

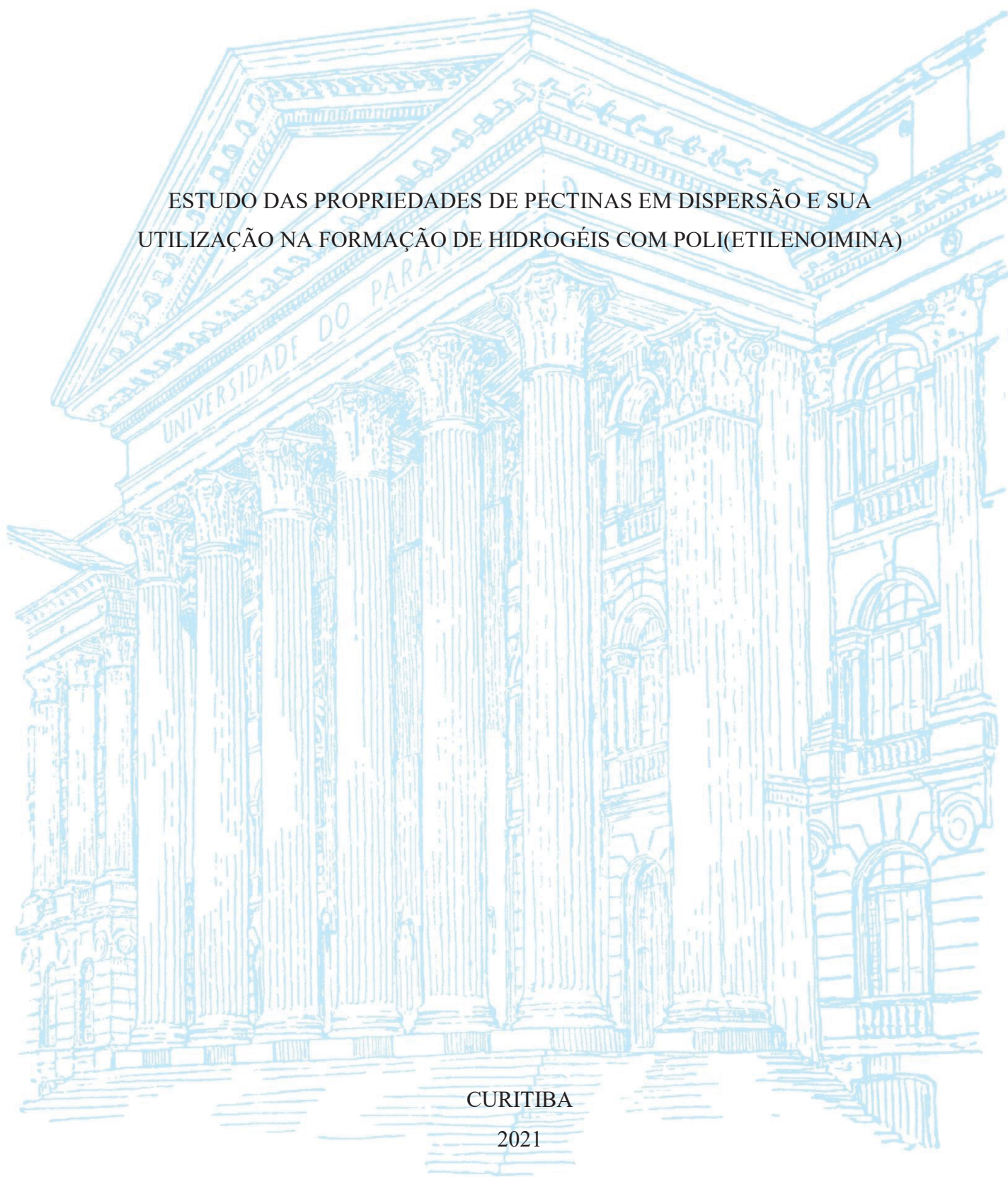
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MORGANA SOFIA ZILSE

ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE PECTINAS EM DISPERSÃO E SUA
UTILIZAÇÃO NA FORMAÇÃO DE HIDROGÉIS COM POLI(ETILENOIMINA)

CURITIBA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MORGANA SOFIA ZILSE

ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE PECTINAS EM DISPERSÃO E SUA
UTILIZAÇÃO NA FORMAÇÃO DE HIDROGÉIS COM POLI(ETILENOIMINA)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Química, Setor de Exatas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Riegel-Vidotti
Coorientador: Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini

CURITIBA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Zilse, Morgana Sofia

**Estudo das propriedades de pectinas em dispersão e sua
utilização na formação de hidrogéis com poli(etilenoimina) /**

Morgana Sofia Zilse. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Riegel-Vidotti

Coorientador: Prof. Dr. Ismael Casagrande Bellettini

1. Hidrogel. 2. Reologia. 3. Pectina. 4. Maracujá. I. Vidotti, Izabel
Riegel. II. Bellettini, Ismael Casagrande. III. Universidade Federal do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MORGANA SOFIA ZILSE** intitulada: **ESTUDO DAS PROPRIEDADES DE PECTINAS EM DISPERSÃO E SUA UTILIZAÇÃO NA FORMAÇÃO DE HIDROGÉIS COM POLI(ETILENOIMINA)**, sob orientação da Profa. Dra. **IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 30 de Novembro de 2021.

IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA

Presidente da Banca Examinadora

RILTON ALVES DE FREITAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DAIANI CANABARRO LEITE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
grandes incentivadores dos meus
estudos.*

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e mais importante agradecimento, aos meus pais, Egon e Iris, e meus irmãos, Maciel e Junior. Desde criança vocês subsidiaram os meus estudos, me incentivaram a batalhar e a alcançar as minhas metas. Me ensinaram a respeitar os meus queridos professores, profissão que hoje escolhi para mim. Obrigada.

Ao meu companheiro, Natan, que me apoiou em minhas loucuras, nas minhas viagens de 500km de (quase) todos os fins de semana, nos âmbitos psicológico, emocional e afetivo. Obrigada por ter paciência e por me ajudar a seguir em frente.

Aos meus mestres que acompanharam minha formação. Em especial aos meus orientadores Izabel e Ismael, que acreditaram em mim e na minha capacidade. Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e por este trabalho.

Aos meus médicos, Pedro e Marco Aurélio, e psicólogos, Jullia e Douglas, que salvaram minha saúde mental quando eu pensei em desistir de tudo.

Aos meus amigos da UFPR e da UFSC, pessoas tão especiais que estes anos de graduação e pós-graduação me trouxeram. Allana, Alex, Andrei, Ana Carol, Ana Letícia, Bruna, Gabriela, Giuliana, Isabela, José, José Severiano, Luiz Keller, Luiza, Máira, Morgana Aline, Nilton, Paola, Patrícia, Renata, Tatiana, Valmir, Welinton e Yane. Obrigada a todos vocês por cada dia de estudo, de laboratório, de tratamento de dados, por cada evento e parceria em viagens, por cada abraço nos dias difíceis, cada ombro amigo para conversar e chorar, pela paciência e por me ajudarem a compreender o incompreensível.

Agradecimentos especiais aos meus amigos orientadores: Ana Carol, que me auxiliou na produção, caracterização e congelamento dos meus géis. Isabela, por todas as disciplinas e trabalhos que estudamos e desenvolvemos juntas. José, que abriu o departamento para mim em inúmeros fins de semana, me ajudou a desenvolver, tratar e compreender diversos experimentos e dados. Alex que me ensinou e auxiliou a desenvolver meus gráficos e espectros. A Máira pelo desenvolvimento dos experimentos de espalhamento de luz e potencial zeta.

Ao Prof. Rilton por ceder o espaço e o uso dos equipamentos para as análises de potencial zeta, espalhamento de luz e reometria, além de me acompanhar nas disciplinas, desde meu primeiro relatório, qualificação e banca de defesa de dissertação. Agradeço aos colegas do laboratório Biopol, que me acolheram no laboratório e sempre foram muito solícitos e queridos ao me ajudar. Especialmente a Bianca, Gabriela, Mariana e William que me salvaram em vários experimentos e treinamentos.

Ao Prof. Frederico e Naiara pelo auxílio com o desenvolvimento e tratamento de dados das análises de componentes principais.

A Naiara novamente e Rafael, pelo auxílio nos experimentos de liofilização.

A Prof Fernanda pelas contribuições na banca de qualificação, discussões e análises de ressonância magnética nuclear.

A Prof Lucimara por ceder a pectina extraída do maracujá.

A UFSC Blumenau por liberar o espaço para o desenvolvimento do projeto durante a pandemia e pelas análises de infravermelho.

Ao Laboratório Multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN) do Departamento de Química da UFPR e ao centro de Ressonância Magnética Nuclear (CRMN) da UFPR pelas análises concedidas.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, pela infraestrutura disponibilizada para as análises de microscopia eletrônica de varredura.

A CAPES, pela bolsa concedida.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a sulfatação e caracterização da pectina do maracujá (PCM), bem como o desenvolvimento de hidrogéis baseados nas pectinas, sulfatadas e não sulfatada, interagindo com o polímero sintético poli(etilenoimina) (PEI). As amostras de pectina foram inicialmente modificadas e em seguida caracterizadas por diversas técnicas. Suas análises incluem cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência (HPSEC), a partir da qual foi possível observar dispersão heterogênea das amostras de pectina. A partir da ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e mapa de correlação 2D do tipo HSQC-DEPT, bem como espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier, observaram-se os sinais e bandas características da estrutura de ácidos galacturônicos presentes na pectina e a presença de sinais da modificação. Análises de potencial zeta mostraram que todas as amostras estudadas apresentaram valores negativos conforme o esperado para um polieletrólito aniônico. Os dados de viscosidade e espalhamento de luz dinâmico apresentaram dados importantes para a compreensão da conformação apresentada pelas amostras em água e tampão PBS, demonstrando seu comportamento característico de formação de agregados. Ainda, os valores de raio hidrodinâmico demonstraram que a amostra de pectina não sulfatada apresenta valores independentes do solvente (H₂O ou PBS), enquanto que as amostras sulfatadas apresentaram dependência. A partir das análises de fluido concluiu-se que as amostras de pectina apresentaram perfil de fluidos pseudoplásticos em altas concentrações enquanto que o PEI e poli(etilenoglicol) (PEG) apresentaram perfil de fluidos dilatantes. Em um segundo momento hidrogéis de pectina não sulfatada, poli(etileno imina) e poli(etilenoglicol) foram produzidos. Estas amostras apresentaram, nas análises de infravermelho, ligações de hidrogênio como as principais formas de ligações entre cadeias. O hidrogel de composição PCM 1% PEI 1,3 0,4% PEG 0,4% apresentou os melhores resultados reológicos. Por fim, os resultados aqui apresentados contribuem para o uso das pectinas sulfatadas e dos géis com PEI em aplicações de interesse biomédico.

Palavras-chave: Hidrogel. Reologia. Sulfatação. Pectina. Maracujá. Poli(etilenoimina). Poli(etilenoglicol).

ABSTRACT

The objective of this work was the sulphation and characterization of passion fruit pectin, as well as the development of hydrogels based on sulphated and non-sulphated pectins, interacting with the synthetic polymer poly(ethyleneimine). The pectin samples were initially modified and then characterized by different techniques. The analyzes include high performance size exclusion chromatography (HPSEC), from which it was possible to observe heterogeneous dispersion of pectin samples. From the hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and 2D correlation map of the HSQC-DEPT type, as well as Fourier transform infrared spectroscopy, the characteristic signals and bands of the structure of galacturonic acids present in pectin and a were observed. presence of signs of modification. Zeta potential analysis showed that all samples studied showed negative values as expected for an anionic polyelectrolyte. Viscosity and dynamic light scattering data presented important data for understanding the conformation presented by the samples in water and PBS buffer, demonstrating their characteristic behavior of aggregate formation. Furthermore, the hydrodynamic radius values showed that the non-sulfated pectin sample presents values independent of the solvent (H_2O or PBS), while the sulfate samples showed dependence. From the fluid analysis it was concluded that the pectin samples showed a pseudoplastic fluid profile at high concentrations while the PEIs and PEG showed a dilating fluid profile. In a second moment, hydrogels of unsulfated pectin, poly(ethylene imine) and poly(ethylene glycol) were produced. These samples showed, in infrared analysis, hydrogen bonds as the main forms of bonds between chains. The hydrogel with composition PCM 1% PEI 1.3 0.4% PEG 0.4% presented the best rheological results. Finally, the results presented here contribute to the use of sulphate pectins and gels with PEI in applications of biomedical interest.

Keywords: Hydrogel. Rheology. Sulphation. Pectin. Passion fruit. Poly(ethyleneimine). Poly(ethylene glycol).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE PECTINAS HOMOGALACTURONANAS CONSTITUÍDAS DE GRUPOS DE ÁCIDO GALACTURÔNICO METIL ESTERIFICADO (VERMELHO) OU NÃO (AZUL).	8
FIGURA 2. ESTRUTURA DE UMA CADEIA DE POLI(ETILENOIMINA) RAMIFICADA EM PH ÁCIDO, COM SUA UNIDADE DE REPETIÇÃO REPRESENTADA ENTRE COLCHETES, NO QUAL OS GRUPOS AMINA NÃO SE ENCONTRAM PROTONADOS.	10
FIGURA 3. REAÇÃO DE SULFATAÇÃO QUÍMICA NOS GRUPAMENTOS HIDROXILA PRESENTES NA PECTINA.	12
FIGURA 4. PERFIL CROMATOGRÁFICO (HPSEC) PARA A (A) PCM, (B) PCS1.1 E PCS1.2, (C) PCS2 E PCS3. A LINHA SÓLIDA É REFERENTE AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E A LINHA TRACEJADA AO DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ (LS).	22
FIGURA 5. ESPECTRO DE TRANSMITÂNCIA POR NÚMERO DE ONDA DA ANÁLISE DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA PARA A PECTINA DO MARACUJÁ E PECTINAS SULFATADAS.	24
FIGURA 6. SCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS COMPARANDO AS AMOSTRAS DE PECTINA, DO MARACUJÁ E SULFATADAS.	26
FIGURA 7. LOADINGS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS COMPARANDO AS AMOSTRAS DE PECTINA, DO MARACUJÁ E SULFATADAS, EM RELAÇÃO AO EIXO PC1.	26
FIGURA 8. LOADINGS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS COMPARANDO AS AMOSTRAS DE PECTINA, DO MARACUJÁ E SULFATADAS, EM RELAÇÃO AO EIXO PC2.	27
FIGURA 9. MAPA DE CORRELAÇÃO 2D DE ^1H E ^{13}C – HSQC EM D_2O A 60°C PARA A PECTINA DO MARACUJÁ.	29
FIGURA 10. ESPECTRO DE RMN ^1H PARA PCM, PCS1.1, PSC1.3, PSC2, PCS3 E PCS4 EM D_2O A 60°C	31
FIGURA 11. VARREDURA DE pH (3 A 8) POR POTENCIAL ZETA PARA AS AMOSTRAS DE PCM E PCS1.3.	32
FIGURA 12. CURVA DE TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DE PH EM FUNÇÃO DE VOLUME DE ADIÇÃO DE NAOH PARA AS AMOSTRAS DE PCM E PCS1.3 A 25°C	34
FIGURA 13. GRÁFICO DE HUGGINS, DE VISCOSIDADE ESPECIFICA POR CONCENTRAÇÃO (mL mg^{-1}) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (mg mL^{-1}), PARA PCM E PCS1.3 DISPERSAS EM ÁGUA A 25°C	36
FIGURA 14. GRÁFICOS DE HUGGINS, DE VISCOSIDADE ESPECIFICA POR CONCENTRAÇÃO (mL mg^{-1}) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (mg mL^{-1}), PARA PCM DISPERSA EM TAMPÃO PBS A 25°C (A) E 37°C (B).	39

FIGURA 15. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA A PECTINA DO MARACUJÁ NÃO MODIFICADA (PCM) DISPERSAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES A 25°C.	42
FIGURA 16. GÉIS SECOS DE PCM OU PCS2, PEI 25 OU PEI 1,3 E PEG.	44
FIGURA 17. GÉIS HIDRATADOS E SECOS DE PCM, PEI 25 OU PEI 1,3, COM PEG.	45
FIGURA 18. INFRAVERMELHO PARA AS AMOSTRAS DE HIDROGÉIS 1 A 8.....	46
FIGURA 19. INFRAVERMELHO PARA AS AMOSTRAS DE HIDROGÉIS 15 A 18..	46
FIGURA 20. CURVA DE AMPLITUDE PARA A AMOSTRA DE HIDROGEL PCM 1,0% PEI 25 0,4% PEG 0,4% A 25°C.....	47
FIGURA 21. CURVA DE AMPLITUDE PARA A AMOSTRA DE HIDROGEL PCM 1,0% PEI 1,3 0,4% PEG 0,4% A 25°C.....	48
FIGURA 22. CURVA DE CREEP AND RECOVERY PARA A AMOSTRA DE HIDROGEL PCM 1,0% PEI 25 0,4% PEG 0,4% A 25°C.....	49
FIGURA 23. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, COM 200 VEZES DE AUMENTO, DA PECTINA DO MARACUJÁ (A) PCM E AS PECTINAS SULFATADAS (B) PCS1.1, (C) PCS1.2, (D) PCS1.3, (E) PCS2 E (F) PCS3.	51
FIGURA 24. MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA PARA HIDROGÉIS DE (A;B) PCM (0,98%) PEI 25 (0,41%); (C;D) PCM (0,79%) PEI 25 (0,48%); (E;F) PCM (0,98%) PEI 1,3 (0,40%); (G;H) PCM (0,80%) PEI 1,3 (0,48%). AUMENTO DE 200 VEZES À ESQUERDA E 2000 VEZES À DIREITA.....	52
FIGURA 25. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS HIDROGÉIS DE (A; B) PCS1.1(1,00%) PEI 25 (0,40%); (C; D) PCS1.1(0,80%) PEI 25 (0,48%); (E; F) PCS1.1(0,98%) PEI 1,3 (0,41%); (G; H) PCS1.1 (0,80%) PEI 1,3 (0,48%). AUMENTO DE 200 VEZES À ESQUERDA E 2000 VEZES À DIREITA.	53
FIGURA 26. MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA PARA HIDROGÉIS DE (A; B) PCM (1,03%) PEI 25 (0,41%) PEG (0,44%); (C; D) PCM (0,96%) PEI 1,3 (0,44%) PEG (0,42%); (E; F) PCM (0,78%) PEI 25 (0,42%) PEG (0,47%) E (G; H) PCM (0,81%) PEI 1,3 (0,42%) PEG (0,44%). AUMENTO DE 200 VEZES À ESQUERDA E 2000 À DIREITA.	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. AMOSTRAS DE PECTINA DO MARACUJÁ SULFATADAS E SUAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO.....	13
TABELA 2. VALORES DE PKA PARA AS AMOSTRAS PCM E PCS1.3 PERANTE AS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO EMPREGADAS.	33
TABELA 3. VALORES DE POTENCIAL ZETA, PH E TEMPERATURA PARA MEDIDAS PONTUAIS DAS AMOSTRAS DE PECTINA DO MARACUJÁ E PECTINAS SULFATADAS.	35
TABELA 4. VISCOSIDADE INTRÍNSECA $[\eta]$, COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DA RETA (R^2), CONSTANTE DE HUGGINGS (K_H) E CONCENTRAÇÃO DE CRÍTICA (C^*) PARA PCM A 25°C E 37°C.....	38
TABELA 5. VALORES DE ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (PDI), RAIOS HIDRODINÂMICOS (R_H) E COEFICIENTE DE DIFUSÃO (D) PARA AS AMOSTRAS PCM, PCS1.3 E PCS4 EM ÁGUA E EM PBS A 25°C.	41

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AP	Apiogalacturonanas
ATR	Refletância Total Atenuada
c	Concentração
c*	Concentração de crítica
DMF	N, N-dimetilformamida
DNA	Ácido desóxiribonucleico
Dn/dc	Incremento do índice de refração com a concentração
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
GalA	Ácido galacturônico
GM	Grau de metil esterificação
HG	Homogalacturonanas
HM	<i>High methoxyl</i>
HPSEC	Cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance
K _H	Constante de Huggins
LM	<i>Low methoxyl</i>
LS	Espalhamento de luz laser
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
η_{red}	Viscosidade reduzida
η_r	Viscosidade relativa
η_{sp}	Viscosidade específica
[η]	Viscosidade intrínseca
PC1	Primeira componente principal
PC2	Segunda componente principal
PCA	Análise de componentes principais
PCM	Pectina do maracujá
PCS	Pectina do maracujá modificada
PEG	Poli(etilenoglicol)
PEI	Poli(etilenoimina)
PEI-Lac	Poli(etilenoimina) modificada com lactose

pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de ionização ácida
PVA	Poli(acetato de vinila)
Rg	Raio de giro
R _H	Raio hidrodinâmico
RGI	Ramnogalacturonanas do tipo I
RGII	Ramnogalacturonanas do tipo II
RI	Índice de refração
RMN	Ressonância magnética nuclear
TMSP	Ácido trimetilsilil propiônico
XGA	xilogalacturonanas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1. OBJETIVOS	6
1.1.1. Objetivo geral	6
1.1.2. Objetivos específicos	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1.1. POLIELETRÓLITOS	7
1.2. PECTINAS	7
1.3. POLI (ETILENOIMINA)	10
1.4. HIDROGÉIS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. MATERIAIS.....	11
3.2. MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO DA PECTINA DO MARACUJÁ	12
3.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	14
3.3.1. Cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance	14
3.3.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	15
3.3.3. Análise de componentes principais	15
3.3.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	15
3.3.5. Potencial zeta.....	16
3.3.6. Titulação para determinação da constante de ionização ácida	16
3.3.7. Espalhamento de luz dinâmico	17
3.3.8. Viscosimetria capilar	17
3.3.9. Reometria rotacional e oscilatória das dispersões	19
3.4. MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS HIDROGÉIS	19
3.5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	20
3.5.1. Teste de inclinação do tubo	20
3.5.2. Microscopia eletrônica de varredura	20
3.5.3. Reometria dos hidrogéis	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. ESTUDO DAS PROPRIEDADES MOLECULARES, QUÍMICAS E FÍSICO- QUÍMICAS DAS PECTINAS	21
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE PECTINA E POLI(ETILENOIMINA).....	43

5. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57
ANEXO - Material Complementar	64

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país nativo bem como o maior produtor de maracujá (*Passiflora* spp.) do mundo, fornecendo aproximadamente 64% da produção mundial no triênio de 2015 a 2017 (FAO, 2018). A colheita de maracujá no país atingiu 593.429 toneladas em 2019 e prevê-se o crescimento de 3% da produção ao ano (FAO, 2018; IBGE, 2019). Grande parte desta produção é destinada à indústria de sucos e geleias, que durante o processamento do maracujá realiza a extração da polpa, e descarta a casca, as sementes e o mesocarpo, que geram em torno de 60 a 75% de resíduos (CANTERI et al., 2010; MUNHOZ et al., 2018). Buscam-se alternativas para o desenvolvimento de produtos úteis e de alto interesse econômico baseados nestes resíduos industriais (CANTERI et al., 2010; MUNHOZ et al., 2018). Dentre as estratégias de reutilização dos resíduos encontram-se a extração (DE SOUZA et al., 2018; DI DONATO et al., 2020) e aplicação da pectina (PCM), proveniente da polpa e casca do maracujá.

As substâncias pécticas apresentam diversas propriedades benéficas à saúde (MARENDA et al., 2019), como efeitos antimicrobianos, antitumorais, anti-inflamatórios (LECLERE et al., 2016), analgésicos (MZOUGHFI et al., 2018), gastroprotetores (CORRÊA-FERREIRA et al., 2018; ABOUD et al., 2019) e atividade hipolipidêmica (ZAID et al., 2019), além de atuarem como agentes emulsificantes (JIANG et al., 2020; LIU; GUO; MENG, 2020), estabilizantes e antioxidantes (DOS REIS et al., 2018). Devido às propriedades supracitadas, biocompatibilidade, baixo custo e principalmente, abundância de matéria prima em nosso país, a pectina, mais especificamente a pectina extraída do maracujá, é particularmente interessante ao mercado mundial e à nossa economia.

Dentre as possíveis aplicações a pectina apresenta destaque como matéria prima para a produção de hidrogéis, visto que apresenta propriedade de gelificação (KATO et al., 2019; KOCAAGA et al., 2019; MEHRALI et al., 2019; SHAHZAD et al., 2019; THAKUR et al., 2019). Investiga-se a utilização de hidrogéis de pectina para encapsulamento tridimensional e entrega direcionada de células-tronco (MEHRALI et al., 2019), hidrogéis injetáveis para engenharia de tecidos (GHORBANI; NEZHAD-MOKHTARI; MAHMOODZADEH, 2021). Mais especificamente, os modelos tridimensionais de crescimento celular vem sendo estudados nos últimos anos e são de grande interesse, visto que estes materiais apresentam a função de mimetizar o organismo vivo, promovendo maior confiabilidade aos resultados obtidos nestes sistemas (GHORBANI; NEZHAD-MOKHTARI; MAHMOODZADEH, 2021).

Os hidrogéis utilizados como modelos tridimensionais de crescimento celular devem oferecer resistência e um ambiente mecânico adequado para apoiar a migração, diferenciação e proliferação celular, boa porosidade, baixa imunogenicidade e adesão. (GHORBANI; NEZHAD-MOKHTARI; MAHMOODZADEH, 2021). A pectina, por ser não imunogênica é interessante a esta aplicação, porém seu uso é limitado por conta de suas propriedades reológicas ruins (GHORBANI; NEZHAD-MOKHTARI; MAHMOODZADEH, 2021). Na área de produção de hidrogéis é comum a combinação de um ou mais polímeros com o intuito de aprimorar a gelificação e obter géis mais resistentes. Estudos demonstram a associação da pectina a outros polímeros, como a quitosana (BOMBALDI DE SOUZA et al., 2019; LONG et al., 2019), nanogéis de quitosana (SHITRIT; DAVIDOVICH-PINHAS; BIANCO-PELED, 2019), nanocristais de celulose (ABITBOL et al., 2021), nanocelulose (CERNENCU et al., 2019), gelatina e carboximetil celulose (JANTRAWUT et al., 2019), metacrilato (PETTINELLI et al., 2019), colágeno e glucomanana (GHORBANI; NEZHAD-MOKHTARI; MAHMOODZADEH, 2021), dentre outros.

A poli(etilenoimina) (PEI) é um polímero sintético, hidrossolúvel, que possui alta densidade de grupos amino, os quais podem ser protonados em solução aquosa, e a tornam um polieletrólito catiônico (HÖBEL et al., 2011; WEN et al., 2013). A PEI, por apresentar boa interação de seus grupos amino com os grupamentos fosfato do DNA e altas taxas de transfecção gênica, tem sido amplamente utilizada em estudos nos campos da biologia e da medicina (HÖBEL et al., 2011; RICHTER et al., 2010; WEN et al., 2013). Seu uso nas áreas anteriormente citadas muitas vezes é na forma modificada, reticulada ou então complexada com outras moléculas, visto que diminui a citotoxicidade ocasionada pela alta quantidade de grupos amino protonados (APPELHANS et al., 2009; GAO et al., 2010; HÖBEL et al., 2011; WEN et al., 2013; ZHANG, Ying et al., 2018; ZHAO et al., 2019).

Espera-se observar boa interação dos grupamentos amino da PEI com os carboxilato na pectina, por consequência, a formação de géis com boas características mecânicas para a aplicação proposta e também a redução da citotoxicidade da PEI.

Por conta da baixa resistência mecânica apresentada pela pectina, optou-se por adicionar o poli(etilenoglicol). O poli(etilenoglicol) (PEG) é um polímero sintético, biocompatível e não tóxico, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para administração (DIMITROV; TSVETANOV, 2012; ZALIPSKY; HARRIS, 1997). Os poli(etilenoglicóis) de baixa massa molar são cristalinos, assumindo uma conformação

helicoidal, e apresentam propriedades termoplásticas, atuando como plastificante nos hidrogéis em questão (DIMITROV; TSVETANOV, 2012; ZALIPSKY; HARRIS, 1997).

Além da combinação com outros polímeros, técnicas de modificação da pectina, como a sulfatação, tem o intuito de aumentar a resistência do gel e melhorar a interação com outras cadeias, além de melhorar as propriedades biológicas referenciadas e proporcionar a incorporação da propriedade de agente anticoagulante (CHEN, Jun et al., 2015; CHEN, Ling; HUANG, 2019; KASTNER; EINHORN-STOLL; DRUSCH, 2019; WANG, Xiaomei et al., 2013). A sulfatação é uma estratégia de modificação dos grupos hidroxila presentes nas cadeias poliméricas por grupos sulfato (CHEN, Jun et al., 2015; CHEN, Ling; HUANG, 2019; WANG, Xiaomei et al., 2013).

Esta pesquisa propõe a sulfatação e caracterização da pectina extraída do maracujá amarelo e derivados, a fim de desenvolver e caracterizar hidrogéis compostos de pectina (modificada e não modificada), poli (etilenoimina) e poli (etilenoglicol), com a hipótese de preparar hidrogéis de boas propriedades reológicas para futuras aplicações.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Compreender a influência de pectinas sulfatadas e não sulfatada no comportamento de gelificação de hidrogéis com poli (etilenoimina) e poli(etileno glicol).

1.1.2. Objetivos específicos

- Modificar a pectina do maracujá por sulfatação, buscando a melhoria de suas propriedades de gelificação;
- Caracterizar quimicamente a pectina, não sulfatada e sulfatada, a fim de confirmar e determinar sua composição, respectivamente, estrutura química e grau de metil esterificação;
- Estudar as pectinas, sulfatadas e não sulfatada, em dispersão, avaliando a sua conformação, exposição dos grupamentos ionizáveis e comportamento de fluxo;
- Produzir hidrogéis a partir de pectina (sulfatada e não sulfatada) e poli (etilenoimina), variando-se a proporção dos polímeros e a massa molar da poli (etilenoimina);

- Investigar a utilização do poli(etileno glicol) nos hidrogéis como plastificante;
- Analisar as propriedades viscoelásticas e morfológicas dos hidrogéis;
- Compreender as interações que proporcionam a formação das redes tridimensionais dos hidrogéis em questão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. POLIELETRÓLITOS

Os polieletrólitos são uma classe de polímeros que apresentam cargas em suas cadeias, as quais são derivadas de grupos ionizáveis, e por isso apresentam ampla variedade de estruturas e boas propriedades físico-químicas (DOBRYNIN, 2020; KRONBERG; HOLMBERG; LINDMAN, 2014). Os grupos ionizáveis podem apresentar caráter negativo, como a carboxila (COO^-) ou sulfonato (SO_3^-), ou caráter positivo como os grupos amônio (NH_3^+) e, dependendo do grupo que o polieletrólito possui pode ser classificado como aniônico ou catiônico, respectivamente, ou ainda como anfótero, caso apresente ambos os tipos de grupos (KRONBERG; HOLMBERG; LINDMAN, 2014).

Os polieletrólitos atraem grande atenção por conta de sua densidade de carga ajustável conforme o pH, força iônica, temperatura e reticulação, o que os torna interessantes para o desenvolvimento de materiais estímulo responsivos (YUAN et al., 2020). Além disso, por conta de suas cargas a sua conformação também se torna ajustável, o que afeta diretamente a sua viscosidade e a forma como esses polímeros podem interagir com outros materiais (YUAN et al., 2020).

Os polieletrólitos se apresentam em ampla variedade e exibem, de maneira geral, aplicações nas diversas indústrias (cosmética, alimentícia e tintureira) como espessantes, auxiliares de floculação (SHAIKH et al., 2017; VAN HAVER; NAYAR, 2017), aditivos para controle reológico (KRONBERG; HOLMBERG; LINDMAN, 2014; SHAIKH et al., 2017), além de serem empregados como materiais na indústria médica para entrega controlada de fármacos (WU et al., 2020), peptídeos antimicrobianos (BORRO; MALMSTEN, 2019), materiais injetáveis (SHITRIT; DAVIDOVICH-PINHAS; BIANCO-PELED, 2019) dentre muitas outras aplicações.

1.2. PECTINAS

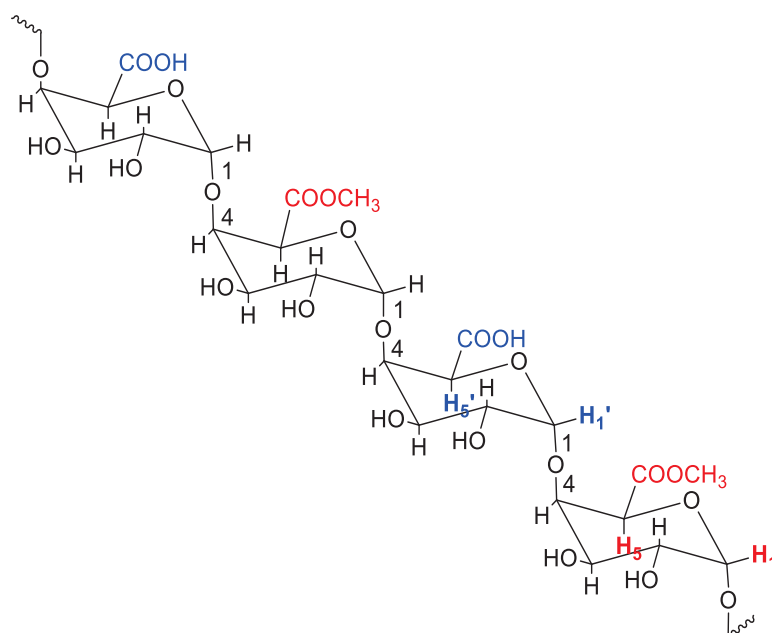
A pectina (PC) é um heteropolissacarídeo aniônico presente nas paredes celulares primárias das plantas, principalmente em frutos e plantas fibrosas (KLINCHONGKON; KHUWIJITJARU; ADACHI, 2018; MARENDA et al., 2019). Dependendo da origem da

pectina, do estágio de desenvolvimento do fruto ou da planta e do método de extração utilizado, pode apresentar diferenças em suas características e propriedades químicas como a massa molar, a configuração química e a presença de diferentes açúcares neutros (FLUTTO, 2003; KASTNER; EINHORN-STOLL; DRUSCH, 2019).

