilde{a}o}}{(dn/dc)_{loop} \sum C_i^{Padr\tilde{a}o}} \quad \text{Equação 7}$$

Conversão dos dados gerados pelo detector de RI (mV) em valores de concentração (mg ml<sup>-1</sup>):

$$C_i = \frac{\eta_0 RI_i}{(dn/dc)_{loop} FC_{RI}} \quad \text{Equação 8}$$

Normalização do detector de Espalhamento de luz a 90° (RALS) para determinação da massa molar absoluta:

$$FC_{RALS} = \frac{\sum RALS_i^{Padr\tilde{a}o}}{(dn/dc)^2 \bar{M}_w^{Padr\tilde{a}o} massa} \quad \text{Equação 9}$$

Conversão dos dados gerados pelo detector de RALS (mV) em valores de  $M_w$  e  $M_n$  ( $\text{g mol}^{-1}$ ):

$$Mw_i = \frac{RALS_i}{\text{massa}(dn/dc)^2 FC_{RALS}} \quad \text{Equação 10}$$

$$\bar{M}_w = \frac{\sum M_{wi} C_i}{\sum C_i} \quad \text{Equação 11}$$

$$\bar{M}_n = \frac{\sum C_i}{\sum C_i / M_{wi}} \quad \text{Equação 12}$$

$$PD = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} \quad \text{Equação 13}$$

As curvas de ajuste usadas nas amostras GNF e GNA obtiveram, respectivamente, os valores de  $r^2_{\text{GNF}} = 0,986999$  e  $r^2_{\text{GNA}} = 0,995415$ .

A calibração foi conferida utilizando um padrão de dextrana com massa de  $70675 \text{ g mol}^{-1}$ , o que gerou os resultados de  $\bar{M}_w = 76500 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $PD = 1,16$  com recuperação de  $93,4\%$ .

#### 4.2.3 ESTUDO DO CONTEÚDO PROTEICO E DA FRAÇÃO ARABINOGALACTANA-PROTEÍNA (AGP) NAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA

O conteúdo de proteína foi analisado pelo método colorimétrico desenvolvido por Lowry (1951) e modificado por Hartree (1972)<sup>55</sup>. Este método que consiste na reação dos nitrogênios peptídicos com o íon  $\text{Cu}^{2+}$  em condições alcalinas, em presença de tartarato para evitar precipitação, forma um complexo de coordenação entre o cobre e o nitrogênio. Este complexo reage subsequentemente reduzindo o reagente de Folin-Ciocalteu (ácido Fosfomolibdotúngstico), por meio dos grupos fenol (imidazol e indol em menor proporção) presentes na proteína, formando um complexo de cor azul, medido no comprimento de onda  $650 \text{ nm}^{55-56}$ .

A curva analítica do método foi realizada com solução de albumina de soro bovino (BSA) gerando relação linear com valor de  $r^2 = 0,999$  (Figura 17).

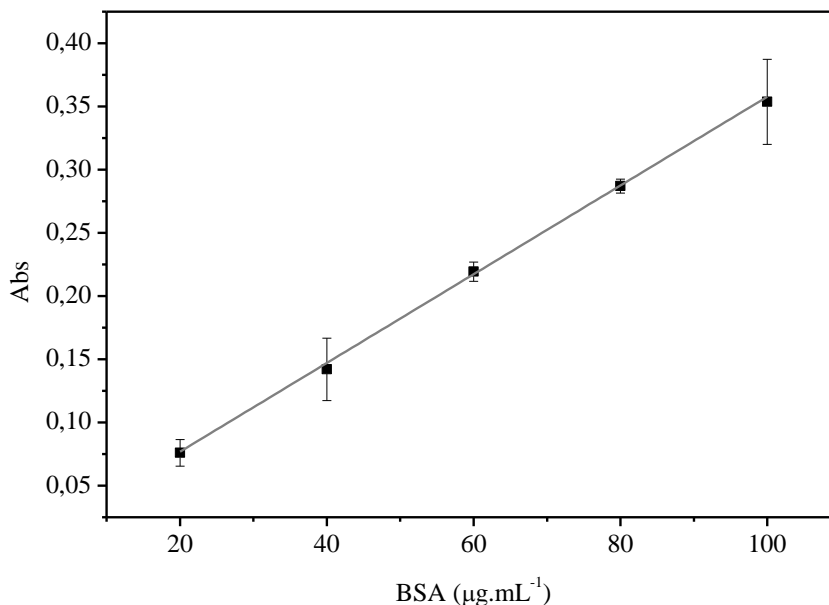


Figura 17 – Curva analítica do método de determinação de proteína usando solução aquosa de proteína de soro bovino (BSA) como padrão, com leitura em comprimento de onda de 650 nm

As amostras foram preparadas em água na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  com 24 h de antecedência para a quantificação do conteúdo proteico.

A quantificação da fração AGP foi determinada pelo método de difusão radial descrito por Gerrit-Jan van Holst em 1985<sup>57</sup> com contribuição da Dra Fernanda F. Simas Tosin e Juliana Maurer no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. Este método se baseia na precipitação da AGP pelo reagente  *$\beta$ -glucosil Yariv*. O reagente de Yariv é dissolvido em gel de agarose e então espalhado em uma superfície para formar uma placa homogênea. 4  $\mu\text{l}$  das amostras são depositadas em poços feitos nesta placa e a placa com os reagentes foi deixada em repouso por 18 h. O diâmetro dos halos formados, que corresponde à precipitação do AGP pelo reagente de Yariv, é medido em milímetros com o auxílio de um paquímetro (Figura 18). O quadrado do diâmetro dos halos formados apresenta relação linear com a concentração de AGP nos limites de 0,25  $\mu\text{g}$  a 3,0  $\mu\text{g}$  de AGP com erro de 7%<sup>57</sup>.

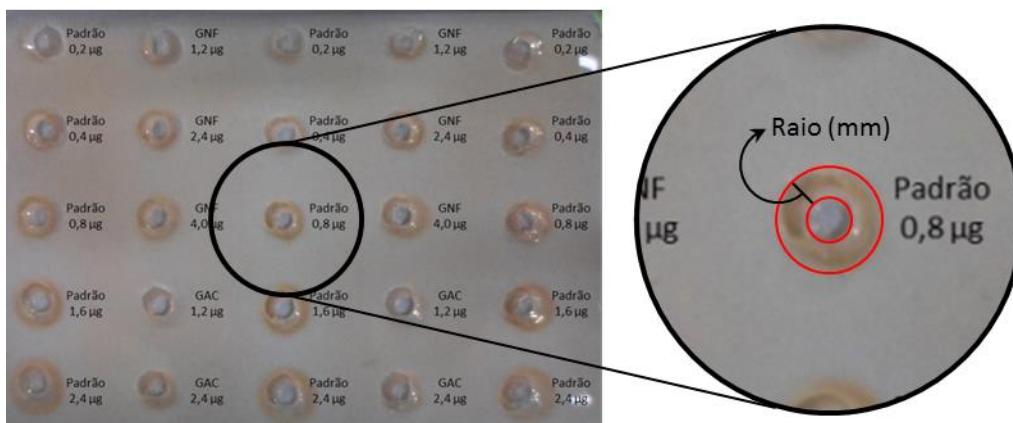


Figura 18 – Esquema de medida dos halos de difusão para quantificação da fração AGP pela metodologia de difusão radial

Foi utilizada goma arábica comercial como padrão de AGP e as amostras foram preparadas em solução de NaCl 1% (m/v). A curva analítica do método obteve relação linear com valor de  $r^2 = 0,999$  (Figura 19).

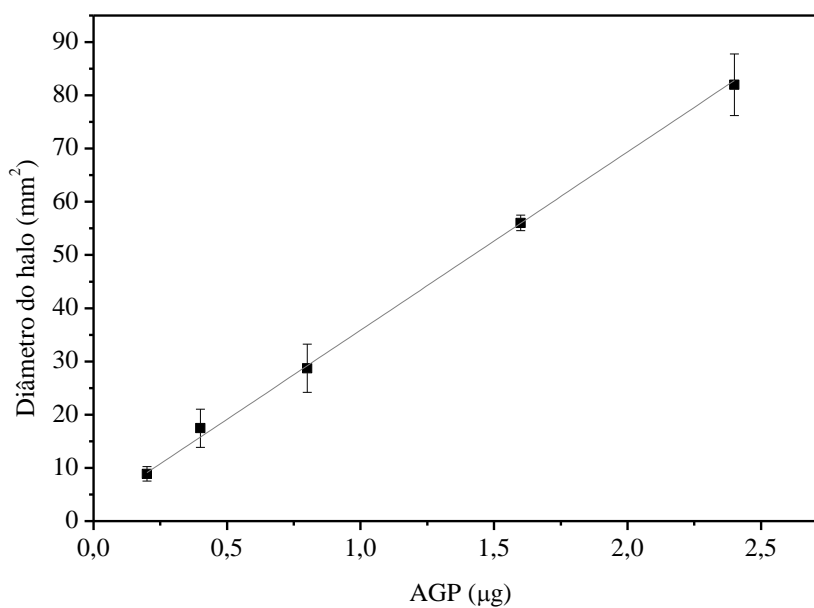


Figura 19 – Curva analítica do método de determinação de AGP

As amostras foram preparadas em solução de NaCl 1% (m/v) nas concentrações de 1, 0,6 e 0,3 mg mL<sup>-1</sup> com 24 h de antecedência para a quantificação da fração AGP.

#### 4.2.4 ESTUDO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS URÔNICOS NAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA

O conteúdo de ácidos urônicos foi determinado segundo metodologia descrita por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991)<sup>58</sup>. Neste método os ácidos urônicos reagem com *m*-hidroxidifenil em meio fortemente ácido formando complexos de coloração rosa, tendo a sensibilidade da reação aumentada pelo tetraborato. O sulfamato suprime a formação de pigmentos marrons gerados por açúcares neutros, reduzindo a interferência destes compostos na análise<sup>59</sup>.

A curva analítica do método foi realizada com solução de ácido galacturônico (25 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) gerando relação linear com valor de  $r^2 = 0,994$  (Figura 20).

