

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIEL ALBUQUERQUE TORRES KAMINSKI



AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE SURFACTANTES E POLÍMEROS
NATURAIS COMO UMA ALTERNATIVA PARA REDUÇÃO DO USO DE
SURFACTANTES

CURITIBA

2017

GABRIEL ALBUQUERQUE TORRES KAMINSKI

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE SURFACTANTES E POLÍMEROS
NATURAIS COMO UMA ALTERNATIVA PARA REDUÇÃO DO USO DE
SURFACTANTES

Tese de doutorado apresentada como requisito à conclusão do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2017

Kaminski, Gabriel Albuquerque Torres

Avaliação da interação entre surfactantes e polímeros naturais como uma alternativa para redução do uso de surfactantes / Gabriel Albuquerque Torres Kaminski – Curitiba, 2017.

108 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Surfactantes umectantes. 2. Biopolímeros. 3. Emulsões. 4. Nanocristais. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GABRIEL ALBUQUERQUE TORRES KAMINSKI** intitulada: **AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE SURFACTANTES E POLÍMEROS NATURAIS COMO UMA ALTERNATIVA PARA REDUÇÃO DO USO DE SURFACTANTES**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 29 de Setembro de 2017.

ROBERTO PONTAROLO
Presidente da Banca Examinadora

MARCO ANDRÉ CARDOSO
Avaliador Externo

ANGELA CRISTINA LEAL BADARÓ TRINDADE
Avaliador Externo

FRANCINE VALENGA
Avaliador Externo

MICHEL LEANDRO DE CAMPOS
Avaliador Externo

À todos aqueles que me possibilitaram chegar até aqui,
principalmente ao Senhor, pais, familiares e amigos.

*“O temor do Senhor
é o princípio da sabedoria,
e o conhecimento do Santo
é prudência.”*

Provérbios 9:10

Bíblia Sagrada

AGRADECIMENTOS

À Deus, Criador dos Céus e da Terra, pelo maior de todos os dons que é a vida. Pela família que me deu, a qual me incentiva e se alegra com minhas conquistas. Pelo desejo de conhecer cada vez mais sobre as maravilhas de Sua criação que colocou dentro de meu coração, catalisador de minha pesquisa. Pelos sábados em Sua presença que me renovam e fornecem condições para começar uma nova semana com alegria e entusiasmo.

Ao meu pai, por desde cedo me instigar a buscar o saber. Por prover tudo que preciso para poder desenvolver minhas faculdades mentais, sociais e espirituais.

À minha mãe, por seu amor e carinho que sempre me confortam. Pela constante preocupação no meu bem-estar que me mantém numa redoma de segurança.

À minha irmã Jéssika, por ser a minha companheira desde e para sempre. Pela sua admiração que me motiva a ir mais além.

Aos meus familiares, pelo incentivo incondicional e por seu carinho.

Aos meus amigos, por suportarem minha empolgação em contar aquilo que aprendo e os avanços de minha pesquisa, mesmo sem ter interesse algum na área. Pela atenção, carinho e paciência que voluntariamente exercem a fim de permanecerem em minha presença sem ter alguma obrigatoriedade nisso.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, grande mentor e idealizador deste projeto. Por acreditar, visualizar e esculpir o rabisco de ideias sem muito fundamento num projeto conciso, detalhado e de sucesso.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, que mesmo sem vagas aceitou minha orientação dando credibilidade a um projeto fora de sua linha de pesquisa e crendo na minha capacidade em realizá-lo.

À Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski, por abrir as portas de seu laboratório de primeiro mundo para o desenvolvimento da maior parte deste trabalho, colocando à disposição seu grande conhecimento, equipamentos e recursos.

Ao Prof. Dr. Michael Tam por abrir as portas do Instituto de Quantum-Nanotecnologia da Universidade de Waterloo, Canadá.

Aos colegas do BioPol que diariamente tiveram a capacidade de conviver comigo, rindo das minhas piadas, sendo engraçadas ou não, pela companhia produtiva durante todo esse tempo. Que Deus tenha misericórdia de vós.

À Coordenação e ao Colegiado do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por todo apoio e incentivo.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Com a crescente escassez de fontes de energias fósseis para produção de polímeros sintéticos, bem como a preocupante emissão de dióxido de carbono que estas indústrias causam, os biopolímeros surgem como alternativa de materiais com diversas propriedades que podem ser ajustadas conforme o sistema que se pretende construir. Ao contrário dos polímeros sintéticos, sua produção consome e estoca dióxido de carbono, através de plantio de árvores, criação de algas, crustáceos, entre outros, que contribuem para o ecossistema, sendo de fácil e abundante obtenção com baixo custo. Neste trabalho foram estudadas as interações entre os biopolímeros xantana e galactomanana com o surfactante catiônico DODAB para a estruturação de sistemas nanométricos e redução do uso de surfactante. Também foi proposta a formação de emulsões água-água de Pickering. Sendo estas compostas pelos biopolímeros albumina e galactomanana, e estabilizadas por nanocristais de celulose. Estas emulsões foram formadas sem óleo e sem surfactantes, portanto, não são poluentes a leitos de rios e apresentam grande potencial. Um material inédito foi criado, através da ligação covalente de albumina nos nanocristais de celulose, e avaliado como estabilizador das emulsões. Da indústria de tintas, cosméticos, alimentos até a nanotecnologia médica, todas podem ser beneficiadas com a utilização de biopolímeros. Este trabalho demonstra algumas características físico-químicas que podem ser obtidas e utilizadas na elaboração dos mais diversos sistemas.

Palavras-chave: Surfactantes catiônicos, biopolímeros, emulsã, nanocristais de celulose.

ABSTRACT

With the growing scarcity of fossil fuel sources for the production of synthetic polymers, as well as the worrying carbon dioxide emission that these industries cause, biopolymers are an alternative to materials with different properties that can be adjusted according to the system to be constructed. Unlike synthetic polymers, its production consumes and stores carbon dioxide by planting trees, creating algae, crustaceans, among others, that contribute to the ecosystem, being of ease and abundant obtainment with low cost.

In this work the interactions between the biopolymers xanthan and galactomannan with the cationic surfactant DODAB were studied for the structuring of nanometric systems and surfactant use reduction.

The formation of water-water Pickering emulsions was also proposed with the use of the biopolymers albumin and galactomannan, and cellulose nanocrystals as stabilizer. These emulsions were formed without the use of oil and surfactants, therefore, non-polluting to riverbeds, with great potential. A novel material was created, by covalent bonding of albumin on the cellulose nanocrystals, and studied as emulsion stabilizer.

From the industry of paints, cosmetics, food to medical nanotechnology, all can benefit from the use of biopolymers. This work demonstrates some physical-chemical characteristics that can be obtained and used in the elaboration of the most diverse systems.

Key-words: Cationic surfactants, biopolymers, emulsion, cellulose nanocrystals.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO BROMETO DE DIMETILDIOCTADECIL AMÔNIO (DODAB).....	25
FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA GALACTOMANANA (GLC) REPRESENTANDO O ESQUELETO (1→4)- β -D-MANANA SUBSTITUÍDO NO OXIGÊNIO 6 POR UMA UNIDADE DE GALACTOSE.	26
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA XANTANA (XAN) REPRESENTANDO O ESQUELETO (1→4)- β -D-GLUCANA COM SUBSTITUIÇÃO NO CARBONO 3 POR UMA CADEIA LATERAL TRISSACARÍDICA COMPOSTA POR UMA UNIDADE DE ÁCIDO D-GLUCURÔNICO (β -1→2) E DUAS UNIDADES DE MANOSE LIGADAS.....	27
FIGURA 4 – a) ISOTERMA DE TENSIOMETRIA DETERMINADA POR GOTA PENDENTE.....	37
FIGURA 5 – ANÁLISES DE MICROCALORIMETRIA REVELANDO QUE OS SISTEMAS FORMARAM LUV. ACIMA DODAB 5 mmol.L ⁻¹ EM ÁGUA ULTRAPURA. NO CENTRO SOLUÇÃO DE XAN 0,5 mg.mL ⁻¹ SEM DODAB. ABAIXO DODAB 5 mmol.L ⁻¹ EM SOLUÇÃO DE XAN 0,5 mg.mL ⁻¹ . EXPERIMENTOS REALIZADOS SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO DE 10 BAR COM TAXA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DE 0,2°C.min ⁻¹	38
FIGURA 6 - TERMOGRAMAS (ACIMA) E ISOTERMA DE LIGAÇÃO (ABAIXO). AS ÚLTIMAS RESULTAM DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DE ITC DAS PRIMEIRAS, OBTIDOS A 25 °C.....	39
FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE AS CAUDAS APOLARES DE DODAB E O ESQUELETO DO POLÍMERO NEUTRO GLC.....	40
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS (ENTRE A CABEÇA CATIONICA DE DODAB E OS SÍTIOS ANIÔNICOS DE XAN) E HIDROFÓBICAS (ENTRE AS CAUDAS APOLARES DE DODAB E O ESQUELETO NEUTRO DE XAN).42	

FIGURA 9 – MECANISMO DA MODIFICAÇÃO QUÍMICA ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO COM TEMPO E POSTERIOR LIGAÇÃO COVALENTE COM ALB POR EDC/NHS.	57
FIGURA 10 – PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DO POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO DOS CRISTAIS MODIFICADOS COM ALB NOS QUATRO pHs TESTADOS.	61
FIGURA 11 – COMPARATIVO DA CONDUTIVIDADE DE CNC PURA (▲), ALB PURA (■), CNC OXIDADA POR TEMPO (●) E CNC LIGADA A ALB (◆) EM FUNÇÃO DO VOLUME DE BASE TITULADA.....	62
FIGURA 12 – COMPARATIVO DO pH CONSUMO DE BASE NA TITULAÇÃO DE CNC PURA (▲), ALB PURA (■), CNC OXIDADA POR TEMPO (●) E CNC LIGADA A ALB (◆)	63
FIGURA 13 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC E ALB, SEM CONTROLE DE pH, DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA. FOTO APÓS 5 SEMANAS DE REPOUSO. ANTES DE CENTRIFUGAR (ACIMA) E APÓS CENTRIFUGAÇÃO (ABAIXO).	64
FIGURA 14 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC E ALB, SEM CONTROLE DE pH, DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA. FOTO APÓS 48 h DE REPOUSO.	65
FIGURA 15 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC, ALB E CNC 0,01%, SEM CONTROLE DE pH. DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA.	66
FIGURA 16 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC E CNC, SEM CONTROLE DE pH. DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA.	67
FIGURA 17 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC E ALB EM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES NOS pHs 4,00, 4,75, 5,50 E 7,00.....	68
FIGURA 18 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE GLC E CONCENTRAÇÃO CONSTANTE DE ALB A 1,30% NOS pHs 4,00, 4,75, 5,50 E 7,00.....	69

FIGURA 19 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES COM CONCENTRAÇÃO CONSTANTE DE GLC A 0,48% E CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE ALB NOS pHs 4,00, 4,75, 5,50 E 7,00.....	70
FIGURA 20 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE GLC E ALB EM pH 4,75 SEM CNC (ACIMA), COM 0,1% DE CNC (CENTRO) E COM 0,1% DE CNC-ALB (ABAIXO).	77
FIGURA 21 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE GLC E ALB EM pH 5,5 SEM CNC (ACIMA), COM 0,1% DE CNC (CENTRO) E COM 0,1% DE CNC-ALB (ABAIXO).	78
FIGURA 22 – TERMOGRAMAS (ACIMA) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (ABAIXO). AS ÚLTIMAS RESULTAM DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DE ITC DAS PRIMEIRAS.	79
FIGURA 23 – TERMOGRAMAS (ACIMA) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (ABAIXO). AS ÚLTIMAS RESULTAM DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DE ITC DAS PRIMEIRAS.	80
FIGURA 24 – TERMOGRAMAS (ACIMA) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (ABAIXO). AS ÚLTIMAS RESULTAM DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DE ITC DAS PRIMEIRAS.	81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DAS INTERAÇÕES ENTRE DODAB, GLC E XAN	39
TABELA 2 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DETERMINADO POR DLS) E POTENCIAL ZETA DAS MOLÉCULAS ALB, GLC E CNC A 0,5 mg.mL ⁻¹ EM ÁGUA ULTRAPURA NOS QUATRO pHs INVESTIGADOS	59
TABELA 3 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DETERMINADO POR DLS) E POTENCIAL ZETA DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE MODIFICADOS (CNC-ALB) A 0,5 mg.mL ⁻¹ EM ÁGUA ULTRAPURA NOS QUATRO pHs INVESTIGADOS	60
TABELA 4 – DETERMINAÇÃO DO PONTO DE EQUIVALÊNCIA (P.E.) DE CNC, ALB, CNC-T E CNC-ALB POR TITULAÇÃO CONDUTIMÉTRICA.....	63
TABELA 5 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DETERMINADO POR DLS) E POTENCIAL ZETA DAS MISTURAS DE ALB COM CNC, E DE GLC COM CNC, NOS QUATRO pHs	76

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DADOS DAS EMULSÕES DE ALB E GLC EM pH 4,00.....	72
QUADRO 2 – DADOS DAS EMULSÕES DE ALB E GLC EM pH 4,75.....	73
QUADRO 3 – DADOS DAS EMULSÕES DE ALB E GLC EM pH 5,50.....	74
QUADRO 4 – DADOS DAS EMULSÕES DE ALB E GLC EM pH 7,00.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ΔG_{ads}^0	–	Energia livre padrão de adsorção
ΔG_{mic}^0	–	Energia livre padrão de micelização
ΔG_{ves}^0	–	Energia livre padrão de formação de vesículas
ΔH_{rev}	–	Entalpia de revestimento
ΔH_{mic}^0	–	Entalpia padrão de micelização
ΔS_{mic}^0	–	Entropia padrão de micelização
ΔS_t^0	–	Entropia padrão translacional
Γ_{max}	–	Excesso superficial máximo na interface solução/ar
a_{min}	–	Área mínima ocupada por uma molécula de surfactante na interface
μ -DSC	–	<i>Differential scanning calorimetry</i> (Micro calorimetria exploratória diferencial)
ALB	–	Albumina
CAC	–	Concentração de agregação crítica
CAM	–	Concentração de agregação molecular
CNC	–	<i>Cellulose nanocrystals</i> (Nanocristais de celulose)
CNC-ALB	–	<i>Cellulose nanocrystals albumin</i> (Nanocristais de celulose ligados covalentemente a albumina)
CNC-T	–	<i>Cellulose nanocrystals TEMPO</i> (Nanocristais de celulose oxidados)
CTAB	–	<i>Cetrimonium bromide</i> (Brometo de cetiltrimetil amônio)
CVC	–	Concentração vesicular crítica
DLS	–	<i>Dynamic light scattering</i> (Espalhamento de luz dinâmico)
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
DODAB	–	<i>Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide</i> (Brometo de dimetildioctadecil amônio)
DTAB	–	<i>Dodecyltrimethylammonium bromide</i> (Brometo de dodeciltrimetil amônio)
EDC	–	Hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
GLC	–	Galactomanana

ITC	–	<i>Isothermal titration calorimetry</i> (Calorimetria de titulação isotérmica)
L_p	–	<i>Persistence length</i> (Comprimento de persistência)
LUV	–	<i>Large unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares grandes)
MES	–	Ácido 2-N-(morpholino) etanosulfônico
M_w	–	<i>Molar mass</i> (massa molar ponderal média)
NHS	–	N-Hidroxisuccinimida
TEMPO	–	N-oxil-2,2,6,6-Tetrametilpiperidina
T_m	–	<i>Temperature melting</i> (Temperatura de fusão)
XAN	–	Xantana

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO	24
2.1 SURFACTANTES.....	24
2.2 BIOPOLÍMEROS	25
2.3 INTERAÇÃO ENTRE SURFACTANTES-BIOPOLÍMEROS.....	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 PREPARO DOS MATERIAIS.....	31
4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AGREGAÇÃO MOLECULAR E MICELAR CRÍTICA	31
4.2.1 Tensiometria	32
4.2.2 Potencial zeta.....	32
4.2.3 Espalhamento de luz dinâmico	32
4.2.4 Microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC)	33
4.2.5 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC).....	33
4.2.5.1 Parâmetros termodinâmicos	33
5. RESULTADOS	35
5.1 TENSIOMETRIA.....	35
5.2 POTENCIAL ZETA.....	35
5.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS).....	35
5.4 PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DE ADSORÇÃO E FORMAÇÃO DE VESÍCULAS	38
5.5 INTERAÇÃO DODAB-GLC	40
5.6 INTERAÇÃO DODAB-XAN	41

5.7	COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE DODAB, GLC E XAN.....	44
6.	CONCLUSÃO	48
	CAPITULO 2:	49
	DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES ÁGUA-ÁGUA DE PICKERING ESTABILIZADAS POR NANOCRISTAIS DE CELULOSE	49
1.	INTRODUÇÃO	50
2.	REVISÃO	51
2.1	INCOMPATIBILIDADE ENTRE PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS... 51	
2.2	NANOCRISTAIS DE CELULOSE.....	52
2.3	INTERFACES ESTABILIZADAS POR PARTÍCULAS COLOIDAIS.....	53
3.	OBJETIVOS	55
3.1	OBJETIVO GERAL.....	55
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
4.	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MOLÉCULAS.....	56
4.2	MODIFICAÇÃO DO NANOCRISTAL DE CELULOSE.....	56
4.3	FORMAÇÃO DAS EMULSÕES.....	57
4.4	AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS EMULSÕES.....	58
4.5	INVESTIGAÇÃO TERMODINÂMICA DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES.....	58
5.	RESULTADOS	59
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MACROMOLÉCULAS.....	59
5.2	MODIFICACAO DO NANOCRISTAL DE CELULOSE.....	60
5.3	FORMAÇÃO DAS EMULSÕES.....	64
5.3.1	Influência de pH e carga superficial.....	67
5.3.2	Influência das concentrações de cada macromolécula.....	68
5.4	AVALIAÇÃO DAS EMULSÕES.....	70
5.5	INVESTIGAÇÃO TERMODINÂMICA DAS INTERAÇÕES.....	79

6. CONCLUSÃO	82
7. CONCLUSÃO GERAL	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXO 1 - CINÉTICAS DE SEPARAÇÃO DE FASE	Erro! Indicador não definido.
REFERENTE AO CAPÍTULO 2	Erro! Indicador não definido.
1. DILUIÇÃO SIMULTÂNEA 1	Erro! Indicador não definido.
1.1 pH 4.0.....	Erro! Indicador não definido.
1.2 pH 4.75.....	Erro! Indicador não definido.
1.3 pH 5.5.....	Erro! Indicador não definido.
1.4 pH 7.00.....	Erro! Indicador não definido.
2. DILUIÇÃO SIMULTÂNEA 2	Erro! Indicador não definido.
2.1 pH 4.0.....	Erro! Indicador não definido.
2.2 pH 4.75.....	Erro! Indicador não definido.
2.3 pH 5.5.....	Erro! Indicador não definido.
2.4 pH 7.0.....	Erro! Indicador não definido.
3. ALB CONSTANTE E GLC DECRESCENTE	Erro! Indicador não definido.
3.1 pH 4.0.....	Erro! Indicador não definido.
3.2 pH 4.75.....	Erro! Indicador não definido.
3.3 pH 5.5.....	Erro! Indicador não definido.
3.4 pH 7.0.....	Erro! Indicador não definido.
4. ALB DECRESCENTE E GLC CONSTANTE	Erro! Indicador não definido.
4.1 pH 4.0.....	Erro! Indicador não definido.
4.2 pH 4.75.....	Erro! Indicador não definido.
4.3 pH 5.5.....	Erro! Indicador não definido.
4.4 pH 7.0.....	Erro! Indicador não definido.

Esta tese foi dividida em dois capítulos para melhor compreensão. Em ambos capítulos foram avaliadas as interações intermoleculares de biopolímeros na estruturação de sistemas tridimensionais nano e micrométricos.

O primeiro capítulo avalia as interações entre os biopolímeros xantana (XAN) e galatomanana (GLC), aniônico e neutro, respectivamente, com o surfactante catiônico brometo de dimetildioctadecil amônio (DODAB). As forças de interação, iônica ou hidrofóbica, entre surfactante e biopolímero, foram correlacionadas com a investigação termodinâmica e físico-química dos sistemas formados através da determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas formadas, potencial zeta e tensão interfacial.

O segundo capítulo investiga a formação de emulsões sem uso de óleo e nem surfactante, através das interações entre os biopolímeros albumina (ALB) e galactomanana (GLC) com nanocristais de celulose (CNC). A estabilidade das emulsões foi avaliada em quatro pHs diferentes para várias formulações. Foi criado e caracterizado um novo material através da ligação covalente de albumina em nanocristais de celulose proposto para melhor estabilização de emulsões água-água de Pickering.

CAPÍTULO 1:
AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES DO SURFACTANTE CATIÔNICO DODAB
COM XANTANA E GALACTOMANANA

1. INTRODUÇÃO

As interações entre surfactantes iônicos e polímeros naturais têm sido investigadas para aplicações no design de nanoobjetos funcionais. Estas técnicas de nanofabricação têm potencial para uso em sistemas de liberação de fármacos, funcionalização, sensores, membranas e biomedicina. Em soluções aquosas, polímeros e surfactantes comportam-se de forma sinérgica, com redução substancial da tensão superficial, comparado a tensão superficial com adição apenas do surfactante (JIANG et al., 2013).

As interações surfactante-polímero minimizam a quantidade total de surfactante necessária para várias aplicações industriais. A redução das concentrações de tensoativo utilizadas representa a preservação do meio ambiente, tendo em vista que estes se acumulam nos leitos de rios, além da redução dos custos de produção.

A utilização de surfactantes catiônicos tem crescido em várias aplicações farmacêuticas. Entre estes estão os sais quaternários de amônio que são os mais tóxicos (Caillier et al., 2009; Maliszewska et al., 2001). Ainda não há muita literatura a respeito da interação de surfactantes catiônicos com polímeros (DAL-BÓ et al., 2011).

Neste trabalho investigou-se o sinergismo entre o surfactante catiônico brometo de dimetildioctadecil amônio (DODAB) e os polímeros naturais xantana (XAN), aniônica, e galactomanana (GLC), neutra; moléculas utilizadas na indústria farmacêutica e cosmética devido às suas contribuições funcionais nas propriedades de sistemas. A compreensão dos mecanismos de interação entre o DODAB e os polímeros possibilita a melhor escolha do perfil da força motriz de interação (eletrostática ou não) para a elaboração de formulações com quantidade reduzida de surfactante catiônico.

2. REVISÃO

2.1 SURFACTANTES

Tensoativos, ou surfactantes, são moléculas orgânicas que têm a habilidade de se adsorver na interface líquido-ar, quando dissolvidos em baixas concentrações, alterando as propriedades físicas interfaciais, reduzindo a tensão superficial e, conseqüentemente, a energia livre superficial. São formadas por uma cabeça polar e uma cauda apolar, podendo ter variadas estruturas tanto para a cabeça, podendo ser iônica ou neutra, quanto para a cauda, podendo ter uma ou duas cadeias alquílicas saturadas, insaturadas ou um grupamento aromático (COSGROVE, 2010; HIEMENZ e RAJAGOPALAN, 1997).

A adsorção de surfactantes na interface têm um papel fundamental em aplicações industriais como detergência, flotação mineral, inibição de corrosão, dispersão de sólidos e recuperação de óleos (SOMASUNDARAN e HUANG, 2000).

A grande abrangência no uso de surfactantes resulta em seu acúmulo no meio ambiente. Estes são descartados no esgoto ou diretamente na água e afetam o ecossistema aquático (KARSA e PORTER, 1995). Vários tensoativos catiônicos possuem atividade antimicrobiana, principalmente os sais quaternários de amônio, sendo estes os mais tóxicos (CAILLIER et al., 2009; MALISZEWSKA et al., 2001). A incapacidade de remover completamente os surfactantes dos efluentes resulta na contaminação dos leitos de rios (ZOLLER, 1993).

O brometo de dimetildioctadecil amônio (DODAB) é um surfactante catiônico com um sal quaternário de amônio como cabeça polar, e duas cadeias saturadas com 18 carbonos por cauda. A transição de gel para líquido cristalino, também conhecida como temperatura de fusão (T_m) é 45 °C. Vesículas não são formadas espontaneamente abaixo desta temperatura porque o surfactante é pouco solúvel. Contudo, uma vez que as vesículas tenham sido formadas, acima da T_m , permanecem estáveis até em temperaturas baixas como 5 °C por meses (FEITOSA, JANSSON e LINDMAN, 2006; WU, YU E JI, 2011).

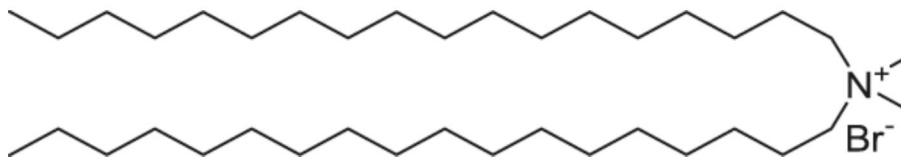


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO BROMETO DE DIMETILDIOCTADECIL AMÔNIO (DODAB)
 FONTE: O AUTOR (2013)

Por ser o lipídio catiônico de menor toxicidade, o DODAB têm sido utilizado no preparo de lipossomas para transfecção de DNA (LI et al., 2010), encapsulamento de vetores adenovirais (STEEL et al., 2007), construção de biofilmes (ROBINSON et al., 2001) e liberação de antibióticos (DRULIS-KAWA e DOROTKIEWICZ-JACH, 2010; WU et al., 2007).