Os polissacarídeos pécticos apresentam alto teor de ácido galacturônico (GalA) e podem ser distintos em cinco classes: homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas do tipo I (RGI) e do tipo II (RGII), xilogalacturonanas (XGA) e apiogalacturonanas (AP) (BREJNHOLT, 2009; FLUTTO, 2003; MARENDA et al., 2019; WOLF; MOUILLE; PELLOUX, 2009).

As pectinas do tipo homogalacturonanas (FIGURA 1), aqui enfatizadas, apresentam cadeias nas quais os grupos de ácidos D-galacturônicos encontram-se ligados covalentemente por ligações 1,4 glicosídicas (BREJNHOLT, 2009; FLUTTO, 2003). Estas cadeias são parcialmente esterificadas e são classificadas quanto ao seu grau de metil esterificação, sendo divididas em dois grupos, alto grau de metil-esterificação (HM) e baixo grau de metil-esterificação (LM), em que apresentam porcentagem superior a 50% e inferior a 50%, respectivamente (BREJNHOLT, 2009; EINHORN-STOLL, 2018; FLUTTO, 2003).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE PECTINAS HOMOGALACTURONANAS CONSTITUÍDAS DE GRUPOS DE ÁCIDO GALACTURÔNICO METIL ESTERIFICADO (VERMELHO) OU NÃO (AZUL).



FONTE: O AUTOR, 2021.

As hidroxilas e carboxilas presentes na estrutura molecular da pectina a tornam um composto altamente hidrofílico, o que propicia à pectina alta absorção de água (GUO;

KALETUNÇ, 2016). Dessa maneira, os pós de pectina comerciais são altamente higroscópicos e adsorvem o vapor da água presente no ambiente, o que leva a aglomerações e endurecimento e afetam a capacidade de umedecimento, dispersão e solubilização (EINHORN-STOLL, 2018). Ainda, o armazenamento da pectina em temperaturas acima de 50°C e em ambiente com a umidade do ar superior a 60%, pode resultar em degradação química (EINHORN-STOLL, 2018).

A origem da palavra "pectina" vem do grego *pektos*, que significa firme e dura, representando sua capacidade de formar géis (BARBOSA et al., 2019; FLUTTO, 2003). Antes da gelificação, quando as carboxilas se encontram desprotonadas suas cargas negativas contribuem para uma conformação estendida, visto que há alta repulsão intramolecular, então, nesta condição a formação de redes de hidrogéis são favorecidas (GUO; KALETUNÇ, 2016).

A gelificação da pectina e a resistência do gel aumentam, normalmente, com o aumento da massa molar do polímero (BREJNHOLT, 2009). Além disso, o grau de metil-esterificação interfere no mecanismo de gelificação. Além da sua utilização para produção de géis, é bastante utilizada nas indústrias alimentícia, farmacêutica, nutracêutica e cosmética como estabilizante e emulsionante (BREJNHOLT, 2009; MARENDA et al., 2019).

A pectina é um polieletrólito fraco que apresenta sua ionização dependente do pH em solução. Quando o pH se encontra acima do pKa, os grupos carboxilas tendem a se ionizar, aumentando a concentração de COO⁻ e decrescendo a concentração de COOH (BARBOSA et al., 2019). Estes grupos ionizados geram uma carga na pectina que pode ser descrita pelo potencial zeta, uma vez que sua superfície representa o potencial elétrico no plano de cisalhamento, e conforme ocorre o aumento da ionização ocorre também um aumento proporcional no potencial zeta (BARBOSA et al., 2019). De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 1), o pKa de um ácido fraco corresponde ao pH no qual a concentração do ácido fraco ([HA]) é igual à concentração da base conjugada ([A⁻]). A ionização máxima da pectina é atingida no valor mais negativo de potencial zeta, quando [COO⁻] é máximo, assim, uma concentração igual do COO⁻ à concentração de COOH é atribuída à metade do valor mais negativo de potencial zeta, e o pH correspondente do meio corresponderá ao pKa da pectina (BARBOSA et al., 2019).

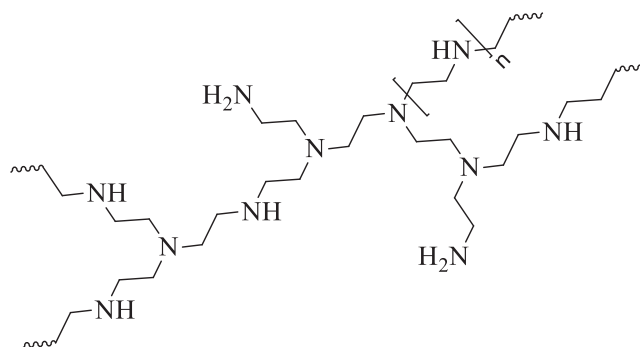
$$pH = pKa - \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Equação 1}$$

1.3.POLI (ETILENOIMINA)

A poli (etilenoimina) (PEI) é um polímero sintético, solúvel em água, que apresenta alta densidade de aminas em suas cadeias, o que a torna um polieletrólito catiônico (HÖBEL et al., 2011; WEN et al., 2013). Sua capacidade de formação de complexos com DNA, por conta da atração eletrostática com os grupos fosfato (PO_4^{3-}) presentes no DNA, alta eficiência de transfecção gênica e proteção do DNA contra nucleases em meio celular a tornou foco de muitos estudos nos campos da biologia e da medicina, principalmente na produção de nanocarreadores e agentes de diagnóstico por imagem (RICHTER et al., 2010; HÖBEL et al., 2011; WEN et al., 2013; JIANG, Xinguo; GAO, 2016).

A PEI pode apresentar cadeias lineares ou ramificadas, as quais são obtidas com base em diferentes sínteses (JIANG, Xinguo; GAO, 2016). A diferença entre as cadeias lineares e ramificadas é dada pelos diferentes grupos amino, visto que a PEI linear apresenta somente aminas primárias e secundárias, enquanto a PEI ramificada apresenta também aminas terciárias (JIANG, Xinguo; GAO, 2016). A PEI ramificada (FIGURA 2) vem sendo amplamente utilizada, em relação a PEI linear, visto que apresenta maior biocompatibilidade (JIANG, Xinguo; GAO, 2016).

FIGURA 2. ESTRUTURA DE UMA CADEIA DE POLI(ETILENOIMINA) RAMIFICADA EM PH ÁCIDO, COM SUA UNIDADE DE REPETIÇÃO REPRESENTADA ENTRE COLCHETES, NO QUAL OS GRUPOS AMINA NÃO SE ENCONTRAM PROTONADOS.



FONTE: O AUTOR, 2021.

1.4.HIDROGÉIS

Os hidrogéis são uma classe de materiais que apresenta um arranjo molecular tridimensional, comumente produzidos com polímeros hidrofílicos que se encontram reticulados, o que permite ampla hidratação e absorção de fluidos biológicos sem ocorrer dissolução (GUO; KALETUNÇ, 2016; WANG, Li et al., 2018; MEHRALI et al., 2019).

Durante a absorção de água, os grupos hidrofílicos dos polímeros assumem um estado hidratado, o que provoca um distanciamento entre as cadeias poliméricas, e assim o aumento do volume ocupado pelo hidrogel (PEPPAS et al., 2000; HOFFMAN, 2002). O hidrogel incha até o equilíbrio e caracteriza o equilíbrio de intumescimento (PEPPAS et al., 2000).

A reticulação das cadeias poliméricas pode ocorrer por agentes químicos ou físicos. A reticulação química consiste na formação de ligações covalentes ou iônicas entre as cadeias poliméricas, formando hidrogéis denominados de permanentes ou químicos (HOFFMAN, 2002). Já a reticulação física consiste em unir as cadeias poliméricas a partir de emaranhamento e/ou forças secundárias, ligações de hidrogênio ou de van der Waals, assim, estes hidrogéis são denominados de reversíveis ou físicos (HOFFMAN, 2002). Os íons Ca^{2+} são comumente utilizados como agentes de reticulação (HOFFMAN, 2002; WOLF; MOUILLE; PELLOUX, 2009; WANG, Li et al., 2018; KATO et al., 2019). Este agente interage com os grupos carboxilato presente nas unidades de ácido galacturônico não metil-esterificado, promovendo a formação da chamada estrutura modelo 'caixa de ovos', que induz e fortalece a formação do gel (WOLF; MOUILLE; PELLOUX, 2009; KATO et al., 2019).

Por conta de sua alta biocompatibilidade, os hidrogéis vem sendo largamente utilizados na engenharia de tecidos. Uma aplicação que vem ganhando grande visibilidade nos últimos estudos é a produção de hidrogéis que mimetizem os tecidos humanos em termos de estrutura, função e desempenho (WANG, Li et al., 2018; MEHRALI et al., 2019; YE; CHANG; ZHANG, 2019). Sua similaridade com a matriz extracelular os torna modelos tridimensionais adequados para confinar e sustentar células, possibilitando o crescimento de diferentes tipos de células (TURETTA et al., 2018; WANG, Li et al., 2018).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

A pectina utilizada foi extraída da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) (PCM), fornecida e previamente caracterizada pelo grupo da Profa. Dra. Lucimara Mach Côrtes Cordeiro, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR (ABBOUD et al., 2019, 2020).

As poli (etilenoiminas) (PEI) com diferentes massas molares (1.300 g mol^{-1} e $25.000 \text{ g mol}^{-1}$) foram adquiridos da Sigma Aldrich® e o poli (etilenoglicol) (PEG) de massa molar 4.000 g mol^{-1} , foi adquirido da Biotec. Os hidrogéis foram preparados em água ultrapura

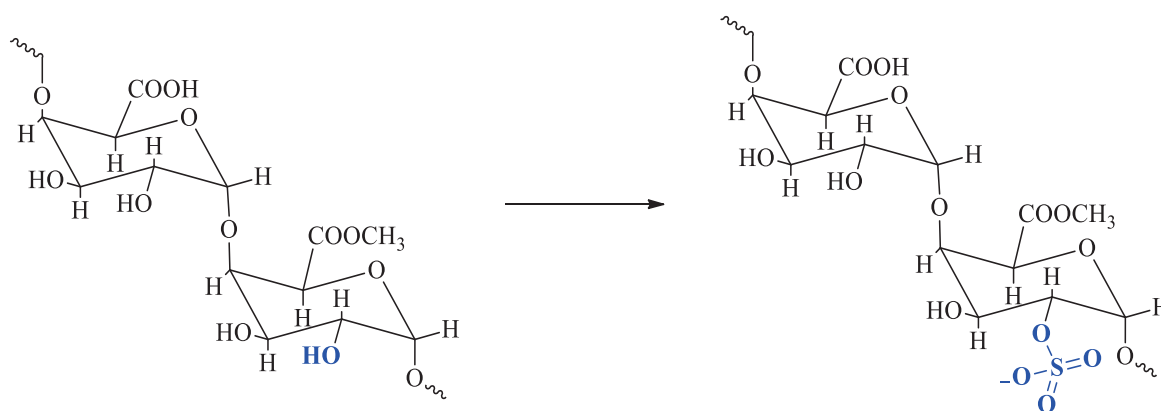
com resistividade controlada em 18,2 MΩ cm, purificada pelo sistema PURELAB Flex 3 (ELGA LabWater).

Os demais reagentes utilizados foram: N, N-dimetilformamida (Nuclear), ácido sulfúrico (Biotec), ácido clorídrico (Nuclear), água deuterada 99,9% (Sigma Aldrich), carbonato de cálcio PA (Neon), hidróxido de sódio (Biotec), complexo SO₃-piridina (Sigma Aldrich), biftalato de potássio (Êxodo Científica).

3.2. MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO DA PECTINA DO MARACUJÁ

Na sulfatação, parte dos grupos hidroxila, presentes na pectina são substituídos por grupos sulfato em solvente aprótico formando um sulfonato de pectina (FIGURA 3) (CHAOUCH et al., 2018; CHEN, Jun et al., 2015; CHEN, Ling; HUANG, 2019; KASTNER; EINHORN-STOLL; DRUSCH, 2019; WANG, Xiaomei et al., 2013). Esta estratégia tem o intuito de melhorar as características de formação de géis, visto que proporcionam grupos capazes de formar reticulações com outras estruturas.

FIGURA 3. REAÇÃO DE SULFATAÇÃO QUÍMICA NOS GRUPAMENTOS HIDROXILA PRESENTES NA PECTINA.



FONTE: O AUTOR, 2021.

Realizou-se uma adaptação do procedimento descrito por Larm et al. (1979)(ROMÁN et al., 2017). Preparou-se o agente de sulfatação (SO₃.DMF) pela adição de 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 12 mL de N, N-dimetilformamida (DMF) sob resfriamento em banho de gelo. Misturou-se 0,2 g de pectina do maracujá (PCM) a 16 mL de N,N-dimetilformamida a 45°C, sob agitação. Após 30 min, adicionaram-se 2 mL, 2,5 mL ou 3 mL do agente de sulfatação às diferentes misturas e as manteve-se sob agitação durante 23 horas a 45°C. Em seguida, neutralizou-se a reação para pH próximo de 7, utilizando papel universal para conferência, com solução de carbonato de cálcio 5% (m/V). Dialisou-se o

produto contra água Milli-Q, até que a água de diálise atingisse condutividade similar à da água ultrapura, com membrana de diálise Spectra/Por[®] 6, MWCO = 12.000 a 14.000 g mol⁻¹. Por fim, liofilizou-se o produto.

Realizou-se também a modificação proposta por Larm et al. (1979) nas condições ótimas de reação descritas por Román et al. (2016), no qual se utiliza o complexo SO₃-piridina como agente de sulfatação. Uma quantidade de pectina do maracujá foi dispersa em N, N- dimetilformamida por 16 horas com agitação vigorosa. Em seguida, preparou-se uma solução de complexo SO₃-piridina em N, N- dimetilformamida e adicionou-se à dispersão de polissacarídeo. Utilizou-se uma razão molar do agente de sulfatação para o grupo hidroxila no polissacarídeo (η SO₃-piridina / OH) de 18 e uma razão do volume total da reação para o peso da amostra (V_T / p ; $\mu\text{L mg}^{-1}$) de 100. A reação foi mantida em agitação durante 6 horas a 25°C. Posteriormente, a reação foi interrompida e neutralizada, a pH 7,0, com uma solução aquosa de carbonato de cálcio 10 % (m/V) e o produto dialisado contra água deionizada, até que a água de diálise atingisse condutividade similar à da água ultrapura, com membrana de diálise Spectra/Por[®] 6, MWCO = 12.000 a 14.000 g mol⁻¹. O material foi então concentrado e liofilizado.

As amostras produzidas e suas proporções estão expressas na TABELA 1. As amostras PCS1.1, PCS1.2, PCS2 e PCS3 foram produzidas inicialmente em menor escala com intuito de avaliar a efetividade da reação. Em seguida, modificou-se a pectina e obteve-se a amostra PCS1.3 em maior escala e por conta disso esta amostra foi utilizada para análises que requeriam maior massa. Além disto a modificação desta amostra foi realizada em atmosfera inerte, com intuito de avaliar se haveria maior grau de modificação nas amostras. Por fim, realizou-se a modificação proposta por Larm et al. (1979) e obteve-se a amostra PCS4.

A nomenclatura das amostras é compreendida da seguinte forma: as letras PC são referentes a pectina, M a maracujá e S a sulfatada. Os números estão relacionados a relação de massa de pectina e volume de agente de sulfatação, sendo que 1 para relação 1:10, 2 para relação 1:12,5 e 3 para a relação 1:15. Por fim, o número 4 está relacionado a amostra modificada pela proposta de Larm et al. (1979).

TABELA 1. AMOSTRAS DE PECTINA DO MARACUJÁ SULFATADAS E SUAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO.

Parâmetros Amostra	Massa de PCM (g)	Volume de SO ₃ DMF (mL)	Relação Massa: Volume
-----------------------	---------------------	---------------------------------------	--------------------------

PCS1.1	0,201	2,0	1:10
PCS1.2	0,403	4,0	1:10
PCS1.3	3,002	30,0	1:10
PCS2	0,200	2,5	1:12,5
PCS3	0,205	3,0	1:15
	Massa de PCM (g)	Massa de SO₃-py (g)	Razão molar SO₃-piridina:OH
PCS4	3,0153	0,0888	18

FONTE: O AUTOR, 2021.

3.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

3.3.1. Cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance

As análises pela técnica de cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC) foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, em cromatógrafo equipado com detector de índice de refração diferencial (RI), modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz laser com multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais acoplados em série. Utilizaram-se quatro colunas de gel permeação ultrahidrogel WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 g mol⁻¹, 4×10^5 g mol⁻¹, 8×10^4 g mol⁻¹ e 5×10^3 g mol⁻¹.

Para as análises de homogeneidade preparam-se as amostras de pectina (1 mg mL⁻¹) no eluente composto de uma solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO₂) (0,1 mol L⁻¹) contendo azida de sódio (NaN₃) (8×10^{-3} g mol⁻¹). Em seguida filtrou-se em filtro Millipore de porosidade 0,22 μm e se eluiu 0,1 mL de cada amostra à taxa de fluxo de 0,6 mL min⁻¹.

Para a determinação do incremento do índice de refração (dn/dc) preparam-se cinco dispersões de diferentes concentrações (0,2 mg mL⁻¹; 0,4 mg mL⁻¹; 0,6 mg mL⁻¹; 0,8 mg mL⁻¹ e 1,0 mg mL⁻¹) no eluente supracitado.

Para a interpretação dos dados e obtenção do incremento do índice de refração (dn/dc), dispersão (Đ), massas molares média numérica (Mn) e média ponderal (Mw), utilizou-se o *software* ASTRA versão 4.70.07 (WYATT, 1993).

3.3.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As análises foram realizadas no Departamento de Ciências Exatas e Educação da UFSC - *Campus* Blumenau em Espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer Frontier por Refletância Total Atenuada (ATR). As leituras foram realizadas a 25°C em uma janela de número de onda de 450 a 4000 cm^{-1} , a um total de 16 acumulações e resolução de 1 cm^{-1} . Utilizou-se o software OriginPro 9.2 para normalização, suavização para remoção de ruídos e ajuste de linhas de base.

3.3.3. Análise de componentes principais

Realizou-se a análise multivariada de componentes principais com intuito de confirmar a modificação da pectina, considerando a desigualdade química entre as amostras. O processamento quimiométrico foi realizado usando o software MATLAB (R2018a) pelo Prof. Dr. Frederico Luis Felipe Soares do Departamento de Química – UFPR.

3.3.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) para as amostras de pectinas (modificada e não modificadas) foram adquiridos no Centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, no Departamento de Bioquímica e Biologia Celular e no Departamento de Química em espectrofotômetros Bruker, modelo AVANCE DRX- 400MHz. As amostras foram dispersas em D_2O , em tubos de 5 mm, a concentração de 40 mg mL^{-1} . Os espectros de ^1H , ^{13}C e mapa de correlação 2D de ^1H e ^{13}C - HSQC foram adquiridos a 60°C, 4 *scans*, com ácido trimetilsilil propiônico (TMS⁺) como padrão e com pré-saturação do sinal da água dos espectros de hidrogênio.

Para o cálculo de grau de metil esterificação (GM) da pectina do maracujá utilizou-se a metodologia descrita por Grasdalen, Einar Bakoy e Larsen (1988), conforme Equação 2.

$$\text{GM} = \left(\frac{I_A - I_B}{I_A + I_B} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que I_A equivale a integral dos sinais dos hidrogênios H_1 e H_5 e I_B equivale a integral dos sinais de H_5' (FIGURA 1). Os hidrogênios H_1 e H_5 , adjacentes a carbono carboxílico metil esterificado, apresentam dois sinais em torno de 5 ppm que são próximos

e podem se sobrepor, portanto, realiza-se a integral combinada de ambos para que seja possível a quantificação do GM.

3.3.5. Potencial zeta

O potencial zeta (ζ) para as pectinas (sulfatadas e não sulfatada) foi determinado no Laboratório de Biopolímeros – Departamento de Química - UFPR em um equipamento Stabino[®] Particle Metrix GmbH Corporation.

Inicialmente preparou-se uma solução aquosa de cloreto de sódio (1 mmol L^{-1}), com intuito de manter um meio com força iônica estável, na qual as pectinas foram dispersas em uma concentração 0,1% (m/m) (GUSTAFSSON et al., 2000). As medidas para determinar um único ponto (medidas pontuais) foram realizadas sem ajuste de pH, em temperatura ambiente e duraram 5 minutos. Após essas medidas, novas medidas pontuais de dispersões 0,1% (m/m) em tampão PBS das amostras PCM, PCS1.3 e PCS4 foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano Series – Malvern, no mesmo laboratório, com temperatura controlada de 25°C.

Para a varredura de pH 3 a pH 8, preparou-se uma solução aquosa de cloreto de sódio ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) que foi utilizada posteriormente para o preparo de uma solução de hidróxido de sódio ($1,475 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). A solução foi utilizada para o preparo da dispersão de pectinas 0,1% (m/m) que alcançaram pH próximo a 7, então adicionou-se 3 gotas de solução de carbonato de sódio (5% m/m) atingindo pH próximo de 10. A titulação foi realizada com ácido clorídrico ($1,378 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), padronizado com o padrão secundário hidróxido de sódio ($9,352 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), o qual foi previamente padronizado com padrão primário biftalato de potássio (Êxodo Científica, MM: 204,22 g mol⁻¹). As titulações foram realizadas com adição de 300 μL de solução de ácido ou base com tempo de estabilização de 40 segundos.

A partir das curvas de varredura de pH por potencial zeta, da equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 1) e da metodologia proposta por Barbosa et al. (2019) determinou-se a constante de dissociação ácida (pKa) das amostras.

É importante salientar que todas as medidas supracitadas foram realizadas em triplicata, com um pistão de 400 μm e temperatura ambiente.

3.3.6. Titulação para determinação da constante de ionização ácida

As constantes de ionização ácida (pKa) das amostras de pectina do maracujá não sulfatada e sulfatada, foram determinadas a partir da técnica de titulação. Inicialmente

preparou-se uma solução de NaCl 0,001 mol L⁻¹ em água ultrapura previamente fervida para remoção de qualquer resíduo de dióxido de carbono, a partir dessa solução prepararam-se dispersões aquosas das amostras de pectina, na concentração de 0,25% (m/v). Cada titulação foi realizada utilizando-se 20 mL da dispersão supracitada como titulada, sendo o pH ajustado com aproximadamente 1,0 mL de solução padrão de HCl 1,6956 mol L⁻¹, atingindo pH próximo de 2,5. Como titulante utilizou-se uma solução de NaOH 0,0912 mol L⁻¹ previamente padronizada com biftalato de potássio. O processo de titulação foi realizado em triplicata para cada amostra a temperatura de 25°C controlada com banho termostaticado, sendo que as adições foram realizadas com 60 segundos de tempo de estabilização.

3.3.7. Espalhamento de luz dinâmico

As análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as pectinas (sulfatadas e não sulfatada) foram realizadas no Laboratório de Biopolímeros – Departamento de Química - UFPR em um equipamento Zetasizer NanoZS – Malvern Instruments and PANalytical. Preparam-se dispersões das pectinas com concentração de 0,1 mol L⁻¹, em água ou em tampão fosfato salino (0,05 mol L⁻¹ / NaCl 0,04 mol L⁻¹ - pH 7,4). As medidas foram realizadas a temperatura controlada de 25°C e 37°C em uma cubeta de poliestireno. O laser utilizado apresenta comprimento de onda de 638,8 nm e a medida foi realizada em ângulo de 173°. Para a aquisição e tratamento dos dados utilizou-se o *software* próprio do equipamento (Zeta Sizer Nano v. 3.30.) e a equação de Stokes-Einsten (Equação 3).

$$D_0 = \frac{k T}{6 \pi \eta R_H} \quad \text{Equação 3}$$

Em que D é o coeficiente de difusão, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade do solvente e R_H é o raio hidrodinâmico (ROSS-MURPHY, 1994; SUN, 2004).

3.3.8. Viscosimetria capilar

As medidas de tempo de escoamento foram realizadas em um viscosímetro Cannon-Fenske de número 75, com 0,54 mm de diâmetro do capilar. Controlou-se a temperatura de 25°C a partir de um sistema de banho termostático acoplado a um reator encamisado de vidro. Inicialmente preparou-se dispersões estoque das pectinas, em água ou em tampão fosfato salino (50 mmol L⁻¹ / NaCl 40 mmol L⁻¹ - pH 7,4), com concentração aproximada de 5,00 mg mL⁻¹. Então diluiu-se, com água ou tampão, até chegar nas concentrações de 4,00 mg mL⁻¹, 3,00 mg mL⁻¹, 2,00 mg mL⁻¹, 1,00 mg mL⁻¹, 0,80 mg mL⁻¹, 0,60 mg mL⁻¹, 0,40 mg

mL⁻¹, 0,20 mg mL⁻¹, 0,10 mg mL⁻¹, 0,08 mg mL⁻¹, 0,06 mg mL⁻¹, 0,04 mg mL⁻¹, 0,02 mg mL⁻¹ e 0,01 mg mL⁻¹. É importante ressaltar que estas medidas foram realizadas somente para as amostras de PCM e PCS1.3, por conta da quantidade necessária de amostra para a análise.

A partir dos valores de tempo de escoamento obtidos nas análises com solução tampão calcularam-se os valores de viscosidade relativa para cada uma das soluções, a partir da Equação 4.

$$\eta_{rel} = \frac{\rho_{solução} \times t_{solução}}{\rho_{solvente} \times t_{solvente}} \quad \text{Equação 4}$$

Em que η_{rel} é a viscosidade relativa, $\rho_{solução}$ é a densidade da solução, $t_{solução}$ o tempo de escoamento da solução, $\rho_{solvente}$ a densidade do solvente e $t_{solvente}$ o tempo de escoamento do solvente. Para as dispersões com regime concentrado as densidades foram medidas a partir de um balão volumétrico de 5 mL previamente calibrado. Ao trabalhar com dispersões em regime diluído leva-se em consideração que a densidade da dispersão é igual a densidade do solvente, dessa maneira, desconsidera-se a densidade e utiliza-se a Equação 5 (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

$$\eta_{rel} = \frac{t_{solução}}{t_{solvente}} \quad \text{Equação 5}$$

Com os valores de viscosidade relativa é possível determinar a viscosidade específica do polímero (Equação 6).

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad \text{Equação 6}$$

Por fim, determina-se a viscosidade reduzida a partir da razão entre a viscosidade específica e a concentração das soluções (Equação 7)

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad \text{Equação 7}$$

Utiliza-se a equação de Huggins (Equação 8) e os valores de viscosidade específica e concentração para traçar um gráfico para cada polímero. Dessa maneira, o valor da viscosidade intrínseca é equivalente ao coeficiente linear e o coeficiente angular equivale a coeficiente de Huggins da reta.

$$\frac{\eta_{esp}}{C} = [\eta] + K_H[\eta]^2 C \quad \text{Equação 8}$$

Determinou-se ainda a concentração de *overlap* (sobreposição) (Equação 9), que é equivalente ao inverso da viscosidade intrínseca. A concentração de crítica indica a concentração na qual o regime de concentração da dispersão é semi-diluído, ou seja, em que há o início da sobreposição das moléculas de polímeros na dispersão (KULICKE; CLASEN, 2004).

$$c^* = \frac{1}{[\eta]} \quad \text{Equação 9}$$

3.3.9. Reometria rotacional e oscilatória das dispersões

Os estudos reológicos foram realizados em dois equipamentos distintos. Inicialmente as análises foram realizadas no Laboratório de Catálise e Termodinâmica Aplicada (LACTA) no Departamento de Engenharia Química da UFPR, usando um viscosímetro programável Brookfield Modelo DV-III (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., EUA). Nestas análises dispersões dos polímeros poli (etilenoimina) 25.000 g mol⁻¹, poli (etilenoimina) 1.300 g mol⁻¹ e poli (etileno glicol) 4.000 g mol⁻¹, na concentração de 0,8%, foram submetidas a análises de curva de viscosidade utilizando uma geometria de cilindro concêntrico (ULA) a uma janela taxa de cisalhamento de 40 a 200 s⁻¹.

As análises das amostras de pectinas, não-sulfatada e sulfatadas, foram realizadas no Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL) – Departamento de Química – UFPR utilizando-se de um Reômetro HAAKE™, RheoStress™1, marca (Thermo Fischer) com uma geometria cone placa de titânio com 60 mm de diâmetro e 2° de angulatura (CP60/2) com um *gap* de 0,105 mm. A temperatura foi controlada por banho acoplado e mantida a 25°C. O software RheoWin 4 Data Manager foi utilizado para obter os parâmetros reológicos e estatísticos.

As varreduras de tensão foram realizadas com tensão de cisalhamento variando de 0,01 Pa a 100 Pa, sendo 20 pontos coletados durante esta variação. As varreduras de taxa de cisalhamento foram realizadas com taxa de cisalhamento aumentando de 0,1 s⁻¹ a 100 s⁻¹ e em seguida diminuindo, sendo 100 pontos coletados durante 300 segundos.

3.4. MÉTODOS DE PRODUÇÃO DOS HIDROGÉIS

Preparam-se dispersões poliméricas de pectina do maracujá (PCM) ou pectina do maracujá sulfatada (PCS), de aproximadamente 2% (m/m) cada, e de poli (etilenoimina) (PEI), para as duas massas molares (PEI 1,3 e PEI 25), e poli(etilenoglicol) (PEG) de aproximadamente 0,8% (m/m). As dispersões foram preparadas em água ultrapura, mantidas sob agitação durante 24 horas a temperatura ambiente. Em sequência, misturaram-se as dispersões em diferentes combinações e obtiveram-se novas misturas com diferentes

porcentagens (m/m), as quais foram agitadas por 30 minutos a 25°C. As misturas foram alocadas em tubos de ensaio, *ependorfs* ou placas de petri e levadas a geladeira por 14 horas a 4°C. As porcentagens obtidas serão apresentadas nos resultados.

3.5. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Os hidrogéis foram selecionados para as caracterizações com base em suas propriedades mecânicas. A avaliação foi feita a partir do teste de inclinação de tubo e os hidrogéis que apresentaram maiores viscosidades sob ação da gravidade foram estudados. A partir dos estudos físico-químicos avaliou-se o impacto das mudanças nas variáveis: proporção entre os polímeros, porcentagem de sulfatação, massa molar da PEI, quantidade e tipo de agente reticulante.

3.5.1. Teste de inclinação do tubo

Os testes de inclinação do tubo foram realizados com intuito de identificar visualmente quais amostras apresentavam formação de géis, homogeneidade e resistência mecânica, e assim, escolher os géis para continuar o estudo. Para o teste, os tubos de ensaio contendo as amostras foram inclinadas a aproximadamente 45°, 90° e 180° e foram fotografados.

3.5.2. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de pectinas e hidrogéis foram analisadas por um microscópio eletrônico de varredura modelo TESCAN VEJA 3 LMU, operando em 10 kV no Centro de Microscopia Eletrônica (CME da UFPR). Para isso, as pectinas e os hidrogéis foram secos por liofilização, formando sólidos e xerogéis. Em seguida, foram fraturados a temperatura ambiente, colados nos suportes com esmalte de carbono e cobertos com ouro em sua superfície por deposição metálica, visto que não são condutores elétricos.

3.5.3. Reometria dos hidrogéis

As análises dos hidrogéis foram realizadas no Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL) – Departamento de Química – UFPR utilizando-se de um Reômetro HAAKE™, RheoStress™1, marca (Thermo Fischer) com uma geometria cone placa de titânio com 60 mm de diâmetro e com ângulo de 2° (CP60/2) com um *gap* de 0,105 mm. A temperatura foi controlada por banho acoplado e mantida a 25°C. O software RheoWin 4 Data Manager foi utilizado para obter os parâmetros reológicos e estatísticos.

As varreduras de tensão foram realizadas em frequência constante de 1 Hz e com tensão de cisalhamento variando de 0,01 Pa a 100 Pa, sendo 20 pontos retirados durante a análise. As varreduras de *creep and recovery* foram realizadas durante 60 segundos, para cada uma das curvas, e durante este tempo foram realizadas 100 medidas. A taxa de cisalhamento para curva de *creep* foi de 0,05 Pa, já a análise de *recovery* foi de 0 Pa, ambas com *gap* de 0,105 mm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DAS PROPRIEDADES MOLECULARES, QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DAS PECTINAS

A análise de dispersão em relação as massas molares das amostras de pectina do maracujá e pectinas modificadas ocorreu através da técnica de cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC). Na técnica foram utilizados dois detectores a fim de avaliar as amostras, um detector de índice de refração diferencial (RI), que permite avaliar a homogeneidade da amostra, e um detector de espalhamento de luz laser com multiângulos (LS), que além da homogeneidade traz informações acerca da conformação e massa molar. O detector de índice de refração diferencial se trata de um refratômetro diferencial que registra a variação no índice de refração entre as duas correntes de eluente, com e sem a dispersão de polímero (WILLIAMS, 1970). Já o detector de espalhamento de luz incide uma luz laser na amostra, que está dispersa no eluente. Parte desta radiação incidida é espalhada pela amostra e a intensidade deste espalhamento varia com o tamanho das partículas, possibilitando assim a determinação das massas molares média numérica e média ponderal, além de prever sua conformação (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

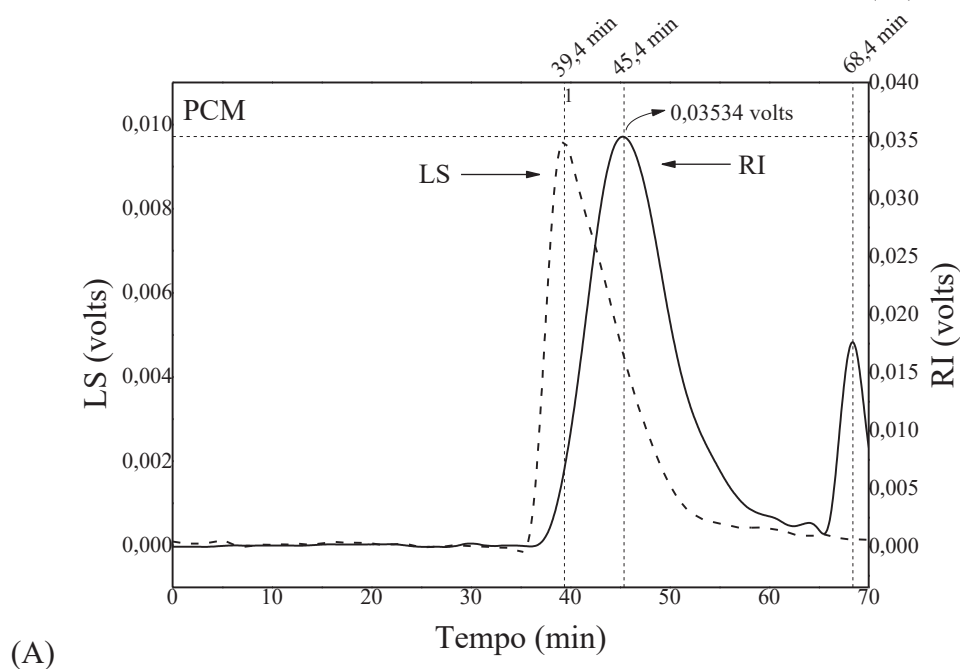
Para as análises de homogeneidade ambos os detectores, RI e LS, foram utilizados. Observa-se que todos os perfis cromatográficos (FIGURA 4) apresentam um único pico de acordo com o detector de espalhamento de luz (tracejado) e o detector de índice de refração (linha sólida). A população apresenta heterogeneidade, visto que cada ponto de tempo de eluição é atrelado a uma diferente massa molar e o pico apresentar a base do pico larga.

