

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CASSIANO PIRES

NOVAS ABORDAGENS DE ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES ÁGUA EM ÁGUA:  
GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E EMULSÕES DE PICKERING COM CÉLULAS DE  
LEVEDURA

CURITIBA

2024

CASSIANO PIRES

NOVAS ABORDAGENS DE ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES ÁGUA EM ÁGUA:  
GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E EMULSÕES DE PICKERING COM CÉLULAS DE  
LEVEDURA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química,  
Setor de Ciências Exatas Universidade Federal do Paraná,  
como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em  
Química.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2024

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

Pires, Cassiano

Novas abordagens para estabilização de emulsões água em água:  
gelificação enzimática e emulsões de Pickering com células de levedura /  
Cassiano Pires. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Rilton Alves de Freitas

1. Emulsões. 2. Água. 3. Gelificação. 4. Polissacarídeos. 5.  
Saccharomyces cerevisiae. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa  
de Pós-Graduação em Química. III. Freitas, Rilton Alves de. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



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 tese de Doutorado de **CASSIANO PIRES** intitulada: **Novas abordagens para estabilização de emulsões água em água: gelificação enzimática e emulsões de Pickering com células de levedura**, sob orientação do Prof. Dr. RILTON ALVES DE FREITAS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 30 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica

25/06/2024 10:23:45.0

RILTON ALVES DE FREITAS  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/07/2024 10:16:01.0

ODINEI HESS GONÇALVES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO  
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/06/2024 08:35:11.0

ELISA SOUZA ORTH

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/06/2024 13:21:27.0

IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/06/2024 10:06:43.0

AGNES DE PAULA SCHEER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 0000-00000 - E-mail: cpgquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 361992

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 361992**

*Em memória de José Carlos Pires*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional ao longo de todos os anos de estudo e dedicação, desde sempre;

À Samya H. Mehanna, por anos de companheirismo e amor incondicional;

Ao professor Rilton A. de Freitas, pela orientação, apoio, paciência e suporte contínuo desde os tempos do mestrado e a quem dedico imensa admiração e gratidão;

Aos professores, meu sincero agradecimento pela dedicação e ensinamentos;

Ao laboratório de biopolímeros (Biopol), aos departamentos de Química, Biologia (em especial ao CTAF) e Farmácia da UFPR;

A todos meus amigos.

## RESUMO

Dispersões coloidais formadas por macromoléculas hidrofílicas podem apresentar comportamento semelhante ao de emulsões convencionais, como óleo e água, apresentando incompatibilidade entre os componentes e conseqüentemente, separando em fases distintas. Polissacarídeos, como amilopectina (AMP) e xiloglucana (XG) apresentam esse comportamento, formando emulsões denominadas como “água em água”, em concentrações regidas por um diagrama de fases, o qual determina condições nas quais são obtidas emulsões de AMP em XG ou vice-versa. A estabilização desses sistemas permite sua aplicação em diversos campos de pesquisa, que permeiam interesses biomédicos, farmacêuticos, cosméticos e de alimentos, justamente por suas propriedades como biocompatibilidade, facilidade de manuseio e baixo custo. A estabilização não pode ser feita com surfactantes tradicionais, como em emulsões entre óleo e água, o que torna o processo ainda mais interessante, possibilitando a formulação livre de surfactantes. Uma alternativa viável é o uso de partículas ou gelificação de uma ou ambas as fases. A utilização de partículas cria uma barreira física na interface entre as fases, recobrando a gotícula dispersa e evitando sua coalescência, tal estabilização gera as emulsões de Pickering. Dentre a variedade de partículas promissoras, em termos de morfologia, estrutura e carga, microrganismos, como células de levedura (*S. cerevisiae*) podem ser utilizadas, principalmente pelo fato de sua estrutura única na parede celular, além do fato de sua importância na indústria de alimentos. Por outro lado, a gelificação pode ser alcançada por enzimas específicas, como a  $\beta$ -galactosidase que atua especificamente removendo grupamentos galactose da XG, tornando-a um gel. As duas abordagens foram exploradas nessa tese: utilização de leveduras, inativadas termicamente, demonstrou-se uma ótima alternativa para a estabilização das emulsões por mecanismos de Pickering, concentrações menores que 2,0 % (m/m) de células estabilizam tanto emulsões de AMP em XG quanto XG em AMP. Além disso, 20 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl é capaz de alterar as interações das células, possibilitando sua migração preferencialmente para fase de AMP, permitindo sua compartimentalização em emulsões onde AMP é fase dispersa. Por outro lado, a gelificação enzimática permite a formação de emulsões de AMP em XG estáveis, mantendo as gotículas da fase dispersa com média de 36  $\mu$ m, as tornando interessantes compartimentos de tamanho controlado pela cinética de gelificação. Por fim, ambos mecanismos foram combinados permitindo a compartimentalização de leveduras dentro dos géis de emulsão e, também, microsferas de XG gelificados com auxílio de emulsões de Pickering.

Palavras-chave: Emulsão água em água. Pickering. *Saccharomyces cerevisiae*. Gelificação. Polissacarídeos.

## ABSTRACT

Colloidal dispersions formed by hydrophilic macromolecules can behave similarly to conventional emulsions, exhibiting incompatibility between components and resulting in separation into distinct phases. Separation can occur either associatively or segregatively, during which droplets from one phase disperse in another. Amylopectin (AMP) and xyloglucan (XG) are polysaccharides can exhibit a unique behavior, forming emulsions known as water-in-water emulsions. The concentration of these emulsions is governed by a phase diagram, which determines the conditions under which emulsions of AMP in XG are obtained or vice versa. The stabilization of these systems enables their application in various research fields, including biomedical, pharmaceutical, cosmetic, and food industries, due to their properties such as biocompatibility, ease of handling, and low cost. Traditional surfactants, such as those used in oil-water emulsions, cannot be used for stabilization, making the process even more intriguing and enabling surfactant-free formulation. A viable alternative is to use particles or gelation of one or both phases. The use of particles creates a physical barrier at the interface between the phases, covering the dispersed droplet and preventing it from coalescing. This stabilization process generates Pickering emulsions. Microorganisms, such as yeast cells (*S. cerevisiae*), are a promising option due to their unique cell wall structure and importance in the food industry. Gelation can be achieved using specific enzymes, such as  $\beta$ -galactosidase, which removes galactose groups from XG, resulting in a gel. This thesis explores two approaches: the use of yeast in various salt conditions to form Pickering emulsions, and enzymatic gelation to form stable gel emulsions. The two mechanisms were combined, resulting in the compartmentalization of yeast within emulsion gels and XG microspheres gelled with the aid of Pickering emulsions.

Keywords: Water-in-water emulsion. Pickering. *Saccharomyces cerevisiae*. Gelation. Polysaccharides.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1	EMULSÕES .....	16
1.2	EMULSÕES ÁGUA EM ÁGUA .....	21
1.2.1	Estabilização por partículas .....	24
1.2.2	Estabilização por gelificação .....	27
1.3	EMULSÕES ENTRE AMILOPECTINA (AMP) E XILOGLUCANA (XG).....	28
1.4	ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA E XILOGLUCANA ....	30
1.4.1	Leveduras .....	31
1.4.2	Gelificação Enzimática.....	33
1.5	OBJETIVOS.....	35
1.5.1	Objetivo geral .....	35
1.5.2	Objetivos específicos.....	35
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
2.1	MATERIAL .....	36
2.2	EMULSÕES .....	36
2.2.1	Preparo dos polissacarídeos.....	36
2.2.2	Emulsificação .....	36
2.2.3	Determinação da tensão interfacial.....	37
2.2.4	Avaliação Microscópica.....	37
2.3	CÉLULAS DE LEVEDURA .....	38
2.3.1	Inativação Térmica .....	38
2.3.2	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier .....	38
2.3.3	Potencial Zeta .....	38
2.4	REOLOGIA.....	39
2.4.1	Cinética de gelificação enzimática de xiloglucana.....	39
2.4.2	Viscosidade e Curvas de Frequência .....	39
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
3.1	DIAGRAMA DE FASES .....	40
3.2	TENSÃO INTERFACIAL.....	40
3.3	EMULSÕES ESTABILIZADAS POR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	42
3.4	EMULSÕES ESTABILIZADAS POR GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA .....	54
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68

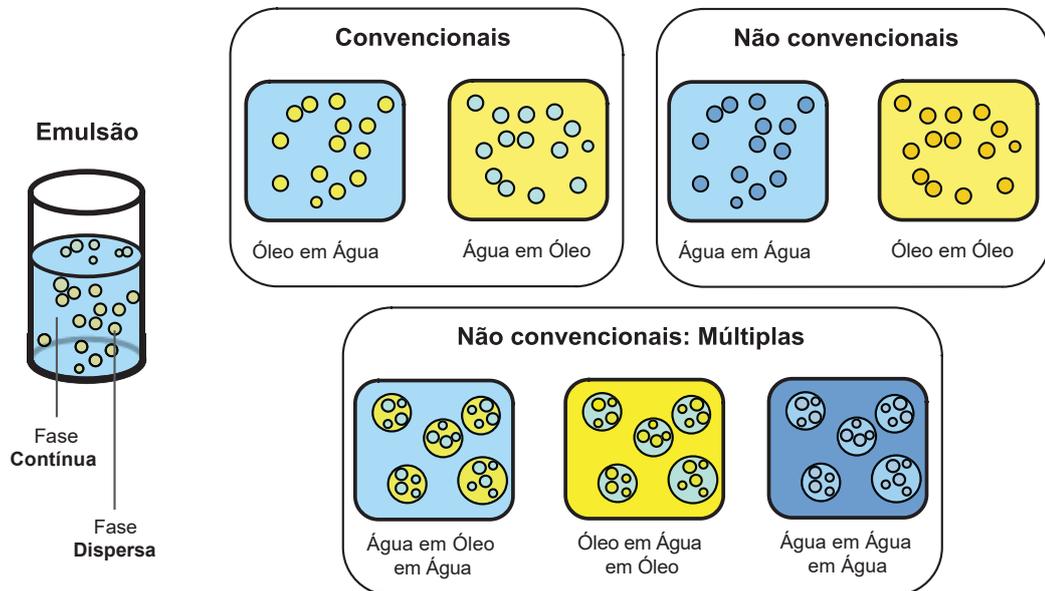
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
--------------------------	-----------

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EMULSÕES

Emulsões podem ser classificadas como sistemas coloidais termodinamicamente instáveis (metaestáveis) formados por dois líquidos imiscíveis entre si (MCCLEMENTS, 2004). Quando misturados, há formação de gotículas de um líquido (fase dispersa ou interna) em outro líquido (fase contínua ou externa). Emulsões com gotículas de óleo dispersas em água são classificadas como óleo em água (O/A), onde o óleo é a fase dispersa e a água, a fase contínua. O oposto, com água dispersa em óleo, é denominado emulsão água em óleo (A/O). Além dessas, existem emulsões múltiplas, como A/O/A e O/A/O (SCHRAMM, 2016). A FIGURA 1 ilustra a classificação das emulsões de acordo com sua fase dispersa.

FIGURA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS EMULSÕES DE ACORDO COM A FASE DISPERSA. EMULSÕES CONVENCIONAIS SÃO FORMADAS POR MISTURAS ENTRE ÁGUA E ÓLEO, ENQUANTO AS NÃO CONVENCIONAIS SÃO FORMADAS POR EMULSÕES ÁGUA EM ÁGUA, ÓLEO EM ÓLEO OU EMULSÕES MÚLTIPLAS.



FONTE: O autor (2024).

As emulsões formadas por óleo e água, amplamente utilizadas na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica, podem ser classificadas como “convencionais”. Por outro lado, as emulsões “não convencionais” incluem: emulsões água em água (A/A), que são formadas por misturas de polímeros hidrofílicos incompatíveis; emulsões de óleos com

solventes polares; e emulsões entre fases oleosas (O/O), originadas de misturas de polímeros incompatíveis, mas dispersíveis em óleos. Emulsões múltiplas, como água em água em água (A/A/A) e as formadas por água e óleo (A/O/A ou O/A/A), também são consideradas como não convencionais (HAZT et al., 2023).

A estabilidade das emulsões refere-se à capacidade de manter suas propriedades ao longo do tempo, sem sofrer separação de fases ou alterações significativas em suas características físico-químicas. Emulsões mais estáveis demonstram uma menor variação nessas propriedades, garantindo uma maior durabilidade e eficácia do sistema emulsificado (SCHRAMM, 2016).

No caso das emulsões formadas entre água e óleo, a estabilidade pode ser alcançada através de moléculas anfifílicas, as quais possuem grupamentos polares com alta afinidade por água e grupamentos apolares com afinidade por óleo. Essas moléculas se posicionam na interface água-óleo, reduzindo a tensão interfacial e formando uma barreira física que impede a coalescência das gotículas (MCCLEMENTS, 2004).