2.2 BIOPOLÍMEROS

Os biopolímeros, aqui usados como sinonímia para polímeros obtidos de fontes naturais (IUPAC, 1992), têm recebido grande atenção no campo alimentício e farmacêutico, em sistemas nanocarreadores, como revestimentos polieletrólitos para partículas e superfícies (LIU et al., 2008; SHAHIDI, ARACHCHI e YEON, 1999).

Na natureza podem ser encontrados em várias fontes como algas (ex: alginato), plantas (ex: galactomananas, celulose), micro-organismos (ex: dextrana, xantana) e animais (ex: quitosana, condroitina), podendo formar complexos por interação eletrostática e revestir moléculas com carga superficial oposta à sua (PRABAHARAN, 2011).

Entre os biopolímeros neutros destacamos as galactomananas (GLC) que podem ser encontradas em diversas plantas, sendo extraídas de goma Guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*), tara (*Caesalpineia spinosa*) (MAIER et al., 1993) e de bracinga (*Mimosa scabrella*) (GANTER et al., 1997). Sua estrutura consiste basicamente de um esqueleto (1→4)-β-D-manana substituído, irregularmente, no oxigênio 6 por (1→6)-α-D-galactose (FIGURA 2) formando a cadeia lateral que confere solubilidade ao polissacarídeo (DEA e MORRISON, 1975).

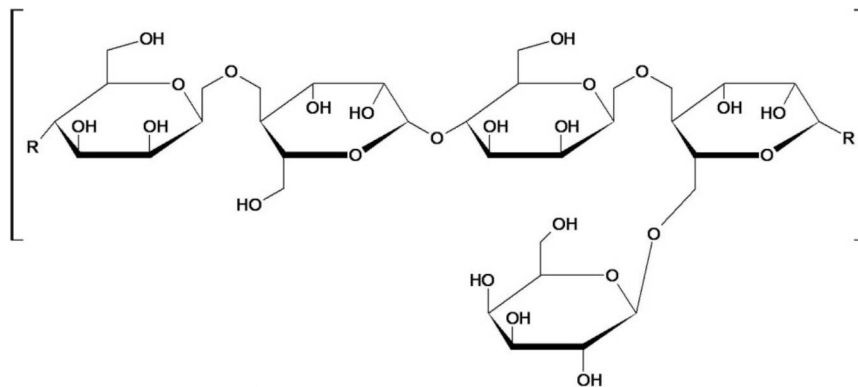


FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA GALACTOMANANA (GLC) REPRESENTANDO O ESQUELETO (1→4)-β-D-MANANA SUBSTITUÍDO NO OXIGÊNIO 6 POR UMA UNIDADE DE GALACTOSE.

FONTE: O AUTOR (2013)

As galactomananas são agentes viscosantes eficientes, propriedade controlada essencialmente pela massa molar, produzindo géis em associação a outros polissacarídeos como a xantana (MORRIS et al., 1977). Assim, isoladamente ou em misturas com outros hidrocolóides, podem ser utilizadas para controlar a reologia de um sistema e conferir propriedades desejadas no produto como estabilidade, textura e liberação controlada de fármacos (GANTER et al., 1997).

A xantana (XAN) ou goma xantana é um heteropolissacarídeo aniônico produzido pelo microorganismo *Xanthomonas campestris*. Seu esqueleto consiste em unidades (1→4)-β-D-glucana com todas unidades de glucose substituídos no carbono 3 por uma cadeia lateral ácida trissacarídica. A cadeia trissacarídica consiste de uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose (Jansson, Kennark e Lindberg, 1975).

Em soluções aquosas, a estrutura da xantana sofre uma transição conformacional, induzida pelo calor, de um estado ordenado (helicoidal) para um estado desordenado. Esta transição conformacional depende da força iônica, natureza do eletrólito, pH e quantidade de acetil e piruvato da molécula (HOLZWARTH, 1976; PAOLETTI, CESÀRO e DELBEN, 1983).

Em altas temperaturas e baixa força iônica do meio, a xantana apresenta estrutura desordenada em solução. Contudo a redução da temperatura e/ou adição de íons induz a organização da estrutura (NORTON et al., 1984). Em água purificada, a 25°C, o esqueleto da xantana é desordenado, ou parcialmente ordenado, e altamente estendido, devido à repulsão eletrostática das cadeias

laterais, possibilitando o alinhamento das moléculas e sua interação por ligações de hidrogênio (ROCHEFORT e MIDDLEMAN, 1987).

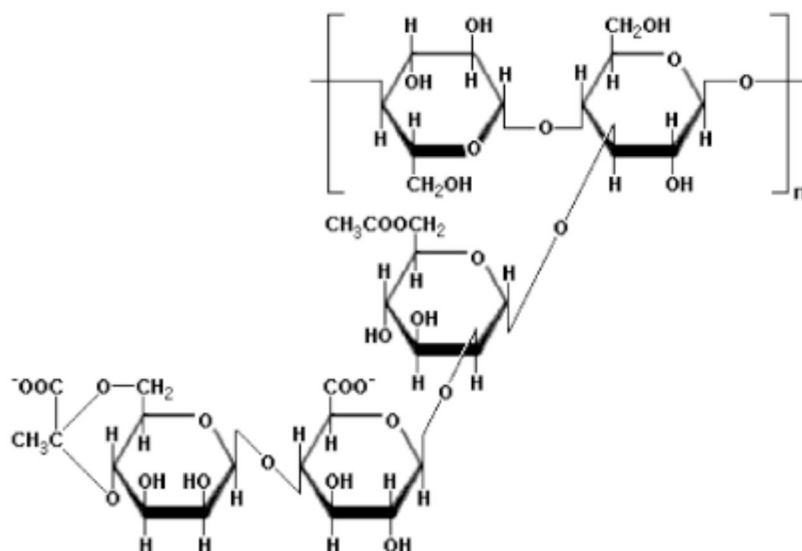


FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA XANTANA (XAN) REPRESENTANDO O ESQUELETO (1→4)-β-D-GLUCANA COM SUBSTITUIÇÃO NO CARBONO 3 POR UMA CADEIA LATERAL TRISSACARÍDICA COMPOSTA POR UMA UNIDADE DE ÁCIDO D-GLUCURÔNICO (β-1→2) E DUAS UNIDADES DE MANOSE LIGADAS.
FONTE: SUTHERLAND (1977)

O aumento da temperatura gera um enovelamento da estrutura que causa a dissociação das ligações de hidrogênio e altera suas propriedades reológicas (ROCHEFORT e MIDDLEMAN, 1987). Após o resfriamento, as moléculas de xantana se unem, duas a duas, formando duplas hélices (MILAS, REED e PRINTZ, 1996). Quando íons são adicionados à solução, a 25 °C ocorre a organização da estrutura com o esqueleto em hélice simples e as cadeias laterais colabam no esqueleto, estabilizando a estrutura (MULLER et al., 1986).

2.3 INTERAÇÃO ENTRE SURFACTANTES-BIOPOLÍMEROS

Surfactantes e polímeros são utilizados em uma grande variedade de aplicações domésticas, industriais e tecnológicas, como em alimentos, tintas, sistemas de liberação de fármacos, fluidos de revestimento, domissanitários e cosméticos. Suas funções principais em conjunto são modificar viscosidade, propriedades reológicas e estabilizar sistemas (GODDARD, 1993; PENFOLD et al., 2003).

As interações entre polímeros e tensoativos opostamente carregados são dirigidas tanto por interações iônicas quanto por interações hidrofóbicas. A

presença de íons na solução é determinante, uma vez que as interações eletrostáticas são parcialmente blindadas na presença de sais, dependendo da concentração e valência destes (BASTARDO et al., 2007; NADERI, MAKUŠKA e CLAEISSON, 2008).

Interações entre polímeros neutros e surfactantes iônicos também são descritas em literatura. Nesse caso as interações são basicamente hidrofóbicas, entre as caudas apolares das moléculas de surfactante e o esqueleto das macromoléculas (HALASOVÁ et al., 2011).

As interações entre polímeros e surfactantes geram agregados com atividade interfacial semelhantes a vesículas de surfactante em solução. A formação de tais agregados ocorre numa concentração menor de surfactante do que a necessária para formação de vesículas de surfactante sozinho, a concentração vesicular crítica (CVC). Esta menor concentração na presença de polímeros é denominada de concentração de agregação crítica (CAC), enquanto a concentração (BAIN et al., 2010).

As interações entre os surfactantes catiônicos brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) e dodeciltrimetil amônio (DTAB) com os polímeros guar, carboximetil-hidroxipropil guar e xantana, foram identificadas por condutimetria, tensiometria, viscosimetria e microcalorimetria (MUKHERJEE, SARKAR E MOULIK, 2010). O CTAB demonstrou-se mais interativo do que DTAB para todos os polímeros na seguinte ordem: guar < carboximetil-hidroxipropil guar < xantana. Na adição inicial de surfactante as cadeias poliméricas se contraíram, contudo se estenderam com o aumento da concentração de surfactante até a formação de agregados.

As interações entre ácido hialurônico e vários tensoativos foram estudadas por tensiometria e fluorimetria (HALASOVÁ et al., 2011), concluindo que embora o aumento da força iônica do meio diminua a interação eletrostática entre o polímero e os tensoativos, esta interação não deixa de existir. Também ficou evidente que a maior interação se deu entre o polímero e Tween 20, sugerindo que esse favorecimento se deu pela baixa polaridade da cabeça polar, um carboidrato, do tensoativo, a qual interage preferencialmente por ligações de hidrogênio.

A interação entre carboxi-metil celulose e CTAB foi detalhada termodinamicamente através de condutimetria, tensiometria, turbidimetria e microcalorimetria (CHAKRABORTY, CHAKRABORTY e GHOSH, 2006). Comprovou-se a formação de agregados de polímeros e surfactantes, semelhantes a vesículas, abaixo da CVC e vesículas livres acima da CVC, uma vez que os polímeros já haviam sido todos ocupados.

A interação entre polieletrólitos e surfactantes iônicos em misturas aquosas possui um papel importante no controle das propriedades reológicas e na estabilidade de processos industriais (THALBERG e LINDMAN, 1993). As interações entre polímeros e tensoativos opostamente carregados em água são cruciais na formação de agregados, separação de fases e na adsorção (Babak, Vikhoreva e Lukina, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação entre o surfactante catiônico DODAB com os polímeros naturais XAN e GLC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a carga superficial e diâmetro hidrodinâmico dos polímeros em solução através de análises de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- Verificar as interações entre os surfactantes e as macromoléculas por análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS), tensiometria, potencial zeta, e análises de microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC);
- Determinar a concentração vesicular crítica (CVC) do surfactante, a concentração de agregação molecular (CAM) das macromoléculas e a concentração de agregação crítica (CAC) dos surfactantes na presença das macromoléculas por tensiometria;
- Avaliar as interações entre macromoléculas e surfactantes termodinamicamente através dos cálculos de energia livre padrão de adsorção, energia livre padrão de formação de vesículas, entropia de formação de vesículas, excesso superficial e área mínima ocupada por uma molécula de surfactante na interface;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DOS MATERIAIS

A xantana comercial (Sigma-Aldrich) foi dispersa em água ultrapura a 1 mg.mL^{-1} e purificada por diálise em membrana de celulose com diâmetro de poros de 12 kDa (Sigma-Aldrich) contra ácido acético $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ por 3 dias, seguido por água ultrapura por 2 dias com trocas de meio a cada 8 horas. Após a diálise o polímero foi liofilizado (Micromodulyo, Thermo).

A galactomanana de alfarroba comercial (Sigma-Aldrich) foi dispersa em água ultrapura a $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e centrifugada (Sigma 4K15C) a 10.000 g por 20 minutos a 40°C . As impurezas precipitadas foram descartadas e ao sobrenadante foi adicionado álcool etílico absoluto qsp 70%. Esta suspensão foi então centrifugada a 10.000 g por 20 minutos a 5°C para precipitar o polímero purificado, o qual foi então lavado com etanol absoluto e novamente centrifugado e seco em estufa a 40°C .

O brometo de dioctadecildimetil amônio (Sigma-Aldrich) foi utilizado conforme adquirido.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AGREGAÇÃO MOLECULAR E MICELAR CRÍTICA

Os polímeros e o surfactante foram submetidos à análises para a determinação da concentração vesicular crítica (CVC), surfactante sozinho em água ultrapura, e de agregação crítica (CAC) surfactante em soluções contendo XAN ou GLC. Foram preparadas soluções de diversas concentrações em água ultrapura, com aquecimento dos polímeros a 60°C por 1 h, e agitação magnética por 24 h. A fim de verificar a interação entre os polissacarídeos e DODAB, diferentes quantidades de surfactante foram adicionadas a soluções de XAN e GLC, ambos a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, em água ultrapura. Estas amostras foram então submetidas às seguintes análises.

4.2.1 Tensiometria

As análises foram realizadas, a 25°C, de acordo com o método do formato da gota pendente em equipamento OCA15 (Dataphysics). Uma gota da solução do polímero, ou tensoativo, é formada na ponta de uma agulha e permanece pendente. O formato da gota é captado por uma câmera e através do software SCA20, a tensão interfacial é determinada pela curvatura da gota através da equação de Laplace-Young abaixo,

$$P_i - P_e = (D - 1) \frac{\gamma}{R} \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

onde, P_i é a pressão interna, P_e é a pressão externa, D a dimensão espacial, R é o raio de curvatura da gota e γ é a tensão superficial. As análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

4.2.2 Potencial zeta

O potencial ζ dos polímeros foi determinado para soluções a 0,5 mg.mL⁻¹, e do surfactante a 5 mmol.L⁻¹ em água ultrapura, por mobilidade eletroforética, utilizando cubetas descartáveis de poliestireno em equipamento Zetasizer nano-zs (Malvern), a 25°C, após 120 segundos de estabilização. Esses experimentos foram realizados na Universidade de Waterloo.

4.2.3 Espalhamento de luz dinâmico

As amostras preparadas para potencial zeta foram submetidas a análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS) com ângulo de detecção de 173° em equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern) em cubetas descartáveis a 25°C. Os foram filtrados pelo número de partículas contadas, não pela intensidade de luz espalhada.

4.2.4 Microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC)

Para este experimento as amostras foram solubilizadas sem aquecimento. As varreduras foram realizadas para XAN a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de 25°C a 100°C , em equipamento Micro DSC III (Setaram), em atmosfera inerte de nitrogênio, sob fluxo de 15 bar, em cadinhos de 1 cm^3 com taxa de aquecimento e de resfriamento de $0,2^\circ\text{C.min}^{-1}$. A fim de mensurar a interação eletrostática entre XAN e DODAB, o surfactante foi adicionado qsp 5 mmol.L^{-1} , à uma solução $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de XAN e submetido à varredura como anteriormente descrita. Os dados foram coletados e analisados pelo software Setsoft 2000. As análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

Não foi possível realizar este experimento com GLC e DODAB devido à alta viscosidade da GLC.

4.2.5 Titulação calorimétrica isotérmica (ITC)

Os experimentos foram realizados em equipamento VP-ITC (Microcal, USA) na Universidade de Waterloo. As soluções de surfactante foram tituladas sobre as soluções de XAN ou GLC a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foram 30 adições de $10 \mu\text{L}$ com intervalo de 600 s entre cada adição. A ponta da seringa atua como agitador mecânico para garantir a mistura do sistema a 300 rpm. Os dados foram coletados e processados com o software Origin 7.0 (OriginLab).

4.2.5.1 Parâmetros termodinâmicos

O grau de ionização das vesículas foi determinado por titulação condutimétrica e a energia livre de Gibbs padrão de micelização (ΔG_{mic}^0) foi calculada por BERG (2010),

$$\Delta G_{ves}^0 = (1 + \beta)RT \ln cmc \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

onde, β é o grau aparente de contra íons ligados à micela, calculado por $1 - \alpha$, sendo α o grau de ionização das micelas, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura de micelização.

O excesso superficial máximo na interface solução/ar (Γ_{max}) foi calculado através da isoterma de adsorção de Gibbs (TADROS, 1984),

$$\Gamma_{max} = \frac{-1}{2.303RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \log c} \right)_T \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

onde, R a constante universal dos gases, T a temperatura, γ a tensão interfacial/superficial e c a concentração de surfactante.

Conhecendo-se Γ_{max} foi possível calcular a área mínima ocupada por uma molécula de surfactante na interface (a_{min}), a qual foi calculada segundo Tadros (1984),

$$a_{min} = \frac{10^{18}}{N_A \Gamma_{max}} \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

onde, N_A é o número de Avogadro.

A energia livre padrão de adsorção (ΔG_{ads}^0) na interface solução/ar foi calculada pela equação:

$$\Delta G_{ads}^0 = \Delta G_{ves}^0 - \pi_{cmc} / \Gamma_{MAX} \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

onde, π_{cmc} é a pressão superficial na CVC, calculada pela diferença entre a tensão superficial da água pura e a tensão superficial da solução de surfactante na CVC (SIKIRIC, PRIMOZIC e FILIPOVIC-VINCEKOVIC, 2002).

5. RESULTADOS

5.1 TENSIOMETRIA

Ao formar uma gota de solução contendo moléculas tensoativas o balanço das interações direcionará as moléculas de surfactante para a interface da gota com o ar (COSGROVE, 2010). A adsorção de moléculas reduz a tensão na superfície, ou interface. Quando toda interface está ocupada a ocorre a formação de um platô de tensão mínima e há um excesso superficial. O aumento da concentração de surfactante a partir deste ponto não reduz mais a tensão interfacial e resulta na criação de regiões apolares no seio da gota, orientado pelas ligações de hidrogênio das moléculas de água e pelas interações entre as cadeias carbônicas (CHAKRABORTY e GHOSH, 2006; COSGROVE, 2010).

A FIGURA 4a apresenta os resultados de tensiometria obtidos para DODAB em água ultrapura e em soluções de XAN ou GLC a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pôde-se observar a redução da tensão superficial com a adição de surfactante em todos os sistemas, bem como a formação de platôs. Houve precipitação apenas na solução de XAN. As barras indicam o desvio padrão de triplicatas.

5.2 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento de uma partícula mais os contra íons que se movem com ela quando uma diferença de potencial elétrico é aplicada no meio (DISALVO e BOUCHET, 2012).

A FIGURA 4b apresenta os resultados das análises de potencial zeta para DODAB em água ultrapura e nas soluções de XAN ou GLC a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pôde-se observar em todos os sistemas o aumento da carga medida com a adição de surfactante, o que condiz com sua carga catiônica. As barras indicam o desvio padrão de triplicatas.

5.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

O DLS determina o raio hidrodinâmico de partículas e agregados através da frequência de variação da luz espalhada devido ao movimento seu Browniano

(BERNE e PECORA, 2000). A FIGURA 4c apresenta o diâmetro hidrodinâmico dos colóides de DODAB formados em água ultrapura e nas soluções de XAN ou GLC a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Em todos os sistemas foram identificadas nanopartículas. As barras indicam o desvio padrão de triplicatas.

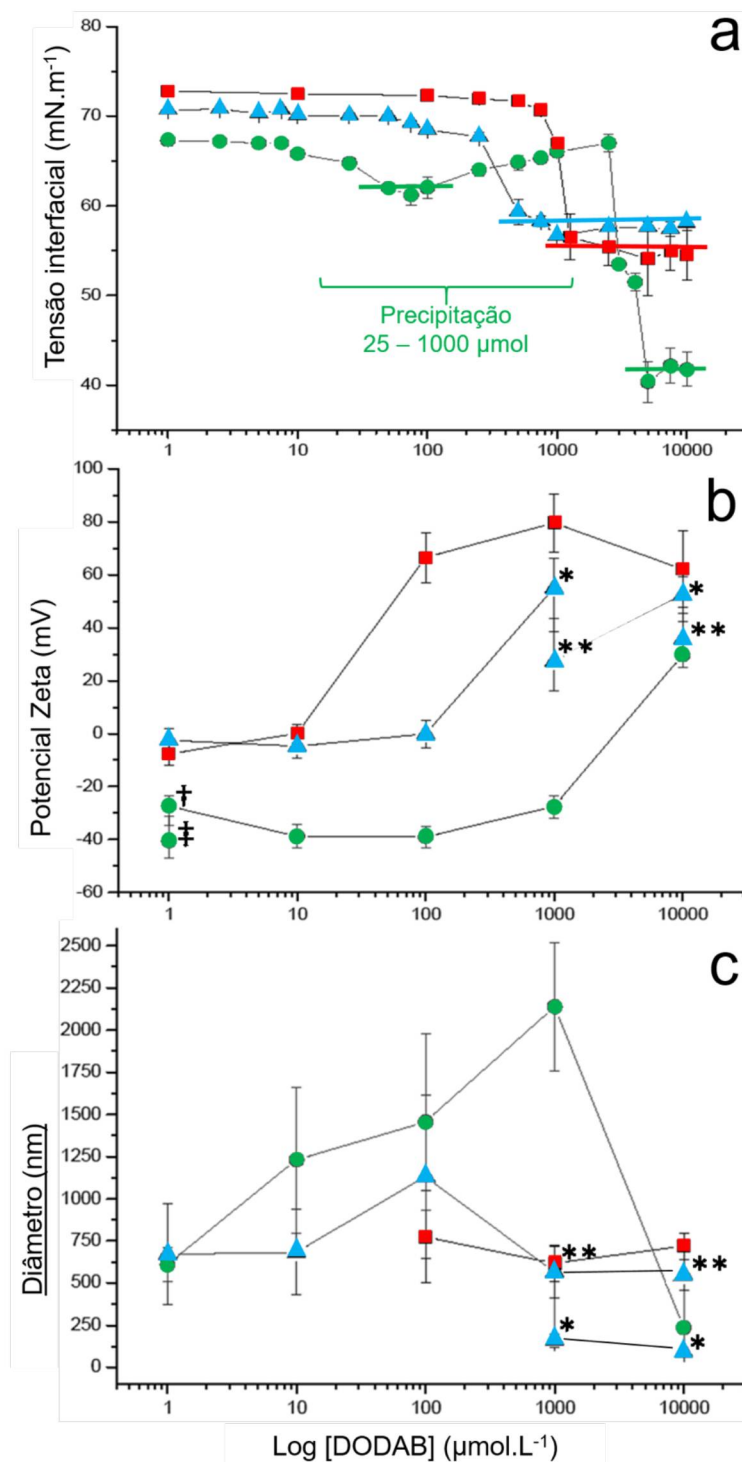


FIGURA 4 – a) ISOTERMA DE TENSIOMETRIA DETERMINADA POR GOTA PENDENTE. b) POTENCIAL ZETA DETERMINADO POR MOBILIDADE ELETROFORÉTICA. c) DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DETERMINADO POR ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO. DODAB EM ÁGUA ULTRAPURA (■) EM GLC A $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (▲) E XAN A $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (●).
 * Vesículas livres de DODAB
 ** Agregados DODAB-GLC
 † Agregados DODAB-XAN
 ‡ Moléculas livres de XAN
 AS BARRAS DENOTAM DESVIO PADRÃO DE TRIPLICATAS.
 TODOS EXPERIMENTOS REALIZADOS A 25°C .
 FONTE: O AUTOR (2015)

5.4 PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DE ADSORÇÃO E FORMAÇÃO DE VESÍCULAS

A análise de μ -DSC FIGURA 5 mostrou que a interação de DODAB com XAN aumenta a entalpia de fusão das cadeias de DODAB a 45°C, de 16 J.mol⁻¹ para 80 J.mol⁻¹, um aumento de 5 vezes. A microcalorimetria também evidenciou que todos os sistemas formaram vesículas unilamelares grandes (LUV), uma vez que foi observado apenas um evento na curva de aquecimento a 45°C e um evento no resfriamento a 40°C, com uma histerese térmica de 5°C característica de LUV (FEITOSA, BARRELEIRO e OLOFSSON, 2000).