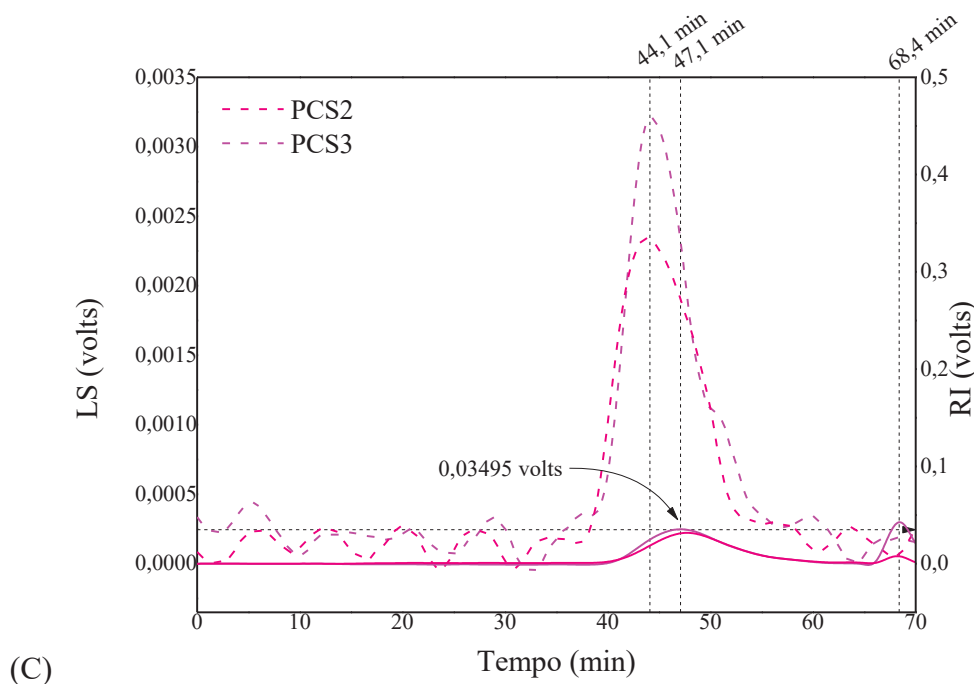
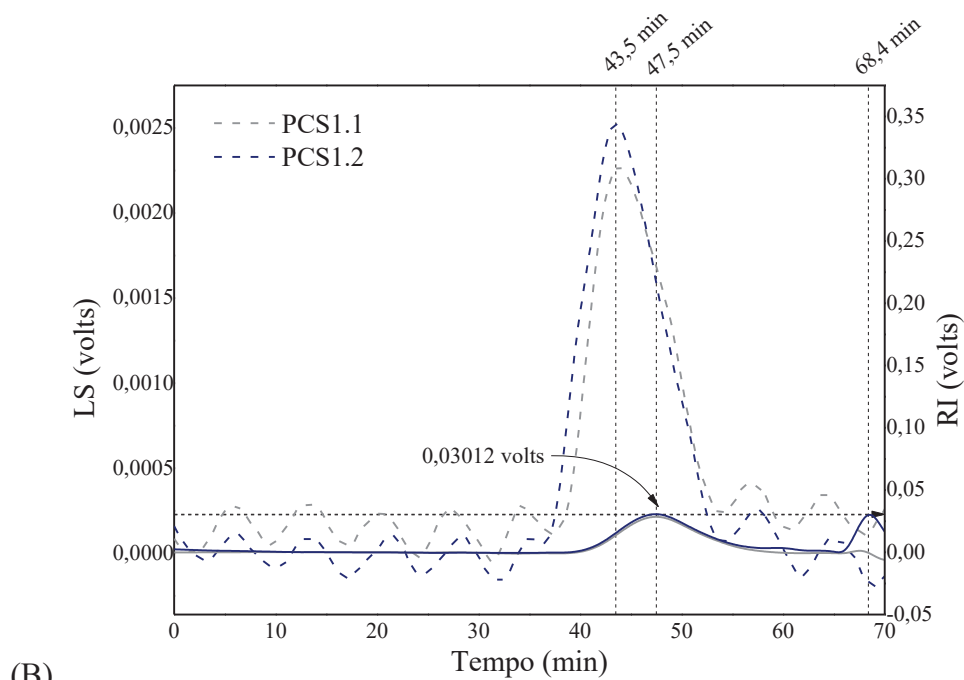
Avaliou-se o perfil cromatográfico da pectina do maracujá (Anexo FIGURA 4 - A) quantitativamente e obteve-se o valor de massa molar de $1,095 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, veiculado a 6% de erro de análise. O valor está de acordo com dados ostentados em trabalhos do grupo ($1,14 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$), apresentando um desvio padrão de $\pm 2,3 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ (JASKI; SIMAS; RIEGEL-VIDOTTI, 2019).

Conforme descrito na literatura, os picos eluídos em baixos tempos de eluição são atribuídos a compostos de massa molar alta, enquanto que em maiores tempos de eluição menores as massas molares da amostra (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; WILLIAMS, 1970). Observa-se nos gráficos da FIGURA 4 que todas as pectinas sulfatadas, comparadas em relação a PCM, apresentaram deslocamento do pico de 45,4 minutos do detector RI para tempos maiores de eluição, indicando a diminuição da massa molar desta população.

Além dos deslocamentos no tempo de eluição, estes picos também apresentaram uma pequena diminuição de índice de refração em relação a PCM (0,03534 volts), sendo que PCS1.1 e PCS1.2 apresentaram 0,03012 volts e PCS2 e PCS3 apresentaram 0,03495 volts, corroborando com a variação de massa molar observada acima. As amostras PCS1.3 e PCS4 não foram analisadas a partir desta técnica.

FIGURA 4. PERFIL CROMATOGRÁFICO (HPSEC) PARA A (A) PCM, (B) PCS1.1 E PCS1.2, (C) PCS2 E PCS3. A LINHA SÓLIDA É REFERENTE AO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E A LINHA TRACEJADA AO DETECTOR DE ESPALHAMENTO DE LUZ (LS).





FONTE: O AUTOR, 2021.

Para melhor elucidar as propriedades das amostras de pectina do maracujá, foram obtidos espectro de FTIR-ATR. Os espectros de todas as pectinas estão mostrados na FIGURA 5, no qual observa-se que todas as amostras exibiram bandas características de polissacarídeos. Inicialmente, uma banda larga característica referente às vibrações de estiramento dos grupos hidroxila, próximo a 3360 cm^{-1} , indicando a ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (JIANG, Yang et al., 2020; LIN et al., 2021a; RODSAMRAN;

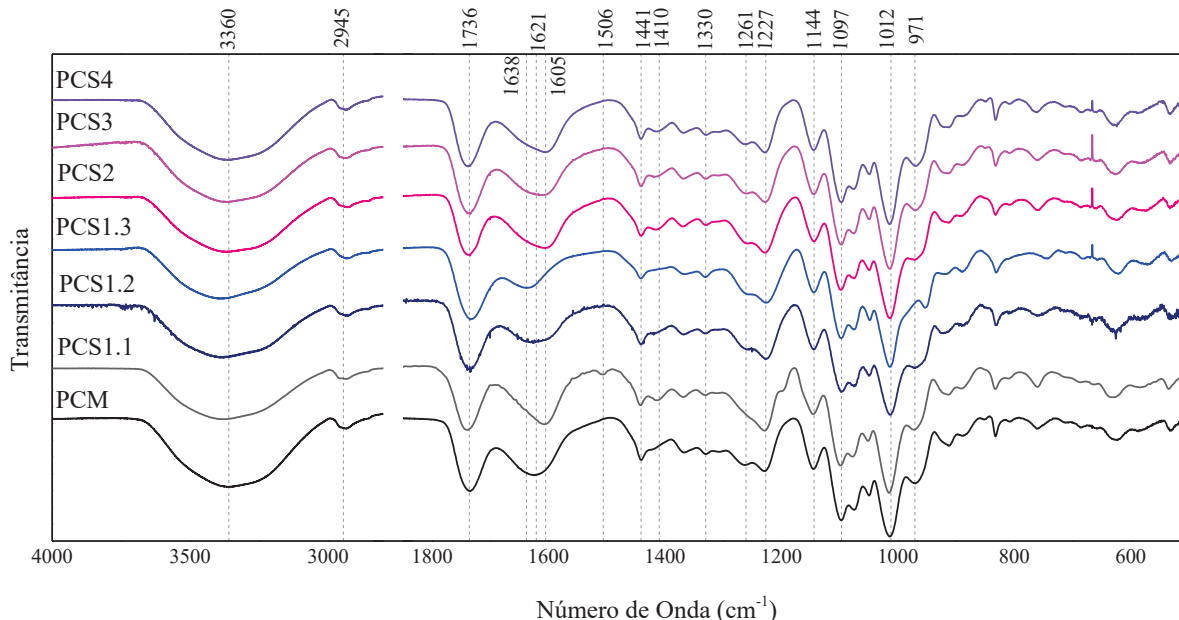
SOTHORNVIT, 2019). A banda de baixa intensidade presente em torno 2945 cm^{-1} está relacionada aos estiramentos vibracionais das ligações C-H, C-H₂ e C-H₃ presentes no anel da pectina (JIANG, Yang et al., 2020; LIN et al., 2021a; RODSAMRAN; SOTHORNVIT, 2019).

A banda intensa em 1736 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento simétrico de C=O dos grupos carboxilatos esterificados, enquanto que a banda intensa em 1612 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento assimétrico de COO⁻ de carboxilas livres (JIANG, Yang et al., 2020; LIN et al., 2021a; RODSAMRAN; SOTHORNVIT, 2019). A banda fraca em 1441 cm^{-1} é atribuída a vibração de alongamento simétrico de COO⁻ de grupos carboxilato livres (JIANG, Yang et al., 2020; LIN et al., 2021a; RODSAMRAN; SOTHORNVIT, 2019).

Ainda, a amostra PCS1.1 apresentou uma banda em 1508 cm^{-1} , proveniente de ligações C-N e N-H, o que indica resíduos do agente de reticulação (SO₃DMF) (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

A banda em 1330 cm^{-1} é atribuída à vibração angular C – H de anéis tipicamente piranose, o que indica que a pectina da casca de maracujá amarelo apresenta este tipo de anel em sua estrutura.

FIGURA 5. ESPECTRO DE TRANSMITÂNCIA POR NÚMERO DE ONDA DA ANÁLISE DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER POR REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA PARA A PECTINA DO MARACUJÁ E PECTINAS SULFATADAS.



FONTE: O AUTOR, 2021.

A região entre 1200 cm^{-1} e 950 cm^{-1} é a impressão digital dos carboidratos em que há a sobreposição das vibrações das ligações C-C e C-O-C presentes no anel (CHAOUCH et al., 2018). As bandas de interesse estão presentes em 1227 cm^{-1} , 1144 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} ,

1012 cm^{-1} e 971 cm^{-1} , atribuídos aos estiramento de O-CH₃, estiramento de C-O, estiramento de C-C, estiramento de C e o dobramento de C-O, respectivamente (CHAOUCH et al., 2018; LIN et al., 2021a; WANG, Wenjun et al., 2015).

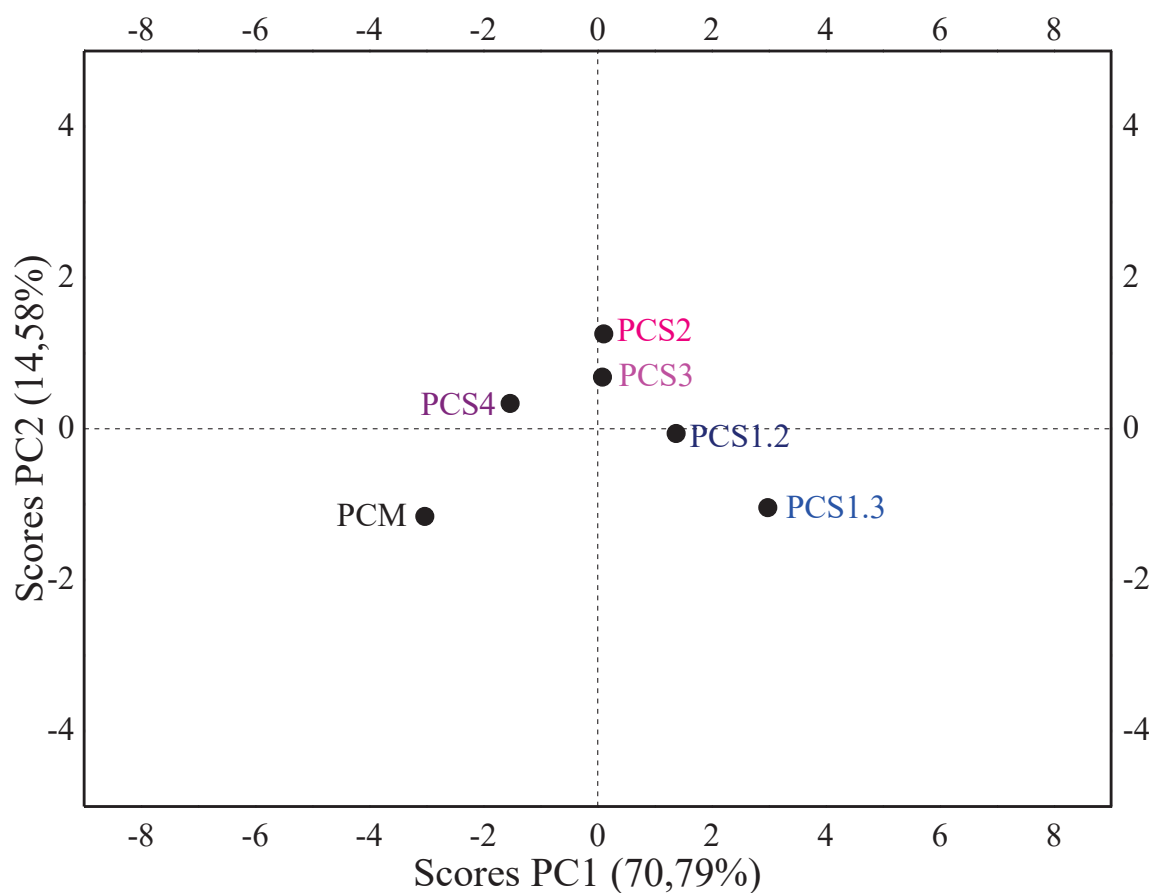
Nas pectinas modificadas, as bandas correspondentes aos deslocamentos assimétrico (S = O) e simétrico (C – O – S) deveriam estar presentes em torno de 1260 cm^{-1} e 850 cm^{-1} , mas não estão claras (CAPUTO; STRAUB; GRINSTAFF, 2019; FAN et al., 2012).

Observa-se que as bandas correspondentes aos grupos carboxílicos metil esterificados nas amostras de pectinas sulfatadas sofreram alteração em sua intensidade, quando comparadas à pectina do maracujá, indicando a alteração no modo de vibração dos grupos metílicos (ZHANG, Kai et al., 2011).

Com o intuito de melhor compreender os resultados obtidos a partir da técnica de infravermelho realizou-se o processamento de dados de Análise de Componentes Principais (PCA). A amostra PCS1.1 não foi avaliada a partir desta técnica visto que seu espectro foi analisado com menores valores de resolução.

No gráfico de *scores* das amostras de pectina (FIGURA 6), do maracujá e sulfatadas, observa-se a projeção dos dados referente a inter-relação das amostras, assim, são gerados componentes principais pela combinação das variáveis originais das 6 amostras (FERREIRA et al., 1999). A primeira componente principal (PC1) explica 70,8% dos dados, enquanto a segunda componente principal (PC2) explica 14,6%, somando 85,4%. Os demais 14,6% normalmente correspondem a valores muito pequenos e ruídos experimentais. Avaliando-se a PC1, é possível dizer que as amostras PCS1.2, PCS1.3, PCS2 E PCS3 são diferentes da PCM, visto que essas amostras apresentam *scores* positivos enquanto que a amostra sem modificação apresenta *score* negativo. Ainda a PC1 descreve a maior variância do conjunto de dados, logo apresenta alta confiabilidade. A amostra PCS4 apresenta *score* negativo, assim, a partir deste eixo não é possível confirmar que houve modificação. Ao avaliar o eixo PC2 observa-se que PCM, PCS1.2 e PCS1.3 apresentam valores negativos enquanto que as amostras PCS2, PCS3 e PCS4 apresentam valores positivos, assim, apresentando diferenças em relação a PCM.

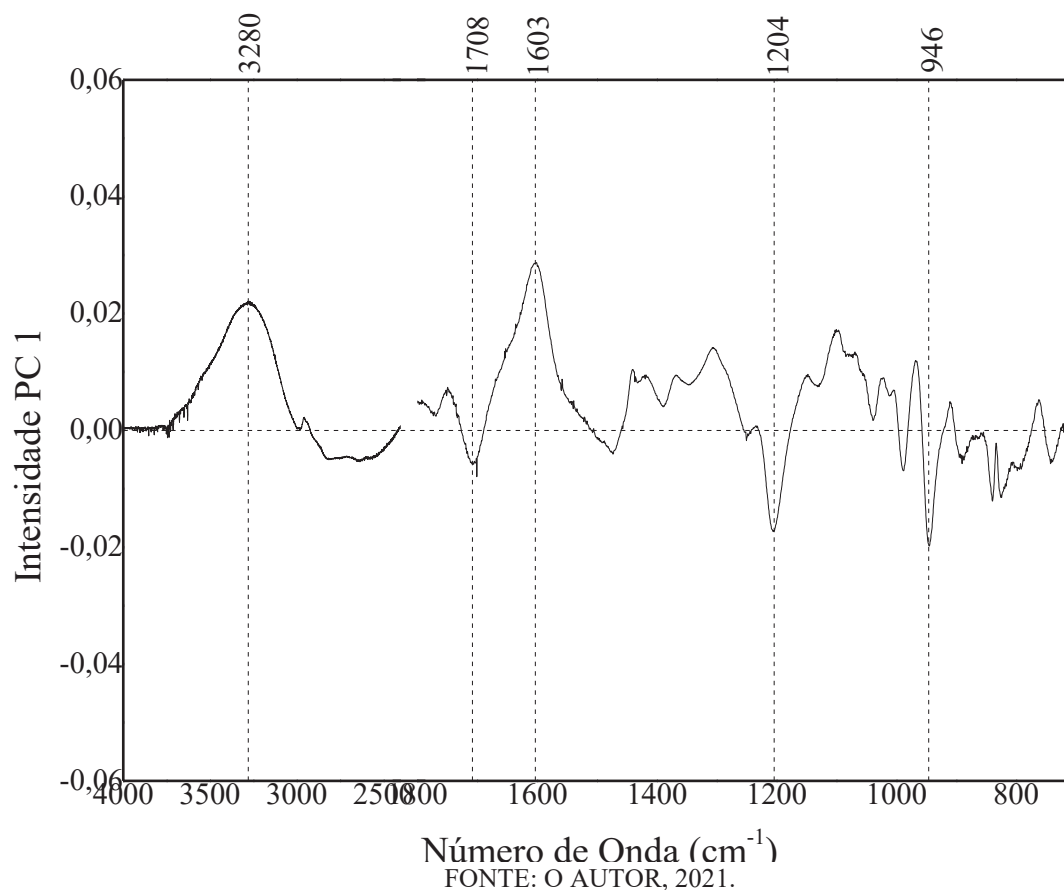
FIGURA 6. SCORES DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS COMPARANDO AS AMOSTRAS DE PECTINA, DO MARACUJÁ E SULFATADAS.



FONTE: O AUTOR, 2021.

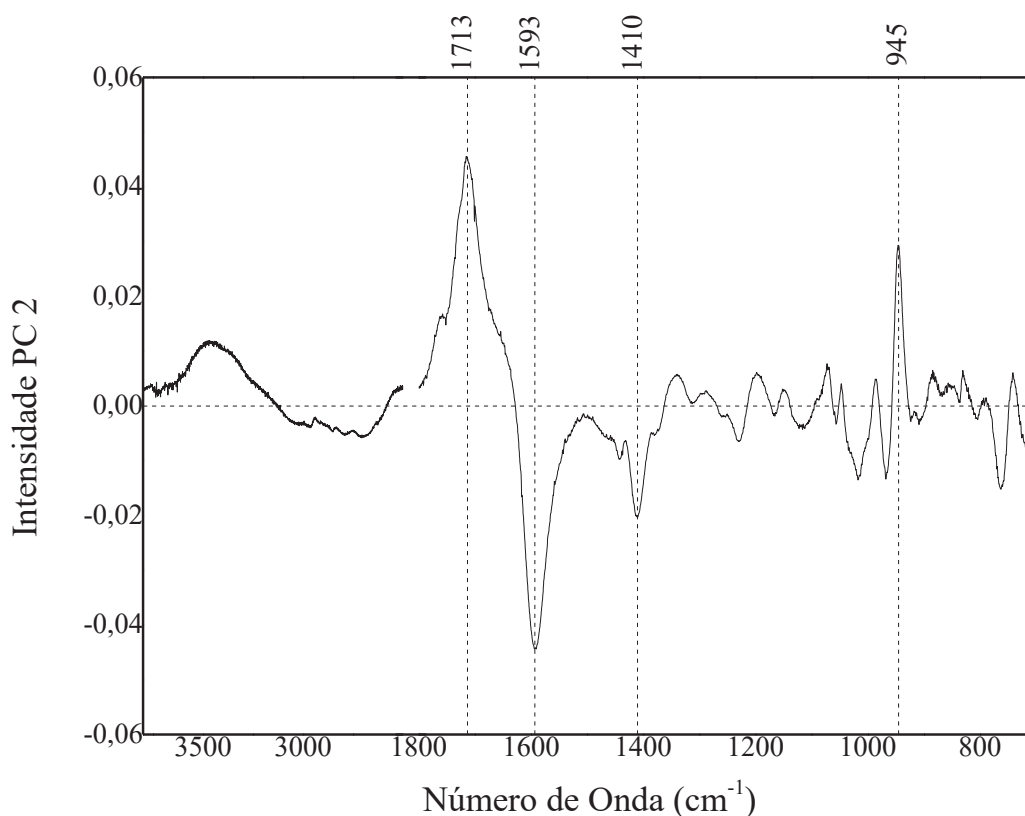
Os gráficos de *loadings* mostram a projeção dos dados referente ao peso com que cada uma das variáveis originais contribuiu para as novas componentes principais (PC1 e PC2) (FERREIRA et al., 1999). No gráfico de *loadings* do eixo PC1 (FIGURA 7), os valores positivos apresentam-se mais intensos nas amostras PCS1.2, PCS1.3, PCS2 e PCS3, enquanto que valores negativos apresentam-se com mais intensidade nas amostras PCM e PCS4. Comparando as amostras observa-se que os quadrantes positivos apresentam os sinais com maior intensidade para o estiramento dos grupos hidroxila, apresentado em 3280 cm^{-1} , vibração de alongamento simétrico de COO^- de grupos carboxila livres, em 1603 cm^{-1} , indicando a prevalência de grupos carboxílicos nas amostras PCS1.2, PCS1.3, PCS2 e PCS3. No lado negativo dos *loadings* as amostras apresentaram maior intensidade para o estiramento simétrico de C=O dos grupos carboxila esterificados, em 1708 cm^{-1} , indicando a prevalência de grupos carboxílicos metil esterificados nas amostras PCM e PCS4.

FIGURA 7. LOADINGS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS COMPARANDO AS AMOSTRAS DE PECTINA, DO MARACUJÁ E SULFATADAS, EM RELAÇÃO AO EIXO PC1.



No gráfico de *loadings* da PC2 (FIGURA 8), os valores positivos apresentam-se mais intensos nas amostras PCS2 e PCS3, enquanto que valores negativos apresentam-se com maior intensidade nas amostras PCM, PCS1.2 e PCS1.3. O lado positivo possui os sinais com maior intensidade para as bandas referentes aos grupos carboxílicos metil esterificados em 1713 cm^{-1} , indicando a prevalência nas amostras PCS2 e PCS3. O lado negativo apresenta em maior intensidade a banda de vibração de alongamento simétrico de COO^- de grupos carboxila livres, em 1593 cm^{-1} , indicando a prevalência dos grupos nas amostras PCM, PCS1.2 e PCS1.3, demonstrados na FIGURA 8.

FIGURA 8. LOADINGS DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS COMPARANDO AS AMOSTRAS DE PECTINA, DO MARACUJÁ E SULFATADAS, EM RELAÇÃO AO EIXO PC2.



FONTE: O AUTOR, 2021.

Além de análises pela técnica de FTIR-ATR também foram realizadas aquisições de RMN para cada amostra. O espectro de RMN ^1H para a pectina do maracujá (Anexo FIGURA A 1) e o seu respectivo mapa de correlação 2D de ^1H e ^{13}C – HSQC (

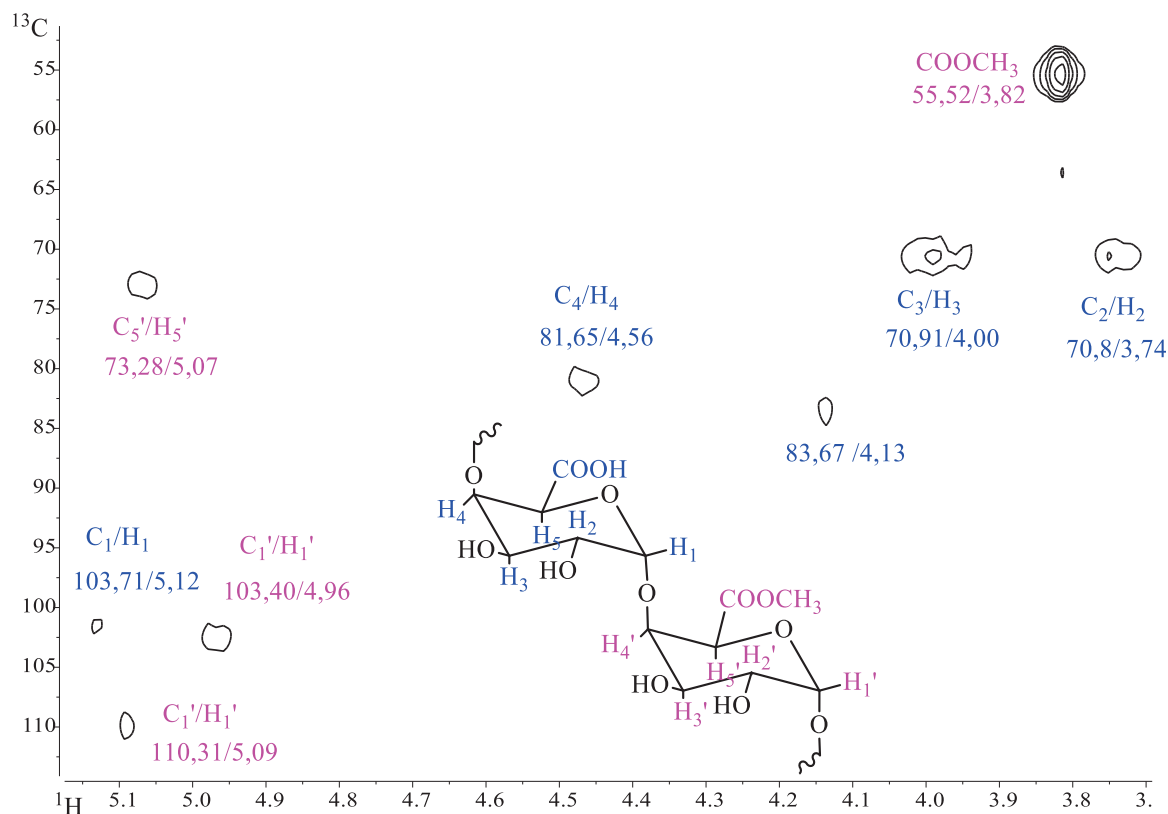
FIGURA 9) demonstram sinais típicos de unidades de ácido galacturônico metil esterificado, compatíveis com trabalhos anteriores do grupo e de parcerias que utilizaram do mesmo lote de material (ABBOUD et al., 2019; JASKI; SIMAS; RIEGEL-VIDOTTI, 2019).

Os deslocamentos químicos correspondentes à região anomérica do ácido α -D-GalA estão presentes em δ 101,46/5,12 ppm, derivado de C_1/H_1 de α -D-GalpA não-esterificado, e em δ 103,4/4,96 e δ 110,01/5,09 ppm, correspondentes a C_1'/H_1' de α -D-GalpA esterificados. Os sinais assinalados em δ 73,06/5,07 ppm são respectivos a C_5'/H_5' de α -D-GalpA metil esterificados (ABBOUD et al., 2019; ASGARI et al., 2019; LIN et al., 2021a; ROMÁN et al., 2017). A partir da integral destes sinais e da Equação 2 determinou-se o grau de metil esterificação (GM) equivalente a 77,84%, caracterizando esta pectina como altamente metoxilada (HM).

O singlete intenso em δ 55,52/3,82 ppm é característico da correlação de carbonos e hidrogênios de COOCH_3 das unidades de α -D-GalpA. Os sinais em δ 81,65/4,56, δ

70,91/4,00 e δ 70,8/3,74 ppm são respectivos à C_4/H_4 , C_3/H_3 e C_2/H_2 das unidades de α -D-GalpA (ASGARI et al., 2019; LIN et al., 2021a; ROMÁN et al., 2017).

FIGURA 9. MAPA DE CORRELAÇÃO 2D DE ^1H E ^{13}C – HSQC EM D_2O A 60°C PARA A PECTINA DO MARACUJÁ.



FONTE: O AUTOR, 2021.

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 10) compara as aquisições das amostras de pectina não modificadas e amostras modificadas. O sinal em δ 4,13 ppm respectivo à C_4/H_4 de resíduos arabinose, também observado na análise de correlação 2D, está presente na amostra de pectina do não modificada como um tripleto, corroborando com os resultados de composição do monossacarídeo encontrados por Abboud et al. (2019). O sinal não se encontra presente nos demais espectros, visto que a reação de modificação, bem como o processo de purificação, podem ter ocasionado a remoção de cadeias laterais de açúcares neutros, como a arabinose (EINHORN-STOLL et al., 2019; KASTNER; EINHORN-STOLL; DRUSCH, 2019; LIN et al., 2021b; ZHANG, Lifen et al., 2013).