A estabilização pode ser abordada sob os aspectos termodinâmicos e cinéticos. Sob a perspectiva da termodinâmica, as emulsões podem ser interpretadas de acordo com a equação (1) (COSGROVE, 2010).

$$\Delta_f G = \Delta_I G - T\Delta_C S \quad (1)$$

Onde  $\Delta_f G$  representa a energia livre de formação,  $\Delta_I G$  é a energia interfacial do sistema,  $T$  a temperatura e  $\Delta_C S$  a variação de entropia configuracional. Quando  $\Delta_f G < 0$ , o sistema é considerado termodinamicamente estável. Por definição, a energia interfacial é igual ao produto da variação da área ( $\Delta A$ ) pela tensão interfacial do sistema ( $\gamma$ ). A equação (1) pode, portanto, ser reescrita como descrita na equação (2):

$$\Delta_f G = \gamma \Delta A - T\Delta_C S \quad (2)$$

A entropia configuracional, por sua vez, é descrita pela equação (3). Onde  $n$  representa o número de gotículas na emulsão,  $k$  é a constante de Boltzmann e  $\phi$ , a fração volumétrica da fase dispersa (COSGROVE, 2010).

$$\Delta_c S = \frac{-nk}{\phi} (\phi \ln \phi + (1 - \phi) \ln(1 - \phi)) \quad (3)$$

A tensão interfacial varia de acordo com a equação (4), onde  $\gamma_\infty$  representa a tensão interfacial em superfícies planas e  $\gamma_0$  é a menor tensão interfacial alcançada quando a monocamada de surfactantes está na curvatura ótima de raio ótimo,  $R_0$  (MCCLEMENTS, 2012).

$$\gamma = \gamma_0 + (\gamma_\infty - \gamma_0) \frac{(R_0 - R)^2}{R_0^2 - R^2} \quad (4)$$

Ajustando as condições do surfactante nas dispersões é possível alcançar um valor mínimo de tensão interfacial, tornando o termo  $\gamma\Delta A$  da equação (2) muito pequeno ainda que  $\Delta A$  seja positivo. Somado a isso, o número de gotículas,  $n$ , no processo de emulsificação sempre aumenta, o que faz do termo  $\Delta_c S$  positivo. Tudo isso pode gerar valores de  $\Delta_f G$  muito baixos, permitindo emulsões estáveis termodinamicamente, conhecidas como microemulsões (SAIFULLAH; AHSAN; SHISHIR, 2016).

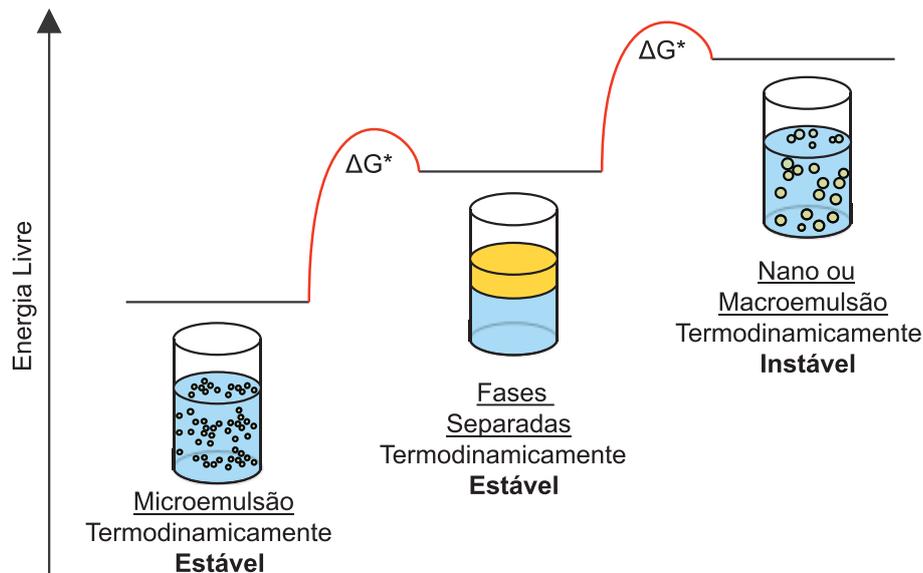
A estabilidade cinética, por sua vez, pode gerar um sistema metaestável mesmo em situações cuja termodinâmica preveja instabilidade.

Um sistema formado entre água e óleo, na ausência de estabilizantes, tende a manter seu estado de menor energia com fases distintas entre os componentes. Quando esse sistema é agitado, podem ser formadas nano ou macroemulsões, que apresentam um nível de energia mais alto. O sistema tende, portanto, a separar as fases para minimizar sua energia. No entanto, surfactantes podem impedir a coalescência ao criar uma barreira física (impedimento estérico) ou eletrostático entre as gotículas. Isso leva a um estado de metaestabilidade, governado pela energia de ativação ( $\Delta G^*$ ). A FIGURA 2 ilustra os níveis de energia livre de formação ( $\Delta_f G$ ) dos sistemas emulsionados.

Ao contrário de nano e macroemulsões, microemulsões podem ser formadas espontaneamente, uma vez que sua energia livre é menor que em sistemas com fase separadas. Na prática, é necessário fornecer o mínimo de energia (temperatura ou agitação) para vencer a barreira cinética ( $\Delta G^*$ ) que separa os dois estados. Para macro ou nanoemulsões, a aplicação

de energia é essencial para sua formação, uma vez que são sistemas termodinamicamente instáveis (MARIYATE; BERA, 2022; SAIFULLAH; AHSAN; SHISHIR, 2016).

FIGURA 2 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ENERGIA LIVRE DE MICRO, NANO E MACROEMULSÕES. OS SISTEMAS SÃO MANTIDOS METAESTÁVEIS ATRAVÉS DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO ( $\Delta G^*$ ).

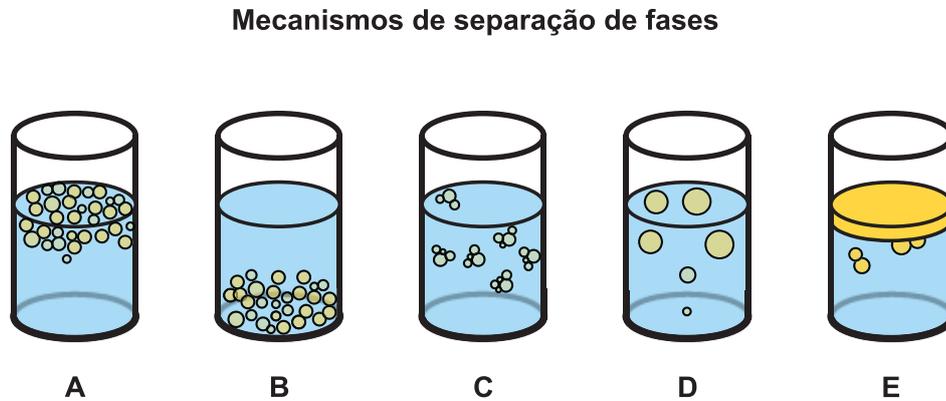


FONTE: O autor (2024).

As gotículas dispersas estão em constante movimentação devido ao movimento browniano, que resulta do choque constante com moléculas do meio contínuo, além de influência da gravidade ou forças externas. A colisão depende de suas interações e pode levar à separação de fases. Como descrito anteriormente, a utilização de surfactantes pode diminuir a tensão interfacial até valores mínimos que garantam a estabilidade termodinâmica de microemulsões. No caso de nano e macromulsões, a utilização de surfactantes pode formar uma barreira física que evita a união das gotículas e, conseqüentemente, evita a separação de fases através da estabilidade cinética.

Na FIGURA 3 são ilustrados os principais mecanismos de separação de fases em emulsões. A cremação e sedimentação (FIG. 3A e B) são processos decorrentes de forças externas, como a força gravitacional. Se a densidade da fase dispersa for menor que da contínua, as gotículas tendem a ficar na porção superior da mistura, caso contrário, as gotículas sedimentam.

FIGURA 3 - PRINCIPAIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA SEPARAÇÃO DE FASES DE EMULSÕES: CREMEIÇÃO (A), SEDIMENTAÇÃO (B), FLOCULAÇÃO (C), ENVELHECIMENTO DE OSTWALD (D) E COALESCÊNCIA (E).



FONTE: O autor (2024).

A velocidade de movimentação de uma gotícula da fase dispersa pode ser descrita pela lei de Stokes, descrita na equação (5).

$$v = -\frac{2gr^2(\rho_d - \rho_c)}{9\eta_c} \quad (5)$$

Onde  $v$  representa a velocidade (cremeação ou sedimentação),  $g$  a força gravitacional,  $r$  o raio da gotícula da fase dispersa, a diferença entre as densidades da fase dispersa e contínuas é dada por  $(\rho_d - \rho_c)$  e  $\eta_c$  representa a viscosidade da fase contínua (MCCLEMENTS, 2004).

É possível notar que a velocidade de cremeação ou sedimentação é inversamente proporcional à viscosidade da fase contínua. Ou seja, a separação de fases pode ser atrasada com o aumento da viscosidade das emulsões, que impacta em uma movimentação mais lenta da fase dispersa, estabilizando assim o sistema.

A floculação (FIG. 3C) é um fenômeno no qual as gotículas dispersas formam pequenos ou grandes aglomerados, podendo apresentar interações fortes ou fracas. O potencial de interação pode ser descrito através da teoria de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (DLVO), descrita na equação (6) (SAIFULLAH; AHSAN; SHISHIR, 2016).

$$U_{(t)}(r) = U_{(e)}(r) + U_{(s)}(r) \quad (6)$$

Onde  $U_{(e)}(r)$  e  $U_{(s)}(r)$  representam, respectivamente, a energia eletrostática e estérea entre as gotículas em função de sua distância ( $r$ ). A somatória desses componentes resulta na energia total das gotículas dispersas  $U_{(t)}(r)$  (KHEDR; STRIOLO, 2019).

A presença dos aglomerados formados na floculação pode acarretar mudanças visuais nas emulsões, assim como na cremação.

O envelhecimento de Ostwald ocorre devido à diferença de solubilidade da fase dispersa. De maneira geral, a solubilidade aumenta ao passo que o raio diminui, ou seja, gotículas menores tendem a diminuir cada vez mais e se difundem em gotículas maiores, diminuindo a área interfacial total (SAIFULLAH; AHSAN; SHISHIR, 2016). A teoria de Lifshitz-Slyzov-Wagner (LSW) descreve a taxa de envelhecimento de Ostwald, conforme descrito na equação (7):

$$\omega_t = \frac{dr_{crit.}^3}{dt} = \frac{8\gamma S_d^{eq} D_d V_m}{9RT} \quad (7)$$

Onde  $r_{crit.}$  é o raio da fase dispersa que não apresenta alteração de tamanho, se a fase dispersa apresentar raio  $< r_{crit.}$ , a gotícula diminui e caso contrário, aumenta.  $S_d^{eq}$  é a solubilidade, no equilíbrio, da fase dispersa e  $D_d$  sua difusibilidade no meio.  $V_m$  representa a fração volumétrica da fase dispersa.  $R$  é a constante universal dos gases e  $T$ , a temperatura (SAIFULLAH; AHSAN; SHISHIR, 2016).

Por fim, a coalescência está relacionada com a quebra do filme líquido fino que separa as gotículas. Ela pode ocorrer em emulsões sedimentadas ou cremeadas e resulta em gotículas cada vez maiores que colapsam e retornam a emulsão em seu estado inicial (SCHRAMM, 2016; TADROS, 2016).

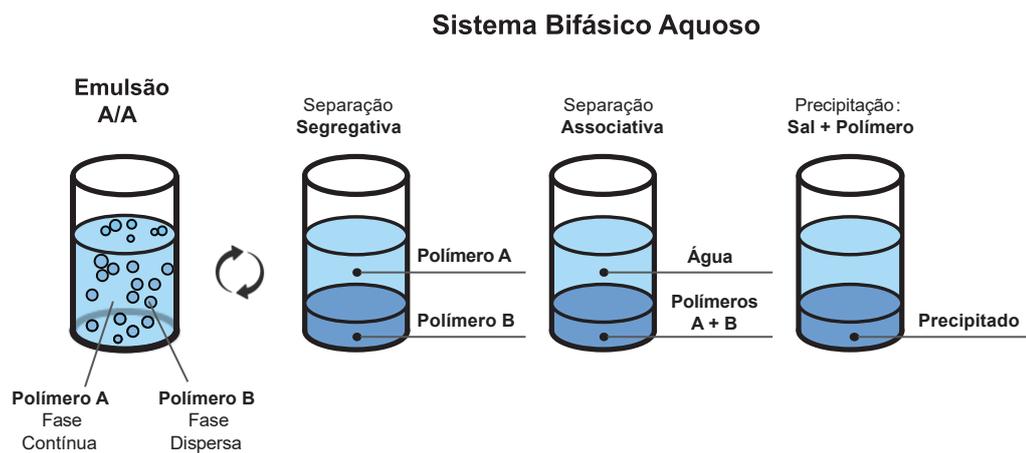
## 1.2 EMULSÕES ÁGUA EM ÁGUA

Dispersões coloidais formadas por macromoléculas podem ser incompatíveis entre si, promovendo misturas com separação de fases, assim como as emulsões convencionais. Os primeiros relatos desses sistemas datam do final do século XIX, com os trabalhos de Beijerinck, utilizando misturas entre gelatina e amido que, dispersos em água, após determinado período, separavam-se em fases distintas. Tais sistemas são denominados como “sistemas bifásicos aquosos”, também conhecidos ATPS, do inglês “*Aqueous Two Phase Systems*”, amplamente

estudados para aplicações biológicas, como precipitação e isolamento de proteínas e outros polímeros em matrizes aquosas (HATTI-KAUL, 2008). Atualmente, o termo “emulsões água em água (A/A)” é amplamente aceito na literatura para designar tais sistemas (ESQUENA, 2016). Além disso, misturas bifásicas aquosas apresentam semelhanças com emulsões convencionais, como as compostas entre óleo e água. Há formação de gotículas de uma fase dispersa em uma contínua e por fim, separação de fases.