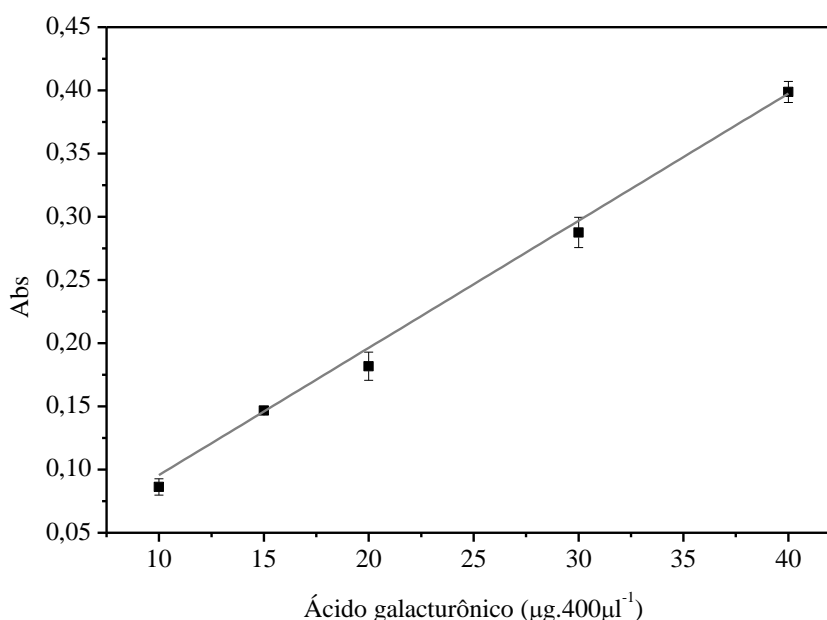


Figura 20 – Curva analítica do método de determinação de ácidos urônicos usando solução aquosa de ácido galacturônico como padrão, com leitura em comprimento de onda de 525 nm

As amostras foram preparadas em água ultrapura na concentração de 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  com 24 h de antecedência para a quantificação do conteúdo de ácidos urônicos.

#### 4.2.5 ESTUDO DA ATIVIDADE TENSOATIVA DAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR TENSIOMETRIA

As medidas de tensão superficial e determinação da concentração de agregação crítica (CAC) e concentração micelar crítica (CMC) foram realizadas pelo método da



gotícula pendente em tensiômetro *DataPhysics OCA15 plus* e programa *SCA20*. Este método consiste na avaliação do perfil de uma gotícula em equilíbrio com a força da gravidade. A equação de Laplace-Young (Equação 14) foi utilizada para determinação da tensão interfacial. No momento da medida ambos os raios de curvatura encontram-se em equilíbrio.

$$\Delta P = \gamma \left( \frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \quad \text{Equação 14}$$

Para as medidas experimentais foi utilizado uma seringa Hamilton de 500  $\mu\text{L}$  de volume com agulha de 38,1 mm de comprimento e diâmetros interno e externo de 1,65 mm e 0,91 mm, respectivamente. As amostras foram preparadas em água ultrapura em concentrações variando de 1 a 150  $\text{mg mL}^{-1}$  com 24 h de antecedência. Os resultados são médias aritméticas de 10 medidas.

#### 4.2.6 DETERMINAÇÃO DO $pK_a$ DAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

Os valores de  $pK_a$  dos polissacarídeos foram calculados experimentalmente por titulação potenciométrica realizadas por José Guilherme Lopes Ferreira no Grupo de Catálise e Cinética coordenada pela professora Elisa S. Orth. As titulações foram realizadas em uma célula de vidro, de parede dupla, com capacidade de 150 mililitros. Esse sistema foi mantido fechado, com a temperatura controlada por um banho termostatizado a 25°C, sob agitação magnética. A solução alcalina utilizada foi adicionada à célula de vidro, com pequenos incrementos de 0,1008 mol de KOH livre de  $\text{CO}_2$ , com o auxílio de uma micropipeta e o pH medido após cada adição. Todas as precauções foram tomadas para eliminar carbonato e  $\text{CO}_2$  durante a titulação. O tratamento dos resultados experimentais foi feito com o software BEST7 que permite determinar as constantes de dissociação ( $pK_a$ ) para cada amostra, usando o valor de -13,78 para a constante de dissociação da água ( $pK_w$ )<sup>60</sup>.

#### 4.2.7 PREPARO DAS EMULSÕES

Inicialmente foram preparadas soluções dos polissacarídeos em estudo pesando 34,5  $\text{mg mL}^{-1}$  de GAC, GNF ou GNA em um tubo de ensaio de 15 mL de capacidade, adicionando-se água ou solução salina (0,9% m/m) e mantendo agitação magnética constante, à temperatura ambiente, por 24 h. O óleo de soja foi adicionado à solução, na

proporção 9:1, resultando em composição final de 10% de óleo, 3% de polissacarídeo e 87% de água e em seguida homogeneizada utilizando-se um homogeneizador Marca Ultra Stirrer, modelo Ultra 80, com velocidade de 13000 rpm por 2 minutos.

#### 4.2.8 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DAS EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS PELAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA

As medidas de potencial zeta foram realizadas em equipamento *Zetasizer nano series ZS90* (Malvern Instruments), em colaboração com o Dr. Mateus Borba Cardoso do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) e Dr. Paulo Vitor Farago da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

As emulsões foram preparadas pela mistura de GAC, GNF ou GNA na concentração de 34,5 mg mL<sup>-1</sup> em água ultrapura (preparada com 24 h de antecedência) com óleo de soja na proporção 9:1, resultando em composição final de 10% de óleo, 3% de polissacarídeo e 87% de água e homogeneizada por injeção durante 5 minutos e diluída 250 vezes no momento da análise.

Para as medidas realizadas em função da concentração salina, concentrações variadas de NaCl foram adicionadas na fase de diluição.

Para as medidas de potencial zeta em função do pH, as diluições das emulsões preparadas tiveram o pH corrigido por adição de soluções de NaOH ou HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.9 ACOMPANHAMENTO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS PELAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR ANÁLISE DO PERFIL DE FASES

As emulsões preparadas de acordo com o item 4.2.7 foram deixadas em repouso à temperatura ambiente e o perfil de fases foi acompanhado nos tempos 1, 2, 8, 16 e 22 dias a 25°C por avaliação macroscópica conforme esquema ilustrado na Figura 21. As medidas foram realizadas com o auxílio do programa *ImageJ*<sup>61-62</sup> versão 1.45s e percentuais de espuma (Esp%), emulsão (Emu%) e fase aquosa (Aqu%) foram calculados pela Equação 15, Equação 16 e Equação 17 respectivamente.

$$Esp\% = \frac{h_{espuma}}{h_{total}} 100 \quad \text{Equação 15}$$

$$Emu\% = \frac{h_{emulsão}}{h_{total}} 100 \quad \text{Equação 16}$$

$$Aqu\% = \frac{h_{aquoso}}{h_{total}} 100 \quad \text{Equação 17}$$

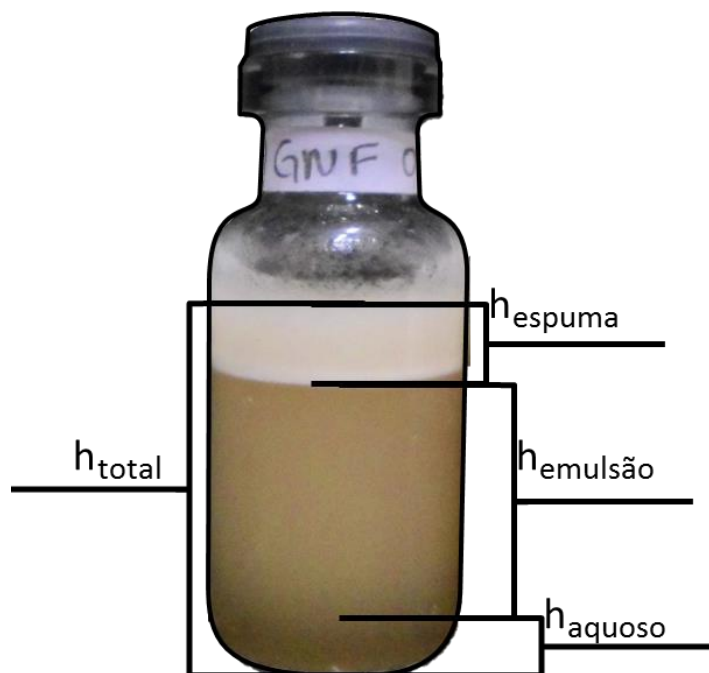


Figura 21 – Esquema de determinação das fases da emulsão

Esp%, Emu% e Aqu% são medidas visuais, que avaliam o grau de separação de fases de uma emulsão em função do tempo, onde Aqu% mede o volume da fase dispersa separada, ou seja, quanto maior for este valor, menor a estabilidade do sistema. A medida Emu% mede o volume da fase emulsionada, ou seja, quanto menor for a variação deste valor ao longo do tempo, melhor será a estabilidade do sistema. Esp% pode ser correlacionado diretamente com o potencial estabilizador, pois esta fase é composta pela mistura de ar (hidrofóbico) e água (mistura gás/líquido), apresentando comportamento semelhante às emulsões (mistura líquido/líquido).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

#### 5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA MASSA MOLAR PONDERAL MÉDIA ( $\bar{M}_w$ ) E POLIDISTRIBUIÇÃO (PD) DOS POLISSACARÍDEOS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA

Todas as amostras eluíram aproximadamente no mesmo intervalo, porém, com perfis distintos. Tipicamente a goma arábica apresenta componentes de alta e baixa massa molar, conforme relatado na literatura<sup>36,46</sup>. Segundo a composição típica da goma arábica, a fração AGP representa ~10% da goma, sendo relatada como um complexo de polissacarídeos e polipeptídeos de elevada massa molar, associados covalentemente em uma conformação específica<sup>43</sup>. Desta forma a fração AGP deve eluir em volumes menores e espera-se ser identificado um intenso sinal no detector de UV<sub>280nm</sub>. O principal componente da goma é a fração AG, que corresponde cerca de 90% e possui ~1% de proteína, sendo esperado que elua em volumes intermediários, com menos intenso. Por fim, a última fração, GP, que corresponde a aproximadamente 1% da goma total, é composta por complexos de baixa massa molecular, com concentrações por volta de 50% de proteína, que deve eluir em volumes mais altos com intenso sinal de UV<sub>280nm</sub>. As curvas de GPC obtidos pelo detector de índice de refração foram deconvoluídos devido à complexidade apresentada. Os picos estão representados na Figura 22 e os resultados resumidos na Tabela 3. Para GAC, dois picos bem definidos foram gerados pelo detector de índice de refração. O pico 1, o que corresponde a 93,9% da concentração molecular total, eluiu em 8,5 ml acompanhado por detecção UV, sugerindo a presença de AGP nesta amostra. O pico 2, o que corresponde à contribuição molecular total menor (6,1%) eluiu em maiores volumes (centrado em 11,7 ml) e não tem qualquer detecção UV significativa, indicando a presença de hidratos de carbono de baixa massa molecular. GNF apresentou cinco picos. O pico 1 é associado a um sinal de UV intenso e alta  $\bar{M}_w$  ( $6 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup>) atribuída à presença de AGP (23,7% do total). Os picos de 2, 3 e 4 podem ser atribuídos ao componente principal AG (~70% do total), associado a um sinal de UV de baixa intensidade. O pico 5, que não gerou sinal no UV, corresponde a 8% da concentração molecular total e pode ser atribuído à fração AG de baixa massa molecular. Para GNA, três picos foram observados após a deconvolução de sinais. O pico 1, que eluiu a cerca de 8 mL, mostrou um intenso sinal de UV, indicando a presença de AGP de elevada massa molecular (9,2% do total). O pico 2, (~9 mL), mostrou

uma resposta UV menos intensa e compõe 25% da concentração molecular total. O pico 3, que representa a maior contribuição para a concentração molecular total (~66%), gerou uma detecção UV intensa, sugerindo a presença de GPs ou AGPs de baixa massa molecular nesta fração. Analisando os resultados de GPC, GNF é mais rica em AGP, GNA em GP ou AGP de baixa massa molecular e GAC contém a menor concentração de proteínas, concordando com a determinação do teor de proteína total (Figura 23 – A).