Observa-se a sobreposição e diminuição significativa da intensidade dos sinais presentes em torno de δ 5,16 ppm relativos aos C_1/H_1 não-esterificados, quando comparado ao sinal δ 3,99 ppm de C_3/H_3 , das amostras PCS1.1, PCS2 e PCS3. Esta diminuição pode

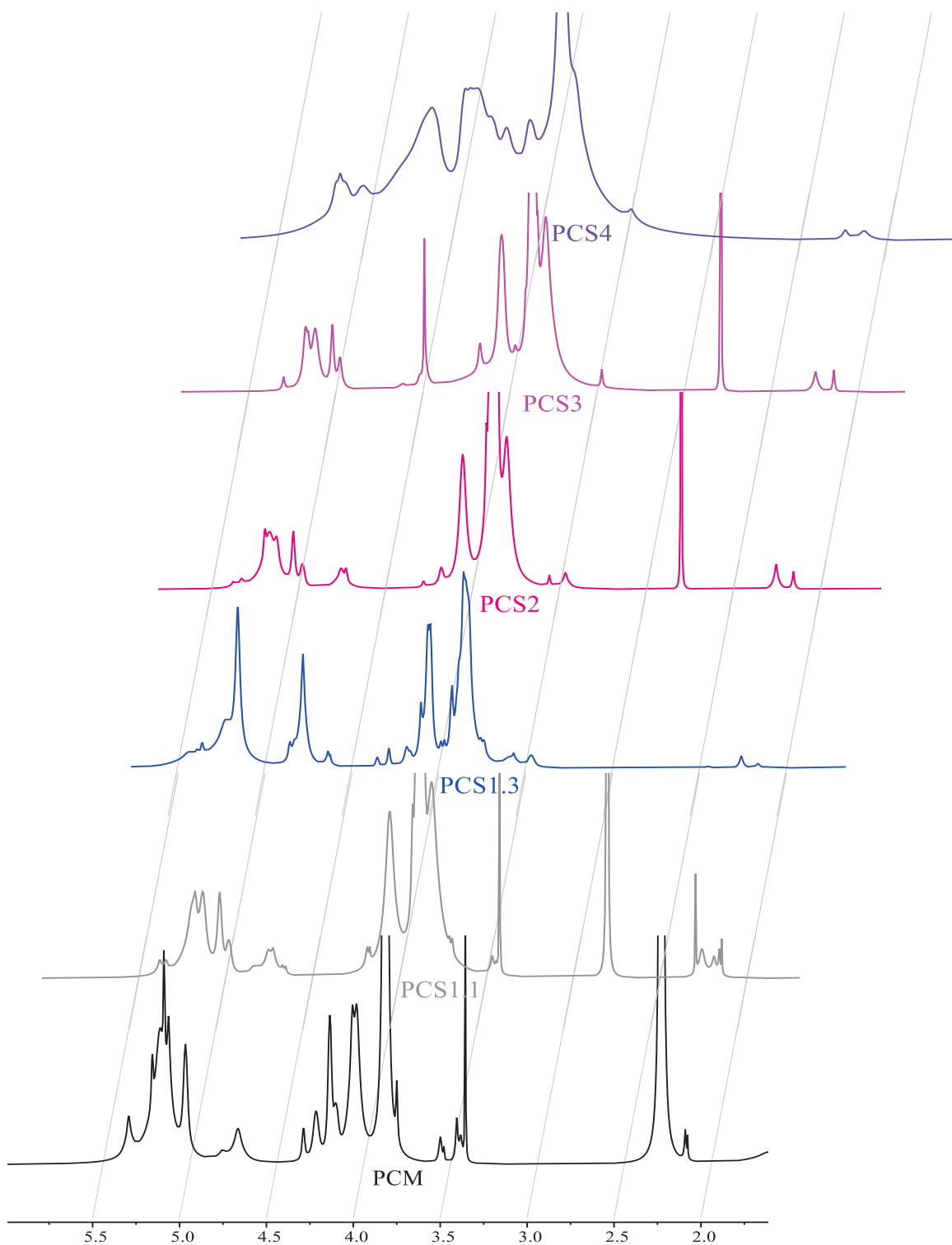
indicar a eliminação de cadeias com grupamentos COOH e, por consequência, o aumento do grau de metil esterificação, através do processo de purificação após a reação de modificação. Ainda, pode salientar a interação dos grupamentos COOH com o resíduo de DMF, o qual está exposto por um singlete intenso em δ 2,75 ppm nas respectivas amostras, mesmo após a purificação.

Os dois sinais em δ 2,18 e 2,07 ppm são deslocamentos ocasionados pela interação dos grupos acetil com as hidroxilas presentes em C₂ e C₃ (LIN et al., 2021a; ZHANG, Lifeng et al., 2013). Estes sinais se encontram com maior intensidade na amostra PCM e em menor intensidade nas amostras modificadas, o que é um indicativo do sucesso da reação de modificação. Ainda, o sinal em δ 3,75 ppm e os deslocamentos presentes em torno de δ 3,50 ppm, relativos ao H₂, diminuem a intensidade nas amostras modificadas enaltecendo novamente a substituição das hidroxilas em questão.

Os mapas de correlação de ¹H e ¹³C – HSQC das amostras de pectina modificadas estão mostradas no Anexo (FIGURA A 2, FIGURA A 3, FIGURA A 4 e FIGURA A 5) e apresentam num geral sinais característicos de pectina. É importante salientar que os espectros foram adquiridos somente com 4 *scans* o que afeta diretamente a qualidade dos resultados e consequentes análises.

O espectro da amostra PCS1.3 (Anexo FIGURA A 2) apresenta evidenciados os sinais característicos da pectina não esterificada, indicando a desesterificação da amostra em questão, sendo um reflexo da utilização de ambiente inerte na modificação da amostra, ou ainda a eliminação de cadeias menores contendo os grupamentos metil esterificados.

FIGURA 10. ESPECTRO DE RMN ^1H PARA PCM, PCS1.1, PCS1.3, PCS2, PCS3 E PCS4 EM D_2O A 60°C .

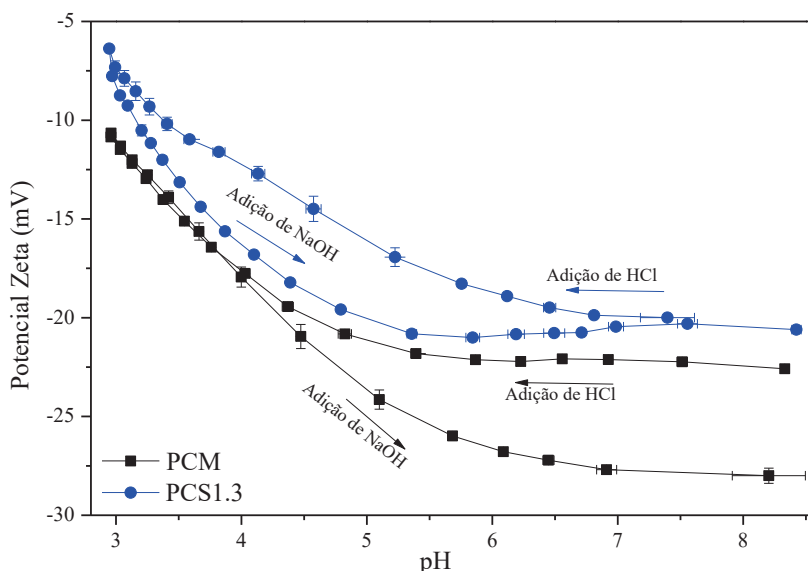


FONTE: O AUTOR, 2021.

O potencial zeta das pectinas PCM e PCS1.3 foi acompanhado em função da variação do pH. A FIGURA 11 mostra as varreduras de pH 3 a 8. O intuito deste experimento foi

avaliar o comportamento do potencial zeta da pectina com a variação do pH e, em sequência, determinar o valor da constante de ionização ácida das amostras.

FIGURA 11. VARREDURA DE pH (3 A 8) POR POTENCIAL ZETA PARA AS AMOSTRAS DE PCM E PCS1.3.



FONTE: O AUTOR, 2021.

As análises foram realizadas à temperatura ambiente sendo as análises para PCM realizadas em torno de 27°C e para PCS1.3 em torno de 29°C. É importante destacar a variação de temperatura entre os experimentos, visto que a conformação das cadeias e os valores de potencial zeta das amostras podem variar. Para evitar essas variações novas medidas podem ser realizadas com temperatura controlada na continuação da pesquisa.

Para a amostra de PCM, a partir da titulação com hidróxido de sódio, obteve-se o potencial zeta mínimo de -27,99 mV e um pKa de 3,37, já para a varredura com adição de ácido clorídrico obteve-se o potencial zeta mínimo de -22,58 mV e pKa de 3,03. A amostra PCS1.3 apresentou potencial zeta mínimo de -20,54 mV para ambas as curvas e pKa de 3,43 e 3,18 para a titulação com base e com ácido, respectivamente.

Com intuito de comparar os valores obtidos anteriormente, realizaram-se titulações ácido-base. A

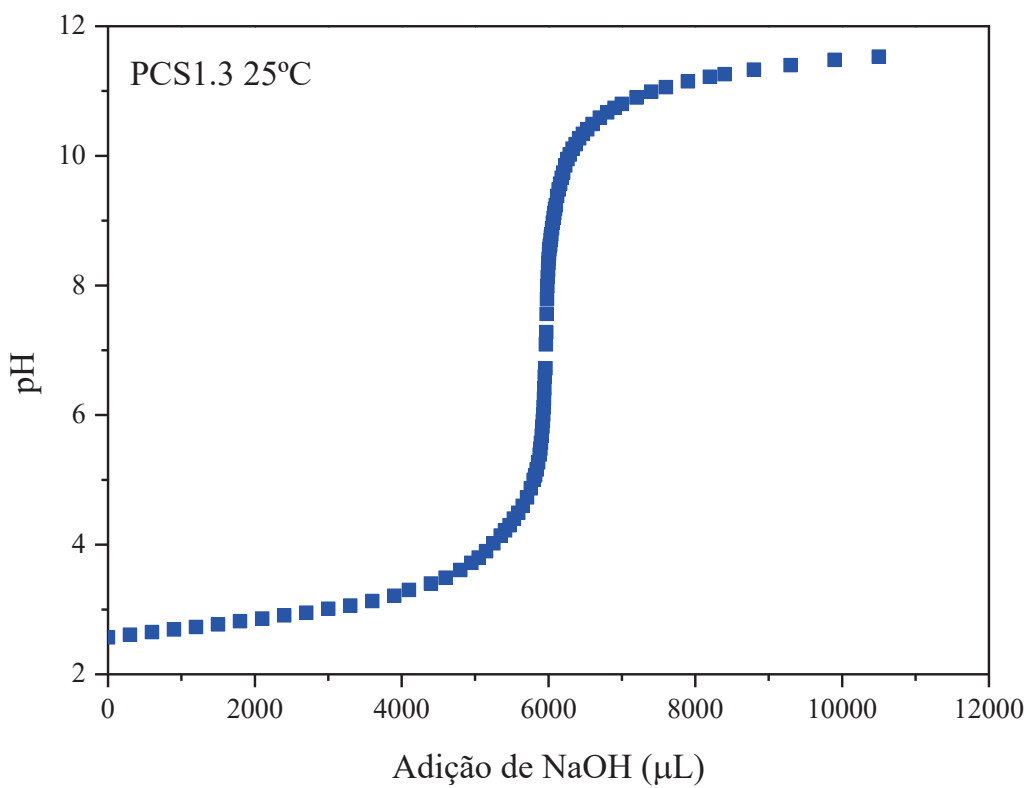
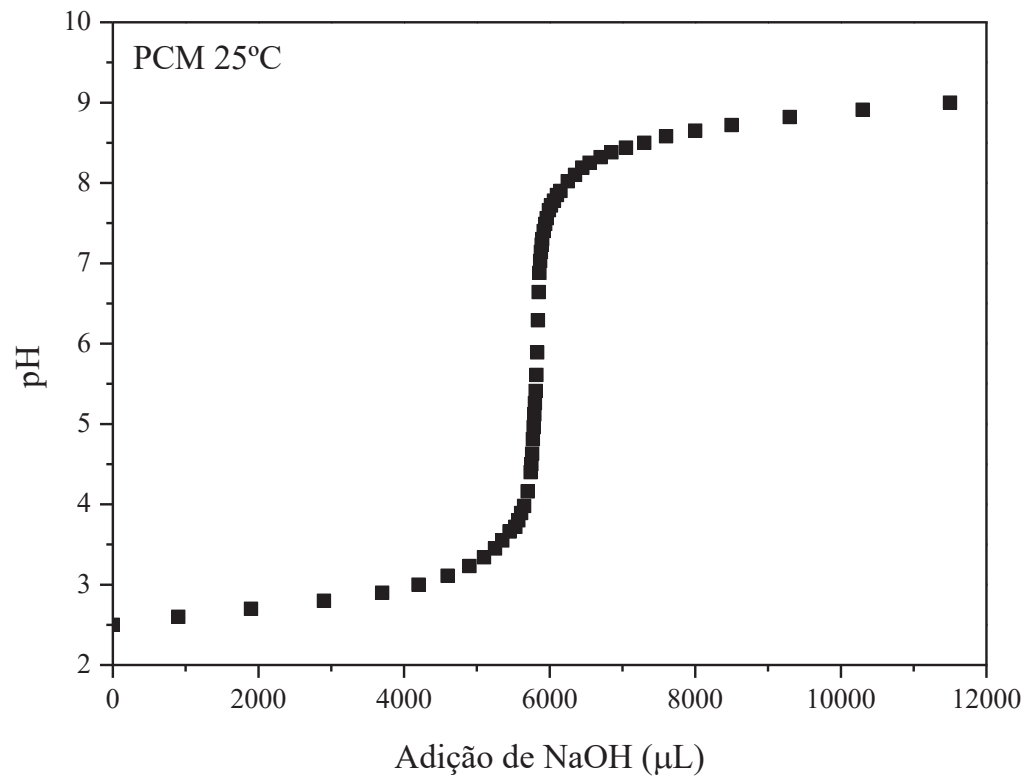
FIGURA 12 apresenta as curvas de titulação obtidas para as amostras PCM e **PCS1.3** a 25°C. Realizaram-se as derivadas segundas das curvas (Anexo - *FIGURA A 6*) com intuito de determinar com maior precisão os pontos de equivalência e pKas das amostras. Para a amostra PCM obteve-se o valor de ponto de equivalência de 7,09, enquanto que o valor de pKa equivalente a 3,54, já para a amostra **PCS1.3** obtiveram-se os valores de 7,28 e 3,64, respectivamente.

O valor de pKa para os grupos ácido carboxílicos, presentes na pectina, é 3,50, assim os valores apresentaram desvios da idealidade, os quais estão presentes na TABELA 2 (SILA et al., 2009). Estes desvios ocorrem por conta da técnica utilizada que é relativa somente aos grupamentos presentes no plano de cisalhamento e não representa necessariamente todos os grupos carboxila na amostra, dependendo da conformação e exposição dos grupamentos carboxila (GREIN-IANKOVSKI et al., 2018).

TABELA 2. VALORES DE PKA PARA AS AMOSTRAS PCM E **PCS1.3** PERANTE AS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO EMPREGADAS.

	pKa (desvio)		
	Titulação básica fluxo	Titulação ácida fluxo	Titulação comum
PCM	3,37 (3,71%)	3,03 (13,43%)	3,54 (1,14%)
PCS1.3	3,43 (2,00%)	3,18 (9,14%)	3,64 (4,00%)

FIGURA 12. CURVA DE TITULAÇÃO ÁCIDO-BASE DE PH EM FUNÇÃO DE VOLUME DE ADIÇÃO DE NaOH PARA AS AMOSTRAS DE PCM E PCS1.3 A 25°C.



FONTE: O AUTOR, 2021.

Análises de potencial zeta e pH das amostras de pectina, não-sulfatada e sulfatadas, na concentração 0,1% (m/m), se encontram na TABELA 3, assim como as respectivas temperaturas de análise e solvente utilizado.

TABELA 3. VALORES DE POTENCIAL ZETA, PH E TEMPERATURA PARA MEDIDAS PONTUAIS DAS AMOSTRAS DE PECTINA DO MARACUJÁ E PECTINAS SULFATADAS.

Amostra	Potencial Zeta (mV)	pH	Temperatura (°C)
Amostra/solvente			
PCM (H₂O)	-71,7 ± 0,2	3,7 ± 0,1	20,4 ± 0,1
PCM (PBS)	-15,5 ± 1,2	7,4 ± 0,1	25,0 ± 0,1
PCS1.1 (H₂O)	-41,0 ± 0,6	5,1 ± 0,2	25,6 ± 0,4
PCS1.2 (H₂O)	-28,3 ± 0,5	3,5 ± 0,1	26,7 ± 0,3
PCS1.3 (H₂O)	-0,03 ± 0,01	3,3 ± 0,1	24,4 ± 0,1
PCS1.3 (PBS)	-11,8 ± 0,7	7,4 ± 0,1	25,0 ± 0,1
PCS2 (H₂O)	-37,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	27,1 ± 0,1
PCS3(H₂O)	-19,9 ± 0,5	4,0 ± 0,1	27,3 ± 0,1
PCS4 (PBS)	-21,7 ± 0,7	7,4 ± 0,1	25,0 ± 0,1

FONTE: O AUTOR, 2021.

Observa-se na TABELA 3 que todas as pectinas apresentam valores de potencial zeta negativo, o que confirma seu caráter aniônico. O valor de potencial zeta é respectivo ao potencial elétrico no plano de cisalhamento e não representa necessariamente todos os grupos carregados na amostra (GREIN-IANKOVSKI et al., 2018). Além disso, o valor de potencial zeta depende da conformação em que a pectina se encontra e da exposição dos grupos carregados, que podem estar no interior de agregados, não contribuindo completamente para a magnitude do potencial zeta (GREIN-IANKOVSKI et al., 2018).

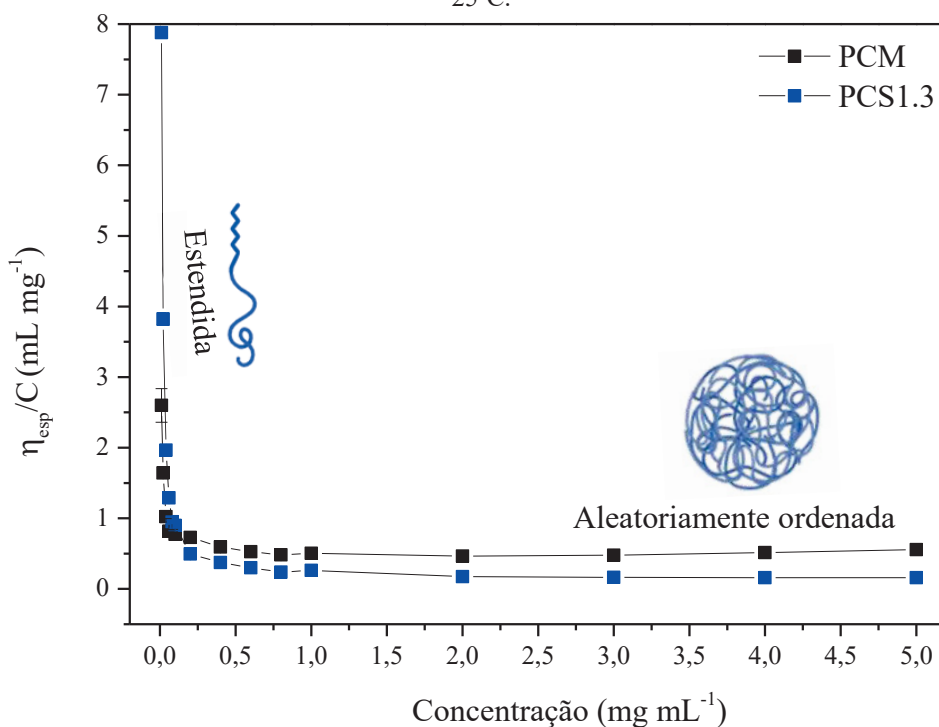
Coloides com valores de potencial zeta maiores do que +30 mV ou menores do que -30 mV são estabilizados eletricamente, visto que as forças repulsivas excedem as forças atrativas, impossibilitando fenômenos de agregação (JOSEPH; SINGHVI, 2019; KUMAR; DIXIT, 2017; LU; GAO, 2010). Nas amostras analisadas observa-se que somente as amostras PCM (H₂O), PCS1.1 e PCS2 apresentaram densidades de carga menores que -30 mV, em seus pHs naturais, o que demonstra que os grupamentos se apresentam expostos e que há pouca agregação nesta temperatura e solventes. A amostra PCM (PBS) apresentou maior valor de potencial zeta, indicando maior enovelamento da amostra neste solvente e

temperatura. A amostra PCS1.3 (H₂O) apresentou o valor de potencial zeta próximo a zero o que demonstra que a amostra se encontra menos expandida e que os grupamentos estão poucos expostos. Já a amostra PCS1.3 (PBS) apresentou os grupamentos mais expostos e o valor de potencial zeta igual a -11,8 mV.

Em relação aos valores de pH sem ajuste, as amostras PCS1.1, PCS2 e PCS3 apresentam seus valores de pH acima do esperado, em torno de 3,5, o que é explicado pela presença de DMF observada nas análises de RMN.

Para compreender a conformação na qual as amostras se encontram em solução análises de viscosimetria e espalhamento de luz dinâmico foram realizadas. A viscosimetria capilar apresentou resultados acerca da conformação da pectina. O gráfico de Huggins (FIGURA 13) relaciona os dados de viscosidade específica em função da concentração das amostras de PCM e PCS1.3 dispersas em água.

FIGURA 13. GRÁFICO DE HUGGINS, DE VISCOSIDADE ESPECÍFICA POR CONCENTRAÇÃO (mL mg⁻¹) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (mg mL⁻¹), PARA PCM E PCS1.3 DISPERSAS EM ÁGUA A 25°C.



FONTE: O AUTOR, 2021.

O gráfico demonstra que com baixas concentrações de pectina na dispersão os valores de viscosidade reduzida diminuem com o aumento da concentração, enquanto que a partir de uma certa concentração, os valores de η_{esp}/C dessas pectinas permanecem constantes com o aumento da concentração. Este comportamento é amplamente

demonstrado na literatura (DOBRYNIN, 2020; KLINCHONGKON; KHUWIJITJARU; ADACHI, 2018; LIMA; SOLDI; BORSALI, 2009; YOO et al., 2006). Polieletrólitos, como a pectina, comumente apresentam valores anormais de viscosidade, que são explicadas pelas mudanças conformacionais (KLINCHONGKON; KHUWIJITJARU; ADACHI, 2018; WINNING et al., 2007). Estas mudanças são proporcionadas pelas forças de repulsão entre as cadeias, em regime concentrado a quantidade de água disponível para solvatação do polímero é menor, o que implica em menor ionização e, por consequência, menor repulsão, gerando uma conformação aleatoriamente ordenada. Em regime diluído as forças eletrostáticas aumentam, visto que a água está presente em maior quantidade para quantidade de polímero, levando a expansão da cadeia e um aumento na viscosidade, este efeito é denominado de “efeito polieletrólito” (FUOSS; STRAUSS, 1948; KLINCHONGKON; KHUWIJITJARU; ADACHI, 2018; WINNING et al., 2007).

Análises viscosimétricas em tampão e com adição de sal ao meio foram realizadas com o intuito de avaliar o comportamento conformacional da pectina do maracujá não-sulfatada ao reduzir as forças repulsivas do meio. A FIGURA 14 mostra os gráficos de Huggins (Equação 8) para as amostras de pectina não-sulfatada e sulfatada a 25°C (A) e 37°C (B). Avaliando os gráficos e estimando o limite do gráfico em concentração igual a zero, é possível determinar o valor da viscosidade intrínseca e da constante de Huggins. Os dados obtidos seguindo o modelo e equação de Huggins estão apresentados na TABELA 4.

Observa-se que a pectina se adequou ao modelo de Huggins e apresentou valores de coeficiente de determinação da reta adequados, embora tenha apresentado levemente o efeito polieletrólito nas mais baixas concentrações. Com o aumento da concentração observa-se o aumento da viscosidade reduzida (Equação 6), conforme o esperado para este modelo e já observado para outros trabalhos relacionados a pectina (LIN et al., 2021a; ZHANG, Lifan et al., 2013); (FUOSS; STRAUSS, 1948; KLINCHONGKON; KHUWIJITJARU; ADACHI, 2018; WINNING et al., 2007)). Ainda, com a variação da temperatura a pectina manteve os valores de viscosidade intrínseca próximos, com um leve aumento com o aumento da temperatura. A concentração de crítica demonstra que a janela de concentração trabalhada é adequada ao experimento, que requer dispersões no regime diluído.

A constante de Huggins é um parâmetro físico-químico que prediz a conformação de uma determinada amostra polimérica a partir do estudo das forças de interações entre polímero-polímero (p-p), polímero-solvente (p-s) e solvente-solvente (s-s) (KULICKE; CLASEN, 2004; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). Quando o valor da constante está entre 0,3 e 0,4 há uma forte tendência de as cadeias poliméricas apresentarem conformação

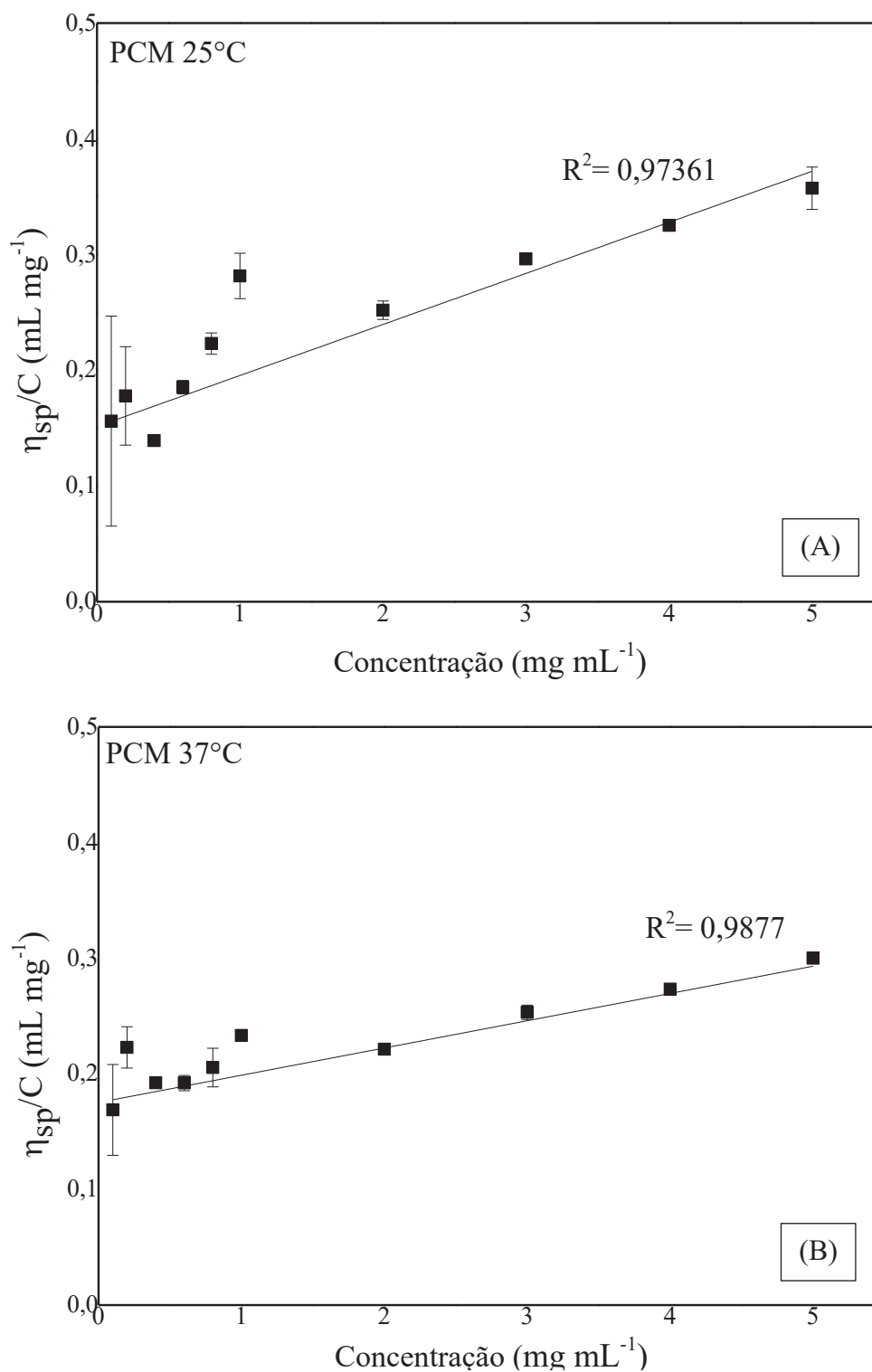
random coil, suas cadeias se entrelaçam de maneira aleatória, e há um equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas nas possíveis interações. Quando o valor da constante de Huggins é superior a 0,4, neste caso 0,77 e 1,92, a tendência é de que o solvente seja classificado como um mau solvente para o sistema, assim, as interações s-s e p-p apresentam-se preferenciais e por consequência as cadeias poliméricas tendem a formar muitos agregados. (KULICKE; CLASEN, 2004; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

TABELA 4. VISCOSIDADE INTRÍNSECA $[\eta]$, COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO DA RETA (R^2), CONSTANTE DE HUGGINGS (K_H) E CONCENTRAÇÃO DE CRÍTICA (C^*) PARA PCM A 25°C E 37°C.

	$[\eta]$ (mL mg ⁻¹)	R^2	K_H	C^* (mg mL ⁻¹)
PCM 25° C	0,15	0,97	1,92	6,60
PCM 37° C	0,18	0,99	0,77	5,71

FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA 14. GRÁFICOS DE HUGGINS, DE VISCOSIDADE ESPECIFICA POR CONCENTRAÇÃO (mL mg⁻¹) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO (mg mL⁻¹), PARA PCM DISPERSA EM TAMPÃO PBS A 25°C (A) E 37°C (B).



FONTE: O AUTOR, 2021.

As análises de espalhamento de luz dinâmico possibilitaram a determinação do raio hidrodinâmico (R_H), índice de polidispersão (PDI) e também dos valores de coeficiente de difusão (D) para as amostras, os quais estão presentes na TABELA 5. As FIGURA A 7, FIGURA A 8 e FIGURA A 9 (Anexo) mostram as curvas de correlação para a PCM, PCS1.3 e PCS4, respectivamente, em água e tampão PBS salino.

Para compreender o raio hidrodinâmico é preciso salientar que nesta análise considera-se que os polímeros dispersos apresentam conformação similar a uma esfera, visto que o raio hidrodinâmico é o raio de uma esfera impenetrável ao solvente (SUN, 2004). A amostra de PCM apresentou diminuição no raio hidrodinâmico em PBS, em relação a H_2O , o que demonstra melhor interação da amostra com a água do que com o tampão. Os dados reforçam o observado nas análises de potencial zeta, em que há maior exposição dos grupamentos carregados em água do que em PBS, logo, uma conformação mais estendida. A presença do sal no tampão PBS possibilita a neutralização de grupos carregados e, assim, a blindagem das interações eletrostáticas e por consequência uma conformação compacta.

O coeficiente de difusão é, neste caso, a medida da massa polimérica transportada em um determinado período de tempo sob a influência do gradiente de concentração (SUN, 2004). A partir da Equação de Stokes-Einstein (Equação 3) o coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao raio hidrodinâmico, assim, com a diminuição do raio do hidrodinâmico, observa-se o aumento do coeficiente de difusão (ROSS-MURPHY, 1994; SUN, 2004). O comportamento relatado é observado para as amostras estudadas, nas quais observam-se valores na mesma ordem de grandeza.

Ainda, observa-se a difusão incompleta e presença de duas populações na amostra PCM em tampão (FIGURA A 7-B) as quais explicam o maior valor de índice de polidispersão entre as demais amostras. A população de PCM com maior raio hidrodinâmico e, por consequência, maior intensidade, se encontra em menor quantidade, enquanto a população de menor tamanho e menor intensidade se encontra em maior quantidade, as quais se tratam de agregados poliméricos proporcionados pela má interação polímero-solvente entre o polímero e tampão, corroborando com os dados de raio hidrodinâmico supracitados.

As amostras de pectina modificadas (PCS1.3 e PCS4) apresentaram um pequeno aumento do raio hidrodinâmico em tampão em relação a água, indicando melhor interação com o tampão do que com a água. Desta maneira, reafirma o comportamento observado na análise de potencial zeta citada anteriormente, em que observamos a maior exposição de grupamentos negativamente carregados para as amostras modificadas em tampão.

A amostra **PCS1.3**, embora não tenha apresentado mais de uma população, apresentou difusão incompleta, não alcançando o valor de coeficiente de difusão igual a zero no tempo de análise, conforme observado no Anexo FIGURA A 8 – A, o que é um indicativo da presença de agregados na amostra.

TABELA 5. VALORES DE ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (PDI), RAIOS HIDRODINÂMICOS (R_H) E COEFICIENTE DE DIFUSÃO (D) PARA AS AMOSTRAS PCM, **PCS1.3** E **PCS4** EM ÁGUA E EM PBS A 25°C.

Amostra	PCM		PCS1.3		PCS4	
	H ₂ O	PBS	H ₂ O	PBS	H ₂ O	PBS
PDI	0,28 ± 0,03	0,49 ± 0,06	0,37 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01
R_H (nm)	189,4 ± 2,5	180,4 ± 1,9	119,8 ± 2,1	124,8 ± 1,9	123,1 ± 5,3	127,3 ± 0,2
D (× 10⁻¹² m²/s)	1,30 ± 0,02	1,36 ± 0,01	2,08 ± 0,02	1,97 ± 0,03	1,48 ± 0,44	1,93 ± 0,01

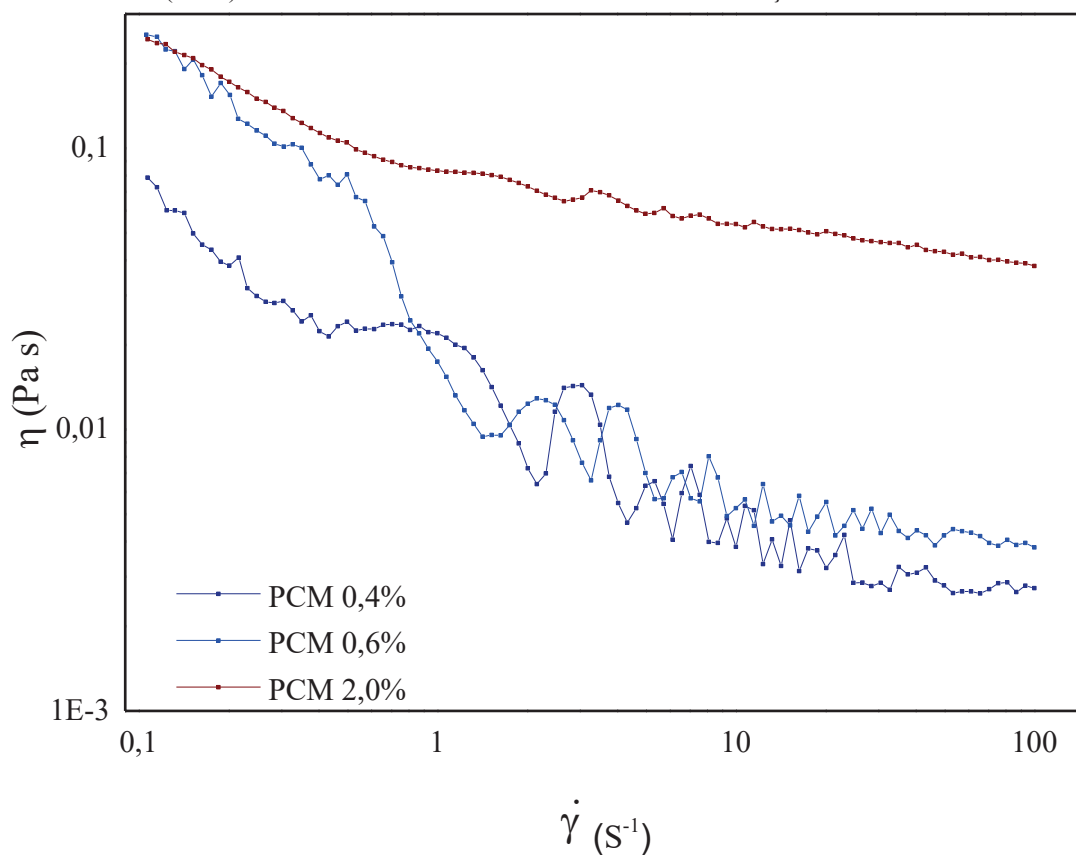
FONTE: O AUTOR, 2021.