A FIGURA 4 ilustra a formação de emulsões água-em-água (A/A) a partir de misturas bifásicas de polímeros hidrofílicos. Na separação segregativa, um dos polímeros forma a fase dispersa e o outro, a fase contínua, assemelhando-se a emulsões convencionais.

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE EMULSÕES ÁGUA-EM-ÁGUA (A/A) FORMADAS POR SISTEMAS BIFÁSICOS AQUOSOS (ATPS), DESTACANDO SEPARAÇÕES DE FASES SEGREGATIVAS, ASSOCIATIVAS E PRECIPITAÇÃO DE POLÍMEROS (A e B).



FONTE: O autor (2024).

A mistura entre dois biopolímeros, dispersos em água, pode gerar uma ou duas fases, macroscopicamente. Em sistemas com apenas uma fase, ambas macromoléculas podem existir como complexos ou simplesmente dispersos em água, em baixas concentrações. Por outro lado, em maiores concentrações, sistemas bifásicos podem ser observados através de dois mecanismos físico-químicos distintos, conhecidos como separação associativa ou separação segregativa (CHAO; SHUM, 2020).

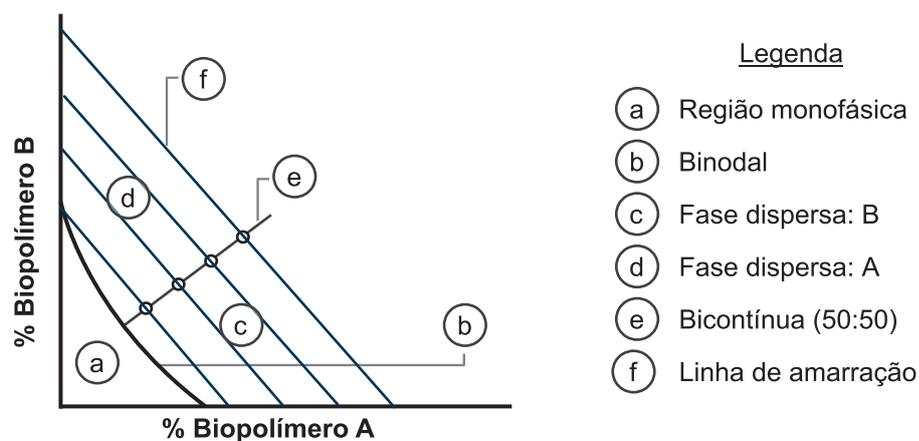
A separação associativa é relacionada à atração entre dois biopolímeros, com cargas opostas por exemplo. Como resultado, uma fase é composta majoritariamente por macromoléculas, conhecida como coacervado ou precipitado, separada da água. Por outro lado, na separação segregativa, os biopolímeros apresentam repulsão um do outro. Nesse caso, cada

fase é rica em um biopolímero. A repulsão é resultado de cargas opostas, no caso de macromoléculas neutras a repulsão pode ser resultado do efeito de exclusão estérica (MATALANIS; JONES; MCCLEMENTS, 2011).

O diagrama de fases é uma ferramenta indispensável em se tratando da avaliação e aplicação de emulsões A/A. Sua representação esquemática é ilustrada na FIGURA 5. Em baixas concentrações de biopolímeros não há formação de emulsão e macroscopicamente a mistura é monofásica (a), em concentrações maiores, demarcada pela linha binodal (b) há formação de duas fases. A região bifásica fornece detalhes sobre fases dispersas (c e d), separadas por uma linha na qual são encontradas emulsões bicontínuas, com composições 50:50 (v/v). Na região bifásica, são identificadas as linhas de amarração (f), que fornecem informações sobre a composição das fases separadas e indicam que a tensão interfacial permanece constante ao longo das mesmas (HATTI-KAUL, 2008).

Outra característica única de emulsões A/A é sua tensão interfacial extremamente baixa, podendo variar entre  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  mN m<sup>-1</sup>, o que representa 3 a 5 ordens de magnitude que interfaces como O/A (ESQUENA, 2016; IQBAL et al., 2016). Valores tão baixos de tensão tornam o método de quantificação mais difícil, entretanto é possível através de técnicas como retração da gota (BALAKRISHNAN et al., 2012; DING et al., 2002; FREITAS et al., 2016).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM DIAGRAMA DE FASES PARA EMULSÕES ÁGUA EM ÁGUA. A REGIÃO MACROSCOPICAMENTE MONOFÁSICA (A) NÃO APRESENTA SEPARAÇÃO DE FASES EM CONCENTRAÇÕES ABAIXO DAS DETERMINADAS PELA LINHA BINODAL (B). EMULSÕES BICONTÍNUAS SÃO ENCONTRADAS NA LINHA 50:50 (E) QUE DIVIDE DUAS REGIÕES BIFÁSICAS (C e D) NA REGIÃO BIFÁSICA AS LINHAS DE AMARRAÇÃO (F).



FONTE: O autor (2024).

A velocidade de separação de fases em emulsões é influenciada pela viscosidade e densidade das fases, conforme descrito pela lei de Stokes, detalhada na equação (5). Em sistemas de polímeros com fases dispersa e contínua de densidades próximas, a diferença de densidade ( $\rho_d - \rho_c$ ) é baixa, resultando em uma velocidade de sedimentação ou cremação mais lenta. Portanto, em emulsões água-em-água, a separação de fases pode levar horas ou até dias para ser completada (VIS; ERNÉ; TROMP, 2016).

A região da interface entre emulsões A/A não é bem definida como O/A, por exemplo, podendo apresentar espessura próxima do comprimento característico biopolímeros que a compõe (ESQUENA, 2016). Por esse motivo, moléculas de surfactantes não adsorvem à interface. Assim, a estabilidade frente a separação de fases é o maior desafio em sistemas A/A. Entre as alternativas, existe a possibilidade de utilização de partículas ou complexação, associação e precipitação de macromoléculas na interface, com objetivo de criar barreiras físicas, evitando a coalescência (ESQUENA, 2023).

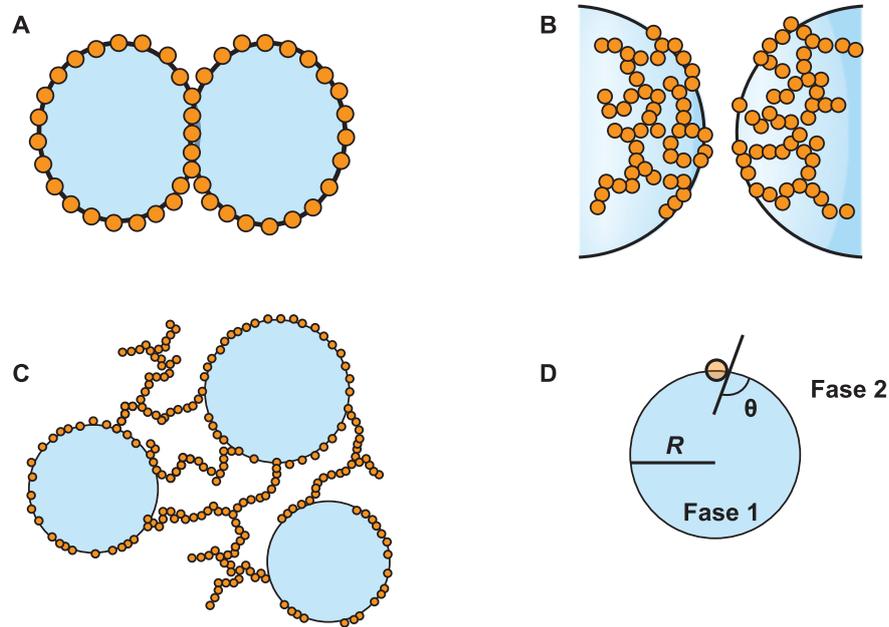
Uma alternativa viável para estabilizar emulsões é a gelificação da fase contínua, o que restringe a movimentação das gotículas da fase dispersa e previne a coalescência. Alternativamente, a gelificação da própria fase dispersa também pode ser empregada para evitar a coalescência das gotículas. Ambas as abordagens melhoram a estabilidade das emulsões, oferecendo soluções eficazes para a prevenção da separação de fases (ABDULLAH et al., 2022).

### 1.2.1 Estabilização por partículas

O primeiro estudo que observou partículas sólidas em interfaces de emulsões e espumas foi relatado por Ramsden (1903), seguido de Pickering (1907), dando origem ao termo “emulsões de Pickering” ou “emulsões de Ramsden-Pickering”. A adesão de partículas na interface da fase dispersa evita que as gotículas coalesçam devido à barreira física ou eletrostática criada durante o revestimento.

A FIGURA 6 ilustra possibilidades de estabilização com partículas esféricas, nem toda interface precisa estar recoberta, forças repulsivas ou o impedimento estéreo podem garantir a estabilidade evitando a proximidade das gotículas (FIG. 6B). E, dependendo das características das partículas utilizadas, podem ser formadas redes entre elas (FIG. 6C), garantindo a estabilização do sistema (BINKS; HOROZOV, 2006).

FIGURA 6 - EMULSÕES ESTABILIZADAS POR MECANISMOS DE PICKERING: PARTÍCULAS NA INTERFACE CRIAM BARREIRA FÍSICA (A), RECOBRIMENTO PARCIAL (B) OU REDES ENTRE GOTÍCULAS (C). A ENERGIA DE ADSORÇÃO É CALCULADA A PARTIR DO RAIO ( $R$ ) DA GOTÍCULA E DO ÂNGULO DE CONTATO ( $\theta$ ) COM A INTERFACE ENTRE AS FASES 1 E 2 (D).



FONTE: Adaptado de Binks e Horozov (2006).

O mecanismo que mantém a partícula aderida ou não à interface é a variação de sua energia livre ( $\Delta G$ ), representada pela equação (8).

$$\Delta G = \pi R^2 \gamma_{12} (1 - |\cos \theta|)^2 \quad (8)$$

A energia livre leva em consideração o raio da partícula esférica ( $R$ ), a tensão interfacial entre as fases ( $\gamma_{12}$ ) e o ângulo de contato ( $\theta$ ) entre a partícula e uma das fases (NICOLAI; MURRAY, 2017).

A unidade de medida usual de  $\Delta G$  é dada em  $k_B T$ , ou seja, pelo produto da constante de Boltzmann ( $k_B$ ) pela temperatura ( $T$ ). A 298 K, essa energia vale  $4,11 \times 10^{-21}$  J. Valores de  $\Delta G$  acima de  $20 k_B T$  indicam boa adesão (BINKS; HOROZOV, 2006). Para alcançar tal valor, é necessário que uma partícula esférica de, no mínimo, 160 nm esteja aderida a  $90^\circ$  em uma interface que apresente  $1 \mu\text{N m}^{-1}$ .

Existe uma imensa variedade de partículas que podem ser utilizadas como estabilizantes, variando sua origem, morfologia, carga, composição etc. (BINKS, 2017;

MURRAY; PHISARNCHANANAN, 2016; PICHOT et al., 2014). Sua escolha depende das propriedades almeçadas para a emulsão.

Vale destacar que a estabilização pode ser alcançada com partículas de origem natural e biodegradável com proteínas, proveniente de leguminosas, polissacarídeos como celulose, quitosana e amido, além de minerais e polímeros sintéticos biodegradáveis. Tais partículas apresentam vantagens como segurança, sustentabilidade, eficiência além de serem altamente versáteis (CALABRESE et al., 2018).

A estabilização por mecanismos de Pickering permite várias aplicações das emulsões A/A. Celik et al (2019), por exemplo, utilizaram emulsões de dextrana em poli(óxido de etileno) (PEO), estabilizada com partículas de proteína para formar *clusters* contendo queratinócitos microencapsulados na fase dispersa, que também pode ser utilizada como microrreatores na área de biotecnologia, como explorado por Cacace et al. (2015), em emulsões de dextrana em polietilenoglicol (PEG), mimetizando microcompartimentos para mineralização enzimática de carbonato de cálcio. O mesmo sistema, dextrana/PEG, pode ser utilizado para encapsular fármacos, como pregabalina (AYDIN; KIZILEL, 2017).

Binks et al. (2005) exploraram o uso de esporos de *Lycopodium clavatum* como partículas para estabilizar emulsões, tendo em vista sua capacidade de adsorção na interface entre óleo e água. Esporos são estruturas reprodutivas unicelulares produzidas por alguns organismos como fungos e plantas, sendo reconhecidos também por sua segurança que permite seu uso para microencapsulação de fármacos (KHANN et al., 2023; MUNDARGI et al., 2016). As cápsulas de exinas esporopolenina, extraídas de *L. clavatum*, também podem ser utilizadas como partículas para estabilização de emulsões A/A (SOTO-AGUILAR et al., 2024). Sua característica hipoalergênica as torna especialmente atrativas para aplicações em cosméticos ou alimentos.