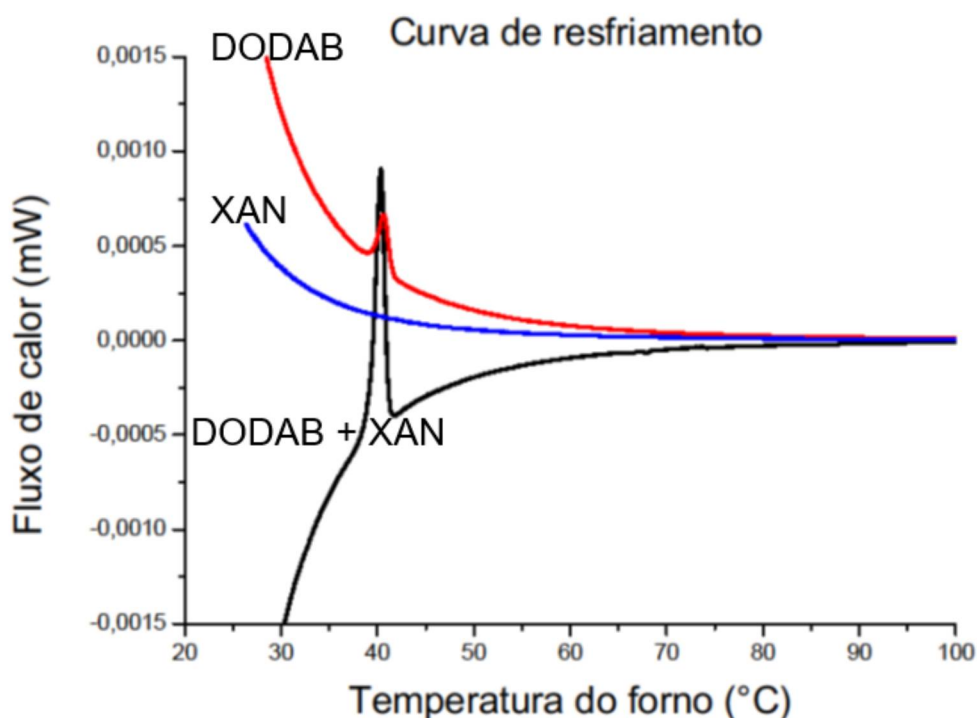


FIGURA 5 – ANÁLISES DE MICROCALORIMETRIA REVELANDO QUE OS SISTEMAS FORMARAM LUV. ACIMA DODAB 5 mmol.L⁻¹ EM ÁGUA ULTRAPURA. NO CENTRO SOLUÇÃO DE XAN 0,5 mg.mL⁻¹ SEM DODAB. ABAIXO DODAB 5 mmol.L⁻¹ EM SOLUÇÃO DE XAN 0,5 mg.mL⁻¹. EXPERIMENTOS REALIZADOS SOB ATMOSFERA DE NITROGÊNIO DE 10 BAR COM TAXA DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO DE 0,2°C.min⁻¹. FONTE: O AUTOR (2015)

A FIGURA 6 mostra os sinais brutos (acima) e a integração das áreas (abaixo) de cada injeção em função do aumento da razão molar entre o DODAB adicionado a cada injeção e os polímeros no meio. As curvas de entalpia de ambos os polímeros avaliados apresentam um evento endotérmico rápido e cooperativo a cada injeção, atribuído à ligação dos polímeros a vesículas de DODAB em solução. As entalpias de ligação foram calculadas como a diferença entre a entalpia inicial e a média das entalpias no platô final.

Outros parâmetros termodinâmicos foram calculados e podem ser vistos na Tabela 1. São eles a energia livre padrão de formação de vesículas (ΔG_{ves}^0), a energia livre padrão de adsorção (ΔG_{ads}^0), o excesso superficial máximo na interface ar/solução (Γ_{max}) e a área mínima ocupada na interface ar/solução (a_{min}). Estes parâmetros fornecem uma melhor compreensão do comportamento das moléculas de surfactante catiônico na presença e na ausência de XAN, aniônica, e GLC, neutro.

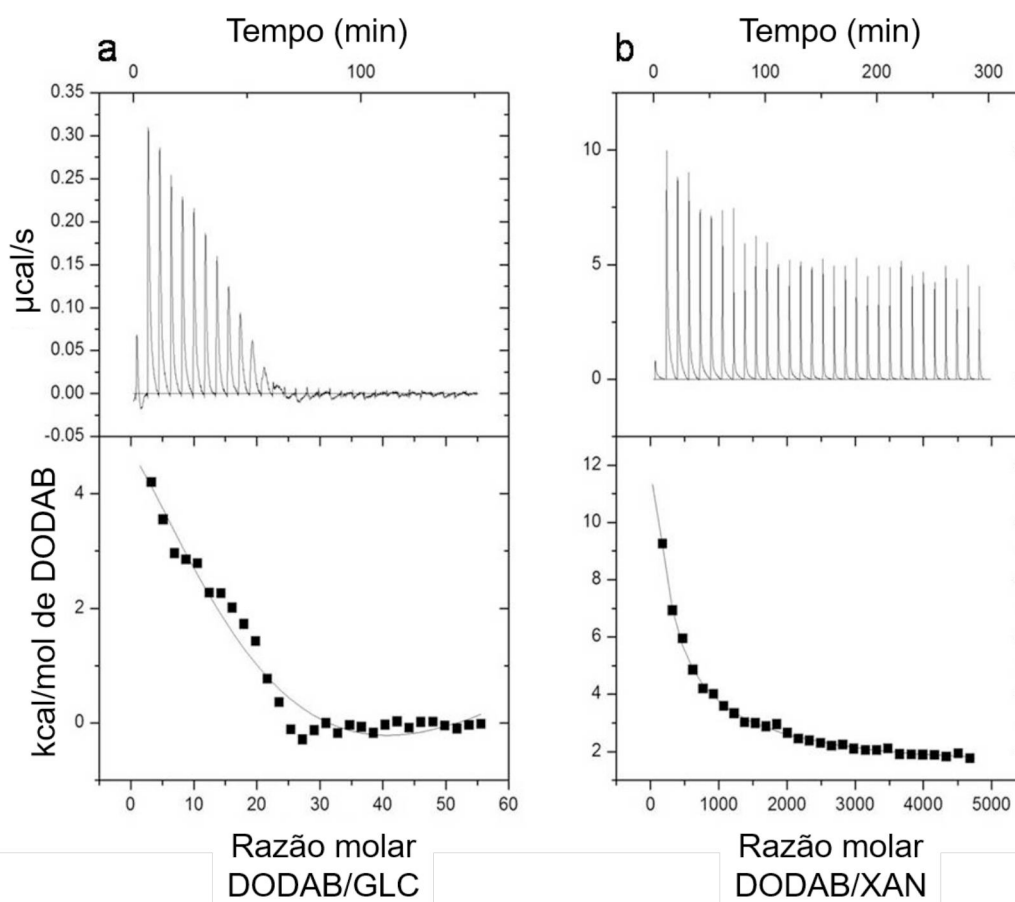


FIGURA 6 - TERMOGRAMAS (ACIMA) E ISOTERMA DE LIGAÇÃO (ABAIXO). AS ÚLTIMAS RESULTAM DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DE ITC DAS PRIMEIRAS, OBTIDOS A 25 °C.

a) DODAB TITULADO SOBRE SOLUÇÃO DE GLC A 0,5 mg.mL⁻¹.

b) DODAB TITULADO SOBRE SOLUÇÃO DE XAN A 0,5 mg.mL⁻¹.

FONTES: O AUTOR

TABELA 1 - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DAS INTERAÇÕES ENTRE DODAB, GLC E XAN

PARÂMETROS	DODAB	DODAB + GLC	DODAB + XAN
ΔG_{ves}^0 (kJ.mol ⁻¹)	- 39,9	- 46,4	- 39,6
ΔG_{ads}^0 (kJ.mol ⁻¹)	- 78,5	- 143,5	- 478,4
Γ_{max} (mol.m ⁻²)	$4,7 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-6}$	$5,9 \times 10^{-7}$
a_{min} (nm ²)	3,5	12,0	28,4

ΔG_{ves}^0 e ΔG_{ads}^0 são as energias padrão livres de formação de vesículas e de adsorção, respectivamente. Γ_{max} é o excesso superficial máximo e a_{min} é a área mínima ocupada por uma molécula de surfactante na interface.

5.5 INTERAÇÃO DODAB-GLC

A FIGURA 4a evidencia que nas soluções de GLC a tensão interfacial reduz em menores concentrações de DODAB, em relação à DODAB em água ultrapura. Isto indica a formação de agregados DODAB-GLC que migram para a interface ar/água. Estes agregados exibem tensoatividade, portanto, menos moléculas de DODAB são necessárias para reduzir a tensão interfacial.

Embora a tensão interfacial reduza em concentrações menores de DODAB nas soluções de GLC, a tensão interfacial mínima atingida no platô é maior do que a tensão interfacial atingida na CVC do DODAB em água ultrapura. Isto pode ser atribuído ao efeito de impedimento espacial dos agregados DODAB-GLC formados que ocupam a interface, impedindo a chegada de mais moléculas de surfactantes, já descritos por Manousakis e Avranas (2013).

A interação entre DODAB e GLC é sustentada majoritariamente por interações hidrofóbicas. As caudas dos surfactantes se ligam ao esqueleto dos polímeros; esta interação reduz a necessidade de adsorção na interface, uma vez que os agregados formados criam um núcleo hidrofóbico e ficam com as cabeças polares voltadas para o meio, conforme ilustrado na FIGURA 7.

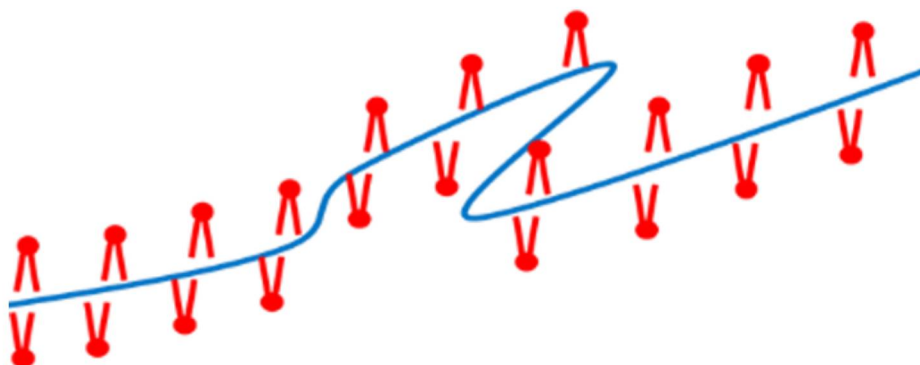


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE AS CAUDAS APOLARES DE DODAB E O ESQUELETO DO POLÍMERO NEUTRO GLC.
FONTE: O AUTOR

A medida que mais moléculas de surfactante interagem com GLC, aumentam tanto o potencial zeta (FIGURA 4b) como o diâmetro (FIGURA 4c) dos agregados. Acima da CVC há uma distribuição bimodal, indicando que os sítios de interação da GLC foram saturados e as moléculas de DODAB excedentes se

organizaram em vesículas. A redução no diâmetro dos agregados de DODAB-GLC em maiores concentrações de DODAB pode ser atribuído ao encolhimento dos agregados devido à repulsão Coulumbiana entre os agregados e as vesículas de DODAB, uma vez que todo o sistema está positivamente carregado.

Como a interação entre DODAB e GLC ocorre majoritariamente entre as caudas apolares do tensoativo e o esqueleto do polímero, a cabeça polar fica voltada para o meio, inibindo a interação de mais moléculas de DODAB com o GLC pela repulsão Coulumbiana catiônica. Na isoterma do DODAB em solução de GLC (FIGURA 4a) a tensão interfacial começa a reduzir a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e a saturação da interface ocorre aproximadamente a $1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

5.6 INTERAÇÃO DODAB-XAN

Em solução de XAN a tensão interfacial reduz a partir de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DODAB, concentração menor do que nos outros meios (FIGURA 4a). A tensão atingiu um primeiro platô entre 50 e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DODAB e voltou a subir até $1250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ caindo abruptamente acima disso. Também foi observado a formação de precipitados apenas no meio contendo XAN, entre 25 e $1250 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

A redução na tensão interfacial entre 50 e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pode ser atribuída à formação de agregados DODAB-XAN com maior tensoatividade que a do surfactante puro.

A principal interação entre DODAB e XAN é eletrostaticamente dirigida: moléculas de DODA^+ ligam-se aos sítios com carga negativa de XAN num processo de troca iônica. Entretanto, esta não é a única interação possível; as caudas apolares dos surfactantes também podem se ligar ao esqueleto de XAN através de interações hidrofóbicas, da mesma forma que interagem com GLC, conforme ilustrado na FIGURA 8.

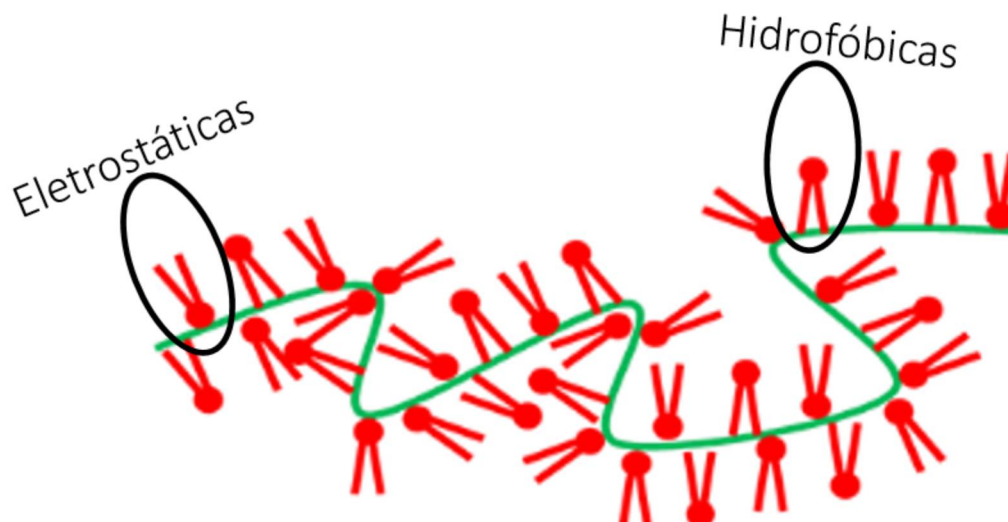


FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DAS INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS (ENTRE A CABEÇA CATIÔNICA DE DODAB E OS SÍTIOS ANIÔNICOS DE XAN) E HIDROFÓBICAS (ENTRE AS CAUDAS APOLARES DE DODAB E O ESQUELETO NEUTRO DE XAN).
 FONTE: O AUTOR

A ligação de DODAB nos sítios negativos de XAN é um processo endotérmico dirigido pelo ganho de entropia, resultado da liberação de contra íons ao meio. Estes contra íons, quando condensados ao redor das cargas de DODA⁺ e XAN, perdem sua entropia translacional; a qual é devolvida quando DODA⁺ se liga a XAN. Este ganho de entropia é a força motriz do processo.

A medida que surfactantes se ligam às cargas negativas, a repulsão Coulumbiana entre moléculas de XAN diminui, aumentando a tendência de floculação/precipitação, observada macroscopicamente.

O aumento na tensão interfacial entre as concentrações de 100 a 1250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DODAB pode ser devido à precipitação dos agregados DODAB-XAN, que cria domínios hidrofóbicos no meio; assim como a dessorção de surfactantes da interface para estes domínios. Um efeito semelhante foi observado por Viseu e colaboradores (2000) para misturas contendo surfactantes catiônicos. O aumento da tensão interfacial acima da CAC foi atribuído à migração de surfactantes da interface para o meio. Esta interpretação foi então comprovada por microscopia. Além da dessorção de surfactantes, Manoli e Avranas (2013) demonstraram que a formação dos agregados de surfactante-polímero reduz a adsorção de surfactantes na interface.

A medida que DODAB é adicionado, os sítios de interação nas moléculas de XAN saturam e as moléculas livres de DODAB migram para a interface; desta

forma, a tensão interfacial cai abruptamente ao mínimo, a CVC. Devido à maior CVC em solução de XAN, comparado ao surfactante puro em água ultrapura, a mistura atinge um platô a uma menor tensão interfacial.

Este resultado pode ser atribuído à redução da repulsão Coulumbiana das cabeças polares de surfactante na interface, mediada por íons Br⁻, que ocorre devido à menor quantidade de contra íons necessária para estabilizar os agregados DODAB-XAN do que vesículas de surfactante puro. De acordo com Jiang e colaboradores (2013), esta redução pode ser atribuída aos agregados, que facilitam a adsorção de novas moléculas de surfactante à interface entre as moléculas já adsorvidas, desta forma aumentando o número de espécies tensoativas.

Acima da CVC, a adição de mais surfactante resulta na formação de vesículas de surfactante puro. A repulsão das cargas catiônicas suspende os agregados DODAB-XAN. Na concentração de 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DODAB em solução de XAN há um aumento no potencial zeta (FIGURA 4b), demonstrando que os sítios negativos do polímero estão ocupados por DODA⁺. A baixas concentrações de DODAB podem apenas reduzir as cargas negativas dos grupos carboxila ocupados. Com o aumento da concentração de DODAB as cargas negativas do polímero são neutralizadas e então ocorrem interações hidrofóbicas entre as caudas apolares do surfactante e o esqueleto do polímero. Estas interações deixam as cabeças catiônicas dos tensoativos expostas, provendo carga positiva aos agregados.

Potencial zeta é um método comum para determinar a estabilidade de sistemas coloidais. Usualmente, quando o potencial zeta de um sistema está entre -30 e +30 mV, as partículas tendem a flocular/precipitar (LI et al., 2011). Os valores de potencial zeta determinados para as amostras de DODAB em XAN que apresentaram precipitação apresentaram valores entre -40 e -30 mV pois as análises foram realizadas apenas com o sobrenadante de tais sistemas.

Abaixo da CVC há sítios carboxílicos disponíveis que resultam numa carga superficial negativa a 1000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Acima da CVC a carga das partículas torna-se positiva, aproximadamente 30 mV, indicando a formação de vesículas de DODAB puro, que estabilizam o sistema e explica a suspensão dos agregados precipitados.

Com o aumento da concentração de DODAB, até a CVC, observa-se o aumento do diâmetro dos agregados (FIGURA 4c), o qual ultrapassou 2000 nm, apenas o sobrenadante foi analisado. Estes agregados espalham muito a luz incidente e resultam em turbidez do sistema. Acima da CVC foi possível determinar o tamanho das vesículas de surfactante puro.

Na CVC a formação de vesículas e termodinâmica de adsorção de DODAB em solução de XAN foram semelhantes a água ultrapura (TABELA 1), o que sustenta a hipótese de que os sítios de XAN foram saturados e o polímero não afeta mais o sistema. Por este motivo os parâmetros termodinâmicos de DODAB em solução de XAN não foram profundamente investigados.

5.7 COMPARAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE DODAB, GLC E XAN

Titulação isotérmica calorimétrica (ITC) foi utilizada para determinar a entalpia de ligação entre os polímeros, XAN e GLC, e DODAB. A análise resulta em uma isoterma de ligação (FIGURA 6) que fornece informação analítica precisa, como o número de vesículas livres e ligadas em diferentes estágios do processo de interação (COUDERC-AZOUANI et al., 2004).

A FIGURA 6 mostra a curva de sinal (acima) e a integral da área a cada injeção (abaixo). A entalpia medida na célula resulta da soma de diferentes energias, como a energia de diluição e da ligação dos polímeros sobre as vesículas. A energia da interação entre os polímeros e tensoativos é mais significativa que a soma de outras energias, que representam as pequenas variações de entalpia após a saturação de todo polissacarídeo.

As curvas de entalpia de ambos polímeros exibiram apenas um evento endotérmico cooperativo a cada injeção, atribuído à ligação destes à DODAB. A ΔH_{lig} (entalpia atribuída a ligação de DODAB nas moléculas de polissacarídeos) foi calculada como a diferença entre a ΔH e a ΔH média ao atingir o platô.

A FIGURA 6a evidenciou pela razão molar que cada molécula de GLC interagiu com aproximadamente 25 moléculas de DODAB. A entalpia desta interação foi de 17,6 kJ.mol⁻¹ de DODAB. Com aproximadamente 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DODAB todos sítios de interação de GLC foram saturados e houve um excesso de vesículas de DODAB puro.

Na FIGURA 6b um platô foi observado entre 600 e 900 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DODAB. Nesta faixa de concentração, os sítios de interação das moléculas de XAN foram saturadas; cada molécula de polissacarídeo interagiu com cerca de 1500 moléculas de DODAB, com uma entalpia de 26,4 kJ.mol^{-1} de DODAB. As pequenas variações de entalpia com a adição de mais surfactante tendem a zero e podem ser atribuídas a associações em sistemas coloidais maiores.

As moléculas de XAN são maiores e possuem massa molar ponderal média (M_w) de $1,03 \times 10^6 \text{ g. mol}^{-1}$, enquanto as moléculas de GLC possuem M_w de $0,26 \times 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$, o DODAB possui massa molar de 630 g.mol^{-1} (KAMINSKI et al., 2015). Além de serem maiores, ficam mais disponíveis para interagir pois possuem maior comprimento de persistência (L_p), XAN igual a 125 nm e GLC 9 nm, que as deixa mais esticadas em solução e ficam mais distantes umas das outras devido a repulsão Coulumbiana entre as moléculas de XAN (KAMINSKI et al., 2016).

As moléculas de XAN possuem dois mecanismos de interação com DODAB, interações iônicas entre seus grupamentos carboxila e as cabeças polares do surfactante e também interações hidrofóbicas entre o esqueleto do polímero e as caudas apolares de DODAB.

A grande entalpia observada nesta análise sugere que os sítios aniônicos das moléculas de XAN interagiram fortemente com as cabeças catiônicas de DODAB. A maior troca de calor de DODAB-XAN, comparada a DODAB-GLC, referente às interações iônicas entre DODA^+ e XAN.

Na FIGURA 4b observa-se que em água ultrapura nanopartículas catiônicas foram formadas a partir de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, comparado a $1000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em solução de GLC, e $10000 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em solução de XAN. Este incremento na concentração necessária de surfactante resulta da ligação deste nos polímeros.

Esta análise demonstrou que as moléculas de surfactante interagiram primeiro com os polímeros e depois entre si. Vesículas de surfactante puro foram formadas apenas acima da CVC. Se houvesse a formação de vesículas abaixo da CVC, poderia ser observada uma distribuição bimodal do potencial zeta com um pico altamente positivo, referente às vesículas de DODAB puro e outro pico próximo ao potencial zeta dos próprios polímeros.

Este aumento no diâmetro dos agregados DODAB-XAN com a adição de mais surfactante, observado na FIGURA 4c, mostrou as diferentes interações entre os tensoativos catiônicos e polímeros neutros ou aniônicos. Enquanto DODAB interage com GLC hidrofobicamente, as cargas positivas do surfactante se voltaram ao meio e os agregados se repeliram. O aumento do diâmetro dos agregados ocorreu apenas até a formação de vesículas de tensoativo puro, ponto em que os agregados se encolhem devido à repulsão Coulumbiana.

No sistema DODAB-XAN são as caudas apolares dos surfactantes que se voltam ao meio, devido à interação iônica entre as cabeças polares e o esqueleto do polímero, favorecendo a formação de agregados que podem flocular ou precipitar, reversivelmente.

Termodinamicamente é favorável que as moléculas de surfactante permaneçam na interface. A autoagregação das moléculas ocorreu apenas quando aproximadamente 80% da interface estava ocupada (MUKHERJEE, MOULIK e RAKSHIT, 2013). A energia livre de adsorção (ΔG_{ads}^0) mais negativa que a energia livre padrão de formação de vesículas (ΔG_{ves}^0) para DODAB (TABELA 1) evidenciou que a adsorção é mais espontânea que a formação de vesículas. Uma vez que CAC e CVC em solução de GLC foram indistinguíveis, ΔG_{ves}^0 corresponde à soma das energias livre de agregação e formação de vesículas. Ao comparar a soma das energias livres do DODAB em GLC com DODAB em XAN fica claro que agregação e formação de vesículas em solução de XAN são mais espontâneas.

Entretanto, em solução de XAN, a adsorção foi mais pronunciada na CAC do que em solução de GLC e água ultrapura. De acordo com Babak, Vikhoreva e Kukin (1997), o aumento da energia livre de adsorção do surfactante em solução de XAN pode ser explicado por três fatores:

- 1) Neutralização da carga catiônica do DODAB pelos grupos funcionais aniônicos da XAN, que reduzem as forças eletrostáticas repulsivas a quase zero, favorecendo a adsorção de DODAB na interface;
- 2) Imersão mais profunda das caudas apolares dos surfactantes, ligados à XAN, na fase apolar (ar), devido à neutralização das cargas catiônicas;

- 3) Adsorção das regiões apolares de XAN na interface, que não ocorre sem a neutralização das cargas de XAN, devido à alta solubilidade desta no meio;
- 4) Maior quantidade de espécies tensoativas adsorvidas na interface devido a estabilização por agregados.

A Γ_{\max} mede as mudanças na interface causadas pela adsorção de surfactante. Ela depende da estrutura adsorvida e sua orientação na interface ar/água. A Γ_{\max} menor para DODAB-XAN na CAC indicou que as moléculas de surfactante interagiram com XAN como descrito anteriormente. A a_{\min} expandiu na presença de GLC e XAN nas CACs.

Estes resultados podem ser atribuídos à melhor compactação da monocamada na interface ar/água na presença de ambos, GLC e XAN, devido a presença de agregados DODAB-polissacarídeo que estabilizam a interface e aumentam a quantidade de espécies tensoativas nela, como descrito por Chakraborty e colaboradores (2009).

Entretanto, na CVC de DODAB em solução de XAN, tanto Γ_{\max} quanto a_{\min} diminuíram comparados a DODAB em água ultrapura, indicando que os agregados estabilizaram as moléculas de surfactante adsorvidas na interface e permitiram que mais moléculas adsorvessem, formando uma monocamada mais compacta na interface, como descrito por Jiang e colaboradores (2013).