As curvas de viscosidade e de fluxo para as dispersões 0,8% de PEI 25.000 g mol⁻¹, PEI 1.300 g mol⁻¹ e PEG 4.000 g mol⁻¹ estão presentes nas FIGURA A 10, FIGURA A 11 e FIGURA A 12 (Anexo), respectivamente. Observa-se que as amostras apresentam uma região inicial de comportamento newtoniano (ideal), em que a viscosidade se mantém constante e a tensão de cisalhamento aumenta linearmente com a taxa de cisalhamento (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Após a taxa de cisalhamento de, aproximadamente, 110 s⁻¹, há o aumento exponencial da inclinação das curvas de viscosidade e tensão de cisalhamento com o aumento da taxa de cisalhamento (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Este comportamento caracteriza fluidos não newtonianos, inelásticos, independentes do tempo que seguem um padrão de fluidos dilatantes (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). O aumento da viscosidade é mais lento do que o aumento da tensão de cisalhamento, visto que há interações intermoleculares em partes das moléculas que dificultam o processo de solvatação (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Além disso, após a taxa de cisalhamento de 110 s⁻¹ o coeficiente angular (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016).

As curvas de viscosidade para três diferentes concentrações da amostra de pectina do maracujá não modificada (PCM) estão presentes na FIGURA 15. O comportamento das curvas mostra propriedades de fluxo pseudoplásticas, em que se observa a diminuição linear

da viscosidade em baixas taxas de cisalhamento (abaixo de $0,45 \text{ s}^{-1}$), porém, com o subsequente aumento da taxa de cisalhamento ocorre também a diminuição desproporcional da viscosidade (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Esta diminuição pode ser explicada por mudanças conformacionais nas cadeias poliméricas, em estado de repouso a entropia é alta e a conformação polimérica é aleatoriamente organizada. Ao aplicar o cisalhamento o sistema mantém esta conformação, porém, a partir de um determinado aumento do cisalhamento as moléculas tendem a se organizar na direção da força aplicada (BRUMMER, 2006). A nova conformação passa a ser menos emaranhada, o que faz com que o sistema flua mais facilmente e diminua consideravelmente o valor da viscosidade. Este comportamento é observado nas amostras de concentração 0,4% e 0,6%, que apresentam regimes de concentração diluído e em torno da concentração crítica, respectivamente (BRUMMER, 2006). No entanto, para soluções poliméricas semidiluídas, que é o caso da amostra 2,0%, observa-se que a mudança conformacional é menos pronunciada (BRUMMER, 2006; SCHRAMM, 2006). Assim, os dados corroboram com os valores de viscosidade intrínseca e concentração crítica obtidos nas análises de viscosimetria.

FIGURA 15. CURVAS DE VISCOSIDADE PARA A PECTINA DO MARACUJÁ NÃO MODIFICADA (PCM) DISPERSAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES A 25°C.









A FIGURA A 13, FIGURA A 14, FIGURA A 15, FIGURA A 16 e FIGURA A 17, mostradas no Anexo, apresentam as varreduras de tensão para as dispersões de PCM nas concentrações de 0,1%, 0,6%, 1,0%, 1,4% e 2,0%, respectivamente. Nas concentrações mais diluídas observa-se a tendência de os valores do módulo elástico (módulo de armazenamento) serem maiores do que os valores do módulo viscoso (módulo de perda). Conforme há o aumento da concentração o módulo viscoso aumenta e há a presença de intersecções entre as curvas, tornando o módulo viscoso maior do que o módulo elástico. O observado corrobora com os comportamentos da viscosidade observados nas curvas de viscosidade.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE PECTINA E POLI(ETILENOIMINA)

Inicialmente avaliou-se os hidrogéis produzidos a partir do teste de inclinação do tubo com intuito de selecionar as combinações que apresentassem visualmente a formação de gel, resistência mecânica e homogeneidade. Os primeiros hidrogéis produzidos foram associações entre dispersões aquosas de PCM (2%) ou PCS1.1 (2%) com PEI 25.000 g mol⁻¹ (0,8%) ou PEI 1.300 g mol⁻¹ (0,8%), que geraram novas dispersões com diferentes concentrações, conforme a FIGURA A 18 (Anexo). Comparando os hidrogéis de PCM observa-se que a associação com PEI 25 (1 e 5) favorece a formação de agregados e separação de fase, enquanto que os hidrogéis com PEI 1,3 (2 e 6) apresentam maior homogeneidade. A cadeia de menor massa molar se torna um melhor reticulante

Em relação a PCS1.1 com PEI 25, observa-se que o hidrogel de composição número 3 apresentou homogeneidade, enquanto que o de composição 7 apresentou um líquido turbido. Os hidrogéis de PCS1.1 com PEI 1,3 (4 e 8) apresentaram homogeneidade, porém sinérese. Realizaram-se também testes de redução na porcentagem de PEI 25, adição de CaCl₂ para formação de reticulação iônica e alteração do pH do meio, os quais foram malsucedidos.

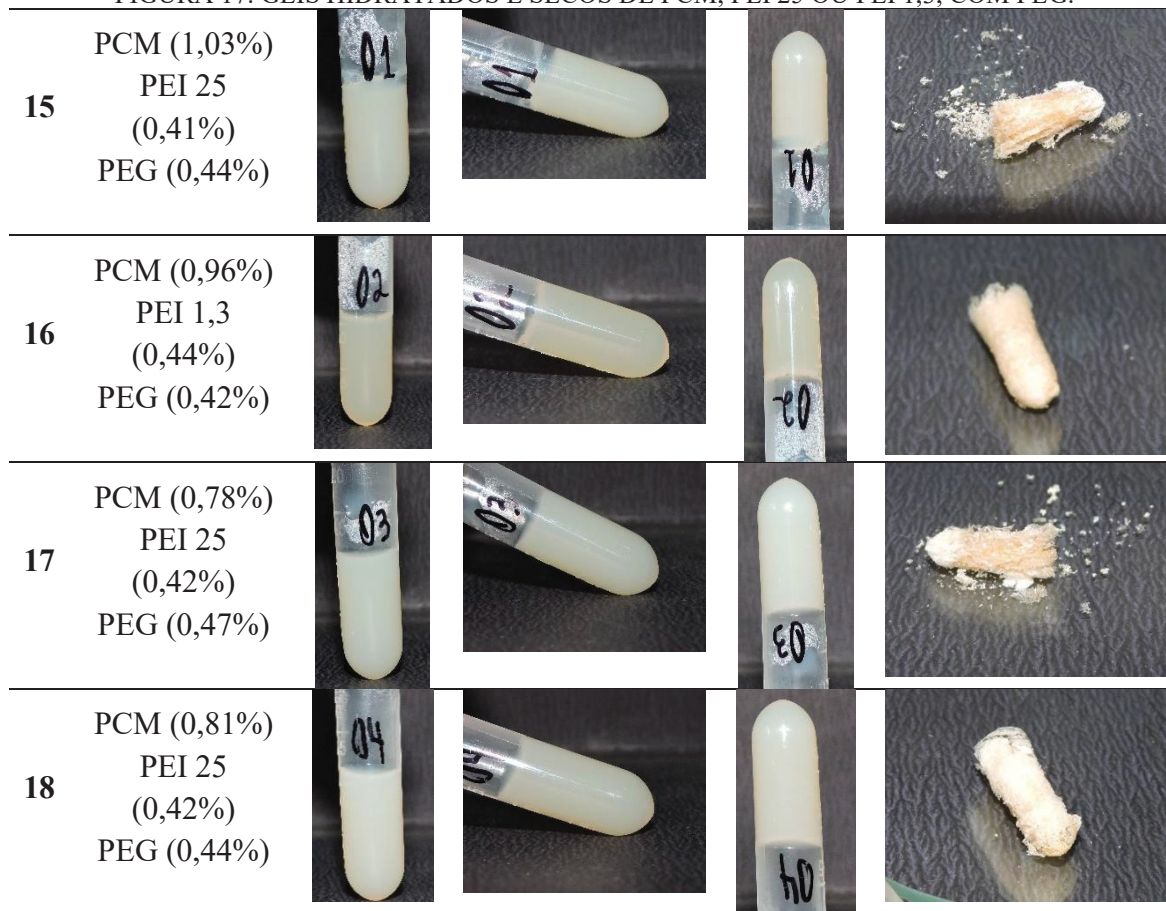
FIGURA 16. GÉIS SECOS DE PCM OU PCS2, PEI 25 OU PEI 1,3 E PEG.

9 PCM (0,77%) PEI 25 (0,34%) PEG (0,34%)		12 PCM (0,67%) PEI 1,3 (0,26%) PEG (0,29%)	
10 PCM (0,78%) PEI 1,3 (0,21%) PEG (0,37%)		13 PCS2 (0,81%) P25 (0,34%) PEG (0,33%)	
11 PCM (0,67%) PEI 25 (0,41%) PEG (0,28%)		14 PCS2 (0,70%) PEI 25 (0,40%) PEG (0,29%)	

FONTE: O AUTOR, 2020.

Os hidrogéis supracitados (1 a 8) foram secos em estufa ou por liofilização, e apresentaram fragilidade na manipulação, portanto, buscou-se como alternativa a adição de outros polímeros. Inicialmente testou-se poli (álcool vinílico) (PVA), porém os testes foram malsucedidos. Então, realizaram-se testes com a utilização de poli(etileno glicol) os quais foram bem sucedidos e estão apresentados na FIGURA A 19 (Anexo) apresenta hidrogéis de PCM (9 a 12) ou PCS2 (13 e 14) e PEG com PEI 25 ou PEI 1,3. Os testes para PCM, com PEI 25 e PEI 1,3, foram bem-sucedidos enquanto para PCS2 somente as amostras com PEI 25 formaram hidrogéis. Estes hidrogéis foram secos em estufa e as imagens dos filmes formados se encontram na FIGURA 16. Os géis com PEI 1,3 revelaram-se quebradiços, enquanto que os hidrogéis com PEI 25 apresentaram certa plasticidade. Os hidrogéis com PEG foram reproduzidos e secos por liofilização, as imagens dos géis hidratados e secos se encontram na FIGURA 17. Por fim, observa-se que os aerogéis com PEI 1,3 apresentam-se menos quebradiços. A FIGURA A 20 apresenta os números de identificação dos hidrogéis com suas respectivas composições com intuito de facilitar a assimilação durante o desenvolvimento seguinte.

FIGURA 17. GÉIS HIDRATADOS E SECOS DE PCM, PEI 25 OU PEI 1,3, COM PEG.

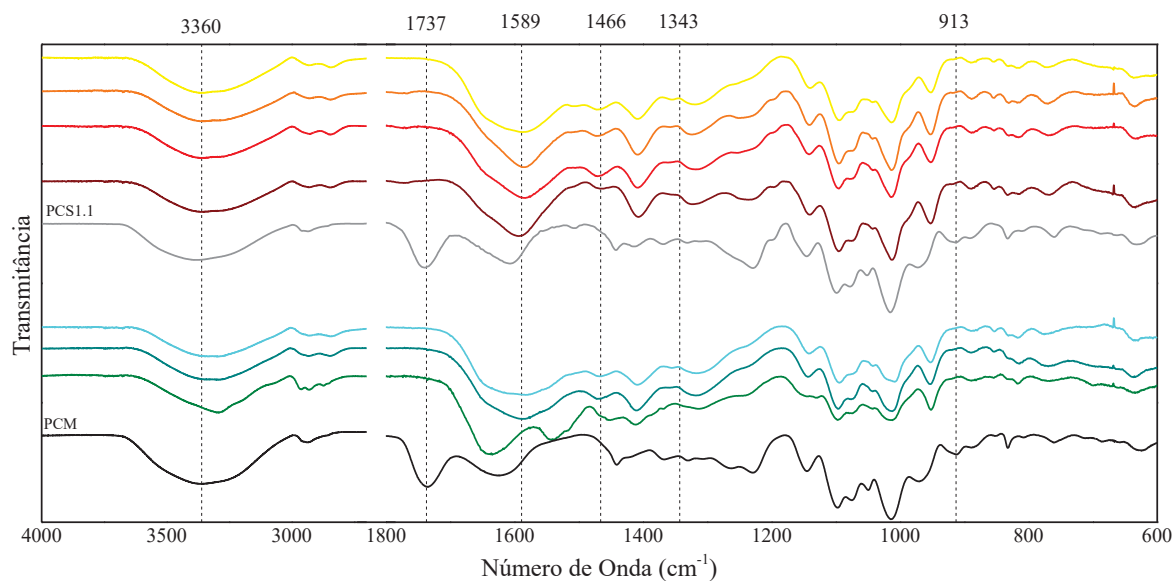


FONTE: O AUTOR, 2021.

A fim de compreender as interações formadas nos hidrogéis, realizaram-se espectros de infravermelho para as amostras 1 a 8, os quais estão presentes na FIGURA 18 e amostras 15 a 18, presentes na FIGURA 19. Observa-se a diminuição da banda de 1735 cm^{-1} em ambos os espectros, em relação a banda presente em 3360 cm^{-1} , os quais são respectivos aos grupamentos carboxila metil esterificado. Ainda, banda presente em 1622 cm^{-1} apresenta deslocamento para 1589 cm^{-1} . Essas variações nas bandas indicam interações com esses grupamentos, mais especificamente do tipo ligação de hidrogênio, sugerindo a formação de hidrogéis reversíveis.

Na FIGURA 18 observa-se os espectros no infravermelho para as amostras de hidrogéis com poli(etileno glicol) em sua composição. A banda presente em 1343 cm^{-1} confirma a presença de poli (etileno glicol).

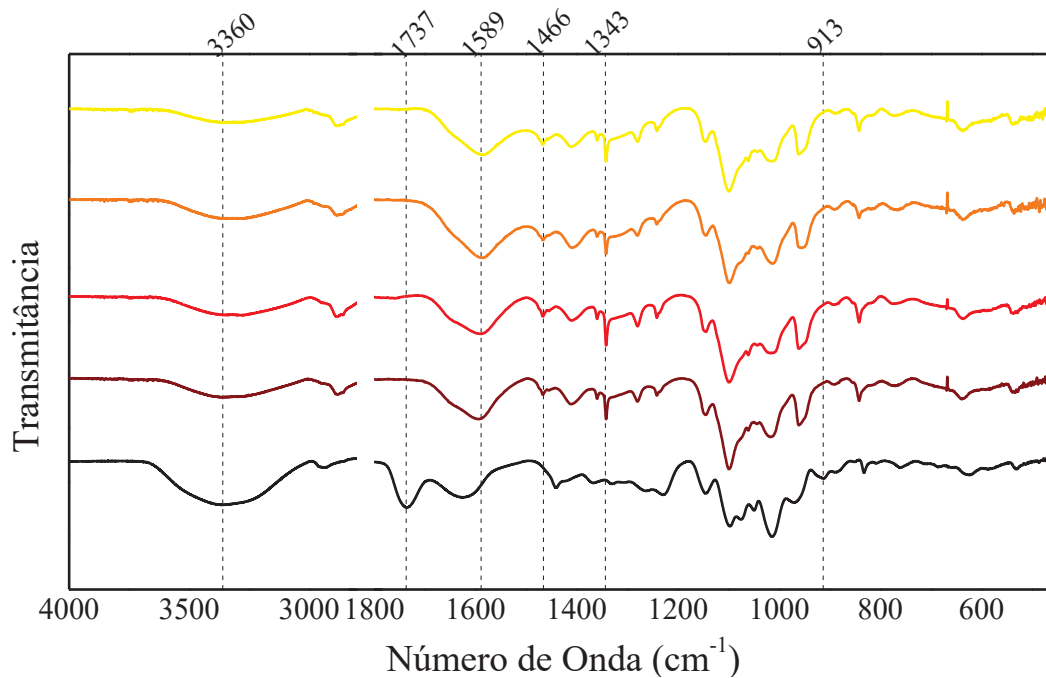
FIGURA 18. INFRAVERMELHO PARA AS AMOSTRAS DE HIDROGÉIS 1 A 8.



FONTE: O AUTOR, 2021.

Legenda: PCM; PCM (0,98%) PEI 25 (0,41%); PCM (0,79%) PEI 25 (0,48%); PCM (0,80%) PEI 1,3(0,48%); PCS1.1; PCS1.1 (1,00%) PEI 25 (0,40%); PCS1.1 (0,80%) PEI 25 (0,48%); PCS1.1 (0,98%) PEI 1,3 (0,41%); PCS1.1 (0,80%) PEI 1,3 (0,48%).

FIGURA 19. INFRAVERMELHO PARA AS AMOSTRAS DE HIDROGÉIS 15 A 18.

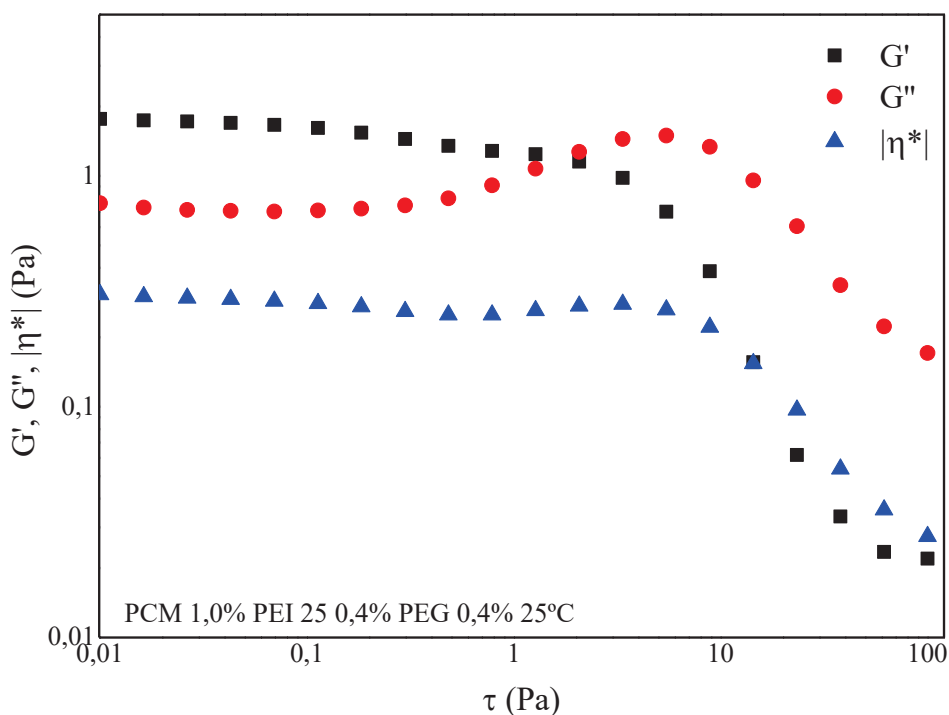


FONTE: O AUTOR, 2021.

Legenda: PCM; PCM (1,03%) PEI 25 (0,41%) PEG (0,44%); PCM (0,96%) PEI 1,3 (0,44%) PEG (0,42%); PCM (0,78%) PEI 25 (0,42%) PEG (0,47%); PCM (0,81%) PEI 25 (0,42%) PEG (0,44%).

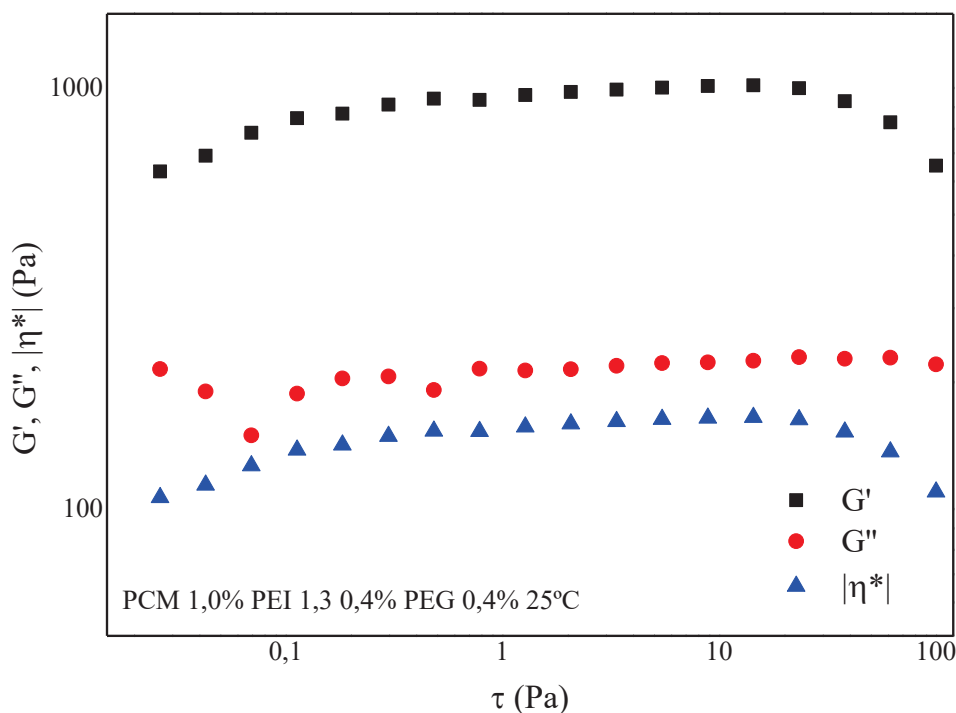
Realizaram-se análises reológicas dos hidrogéis 15 e 16, de composição PCM 1%PEI 25 0,4% PEG 0,4% e PCM 1% PEI 1,3 0,4% PEG 0,4%, respectivamente. As curvas de amplitude para os géis estão presentes nas FIGURA 20 e FIGURA 21. Ambos os hidrogéis apresentam uma faixa viscoelástica linear (LVR), em que os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') apresentam uma faixa linear entre si. A partir de uma determinada tensão de cisalhamento a resposta não é mais linear e a tensão em que ocorre a intersecção das retas é chamado de ponto de ruptura. Observa-se que o gel contendo PEI 1,3 apresenta maior resistência ao cisalhamento, visto que seu ponto de ruptura se encontra acima de 100 Pa, enquanto que o ponto de ruptura do hidrogel com PEI 25 é cerca de 1,60 Pa. Esta diferença é ocasionada pela diferença de massa molar entre as poli(etilenoiminas) utilizadas. A PEI de menor massa molar apresenta maior mobilidade e comporta-se como um melhor agente reticulante entre as cadeias de pectina. Dessa maneira o hidrogel 16 de composição PCM 1% PEI 1,3 0,4% PEG 0,4%, apresenta melhor propriedade reológica e indica a formação de uma forte estrutura tridimensional.

FIGURA 20. CURVA DE AMPLITUDE PARA A AMOSTRA DE HIDROGEL PCM 1,0% PEI 25 0,4% PEG 0,4% A 25°C.



FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA 21. CURVA DE AMPLITUDE PARA A AMOSTRA DE HIDROGEL PCM 1,0% PEI 1,3 0,4% PEG 0,4% A 25°C.



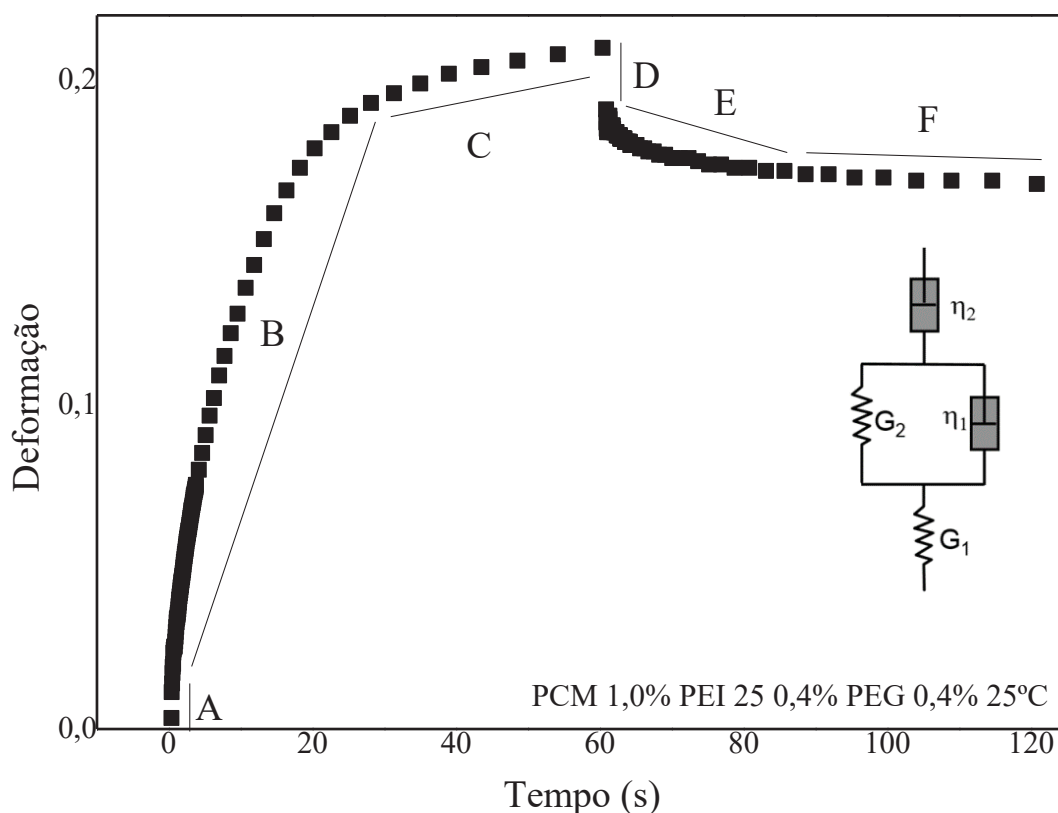
FONTE: O AUTOR, 2021.

A FIGURA 22 apresenta a curva de *creep and recovery* para a amostra de hidrogel PCM 1,0% PEI 25 0,4% PEG 0,4% a 25°C. Inicialmente (A) observamos que com o aumento da taxa de cisalhamento há a deformação instantânea da amostra até a tensão de cisalhamento de 0,01, ocasionada pelo componente elástico da amostra, mantendo a conformação original e a entropia alta (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Em um segundo momento observa-se a uma curvatura no gráfico (B), representado pelo componente viscoso, que permite a deformação através do rearranjo conformacional das cadeias, e pelo componente elástico, que atua no retardo da deformação pelas cadeias que ainda não rearranjaram sua conformação (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Após algum tempo de aplicação da taxa de cisalhamento, as cadeias apresentaram maior rearranjo conformacional e com isso o módulo viscoso se sobressai e o sistema apresenta comportamento linear, conforme a região C do gráfico (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Com a queda abrupta da taxa de cisalhamento há também a queda na tensão de cisalhamento e diminuição da deformação ocasionada pelo módulo viscoso (D) (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Então, o módulo elástico atua concomitantemente com o módulo viscoso e proporciona uma queda polinomial da deformação, por conta do retorno parcial da conformação das cadeias ao estado inicial e de maior entropia (E) (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Por fim, observa-se as forças elásticas atuando sozinhas no sistema e permitindo o fluxo do material,

porém, recuperando uma pequena parte da deformação ocorrida (F) (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016).

O hidrogel analisado apresenta um comportamento reológico que o classifica em uma região entre os líquidos e sólidos e, portanto, é um material viscoelástico (BRUMMER, 2006; MALVERN, 2016). Uma forma de representar pictoricamente e descrever o fenômeno ocorrido é por modelos em que o módulo viscoso é representado por um amortecedor e o módulo elástico por uma mola. A sequência de acontecimentos citados acima é característica do Modelo de Burguer, o qual está representado juntamente com a curva de *creep and recovery* (MALVERN, 2016).

FIGURA 22. CURVA DE *CREEP AND RECOVERY* PARA A AMOSTRA DE HIDROGEL PCM 1,0% PEI 25 0,4% PEG 0,4% A 25°C.



FONTE: O AUTOR, 2021.

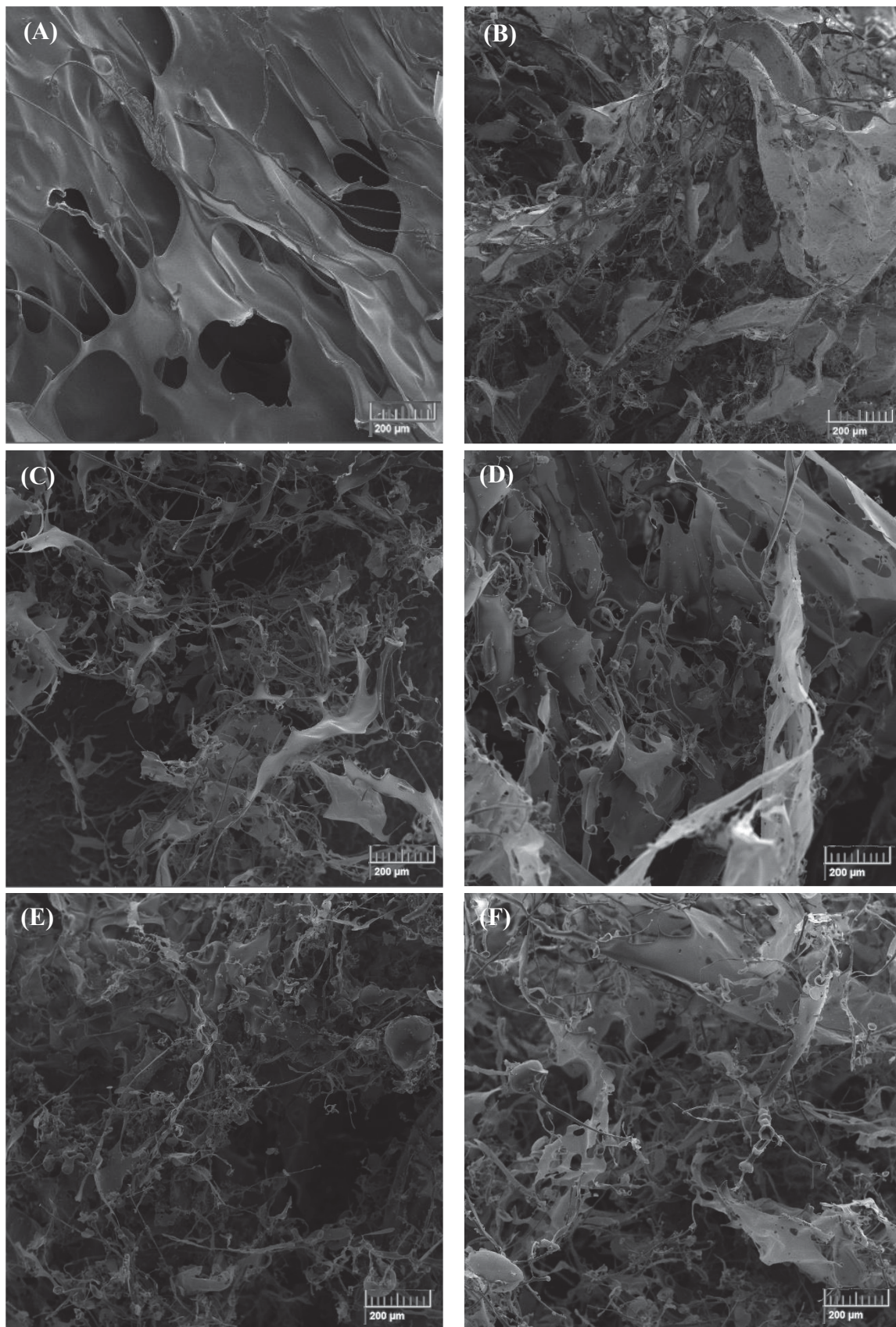
A morfologia das pectinas e dos hidrogéis foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens para as pectinas (FIGURA 23) demonstraram que a pectina do maracujá apresenta estrutura lisa, lamelar e com poucos filamentos enquanto que as pectinas modificadas apresentam estrutura altamente filamentosa.

Os hidrogéis de PCM ou PCS1.1 com PEI 25 ou PEI 1,3, apresentados na seção anterior (FIGURA A 18), foram secos por liofilização e observa-se que os aerogéis formados (FIGURA 24 e FIGURA 25) apresentam estruturas porosas similares a folhas. Ao comparar os hidrogéis produzidos com PCM, variando entre PEI 1,3 e PEI 25, observa-se a presença de estruturas filamentosas sobrepostas por estas esferas coalescidas nos hidrogéis com PEI 25 em sua superfície, indicando a produção de uma emulsão que após a liofilização demonstrou-se com separação de fases, a qual já foi observada nas imagens do teste de inclinação do tubo. As estruturas dos hidrogéis com PEI 1,3 apresentaram homogeneidade e estruturas folhosas de menores tamanhos.

Os hidrogéis produzidos com PCS1.1 e PEI 25 apresentaram sinais de separação de fases (esferas) em suas estruturas, corroborando com as imagens macroscópicas que apresentaram menor homogeneidade. As estruturas das amostras produzidas com PCS1.1 e PEI 1,3 apresentaram círculos em sua superfície e estruturas folhosas maiores do que os hidrogéis com PEI 25.