Microrganismos também demonstram grande potencial para aplicação em emulsões de Pickering. Chen et al. (2015) modificaram a superfície de *Alcaligenes faecalis*, dopando com óxido de ferro, e as utilizaram na interface de emulsões O/A para realizar catálise interfacial de mandelonitrilo, composto hidrofóbico que fica na fase oleosa, em ácido mandélico, que por ser hidrofílico particiona para fase aquosa dispersa. As bactérias, recobertas pelo óxido de ferro, são recuperadas no fim da reação, facilitando sua reutilização. Emulsões A/O também podem ser estabilizadas por *Mycobacterium neoaurum* para biocatálise do colesterol em subprodutos que podem ser utilizados como intermediários da produção de esteroides e outros compostos de importância industrial (XIE et al., 2021). Por fim, emulsões A/A também merecem destaque

na área de alimentos e suplementos, como demonstram Ruan et al. (2023), ao encapsular microrganismos probióticos, como *Lactocabillus plantarum* em emulsões de dextrana em hidroximetilpropilcelulose (HPMC), resistentes ao meio ácido e melhorando a proteção em ambientes gastrointestinais, após secagem por *spray dryer*.

Probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014). Durante a passagem no trato gastrointestinal, os microrganismos, podem ser submetidos a ambientes severos, como meio ácido encontrado no estômago, reduzindo sua viabilidade. Uma maneira de contornar esse problema e aumentar sua eficiência é através do microencapsulamento com emulsões de Pickering (HAJI et al., 2022).

Emulsões água-em-água (A/A) não apenas oferecem a vantagem de serem livres de gorduras, mas também podem ser formadas a partir de polissacarídeos encontrados em alimentos, o que as torna ainda mais atrativa para essa aplicação (ESQUENA, 2023).

### 1.2.2 Estabilização por gelificação

Outra maneira viável de alcançar a estabilização de emulsões A/A é através da formação de uma emulsão em gel, também denominada “emulgel”, é uma matriz gelificada contendo uma dispersão na qual uma ou mais fases formam redes, resultando em uma textura semissólida. (ABDULLAH et al., 2022). A formação dessas estruturas ocorre pela adição de um agente gelificante à emulsão, que se auto-organiza para formar uma rede tridimensional reticulada. A gelificação pode ocorrer tanto na fase contínua quanto dispersa, sendo induzida por diferentes métodos como aquecimento, variação de pH, enzimas, adição de sal, entre outros (WU et al., 2021).

Emulsões A/A, formadas por PEO e dextrana, por exemplo, podem ser estabilizadas com nanopartículas de sílica negativamente carregadas. As partículas se adsorvem na interface do sistema e interagem preferencialmente com PEO, gelificando-o em condições adequadas, sendo como fase contínua, formando gel, ou fase dispersa, formando *beads* (SHEKHAR et al., 2023). Partículas formadas por gliadina e amido também podem ser utilizados para gelificação de emulsões de Pickering. Elas aderem à interface do óleo disperso na água formando uma rede tridimensional que gelifica a emulsão. Além disso, os géis se demonstram estáveis em meio ácido, sugerindo a proteção de bioativos em ambiente estomacal e melhorando a entrega em meio intestinal (SONG et al., 2023).

Utilizando nanocristais de celulose, a estabilidade de emulsões também pode ser alcançada, as quais aglomeram frente adição de cloreto de sódio. Eles podem estabilizar por mecanismos de Pickering e, quando em excesso na fase contínua, podem gelificar a emulsão como um todo (AYED et al., 2018) ou apenas na interface das gotículas da fase dispersa (ZHOU et al., 2023).

Neste trabalho as duas abordagens estabilização citadas foram utilizadas. As emulsões de Pickering foram avaliadas na presença de células de levedura, *Saccharomyces cerevisiae* e a gelificação foi realizada através da enzima  $\beta$ -galactosidase, ambos serão detalhados a seguir, bem como os demais componentes da emulsão: amilopectina (AMP) e xiloglucana (XG).

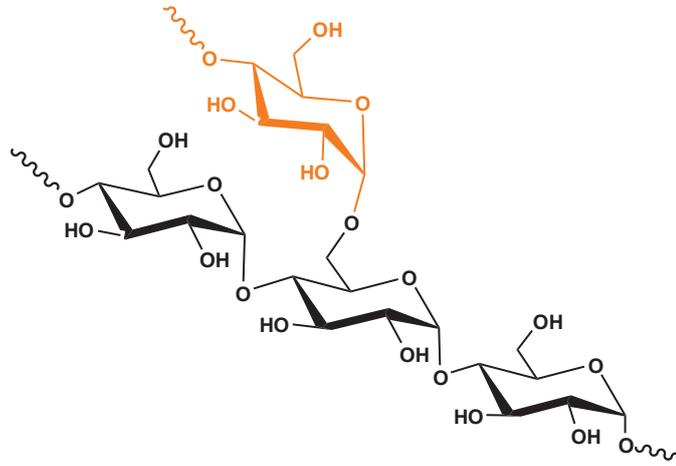
### 1.3 EMULSÕES ENTRE AMILOPECTINA (AMP) E XILOGLUCANA (XG)

A mistura entre os polissacarídeos, não-iônicos, de origem natural, AMP e XG, podem ser utilizados para formação de emulsões A/A (FREITAS et al., 2016; HAZT et al., 2020; PIRES et al., 2023).

Os carboidratos são os polissacarídeos mais abundantes da Terra, dada sua importância nutricional como fonte de energia tanto para organismos autotróficos quanto heterotróficos. A AMP, assim como amilose, é um polissacarídeo presente no amido. Destacando-se como biomaterial por possuir características além da abundância como baixo custo, não-toxicidade e biodegradabilidade (APRIYANTO; COMPART; FETTKE, 2022). Sua estrutura é composta por unidades de  $\alpha$ -D-glucose, conectadas por ligações 1  $\rightarrow$  4 formando a cadeia principal, com ramificações formadas por ligações 1  $\rightarrow$  6, como ilustra a FIGURA 7. Sua massa molar pode variar entre  $10^7$  e  $10^9$  g mol<sup>-1</sup> (BERTOFT, 2013; SMITH, 2001).

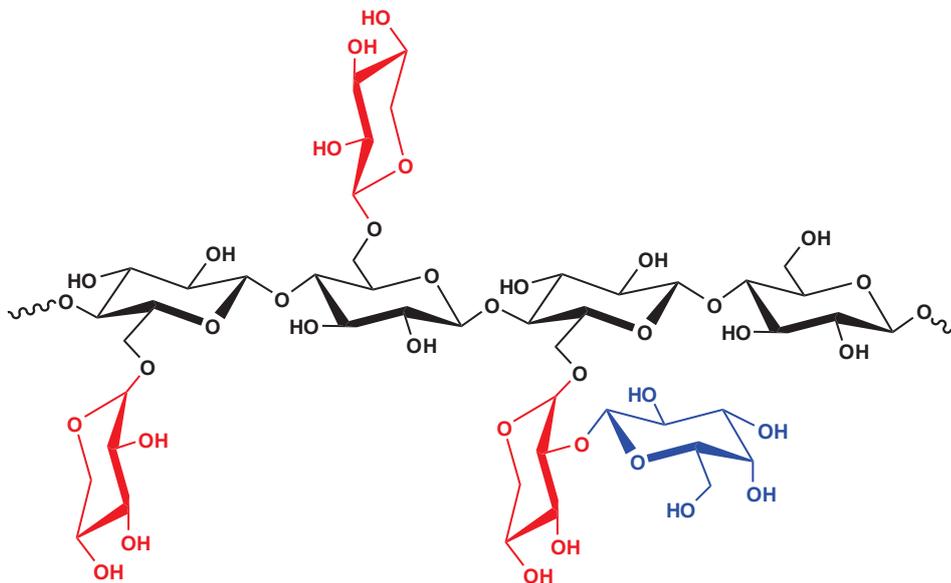
A XG também é um polissacarídeo de reserva presente em espécies vegetais como o Tamarindo (*Tamarindus indica*), Jatobá (*Hymenaea courbaril*), dentre outras. Conforme ilustrado na FIGURA 8, sua estrutura é composta por uma cadeia linear de  $\beta$ -D-glucose, com ligações 1  $\rightarrow$  4, apresentando  $\alpha$ -D-xilose em ligações 1  $\rightarrow$  6, podendo apresentar unidades de  $\beta$ -D-galactose com ligações 1  $\rightarrow$  2 na xilose (SCHULTINK et al., 2014). Esse biopolímero apresenta características como mucoadesividade, biocompatibilidade, além de ser passível à gelificação (KULKARNI et al., 2017). Formulações farmacêuticas baseadas em XG estão ganhando notoriedade em diversas aplicações como rotas para carreamento de fármacos (DUTTA; GIRI; GIRI, 2020; KUMAR et al., 2017; MAHAJAN et al., 2012).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA AMILOPECTINA. A CADEIA PRINCIPAL É FORMADA POR UNIDADES DE  $\alpha$ -D-GLUCOSE, COM LIGAÇÕES 1  $\rightarrow$  4 E RAMIFICAÇÕES EM 1  $\rightarrow$  6, EM LARANJA.



FONTE: Adaptado de Smith (2001).

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DA XILOGLUCANA. A CADEIA PRINCIPAL É FORMADA POR UNIDADES DE GLUCOSE, COM LIGAÇÕES 1  $\rightarrow$  4, EM PRETO, APRESENTANDO RAMIFICAÇÕES COM XILOSE EM 1  $\rightarrow$  6, REPRESENTADO EM VERMELHO, COM ALGUMAS SUBSTITUIÇÕES COM GALACTOSE EM XILOSE, EM LIGAÇÕES 1  $\rightarrow$  2, EM AZUL.



FONTE: Adaptado de Park e Cosgrove (2015).

Além disso, a XG é considerada uma fibra dietética, ou seja, não é digerível e não atravessa membrana intestinal. É reconhecida, também, por estimular o crescimento e atividade de bactérias benéficas no intestino, o que promove a saúde intestinal (ESQUENA-MORET,

2022). As fibras dietéticas passíveis de degradação na microbiota intestinal, principalmente por lactobacilos e bifidobactérias, são consideradas prebióticos. As fibras degradadas por esses microrganismos produzem ácidos graxos de cadeia curta, os quais são rapidamente absorvidos, através do cólon, para corrente sanguínea, importantes para produção de energia e funcionamento adequado do organismo (BAMIGBADE et al., 2022).

Estudos sugerem que a XG apresenta efeitos muito benéficos na saúde intestinal, alterando significativamente a microbiota. Durante sua fermentação há uma produção expressiva de ácidos graxos de cadeia curta, além da modulação da microbiota (MORO CANTU-JUNGLES et al., 2019). Outros benefícios relatados incluem a regulação do açúcar e lipídeos no sangue, além de proteção da mucosa intestinal (CHEN et al., 2020).

Estudos *in-vivo* demonstram que a suplementação com XG em camundongos alimentados com dieta rica em gordura auxilia na perda de peso, além de melhorar o perfil lipídico, reduzindo os níveis de triglicerídeos, colesterol total e lipídeos hepáticos, quando comparados com o grupo controle (CHENG et al., 2020). A redução de distúrbios metabólicos também foi relatada por Zhu et al. (2023), que observaram a redução de inflamação no fígado e potencial efeito antioxidante com a suplementação de XG.

Os benefícios da XG em dietas controladas estão alinhados com uma das propostas das emulsões água-em-água (A/A): a criação de alimentos sem gordura.

A mistura entre os polissacarídeos, AMP e XG, dispersos em água, pode apresentar separação de fases completa após determinado período, entre horas e dias, dependendo das concentrações de ambos os componentes, determinadas pelo diagrama de fases, ferramenta indispensável para concepção e aplicação das emulsões formadas (FREITAS et al., 2016; HAZT et al., 2020; PIRES et al., 2023). É possível distinguir concentrações nas quais a XG será fase contínua ou dispersa, bem como regiões de bicontinuidade (linha 50:50) e linhas de amarração destacando propriedades semelhantes ao longo dela, como a mesma tensão interfacial do sistema. O diagrama desse sistema foi descrito por HAZT et al. (2020) e será detalhado ao decorrer desse trabalho.

#### 1.4 ESTABILIZAÇÃO DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA E XILOGLUCANA

Emulsões entre AMP e XG podem ser estabilizadas por microgéis de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ LGm), que apresentam maior afinidade por AMP em pH acima de 5 e pela XG, em pH mais baixo. A estabilização ocorre devido à adsorção de XG nos microgéis, iniciando em pH abaixo

de 5,5. O efeito da morfologia de  $\beta$ LGm foi explorada por Hazt et al. (2020). Em pH menor 5, os microgéis estabilizam as emulsões e em pH mais alto a interação com AMP induziu a formação de gel, por outro lado, as nanofibrilas estabilizaram as emulsões em diferentes valores de pH, evidenciando a importância da morfologia.

A celulose também pode ser utilizada para estabilização de emulsões entre AMP e XG. A hidrólise ácida da celulose microcristalina pode resultar em nanocristais de celulose em forma de bastão com alomorfo do tipo I, similar ao encontrado na celulose nativa. Tais nanocristais apresentam interação preferencial com a XG, o que resulta na formação de géis estáveis. Por outro lado, a celulose mercerizada pode ter sua morfologia alterada para uma forma esférica e para o alomorfo do tipo II, que interage menos com a XG, mas estabiliza as emulsões por meio do efeito Pickering (PIRES et al., 2023).

Como exposto, emulsões A/A podem ser estabilizadas por partículas ou gelificação de uma das fases. Para emulsões A/A, esse trabalho aborda duas metodologias para estabilização: com leveduras, através do uso de células de *S. cerevisiae* inativadas e gelificação enzimática da XG. A escolha de utilizar células de levedura foi motivada não apenas por sua significativa importância comercial, mas também pelos potenciais benefícios que podem oferecer como suplemento alimentar para a saúde humana. Além disso, a estabilização por meio da gelificação enzimática reforça a viabilidade de sua aplicação em alimentos, explorando novas texturas e possibilitando a criação de emulsões livres de gordura.