Embora a entalpia aumente, a formação de agregados é favorável, como revelado pela ΔG_{ves}^0 negativa. Isso porque a formação de agregados aumenta a entropia de todo o sistema a 25°C (MATULIS, ROUZINA e BLOOMFIELD, 2000; WANG e TAM, 2002; WANG, et al., 2003).

6. CONCLUSÃO

As interações entre o surfactante DODAB e os biopolímeros XAN e GLC demonstraram ser efetivas para a redução da tensão interfacial e consequente redução da concentração deste tensoativo na confecção de sistemas. DODAB forma agregados maiores com XAN, que interagem entre si, causando turbidez e precipitação quando o potencial zeta dos agregados é menor que 30 mV. Estes precipitados puderam ser ressuspensos com a adição de mais surfactante, que confere carga positiva aos agregados e se associa em vesículas catiônicas que estabilizam o sistema através de repulsão Coulumbiana. DODAB com GLC forma agregados menores e mais uniformes, sem precipitação e turbidez, mesmo em altas concentrações de tensoativo. Com GLC o platô de tensão interfacial mínima foi atingido com menor concentração de surfactante do que com XAN, todavia, com XAN, o platô mínimo atingido tem tensão interfacial menor. Ambos os sistemas possuem aplicabilidade, cada um com seus benefícios. A escolha da força motriz majoritária de interação surfactante-polissacarídeo, iônica ou hidrofóbica, deve ser escolhida de acordo com os aspectos físico-químicos do sistema a ser formado e sua função.

CAPITULO 2:
DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES ÁGUA-ÁGUA DE
PICKERING ESTABILIZADAS POR NANOCRISTAIS DE
CELULOSE

1. INTRODUÇÃO

Partículas coloidais tendem a ocupar interfaces reduzindo a energia livre interfacial. Esse fenômeno foi inicialmente investigado por Pickering (PICKERING, 1907) e é comumente nomeado como emulsão de Pickering.

A adsorção das partículas coloidais inibe a coalescência de partículas que colidem na fase contínua estabilizando assim as emulsões. Esta estratégia de estabilização através de sólidos nanométricos, sem surfactantes, tem ganhado maior atenção num esforço para reduzir o uso de surfactantes em emulsões e espumas (FIROOZMAND, MURRAY e DICKSON, 2009).

Nanocristais de celulose (CNC) tem sido extensivamente investigados em várias áreas por suas características físico-químicas e já foram utilizados com sucesso para estabilizar emulsões de Pickering, sem uso de surfactantes, óleo-água (KALASHNIKOVA et al., 2011).

Emulsões formadas por polímeros hidrossolúveis e incompatíveis são denominadas como emulsões água-água. Entre as incompatibilidades mais comuns de polímeros em água estão polissacarídeos neutros com proteínas (GRINBERG e TOLSTOGUZOV, 1997).

Emulsões água-água possuem potencial para aplicações nas indústrias de alimentos e cosméticos como uma alternativa a emulsões óleo-água, uma vez que estas indústrias têm desenvolvido diversas linhas com redução e até ausência de gorduras, como alimentos *light* e cremes *oil-free*.

O objetivo deste capítulo da tese é propor um modelo de emulsão água-água de Pickering, ou seja, sem uso de óleo e nem de surfactante. Para formar o sistema foram escolhidos os polímeros naturais albumina de ovo e galactomanana de alfarroba, macromoléculas hidrossolúveis utilizadas na industrialmente. Para estabilização desta mistura de soluções poliméricas foram utilizados nanocristais de celulose comerciais e também modificados por ligação covalente de albumina, descrita neste capítulo. A estabilização através de nanocristais modificados e não modificados foi comparada.

2. REVISÃO

2.1 INCOMPATIBILIDADE ENTRE PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS

A incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos é conhecida há mais de 100 anos. Em 1896, Beijerinck descobriu a separação de fases entre soluções aquosas de gelatina e amido e, em 1898, Butschli observou um fenômeno similar para misturas de soluções aquosas de gelatina e amido autoclavado (BEIJERINCK, 1896; BUTSCHLI, 1898).

Em 1910, Beijerinck descreveu o fenômeno de separação de fases dos biopolímeros em várias concentrações de soluções aquosas de gelatina e amido, utilizando iodo como corante. A separação pôde ser revertida alterando as concentrações relativas dos biopolímeros no sistema. A coalescência das gotículas dispersas foi lenta e levou a formação de camadas de líquido. A temperatura não demonstrou importância no processo (BEIJERINCK, 1910).

Ostwald e Hertel observaram que em concentrações constantes de gelatina, o aumento da concentração de amido resultou em maior fração de volume na fase de gelatina. Contudo, em concentrações constantes de amido, o aumento da concentração de gelatina reduziu a fração de volume de amido. Após a separação das fases, as moléculas de amido sofreram desidratação e a fase rica em amido lentamente se transformou em precipitado (OSTWALD e HERTEL, 1929).

Vários outros estudos sobre a incompatibilidade de proteínas e polissacarídeos foram publicados (DOBRY e BOYER 1948; BUNGENBERG, 1952; DOI, 1965) e, a partir de 1965 o estudo da termodinâmica das incompatibilidades ganhou interesse para o desenvolvimento de alimentos formulados e seus processos (NESMEYANOV et al., 1969).

Grinberg reuniu os dados de mais de 100 incompatibilidades entre proteínas e polissacarídeos publicadas por diversos autores (GRINBERG e TOLSTOGUZOV, 1997) e concluiu ser um fenômeno muito generalizado. Segundo seu trabalho, sob determinadas condições, qualquer sistema aquoso tende a separar proteínas e polissacarídeos em fases. Estas condições variam de acordo com os biopolímeros em questão, dependendo da estrutura e

composição destes, bem como da massa molecular ponderal média e conformação.

Abaixo de seu ponto isoelétrico e em baixa força iônica, proteínas interagem com polissacarídeos aniônicos formando complexos tanto solúveis, quanto insolúveis (TOLSTOGUZOV e WAINERMANN, 1975; ANTONOV, GRINBERG e TOLSTOGUZOV, 1979; TOLSTOGUZOV, GRINBERG e GUROV, 1985). Proteínas também podem interagir com polissacarídeos neutros, formando complexos intermoleculares, sob baixa força iônica e em pHs diferentes de seu ponto isoelétrico (GRINBERG e TOLSTOGUZOV, 1972). Presume-se que a interação entre proteínas e polissacarídeos neutros se dê pela atração entre dipolos dos resíduos de carboidratos do polissacarídeo e as cargas da proteína ou pela formação de bases fracas de Schiff com a participação de aldeídos dos polissacarídeos e os grupos amino das proteínas (VARFOLOMEEVA, GRINBERG e TOLSTOGUZOV, 1980; DELLACHERIE et al., 1983).

A separação de fases de misturas contendo proteínas e polissacarídeos neutros, em pHs distantes do ponto isoelétrico da proteína, não é termodinamicamente favorável, devido a um efeito negentrópico pela concentração de contra íons na fase protéica (VASILEVSKA, STARODUBZEV e KHOKHLOV, 1987). Ao se aproximar do ponto isoelétrico as proteínas se auto associam devido a gradual degeneração das forças repulsivas (TANFORD, 1965; HIPPEL e SCHEICH, 1973). O aumento na intensidade de autoassociação das proteínas indica que a água se torna um solvente pior para elas, embora continue um bom solvente para os polissacarídeos (PATTERSON, 1982).

2.2 NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Atualmente há um crescente interesse no desenvolvimento de materiais biodegradáveis utilizando processos tecnológicos de fontes renováveis que ofereçam sustentabilidade e menor dependência de combustíveis fósseis (CHERRIAN et al., 2011; DEEPA et al., 2011). Neste contexto, a celulose se destaca por sua abundância na natureza, biodegradabilidade e baixo custo. A fotossíntese fixa o dióxido de carbono acumulado na atmosfera para a síntese

deste polímero natural promissor e pode ser uma alternativa para controlar o efeito estufa (DEEPA et al., 2011; LIU et al., 2010).

As fibras de celulose são utilizadas em várias aplicações industriais há muito tempo. Contudo, apenas através da hidrólise ácida das fibras de celulose foram obtidas estruturas cristalinas nanométricas, denominadas nanocristais de celulose (CNC) (BRAS et al., 2010). Através da hidrólise com ácido sulfúrico podem ser obtidos nanocristais uniformes, carregados negativamente pela sulfatação de grupos hidroxila, que formam dispersões coloidais estáveis (OSKMAN et al., 2006), com alta superfície reativa, o que o torna um excelente material de partida para modificações químicas e funcionalização (LU e HSIEH, 2012).

2.3 INTERFACES ESTABILIZADAS POR PARTÍCULAS COLOIDAIS

Emulsões de Pickering utilizam-se de partículas coloidais para a estabilização de sistemas sem surfactantes. As partículas se dirigem à interface tanto por adsorção como por depleção, pela força repulsiva resultante entre os polímeros incompatíveis (FIROOZMAND, MURRAY e DICKSON, 2009; BALAKRISHNAN et al., 2012). Estas partículas adsorvidas nas interfaces previnem a coalescência de gotículas da fase dispersa. Esta forma de estabilização de emulsões resulta numa estabilidade maior do que o uso de surfactantes de baixa massa molecular, pois colóides tendem a adsorver quase irreversivelmente em interfaces (BINKS, 2002).

As incompatibilidades entre biopolímeros solúveis em água gera separação de fases aquosas distintas. Estas incompatibilidades ocorrem com concentrações relativamente baixas, resultando em fases compostas majoritariamente por água com propriedades muito semelhantes. Ao contrário de interfaces tradicionais, as emulsões água-água não possuem espessura bem definida, e sim uma natureza difusa. A interface é então definida como a região na qual a concentração dos dois biopolímeros difere (SAGIS e SCHOLTEN, 2014).

A tensão nestas interfaces é muito baixa quando comparada a interfaces óleo-água (da ordem de $1 \mu\text{N/m}$, comparado a dezenas de $\mu\text{N/m}$), portanto criar tais interfaces não exige grande quantidade de energia, o que torna sua

estabilização mais desafiadora. Quando ambas as fases são líquidas a separação delas tende a ser completa, minimizando a área de interface. Contudo, pesquisas têm demonstrado que emulsões água-água podem ser estabilizadas e a separação de fases aquosas pode ser desacelerada através de Pickering (FIROOZMAND, MURRAY e DICKSON, 2009; NGUYEN, NICOLAI e BENYAHIA, 2013).

Embora a tensão interfacial entre moléculas imiscíveis solúveis em água seja extremamente pequena quando comparada a interfaces óleo/água, emulsões água-água de Pickering já foram formadas e observadas por horas e até poucos dias. Entre os materiais utilizados estão gelatina e amido (FIROOZMAND, MURRAY e DICKSON, 2009), xantana e caseína (HANAZAWA e MURRAY, 2014), amido ceroso e galactomananas de Guar e Alfarroba (MURRAY e PHISARNCHANANAN, 2014), dextrana e óxido de polietileno (BALAKRISHNAN et al., 2012; NGUYEN, NICOLAI e BENYAHIA, 2013), dextrana e albumina com metilcelulose (POORTINGA, 2008), por exemplo.

Entre os coloides utilizados para formar emulsões água-água de Pickering estão partículas de látex (FIROOZMAND, MURRAY e DICKSON, 2009; BALAKRISHNAN et al., 2012) e sílica (MURRAY e PHISARNCHANANAN, 2014), partículas proteicas (NGUYEN, NICOLAI e BENYAHIA, 2013), gotículas de óleo (HANAZAWA e MURRAY, 2014) e quartzo (POORTINGA, 2008).

O aumento significativo na estabilidade que partículas coloidais podem dar a emulsões e espumas, comparado a emulsificantes mais tradicionais, provavelmente irá levar a maior utilização de estabilização por Pickering na indústria de alimentos. Particularmente quando partículas de grau alimentício e até funcionais, como fibras e proteínas, chegarem ao mercado (SAGIS e SCHOLTEN, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a formação de emulsão água-água estabilizada por nanocristais de celulose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a carga superficial e diâmetro hidrodinâmico das macromoléculas, ALB e GLC, e dos nanocristais de celulose em solução através de análises de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- Modificar o CNC através de oxidação com reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) e posterior ligação covalente de ALB para direcionar o posicionamento das partículas coloidais;
- Elaborar emulsões de ALB com GLC, estabilizadas com CNC, modificado e não modificado, e avaliar sua estabilidade;
- Investigar a termodinâmica de interação entre ALB e CNC, GLC e CNC modificado ou não, por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MOLÉCULAS

A albumina comercial de ovo (Sigma-Aldrich) foi solubilizada em água ultrapura a 1 mg.mL^{-1} e purificada por diálise em membrana de celulose com diâmetro de poros de 12 kDa (Sigma-Aldrich) contra água ultrapura por 2 dias com trocas de meio a cada 8 horas. Após a diálise o polímero foi liofilizado (Micromodulyo, Thermo).

A galactomanana utilizada seguiu o método de preparo e purificação descritos no item 4.1 do primeiro capítulo desta tese. Os nanocristais de celulose (Celluforce) foram utilizados conforme fornecidos.

A caracterização das macromoléculas ALB, GLC e CNC, foi feita a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em água ultrapura de acordo com os itens 4.2.2 e 4.2.3 do primeiro capítulo desta tese. Esses experimentos foram realizados na Universidade de Waterloo.

4.2 MODIFICAÇÃO DO NANOCRISTAL DE CELULOSE

Primeiramente os cristais foram oxidados com o reagente N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO). Em 400 mL de água ultrapura foram dispersos 2,5 g de CNC, 50 mg de TEMPO e 800 mg de brometo de sódio. O pH foi ajustado com hidróxido de sódio a 1 mol.L^{-1} para 11. Sob agitação mecânica foi lentamente adicionado 20 mL de hipoclorito de sódio a 1 mol.L^{-1} , reajustando o pH sempre que preciso. Após três horas foram adicionados 20 mL de metanol e ácido clorídrico a 1 mol.L^{-1} qsp pH 5. Os cristais oxidados (CNC-T) foram dialisados por três dias contra água ultrapura.

O CNC-T foi então disperso a 1% p/p, em relação ao peso total da solução, em meio tampão de ácido 2-N-(morpholino) etanosulfônico (MES) qsp 50 mmol.L^{-1} pH 5, ao qual foi adicionado hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carboiimida (EDC) qsp 25 mmol.L^{-1} . Após 15 minutos foi adicionado N-hidroxisuccinimida (NHS) qsp 25 mmol.L^{-1} . Após 15 minutos adicionou-se ALB qsp 1% p/p em relação ao peso total da solução. A reação permaneceu *overnight* e foi purificada por diálise durante 5 dias e posterior

centrifugação a 8.500 g durante 20 minutos. O mecanismo da reação está resumidamente descrito abaixo na FIGURA 9. Esses experimentos foram realizados na Universidade de Waterloo.

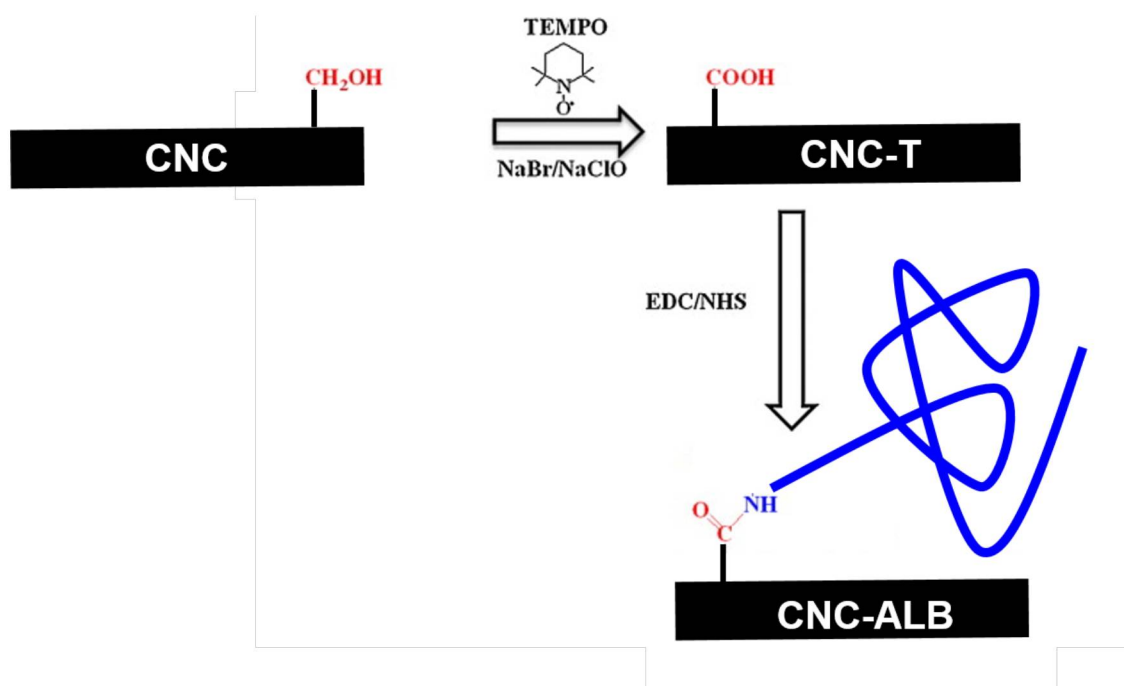


FIGURA 9 – MECANISMO DA MODIFICAÇÃO QUÍMICA ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO COM TEMPO E POSTERIOR LIGAÇÃO COVALENTE COM ALB POR EDC/NHS.
 FONTE: O AUTOR

4.3 FORMAÇÃO DAS EMULSÕES

As emulsões água-água foram formadas através do preparo de soluções mãe de ALB 5% p/p, GLC 1% p/p e CNC (comerciais ou modificados) 2% p/p. Devido à viscosidade das soluções mãe, as amostras foram preparadas pesando alíquotas das soluções mãe e completando com peso de água ultrapura para atingir a concentração final desejada. As misturas foram formadas contendo 0,1 a 2% (p/p) de ALB, 0,02 a 0,5% (p/p) de GLC, 0 a 1% (p/p) de CNC e agitadas em vórtex por 30 segundos. Foram preparadas amostras nas mesmas concentrações em quatro diferentes pHs: 4,75, o ponto isoelétrico da ALB; 4,00, abaixo do ponto isoelétrico da ALB; 5,50, acima do ponto isoelétrico da ALB; e 7,00, pH neutro acima do ponto isoelétrico da ALB. O ajuste de pH das amostras foi feito com hidróxido de sódio 0,1 mmol.L⁻¹ e/ou ácido clorídrico 0,1 mmol.L⁻¹.

As amostras foram fotografadas em diversos tempos para observação da cinética de separação. O parâmetro de estabilidade foi considerado como a

ausência de separação de fases visível. Esses experimentos foram realizados na Universidade de Waterloo.

4.4 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS EMULSÕES

A estabilidade das emulsões foi observada visualmente por até cinco semanas. Alíquotas dos sobrenadantes foram coletadas para determinação de potencial zeta e DLS, feitas de acordo com os itens 4.1.2 e 4.1.3 do primeiro capítulo desta tese. Esses experimentos foram realizados na Universidade de Waterloo.

4.5 INVESTIGAÇÃO TERMODINÂMICA DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES

A investigação das interações foi realizada através de titulação isotérmica calorimétrica conforme descrito no item 4.1.5 do primeiro capítulo desta tese. Esses experimentos foram realizados na Universidade de Waterloo.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MACROMOLÉCULAS

As macromoléculas foram submetidas a análises de espalhamento de luz dinâmico, para determinação do diâmetro hidrodinâmico, e de potencial zeta para determinação da carga superficial em cada pH estudado.

Na TABELA 2 pôde-se observar que a carga superficial da ALB varia bastante com o pH, devido aos grupos aminos e ácidos que podem se ionizar. Abaixo do ponto isoelétrico, pH 4, os grupos amino estão ionizados e o potencial zeta da ALB fica positivo. No ponto isoelétrico, pH 4,75, a carga se aproxima de zero. Acima do ponto isoelétrico os grupamentos amino assumem sua forma molecular e os grupamentos ácidos se ionizam, conferindo potencial zeta negativo à ALB de -14 mV e -27 mV nos pHs 5,50 e 7,00, respectivamente.

TABELA 2 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DETERMINADO POR DLS) E POTENCIAL ZETA DAS MOLÉCULAS ALB, GLC E CNC A $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ EM ÁGUA ULTRAPURA NOS QUATRO pHs INVESTIGADOS

pH	Molécula	DLS (nm)	Zeta (mV)
4,00	ALB	52	+19
	GLC	103	-1,3
	CNC	116	-40
4,75	ALB	74	+2,8
	GLC	116	-1,3
	CNC	111	-42
5,50	ALB	70	-14
	GLC	100	-1,3
	CNC	120	-41
7,00	ALB	75	-27
	GLC	90	-1,1
	CNC	119	-41

O diâmetro hidrodinâmico da ALB diminui quando carregada positivamente, abaixo do ponto isoelétrico, mas não varia do ponto isoelétrico para cima.

A GLC é um biopolímero neutro e nas análises de potencial zeta sua carga praticamente não variou, mantendo-se levemente negativa. Seu diâmetro

hidrodinâmico teve pouca variação, sendo maior em pH 4,75, com 116 nm, e menor em pH 7,00 com 90 nm.

Os nanocristais de celulose são produzidos a partir de um processo de hidrólise com ácido sulfúrico que lhes conferem carga fortemente negativa independente do pH em que se encontram (~ -40 mV). Seu diâmetro hidrodinâmico também varia pouco conforme o pH, mantendo-se ao redor de 115 nm.

5.2 MODIFICACAO DO NANOCRISTAL DE CELULOSE

Os CNC foram primeiramente oxidados pela reação com TEMPO. Os nanocristais oxidados foram denominados como CNC-T e então modificados com a ligação covalente de ALB através da reação com NHS e EDC, para favorecer a adsorção do CNC na interface ALB-GLC. Estes cristais modificados foram denominados como CNC-ALB.

Os nanocristais modificados formaram micropartículas com carga superficial negativa de estrutura estável e robusta ao pH, como demonstram os resultados de potencial zeta e DLS apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DETERMINADO POR DLS) E POTENCIAL ZETA DOS NANOCRISTAIS DE CELULOSE MODIFICADOS (CNC-ALB) A $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ EM ÁGUA ULTRAPURA NOS QUATRO pHs INVESTIGADOS

pH	DLS (nm)	Zeta (mV)
4,00	1365	-32
4,75	1172	-36
5,50	1293	-36
7,00	1209	-34

Aparentemente as moléculas de albumina foram internalizadas e os nanocristais de celulose ficaram voltados para o lado externo das micropartículas CNC-ALB, conferindo carga superficial negativa estável nos quatro pHs testados. O tamanho também variou pouco, e ambos ensaios de potencial zeta e DLS apresentaram picos unimodais para todos os pHs, como pode ser visto na FIGURA 10.

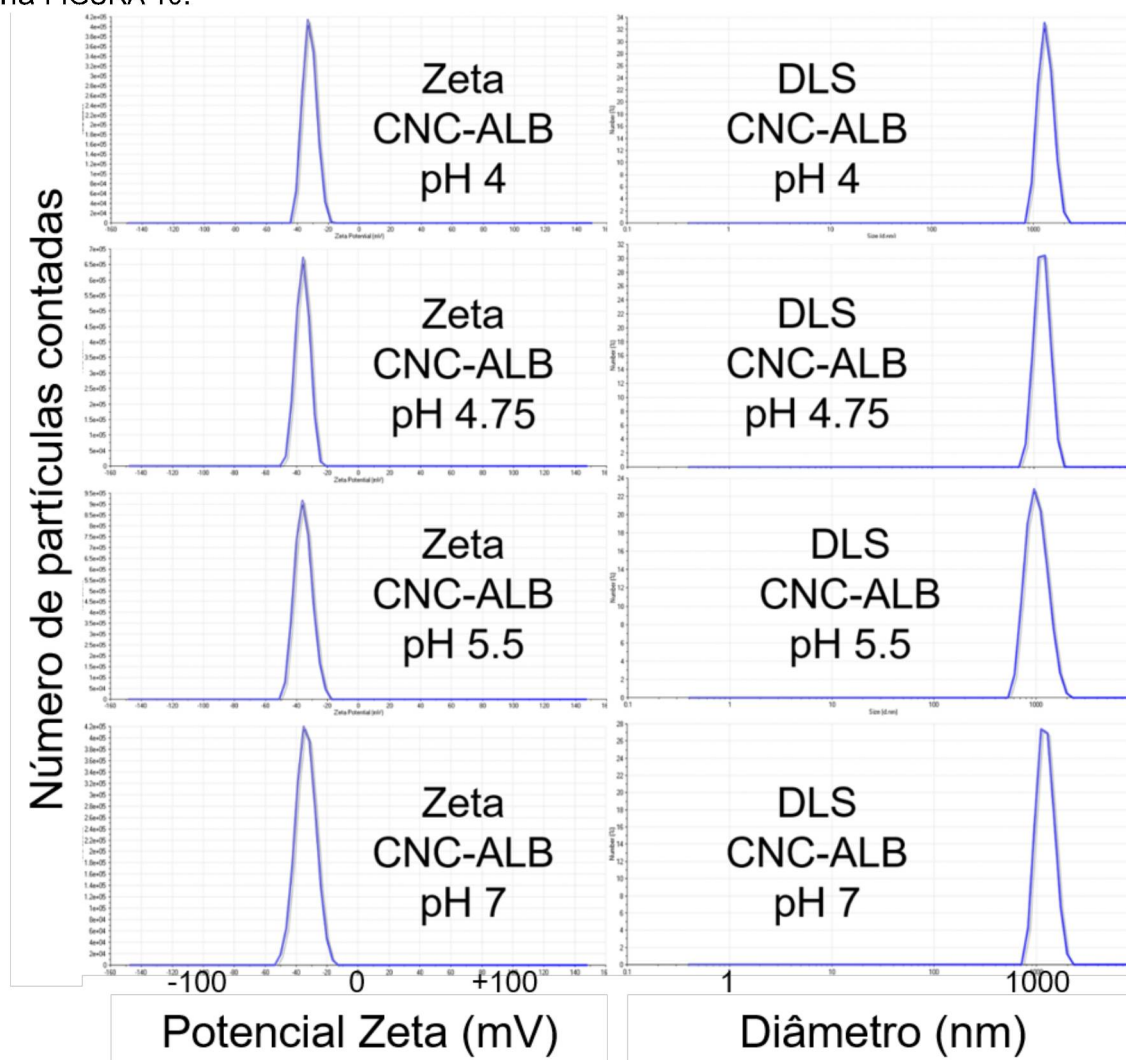


FIGURA 10 – PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DO POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO DOS CRISTAIS MODIFICADOS COM ALB NOS QUATRO pHs TESTADOS.
 FONTE: O AUTOR

Foram realizadas titulações condutimétricas, após intensa lavagem por diálise, a fim de comprovar as modificações feitas nos cristais. Tanto de oxidação como ligação de albumina, os resultados são apresentados nas FIGURA 11 e FIGURA 12.