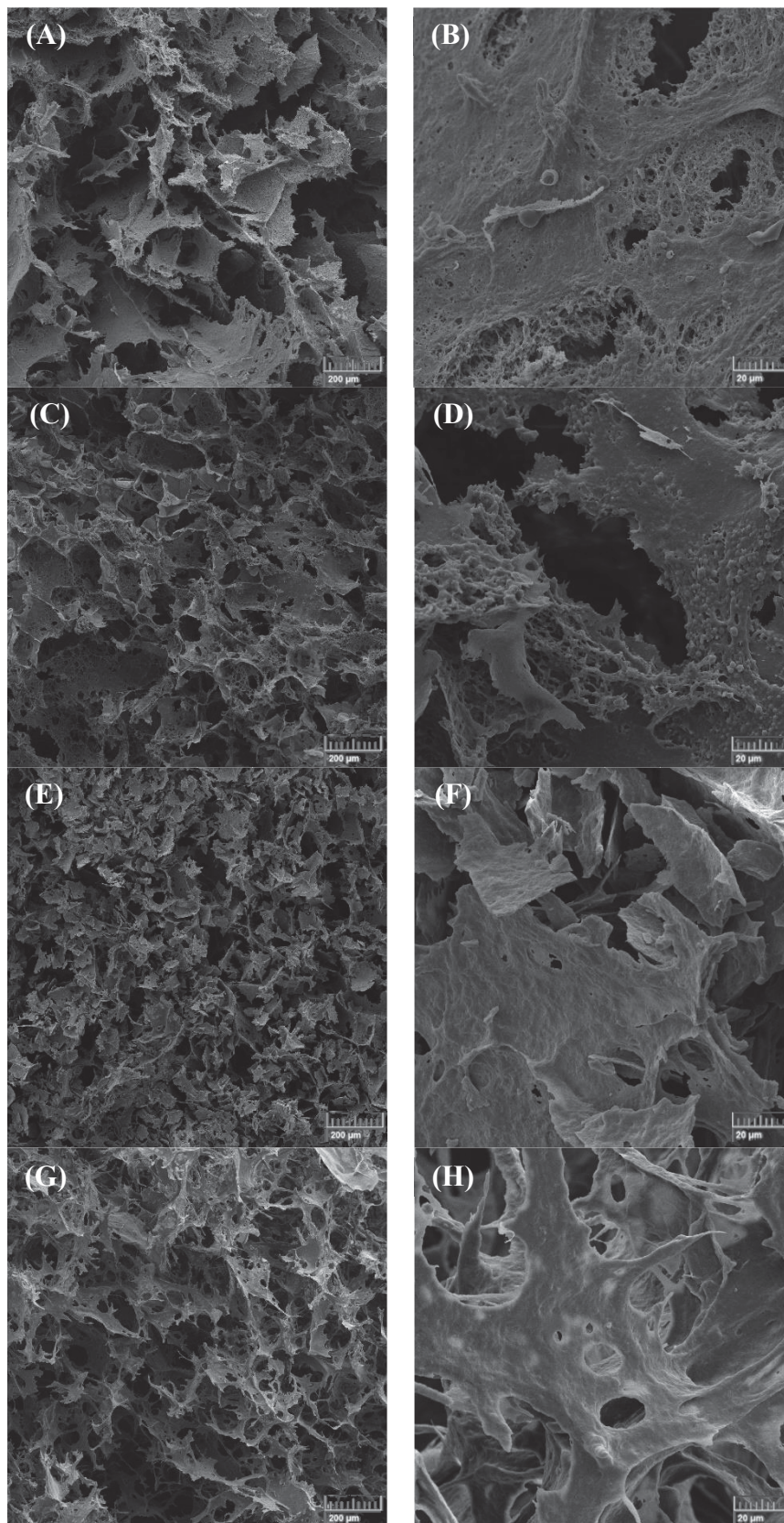
Ao avaliar os hidrogéis contendo PCM e PEG, tanto com PEI 25 quanto com PEI 1,3 na composição (FIGURA 26), observam-se estruturas extremamente lisas, lamelares e homogêneas, indicando que a adição de PEG impediu a separação de fases e formou melhores rede tridimensionais.

FIGURA 23. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA, COM 200 VEZES DE AUMENTO, DA PECTINA DO MARACUJÁ (A) PCM E AS PECTINAS SULFATADAS (B) PCS1.1, (C) PCS1.2, (D) PCS1.3, (E) PCS2 E (F) PCS3.



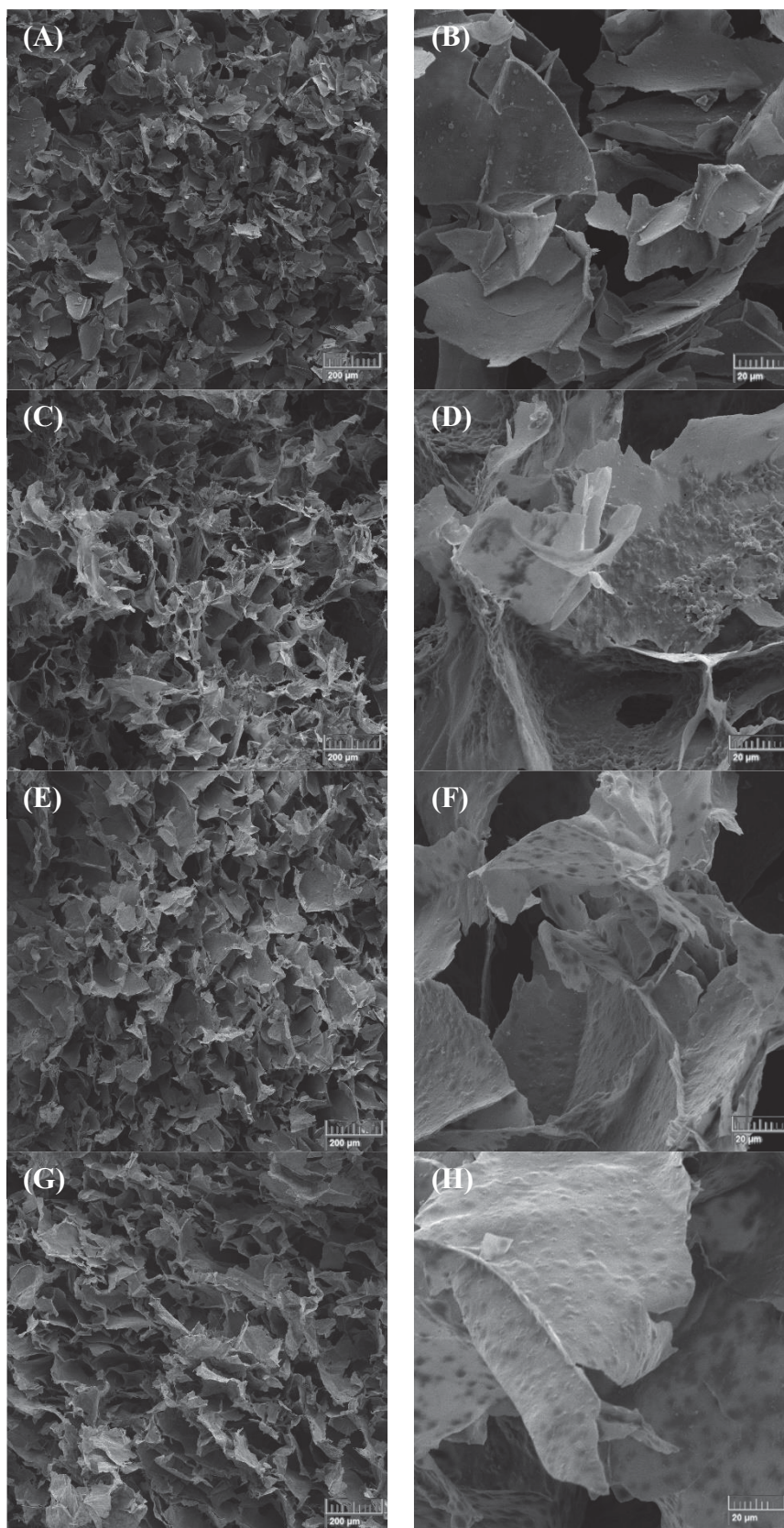
FONTE: O AUTOR, 2020.

FIGURA 24. MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA PARA HIDROGÉIS DE (A;B) PCM (0,98%) PEI 25 (0,41%); (C;D) PCM (0,79%) PEI 25 (0,48%); (E;F) PCM (0,98%) PEI 1,3 (0,40%); (G;H) PCM (0,80%) PEI 1,3 (0,48%). AUMENTO DE 200 VEZES À ESQUERDA E 2000 VEZES À DIREITA.



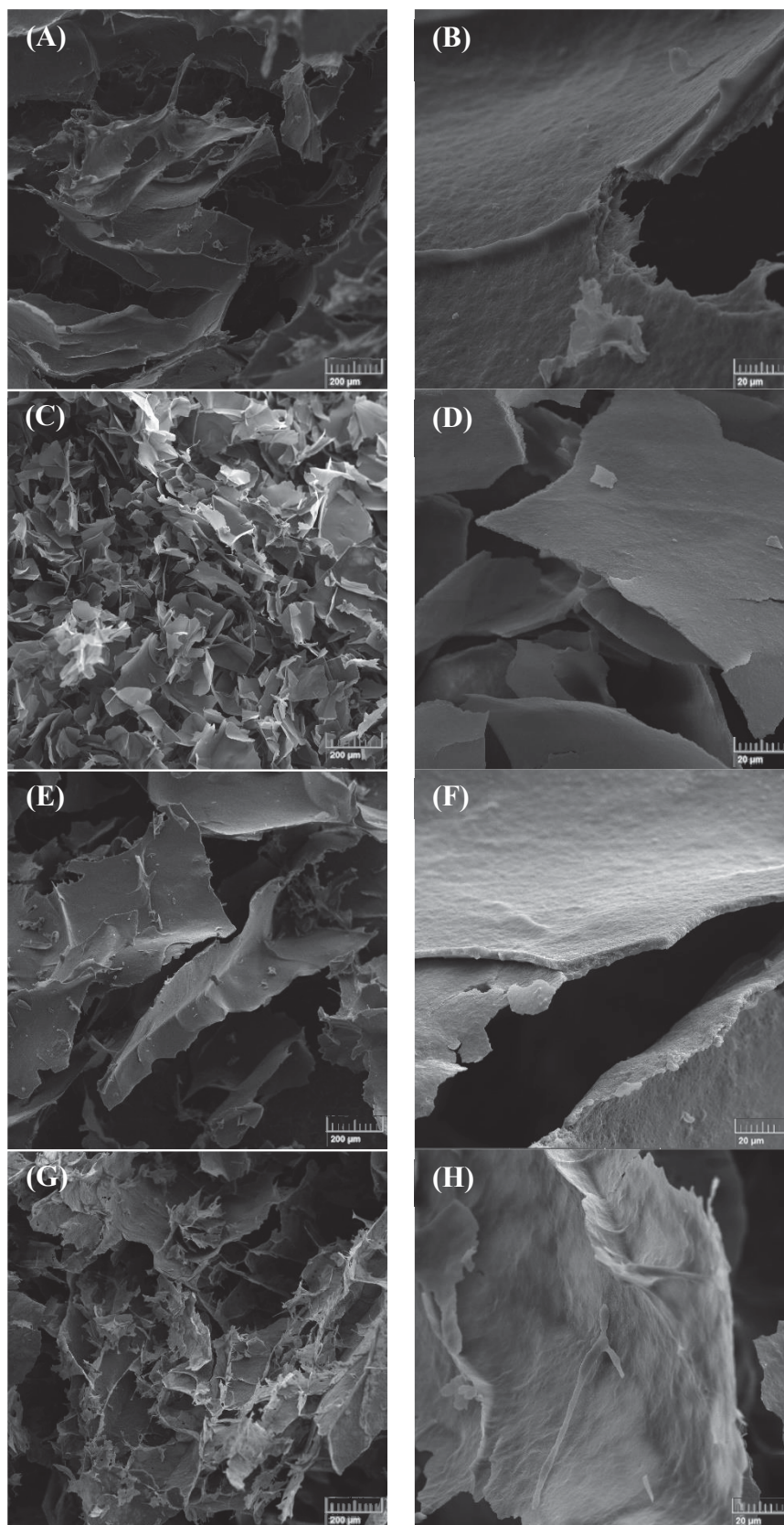
FONTE: O AUTOR, 2020.

FIGURA 25. IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS HIDROGÉIS DE (A; B) PCS1.1(1,00%) PEI 25 (0,40%); (C; D) PCS1.1(0,80%) PEI 25 (0,48%); (E; F) PCS1.1(0,98%) PEI 1,3 (0,41%); (G; H) PCS1.1 (0,80%) PEI 1,3 (0,48%). AUMENTO DE 200 VEZES À ESQUERDA E 2000 VEZES À DIREITA.



FONTE: O AUTOR, 2020.

FIGURA 26. MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA PARA HIDROGÉIS DE (A; B) PCM (1,03%) PEI 25 (0,41%) PEG (0,44%); (C; D) PCM (0,96%) PEI 1,3 (0,44%) PEG (0,42%); (E; F) PCM (0,78%) PEI 25 (0,42%) PEG (0,47%) E (G; H) PCM (0,81%) PEI 1,3 (0,42%) PEG (0,44%). AUMENTO DE 200 VEZES À ESQUERDA E 2000 À DIREITA.



FONTE: O AUTOR, 2020.

5. CONCLUSÕES

Esta pesquisa propôs a sulfatação e caracterização da pectina extraída do maracujá amarelo e derivados, a fim de desenvolver e caracterizar hidrogéis compostos de pectina (modificada e não modificada), poli (etilenoimina) e poli (etilenoglicol), com a hipótese de preparar hidrogéis de boas propriedades reológicas para futuras aplicações.

Os estudos físico-químicos de caracterização das amostras de pectina do maracujá, não sulfatadas e sulfatadas, foram realizados com o intuito de caracterizar as amostras em termos de massas molares e dispersão, estrutura química, morfologia das amostras, conformação e estabilidade coloidal das dispersões.

Com as análises de HPSEC observou-se que as amostras estudadas são dispersas em termos de massa molar. Com os resultados obtidos de RMN, FTIR e PCA conclui-se que a pectina é uma homogalacturonana composta de ácidos urônicos com 77,84% dos seus grupos metil esterificados. Com a modificação, observou-se que as amostras apresentaram variação nos grupamentos metil esterificados, pela purificação em diálise, e diminuição significativa dos grupamentos hidroxilas dos carbonos 2 e 3, o que é um indicativo da modificação com grupos sulfato.

As medidas de potencial zeta indicaram que as amostras PCM, PCS1.1 e PCS2 apresentaram valores inferiores a -30 mV, ou seja, estabilidade coloidal em seu pH natural. A determinação do pKa para as amostras com base no potencial zeta máximo alcançou valores de 3,37 e 3,03 para PCM e 3,43 e 3,18 para PCS1.3. Ainda, determinou-se o pKa com base em titulação potenciométrica em que se obtiveram os valores de 3,54 para PCM e 3,64 para PCS1.3. Dessa maneira, os valores de pKa ficaram próximos do valor de pKa dos grupamentos carboxila (3,5), apresentaram baixos desvios e validaram a técnica realizada no equipamento de potencial zeta.

As análises de viscosidade com dispersões aquosas de PCM e PCS1.3 demonstraram comportamentos característicos de polieletrólitos para as amostras a baixas concentrações. As mesmas análises para PCM em tampão PBS reduziram o efeito polieletrólito e forneceram valores de viscosidade intrínseca e constante de Huggins que indicam a presença de agregados nas dispersões estudadas. Análises de espalhamento de luz dinâmico das mesmas amostras indicaram valores de raio hidrodinâmico, índice de polidispersão e coeficiente de difusão e confirmaram a presença de agregados nos sistemas.

Quanto a morfologia, a amostra de PCM apresenta superfície lisa e lamelar, e as amostras modificadas apresentaram filamentos. Os hidrogéis produzidos apresentaram morfologias porosas e estruturas similares a folhas. Os hidrogéis com PEI 25 apresentaram

separação de fases, a qual foi reduzida com a adição de PEG aos sistemas. Além disso, a adição de PEG tornou os sistemas mais homogêneas, lisos e lamelares. As análises por infravermelho indicam que as redes tridimensionais estão reticuladas a partir de ligações de hidrogênio, fazendo com que estes géis sejam caracterizados como hidrogéis

Os hidrogéis com PEI 1,3 e PEG apresentaram as melhores propriedades macroscópicas e microscópicas, assim, foram estudadas a partir de reometria. Os estudos reológicos demonstraram que, dentre as amostras estudadas, o hidrogel de composição PCM 1% PEI 1,3 0,4% PEG 0,4% apresentou os melhores resultados reológicos.

Estudos complementares podem ser desenvolvidos a fim de concluir com clareza a caracterização das amostras, como por exemplo por análise elementar, titulação turbidimétrica, TGA, dicroísmo circular e espectroscopia de massas. Os estudos devem ainda dar continuidade no sentido de compreender a aplicabilidade das amostras, tanto das pectinas quanto dos hidrogéis, como possíveis materiais heparinóides, géis para modelos de crescimento celular tridimensional, dentre outros.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, Kahlile Youssef et al. Gastroprotective effect of soluble dietary fibres from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel against ethanol-induced ulcer in rats. **Journal of Functional Foods**, 2019.
- _____. High methoxyl pectin from the soluble dietary fiber of passion fruit peel forms weak gel without the requirement of sugar addition. **Carbohydrate Polymers**, v. 246, p. 116616, 15 out. 2020.
- ABITBOL, Tiffany et al. Cellulose nanocrystal/low methoxyl pectin gels produced by internal ionotropic gelation. **Carbohydrate Polymers**, v. 260, p. 117345, 15 maio 2021.
- APPELHANS, Dietmar et al. Hyperbranched PEI with various oligosaccharide architectures: Synthesis, characterization, ATP complexation, and cellular uptake properties. **Biomacromolecules**, 2009.
- ASGARI, Kianoosh et al. High-methylated pectin from walnut processing wastes as a potential resource: Ultrasound assisted extraction and physicochemical, structural and functional analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, 18 nov. 2019.
- BARBOSA, Joao A.C. et al. Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa. **International Journal of Pharmaceutics: X**, 2019.
- BOMBALDI DE SOUZA, Fernanda Carla et al. A simple and effective approach to produce tubular polysaccharide-based hydrogel scaffolds. **Journal of Applied Polymer Science**, 2019.
- BORRO, Bruno C.; MALMSTEN, Martin. **Complexation between antimicrobial peptides and polyelectrolytes**. *Advances in Colloid and Interface Science*. [S.l.: s.n.], 2019
- BREJNHOLT, Sarah M. Pectin. **Food Stabilisers, Thick. Gelling Agents**. [S.l.: s.n.], 2009. .
- BRUMMER, R. Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions. **Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions**, 2006.
- CANTERI, Maria H.G. et al. A Comparative Study of Pectin Extracted from Passion Fruit Rind Flours. **Journal of Polymers and the Environment**, 2010.
- CAPUTO, Hannah E.; STRAUB, John E.; GRINSTAFF, Mark W. **Design, synthesis, and biomedical applications of synthetic sulphated polysaccharides**. *Chemical Society Reviews*. [S.l.: s.n.], 2019
- CERNENCU, Alexandra I. et al. Bioinspired 3D printable pectin-nanocellulose ink formulations. **Carbohydrate Polymers**, v. 220, p. 12–21, 15 set. 2019.
- CHAOUCH, Mohamed Aymen et al. Access to new anticoagulant by sulfation of pectin-like polysaccharides isolated from *Opuntia ficus indica* cladodes. **International Journal**

of **Biological Macromolecules**, 2018.

CHEN, Jun et al. Pectin Modifications: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015.

CHEN, Ling; HUANG, Gangliang. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

CORRÊA-FERREIRA, Marília Locatelli et al. Gastroprotective effects and structural characterization of a pectic fraction isolated from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

DE SOUZA, Caroline G. et al. Sequential extraction of flavonoids and pectin from yellow passion fruit rind using pressurized solvent or ultrasound. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018.

DI DONATO, Paola et al. Vegetable wastes derived polysaccharides as natural eco-friendly plasticizers of sodium alginate. **Carbohydrate Polymers**, 2020.

DIMITROV, I.; TSVETANOV, C. B. Oligomeric Poly(ethylene oxide)s: Functionalized Poly(ethylene glycol)s. PEGylation. **Polym. Sci. A Compr. Ref. 10 Vol. Set.** [S.l: s.n.], 2012. .

DOBRYNIN, Andrey V. Polyelectrolytes: On the doorsteps of the second century. **Polymer**, p. 122714, 28 jun. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386120305449>>. Acesso em: 29 jun. 2020.

DOS REIS, Luzia Caroline Ramos et al. Antioxidant potential and physicochemical characterization of yellow, purple and orange passion fruit. **Journal of Food Science and Technology**, 2018.

EINHORN-STOLL, Ulrike. Pectin-water interactions in foods – From powder to gel. **Food Hydrocolloids**, v. 78, p. 109–119, 1 maio 2018.

_____. Thermal degradation of citrus pectin in low-moisture environment - Influence of acidic and alkaline pre-treatment. **Food Hydrocolloids**, 2019.

FAN, Lihong et al. Synthesis and anticoagulant activity of pectin sulfates. **Journal of Applied Polymer Science**, 2012.

FAO, Food and Agriculture Organization. **Food Outlook- Biannual report on global food markets**. July 2018 ed. [S.l: s.n.], 2018.

FERREIRA, Márcia M.C. et al. Quimiometria i: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 1999.

FLUTTO, L. PECTIN | Properties and Determination. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 4440–4449, 1 jan. 2003.

FUOSS, Raymond M.; STRAUSS, Ulrich P. Electrostatic interaction of polyelectrolytes and simple electrolytes. **Journal of Polymer Science**, 1948.

GAO, Jian Qing et al. Gene-carried chitosan-linked-PEI induced high gene transfection efficiency with low toxicity and significant tumor-suppressive activity. **International**

Journal of Pharmaceutics, 2010.

GHORBANI, Marjan; NEZHAD-MOKHTARI, Parinaz; MAHMOODZADEH, Farideh. Incorporation of Oxidized Pectin to Reinforce Collagen/Konjac Glucomannan Hydrogels Designed for Tissue Engineering Applications. **Macromolecular Research**, v. 29, n. 4, p. 289–296, 1 abr. 2021. Disponível em: <www.springer.com/13233pISSN1598-5032eISSN2092-7673>. Acesso em: 25 maio 2021.

GRASDALEN, Hans; EINAR BAKØY, Ole; LARSEN, Bjørn. Determination of the degree of esterification and the distribution of methylated and free carboxyl groups in pectins by ¹H-n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, 1988.

GREIN-IANKOVSKI, Aline et al. A comprehensive study of the relation between structural and physical chemical properties of acacia gums. **Food Hydrocolloids**, 2018.

GUO, Jingxin; KALETUNÇ, Gönül. Dissolution kinetics of pH responsive alginate-pectin hydrogel particles. **Food Research International**, 2016.

GUSTAFSSON, Jan et al. The influence of pH and NaCl on the zeta potential and rheology of anatase dispersions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2000.

HÖBEL, Sabrina et al. Maltose- and maltotriose-modified, hyperbranched poly(ethylene imine)s (OM-PEIs): Physicochemical and biological properties of DNA and siRNA complexes. **Journal of Controlled Release**, 2011.

HOFFMAN, Allan S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2002.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal - PAM | IBGE**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?edicao=29008&t=sobre>>. Acesso em: 11 maio 2021.

JANTRAWUT, Pensak et al. Fabrication and characterization of low methoxyl pectin/gelatin/carboxymethyl cellulose absorbent hydrogel film for wound dressing applications. **Materials**, 2019.

JASKI, Ana Caroline; SIMAS, Fernanda Fogagnoli; RIEGEL-VIDOTTI, Izabel C. **Hidrogéis binários de poli (álcool) vinílico e pectinas: avaliação de propriedades físico-químicas e utilização como fase extratora**. . Curitiba PR: [s.n.], 2019

JIANG, Wen xin et al. Emulsifying properties of high methoxyl pectins in binary systems of water-ethanol. **Carbohydrate Polymers**, 2020.

JIANG, Xinguo; GAO, Huile. **Neurotox. Nanomater. Nanomedicine**. [S.l: s.n.], 2016.

JIANG, Yang et al. Pectin extracted from persimmon peel: A physicochemical characterization and emulsifying properties evaluation. **Food Hydrocolloids**, v. 101, 1 abr. 2020.

JOSEPH, Emil; SINGHVI, Gautam. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. **Nanomater. Drug Deliv. Ther.** [S.l: s.n.], 2019. .

KASTNER, H.; EINHORN-STOLL, U.; DRUSCH, S. Influence of enzymatic and acidic

- demethoxylation on structure formation in sugar containing citrus pectin gels. **Food Hydrocolloids**, 2019.
- KATO, Norihiro et al. Structuring of multiple parallel pectin gel filaments by applied shear. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.
- KLINCHONGKON, Khwanjai; KHUWIJITJARU, Pramote; ADACHI, Shuji. Properties of subcritical water-hydrolyzed passion fruit (*Passiflora edulis*) pectin. **Food Hydrocolloids**, 2018.
- KOCAAGA, Banu et al. Low-methoxyl pectin–zeolite hydrogels controlling drug release promote in vitro wound healing. **Journal of Applied Polymer Science**, 2019.
- KRONBERG, Bengt; HOLMBERG, Krister; LINDMAN, Björn. **Surf. Chem. Surfactants Polym.** [S.l: s.n.], 2014.
- KULICKE, Werner-Michael; CLASEN, Christian. **Viscosimetry of Polymers and Polyelectrolytes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-10796-6>>. Acesso em: 4 nov. 2020. (Springer Laboratory).
- KUMAR, Ajeet; DIXIT, Chandra Kumar. Methods for characterization of nanoparticles. **Adv. Nanomedicine Deliv. Ther. Nucleic Acids**. [S.l: s.n.], 2017. .
- LARM, Olle et al. The preparation of a heparin analogue from alginic acid. **Carbohydrate Research**, v. 73, n. 1, p. 332–336, 1 ago. 1979.
- LECLERE, Lionel et al. Identification of a cytotoxic molecule in heat-modified citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, 2016.
- LIMA, Aline M.F.; SOLDI, Valdir; BORSALI, Redouane. Dynamic light scattering and viscosimetry of aqueous solutions of pectin, sodium alginate and their mixtures: Effects of added salt, concentration, counterions, temperature and chelating agent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009.
- LIN, Yupeng et al. Structural and rheological characterization of pectin from passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel extracted by high-speed shearing. **Food Hydrocolloids**, v. 114, p. 106555, 1 maio 2021a.
- _____. Structural and rheological characterization of pectin from passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) peel extracted by high-speed shearing. **Food Hydrocolloids**, v. 114, p. 106555, 1 maio 2021b.
- LIU, Zhanpeng; GUO, Xiaoming; MENG, Hecheng. Added ferulic acid enhances the emulsifying properties of pectins from different sources. **Food Hydrocolloids**, 2020.
- LONG, Jingjunjiao et al. A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery. **Materials Science and Engineering C**, 2019.
- LU, Guang Wei; GAO, Ping. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. **Handb. Non-Invasive Drug Deliv. Syst.** [S.l: s.n.], 2010. .
- LUCAS, Elizabete F; SOARES, Bluma G; MONTEIRO, Elisabeth E. C. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. 1. ed. Rio de Janeiro: e-papers, 2001.

MALVERN, Instruments. **A Basic Introduction to Rheology Shear Flow. WHITEPAPER.** [S.l: s.n.], 2016

MARENDA, Flávia Roberta Buss et al. Advances in Studies Using Vegetable Wastes to Obtain Pectic Substances: A Review. **Journal of Polymers and the Environment**, 2019.

MEHRALI, Mehdi et al. Pectin Methacrylate (PEMA) and Gelatin-Based Hydrogels for Cell Delivery: Converting Waste Materials into Biomaterials. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 2019.

MUNHOZ, Davi R. et al. Sustainable Production and in vitro Biodegradability of Edible Films from Yellow Passion Fruit Coproducts via Continuous Casting. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, 2018.

MZOUGH, Zeineb et al. Optimized extraction of pectin-like polysaccharide from Suaeda fruticosa leaves: Characterization, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities. **Carbohydrate Polymers**, 2018.

PAVIA, Donald L.; LAMPMAN, Gary M.; KRIZ, George S. **Introduction to Spectroscopy third edition. Thomson Learning, Inc.** [S.l: s.n.], 2001

PEPPAS, N. A. et al. **Hydrogels in pharmaceutical formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** [S.l: s.n.], 2000

PETTINELLI, Natalia et al. Entrapment of chitosan, pectin or κ -carrageenan within methacrylate based hydrogels: Effect on swelling and mechanical properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, p. 583–590, 1 mar. 2019.

RICHTER, Anne et al. PH-stable hyperbranched poly(ethyleneimine)-maltose films for the interaction with phosphate containing drugs. **New Journal of Chemistry**, 2010.

RODSAMRAN, Patrathip; SOTHORNVIT, Rungsinee. Microwave heating extraction of pectin from lime peel: Characterization and properties compared with the conventional heating method. **Food Chemistry**, v. 278, p. 364–372, 25 abr. 2019.

ROMÁN, Yony et al. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, 2017.

_____. Optimization of chemical sulfation, structural characterization and anticoagulant activity of Agaricus bisporus fucogalactan. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 345–352, 1 ago. 2016.

ROSS-MURPHY, S. B. Physical techniques for the study of food biopolymers. p. 450, 1994.

SCHRAMM, Laurier L. Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications. **Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications**, p. 1–448, 29 mar. 2006.

SHAHZAD, Amna et al. Formulation development and characterization of cefazolin nanoparticles-loaded cross-linked films of sodium alginate and pectin as wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

SHAIKH, Shifa M.R. et al. **Influence of polyelectrolytes and other polymer complexes on the flocculation and rheological behaviors of clay minerals: A comprehensive**

- review. Separation and Purification Technology.** [S.l: s.n.], 2017
- SHITRIT, Yulia; DAVIDOVICH-PINHAS, Maya; BIANCO-PELED, Havazelet. Shear thinning pectin hydrogels physically cross-linked with chitosan nanogels. **Carbohydrate Polymers**, 2019.
- SILA, D N et al. Pectins in Processed Fruits and Vegetables: Part II-Structure-Function Relationships. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2009.
- SUN, S. F. Physical Chemistry of Macromolecules. **Physical Chemistry of Macromolecules**, 16 jan. 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471623571>>. Acesso em: 26 maio 2022.
- THAKUR, Sourbh et al. **Progress in pectin based hydrogels for water purification: Trends and challenges.** **Journal of Environmental Management.** [S.l: s.n.], 2019
- TURETTA, Matteo et al. Emerging Technologies for Cancer Research: Towards Personalized Medicine with Microfluidic Platforms and 3D Tumor Models. **Current Medicinal Chemistry**, 2018.
- VAN HAVER, Lucie; NAYAR, Sasi. **Polyelectrolyte flocculants in harvesting microalgal biomass for food and feed applications.** **Algal Research.** [S.l: s.n.], 2017
- WANG, Li et al. **Porous and responsive hydrogels for cell therapy.** **Current Opinion in Colloid and Interface Science.** [S.l: s.n.], 2018
- WANG, Wenjun et al. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. **Food Chemistry**, 2015.
- WANG, Xiaomei et al. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2013.
- WEN, Shihui et al. Surface modification and PEGylation of branched polyethyleneimine for improved biocompatibility. **Journal of Applied Polymer Science**, 2013.
- WILLIAMS, T. **Gel permeation chromatography: A review.** **Journal of Materials Science.** [S.l: s.n.], 1970
- WINNING, Hanne et al. Quantification of the degree of blockiness in pectins using ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Hydrocolloids**, 2007.
- WOLF, Sebastian; MOUILLE, Grégory; PELLOUX, Jérôme. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. **Molecular Plant**, 2009.
- WU, Danjun et al. **Chitosan-based Colloidal Polyelectrolyte Complexes for Drug Delivery: A Review.** **Carbohydrate Polymers.** [S.l: s.n.], 2020
- YE, Dongdong; CHANG, Chunyu; ZHANG, Lina. High-Strength and Tough Cellulose Hydrogels Chemically Dual Cross-Linked by Using Low- and High-Molecular-Weight Cross-Linkers. **Biomacromolecules**, 2019.
- YOO, Sang Ho et al. Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. **Food Hydrocolloids**, 2006.

YUAN, Weiyong et al. Weak polyelectrolyte-based multilayers via layer-by-layer assembly: Approaches, properties, and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 282, p. 102200, 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868619304397>>. Acesso em: 27 jun. 2020.

Z Aid, Rubaiyi M. et al. *Hylocereus polyrhizus* peel's high-methoxyl pectin: A potential source of hypolipidemic agent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 361–367, 1 ago. 2019.

ZALIPSKY, Samuel; HARRIS, J. Milton. Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol). **ACS Symposium Series**, 1997.

ZHANG, Kai et al. FT Raman investigation of novel chitosan sulfates exhibiting osteogenic capacity. **Carbohydrate Polymers**, 2011.