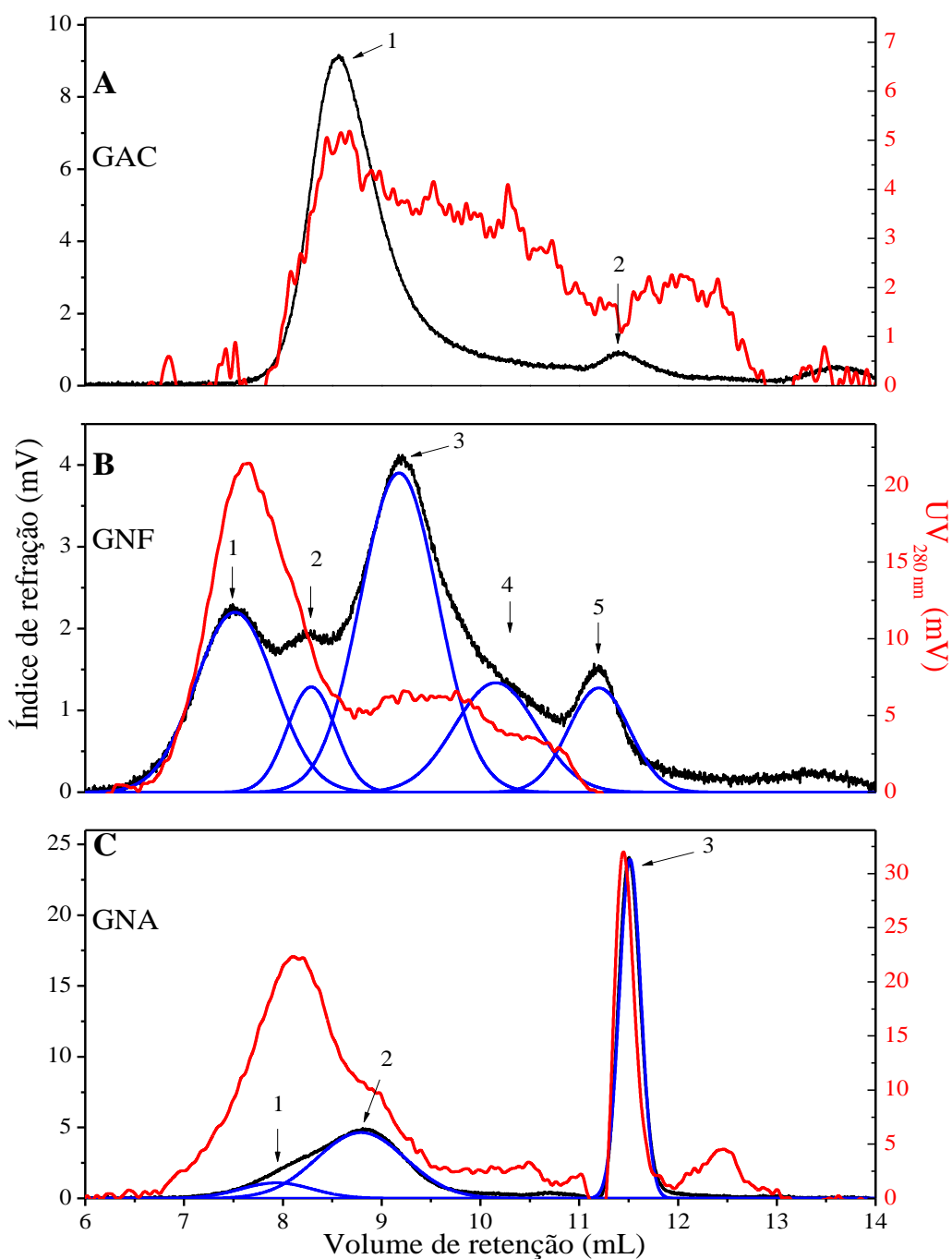


Figura 22 – Perfil cromatográfico da análise de GPC. Linhas pretas representam sinal de índice de refração; linhas azuis representam sinal de índice de refração deconvoluído; linhas vermelhas representam sinal do detector de UV – sinal captado no comprimento de onda de 280 nm. A) Amostra GAC. B) Amostra GNF. C) Amostra GNA

Tabela 3 – Dados de GPC deconvoluídos das amostras GAC, GNF, e GNA

Amostra	Pico	Área	Centro (mL)	$\bar{M}_w$ ( $10^3$ g mol <sup>-1</sup> )	PD	Contribuição
GAC	1	8,3	08,9	644	1,17	93,9%
	2	0,5	11,7	307	1,29	06,1%
GNF	1	2,1	07,7	6445	1,28	23,7%
	2	0,9	08,5	4148	1,44	10,0%
	3	3,3	09,3	730	1,66	36,1%
	4	1,9	10,2	750	1,48	21,9%
	5	0,7	11,4	370	1,21	08,2%
GNA	1	0,9	07,8	3404	1,06	09,2%
	2	2,5	08,7	590	2,47	25,0%
	3	6,5	11,4	7	1,74	65,8%

Segundo os dados da Tabela 3, as amostras podem ser separadas em função do tamanho das cadeias moleculares, sendo que GNF possui moléculas maiores, com maior polidistribuição de tamanhos, seguida por GAC, com cadeias de tamanho intermediário e GNA com grande concentração de cadeias pequenas.

O sinal do detector de UV<sub>280nm</sub> revela a presença de proteína. Para GAC este sinal está presente em toda a extensão do cromatograma, indicando que as cadeias proteicas estão distribuídas em todas as frações da amostra. Já para GNF este sinal é mais acentuado na região I, permanece com menor intensidade na II e ausente na III, o que significa que a maioria das cadeias proteicas possuem elevadas massas molares. A amostra GNA também apresentou sinal de UV em todos os picos cromatográficos, indicando que as cadeias proteicas estão distribuídas entre as moléculas de altas e baixas massas molares, sendo que estas possuem concentrações maiores na região de cadeias de baixa massa molar do que observado para a amostra GAC.

### 5.1.2 ESTUDO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS URÔNICOS, PROTEÍNA E FRAÇÃO ARABINOGALACTANA-PROTEÍNA (AGP) NAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA

O ensaio de determinação do teor proteico (Figura 23 – A), a amostra GAC apresentou menor concentração de proteína ( $3,6\% \pm 0,1$ ) do que as amostras de acácia negra, que apresentaram  $9,7\% \pm 0,1$  e  $6,9\% \pm 0,2$  para GNF e GNA respectivamente.

A quantificação do teor de ácidos urônicos (Figura 23 – B) mostrou que GAC ( $27,0\% \pm 1,0$ ) possui quase o dobro de ácidos quando comparada com as amostras de acácia negra (GNF  $15,1\% \pm 0,9$  e GNA  $14,5\% \pm 0,1$ ). Os grupos ácidos presentes nas

gomas podem sofrer ionização dependendo das condições do meio, dando a estes polissacarídeos a característica de polieletrólito. Quando ionizados aumentam a estabilidade de sistemas emulsionados por produzirem um efeito de repulsão eletrostática, evitando a aproximação das interfaces estabilizadas.

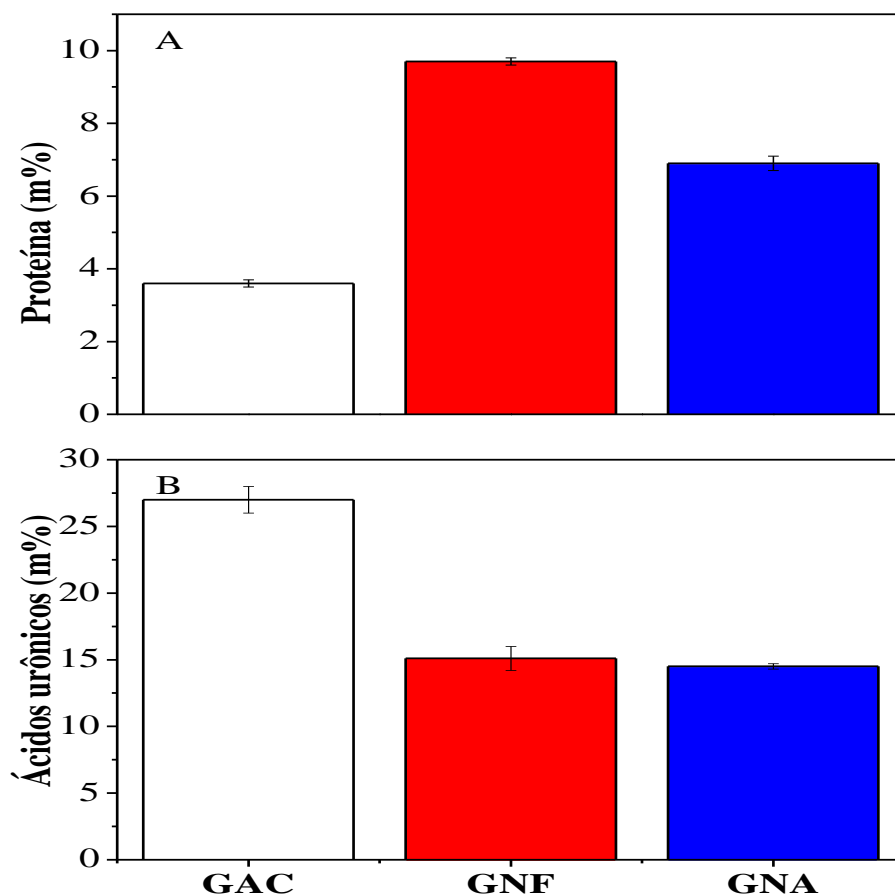


Figura 23 – A) Resultados da determinação do conteúdo proteico. B) Resultados da determinação do teor de ácidos urônicos

O resultado do ensaio de determinação de AGP necessita de uma atenção especial na comparação da quantificação entre as amostras. A metodologia usada é baseada na difusão do complexo arabinogalactana-proteína no gel de agarose contendo o reagente  *$\beta$ -glucosil Yariv*, o que a torna susceptível à interferência no resultado quantitativo devido à diferença na mobilidade dos complexos no meio, e não somente da diferença de concentração. Como a análise de GPC revelou que as três amostras apresentam valores de  $\bar{M}_w$  diferentes, bem como a distribuição das moléculas proteicas entre as frações de baixa e alta massa molar, a velocidade de difusão varia para cada amostra, interferindo na qualidade da quantificação. Todas as amostras obtiveram resultado positivo, confirmando a presença de AGP.