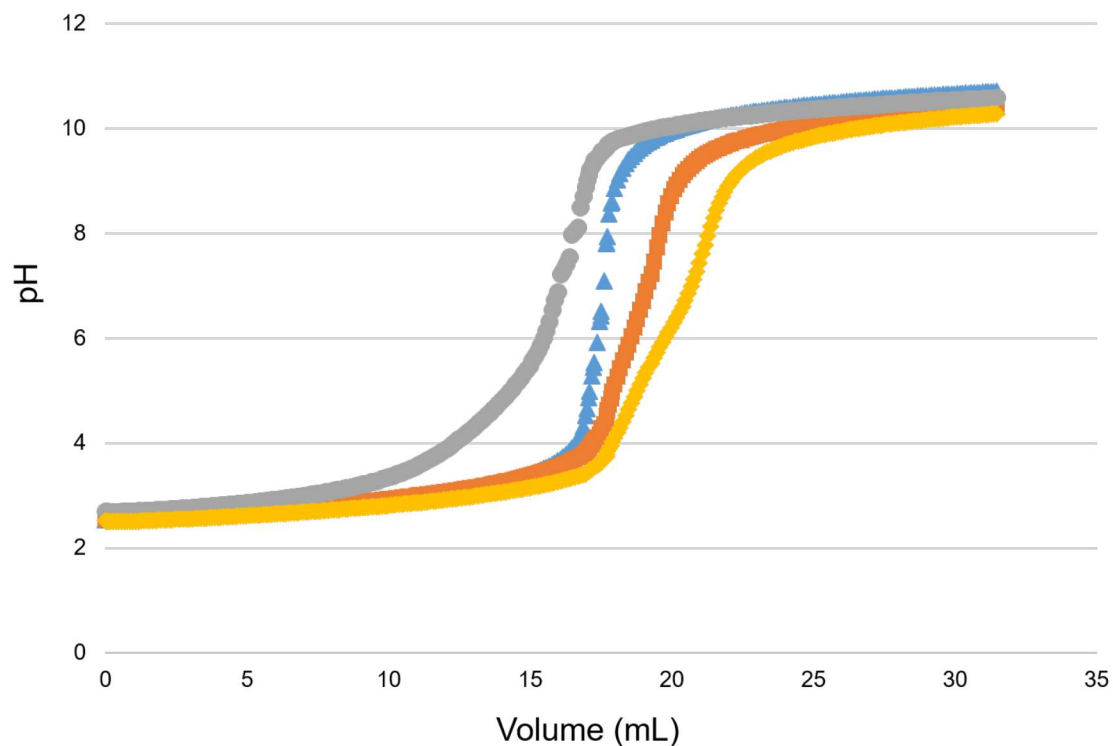


FIGURA 11 – COMPARATIVO DA CONDUTIVIDADE DE CNC PURA (▲), ALB PURA (■), CNC OXIDADA POR TEMPO (●) E CNC LIGADA A ALB (◆) EM FUNÇÃO DO VOLUME DE BASE TITULADA.

FONTE: O AUTOR

As curvas de pH foram então analisadas na planilha Curtipot disponibilizada para acesso online pelo Instituto de Química da USP, a fim de determinar o ponto de equivalência de cada molécula através das derivadas das curvas de condutividade e pH.

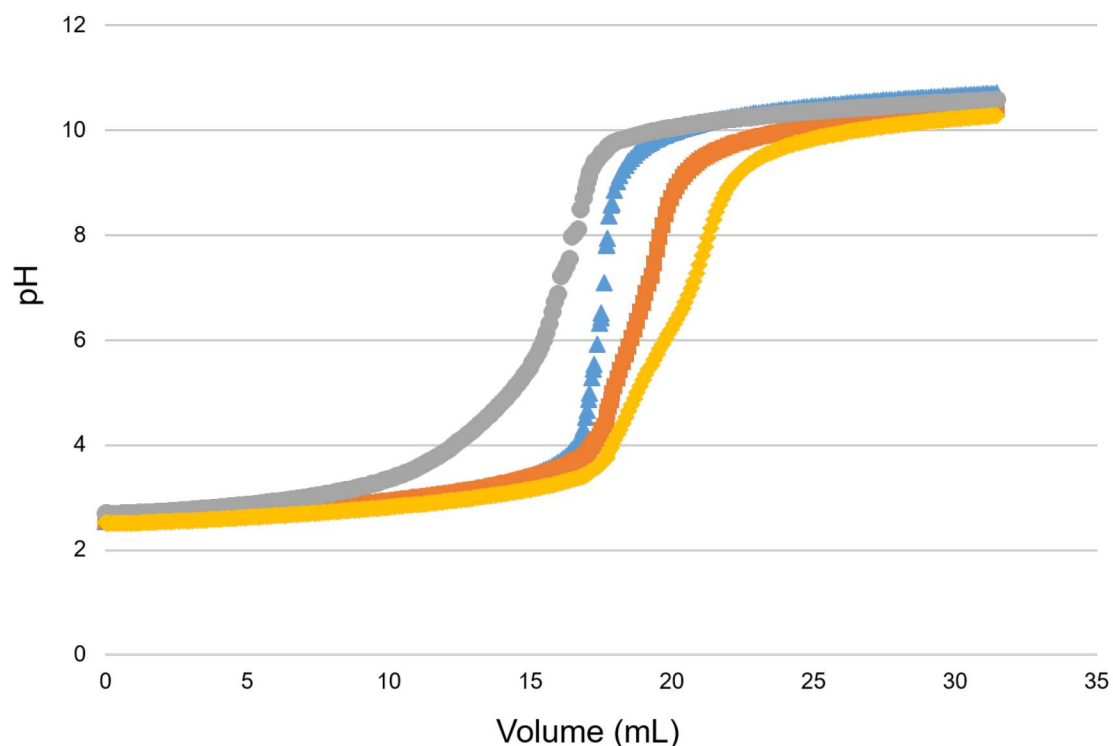


FIGURA 12 – COMPARATIVO DO pH CONSUMO DE BASE NA TITULAÇÃO DE CNC PURA (\blacktriangle), ALB PURA (\blacksquare), CNC OXIDADA POR TEMPO (\bullet) E CNC LIGADA A ALB (\blacklozenge).
 FONTE: O AUTOR

A TABELA 4 apresenta os resultados das modificações químicas dos nanocristais. A oxidação da CNC foi bem-sucedida, exigindo maior quantidade de base para neutralização, elevando de 7,002 para 7,552 o ponto de equivalência. A ligação covalente de CNC e ALB gerou dois pontos de equivalência diferentes dos pontos de equivalência destes biopolímeros puros analisados isoladamente, resultado em acordo com os dados de potencial zeta (TABELA 3) que mostram a redução da carga superficial negativa dos CNC, comprovando assim a formação das micropartículas CNC-ALB.

TABELA 4 – DETERMINAÇÃO DO PONTO DE EQUIVALÊNCIA (P.E.) DE CNC, ALB, CNC-T E CNC-ALB POR TITULAÇÃO CONDUTIMÉTRICA

Molécula	P.E. (pH)	dpH/dV	d ² pH/dV ²
CNC	7,002	4,9107	0,0014
ALB	7,650	2,1413	0,0003
CNC-T	7,552	3,4726	0,0012
CNC-ALB	4,796	1,1815	0,000006
	7,762	1,6581	0,0001

5.3 FORMAÇÃO DAS EMULSÕES

A fim de encontrar a região de incompatibilidade entre os biopolímeros ALB e GLC, foram preparadas várias amostras a partir da diluição e mistura de alíquotas das soluções mãe em água ultrapura, sem controle de pH, sendo o pH da água ultrapura utilizada 6,50. Estas amostras foram observadas por até 5 semanas e mostraram que a concentração de GLC influencia de tal forma a viscosidade do sistema que mesmo após centrifugação a 11.000 g por 60 min não foi possível definir bem a separação de fases, como mostra a FIGURA 13.

GLC - 1.42%	GLC - 1.24%	GLC - 1.06%	GLC - 0.88%	GLC - 0.71%	GLC - 0.53%	GLC - 0.35%	GLC - 0.18%	GLC - 0.07%
ALB - 1.30%	ALB - 1.14%	ALB - 0.98%	ALB - 0.81%	ALB - 0.65%	ALB - 0.49%	ALB - 0.33%	ALB - 0.16%	ALB - 0.07%

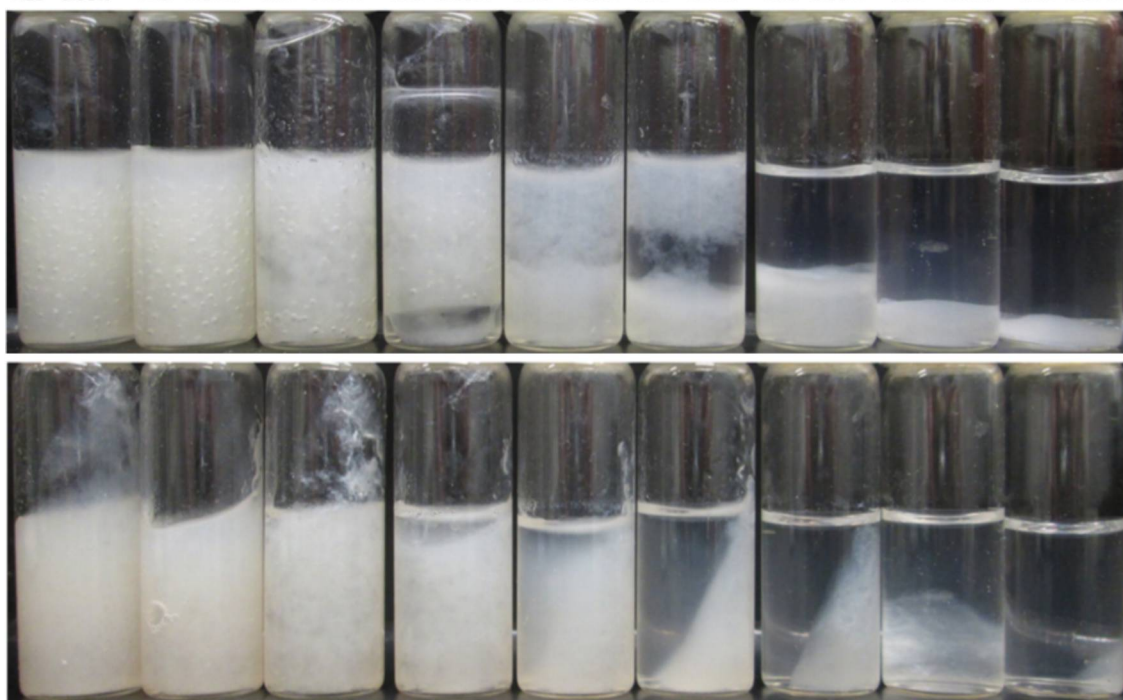


FIGURA 13 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC E ALB, SEM CONTROLE DE pH, DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA. FOTO APÓS 5 SEMANAS DE REPOUSO. ANTES DE CENTRIFUGAR (ACIMA) E APÓS CENTRIFUGAÇÃO (ABAIXO).

Para evitar um falso positivo, atribuindo estabilidade a sistemas que são incompatíveis e que não apresentam separação de fases devido à alta viscosidade do meio, a concentração de GLC foi reduzida no preparo das amostras para prosseguir o estudo, apresentadas abaixo (FIGURA 14).

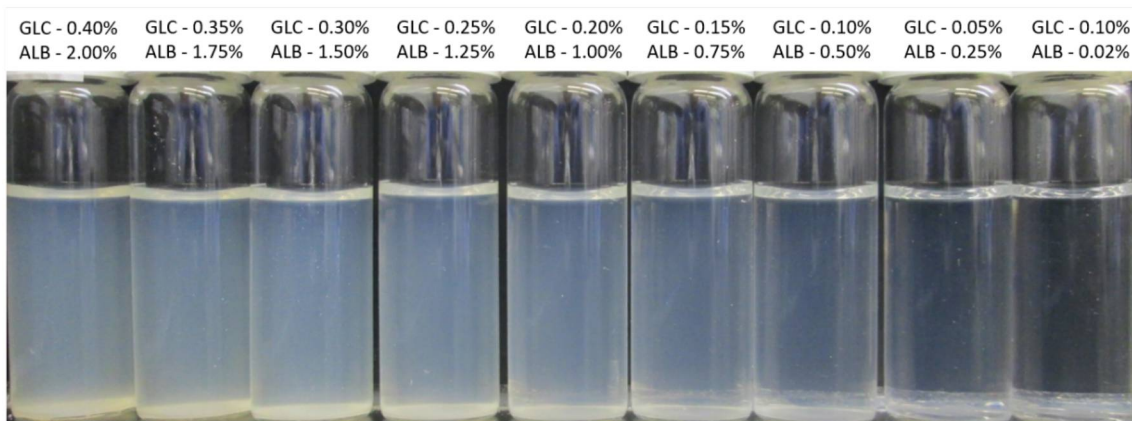


FIGURA 14 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC E ALB, SEM CONTROLE DE pH, DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA. FOTO APÓS 48 h DE REPOUSO.

Posteriormente foram preparadas amostras com CNC com as mesmas concentrações finais de macromoléculas, também observadas por 48 horas. A ordem de mistura das macromoléculas foi investigada e demonstrou ser relevante.

Na FIGURA 15 pôde-se observar as amostras com as mesmas concentrações misturadas em ordens diferentes. Sendo nas de cima o CNC adicionado por último após uma hora da mistura de ALB e GLC, e nas de baixo a GLC adicionada por último, após uma hora da mistura de ALB e CNC.

Aparentemente há incompatibilidade entre CNC e GLC e a interação entre ALB e CNC, anterior à adição de GLC, contribuiu para a estabilização do sistema.

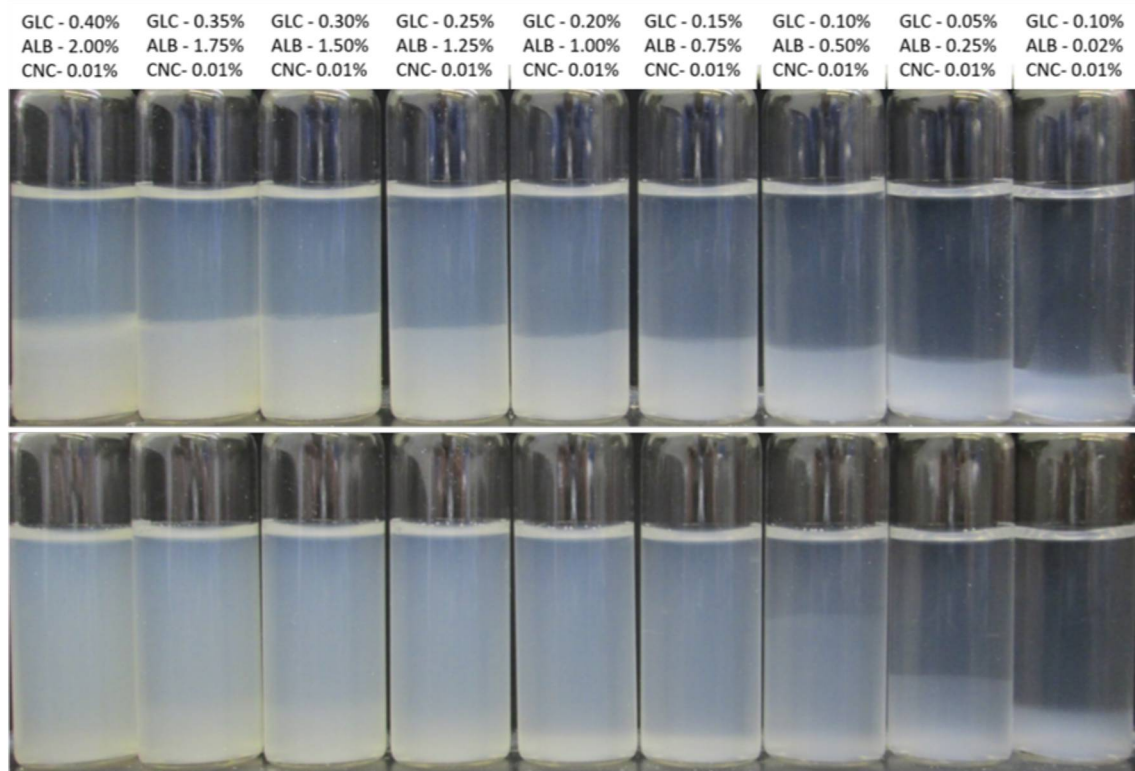


FIGURA 15 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC, ALB E CNC 0,01%, SEM CONTROLE DE pH. DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA.

ACIMA: CNC ADICIONADA POR ÚLTIMO, APÓS UMA HORA DA MISTURA DAS SOLUÇÕES DE ALB E GLC.

ABAIXO: GLC ADICIONADA POR ÚLTIMO, APÓS UMA HORA DA MISTURA DAS SOLUÇÕES DE ALB E CNC.

FOTOS APÓS 48 h DE REPOUSO.

Ao misturar ALB e CNC primeiro, ocorrem interações íon-dipolo entre os grupamentos amino de ALB e sulfato de CNC que reduzem as cargas e evitam a separação de fases com a adição de GLC. Contudo, a adição posterior de CNC causa a formação de precipitado.

A fim de investigar a incompatibilidade entre GLC e CNC foram feitas duas sequências de diluições, primeiramente mantendo a concentração de GLC constante e variando a concentração de CNC. Posteriormente, mantendo a concentração de CNC constante e variando a concentração de GLC.

Como evidenciado na FIGURA 16, quanto maior a concentração de CNC, maior a precipitação observada em alta concentração de GLC. Contudo, mantendo a concentração de CNC em 1%, só foi observado formação de precipitado nas amostras com menor concentração de GLC. Portanto, a concentração de CNC utilizada nas emulsões seguintes foi inferior a 1%.

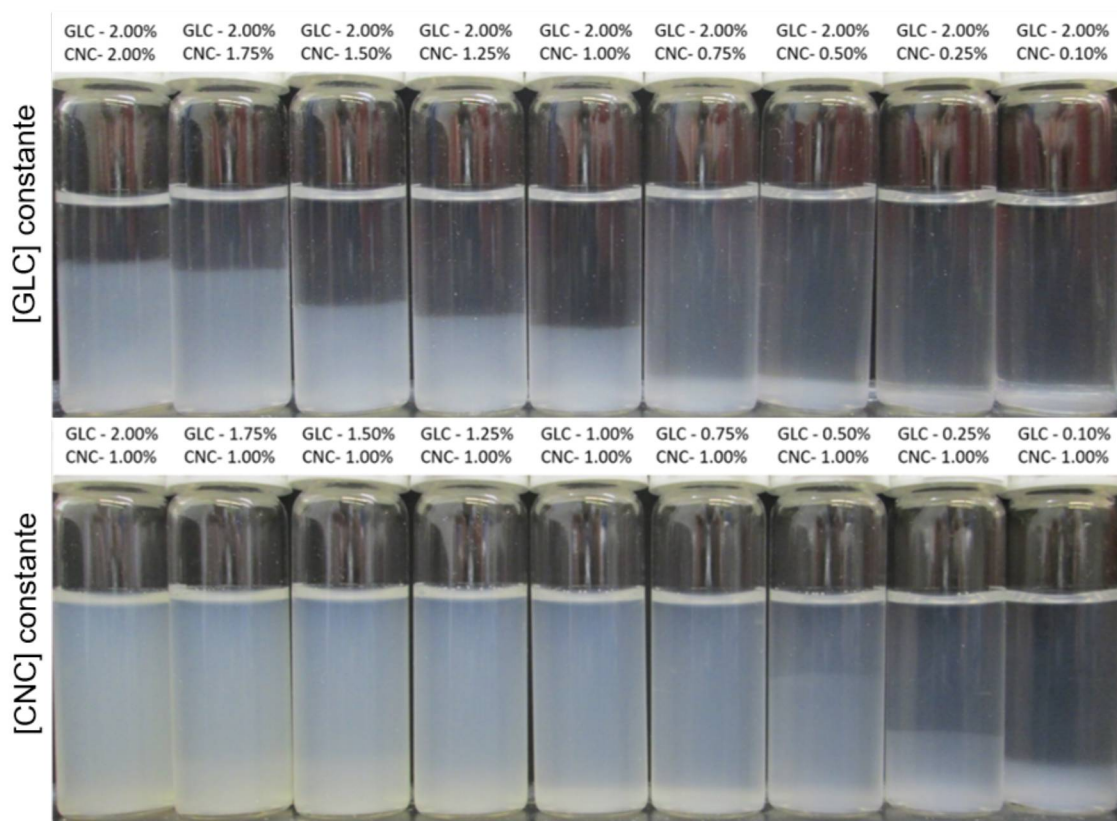


FIGURA 16 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC E CNC, SEM CONTROLE DE pH. DILUÍDAS COM ÁGUA ULTRAPURA.
 ACIMA: CONCENTRAÇÃO DE GLC CONSTANTE E CONCENTRAÇÃO DE CNC DECRESCENTE.
 ABAIXO: CONCENTRAÇÃO DE CNC CONSTANTE E CONCENTRAÇÃO DE GLC DECRESCENTE.
 FOTOS APÓS 48 h DE REPOUSO.

5.3.1 Influência de pH e carga superficial

Foram escolhidos quatro diferentes pHs para investigar a influência da variação de carga superficial da albumina na formação das emulsões. Um abaixo do ponto seu isoeletrico 4,00, no ponto isoeletrico 4,75, e dois acima 5,50 e neutro 7,00.

Inicialmente foram preparadas amostras com concentrações decrescentes tanto de ALB quanto de GLC. Estas amostras foram observadas e fotografadas por até 5 semanas. As fotografias que demonstram as cinéticas de separação estão no Anexo A. Após cinco semanas as amostras foram centrifugadas para forçar a separação de fases. Foram então escolhidas as concentrações de trabalho, descartando amostras cuja alta viscosidade, majoritariamente atribuída a GLC, dificultasse a separação de fases mesmo após centrifugação. Observou-se que após 48 horas não houve diferença na

separação de fases nas concentrações escolhidas, motivo pelo qual as amostras seguintes foram observadas por até 48 h.

A FIGURA 17 apresenta as amostras com as concentrações decrescentes de ALB e GLC escolhidas para estudo, evidenciando a influência das cargas superficiais da ALB nos quatro diferentes pHs.