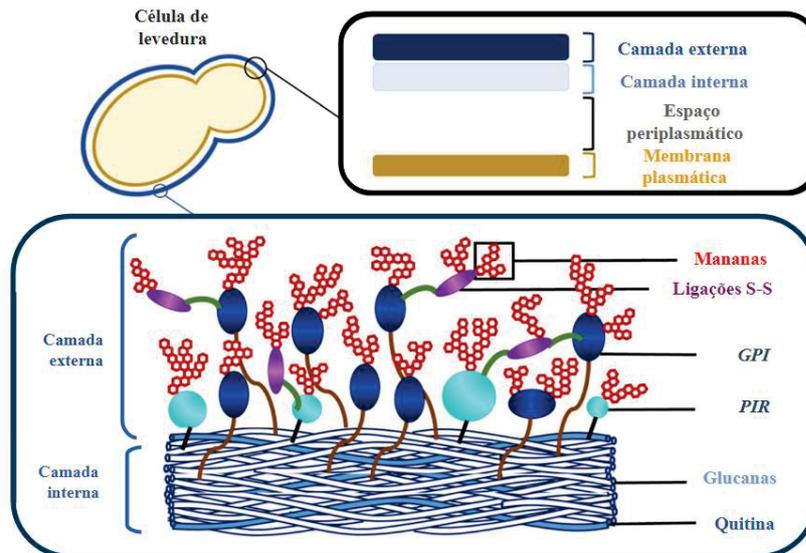
#### 1.4.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, em sua maioria pertencentes à ordem Saccharomycetales. A espécie mais conhecida é a *Saccharomyces cerevisiae*, muito utilizada em processos fermentativos na indústria de alimentos (PARAPOULI et al., 2020). A complexidade da arquitetura de sua parede celular surgiu de acordo com estudos genéticos, moleculares e bioquímicos, que conduziram à descoberta de várias interconexões entre os vários componentes da parede celular, levando a complexos macromoleculares (OSUMI, 1998).

Além de fornecer uma barreira resistente, os componentes da parede celular regulam propriedades como pressão osmótica, acessibilidade molecular e interações entre célula-célula e célula-ambiente (SMITS et al., 1999). Todas essas características podem ser atribuídas à sua complexa composição macromolecular que varia de acordo com o ambiente, respondendo às

variações de temperatura, pH e força iônica, por exemplo. A FIGURA 9 ilustra os principais componentes da parede celular das leveduras, bem como sua estrutura.

FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS, COMPOSTA POR CAMADAS EXTERNAS, CONTENDO MANANAS COM LIGAÇÕES COVALENTE POR LIGAÇÕES DISSULFETO, GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL (GPI) OU PROTEÍNAS DE REPETIÇÃO INTERNA (PIR) E UMA CAMADA INTERNA, COMPOSTA POR GLUCANAS E QUITINA.



FONTE: Adaptado de Yammine et al. (2022).

Entre a membrana plasmática e a camada interna, constituída principalmente de  $\beta$ -glucanas (acima de 60 % da massa seca) e quitina há um espaço periplasmático. A camada externa é, majoritariamente, formada por mananas, as quais podem apresentar ligações covalentes sendo conhecidas como proteínas da parede celular (CWP, do inglês *Cell Wall Protein*), podendo ser classificadas de acordo com seu tipo de ligação: GPI-CWP, mananas ligadas a grupamentos glicosilfosfatidilinositol (GPI), ligados por ligações de dissulfeto e ligações com proteínas de repetição interna (PIR, do inglês *Protein with Internal Repeats*) (YAMMINE et al., 2022).

Em 1970, Srivastava et al., apontaram que microrganismos (células de levedura) atuam como partículas estabilizantes em emulsões de Pickering durante a fermentação de hidrocarbonetos. Ao utilizar células secas, foi possível estabilizar emulsões com mais de 85% (v/v) de fase oleosa, devido às propriedades hidrofílicas da membrana celular. Além disso, foi notada uma redução significativa na tensão interfacial entre o óleo e a água. Por outro lado, Nejadmansouri et al. (2023) notaram que, entre 19 microrganismos probióticos avaliados, a levedura apresentou baixa estabilidade devido às suas propriedades hidrofílicas. Entretanto a

parede celular pode ser modificada, como propuseram Zhu et al. (2014) ao modificar a superfície de leveduras com ácido oleico, tornando-as hidrofóbicas para estabilizar emulsões A/O por efeito Pickering. Firoozmand e Rousseau (2016) utilizaram leveduras inativadas termicamente para preparar emulsões com apelo “totalmente natural” em emulsões com fase oleosa acima de 80 % (v/v), estáveis por mais de 4 meses.

Em emulsões A/A, entre gelatina e maltodextrina, a utilização de bactérias e leveduras podem alterar a cinética de separação de fases, podendo ser utilizadas como modificadores reológicos de géis, aumentando seu módulo elástico (FIROOZMAND; ROUSSEAU, 2014). Entretanto, escassos são os relatos na literatura que utilizam leveduras como partículas para formação de emulsões A/A estáveis, o que reforça a inovação na abordagem aqui avaliada.

#### 1.4.2 Gelificação Enzimática

A  $\beta$ -galactosidase possui a capacidade de hidrolisar grupos galactose de biopolímeros, oligossacarídeos e metabólitos secundários. Essas enzimas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos devido à sua capacidade de conferir sabor, solubilidade e melhorar a digestibilidade de produtos lácteos. Diferentes fontes de  $\beta$ -galactosidase estão disponíveis, como plantas, bactérias e leveduras, cada uma com condições ideais de pH e temperatura para sua atividade (SAQIB et al., 2017).

Como mencionado, cadeias poliméricas tais como as de XG, que apresentam grupamentos de galactose em sua cadeia lateral, podem ser hidrolisadas parcialmente. Brun-Graepi et al. (2010) observaram que a XG oriunda de tamarindo (*Tamarindus indica*), na presença de  $\beta$ -galactosidase, pode formar géis termorreversíveis. Também foi observado que uma menor quantidade de grupamentos galactose na cadeia do polissacarídeo intensifica a interação entre as próprias cadeias do polímero e reduz a interação com a água. Isso indica que a hidrofobicidade está diretamente relacionada ao teor de galactose na cadeia polimérica, conforme revelado por experimentos de espalhamento de luz dinâmico. Ou seja, como a galactose é responsável pelo segmento mais hidrofílico, uma vez removido, os segmentos hidrofóbicos apresentam maior interação.

A remoção enzimática de unidades de galactose também ocorre no trato digestivo de humanos e, experimentos em ratos indicam que a XG com galactose parcialmente removida apresenta os mesmos benefícios da nativa (YAMATOYA et al., 2011). Parâmetros como tempo

e temperatura de gelificação de XG podem ser facilmente controlados através da quantidade de grupamentos galactose removidos enzimaticamente (NISBET et al., 2006).

Em um estudo detalhado, conduzido por Sakakibara et al. (2017), observou-se que o aumento da concentração de enzima influencia na cinética de gelificação sem afetar a estrutura e rigidez do gel formado. Esse trabalho norteia a possibilidade de estabilização das emulsões de AMP em XG através da atividade enzimática da  $\beta$ -galactosidase.

Na presente tese, os resultados destacam o potencial inovador das células de levedura nas emulsões A/A, explorando a influência da força iônica do meio. Além disso, são apresentados os detalhes da cinética de gelificação enzimática e da microestrutura das emulsões obtidas. Por fim, os resultados revelam novas abordagens para a aplicação desses sistemas, especialmente através da combinação estratégica de leveduras e enzimas, ampliando as possibilidades de uso e os horizontes de pesquisa nessa área.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

Investigar a eficácia da estabilização de emulsões entre amilopectina e xiloglucana utilizando células de levedura e enzimas para gelificação enzimática.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Utilizar células de levedura inativadas termicamente em diferentes concentrações e condições salinas para estabilização de emulsões tipo Pickering;
- Descrever, em detalhes, a cinética de gelificação enzimática, utilizando diferentes temperaturas e concentrações de  $\beta$ -galactosidase em suspensões de xiloglucana, e nas emulsões;
- Analisar macroscopicamente o comportamento das leveduras e enzimas nas emulsões e analisar a microestrutura formada através de técnicas de microscopia confocal a laser;
- Acompanhar a estabilidade macroscópica das emulsões, por leveduras e/ou gelificação, em três pontos distintos do diagrama de fases.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Xiloglucana (DSP Gokyo Food & Chemical Co., Lote 18.08.27-1), amilopectina (Sigma-Aldrich, lote BCBV5057), água ultra purificada (18 M $\Omega$  cm, Gehaka, OS20LXE), enzima  $\beta$ -galactosidase (*Aspergillus niger*, Megazyme, lote 140801a), levedura (*Saccharomyces cerevisiae*, Angel Yeast Co.), NaCl (Synth), NaN<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, lote STBJ7813), etanol (Ilha, absoluto), DMSO (PA, Synth), NaOH (Neon Química), KCl (Synth), HCl (Synth), FITC (Sigma-Aldrich).

### 2.2 EMULSÕES

#### 2.2.1 Preparo dos polissacarídeos

A XG foi dispersa em água ultrapura numa concentração de 10 g L<sup>-1</sup> com 200 ppm de NaN<sub>3</sub> como conservante, por 24 h em agitação magnética (500 rpm). Posteriormente, foi precipitada em 3x seu volume com etanol absoluto. O precipitado foi filtrado e seco à 40 °C em estufa a vácuo. Por fim o material foi triturado e armazenado em ambiente seco e protegido da luz para uso (PIRES et al., 2023).

A AMP foi dispersa em uma mistura de DMSO e água (95:5 v/v) em uma concentração de 50 g L<sup>-1</sup> sob agitação magnética (1000 rpm) por 48 h. Posteriormente, foi precipitada em etanol, filtrada, seca e armazenada conforme relatado para XG (PIRES et al., 2023).

#### 2.2.2 Emulsificação

As emulsões foram preparadas, a partir das dispersões de AMP e XG, em três pontos distintos do diagrama de fases, nos quais a AMP é fase contínua ou dispersa e em uma mistura na qual a emulsão é bicontínua (50:50 v/v).

Após a pesagem da mistura polissacarídeos, o ajuste da concentração é realizado com água ultrapura, partículas (leveduras) ou enzimas. Posteriormente, a mistura, contendo 3 mL, é emulsionada em vórtex (Genie 2) por 60 s. Os tubos são deixados em repouso, em ambiente com temperatura controlada. Usualmente, são registradas fotos até 96 h após emulsificação.

### 2.2.3 Determinação da tensão interfacial

A tensão interfacial na linha de amarração do ponto A e, conseqüentemente, M e B foi quantificada a partir da técnica de retração da gota. Nesse método, a tensão é quantificada através de medidas da evolução do diâmetro da gotícula da fase dispersa em função do tempo após remover o estresse (DING et al., 2002). Para isso, a emulsão de AMP e XG é preparada e disposta em uma lâmina escavada e o estresse é aplicado, cuidadosamente com uma espátula, empurrando a lamínula. Como resultado, a gotícula é deformada e, após remoção do estresse, volta ao diâmetro inicial. A tensão interfacial pode ser quantificada de acordo com a equação (9) e (10).

$$\ln D(t) = \ln D_0 - \frac{t}{\tau} \quad (9)$$

$$\tau = \frac{\mu_c R_0 (19\lambda + 16\lambda)(2\lambda + 3)}{\sigma 40(\lambda + 1)} \quad (10)$$

Onde  $D(t)$  é o diâmetro da gotícula no tempo ( $t$ ),  $D_0$ , o parâmetro de deformação no tempo inicial e  $\tau$  representa o tempo característico que está relacionado com a viscosidade da fase contínua  $\mu_c$ ,  $R_0$  o raio da gotícula retraída,  $\lambda$  é a razão entre a viscosidade da fase dispersa e contínua e, por fim, a tensão interfacial é dada por  $\sigma$ .

### 2.2.4 Avaliação Microscópica

As emulsões foram avaliadas através da técnica de microscopia confocal a laser (Nikon, A1R MP+). A AMP foi marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) através da reação descrita por Belder e Granath (1973). Em massa, o valor da AMP-FITC utilizada foi de 10 %, quantidade que não afeta a separação de fases. Com isso, a fase de AMP absorve energia em 490 nm, emitindo em 550 nm.

Para avaliação das leveduras, foi adicionado 5 ppm de Azul do Nilo às suspensões, por 12 h, antes da mistura com os biopolímeros. Essa quantidade de corante não afeta as interações entre AMP e partículas, possibilitando sua melhor visualização. O corante utilizado absorve em 631 nm e emite em 660 nm.

Cerca de 100  $\mu\text{L}$  de emulsões foram depositadas no *holder* (Greiner Bio-one) para confocal, ou dispostas em lâminas escavadas vedadas, para evitar evaporação, e mantidas na posição vertical até a hora da análise, permitindo a reprodução do ambiente real no qual as emulsões são armazenadas.