### 5.1.3 ESTUDO DA ATIVIDADE TENSOATIVA DAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR TENSIOMETRIA

Os resultados das medidas de tensão superficial, representados na Figura 24, revelaram a maior atividade tensoativa dos polissacarídeos extraídos da acácia negra. As amostras GAC e GNF obtiveram valores de concentração de agregação crítica (CAC) muito próximos (12,9 e 13,5 mg mL<sup>-1</sup> respectivamente) enquanto que GNA necessitou de apenas 10,5 mg mL<sup>-1</sup>. A amostra comercial atinge a concentração micelar crítica (CMC) por volta de 68 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto que a determinação da CMC para as amostras de acácia-negra não foi determinada, pois GNF não atingiu um platô na redução da tensão interfacial mesmo após concentrações superiores a 130 mg mL<sup>-1</sup> e GNA, a partir de 100 mg mL<sup>-1</sup> apresentou solubilização incompleta, interferindo no ensaio. Porém, quando comparamos a desempenho das amostras na concentração equivalente à CMC da amostra GAC a redução da tensão interfacial obtida por GNF e GNA é muito maior, sendo que GAC reduz a tensão para 63 mN m<sup>-1</sup> enquanto que GNF reduz para 56 mN m<sup>-1</sup> e GNA para 47 mN m<sup>-1</sup> (extrapolação pela equação de Boltzmann).

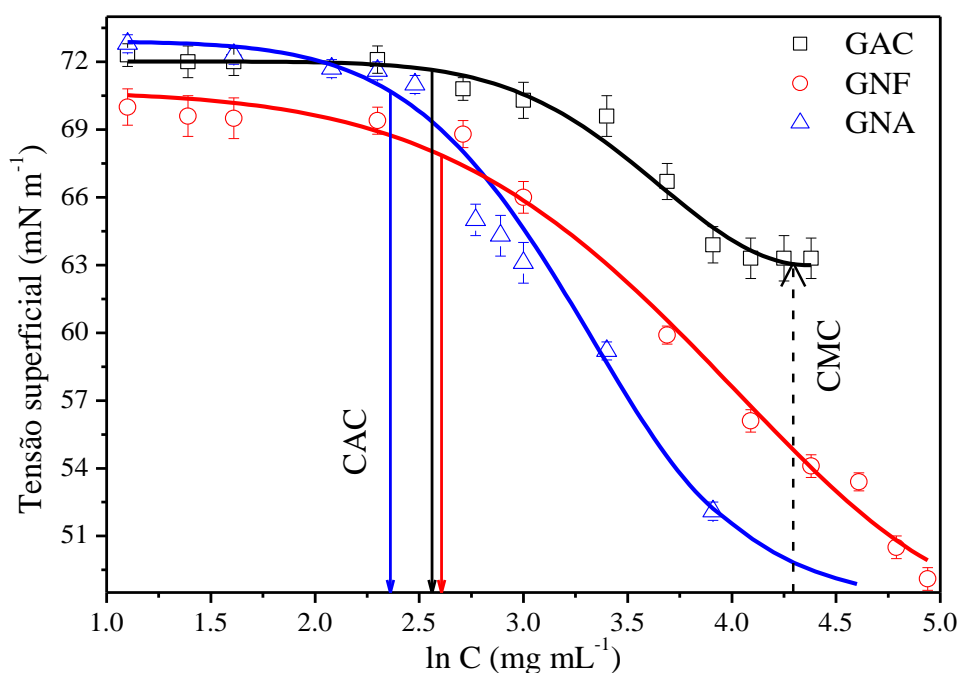


Figura 24 – Medidas de tensão interfacial dos polissacarídeos em água pelo método da gotícula pendente. As linhas sólidas correspondem às curvas ajustadas pela equação de Boltzmann. Setas sólidas correspondem aos valores de CAC e seta tracejada ao valor de CMC

Esta grande diferença obtida na atividade tensoativa pode ser atribuída à maior quantidade de proteína presente nos polissacarídeos extraídos da acácia-negra, podendo



estas constituir o complexo AGP. Segundo PHILLIPS e WILLIAMS<sup>34</sup> foi confirmada a presença de AGP em todos os picos, tanto de elevada massa molar ( $> 1 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ ) quanto em baixa massa molar ( $\sim 2 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ ) para gomas das espécies *A. senegal* e *A. seyal*, e ainda revelam composições diferentes entre os aminoácidos presentes nas regiões de diferentes massas (hidroxiprolina e serina, aminoácidos predominantes nas regiões de maior massa molar enquanto que para a região de menor massa molar a predominância é de ácido aspártico, serina, leucina e glicina. Considerando as diferentes composições, as cadeias proteicas com maior teor de leucina e glicina são mais apolares, o que favorece a interação com a interface óleo/água, o que pode favorecer o efeito tensoativo dos complexos AGP de menor massa molar. O tamanho do complexo AGP também influencia em relação à mobilidade, pois quanto menor for o tamanho do complexo, maior será a capacidade de difundir em velocidades mais elevadas para a interface (Figura 25), local onde os grupos de aminoácidos podem promover uma rápida adsorção, reduzindo a tensão interfacial<sup>9, 40, 43, 44, 59</sup>.

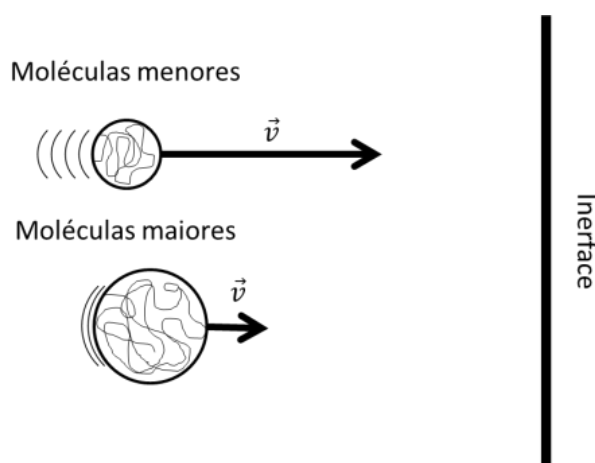


Figura 25 – Esquema da influência do tamanho das partículas na velocidade de difusão para interfaces

#### 5.1.4 DETERMINAÇÃO DO $pK_a$ DAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

Na análise de determinação do  $pK_a$  por titulação potenciométrica (Figura 26) foram obtidos dois valores de  $pK_a$  característicos. O  $pK_{a1}$  refere-se aos ácidos urônicos, sendo consistente com dados reportados na literatura<sup>60</sup>, e o  $pK_{a2}$  refere-se aos grupos de aminoácidos catiônicos presente nas proteínas<sup>61, 62</sup> (Tabela 4). As amostras consumiram quantidades diferentes de KOH para atingirem o ponto de equivalência.

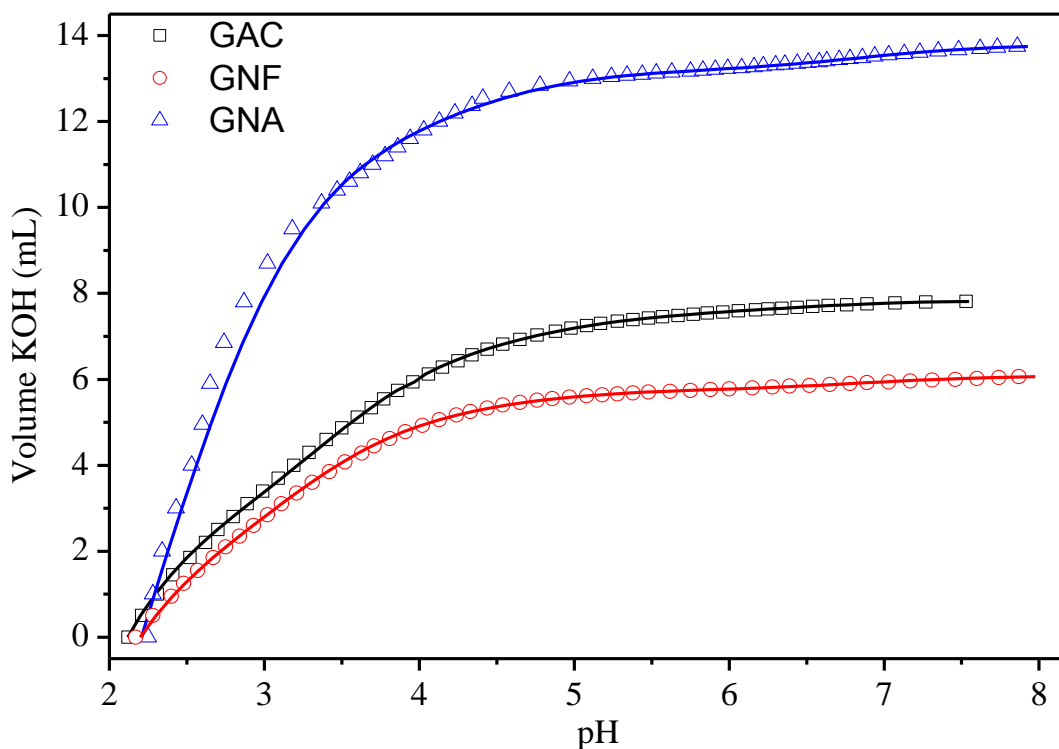


Figura 26 – Curvas de titulação potenciométrica de GAC, GNA e GNF (25 mg mL<sup>-1</sup> à 25°C) com KOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. As linhas sólidas correspondem às curvas de ajuste obtidas pelo programa BEST7

Valores de  $pK_a$  menores indicam maior força ácida, ou seja, possuem maior capacidade de estabilização das cargas negativas formadas. As moléculas de proteína contribuem para a estabilização das cargas negativas locais através da interação com os grupos catiônicos ( $-\text{NH}_3^+$ ). Seguindo este ponto de vista espera-se que a ordem crescente de acidez das amostras seja  $\text{GAC} < \text{GNA} < \text{GNF}$ , devido a maior capacidade de estabilização das cargas (Figura 23 – A). Realmente GAC apresenta o maior valor de  $pK_{a1}$ , porém GNA é mais ácida do que GNF. Esta inversão pode ser explicada pelo efeito do tamanho das cadeias, uma vez que, para que a estabilização ocorra faz-se necessário que os grupos de aminoácidos catiônicos estejam disponíveis para interagir com as cargas negativas formadas. A disponibilidade destes grupos pode ser reduzida em função do tamanho das cadeias polipeptídicas por causa do dobramento da molécula, que diminui a disponibilidade destes grupos. No caso de moléculas menores o dobramento é mais simples e limitado, o que torna os grupos mais acessíveis para a estabilização das cargas. Outro fator que influencia é a composição dos aminoácidos. Desta forma GNA apresenta a maior capacidade de estabilização de cargas e, conseqüentemente, o menor valor de  $pK_a$ .