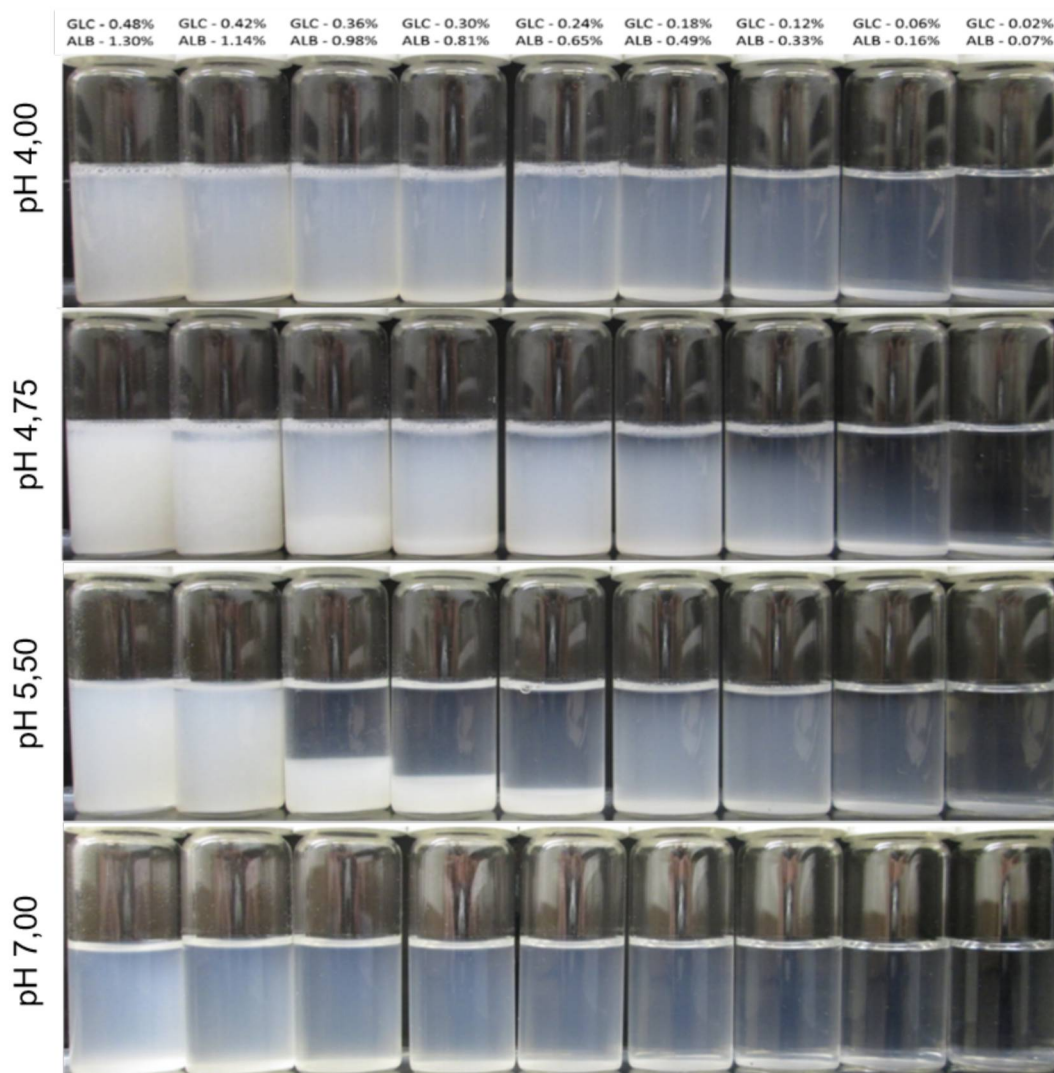


FIGURA 17 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES DE GLC E ALB EM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES NOS pHs 4,00, 4,75, 5,50 E 7,00. FOTOS APÓS 48 h DE REPOUSO.

5.3.2 Influência das concentrações de cada macromolécula

Após avaliar o comportamento das amostras preparadas por diluição seriada a partir das soluções mãe, foram preparadas amostras variando apenas a concentração de uma macromolécula por vez, mantendo a concentração da outra constante. Primeiramente foram preparadas amostras com concentração

constante de ALB a 1,30% e concentrações decrescentes de GLC apresentadas na FIGURA 18.

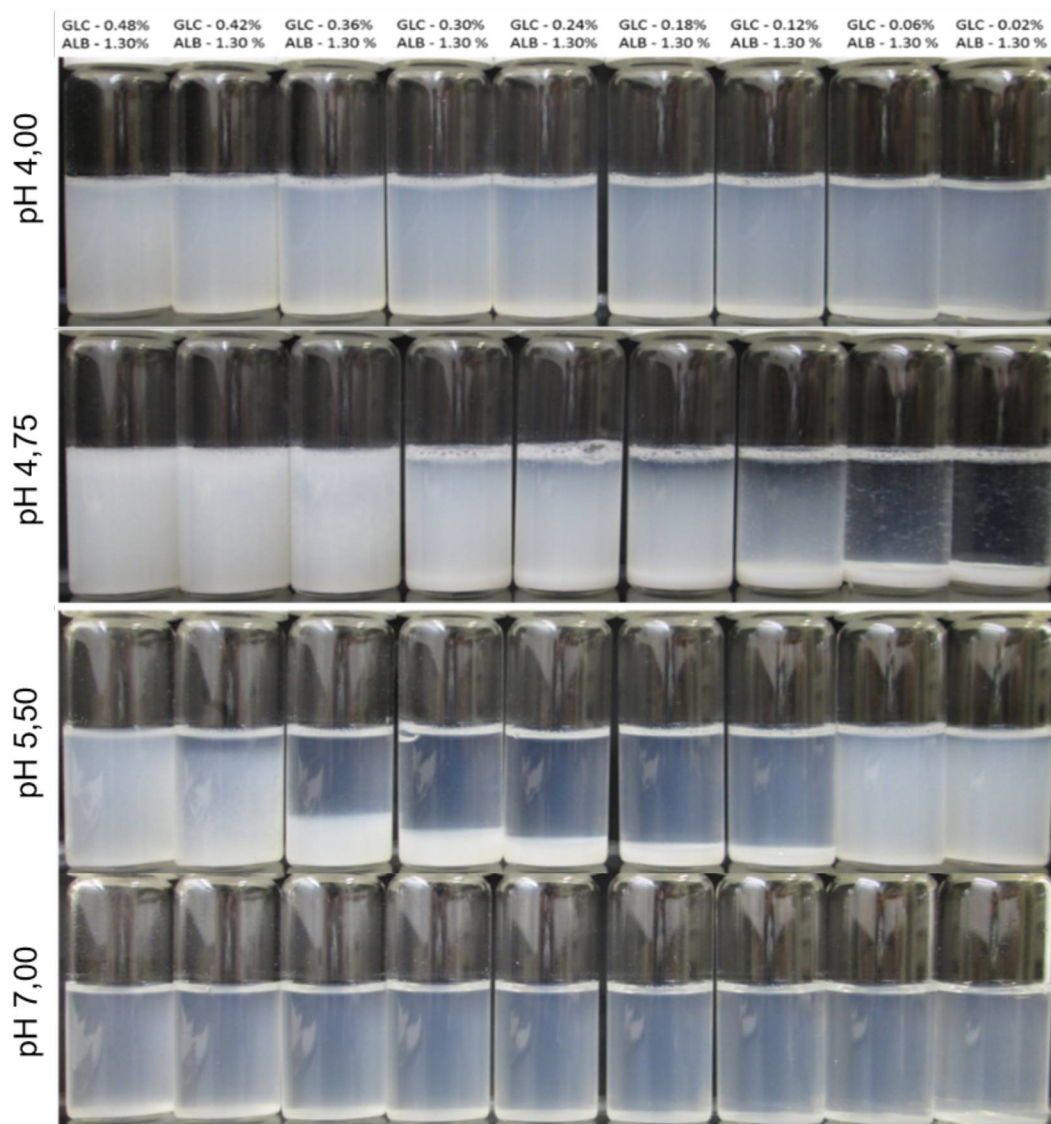


FIGURA 18 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE GLC E CONCENTRAÇÃO CONSTANTE DE ALB A 1,30% NOS pHs 4,00, 4,75, 5,50 E 7,00. FOTOS APÓS 48 h DE REPOUSO.

Pôde-se avaliar na FIGURA 18 que nos pHs 7,00 e 4,00 não há separação de fases entre ALB e GLC, apenas turvação do meio. No ponto isoelétrico houve separação de fases a partir de 0,30% de GLC para baixo. No pH 5,50 observa-se separação de fases entre 0,42 a 0,06% de GLC.

Posteriormente foram preparadas amostras com concentrações decrescentes de ALB e concentração constante de GLC a 0,48%, apresentadas na FIGURA 19.

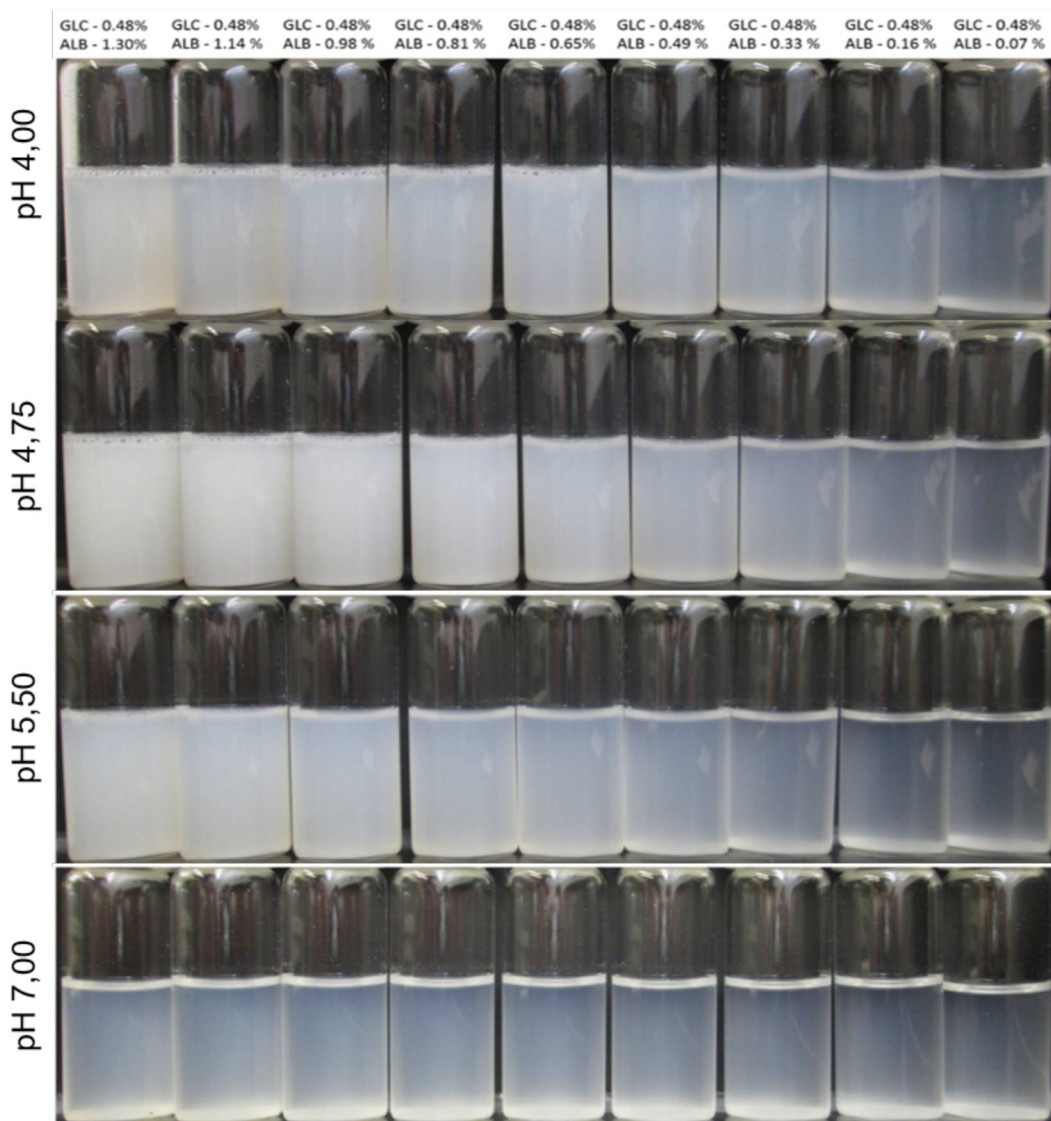


FIGURA 19 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES COM CONCENTRAÇÃO CONSTANTE DE GLC A 0,48% E CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE ALB NOS pHs 4,00, 4,75, 5,50 E 7,00. FOTOS APÓS 48 h DE REPOUSO.

Pelos resultados apresentados na FIGURA 19 pôde-se perceber que a alta concentração de GLC inibe a separação de fases em todos os pHs, possivelmente pela viscosidade conferida ao sistema.

5.4 AVALIAÇÃO DAS EMULSÕES

A estabilidade das emulsões foi avaliada visualmente. As amostras foram fotografadas periodicamente até não ser observada mais diferença na estabilidade ou separação de fases. Ao atingir este ponto, a altura de cada fase foi medida nas amostras que separaram fases. Alíquotas foram retiradas dos

sobrenadantes para análise de potencial zeta e DLS. A coluna Zeta 2 apresenta os dados do segundo pico das amostras que demonstraram perfil bimodal de distribuição de potencial zeta.

O QUADRO 1 demonstra a formação de agregados de ALB e GLC na maior concentração testada de GLC, em todas as concentrações de ALB, com apenas uma medida de potencial zeta, o que indicou não haver moléculas livres de ALB e GLC. Neste pH, abaixo do ponto isoelétrico, ALB possui potencial zeta de +19 mV. A maioria das amostras não separou fase possivelmente devido a repulsão Coulumbiana catiônica das moléculas de ALB.

[GLC] %	[ALB] %	Altura GLC (cm)	Altura ALB (cm)	Zeta (mV)	Zeta 2 (mV)	DLS (nm)
0,07	0,07	0,50	3,00	-7,33	53,8	90
0,18	0,16	1,00	2,50	-16,8	60,7	72
0,35	0,33	1,10	2,40	0,322	-	90
0,53	0,49	2,00	1,50	-0,803	46	82
0,71	0,65	2,50	1,50	0,0723	-	47
0,88	0,81	2,80	1,20	0,0785	-	71
1,06	0,98	3,00	0,70	0,504	-	61
1,24	1,14	Não separou		-	-	-
1,42	1,30	Não separou		-	-	-
0,02	0,07	Não separou		-5,82	45,4	87
0,06	0,16	Não separou		-1,55	37,1	83
0,12	0,33	Não separou		2,67	-	106
0,18	0,49	Não separou		3,01	-	85
0,24	0,65	Não separou		1,55	-	86
0,30	0,81	Não separou		0,637	-	91
0,36	0,98	Não separou		0,673	-	89
0,42	1,14	Não separou		0,327	-	124
0,48	1,30	Não separou		0,39	-	2221
0,48	0,07	Não separou		-0,613	-	108
0,48	0,16	Não separou		-1,42	45	2010
0,48	0,33	Não separou		0,0231	-	88
0,48	0,49	Não separou		-1,7	41,8	2368
0,48	0,65	Não separou		-0,181	-	2130
0,48	0,81	Não separou		0,065	-	2047
0,48	0,98	Não separou		0,394	-	2546
0,48	1,14	Não separou		0,224	-	2790
0,48	1,30	Não separou		0,0813	-	2688
0,02	1,30	Não separou		11,7	32,4	130
0,06	1,30	Não separou		14	-	110
0,12	1,30	Não separou		9,01	-	117
0,18	1,30	Não separou		7,52	-	96
0,24	1,30	Não separou		2,44	-	105
0,30	1,30	Não separou		1,6	-	85
0,36	1,30	Não separou		1,26	-	75
0,42	1,30	Não separou		0,724	-	2300
0,48	1,30	Não separou		0,234	-	2390

QUADRO 1 – DADOS DAS EMULSÕES DE ALB E GLC EM pH 4,00.

No QUADRO 2 estão representados os resultados obtidos pelos agregados de ALB e GLC nas amostras que não separaram fases, indicando que esta interação contribui para a estabilidade do sistema. No ponto isoelétrico, pH 4,75, ALB possui potencial zeta próximo de zero e pode interagir com GLC por interações hidrofóbicas causando precipitação. Apenas as amostras com

concentrações mais altas de GLC não separaram fase, provavelmente devido a viscosidade.

[GLC] %	[ALB] %	Altura GLC (cm)	Altura ALB (cm)	Zeta (mV)	Zeta 2 (mV)	DLS (nm)
0,07	0,07	0,50	3,00	-1,21	46,3	34
0,18	0,16	0,80	2,70	-0,555	46,9	75
0,35	0,33	1,20	2,30	-0,23	-	65
0,53	0,49	2,00	1,50	-0,404	-	71
0,71	0,65	2,60	1,40	-1,06	-	48
0,88	0,81	2,70	0,80	0,0245	-	73
1,06	0,98	3,00	0,50	-6,93	53,7	73
1,24	1,14	Nao separou		-	-	-
1,42	1,30	Nao separou		-	-	-
0,02	0,07	0,20	3,30	-11,1	36,6	49
0,06	0,16	0,35	3,15	-1,71	45,9	91
0,12	0,33	0,40	3,10	-0,709	46,9	108
0,18	0,49	0,50	3,00	-0,882	47,9	80
0,24	0,65	0,70	2,80	-0,207	-	107
0,30	0,81	0,90	2,60	-0,0698	46,9	92
0,36	0,98	1,40	2,10	-0,246	46,2	91
0,42	1,14	1,40	2,10	-5,46	39	63
0,48	1,30	Nao separou		-0,122	-	2234
0,48	0,07	Nao separou		-1,63	-	54
0,48	0,16	Nao separou		-2,08	-	1906
0,48	0,33	Nao separou		-0,666	-	3112
0,48	0,49	Nao separou		-0,284	-	2737
0,48	0,65	Nao separou		-0,115	-	2658
0,48	0,81	Nao separou		0,13	-	2169
0,48	0,98	Nao separou		0,0529	-	1867
0,48	1,14	Nao separou		0,0195	-	1685
0,48	1,30	Nao separou		-3,66	44	151
0,02	1,30	0,50	3,00	-1,21	46,7	7672
0,06	1,30	0,60	2,90	-2,51	-	89
0,12	1,30	0,70	2,80	0,284	-	79
0,18	1,30	0,80	2,70	-0,0771	-	77
0,24	1,30	Nao separou		-0,168	-	76
0,30	1,30	Nao separou		-0,231	-	71
0,36	1,30	Nao separou		-0,0569	-	1695
0,42	1,30	Nao separou		-0,0157	-	2029
0,48	1,30	Nao separou		0,0652	-	2561

QUADRO 2 – DADOS DAS EMULSÕES DE ALB E GLC EM pH 4,75.

O QUADRO 3 relaciona os resultados obtidos com as emulsões e também mostra a formação de agregados nas amostras que não separaram

fases. Acima do ponto isoelétrico, pH 5,50, ALB possui potencial zeta de -14,1 mV, não forte o suficiente para manter o sistema estável por repulsão Coulumbiana aniônica, havendo separação de fases na maioria das amostras.

[GLC] % T0	[ALB] % T0	Altura GLC (cm)	Altura ALB (cm)	Zeta (mV)	Zeta 2 (mV)	DLS (nm)
0,07	0,07	0,50	3,00	-32,5	-1,01	85
0,18	0,16	1,00	2,50	-25,6	-0,209	80
0,35	0,33	1,60	1,90	-3,2	-21,6	64
0,53	0,49	Nao separou		-5,56	-	59
0,71	0,65	Nao separou		-8,74	-	91
0,88	0,81	Nao separou		-5,88	-	23
1,06	0,98	Nao separou		-	-	-
1,24	1,14	Nao separou		-	-	-
1,42	1,30	Nao separou		-	-	-
0,02	0,07	Nao separou		13,9	-50,6	96
0,06	0,16	Nao separou		-18,3	36,5	70
0,12	0,33	0,40	3,10	-11,3	53,9	99
0,18	0,49	0,50	3,00	-6,09	-	89
0,24	0,65	0,60	2,90	-3,68	48,9	90
0,30	0,81	0,80	2,70	-1,16	49,2	67
0,36	0,98	1,00	2,50	-1,75	-	77
0,42	1,14	Nao separou		-4,23	51,6	65
0,48	1,30	Nao separou		-3,54	-	2282
0,48	0,07	Nao separou		-2,49	-	81
0,48	0,16	Nao separou		-2,08	-	81
0,48	0,33	Nao separou		-3,84	-	120
0,48	0,49	Nao separou		-2,63	-	62
0,48	0,65	Nao separou		-2,64	-	2385
0,48	0,81	Nao separou		-3,21	-	2386
0,48	0,98	Nao separou		-3,34	-	3487
0,48	1,14	Nao separou		-2,1	-	3091
0,48	1,30	Nao separou		-4,14	-	2430
0,02	1,30	Nao separou		-17,7	-	106
0,06	1,30	Nao separou		-17,6	-2,7	121
0,12	1,30	0,50	3,00	-3,56	-20,7	81
0,18	1,30	0,60	2,90	-1,8	-19,4	87
0,24	1,30	0,60	2,90	-3,87	53,2	52
0,30	1,30	0,70	2,80	-1,84	-	68
0,36	1,30	0,90	2,60	-3,72	-	83
0,42	1,30	1,40	2,10	-2,91	-	69
0,48	1,30	Nao separou		-4,62	-	2797

QUADRO 3 – DADOS DAS EMULSÕES DE ALB E GLC EM pH 5,50.

Em pH neutro ALB possui potencial zeta de -27 mV, forte suficiente para estabilizar o sistema, houve separação de fases em poucas amostras com as menores concentrações de ALB e GLC. Não foi identificada nenhuma formação de agregado (QUADRO 4).

[GLC] % TO	[ALB] % TO	Altura GLC (cm)	Altura ALB (cm)	Zeta (mV)	Zeta 2 (mV)	DLS (nm)
0,07	0,07	0,50	3,00	12,1	-51,4	27
0,18	0,16	1,00	2,50	-12	-37,5	59
0,35	0,33	1,40	2,10	-4,47	-23,3	60
0,53	0,49	2,20	1,30	-9,02	-	57
0,71	0,65	Nao separou		-8,39	55,8	60
0,88	0,81	Nao separou		-12,2	7,1	54
1,06	0,98	Nao separou		-6,93	-	45
1,24	1,14	Nao separou		-	-	-
1,42	1,30	Nao separou		-	-	-
0,02	0,07	Nao separou		-3,31	-	69
0,06	0,16	Nao separou		-22,5	7,68	63
0,12	0,33	Nao separou		54,1	-53,9	71
0,18	0,49	Nao separou		-32,1	-6,86	76
0,24	0,65	Nao separou		-5,29	-29,9	77
0,30	0,81	Nao separou		-7,36	-28,7	78
0,36	0,98	Nao separou		-15,8	-29,5	78
0,42	1,14	Nao separou		-14,5	12,1	81
0,48	1,30	Nao separou		-6,25	-20,9	84
0,48	0,07	Nao separou		-6,73	11,8	77
0,48	0,16	Nao separou		-2,26	55,9	80
0,48	0,33	Nao separou		-2,82	-	78
0,48	0,49	Nao separou		-6,42	-	70
0,48	0,65	Nao separou		-4,15	-	96
0,48	0,81	Nao separou		-4,14	-22,1	99
0,48	0,98	Nao separou		-9,57	53,4	81
0,48	1,14	Nao separou		-15,9	2,88	85
0,48	1,30	Nao separou		-3,33	-18	76
0,02	1,30	Nao separou		-30,2	-4,25	65
0,06	1,30	Nao separou		-23,2	4,96	80
0,12	1,30	Nao separou		-29,9	-1,93	82
0,18	1,30	Nao separou		-25,5	0,189	83
0,24	1,30	Nao separou		-28,1	0,103	79
0,30	1,30	Nao separou		-3,83	-26,6	75
0,36	1,30	Nao separou		-20,2	0,113	80
0,42	1,30	Nao separou		-3,08	-20,7	81
0,48	1,30	Nao separou		-5,76	-23	87

QUADRO 4 – DADOS DAS EMULSÕES DE ALB E GLC EM pH 7,00.

A fim de compreender as interações nos quatro pHs entre ALB com CNC e GLC com CNC, soluções de ALB foram misturadas com soluções de CNC, e soluções de GLC misturadas com soluções de CNC. Após repouso estas misturas submetidas a análises de DLS e potencial zeta.

Os resultados da TABELA 5 evidenciaram a interação eletrostática entre ALB e CNC nos pHs 4,00 e 4,75, com a formação de agregados micrométricos que estouraram a linearidade do espalhamento de luz dinâmico e apresentam cargas superficiais entre os valores das moléculas puras. Acima do ponto isoelétrico da ALB, pH 5,50 e pH 7,00, não foram evidenciados agregados micrométricos, contudo, os resultados de potencial zeta nestes pHs demonstraram interação entre ALB e CNC pela formação de perfis unimodais com valor de potencial intermediário.

TABELA 5 – DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (DETERMINADO POR DLS) E POTENCIAL ZETA DAS MISTURAS DE ALB COM CNC, E DE GLC COM CNC, NOS QUATRO pHs

pH	Moléculas	DLS (nm)	Zeta (mV)
4,00	ALB + CNC	2000	-5
	GLC + CNC	153	-0,6
4,75	ALB + CNC	2000	-20,4
	GLC + CNC	104	-0,3
5,50	ALB + CNC	113	-27
	GLC + CNC	133	-0,2
7,00	ALB + CNC	69	-31
	GLC + CNC	145	-0,4

Nas misturas de GLC com CNC aparentemente a GLC encobriu a CNC e observou-se apenas os dados correspondentes a GLC. A não formação de agregados, ou de potencial zeta intermediário a GLC e CNC evidenciou que não houve interação, ou associação entre eles.