## 2.3 CÉLULAS DE LEVEDURA

### 2.3.1 Inativação Térmica

A levedura comercial foi suspensa em água ultrapura, em uma concentração de 5 % (m/m) e agitada por 30 min em agitação magnética (500 rpm), em temperatura controlada de 80 °C. Após resfriar a suspensão para temperatura ambiente (~23 °C), esta foi submetida a cinco ciclos de centrifugação de 5 minutos a 1000 g a 20 °C. O sobrenadante foi descartado e o material sedimentado foi ressuspense em água com agitação em vórtex. Após o quinto ciclo, a levedura foi seca em estufa a 30 °C, por 40 h.

### 2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Após secagem, as leveduras inativadas e comerciais foram analisadas através da técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com reflectância atenuada (FTIR-ATR) (Alpha FT-IR, Alpha-P Bruker). Os espectros, entre região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  foram obtidos com 32 varreduras e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.3 Potencial Zeta

O potencial zeta foi avaliado em suspensões aquosas de 0,02 % (m/m), através da mobilidade eletroforética aplicando a aproximação de Smoluchowski com  $f(\text{Ka}) = 1,5$ , com laser de 633 nm, utilizando o equipamento ZetaSizer (Malvern, ZEN3600), a 25 °C, em cubeta DTS1070 (Malvern). O efeito do pH foi avaliado em valores entre 2 e 9, ajustados com soluções de NaOH ou HCl 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . Para avaliação do efeito do sal, a suspensão de levedura foi titulada com solução de NaCl concentrada através do titulador MPT-2 (Malvern). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

## 2.4 REOLOGIA

### 2.4.1 Cinética de gelificação enzimática de xiloglucana

Para observar o tempo necessário para formação de gel de XG, em diferentes temperaturas e concentrações de  $\beta$ -galactosidase, foram realizados ensaios dinâmico oscilatórios, através de reologia, utilizando o equipamento Rheostress 1 (Thermo Scientific Haake), equipado com geometria cone placa (60 mm, 2°).

A XG foi dispersa a 2,0 % (m/m) em água ultrapura, conservada com 200 ppm de  $\text{NaN}_3$ , por 24 h. Para análise, a concentração do biopolímero utilizada foi de 1,30 % (m/m), com adição de 0,40; 0,80; 1,15; 1,50 e 1,90 U de  $\beta$ -galactosidase por mg de XG. O pH, em todas as medidas foi de 5,5. Os módulos  $G''$  e  $G'$  foram acompanhados em função do tempo, em uma frequência angular de  $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$ , a tensão imposto ( $\sigma = 0,1 \text{ Pa}$ ). As suspensões foram avaliadas em temperaturas de 25, 30, 40, 45 e 50 °C, controladas por banho termostático. Para evitar evaporação, a geometria do sensor foi recoberta com uma camada de óleo mineral. O tempo de gelificação ( $t_{\text{gel}}$ ) foi obtido a partir do cruzamento entre os módulos  $G'$  e  $G''$ .

### 2.4.2 Viscosidade e Curvas de Frequência

A viscosidade das emulsões, bem como a varredura de frequência, foi analisada no reômetro HR10 (TA instruments), equipado com geometria cone placa (40 mm, 2°), mantendo *gap* de 300  $\mu\text{m}$ . A viscosidade foi observada de 1 a 100  $\text{s}^{-1}$  em 400 s, sob condições de estado estacionário, para emulsões contendo entre 0,50 e 2,00 % (m/m) de partículas. E a avaliação do efeito de NaCl na viscosidade foi avaliado a 1 e 20  $\text{mmol L}^{-1}$  em amostras contendo 2,0 % (m/m) de levedura.

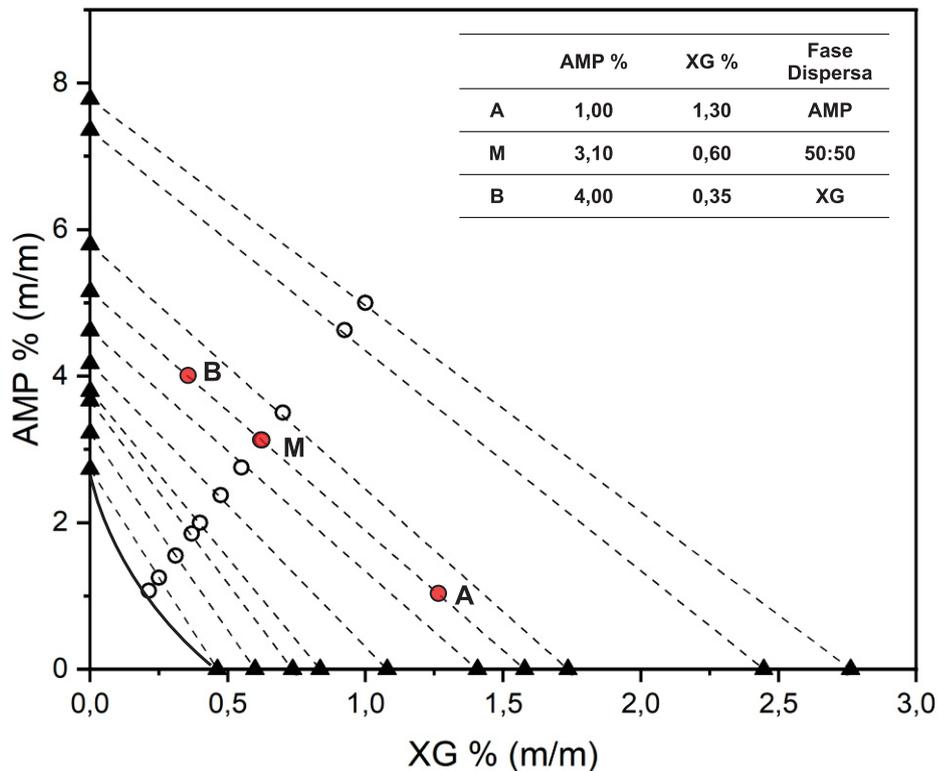
A varredura de frequência avaliou o impacto da adição das leveduras a 2,0% (m/m). Os módulos de perda ( $G''$ ) e armazenamento ( $G'$ ) foram acompanhados, a 25 °C, em função da frequência angular ( $\omega$ ), variando entre 0,01 e 100  $\text{rad s}^{-1}$ , o estresse imposto ( $\sigma = 0,1 \text{ Pa}$ ) está dentro do regime viscoelástico do sistema (SAKAKIBARA et al., 2017).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 DIAGRAMA DE FASES

A partir do diagrama de fases descrito por Hazt et al. (2020), apresentado na FIGURA 10, é possível determinar concentrações nas quais as misturas entre AMP e XG separam fase. Nesse estudo foram utilizadas três condições: AMP fase dispersa ou contínua (ponto A e B, respectivamente) e uma emulsão bicontínua na linha 50:50 (ponto M) na qual, após a separação, o volume das fases são equivalentes.

FIGURA 10 - DIAGRAMA DE FASES PARA EMULSÕES DE AMILOPECTINA (AMP) E XILOGLUCANA (XG), DESTANDO OS PRINCIPAIS PONTOS AVALIADOS (A, M E B).



FONTE: Adaptado de Hazt et al. (2020).

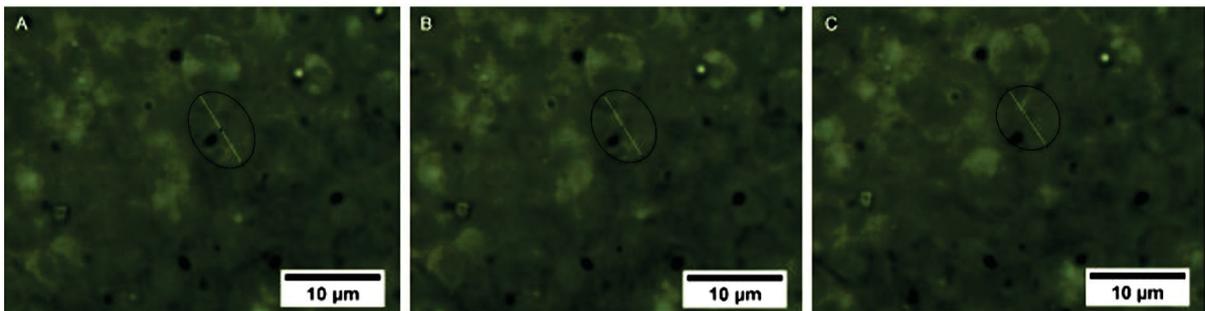
#### 3.2 TENSÃO INTERFACIAL

Os três pontos avaliados (A, B e M) encontram-se na mesma linha de amarração, apresentando o mesmo valor de tensão interfacial, cuja determinação não é trivial. No entanto, a técnica de retração da gota é uma técnica viável para essa quantificação (BALAKRISHNAN et al., 2012; DING et al., 2002; FREITAS et al., 2016). Neste método, um estresse controlado

é aplicado para deformar a gota, e a evolução do seu diâmetro até retornar ao valor inicial é monitorada em função do tempo. A partir dessa análise, a tensão interfacial pode ser calculada.

A FIGURA 11 ilustra o comportamento para gotícula de AMP (1,00 % m/m) dispersa em XG (1,30 % m/m).

FIGURA 11 - GOTÍCULA DE AMP (1,00 %) DISPERSA EM XG (1,30 %) APÓS APLICAÇÃO DE FORÇA DE CISALHAMENTO,  $t = 0$  s (A), EM 5 s (B) E APÓS 11 s (C).



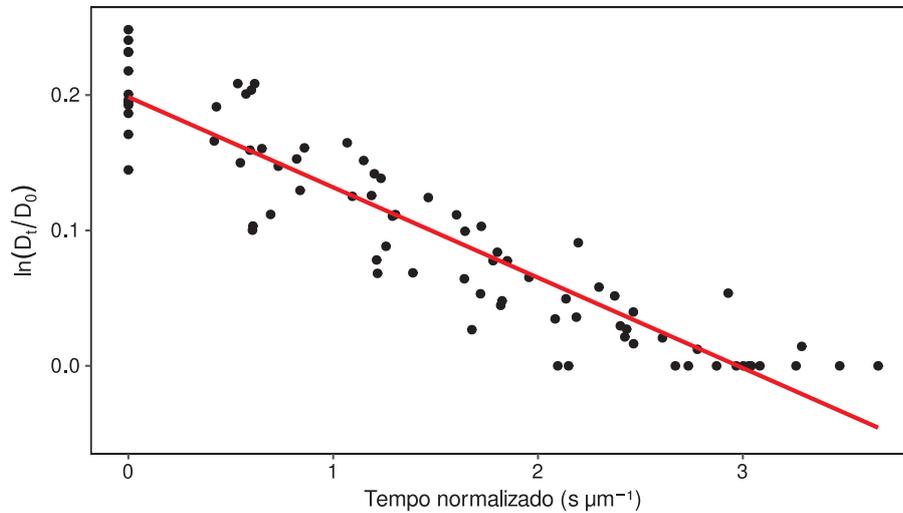
FONTE: Adaptado de Regnier (2021).

A equação (9) demonstra que a deformação da gota diminui exponencialmente com o tempo após remoção da força aplicada. O tempo característico ( $\tau$ ) está relacionado com a tensão interfacial, viscosidade das fases e com o raio da fase dispersa. O coeficiente linear da equação fornece o valor de  $\tau$  e, conseqüentemente de acordo com a equação (10) a tensão interfacial do sistema.

A FIGURA 12 relaciona o parâmetro de deformação em função do tempo de relaxamento da gotícula da fase dispersa, normalizado por seu diâmetro. A reta que melhor se ajusta aos dados apresenta coeficiente angular de  $-0,052 \mu\text{m s}^{-1}$ . Considerando os demais valores de viscosidade de zero fluxo da fase contínua ( $0,41 \text{ Pa s}$ ) e dispersa ( $0,28 \text{ Pa s}$ ), raio médio das gotículas dispersas ( $2,56 \pm 0,65 \mu\text{m}$ ) é possível obter o valor tensão interfacial, resultando em  $0,10 \mu\text{N m}^{-1}$ .

O valor calculado vai de encontro ao já reportado na literatura para emulsões com AMP e XG (FREITAS et al., 2016). E é comparável ao valor de outros sistemas A/A, como  $1,0 \mu\text{N m}^{-1}$  encontrado para PEO e Dextrana (BALAKRISHNAN et al., 2012).

FIGURA 12 - VARIAÇÃO DO DIÂMETRO INICIAL ( $D_0$ ) APÓS CISALHAMENTO IMPOSTO ( $D_T$ ) EM GOTÍCULAS DE AMILOPECTINA DISPERSAS EM UMA MATRIZ DE XILOGLUCANA, OBSERVADOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE RELAXAÇÃO NORMALIZADO PELO DIÂMETRO ( $s \mu\text{m}^{-1}$ ).



FONTE: Adaptado de Regnier (2022).

### 3.3 EMULSÕES ESTABILIZADAS POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

As células de levedura foram inativadas para evitar qualquer tipo de atividade biológica na emulsão. Essa abordagem foi adotada para avaliar, exclusivamente, as características das células como estabilizantes.

A inativação pode ser alcançada com o aumento da temperatura. Quando uma suspensão de células é mantida a 55 °C, o tempo de redução decimal é inferior a 3 minutos (LÓPEZ-MALO; GUERRERO; ALZAMORA, 1999). As condições descritas nesse estudo (30 min, 80 °C) garantem a inativação.