Tabela 4 – Valores de  $pK_a$  e ponto de equivalência (P.E.) determinado para as amostras GAC, GNF e GNA (25 mg mL<sup>-1</sup> a 25°C)

Polissacarídeo	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	P.E. mmol
GAC (25 mg mL <sup>-1</sup> )	3,61 ± 0,01	6,46 ± 0,01	0,7467
GNF (25 mg mL <sup>-1</sup> )	3,37 ± 0,03	6,88 ± 0,03	0,5972
GNA (25 mg mL <sup>-1</sup> )	2,71 ± 0,04	6,86 ± 0,04	1,3705

A ordem de consumo de base necessária para atingir o ponto de equivalência entre as amostras tituladas foi GNA > GAC > GNF (Tabela 4). O consumo de base também está relacionado com a presença de proteína, pois estas possuem a propriedade de tamponar o meio e também está relacionada com a disponibilidade dos grupos amina e carboxílico. Logo GNA necessita de mais volume de KOH por ter a maior concentração de moléculas proteicas menores. A amostra GAC, apesar de possuir menor conteúdo proteico, é a segunda a consumir mais base, pois as moléculas proteicas se distribuem entre moléculas de alta e baixa massa molecular. Por outro lado, a fração GNF consome a menor quantidade de base mesmo contendo a maior concentração de proteína, o que se deve à grande concentração destas em moléculas de elevadas massas molares (sinal UV<sub>280 nm</sub> na Figura 22 – página 45).

Os valores de  $pK_{a2}$  foram similares entre as amostras GNF e GNA, o que pode ser relacionado à similaridade na natureza das proteínas.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS PELAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA

### 5.2.1 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DAS EMULSÕES

O potencial zeta das emulsões estabilizadas com os polissacarídeos foi acompanhado durante o período de 12 h e os resultados estão resumidos na Tabela 5 e Figura 27.

Tabela 5 – Determinação do potencial zeta das emulsões estabilizadas com GAC, GNF e GNA em água nos tempos 0 e 12 h

Amostra	Potencial zeta (mV)			
	0 h*		12 h	
GAC	-39,4	± 0,7	-37,6	± 1,02
GNF	-26,5	± 0,58	-25,4	± 0,64
GNA	-48,7	± 1,42	-45,2	± 0,74

\* imediatamente após o preparo

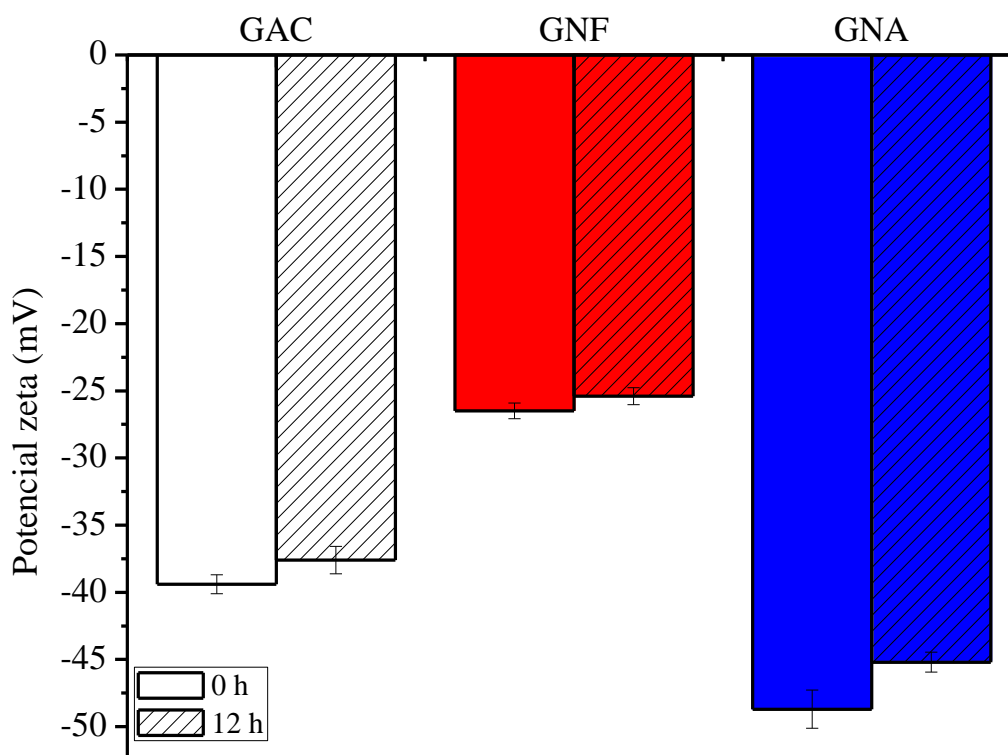


Figura 27 – Variação do potencial zeta das emulsões no período de 12 h das amostras GAC, GNF e GNA em água

A variação do potencial zeta também foi determinada frente à adição de eletrólito (NaCl) no meio (Figura 28). Os sistemas emulsionados com GAC apresentaram valores de potencial zeta variando de -40 mV, quando em ausência de eletrólitos, a -12,3 mV quando em solução contendo 154 mmol de NaCl. As emulsões estabilizadas por GNF apresentaram valores de potencial zeta de -27 mV em água e -7 mV quando em presença de 154 mmol de NaCl. As emulsões contendo GNA mostraram valores de potencial zeta de -45 mV quando em ausência de eletrólitos e -9,67 mV frente à concentração de 154 mmol de NaCl.

A teoria DLVO<sup>16-21, 23</sup> (Derjaguin e Landau, Verwey e Overbeek) explica quantitativamente a estabilização de sistemas coloidais a partir do equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas, apesar de desconsiderar a influência de outras interações como o efeito estérico de polímeros. Esta abordagem nos permite ter um entendimento mais claro sobre a relação do potencial zeta e a estabilização de emulsões.

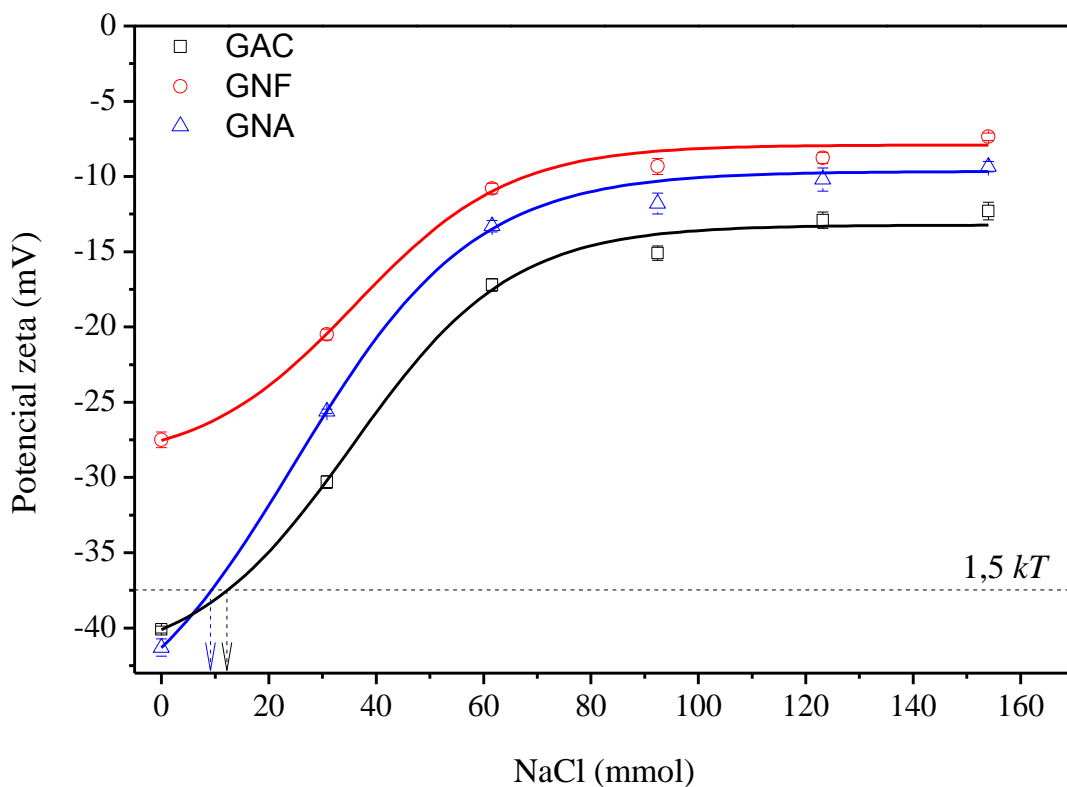


Figura 28 – Potencial zeta das emulsões em função da concentração de NaCl. As linhas sólidas correspondem às curvas de ajuste. Setas tracejadas indicam o limite de estabilização eletrostática contra flocação irreversível

Segundo essa teoria, as forças atrativas e repulsivas se comportam de maneira diferente frente à variação da distância entre duas superfícies, o que gera um potencial resultante dependente da proximidade das partículas e intensidade das forças. Como consequência desta complexa relação, o potencial resultante pode apresentar três regiões distintas<sup>16-21, 23</sup> conforme ilustrado na Figura 29.

- 1° mínimo: está relacionado à flocação irreversível, onde existe o contato entre as interfaces. Em sistemas emulsionados levará à ocorrência de coalescência e, conseqüentemente à quebra da emulsão.
- Máximo: é a região na qual a repulsão eletrostática apresenta maior contribuição para a estabilidade do sistema.
- 2° mínimo: se situa na região onde a repulsão eletrostática não consegue atuar devido à distância existente entre as superfícies. Está relacionado à flocação reversível.