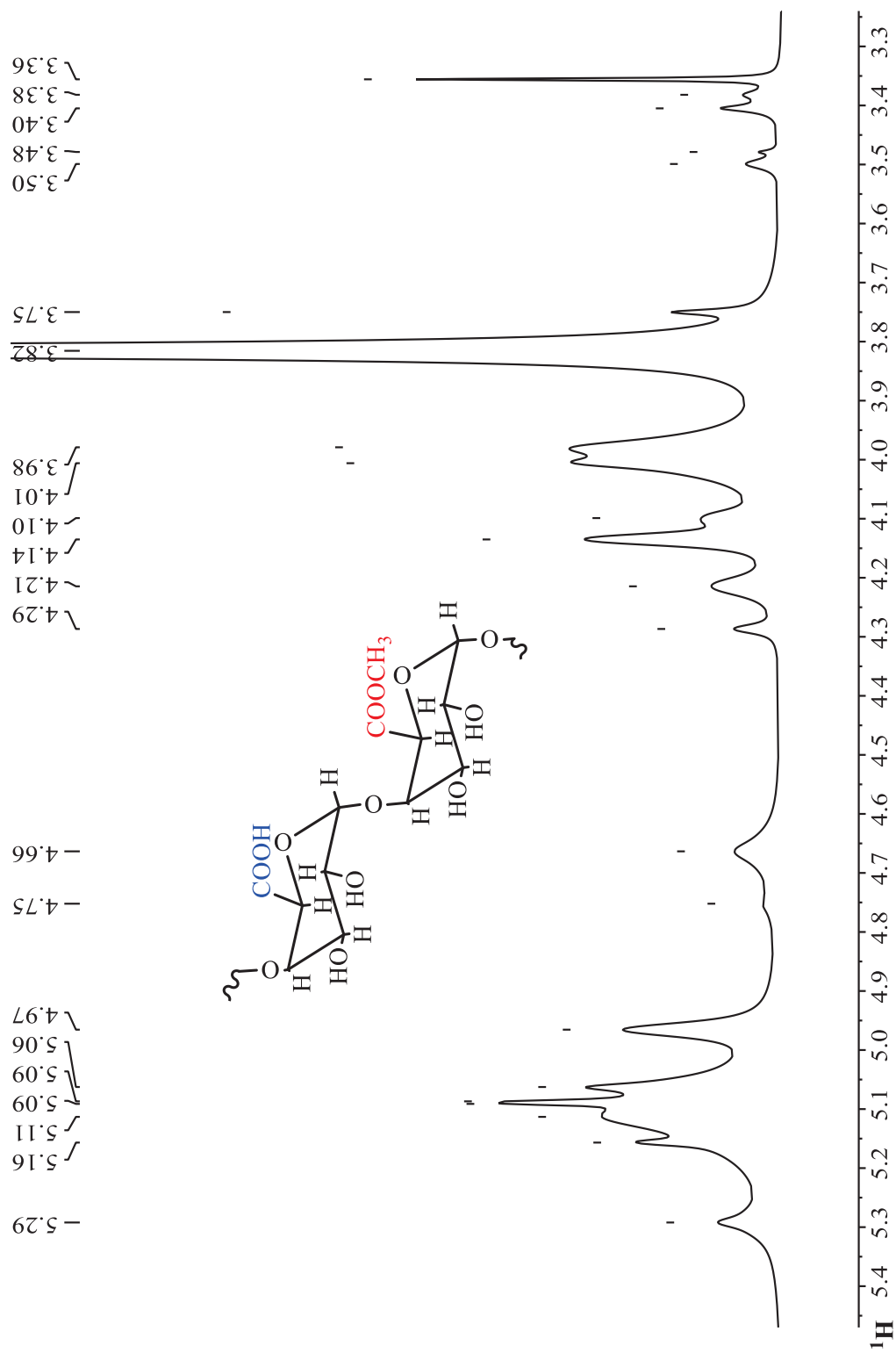
ZHANG, Lifen et al. Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure and rheological properties of apple pectin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 222–231, 1 jan. 2013.

ZHANG, Ying et al. Ionic-crosslinked polysaccharide/PEI/DNA nanoparticles for stabilized gene delivery. **Carbohydrate Polymers**, 2018.

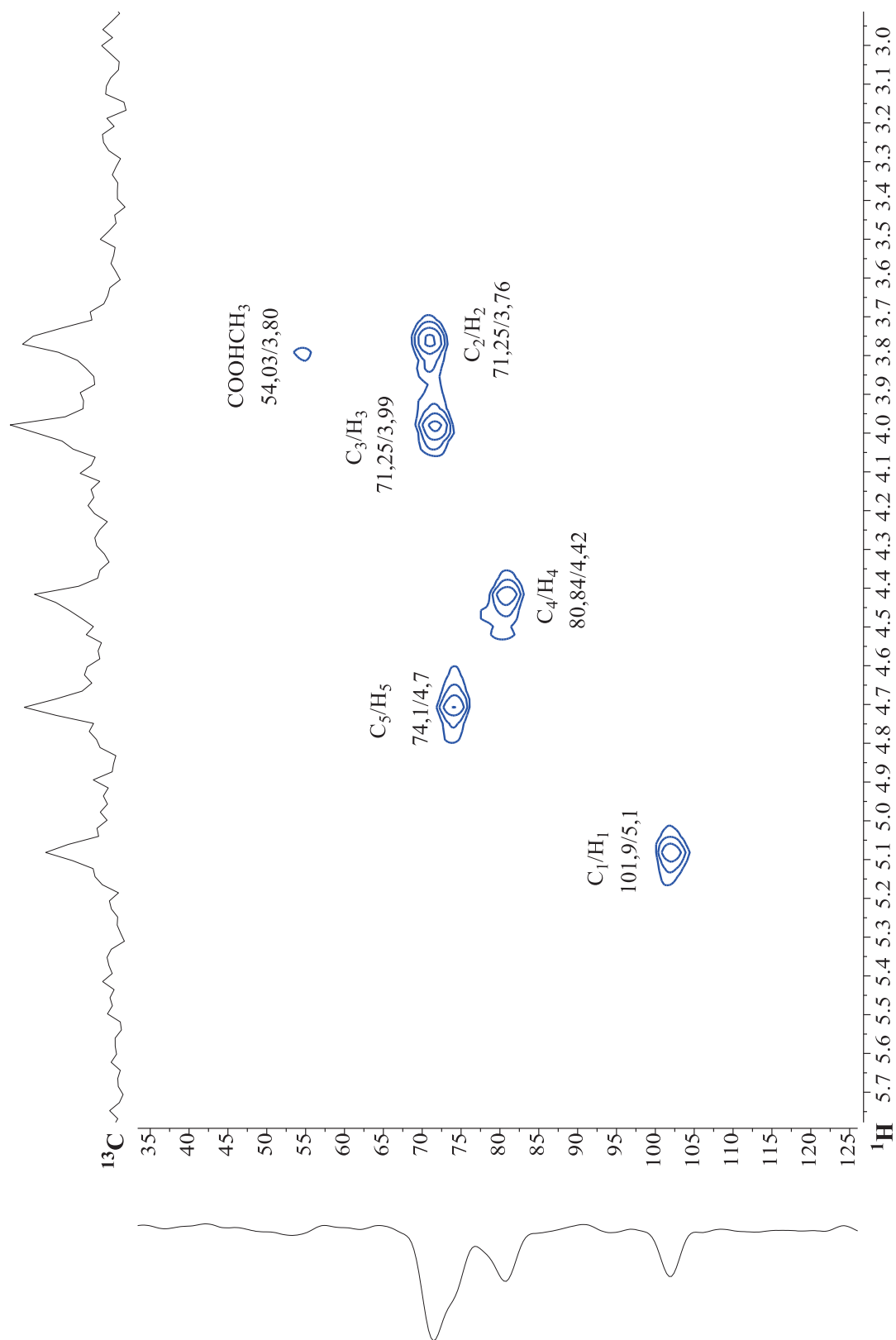
ZHAO, Liman et al. Glycopolymers/PEI complexes as serum-tolerant vectors for enhanced gene delivery to hepatocytes. **Carbohydrate Polymers**, 2019.

ANEXO - Material Complementar

FIGURA A 1. ESPECTRO DE RMN 1H PARA A PECTINA DO MARACUJÁ EM D2O A 60°C.

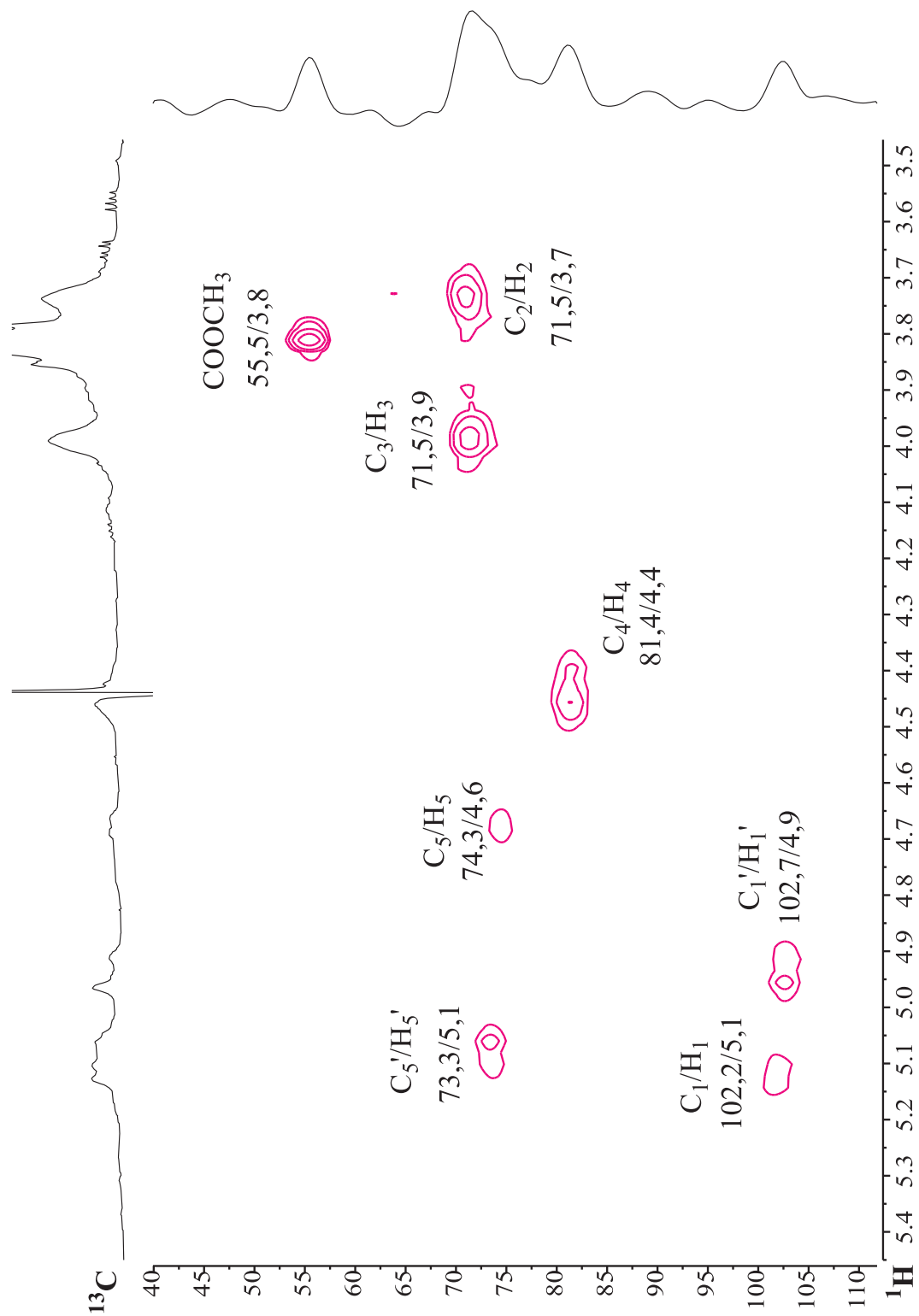


FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 2. MAPA DE CORRELAÇÃO 2D DE ^1H E ^{13}C – HSQC EM D_2O A 60°C PARA A PECTINA MODIFICADA PCS1.3.

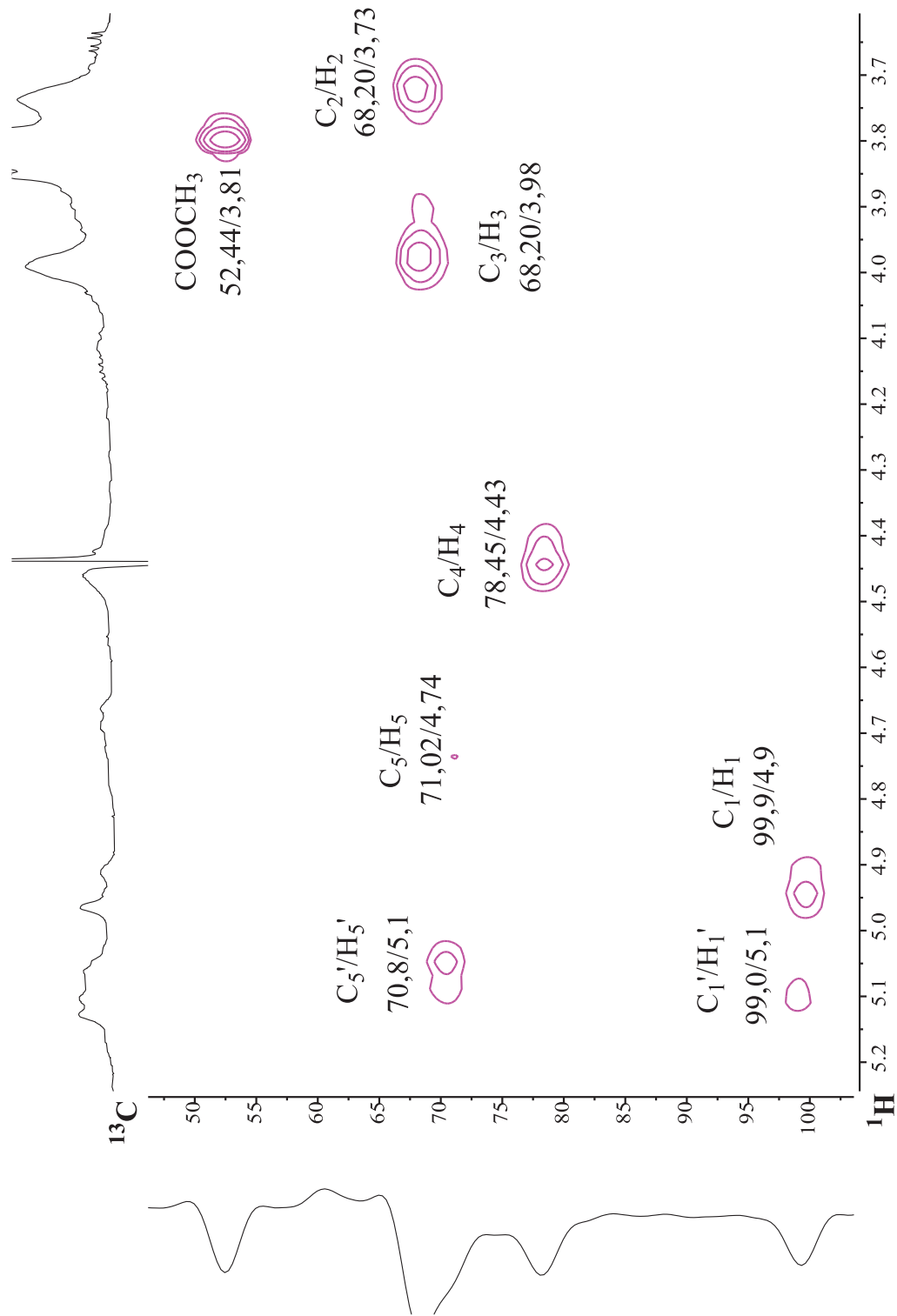
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 3. MAPA DE CORRELAÇÃO 2D DE ^1H E ^{13}C – HSQC EM D_2O A 60°C PARA A PECTINA MODIFICADA PCS2.



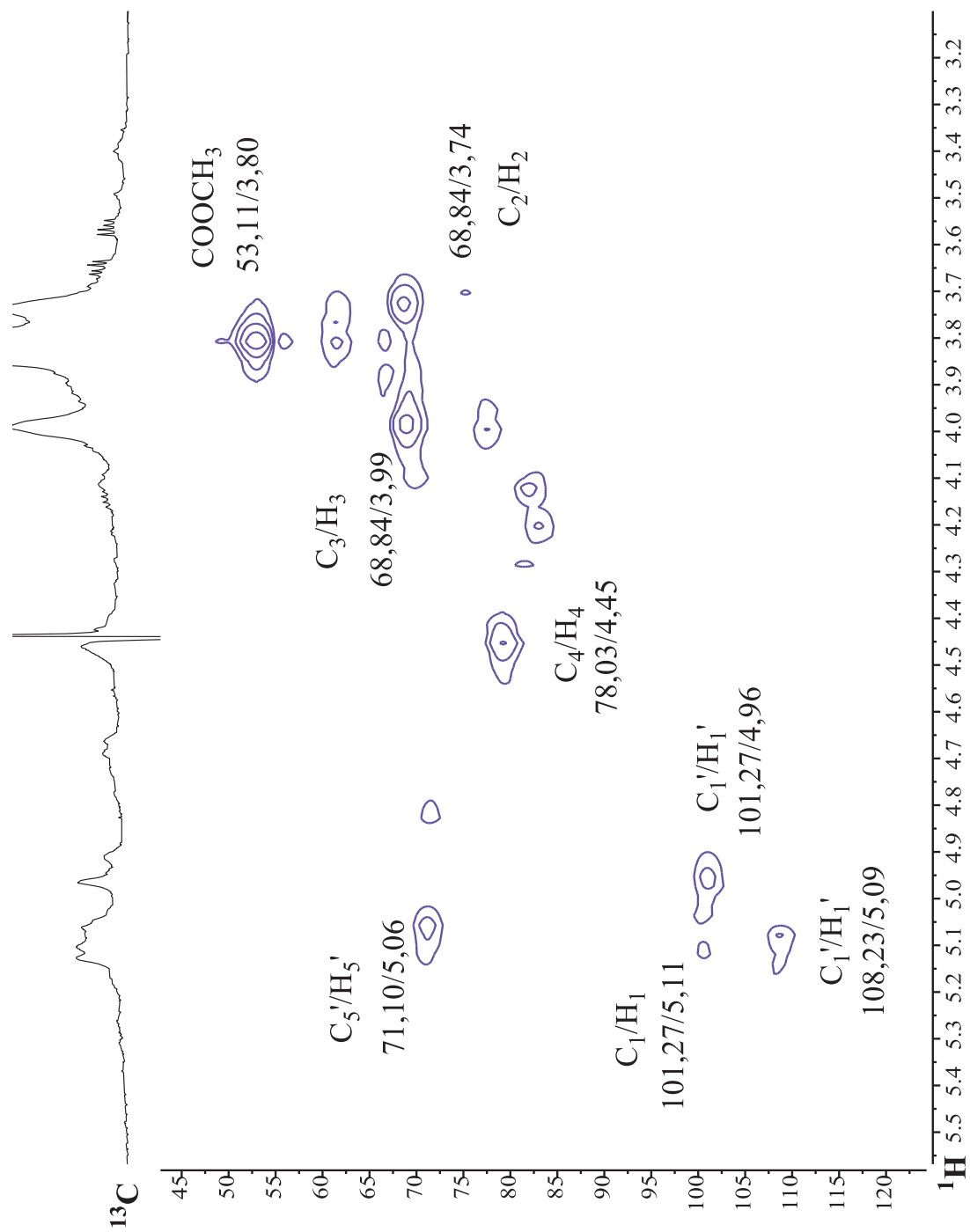
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 4. MAPA DE CORRELAÇÃO 2D DE ^1H E ^{13}C – HSQC EM D_2O A 60°C PARA A PECTINA MODIFICADA PCS3.



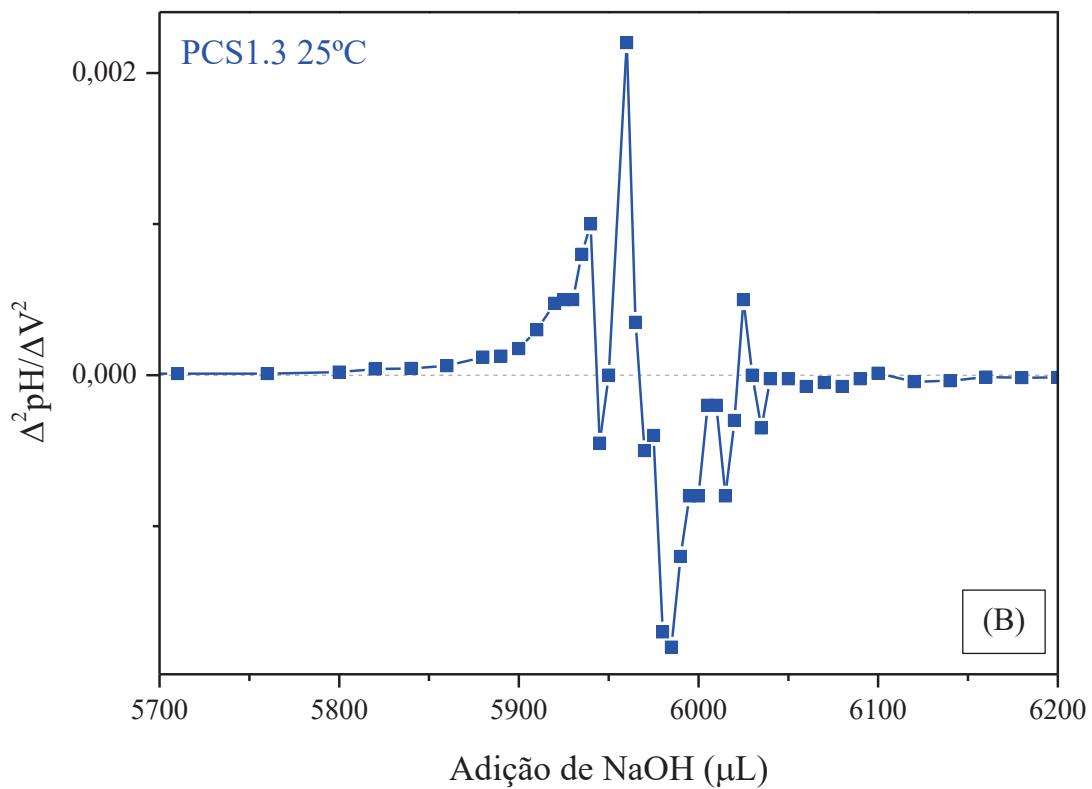
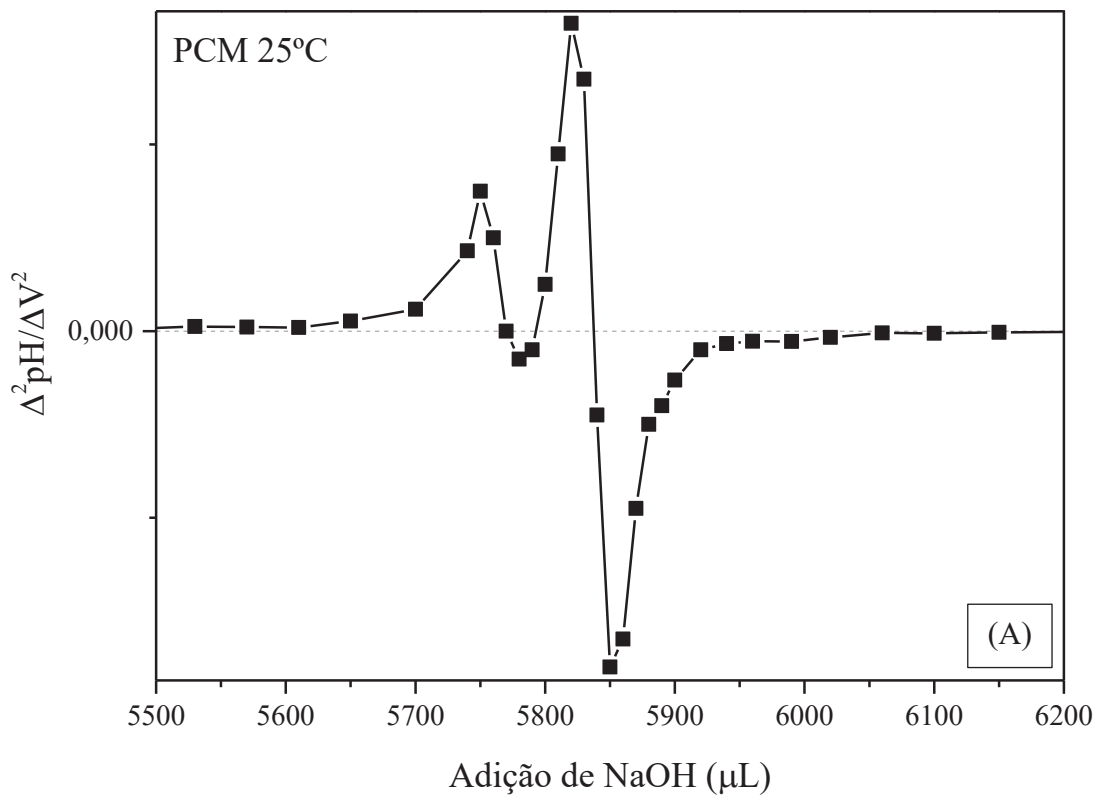
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 5. MAPA DE CORRELAÇÃO 2D DE ^1H E ^{13}C – HSQC EM D_2O A 60°C PARA A PECTINA MODIFICADA PCS4.



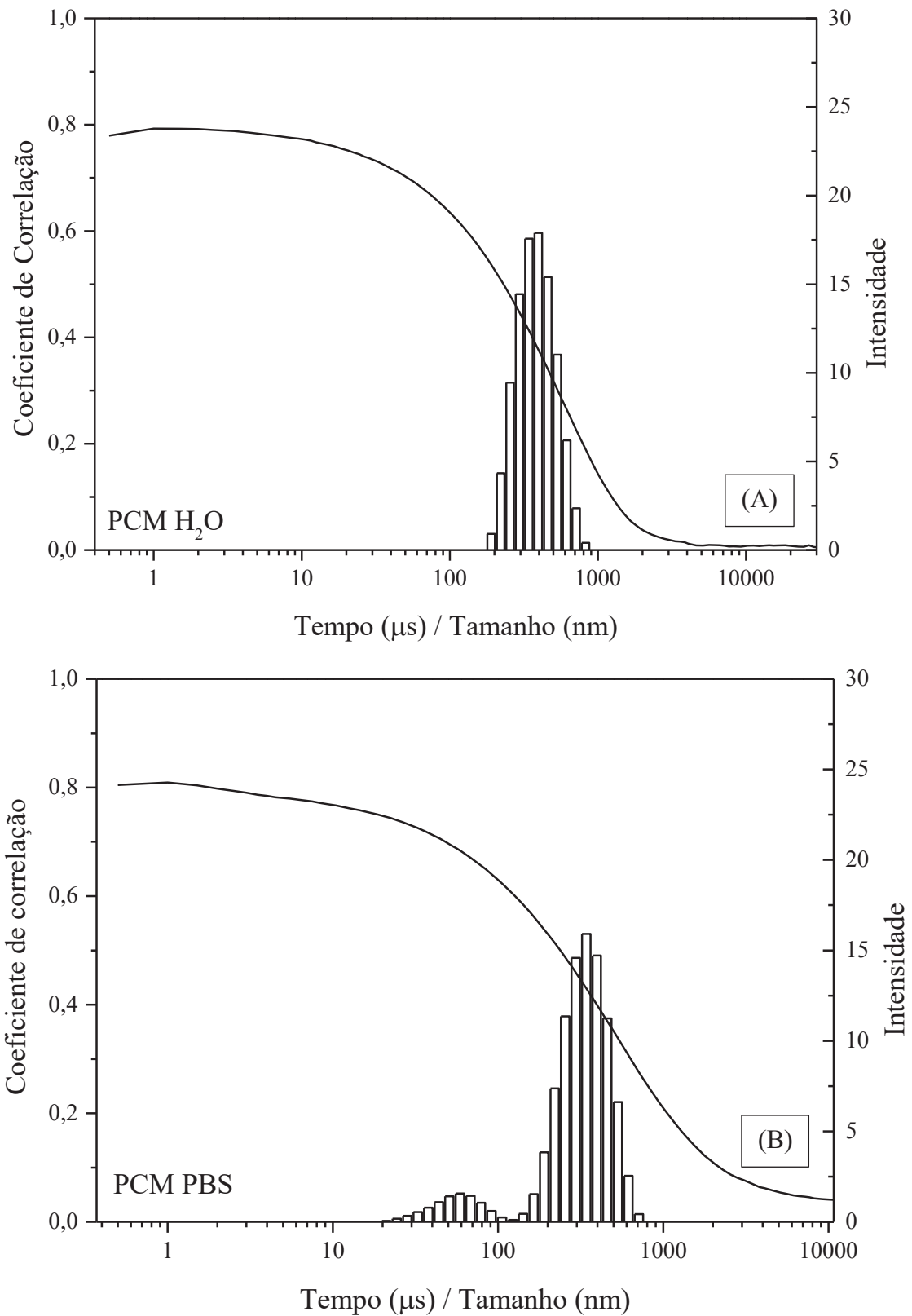
FONTE: O AUTOR, 2021

FIGURA A 6. GRÁFICO DA DERIVADA SEGUNDA DE PH POR FUNÇÃO DE VOLUME EM FUNÇÃO DE VOLUME DE BASE ADICIONADA PARA PCM (A) E PCS1.3 (B) A 25°C.



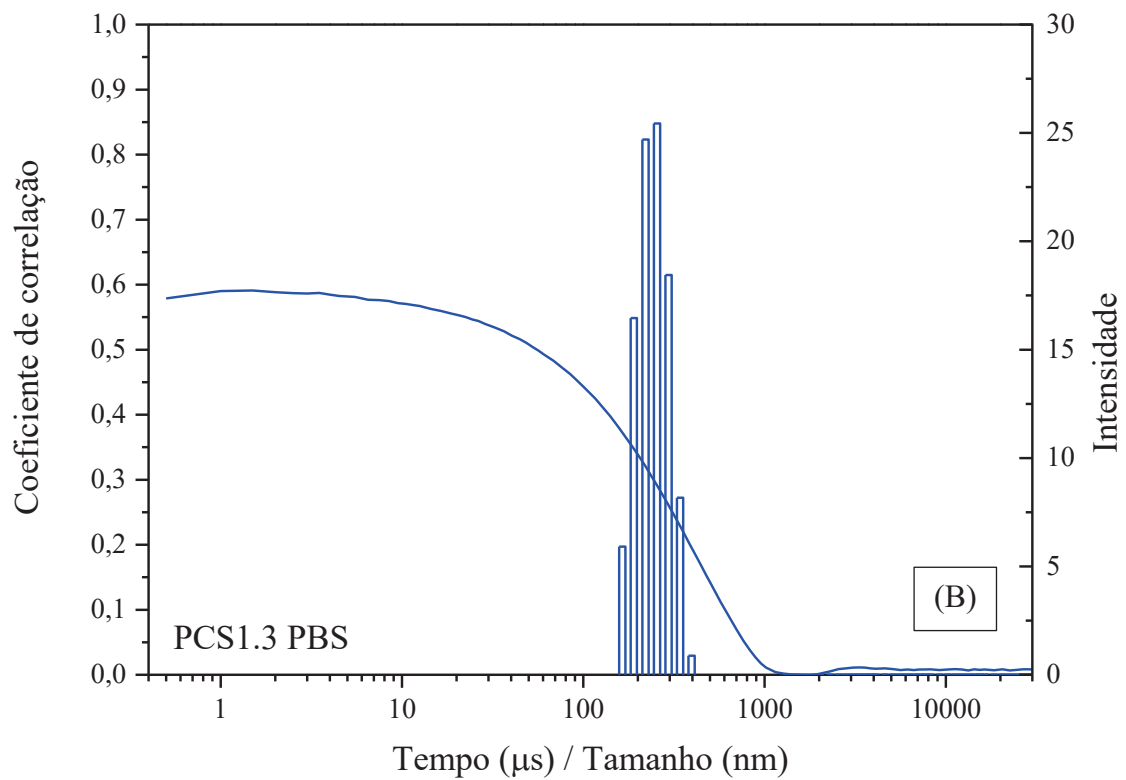
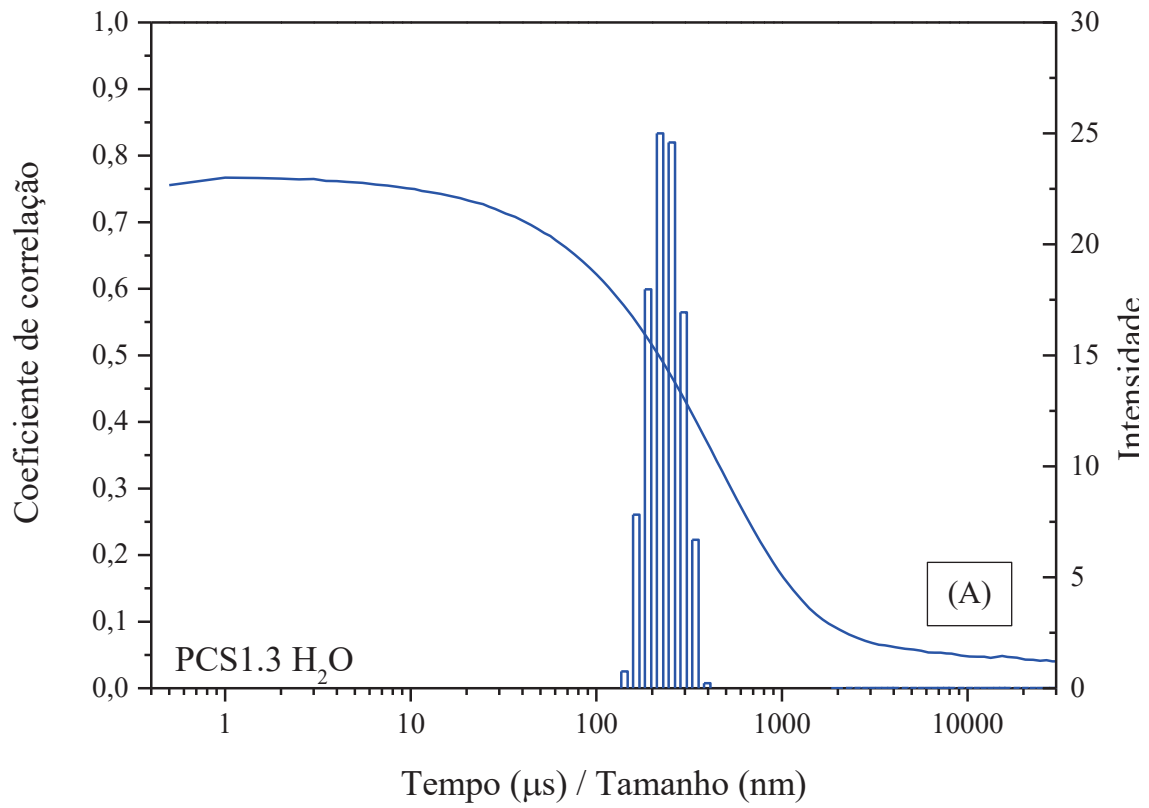
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 7. GRÁFICO DE COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E INTENSIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO E DIAMETRO HIDRODINÂMICO, RESPECTIVAMENTE, PARA PCM DISPERSA ÁGUA (A) E EM TAMPÃO PBS (B) A 25°C.