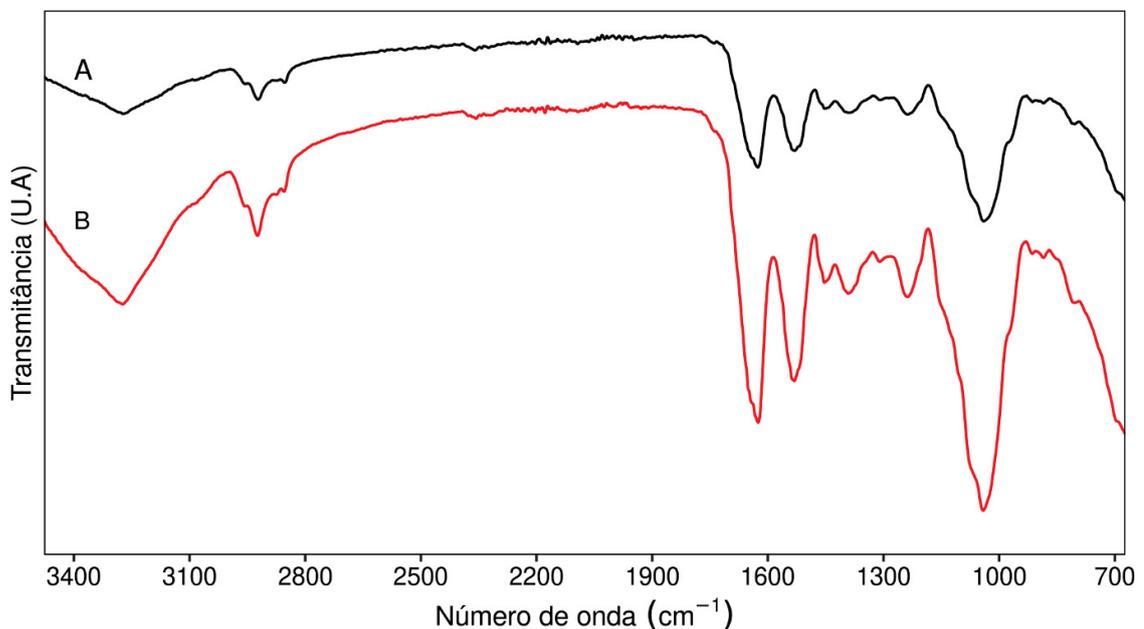
As células de levedura podem assumir diversas morfologias, como ovoides, esféricas, baciliformes, entre outras. A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, comumente morfologia esférica, com diâmetro próximo de 5 μm (CHAVEZ et al., 2024). As organelas e outros compartimentos celulares são protegidos do ambiente externo através da parede celular, que apresenta dimensões entre 100 e 200 nm, formada por uma rede entre polissacarídeos, proteínas e lipídeos (KLIS et al., 2002). Em sua camada mais interna, a parede, é formada por redes de β-glucanas e quitina, garantindo elasticidade e resistência mecânica. A camada externa, por outro lado, é composta por mananas e manoproteínas fortemente glicosiladas cujas funções incluem a adesão, reconhecimento e interações celulares, protegendo contra agentes externos (YAMMINE et al., 2022).

Os grupamentos presentes na parede celular das células comerciais e inativadas podem ser evidenciados a partir da técnica de espectroscopia no infravermelho, exibida na FIGURA 13.

Em  $3293\text{ cm}^{-1}$  é possível observar os estiramentos de sobreposição entre OH e NH (amina), o estiramento assimétrico dos grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) é observado em  $2924\text{ cm}^{-1}$ . As aminas primárias e secundárias, são representadas por estiramentos na região entre  $1535$  e  $1660\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, além da ligação C=O e NH da ligação peptídica, presente em proteínas da parede celular. Em  $1040\text{ cm}^{-1}$  há estiramentos de grupamentos fosfato, presentes em fosfolípidios, bem como ligações C-O de carboidratos (GALICHET et al., 2001).

Os resultados do FTIR também estão de acordo com os observados por Hlihor et al. (2013), para leveduras inativadas termicamente. Além disso, é possível notar que não há diferença nos estiramentos observados para leveduras antes e após inativação térmica, o que sugere que as leveduras foram apenas inativadas sem alteração dos grupamentos químicos presentes nas células.

FIGURA 13 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO OBTIDOS PARA AMOSTRAS DE *S. Cerevisiae* COMERCIAL (A) E APÓS SUA INATIVAÇÃO TÉRMICA (B).



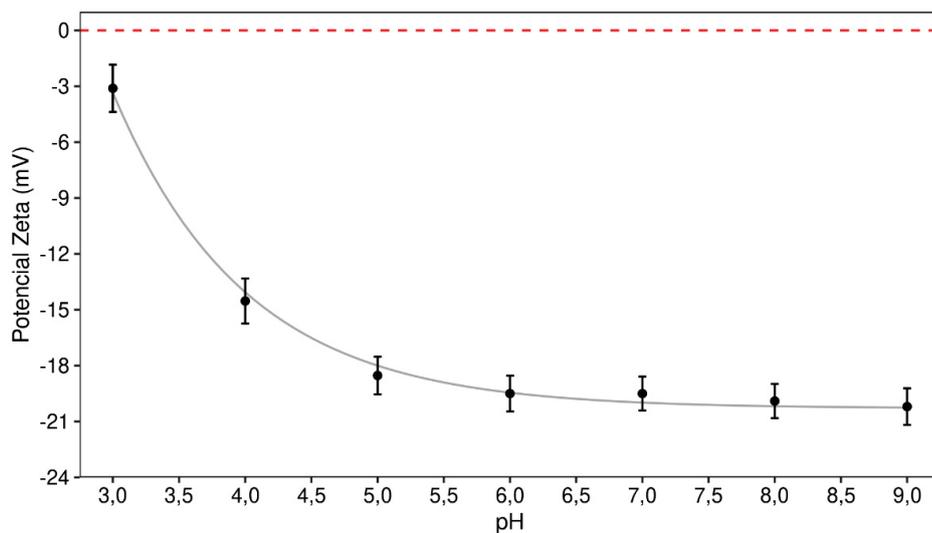
FONTE: O autor (2023).

Os grupamentos presentes na superfície também são responsáveis pelo comportamento das células quando suspensas em água. Através de titulação condutométrica, Zhang et al. (2010)

sugerem  $pK_a$  de 3,5 – 5,3 para os grupamentos carboxila, 6,2 – 7,3 para fosforil, 8,9 – 11 para amina e 9,5 – 10,1 para hidroxilas.

As partículas em suspensão experimentam quatro tipos de interações relevantes: 1) entre as cadeias de polissacarídeos; 2) hidrodinâmica (repulsiva); 3) interações de longa distância (van der Waals e dupla camada elétrica) e 4) interações de curto alcance (repulsivas ou atrativas) (CHANG; CHANG, 2002). Considerando que as manoproteínas na camada externa são eletricamente carregadas (OSUMI, 1998), o potencial zeta é uma ferramenta importante para avaliar a estabilidade e as propriedades da suspensão em face de alterações no meio, como pH e força iônica (NARONG; JAMES, 2006), conforme ilustrado na FIGURA 14, variando o pH na suspensão de leveduras.

FIGURA 14 - VARIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE CÉLULAS DE *S. Cerevisiae*, INATIVADAS TERMICAMENTE, AVALIADAS EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DE pH.



FONTE: O autor (2023).

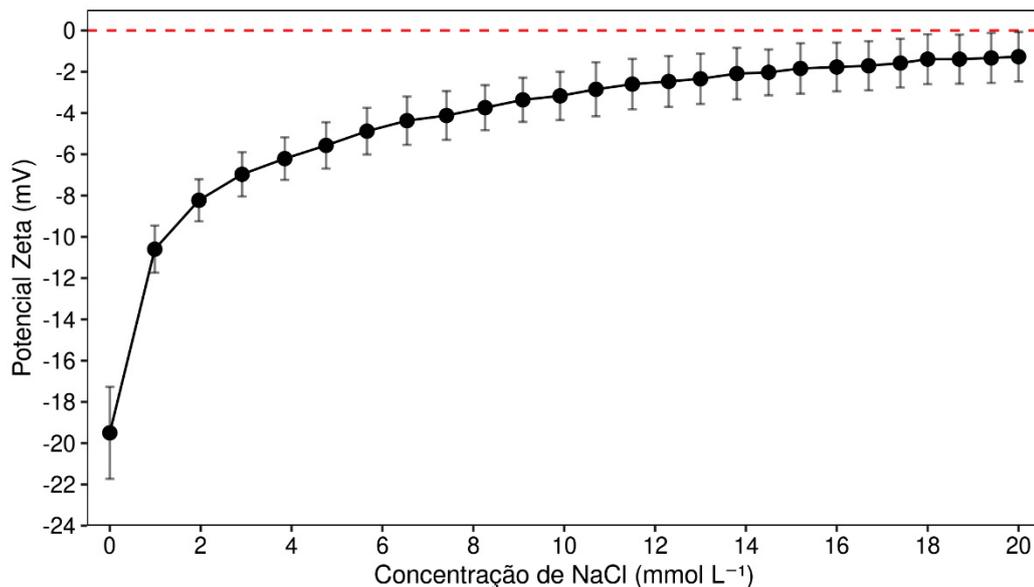
Em pH 3 os valores de potencial zeta são próximos de zero, o que está de acordo com o observado em outros trabalhos da literatura (NARONG; JAMES, 2006) indicando que os grupamentos estão protonados e isso reduz a repulsão entre as células, justificando o baixo valor do potencial zeta. Por outro lado, ao aumentar o pH os grupamentos são desprotonados, apresentando carga negativa, o que aumenta a repulsão entre as células. O valor constante, acima de pH 6, indica que não há mais sítios desprotonáveis, mantendo um valor constante no potencial. As emulsões são preparadas em pH 5,5 e nesse valor, o potencial zeta das leveduras é cerca de -19 mV.

Sais podem alterar as propriedades da dupla camada elétrica das partículas e com isso alterar suas interações com outras partículas ou com uma ou ambas as fases das emulsões (BOOSTANI et al., 2020; MCCLEMENTS; JAFARI, 2018). As partículas de levedura foram expostas em diferentes concentrações de cloreto de sódio, em pH 5,5, o perfil do potencial zeta pode ser observado na FIGURA 15.

Os íons  $\text{Na}^+$  neutralizam as cargas negativas dos grupamentos funcionais da parede celular, causando um efeito de blindagem. A concentração de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  foi capaz de reduzir cerca de 50 % do potencial enquanto  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  reduz quase em sua totalidade o potencial.

Considerando as características da parede celular de células de *S. cerevisiae* inativadas, frente adição de sal, foram avaliadas três condições para aplicação das leveduras em emulsões de AMP e XG: com  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  e sem adição de NaCl.

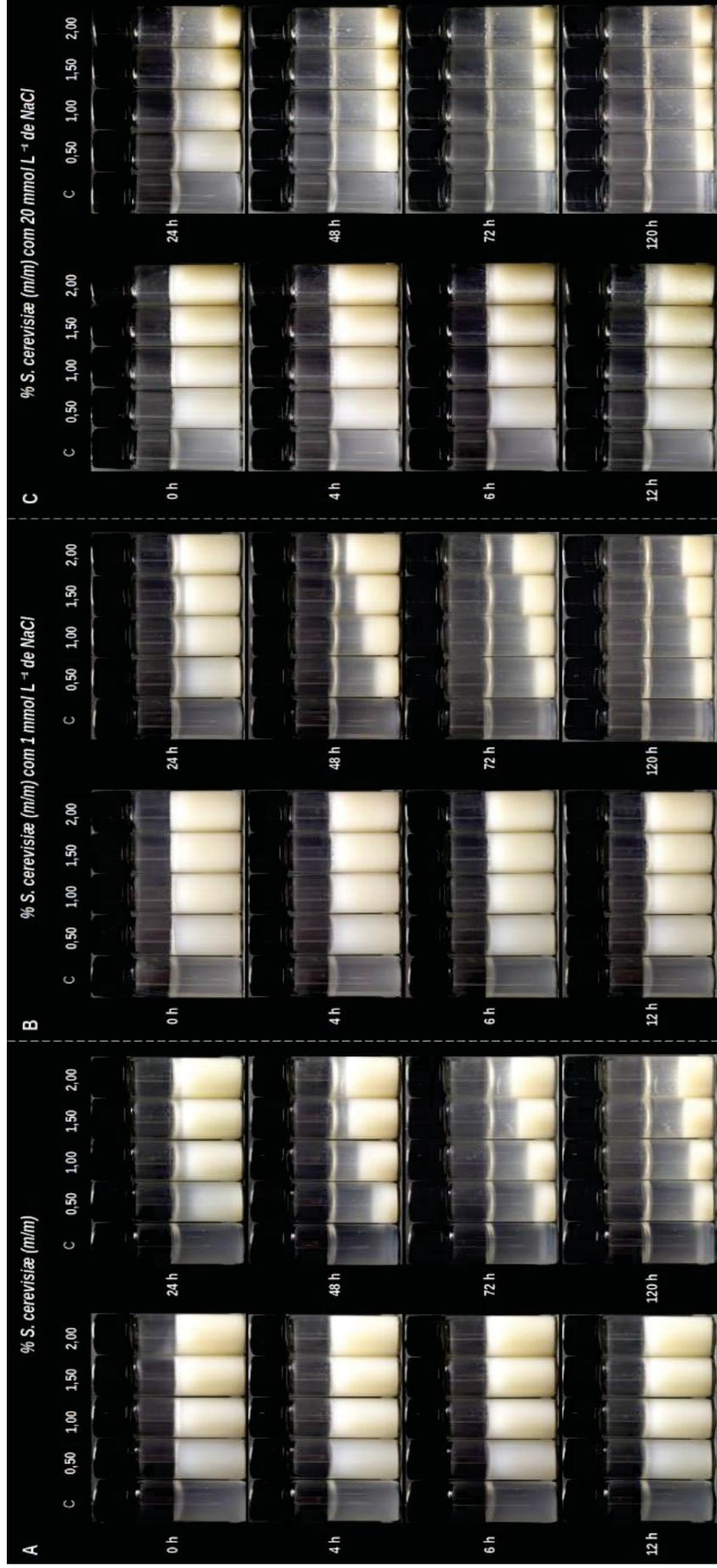
FIGURA 15 - VARIAÇÃO DO POTENCIAL ZETA DE CÉLULAS DE *S. Cerevisiae*, INATIVADAS TERMICAMENTE, AVALIADAS EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE NaCl AO MEIO.