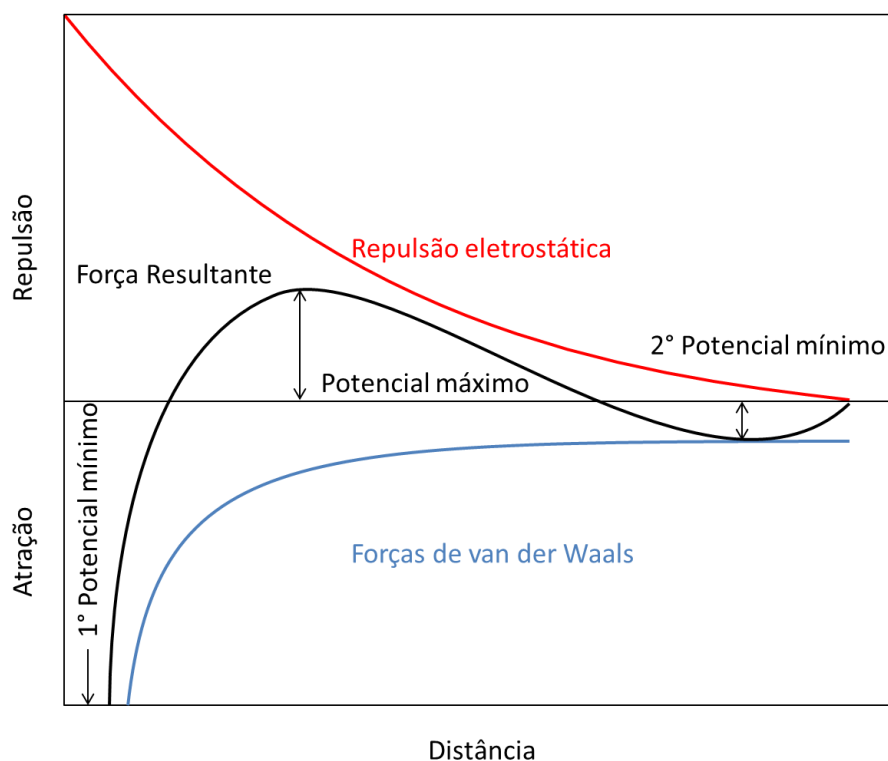


Figura 29 – Esquema das forças atuantes na teoria DLVO. A curva em vermelho representa o potencial de repulsão gerado pela dupla camada elétrica. A curva em azul representa o potencial atrativo gerado por forças de van der Waals. A soma das duas curvas (repulsão e atração) dá origem à curva do potencial resultante (preto)

Quanto maior a intensidade do potencial máximo, maior será o efeito repulsivo exercido sobre a partícula atuando como uma barreira impedindo que o primeiro mínimo seja atingido, ou seja, impede a ocorrência da floculação irreversível. Para que esta barreira seja efetiva na prevenção da floculação irreversível, o potencial máximo deve ser  $> 1,5kT$ , que em termos de potencial zeta deve ser  $> |37,5|$  mV a  $25^{\circ}\text{C}$ <sup>16-21, 23</sup>.

As emulsões preparadas com GNF não apresentaram valores de potencial zeta necessários para evitarem a floculação irreversível mediante a atuação da repulsão eletrostática tanto em presença quanto em ausência de NaCl. Já as preparadas com GAC e GNA foram capazes de desenvolver potenciais negativos suficientes para estabilizar os sistemas emulsionados por repulsão eletrostática.

O potencial zeta das emulsões estabilizadas por GAC é inibido a ponto de não exercer estabilidade via repulsão eletrostática a partir de 12,4 mmol de NaCl, enquanto que as emulsões contendo GNA necessita de apenas 9,3 mmol, indicando que a estabilização via repulsão eletrostática é muito sensível à presença de eletrólitos para as amostras.

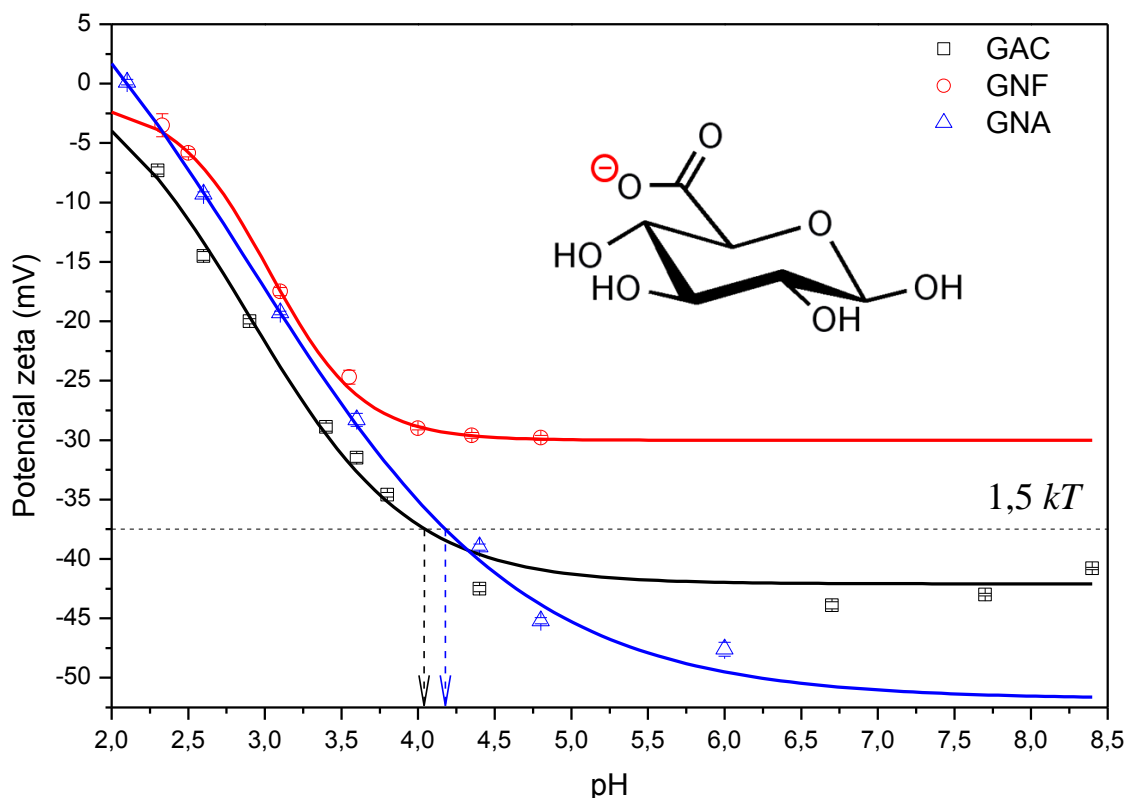


Figura 30 – Medida do potencial zeta das emulsões O/A estabilizadas com GAC, GNF ou GNA em função do pH do meio. Linhas sólidas correspondem às curvas ajustadas pela equação de Boltzmann. Setas tracejadas indicam o pH limite para ocorrência da estabilização eletrostática contra floculação irreversível

Quando avaliadas em função do pH do meio (Figura 30), as amostras estabilizadas com GAC apresentaram valor de potencial suficiente para evitar a floculação irreversível em pH igual ou superior a 4,0. As amostras contendo GNF não atingiram o potencial necessário em nenhum valor de pH testado enquanto que as emulsões preparadas com GNA foram capazes de exercer repulsão eletrostática suficiente para promover estabilidade em valores de pH superiores a 4,2. Esta dependência do pH está relacionada com a origem das cargas formadas, que provém da desprotonação dos grupos carboxílicos dos ácidos urônicos. A intensidade da carga formada está diretamente ligada ao valor de  $pK_a$  dos polissacarídeos, que, conforme já discutido, está relacionado à maior capacidade de estabilizar as cargas formadas. Quanto menor o valor do  $pK_a$  mais negativo o potencial zeta desenvolvido e, conseqüentemente maior o poder de estabilização via repulsão eletrostática. Desta forma, era de se esperar que GNF apresentasse valor de  $\zeta$  mais negativo que GAC por ter o  $pK_{a1}$  menor. Porém, isto não ocorre, provavelmente por mudanças conformacionais na estrutura de GNF que impedem a exposição das cargas na superfície da gotícula.

### 5.2.2 ACOMPANHAMENTO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS PELAS AMOSTRAS DE ACÁCIA-NEGRA E GOMA ARÁBICA POR ANÁLISE DO PERFIL DE FASES

Ao acompanhar a aparência macroscópica das emulsões ao longo do tempo é possível visualizar o perfil de fases. As Figuras 32 e 33 ilustram o perfil de fases no período de 21 dias na ausência e presença de NaCl. Pode-se observar a formação de três fases distintas. A primeira situa-se no topo das amostras, compondo a fase espuma (Esp%). Esta fase pode ser relacionada com o potencial de estabilizar emulsões, uma vez que só se forma quando ocorre a mistura de ar e água, sendo o ar de caráter hidrofóbico. Quando pouco estável, a espuma tende a se desfazer facilmente impulsionada pela grande diferença de densidade entre as fases dispersa e contínua. A segunda fase observada é a emulsão propriamente dita (Emu%). A estabilidade desta fase representa diretamente a estabilidade do sistema. A terceira fase é a fase rica em solvente (Aqu%). A separação desta fase implica no aumento da concentração das fases anteriores, que se separam devido à diferença de densidade e à própria desestabilização do sistema.

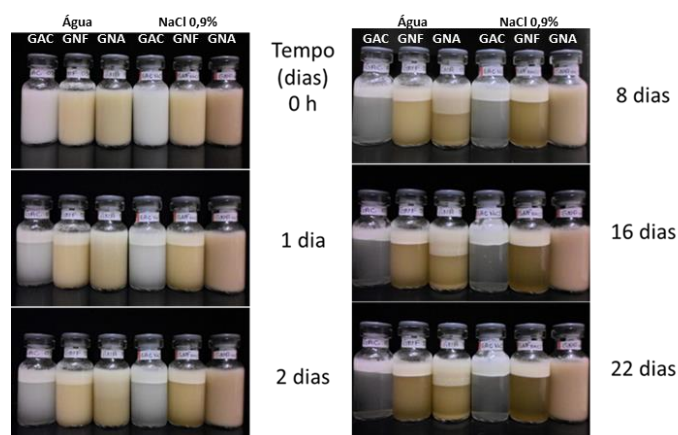


Figura 31 – Imagem do acompanhamento da separação de fases das emulsões em função do tempo ao longo de 22 dias em repouso a temperatura ambiente

As emulsões preparadas sem a adição eletrólitos (Figura 32 – A) e estabilizadas com GAC ou GNF apresentaram a formação das três fases após 24 h de repouso, sendo que a espuma formada variou muito pouco ao longo dos 22 dias, representando aproximadamente 20% do volume do sistema. Já as amostras contendo GNA só apresentaram formação da fase Esp% no segundo dia, ocupando 49% do volume total, que se reduz ao longo do tempo, estabilizando em 40% após o 16º dia. Este comportamento diferente pode ser relacionado à maior capacidade de estabilização de GNA em relação às outras amostras.