Tendo em vista que os pHs que mais separaram fases foram 4,75 e 5,50, foram realizados testes com CNC e CNC-ALB para estabilizar estas emulsões. Os resultados destes testes podem ser visualizados nas FIGURA 20 FIGURA 21.

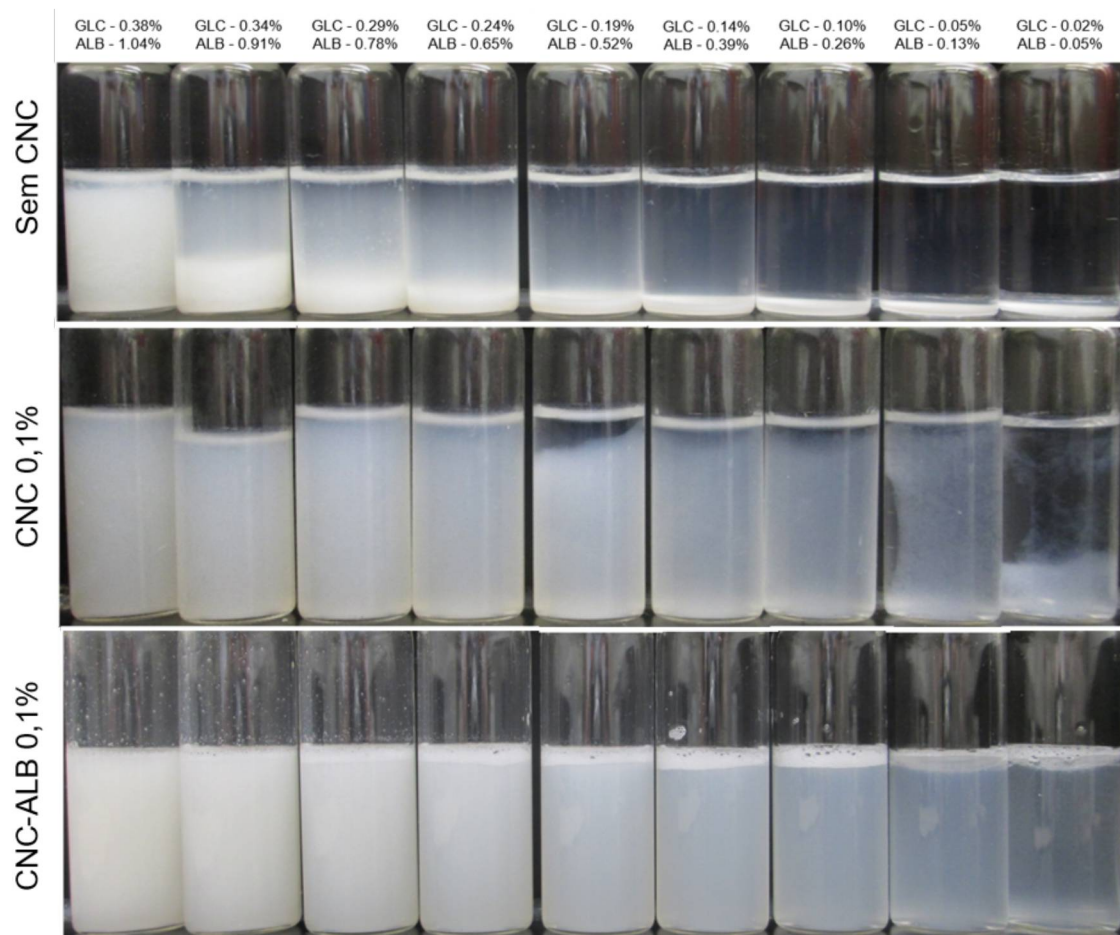


FIGURA 20 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE GLC E ALB EM pH 4,75 SEM CNC (ACIMA), COM 0,1% DE CNC (CENTRO) E COM 0,1% DE CNC-ALB (ABAIXO). FOTOS APÓS 5 SEMANAS DE REPOUSO.

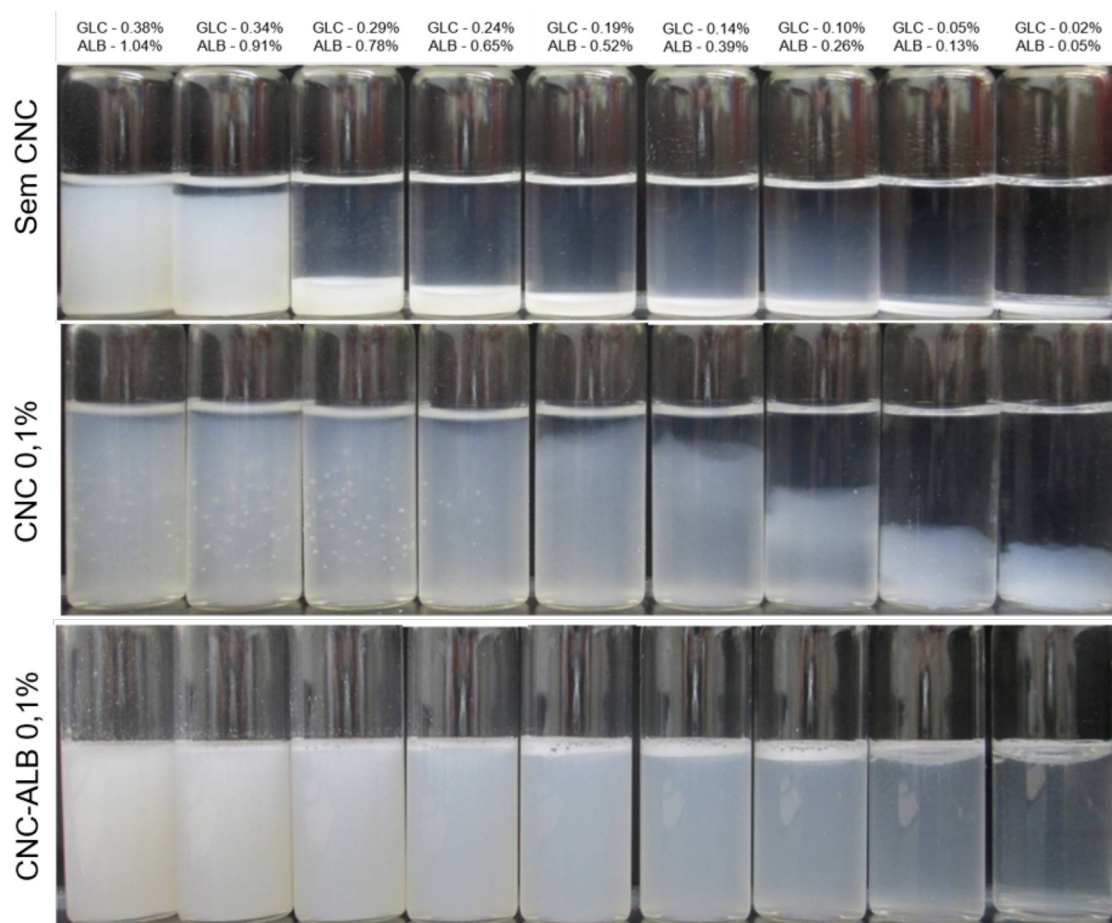


FIGURA 21 – AMOSTRAS DA MISTURA DE SOLUÇÕES COM CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DE GLC E ALB EM pH 5,5 SEM CNC (ACIMA), COM 0,1% DE CNC (CENTRO) E COM 0,1% DE CNC-ALB (ABAIXO). FOTOS APÓS 5 SEMANAS DE REPOUSO.

A adição de CNC nas emulsões de pH 4,75 e 5,50 resultou em um aumento da estabilidade destas, turvando o meio e reduzindo a separação de fases. A adição de CNC-ALB resultou na maior estabilização dos sistemas em ambos pHs.

As cargas maiores de ALB, positiva em pH 4,00 e negativa em pH 7,00, inibiram a separação de fases. A adição de CNC aumentou a estabilidade dos sistemas em que o potencial zeta da ALB é menor, pH 4,75 e pH 5,50, possivelmente pelo potencial zeta da CNC que gira em torno de -40 mV (dados apresentados na TABELA 2). O potencial zeta negativo do CNC-ALB, bem como seu maior diâmetro hidrodinâmico (dados apresentados na TABELA 3) resultaram em uma estabilização ainda melhor.

Em pH 4,75 a ALB possui potencial zeta levemente positivo e interage com CNC formando agregados (TABELA 5), o que resulta em uma turvação

maior do meio do que em pH 5,5, como pode ser observado nas FIGURA 20 e FIGURA 21.

5.5 INVESTIGAÇÃO TERMODINÂMICA DAS INTERAÇÕES

A fim de compreender a interação entre as macromoléculas e CNC foram feitas análises de calorimetria de titulação isotérmica (FIGURA 22).

Ao titular ALB sobre CNC abaixo do ponto isoelétrico (FIGURA 22A) percebe-se um perfil de interação inicialmente endotérmico (picos positivos) tornando-se exotérmico a medida que há saturação dos sítios de interação (cargas negativas de CNC e cargas positivas de ALB). Esta interação eletrostática causa a formação de agregados, como verificado na TABELA 5, mas sem a separação de fases. O resultado do DLS na TABELA 5, corroborado com o potencial zeta (-5 mV), demonstra a diminuição da carga negativa de CNC (-40 mV) pela interação com ALB (+19 mV).

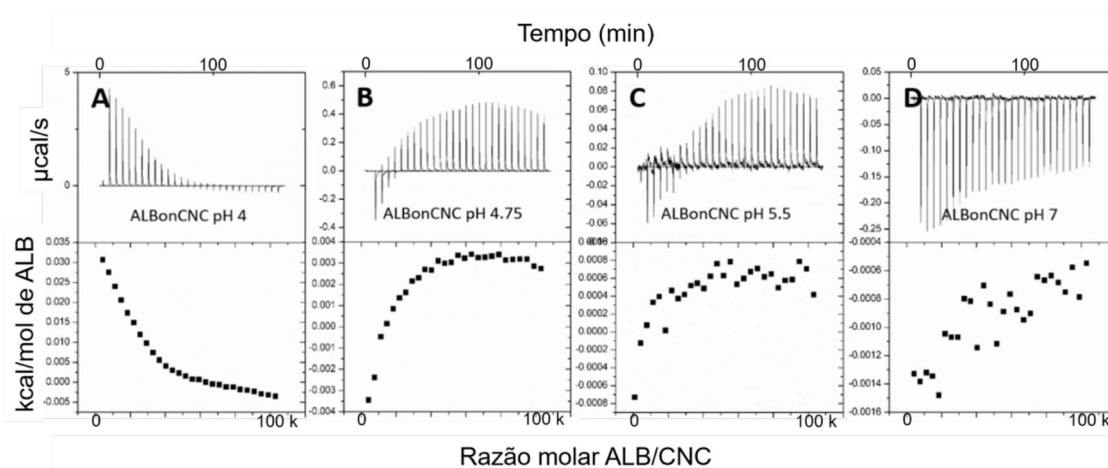


FIGURA 22 – TERMOGRAMAS (ACIMA) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (ABAIXO). AS ÚLTIMAS RESULTAM DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DE ITC DAS PRIMEIRAS.

- ALB SOBRE SOLUÇÃO DE CNC EM pH 4,00.
- ALB SOBRE SOLUÇÃO DE CNC EM pH 4,75.
- ALB SOBRE SOLUÇÃO DE CNC EM pH 5,50.
- ALB SOBRE SOLUÇÃO DE CNC EM pH 7,00.

FONTE: O AUTOR

No ponto isoelétrico (FIGURA 22B) percebe-se um perfil oposto de interação da FIGURA 22A, também demonstrando uma saturação (platô de entalpia). Esta interação promove a formação de agregados que causam a redução da estabilidade do sistema e conseqüente separação de fases. Como verificado na TABELA 5, o potencial zeta dos agregados (-20 mV) tem menor

redução da carga negativa de CNC devido a menor carga positiva de ALB (+2,8 mV).

Interações hidrofóbicas são dirigidas por entropia (REKHARSKY e INOUE, 2006) e indicam maior mobilidade translacional e conformacional provenientes da complexação das moléculas (CAMEROON et al., 2010; COOPER et al., 1999). Acima do ponto isoelétrico (FIGURA 22 C e D), em ambos os casos, a integração das entalpias das injeções de ALB em CNC não mostra uma tendência de saturação de sítios de interação (platô), sendo esses calores provenientes de diluição e perturbação do meio. Há separação de fases em pH 5,50, possivelmente pela carga de ALB não ser suficientemente grande para estabilizar o sistema por repulsão Coulumbiana como ocorre em pH 7,00, no qual não há separação de fases.

A titulação de GLC sobre CNC evidencia que não há interação entre eles em nenhum pH (FIGURA 23), uma vez a integração das entalpias de cada injeção não sugere nenhum platô, sendo os calores detectados provenientes de diluição e perturbação do meio. A falta de interação entre GLC e CNC pode ser inclusive percebida pelo ruído da análise, uma vez que a linha de base não chega a ser corrigida mesmo com 600 s de intervalo entre as injeções.

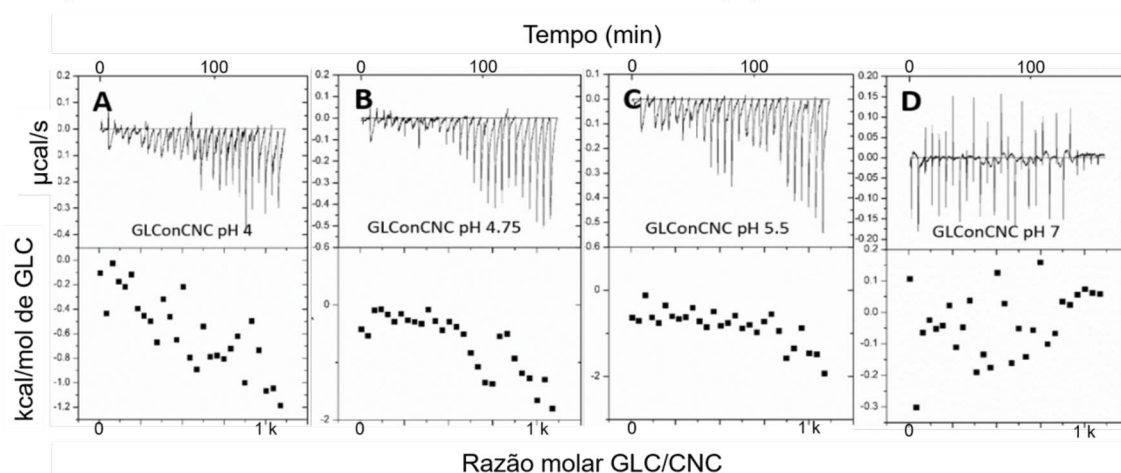


FIGURA 23 – TERMOGRAMAS (ACIMA) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (ABAIXO). AS ÚLTIMAS RESULTAM DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DE ITC DAS PRIMEIRAS.

- GLC SOBRE SOLUÇÃO DE CNC EM pH 4,00.
- GLC SOBRE SOLUÇÃO DE CNC EM pH 4,75.
- GLC SOBRE SOLUÇÃO DE CNC EM pH 5,50.
- GLC SOBRE SOLUÇÃO DE CNC EM pH 7,00.

FONTE: O AUTOR

A fim de comparar as interações de GLC com os cristais modificados e não modificados, soluções de GLC foram tituladas sobre soluções de CNC-ALB e os resultados são apresentados na FIGURA 24.

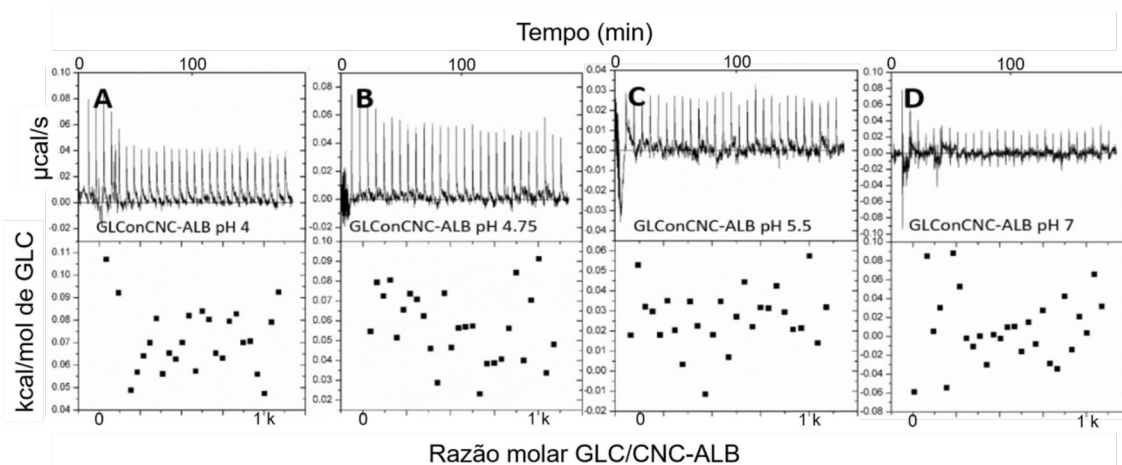


FIGURA 24 – TERMOGRAMAS (ACIMA) E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO (ABAIXO). AS ÚLTIMAS RESULTAM DA INTEGRAÇÃO DOS PICOS DE ITC DAS PRIMEIRAS.

- GLC SOBRE SOLUÇÃO DE CNC-ALB EM pH 4,00.
- GLC SOBRE SOLUÇÃO DE CNC-ALB EM pH 4,75.
- GLC SOBRE SOLUÇÃO DE CNC-ALB EM pH 5,50.
- GLC SOBRE SOLUÇÃO DE CNC-ALB EM pH 7,00.

FONTE: O AUTOR

Embora o perfil das entalpias das injeções tenha sido alterado de exotérmico, GLC sobre CNC calor é liberado, (picos negativos), para endotérmico GLC sobre CNC-ALB consome calor (picos positivos), em ambos os casos, a troca de calor não mostrou uma tendência de saturação de sítios de interação e a perturbação do meio não chega a ser corrigida pela linha de base.

A modificação dos cristais com a adição de ALB não causou repulsão com as moléculas de GLC e promoveu maior estabilidade aos sistemas em que havia separação de fases, como pode ser visto nas FIGURA 20 FIGURA 21. A falta de interação entre GLC e CNC e CNC-ALB mostrou que a estabilização dos sistemas nos pHs 4,75 e 5,5 ocorre pela adsorção dessas partículas nas interfaces.

6. CONCLUSÃO

As regiões de pH e concentração que promovem incompatibilidade e separação de fases entre os polímeros naturais GLC e ALB foram investigadas e estabilizadas com o uso de partículas nano e micrométricas. Uma nova partícula foi criada, através da oxidação de CNC e ligação covalente de moléculas de ALB a estes, a qual foi caracterizada e investigada como estabilizadora. A partícula inédita criada neste trabalho demonstrou ser superior a CNC na estabilização das emulsões. O estudo termodinâmico sugere, por falta de interação, que a estabilização dos sistemas tenha ocorrido pela adsorção das partículas nas interfaces. Portanto, emulsões de Pickerin compostas por soluções de ALB e GLC foram efetivamente estabilizadas por partículas, sem uso de surfactante, do tipo água/água, sem uso de óleo. Este tipo de estabilização de macromoléculas solúveis em água e incompatíveis, determinadas como emulsões água-água, sem uso de surfactantes é recente e muito promissora.

7. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho demonstramos duas alternativas de redução do uso de surfactantes na formulação de emulsões com consequente estímulo ao uso de polímeros naturais. A diminuição no uso de surfactantes é benéfica ao meio ambiente, principalmente os catiônicos.

No primeiro capítulo a redução da concentração de surfactante foi proposta através da associação com polímeros naturais. A termodinâmica e físico-química das interações entre o surfactante catiônico DODAB e os polímeros naturais XAN e GLC (aniônico e neutro, respectivamente) foram investigadas e detalhadas. A associação demonstrou ser efetiva na redução da concentração necessária de surfactante pela formação de agregados com ambos polímeros que apresentaram propriedades tensoativas.

No segundo capítulo a estabilização por partículas, emulsões de Pickering, sem uso de surfactante foi proposta. A criação de emulsões completamente formadas por polímeros naturais foi estudada através da mistura de soluções dos polímeros hidrossolúveis, mas incompatíveis, GLC e ALB. Os empregos de CNC, bem como de um material inédito criado através da ligação covalente entre CNC e ALB, demonstraram eficiência como estabilizadores dessas emulsões água-água de Pickering.

REFERÊNCIAS

- Amoozgar, Z., J. Y. Park, Q. N. Lin and Y. Yeo (2012). "Low Molecular-Weight Chitosan as a pH-Sensitive Stealth Coating for Tumor-Specific Drug Delivery." *Mol Pharm* 9(5): 1262-1270.
- Antonov, Y. A., Y. Y. Grinberg and Y. B. Tolstoguzov (1979). *Nahrung* 23: 207-214.
- Babak, V. G., G. A. Vikhoreva and I. G. Lukina (1997). "Interaction between carboxymethylchitin and tetradecyltrimethylammonium bromide: phase separation, surface tension and stability of microscopic foam films and foams." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 128: 75-89.
- Bain, C. D., P. M. Claesson, D. Langevin, R. Meszaros, T. Nylander, C. Stubenrauch, S. Titmuss and R. v. Klitzing (2010). "Complexes of surfactants with oppositely charged polymers at surfaces and in bulk." *Advances in Colloid and Interface Science* 155: 32–49.
- Baldrick, P. (2010). "The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient." *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56(3): 290-299.
- Bastardo, L. A., J. Iruthayaraj, M. Lundin, A. Dedinaite, A. Vareikis, R. Makuška, A. v. d. Wal, I. Furó, V. M. Garamus and P. M. Claesson (2007). "Soluble complexes in aqueous mixtures of low charge density comb polyelectrolyte and oppositely charged surfactant probed by scattering and NMR." *Journal of Colloid and Interface Science* 312: 21–33.
- Baumgart, T. and A. Offenhausser (2003). "Polysaccharide-supported planar bilayer lipid model membranes." *Langmuir* 19(5): 1730-1737.
- Behm, B., P. Babilas, M. Landthaler and S. Schreml (2011). "Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 26: 812–820.
- Beijerinck, M. W. (1896). *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene* 2: 697.
- Beijerinck, M. W. (1910). *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* 7: 16.
- Berg, J. C. (2010). *An introduction to interfaces and colloids the bridge to nanoscience*, World Scientific.
- Berne, B. J. e Pecora, R. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. New York. 2000.
- Binks, B. P. (2002). "Particles as surfactants e similarities and differences." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7: 21-41.

Borden, M. A. and M. L. Longo (2002). "Dissolution behavior of lipid monolayer-coated, air-filled microbubbles: Effect of lipid hydrophobic chain length." *Langmuir* 18(24): 9225-9233.

Bras, J., Hassan, M. L., Bruzesse, C., Hassan, E. A., El-Wakil, N. A., & Dufresne, A. (2010). "Mechanical, barrier, and biodegradability properties of bagasse cellulose whiskers reinforced natural rubber nanocomposites." *Industrial Crops and Products*, 32, 627–633.

Bresolin, T. M. B., M. Milas, M. Rinaudo and J. L. M. S. Ganter (1998). "Xanthan–galactomannan interactions as related to xanthan conformations." *International Journal of Biological Macromolecules*(23): 263 - 275.

Brito, R. O. and E. F. Marques (2005). "Neat DODAB vesicles: Effect of sonication time on the phase transition thermodynamic parameters and its relation with incomplete chain freezing." *Chemistry and Physics of Lipids*(137): 18-28.

Bungenberg de Jong, H. G. and H. R. Kruyt (1952). *Colloid Science*: 355-364.

Butschli, O. (1898). *Untersuch. Strukt.* 251.

Caillier, L., E. T. de Givenchy, R. Levy, Y. Vandenberghe, S. Géribaldi and F. Guittard (2009). "Synthesis and antimicrobial properties of polymerizable quaternary ammoniums." *European Journal of Medicinal Chemistry* 44: 3201–3208.

Cárdenas, M., T. Nylander, B. Jönsson and B. Lindman (2005). "The interaction between DNA and cationic lipid films at the air–water interface." *Journal of Colloid and Interface Science* 286(1): 166-175.

Chakraborty, T., I. Chakraborty and S. Ghosh (2006). "Sodium Carboxymethylcellulose-CTAB Interaction: A Detailed Thermodynamic Study of Polymer-Surfactant Interaction with Opposite Charges." *Langmuir*: 9905-9913.

Chakraborty, T., I. Chakraborty, S. P. Moulik and S. Ghosh (2009). "Physicochemical and Conformational Studies on BSA-Surfactant Interaction in Aqueous Medium." *Langmuir* 25: 3062-3074.

Chen, R. R. and D. J. Mooney (2003). "Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering." *Pharmaceutical Research* 20: 1103–1112.

Cheow, W. S. and K. Hadinoto (2011). "Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 85(2): 214-220.

Cherian, B. M., Leão, A. L., de Souza, S. F., Costa, L. M. M., de Olyveira, G. M., Kot-taisamy, M. (2011). "Cellulose nanocomposites with nanofibres isolated from pineapple leaf fibers for medical applications." *Carbohydrate Polymers*, 86, 1790–1798.