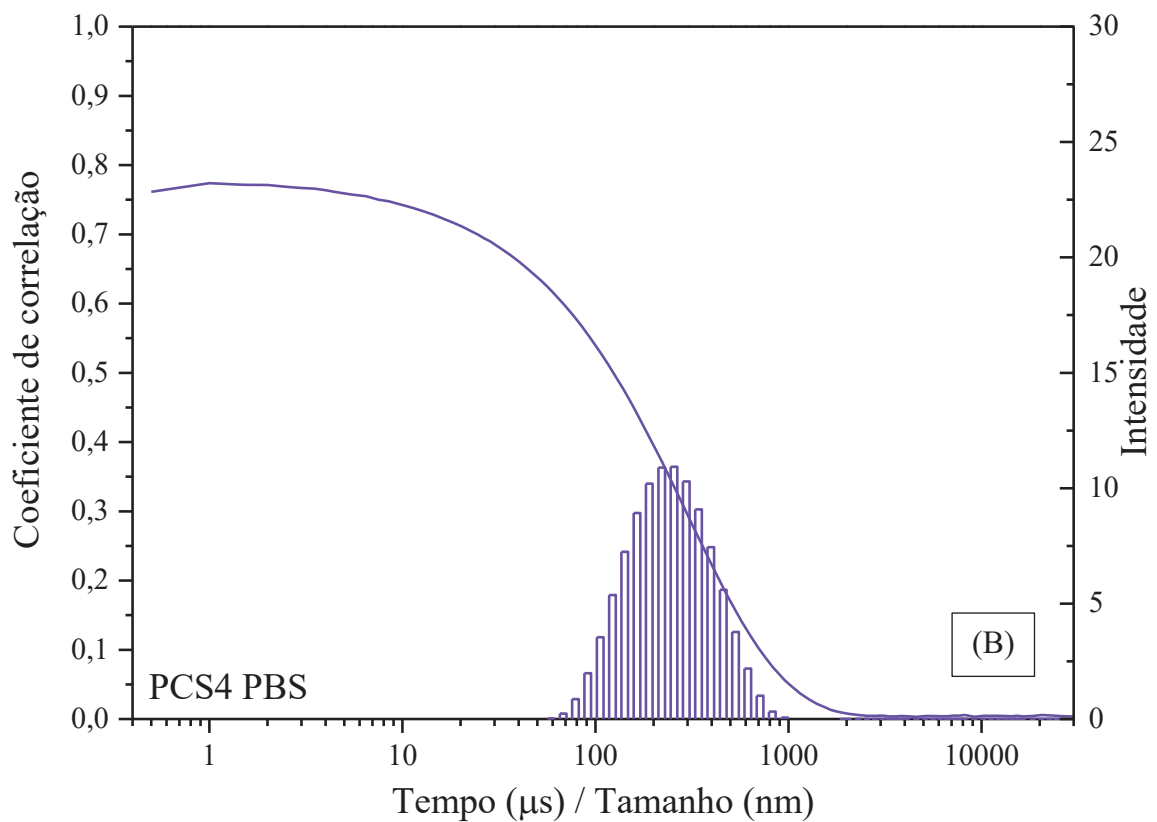
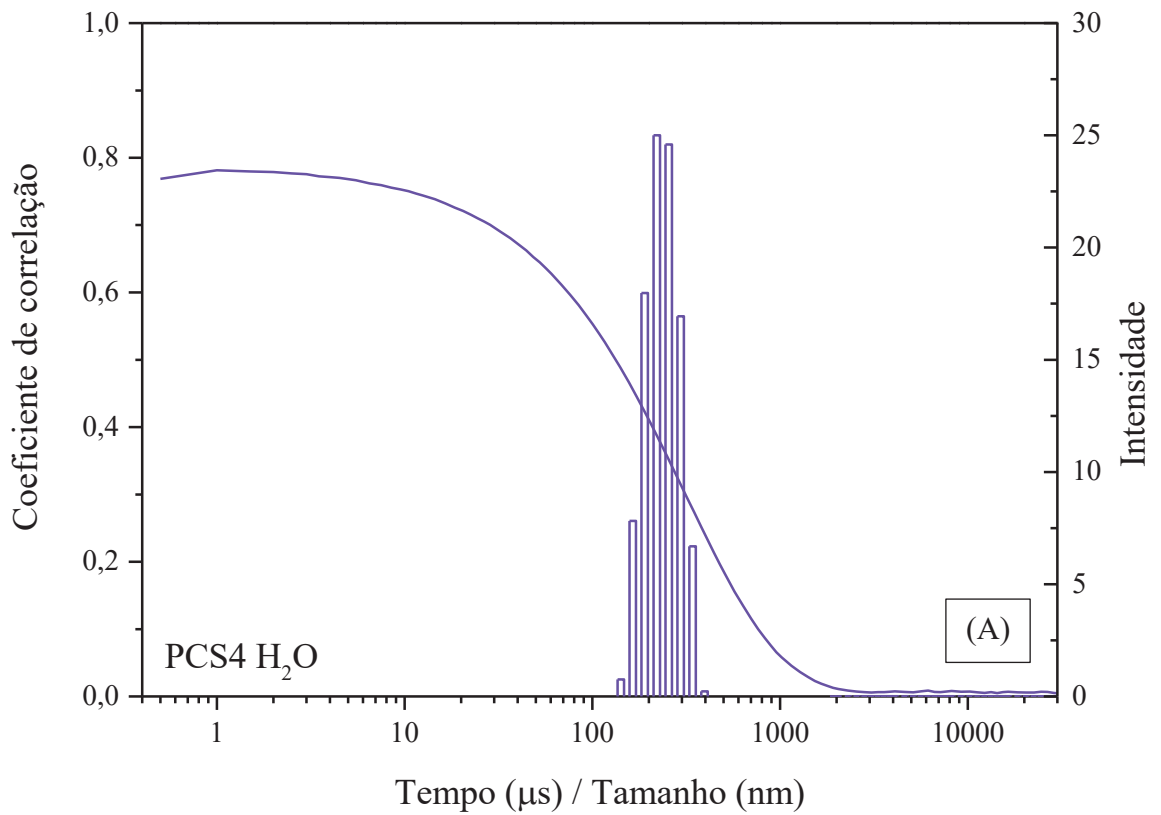
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 8. GRÁFICO DE COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E INTENSIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO E DIAMETRO HIDRODINÂMICO, RESPECTIVAMENTE, PARA PCS1.3 DISPERSA ÁGUA (A) E EM TAMPÃO PBS (B) A 25°C.



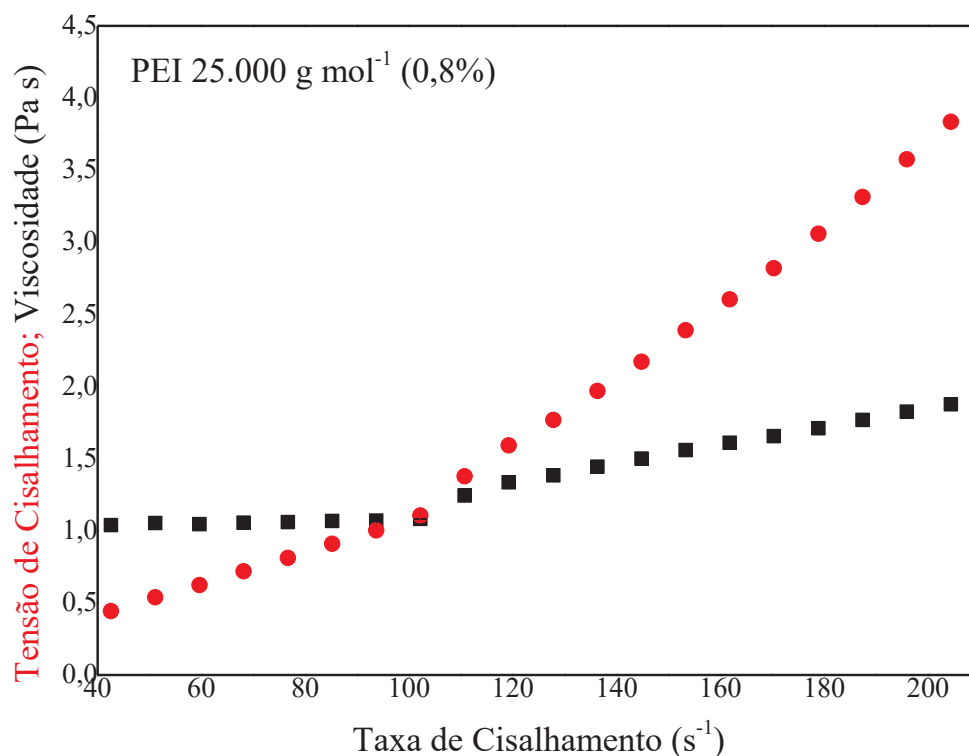
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 9. GRÁFICO DE COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E INTENSIDADE EM FUNÇÃO DO TEMPO E DIAMETRO HIDRODINÂMICO, RESPECTIVAMENTE, PARA PCS4 DISPERSA ÁGUA (A) E EM TAMPÃO PBS (B) A 25°C.



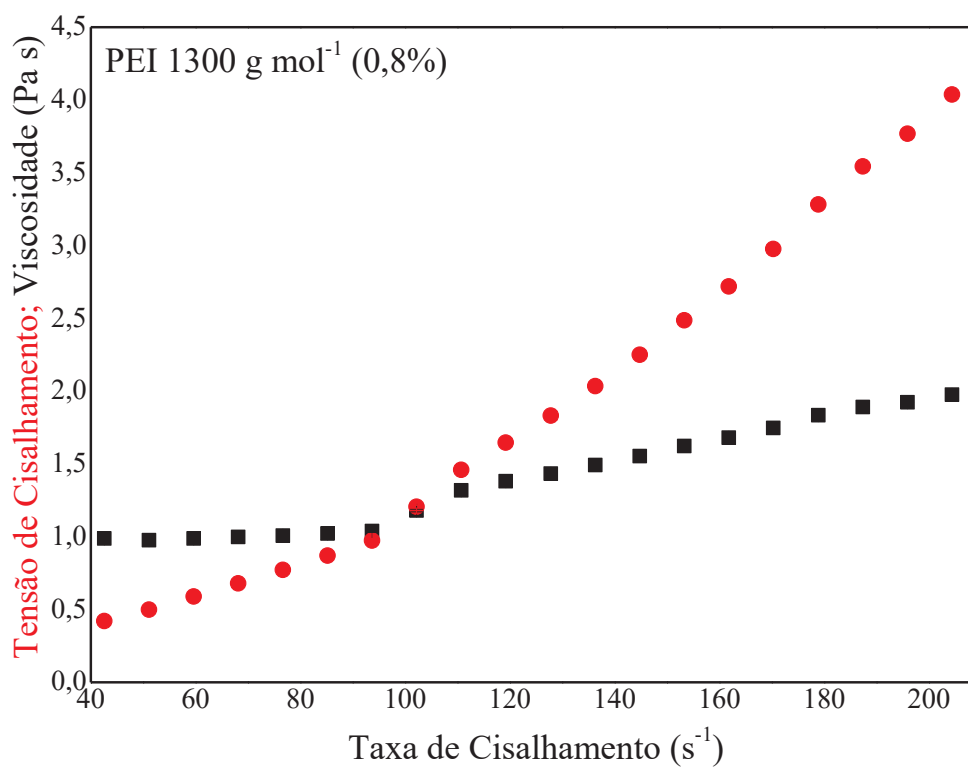
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 10. GRÁFICO CURVA DE FLUXO (VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO) PARA PEI 25.000 g mol⁻¹ (0,8%) EM TAMPÃO PBS A 25°C.



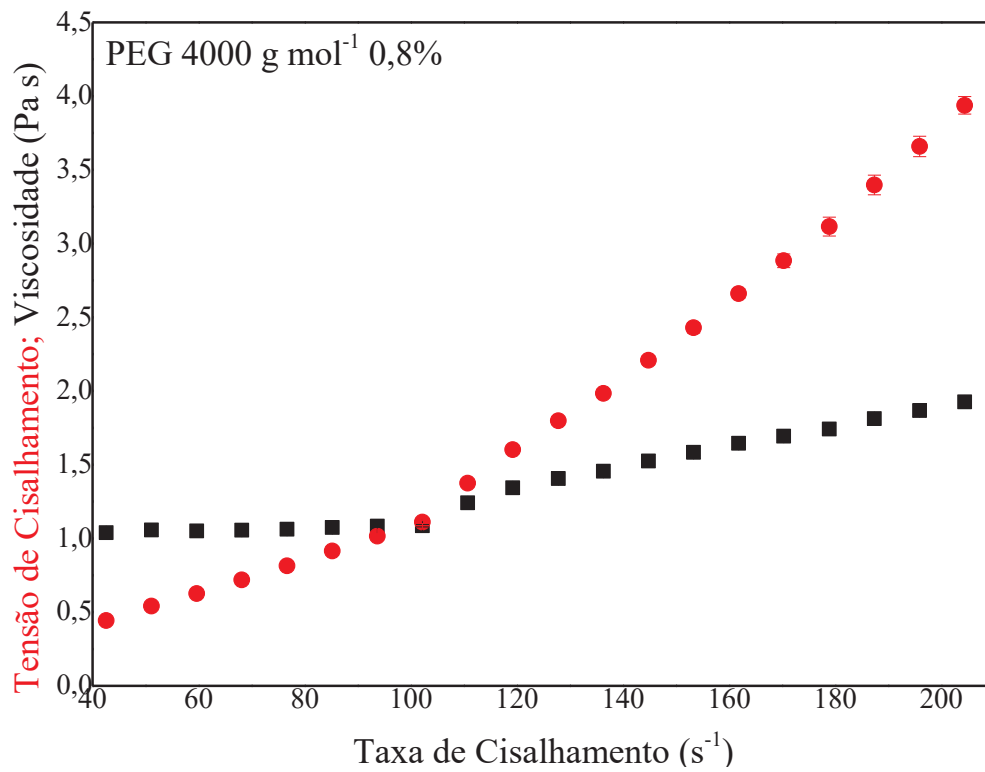
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 11. GRÁFICO DE CURVA DE FLUXO (VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO) PARA PEI 1.300 g mol⁻¹ (0,8%) EM TAMPÃO PBS A 25°C.



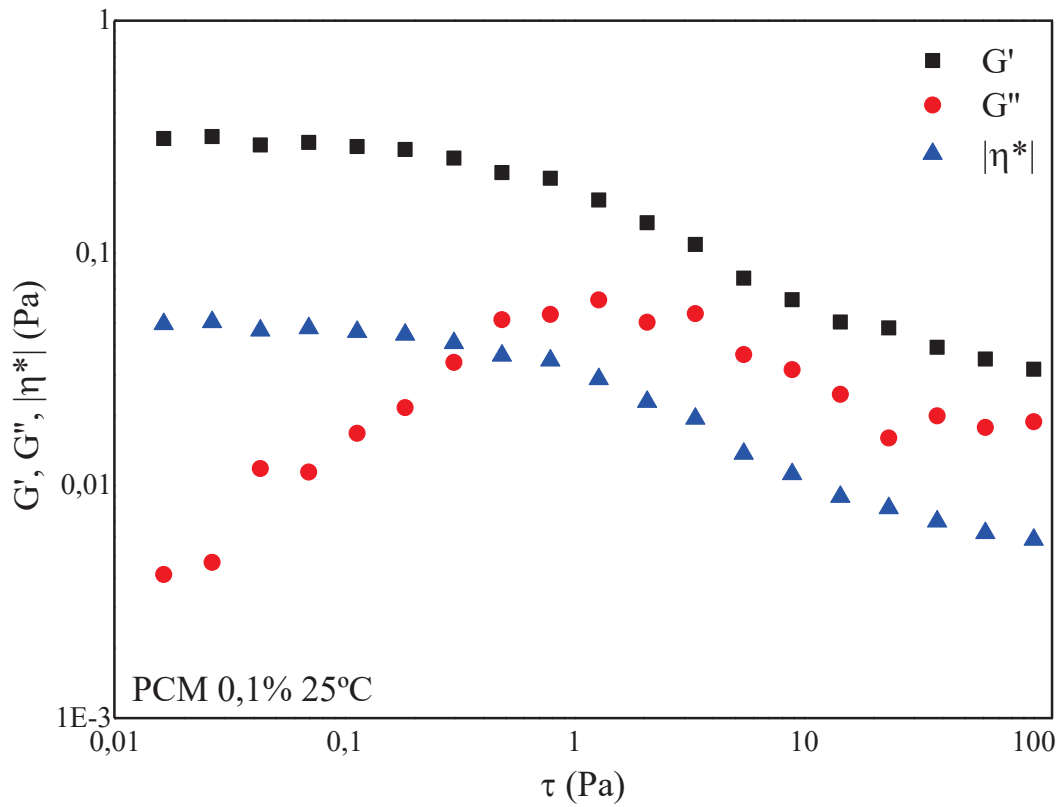
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 12. GRÁFICO DE CURVA DE FLUXO (VISCOSIDADE EM FUNÇÃO DA TAXA DE CISALHAMENTO) PARA PEG 4.000 g mol^{-1} 0,8% EM TAMPÃO PBS A 25°C.



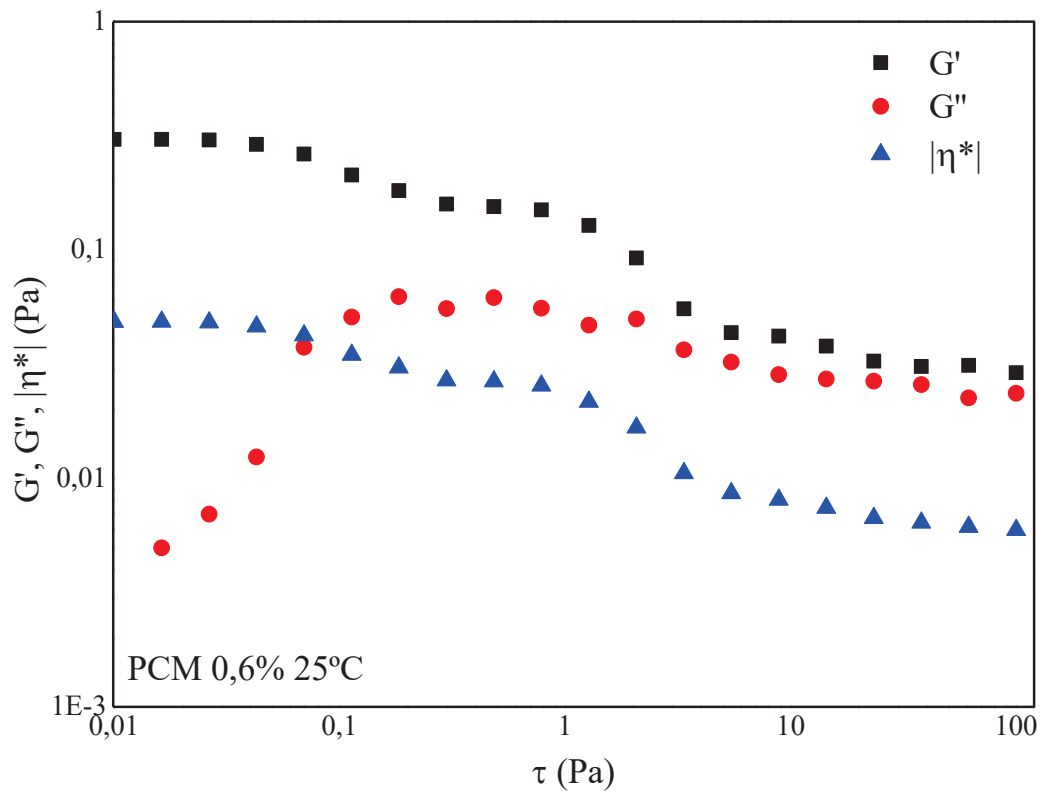
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 13. VARREDURA DE TENSÃO PARA PCM 0,1% A 25°C.



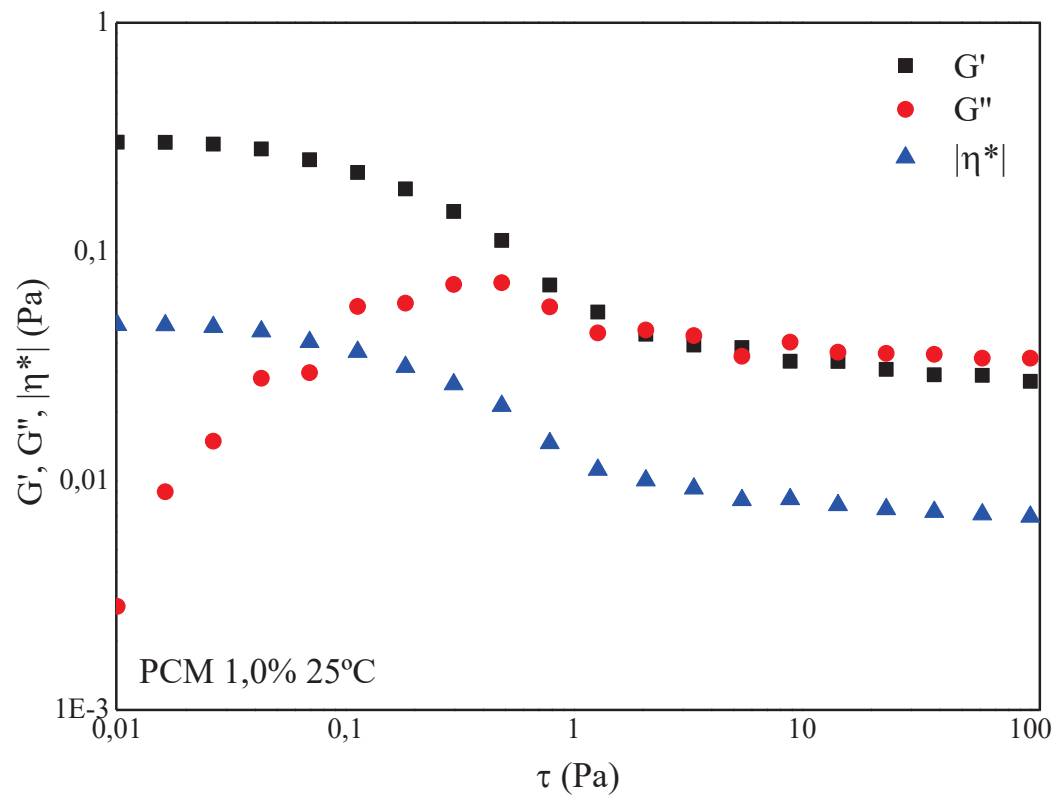
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 14. VARREDURA DE TENSÃO PARA PCM 0,6% A 25°C.



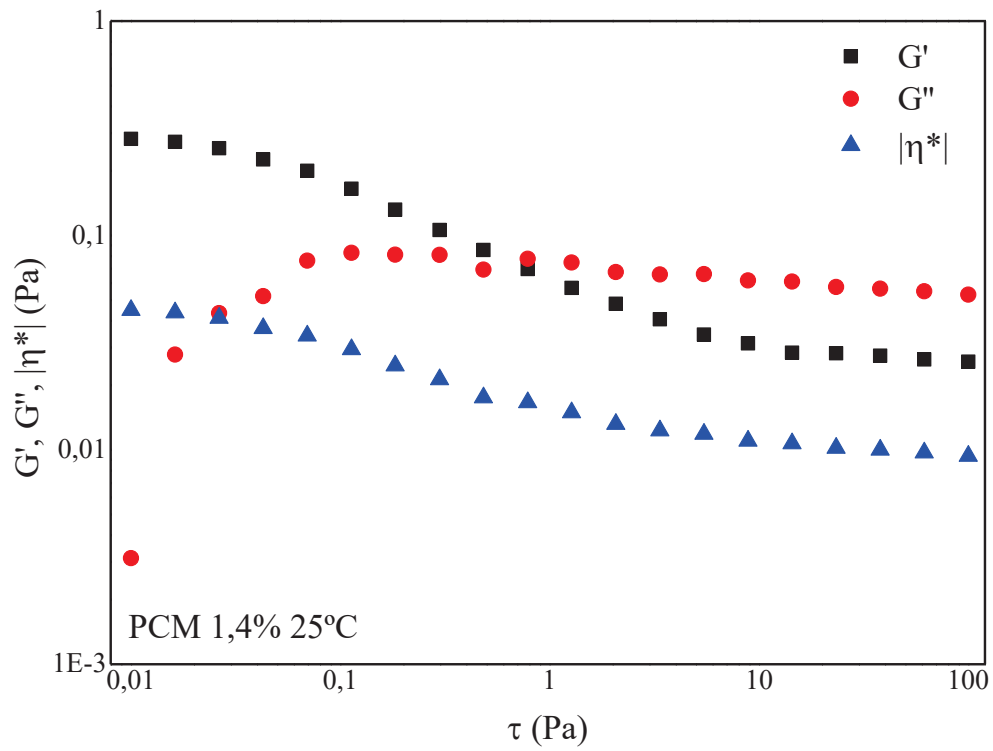
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 15. VARREDURA DE TENSÃO PARA PCM 1,0% A 25°C.



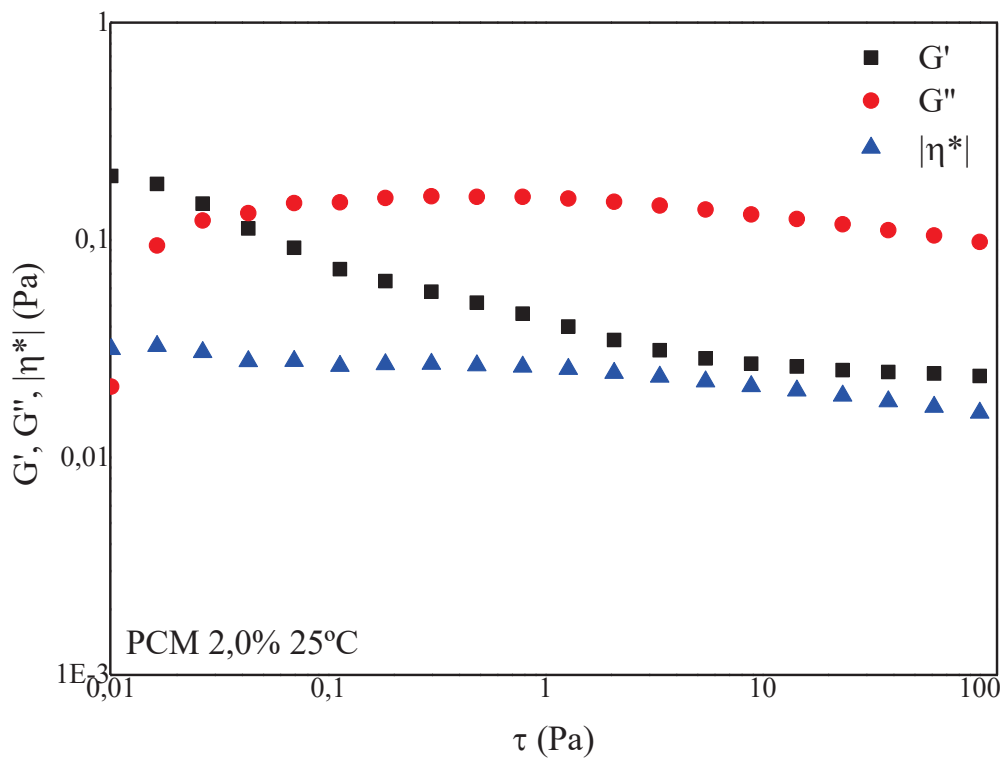
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 16. VARREDURA DE TENSÃO PARA PCM 1,4% A 25°C.



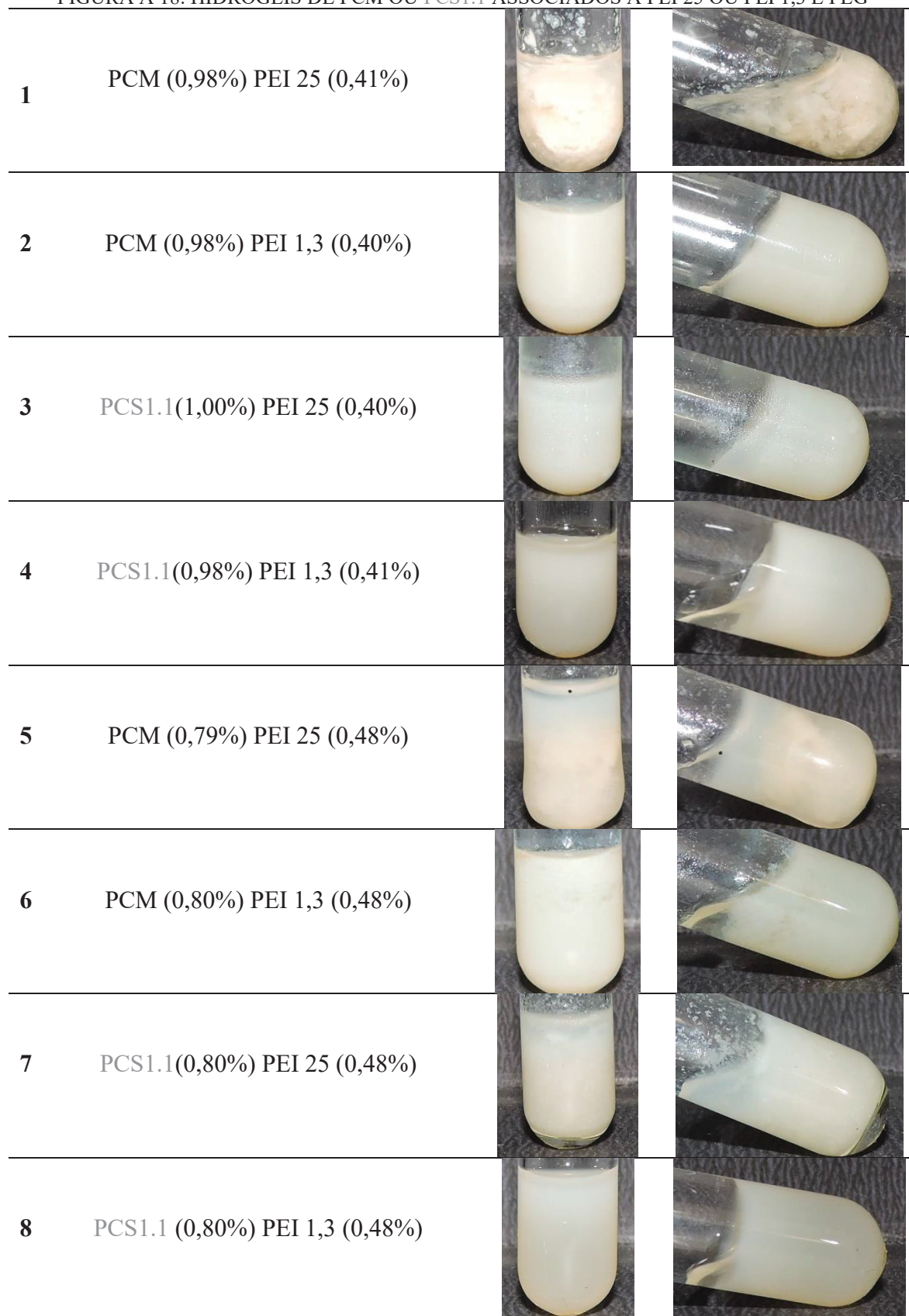
FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 17. VARREDURA DE TENSÃO PARA PCM 2,0% A 25°C.





















FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 18. HIDROGÉIS DE PCM OU PCS1.1 ASSOCIADOS A PEI 25 OU PEI 1,3 E PEG



FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 19. HIDROGÉIS DE PCM, PEI 25 OU PEI 1,3 E PEG.

9	PCM (0,77%) PEI 25 (0,34%) PEG (0,34%)			
10	PCM (0,78%) PEI 1,3 (0,21%) PEG (0,37%)			
11	PCM (0,67%) PEI 25 (0,41%) PEG (0,28%)			
12	PCM (0,67%) PEI 1,3 (0,26%) PEG (0,29%)			
13	PCS2 (0,81%) PEI 25 (0,34%) PEG (0,33%)			
14	PCS2 (0,70%) PEI 25 (0,40%) PEG (0,29%)			

FONTE: O AUTOR, 2021.

FIGURA A 20. NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HIDROGÉIS E RESPECTIVAS COMPOSIÇÕES

AMOSTRA	COMPOSIÇÃO	AMOSTRA	COMPOSIÇÃO
1	PCM (0,98%) PEI 25 (0,41%)	10	PCM (0,78%) PEI 1,3 (0,21%) PEG (0,37%)
2	PCM (0,98%) PEI 1,3 (0,40%)	11	PCM (0,67%) PEI 25 (0,41%) PEG (0,28%)
3	PCS1.1(1,00%) PEI 25 (0,40%)	12	PCM (0,67%) PEI 1,3 (0,26%) PEG (0,29%)
4	PCS1.1(0,98%) PEI 1,3 (0,41%)	13	PCS2 (0,81%) P25 (0,34%) PEG (0,33%)
5	PCM (0,79%) PEI 25 (0,48%)	14	PCS2 (0,70%) PEI 25 (0,40%) PEG (0,29%)
6	PCM (0,80%) PEI 1,3 (0,48%)	15	PCM (1,03%) PEI 25 (0,41%) PEG (0,44%)
7	PCS1.1(0,80%) PEI 25 (0,48%)	16	PCM (0,96%) PEI 1,3 (0,44%) PEG (0,42%)
8	PCS1.1 (0,80%) PEI 1,3 (0,48%)	17	PCM (0,78%) PEI 25 (0,42%) PEG (0,47%)
9	PCM (0,77%) PEI 25 (0,34%) PEG (0,34%)	18	PCM (0,81%) PEI 25 (0,42%) PEG (0,44%)

FONTE: O AUTOR, 2022.