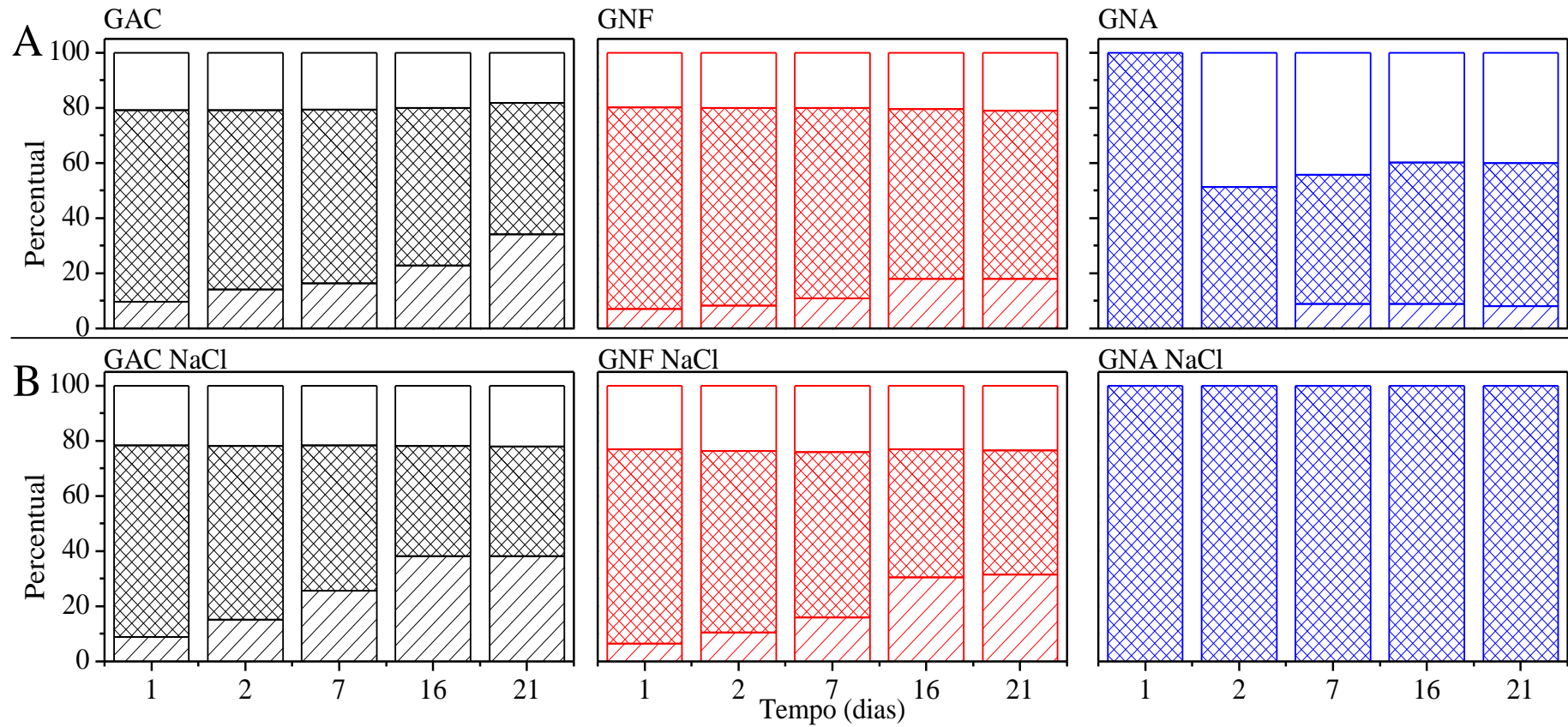


Figura 32 – Separação de fases das emulsões em função do tempo. / Aqu%; ▨ Emu% e □ Esp% A) Emulsões preparadas em água. B) Emulsões preparadas em NaCl 0,9%

Em relação à fase Emu%, a emulsão estabilizada com GAC obteve a maior redução de volume ao longo dos 22 dias, acompanhado pelo aumento da fase Aqu%, indicando pior estabilização do sistema. A emulsão preparada com GNF apresentou menor velocidade na redução de volume da fase Emu%, que também foi acompanhado pelo aumento da fase Aqu%, o que revela a melhor capacidade de estabilização de emulsões desta amostra em relação à GAC. Para GNA a fase Emu% estabilizou em 51% após o 2º dia, permanecendo estável durante o período observado. A fase Aqu% surgiu após 7 dias e foi acompanhada por aparecimento de precipitado. Este comportamento observado para GNA mostra a superioridade deste polissacarídeo na estabilização de emulsões. A presença de precipitado contribui para a hipótese de exercer efeito na redução da diferença de densidade entre as fases, atuando em sentido oposto à cremação.

As emulsões preparadas com NaCl na concentração de 0,9% (m/m) estão representadas na Figura 32 – B, onde observa-se que GNA apresentou o melhor desempenho em estabilizar as amostras. A espuma formada permaneceu ocupando aproximadamente 22% do volume total, mantendo-se estável ao longo do tempo. Para a fase Emu% e Aqu%, as emulsões contendo GAC apresentaram o maior ritmo de separação ao longo dos 21 dias, sendo que no 21º dia, Emu% ocupou 40% e Aqu% 38% do volume total da amostra. Para as amostras preparadas com GNF, no 21º dia Emu% representou 45% e Aqu% 32%, sendo melhor que GAC na estabilização de emulsões. As emulsões preparadas com GNA na presença de eletrólito não separaram fase durante o período avaliado, sendo compostas integralmente por fase emulsionada. Após os 22 dias de repouso, visualmente a emulsão formou uma estrutura semelhante a um gel. Os resultados observados indicam a capacidade superior da amostra GNA na estabilização de emulsões que, em presença de NaCl, obteve o melhor resultado.

A associação das medidas de potencial zeta com a avaliação do perfil de separação de fases, na presença e ausência de eletrólito, permite avaliar o tipo de mecanismo de estabilização exercido pelas amostras.

A amostra GAC atua por estabilização eletroestérica, pois, quando em pH superior a 4,0 e ausência de eletrólitos, consegue gerar potencial eletrostático forte o suficiente para inibir a floculação irreversível. Quando adicionado NaCl em concentração suficiente para suprimir a repulsão eletrostática, o efeito estérico permanece estabilizando o sistema. Já a fração GNF estabiliza unicamente via efeito estérico, uma vez que não gera potencial elétrico suficiente, independentemente do valor de pH do meio, capaz de inibir a floculação irreversível. Ao adicionar sal ao meio observa-se uma redução da eficiência de

estabilização que pode ser relacionada à redução do volume hidrodinâmico do filme coloidal formado pela goma por efeito de dessolvatação das cadeias poliméricas, promovido pelos íons, permitindo maior compactação dos polissacarídeos (aumento da interação polímero-polímero) e, conseqüentemente, permitindo aproximação das gotículas. O biopolímero GNA atua por vários mecanismos de estabilização. Ele se organiza na interface óleo/água exercendo efeito estérico. Em soluções com valores de pH superiores a 4,2 e ausência de eletrólitos, consegue fornecer valores de  $\zeta$  superiores a  $1,5kT$ , exercendo estabilização por repulsão eletrostática. Além disso, quando em presença de eletrólito, forma uma estrutura semelhante a um gel, aumentando a viscosidade do meio, que reduz a velocidade de separação de fases. O gel formado pode ser efeito das cadeias de baixa massa promovendo ligações cruzadas entre as cadeias de polissacarídeo de GNA. Quando em água, a carga das cadeias impede a aproximação e interação entre si, mas quando expostas a íons no meio, a repulsão eletrostática é suprimida pelos contra íons permitindo a aproximação das moléculas, dando origem a uma rede tridimensional, aprisionando a fase dispersa em seu interior, aumentando a estabilidade do meio.

## 6 CONCLUSÃO

Os polissacarídeos provenientes da goma de acácia negra mostraram maior eficiência em estabilizar as emulsões do que a goma arábica comercial. O conteúdo proteico exerceu papel de extrema importância na propriedade estabilizante destes polissacarídeos, sendo influenciados por seu perfil de distribuição entre moléculas de alta massa e baixa massa. O comportamento das emulsões pode ser entendido a partir da análise das propriedades químicas e físico-químicas dos polissacarídeos. Pela avaliação do potencial zeta das emulsões em função da concentração salina, em conjunto com o perfil de fases, pôde-se concluir que GAC estabiliza as emulsões pela combinação do efeito estérico e repulsão eletrostática, enquanto que GNF atua por estabilização estérica, pois não promove repulsão eletrostática significativamente forte para inibir a ocorrência de agregação irreversível. O mecanismo de estabilização mediado por GNA se dá por estabilização eletrostática e estérica e, quando em presença de eletrólito, forma uma estrutura semelhante a um gel, aumentando a viscosidade do meio e, conseqüentemente, reduzindo a velocidade de separação de fases.

Estes resultados convergem para a afirmação do potencial de aplicação comercial, como matéria prima nova, bem como substituinte da goma arábica comercial, da goma de acácia-negra, contribuindo para a agregação de valor à cadeia de exploração de produtos e subprodutos da *Acacia mearnsii* De Wild no Brasil.