Choi, J. K., J.-H. Jang, W.-H. Jang, J. Kim, I.-H. Bae, J. Bae, Y.-H. Park, B. J. Kim, K.-M. Lim and J. W. Park (2012). "The effect of epidermal growth factor

(EGF) conjugated with low-molecular weight protamine (LMWP) on wound healing of the skin." *Biomaterials* 33: 8579-8590.

Cosgrove, T. (2010). *Colloid science: principles, methods and applications*. Bristol, John Wiley & Sons Ltd.

Dakia, P. A., C. Blecker, C. Robert, B. Wathelet, M. Paquot and B. D. A. (2008). "Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment." *Food Hydrocolloids* 22: 807-818.

Dal-Bó, A. G., R. Laus, A. C. Felipe, D. Zanette and E. Minatti (2011). "Association of anionic surfactant mixed micelles with hydrophobically modified ethyl (hydroxyethyl) cellulose." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 380: 100–106.

Dea, I. C. M. and A. Morrison (1975). "Chemistry and interactions of seed galactomannans." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 32: 241–312.

Decher, G. (1997). "Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites." *SCIENCE* 277: 1232-1237.

Deepa, B., Abraham, E., Cherian, B. M., Bismarck, A., Blaker, J. J., Pothan, L. A. (2011). "Structure, morphology and thermal characteristics of banana nanofibers obtained by steam explosion." *Bioresource Technology*, 102, 1988–1997.

Değim, Z., N. Çelebi, C. Alemdaroğlu, M. Deveci, S. Öztürk and C. Özoğul (2011). "Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing." *International Wound Journal*: 1-12.

Dellacherie, E., F. Bonneaux, P. Labrude and C. Vigneron (1983). *Biochimica et Biophysica Acta* 749: 106-114.

Disalvo, E. A. e Bouchet, A. M. Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption. *Colloids and Surfaces A*. 2012.

Dobry, A. and F. Boyer-Kawenoki (1948). *The Bulletin des Sociétés Chimiques Belges* 57: 280-285.

Doi, K. (1965). *Biochimica et Biophysica Acta* 94: 557-565.

Domenici, F., C. Castellano, F. Dell'Unto and A. Congiu (2012). "Temperature-dependent structural changes on DODAB surfactant assemblies evidenced by energy dispersive X-ray diffraction and dynamic light scattering." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

Drulis-Kawa, Z. and A. Dorotkiewicz-Jach (2010). "Liposomes as delivery systems for antibiotics." *International Journal of Pharmaceutics* 387: 187–198.

Dube, D. H. and C. R. Bertozzi (2005). "Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics." *Nat Rev Drug Discov* 4(6): 477-488.

Fan, C. W. and S. C. Lee (2008). "Effects in surface free energy of sputter-deposited NbN_x films." *Materials Chemistry and Physics* 107(2-3): 334-338.

Fang, N., V. Chan, H.-Q. Mao and K. W. Leong (2001). "Interactions of Phospholipid Bilayer with Chitosan: Effect of Molecular Weight and pH." *Biomacromolecules* 2(4): 1161-1168.

Feitosa, E., P. Barreleiro and G. Olofsson (2000). "Phase transitions in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods." *Chemistry and Physics of Lipids* 105: 201-213.

Feitosa, E., J. Jansson and B. Lindman (2006). "The effect of chain length on the melting temperature and size of dialkyldimethylammonium bromide vesicles." *Chemistry and Physics of Lipids* 142: 128-132.

Ferrara, K. W., M. A. Borden and H. Zhang (2009). "Lipid-Shelled Vehicles: Engineering for Ultrasound Molecular Imaging and Drug Delivery." *Accounts of Chemical Research* 42(7): 881-892.

Firoozmand, H., B. S. Murray and E. Dickinson (2009). "Interfacial structuring in a phase-separating mixed biopolymer solution containing colloidal particles." *Langmuir* 25: 1300-1305.

Ganter, J. L. M. S., A. T. M. Cardoso, M. Kaminski and F. Reicher (1997). "Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process." *International Journal of Biological Macromolecules* 21: 137-140.

Gedda, L., P. Olsson, J. Pontén and J. Carlsson (1996). "Development and in Vitro Studies of Epidermal Growth Factor-Dextran Conjugates for Boron Neutron Capture Therapy." *Bioconjugate Chemistry* 7: 584-591.

Giuffre, A. J., L. M. Hamm, N. Han, J. J. De Yoreo and P. M. Dove (2013). "Polysaccharide chemistry regulates kinetics of calcite nucleation through competition of interfacial energies." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(23): 9261-9266.

Goddard, E. D. (1993). *Interaction of Surfactants with Polymers and Proteins*. Boca Raton, CRC Press.

Grinberg, V. Y. and V. B. Tolstoguzov (1997). "Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions." *Food Hydrocolloids* 11(2): 145-158.

Grinberg, V. Y. and Y. B. Tolstoguzov (1972). *Carbohydrate Research* 25: 313-321.

Gulrez, S. K. H., S. Al-Assaf, Y. Fang, G. O. Phillips, A. P. Gunning and B. D. A. (2012). "Revisiting the conformation of xanthan and the effect of industrially relevant treatments." *Carbohydrate Polymers* 90: 1235-1243.

Halasová, T., J. Krouská, F. Mravec and M. Pekař (2011). "Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 391(1-3): 25-31.

Harmon, A. M., M. H. Lash, N. Tishbi, D. Lent, E. A. Mintzer and K. E. Uhrich (2011). "Thermodynamic and Physical Interactions between Novel Polymeric Surfactants and Lipids: Toward Designing Stable Polymer Lipid Complexes." *Langmuir*: 9131–9138.

Hartree, E. F. (1972). "Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives Linear Photometric Response." *Analytical Biochemistry* 48: 422-427.

He, C. B., Y. P. Hu, L. C. Yin, C. Tang and C. H. Yin (2010). "Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles." *Biomaterials* 31(13): 3657-3666.

Hiemenz, P. C. and R. Rajagopalan (1997). *Principles of colloid and surface chemistry*. Boca Raton, CRC Press.

Hippel, P. H. and T. Scheich (1973). *Structure and Stability of Biological Macromolecules*. Moscow, Mir.

Holmberg, V. C. and B. A. Korgel (2010). "Corrosion Resistance of Thiol- and Alkene-Passivated Germanium Nanowires." *Chemistry of Materials* 22(12): 3698-3703.

Hvattuma, E., a. L. Yip, D. Grace and K. Dyrstad (2012). "Characterization of polysorbate 80 with liquid chromatography mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy: Specific determination of oxidation products of thermally oxidized polysorbate 80." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 62: 7–16.

IUPAC (1992). *Glossary for chemists of terms used in biotechnology*.

Jansson, P. E., L. Kennark and B. Lindberg (1975). "Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*." *Carbohydrate Research* 45: 275–282.

Jian, G., R. Ying and G. Wei (2009). "Molecular Dynamics Simulation of Effect of Salt on the Compromise of Hydrophilic and Hydrophobic Interactions in Sodium Dodecyl Sulfate Micelle Solutions." *Chinese Journal of Chemical Engineering* 17(4): 654-660.

Jiang, R., Y. Wang, Y. Yang and C. Lin (2013). "Equilibrium and dynamic surface tension of carboxymethylchitosan and alkyl trimethylammonium bromide mixtures." *Journal of Dispersion Science and Technology* 34: 22–31.

Kaminski, G. A. T., M. R. Sierakowski, R. Pontarolo, R. A. Freitas (2015). "Comparison between the interactions of the cationic surfactante DODAB with xanthan and galactomannan." *Carbohydrate Polymers* 115:478-484.

Kaminski, G. A. T., M. R. Sierakowski, R. Pontarolo, L. A. Santos, R. A. Freitas (2016). "Layer-by-layer polysaccharide-coated liposomes for sustained delivery or epidermal growth factor." *Carbohydrate Polymers* 140:129-135.

Karsa, D. R. and M. R. Porter (1995). *Biodegradability of Surfactants*. Glasgow, UK., Blackie Academic & Professional.

Khanal, A., Y. G. Cui, L. A. Zhang, R. Pelton, Y. Y. Ren, H. Ketelson and J. Davis (2010). "Cationic Liposome Colloidal Stability in the Presence of Guar Derivatives Suggests Depletion Interactions May be Operative in Artificial Tears." *Biomacromolecules* 11(9): 2460-2464.

Khouryieh, H. A., T. J. Herald, F. Aramouni and S. Alavi (2007). "Intrinsic viscosity and viscoelastic properties of xanthan/guar mixtures in dilute solutions: Effect of salt concentration on the polymer interactions." *Food Research International* 40: 883–893.

Krajewska, B., P. Wydro and A. Kyzioł (2013). "Chitosan as a subphase disturbant of membrane lipid monolayers. The effect of temperature at varying pH: I. DPPG." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 434(0): 349-358.

Kudsiova, L., C. Arafiena and M. J. Lawrence (2008). "Characterisation of chitosan-coated vesicles encapsulating DNA suitable for gene delivery." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97(9): 3981-3997.

Kwan, J. J. and M. A. Borden (2012). "Lipid monolayer dilatational mechanics during microbubble gas exchange." *Soft Matter* 8(17): 4756-4766.

Kwan, J. J. and M. A. Borden (2012). "Lipid monolayer dilatational mechanics during microbubble gas exchange (vol 8, pg 4756, 2012)." *Soft Matter* 8(48): 12144-12144.

Lawrie, G., I. Keen, B. Drew, A. Chandler-Temple, L. Rintoul, P. Fredericks and L. Grondahl (2007). "Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS." *Biomacromolecules* 8(8): 2533-2541.

Lee, K. Y. and D. J. Mooney (2012). "Alginate: Properties and biomedical applications." *Progress in Polymer Science* 37: 106–126.

Li, D., G. Li, P. Li, L. Zhang, Z. Liu, J. Wang and E. Wang (2010). "The enhancement of transfection efficiency of cationic liposomes by didodecyldimethylammonium bromide coated gold nanoparticles." *Biomaterials* 31: 1850–1857.

Li, F., Y. Luan, X. Liu, G. Xu, X. Li, X. Li and J. Wang (2011). "Investigation on the aggregation behaviors of DODAB/NaDEHP cationic vesicles in the absence and presence of a negatively charged polyelectrolyte." *Physical Chemistry Chemical Physics* 13: 5897–5905.

Liebau, M., G. Bendas, U. Rothe and R. H. H. Neubert (1998). "Adhesive interactions of liposomes with supported planar bilayers on QCM as a new adhesion model." *Sensors and Actuators B* 47: 239–245.

Lipids, A. P. (2013).

Liu, H., Liu, D., Yao, F., & Wu, Q. (2010). "Fabrication and properties of transparent poly-methylmethacrylate/cellulose nanocrystals composites." *Bioresource Technology*, 101, 5685–5692.

Liu, Z., Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou and Z. Zhang (2008). "Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems." *Advances in Drug Delivery Reviews* 60: 1650–1662.

Lojou, É. and P. Bianco (2004). "Buildup of Polyelectrolyte-Protein Multilayer Assemblies on Gold Electrodes. Role of the Hydrophobic Effect." *Langmuir* 20: 748-755.

Lozano, M. M. and M. L. Longo (2009). "Complex formation and other phase transformations mapped in saturated phosphatidylcholine/DSPE-PEG2000 monolayers." *Soft Matter* 5(9): 1822-1834.

Lu, P. e Hsieh, Y. L. (2012). "Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from rice straw." *Carbohydrate Polymers* 87: 564-573.

Maier, H., M. Anderson, C. Karl, K. Magnuson, R. L. Whistler, R. L. In: Whistler and J. N. BeMiller (1993). *Industrial Gums: Polysaccharides and their Derivatives*. New York, Academic Press.

Maliszewska, I., K. A. Wilk, B. Burczyk and L. Syper (2001). "Antimicrobial activity and biodegradability of N-alkylaldonamides." *Progress in Colloid and Polymer Science* 118: 172–176.

Manoli, S. and A. Avranas (2013). "Aqueous solutions of the double chain cationic surfactants didodecyldimethylammonium bromide and ditetradecyldimethylammonium bromide with Pluronic F68: Dynamic surface tension measurements." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 436: 1060– 1068.

Manousakis, M. and A. Avranas (2013). "Dynamic surface tension studies of mixtures of hydroxypropylmethylcellulose with the double chain cationic surfactants didodecyldimethylammonium bromide and ditetradecyldimethylammonium bromide." *Journal of Colloid and Interface Science* 402: 237–245.

Matulis, D., L. Rouzina and V. A. Bloomfield (2000). "Thermodynamics of DNA binding and condensation: isothermal titration calorimetry and electrostatic mechanism." *Journal of Molecular Biology* 296: 1053.

Mertins, O., M. I. Z. Lionzo, Y. M. S. Micheletto, A. R. Pohlmann and N. P. da Silveira (2009). "Chitosan effect on the mesophase behavior of

phosphatidylcholine supramolecular systems." *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* 29(2): 463-469.

Meuse, C. W., G. Niaura, M. L. Lewis and A. L. Plant (1998). "Assessing the molecular structure of alkanethiol monolayers in hybrid bilayer membranes with vibrational spectroscopies." *Langmuir* 14(7): 1604-1611.

Morita, S., M. Nukui and R. Kuboi (2006). "Immobilization of liposomes onto quartz crystal microbalance to detect interaction between liposomes and proteins." *Journal of Colloid and Interface Science* 298: 672-678.

Morris, E. R., D. A. Rees, G. Young, M. D. Walkinshaw and A. Darke (1977). "Order- disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host." *Journal of Molecular Biology* 110: 1-16.

Mukherjee, I., S. P. Moulik and A. K. Rakshit (2013). "Tensiometric determination of Gibbs surface excess and micelle point: A critical revisit." *Journal of Colloid and Interface Science* 394: 329-336.

Mukherjee, I., D. Sarkar and S. P. Moulik (2010). "Interaction of Gums (Guar, Carboxymethylhydroxypropyl Guar, Diutan, and Xanthan) with Surfactants (DTAB, CTAB, and TX-100) in Aqueous Medium." *Langmuir* 26(23): 17906-17912.

Naderi, A., R. Makuška and P. M. Claesson (2008). "Interactions between bottle-brush polyelectrolyte layers: Effects of ionic strength and oppositely charged surfactant." *Journal of Colloid and Interface Science* 323: 191-120.

Nakano, K., Y. Tozuka, H. Yamamoto, Y. Kawashima and H. Takeuchi (2008). "A novel method for measuring rigidity of submicron-size liposomes with atomic force microscopy." *International Journal of Pharmaceutics* 355: 203-209.

Naves, A. F. and D. F. S. Petri (2005). "The effect of molecular weight and degree of substitution on the interactions between carboxymethyl cellulose and cetyltrimethylammonium bromide." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 254: 207-214.

Nesmeyanov, A. N., Y. M. Belikov, S. Y. Rogozhin, G. L. Slonimskii, R. V. Golovnya and Y. B. Tolstoguzov (1969). *Vestnik Akademii Nauk SSSR* 1: 27-44.

Nguyen, B. T., T. Nicolai and L. Benyahia (2013). "Stabilization of water-in-water emulsions by addition of protein particles." *Langmuir* 29: 10658-10664.

Ohnishi, N., E. Yamamoto, H. Tomida, K. Hyodo, H. Ishihara, H. Kikuchi, K. Tahara and H. Takeuchi (2013). "Rapid determination of the encapsulation efficiency of a liposome formulation using column-switching HPLC." *International Journal of Pharmaceutics* 441: 67-74.

Onésippe, C. and S. Lagerge (2008). "Studies of the association of chitosan and alkylated chitosan with oppositely charged sodium dodecyl sulfate." *Colloids and Surfaces A* 330: 201-206.

Oskman, K., Mathew, A. P., Bondenson, D., e Kvien, I. (2006). "Manufacturing process of cellulose whiskers/poly(lactic acid) nanocomposites." *Composites Science and Technology*, 66, 2776–2784.

Ostwald, W. and R. H. Hertel (1929). *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* 47(258): 357.

Owens, D. E. and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* 307(1): 93-102.

Park, Y., A. C. Luce, R. D. Whitaker, B. Amin, M. Cabodi, R. J. Nap, I. Szleifer, R. O. Cleveland, J. O. Nagy and J. Y. Wong (2012). "Tunable Diacetylene Polymerized Shell Microbubbles as Ultrasound Contrast Agents." *Langmuir* 28(8): 3766-3772.

Patterson, D. (1982). *Polymer Engineering & Science* 22: 64-73.

Pavinatto, A., F. J. Pavinatto, J. A. D. Deleuzuk, T. M. Nobre, A. L. Souza, S. P. Campana-Filho and O. N. Oliveira (2013). "Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 104: 48-53.

Pavinatto, F. J., A. Pavinatto, L. Caseli, D. S. dos Santos, T. M. Nobre, M. E. D. Zaniquelli and O. N. Oliveira (2007). "Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface." *Biomacromolecules* 8(5): 1633-1640.

Penfold, J., D. J. F. Taylor, R. K. Thomas, I. Tucker and L. J. Thompson (2003). "Adsorption of Polymer/Surfactant Mixtures at the Air-Water Interface: Ethoxylated Poly(ethyleneimine) and Sodium Dodecyl Sulfate." *Langmuir* 19: 7740-7745.

Prabaharan, M. (2011). "Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems." *International Journal of Biological Macromolecules* 49: 117-124.

Quemeneur, F., M. Rinaudo and B. Pepin-Donat (2008). "Influence of molecular weight and pH on adsorption of chitosan at the surface of large and giant vesicles." *Biomacromolecules* 9(1): 396-402.

Ratanabanangkoon, P., M. Gropper, R. Merkel, E. Sackmann and A. P. Gast (2003). "Mechanics of streptavidin-coated giant lipid bilayer vesicles: A micropipet study." *Langmuir* 19(4): 1054-1062.

Ravi-Kumar, M. N. V. (2000). "A review of chitin and chitosan applications, Reactive & Functional." *Polymers* 46: 1–27.

Recillas, M., L. L. Silva, C. Peniche, F. M. Goycoolea, M. Rinaudo and W. M. Arguelles-Monal (2009). "Thermoresponsive Behavior of Chitosan-g-N-isopropylacrylamide Copolymer Solutions." *Biomacromolecules* 10(6): 1633-1641.

Rinaudo, M. (2006). "Chitin and chitosan: Properties and applications." *Progress in Polymer Science* 31(7): 603-632.

Rinaudo, M., G. Pavlov and J. Desbrières (1999). "Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan." *Polymers* 40: 7029–7032.

Robinson, A. M., M. Bannister, J. E. Creeth and M. N. Jones (2001). "The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide." *Colloids and Surfaces A* 186: 43–53.

Rosen, M. J. and S. Aronson (1981). "Standard free energies of adsorption of surfactants at the aqueous solution/air interface from surface tension data in the vicinity of the critical micelle concentration." *Colloids and Surfaces* 3: 201-203.

Rotta, J., R. A. Ozorio, A. M. Kehrwald, G. M. D. Barra, R. D. D. C. Amboni and P. L. M. Barreto (2009). "Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol." *Materials Science & Engineering C- Biomimetic and Supramolecular Systems* 29(2): 619-623.

Sagis, L. M. C. and E. Scholten (2014). "Complex interfaces in food: Structure and mechanical properties." *Trends in Food Science & Technology* 37(1): 59-71.

Sahin, I., D. Bilge, N. Kazanci and F. Severcan (2013). "Concentration-dependent effect of melatonin on DSPC membrane." *Journal of Molecular Structure* 1052: 183-188.

Sato, M. and M. Sano (2005). "Van der Waals layer-by-layer construction of a carbon nanotube 2D network." *Langmuir* 21: 11490–11494.

Shahidi, F., J. K. V. Arachchi and Y. J. Yeon (1999). "Food applications of chitin and chitosan." *Trends in Food Science and Technology* 10: 37–51.

Sheng, Y., C. S. Liu, Y. Yuan, X. Y. Tao, F. Yang, X. Q. Shan, H. J. Zhou and F. Xu (2009). "Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan." *Biomaterials* 30(12): 2340-2348.

Shikata, F., H. Tokumitsu, H. Ichikawa and Y. Fukumori (2002). "In vitro cellular accumulation of gadolinium incorporated into chitosan nanoparticles designed for neutron-capture therapy of cancer." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53(1): 57-63.

Sikiric, M., I. Primožic and N. Filipovic-Vincekovic (2002). "Adsorption and association in aqueous solutions of dissymmetric gemini surfactant." *Journal of Colloid and Interface Science* 250: 221–229.

Somasundaran, P. and L. Huang (2000). "Adsorption/aggregation of surfactants and their mixtures at solid–liquid interfaces." *Advances in Colloid and Interface Science* 88: 179.

Steel, J. C., H. M. A. Cavanagh, M. A. Burton, M. S. Abu-Asab, M. Tsokos, J. C. Morris and W. H. J. Kalle (2007). "Increased tumor localization and reduced

immune response to adenoviral vector formulated with the liposome DODAB/DOPE." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30: 398–405.

Sun, J., T. Wu, Y. Sun, Z. Wang, X. Zhang, J. Shen and W. Cao (1998). "Fabrication of a covalently attached multilayer via photolysis of layer-by-layer self-assembled films containing diazo-resins." *Chemical Communications*: 1853-1854.

Tako, M. (1991). "Synergistic interaction between xanthan and tara-bean gum." *Carbohydrate Polymers* 10: 619–633.

Tanford, C. (1965). *Physical Chemistry of Macromolecules*. Moscow, Khimia.

Taylor, T. M., P. M. Davidson, D. B. Bruce and J. Weiss (2005). "Liposomal nanocapsules in food science and agriculture." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 587–605.

Thalberg, K. and B. Lindman (1993). "Segregation in aqueous systems of a polyelectrolyte and an ionic surfactant " *Colloids and Surfaces A* 76: 283.

Tinkov, S., G. Winter, C. Coester and R. Bekeredjian (2010). "New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: Part I - Formulation development and in-vitro characterization." *Journal of Controlled Release* 143(1): 143-150.

Tolstogusow, W. B. and E. S. Wainermann (1975). *Nahrung* 19: 45-60.

Tolstoguzov, V. B., V. Y. Grinberg and A. N. Gurov (1985). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 151-159.

Tominaga, M., A. Ohira, Y. Yamaguchi and M. Kunitake (2004). "Electrochemical, AFM and QCM studies on ferritin immobilized onto a self-assembled monolayer-modified gold electrode." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 566 323–329.

Varfolomeeva, E. P., V. Y. Grinberg and Y. B. Tolstoguzov (1980). *Polymer Bulletin* 2: 613-618.

Vasilevskaya, V. V., S. G. Starodubzev and A. R. Khokhlov (1987). *Vysokomolekulyarnye Soedineniya* 29B: 930-933.

Vendruscolo, C. W., C. Ferrero, E. A. G. Pineda, J. L. M. Silveira, R. A. Freitas, M. R. Jiménez-Castellanos and T. M. B. Bresolin (2009). "Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: Effect of drying method." *Carbohydrate Polymers* 76: 86-93.

Viseu, M. I., M. M. Velázquez, C. S. Campos, I. García-Mateos and S. M. B. Costa (2000). "Structural Transitions in a Bicationic Amphiphile System Studied by Light-Scattering, Conductivity, and Surface Tension Measurements." *Langmuir* 16: 4882-4889.

Wang, C. and K. C. Tam (2002). "New Insights on the Interaction Mechanism within Oppositely Charged Polymer/Surfactant Systems." *Langmuir* 18: 6484.

Wang, C., K. C. Tam, R. D. Jenkins and C. B. Tan (2003). "Interactions between Methacrylic Acid/Ethyl Acrylate Copolymers and Dodecyltrimethylammonium Bromide." *Journal of Physical Chemistry B* 107: 4667-4675.

Wang, L. Y., Z. Q. Wang, X. Zhang, J. C. Shen, L. F. Chi and H. Fuchs (1997). "A new approach for the fabrication of an alternating multilayer film of poly(4-vinylpyridine) and poly(acrylic acid) based on hydrogen bonding." *Macromolecular Rapid Communications* 18: 509–514.

Wattanaphanit, A. and N. Saito (2013). "Effect of polymer concentration on the depolymerization of sodium alginate by the solution plasma process." *Polymer Degradation and Stability*.

Wong, T. Y., L. A. Preston and N. L. Schiller (2000). "Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications." *Annual review of microbiology* 54: 289-340.

Wu, F.-G., Z.-W. Yu and G. Ji (2011). "Formation and transformation of the subgel phase in dioctadecyldimethylammonium bromide aqueous dispersions." *Langmuir* 27: 2349-2356.

Wu, J., A. Lee, Y. Lu and R. J. Lee (2007). "Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes." *International Journal of Pharmaceutics* 337: 329–335.

Zaru, M., M. L. Manca, A. M. Fadda and S. G. Antimisiaris (2009). "Chitosan-coated liposomes for delivery to lungs by nebulisation." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 71(1): 88-95.

Zoller, U. (1993). "Groundwater contamination by detergents and polycyclic aromatic hydrocarbons—a global problem of organic contaminants: is the solution locally specific?" *Water Science and Technology* 27: 187– 195.