## 7 REFERÊNCIAS

- 1 YANG, L. e ZHANG, L.M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, 349–361, 2009.
- 2 WANG, W.; LIU, X.; XIE, Y.; ZHANG, H.; YU, W.; XIONG, Y.; XIE, W.; MA, X. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. **Journal of Materials Chemistry**, 16, 3252–3267, 2006.
- 3 GÉRENTE, C.; MESNIL, P.C.; ANDRÈS, Y.; THIBAUT, J.F.; CLOIREC, P.L. Removal of metal ions from aqueous solution on low cost natural polysaccharides. Sorption mechanism approach. **Reactive & Functional Polymers**, 46, 135–144, 2000.
- 4 GLICKSMAN, M.; SAND, R.E.; WHISTLER, R.L.; BeMILLER, J.N. Industrial Gums, Polysaccharides and their derivatives, 2nd ed., **Academic Press**, San Diego, 198-254, 1973.
- 5 YADAV, M.P.; IGARTUBURU, M.; YAN, Y.; NOTHNAGEL E.A. Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic. **Food Hydrocolloids**, 21, 297-308, 2007.
- 6 VERBEKEN, D.; DIERCKX, S.; DEWETTINCK, K. Exudate gums: occurrence, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 63, 10-21, 2003.
- 7 CHOUDHARY, P.D. e PAWAR, H.A. Recently Investigated Natural Gums and Mucilages as Pharmaceutical Excipients: An Overview. **Journal of Pharmaceutics**. 2014, 1-9.
- 8 COZIC, C.; PICTON, L.; GARDA, M.R.; MARLHOUX, F.; LE CERF, D. Analysis of arabic gum: Study of degradation and water desorption processes. **Food Hydrocolloids**, 23, 1930–1934, 2009.
- 9 GILS, P.S.; RAY, D.; SAHOO, P.K. Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, 46, 237-244, 2010.
- 10 LEONG, Y.K.; SEAH, U.; CHU, S.Y.; ONG, B.C. Effects of Gum Arabic macromolecules on surface forces in oxide dispersions. **Colloids and Surfaces A**, 182, 263–268, 2001.
- 11 ALICEWEB. Disponível em: <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/>>. Acesso em março de 2014.

- 12 ISLAM, A.M.; PHILLIPS, G.O.; SLJIVO, A.; SNOWDEN, M.J.; WILLIAMS, P.A. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. **Food Hydrocolloids**, 11, 493-505, 1997.
- 13 CALDEIRA, M. V. W. et al., Eficiência do uso de micronutrientes e sódio em três procedências de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Revista Árvore**, 28, 1, 39-47, 2004.
- 14 GRIGOLETTI, A.; SANTOS, A.F.; HIGA, A.R.; MORA, A.L.; SIMON, A.A.; AUER, C.G.; IEDE, E.T.; CURCIO, G.R.; RODIGHERI, H.R.; DEDECEK, R.A.; KEIL, S.S.; PENTEADO, S.R.C. Sistemas de Produção, 3: Cultivo da Acácia-Negra. **Embrapa Florestas Versão Eletrônica, Embrapa**, 2003.
- 15 HIGA, R.C.V.; DEDECEK, R.A. Acácia-negra. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 2p. **Instrução Técnica**, 5. 1999.
- 16 IQBAL, M. International trade in non-wood forest products: An overview. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 1993.
- 17 PARTICLE SCIENCE. Emulsion Stability and Testing. Particle Sciences – Drug Development Services. **Technical Brief**, 2, 2011.
- 18 MYERS, D. **Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications**, 2 ed. John Wiley & Sons, Inc. 1999.
- 19 HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. **Surfactants and polymers in aqueous solutions**. John Wiley & Son, Ltd. 2002.
- 20 LEE, Y.S. **Self-assembly and nanotechnology: a force balance approach**. John Wiley & Sons, Inc. ACS 2008.
- 21 SHAW, D.J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. Butterworth-Heinemann, Elsevier Science Ltd. 2003.
- 22 Goodwin, J.W. **Colloids and interfaces with surfactants and polymers: an introduction**. John Wiley & Sons, Ltd. 2004.
- 23 ROTTKE, M.; LUNTER, D.J.; DANIELS, R. In vitro studies on release and skin permeation of nonivamide from novel oil-in-oil-emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 86, 2, 260–266, 2014.
- 24 CARUSO, F. **Colloids and colloid assemblies**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004.
- 25 LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A. Hydrogels in Miniemulsions. **Advances in Polymer Science**, 234, 39–63, 2010.

- 26 JAYME, M.L.; DUNSTAN, D.E.; Gee, M.L. Zeta potentials of gum arabic stabilised oil in water emulsions. **Food Hydrocolloids**, 13, 459–465, 1999.
- 27 CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D.J. Impact of weighting agents and sucrose on gravitational separation of beverage emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 11, 5561-5565, 2000.
- 28 SIMAS TOSIN, F.F. **Polissacarídeos da goma de exsudato e da polpa dos frutos de Prunus pérsica: Caracterização estrutural e análises reológicas**. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). UFPR, Curitiba, 2008.
- 29 FARZI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOHAMMADIFAR, M.A. A comparative study on the emulsifying properties of various species of gum tragacanth. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013, 57, 76– 82.
- 30 SAMANTA, A.; OJHA, D.; MUKHERJEE, B. Stability analysis of primary emulsion using a new emulsifying agent gum odina. *Natural Science*. 2010, 2, 494-505.
- 31 PANDA, D.S. Studies on gum of Moringa oleifera for its emulsifying properties. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2014, 6, 92-6.
- 32 DESHMUKHA, A.S.; SETTY, C.M.; BADIGER, A.M.; MURALIKRISHNAA, K.S. Gum ghatti: A promising polysaccharide for pharmaceutical applications. *Carbohydrate Polymers*. 2012, 87, 980–986.
- 33 GOLDSTEIN, A.M. Chemistry, Properties, and Application Of Gum Karaya. **NATURAL PLANT HYDROCOLLOIDS**. Chapter 6, 33–37. *Advances in Chemistry*, Vol. 11, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 1954.
- 34 PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge, England: CRC Press, Woodhead Publishing Ltd. 155–168, 2000.
- 35 GRÖßL, M.; HARRISON, S.; KAMLA, I.; KENNDLER, E. Characterization of natural polysaccharides (plant gums) used as binding media for artistic and historic works by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 1077, 80–89, 2005.
- 36 OSMAN, M.E.; WILLIAMS, P.A.; MENZIES, A.R.; PHILLIPS, G.O. Characterization of Commercial Samples of Gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41, 71-77, 1993.
- 37 ALI, B.H.; ZIADA, A.; BLUNDEN, G. Biological effects of gum arabic: A review of some recent research. **Food and Chemical Toxicology**, 47, 1–8, 2009.
- 38 ASPINAL, G.O. The polysaccharides. **Academic Press**, New York, 2, 458-459, 1983.

- 39 IDRIS, O.H.M.; WILLIAMS, P.A.; PHILLIPS, G.O. Characterisation of gum from Acacia senegal trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography. **Food Hydrocolloids**, 12, 378-388, 1998.
- 40 LI, X.; FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G.O.; NISHINARI, K.; ZHANG, H. Rheological study of gum arabic solutions: Interpretation based on molecular self-association. **Food Hydrocolloids**, 23, 2394–2402, 2009.
- 41 RENARD, D. et al. Acacia senegal gum: continuum of molecular species differing by their protein to sugar ratio, molecular weight, and charges. **Biomacromolecules**, 7, 2637-2649, 2006.
- 42 TISCHER, C.A. Oligossacarídeos redutores naturais das gomas comerciais arábica, guatti e tragacanto: análise estrutural comparativa. **Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica). UFPR**, Curitiba, 2002.
- 43 MAHENDRAN, T.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O.; AL-ASSAF, S. T.; BALDWIN, C. New insights into the structural characteristics of the arabinogalactan-protein (AGP) fraction of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 19, 9269–9276, 2008.
- 44 FINCHER, G. B., STONE, B. A., and A. E. CLARKE. Arabinogalactanproteins: structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Biology**, 34, 47–70, 1983.
- 45 GREIN, A.; SILVA, B. C.; WENDEL, C. F.; TISCHER, C. A.; SIERAKOWSKI, M. R.; Moura, A.B.D.; IACOMINI, M. ; GORIN, P.A.J.; Simas Tosin, F.F.; Riegel-Vidotti, I.C. Structural characterization and emulsifying properties of polysaccharides of Acacia mearnsii de Wild gum. **Carbohydrate Polymers**, 92, 312– 320, 2013.
- 46 RANDALL, R.C.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum Arabic. **Food Hydrocolloids**, 2, 2, 131-140, 1988.
- 47 DICKINSON, E.; GALAZKA, V.B. Emulsifying behaviour of gum arabic. Part 1: Effect of the nature of the oil phase on the emulsion droplet-size distribution. **Carbohydrate Polymers**, 14, 373–383, 1991.
- 48 CASTELANI, O.; AL-ASSAF, S.; AXELOS, M.; PHILLIPS, G. O.; ANTON, M. Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 2: Adsorption properties at the n-hexadecane–water interface. **Food Hydrocolloids**, 24, 121–130, 2010.
- 49 SANTOS, A.F.; LUZ, E.D.M.N. REVISÃO: A gomose da acácia-negra no Brasil. **Summa Phytopathologica**, 33, 2, p. 113-118, 2007.



- 50 ZEILJEMAKER, F.C.J. The gummosis of black wattle: a complex of disease. **Wattle Research Institute**. Report 1967-68, p. 40-43. 1968.
- 51 BLACKHERBALS. Disponível em [http://www.blackherbals.com/gum\\_arabic.htm](http://www.blackherbals.com/gum_arabic.htm) Acessado em junho de 2014.
- 52 DA CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, 32, 649-660, 2009.
- 53 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 795, de 15 de dezembro de 1993. Aprova as normas de identidade, qualidade, embalagem, marcação e apresentação do óleo e do farelo de soja. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 dez. 1993. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=4355>. Acesso em: 2013.
- 54 CANCIAM, C.A. Efeito da temperatura na viscosidade de óleos vegetais refinados. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra**, 16, 1, 07-12, 2010.
- 55 HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, 48, 422-427, 1972.
- 56 ACASTI. Disponível em: <http://acasti.webs.ull.es/docencia/practicas/4.pdf>. Acesso em julho de 2013.
- 57 GERRIT-JAN; van HOLS; CLARKE A.E. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. **Analytical Biochemistry**, 148, 446-450, 1985.
- 58 FILISETTI-COZZI, T.M.C.C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162. 1991.
- 59 MELTON, L.D.; SMITH, B.G. Colorimetric assay of uronic acid content of cell walls. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. E3.3.1-3.3.4, 2001.
- 60 MARTELL, A. E.; HANCOCK, R. D. Metal Complexes in Aqueous Solutions. New York: Plenum Press. 1996.
- 61 ABRÀMOFF, M.D.; MAGALHÃES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ, **Biophotonics International**, 11, 7, 36-42, 2004.
- 62 SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, **Nature Methods**, 671, 2012.
- 63 Cornelsen, Patricia A.; Quintanilha, Ronaldo C.; Vidotti, Marcio; Gorin, Philip A.J.; Simas-Tosin, Fernanda F.; Riegel-Vidotti, Izabel C. Native and structurally modified

gum arabic: Exploring the effect of the gum's microstructure in obtaining electroactive nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 119, 35-42, 2015.