FONTE: O autor (2023).

A evolução das emulsões, em função do tempo é demonstrada na FIGURA 16. Nas primeiras 3 h as emulsões se demonstram estáveis. Após 24 h é possível observar que as emulsões começam apresentar sedimentação. Na ausência de partículas (tubo C) a separação de fases começa a ser observada. O volume sedimentado para menores concentrações de partículas, como 0,50 % (m/m) é menor, ao contrário de maiores concentrações.

FIGURA 16 - COMPORTAMENTO MACROSCÓPICO DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA (1,00 %) EM XILOGLUCANA (1,30 %) (PONTO A DESTACADO NO DIAGRAMA DE FASES), A 25 °C, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LEVEDURA INATIVADAS TERMICAMENTE (A), NA PRESENÇA DE 1 mmol L<sup>-1</sup> (B) E 20 mmol L<sup>-1</sup> (C) DE NaCl.



FONTE: O autor (2023).

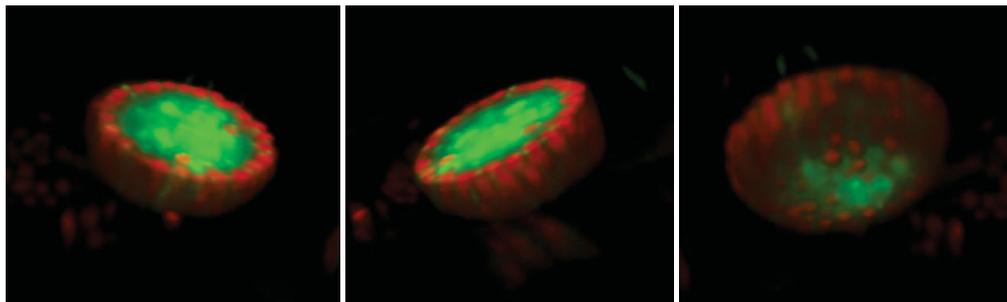
É evidente que, com o aumento de partículas, há maior volume emulsionado, ou seja, a separação de fases foi atrasada.

A adição de 1 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl nas emulsões (FIG. 16B) não afetou aquelas sem partículas (tubo C). Na presença de levedura, com cerca de 50 % de carga superficial blindada, não há diferença significativa macroscopicamente, o comportamento é semelhante ao observado para partículas sem adição de sal. Ou seja, blindar até 50 % das cargas não afetou significativamente a separação macroscópica de fases.

Por outro lado, a presença de 20 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl nas emulsões (FIG. 17C) resultou em sedimentação após 12 horas com 2,00% (m/m) de partículas. Esse efeito é ainda mais pronunciado após 24 horas para concentrações mais elevadas, e após 48 horas, a sedimentação foi observada em todas as concentrações. Em resumo, a adição de NaCl exerce um impacto significativo sobre o comportamento das partículas nas emulsões.

Para investigar detalhadamente o comportamento das partículas nas emulsões, utilizou-se a técnica de microscopia confocal a laser. A FIGURA 17 ilustra que o recobrimento, com 2,0 % de leveduras (em vermelho) garante um bom revestimento das gotículas da fase dispersa (em verde).

FIGURA 17 - RECONSTRUÇÃO TRIDIMENSIONAL, A PARTIR DE VÁRIOS PLANOS FOCALIS OBTIDOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER, DE GOTÍCULA DE AMILOPECTINA(VERDE) RECOBERTA DE CÉLULAS DE *S. Cerevisiae* INATIVADAS (VERMELHO) DISPERSAS EM XILOGLUCANA (PRETO).

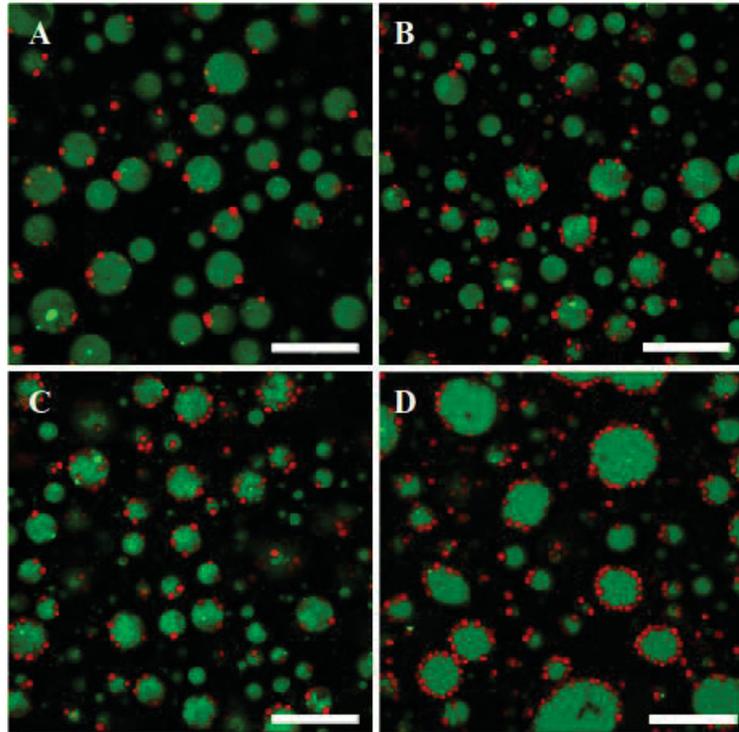


FONTE: O autor (2023).

A FIGURA 18 mostra o efeito da concentração de partículas nas emulsões. Foi possível observar que, em concentrações menores, as células de *S. cerevisiae* se encontram na interface. Com 2,0 % (m/m) há formação de emulsões de Pickering. Isso vai ao encontro do observado macroscopicamente: quanto mais partículas, maior o recobrimento e, conseqüentemente, maior estabilização. Entretanto, devido ao tamanho das células, houve sedimentação da emulsão e,

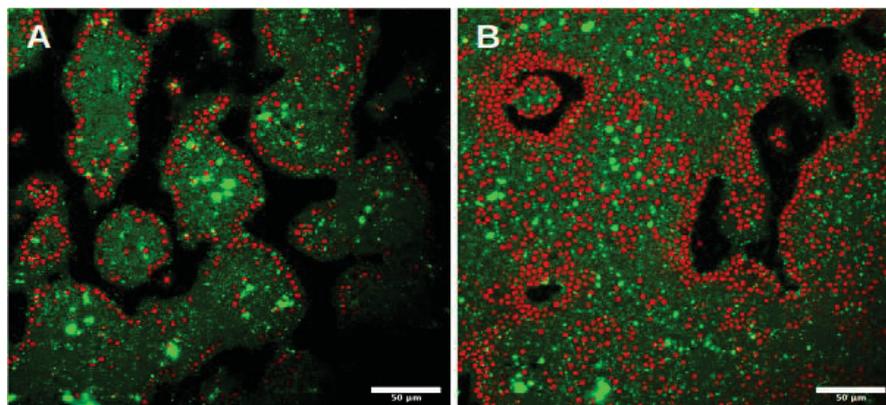
com o tempo, coalescência. Isso foi verificado nas imagens de microscopia de frações inferiores do tubo das emulsões, em 24h, conforme ilustra a FIGURA 19.

FIGURA 18 - MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA (VERDE) A 1,00 % EM XILOGLUCANA (PRETO) A 1,30 % NA PRESENÇA DE CÉLULAS DE *S. Cerevisiae* INATIVADAS (VERMELHO) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES: 0,50 % (A), 1,00 % (B), 1,50 % (C) E 2,00 % (D). BARRA DE ESCALA = 50  $\mu\text{m}$ .



FONTE: O autor (2023).

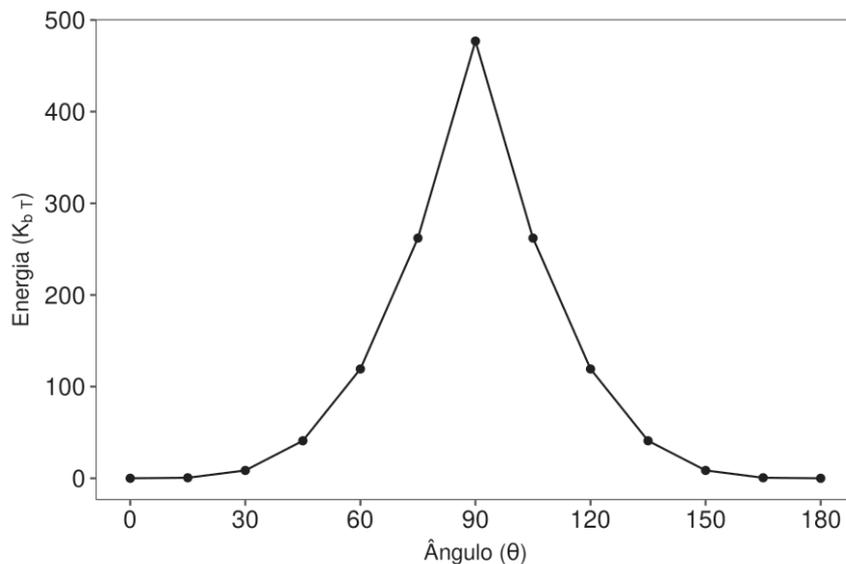
FIGURA 19 - MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA 1,00% (VERDE) EM XILOGLUCANA 1,30% (PRETO) COM 2,00 % DE CÉLULAS INATIVADAS DE *S. Cerevisiae* (VERMELHO), SEM SAL (A) E COM 20 mmol L<sup>-1</sup> DE NaCl (B). AS IMAGENS, REGISTRADAS A 20  $\mu\text{m}$  DE ALTURA, MOSTRAM A COALESCÊNCIA NA PARTE INFERIOR DOS TUBOS. BARRA DE ESCALA = 50  $\mu\text{m}$ .



FONTE: O autor (2023).

Uma vez definido o valor da tensão interfacial para sistemas AMP e XG, foi possível quantificar a energia de desorção da partícula esférica através da equação (9). Considerando que leveduras apresentam raio médio de  $2,5 \mu\text{m}$  o valor da energia em função do ângulo varia de acordo com o ilustrado na FIGURA 20. É possível notar que valores altos de energia de desorção são obtidos, decorrente do diâmetro considerável da célula de levedura.

FIGURA 20 – VARIAÇÃO DA ENERGIA LIVRE DE DESSORÇÃO DE LEVEDURAS ( $R = 2,5 \mu\text{m}$ ), EM FUNÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO NA INTERFACE DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA EM XILOGLUCANA. A TENSÃO INTERFACIAL DO SISTEMA É DE  $0,10 \mu\text{N m}^{-1}$ .



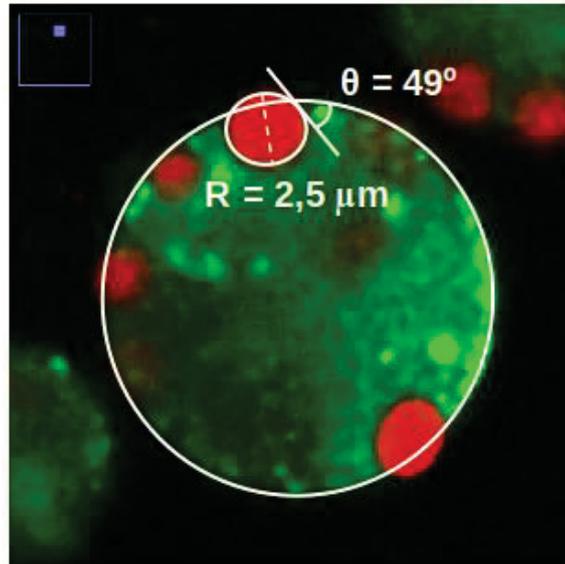
FONTE: O autor (2024).

A FIGURA 21 mostra o ângulo de contato formado entre a partícula e as fases de AMP e XG. Com base nessa informação, é possível calcular a energia de desorção, considerando que a tensão interfacial ( $0,10 \mu\text{N m}^{-1}$ ) também foi determinada para essas emulsões. O valor encontrado para  $\Delta G$  foi de  $56 k_B T$ , suficiente para garantir a forte adesão da partícula à interface.

O efeito do NaCl é ilustrado na FIGURA 22 para uma concentração de partículas de 2,0% (m/m). Na ausência de sal (FIG. 22A), as leveduras apresentaram um diâmetro médio de  $5 \mu\text{m}$  ( $n = 50$ ). No entanto, a adição de sal promove dois efeitos: a redução do tamanho das células e/ou sua migração para a fase dispersa de AMP.

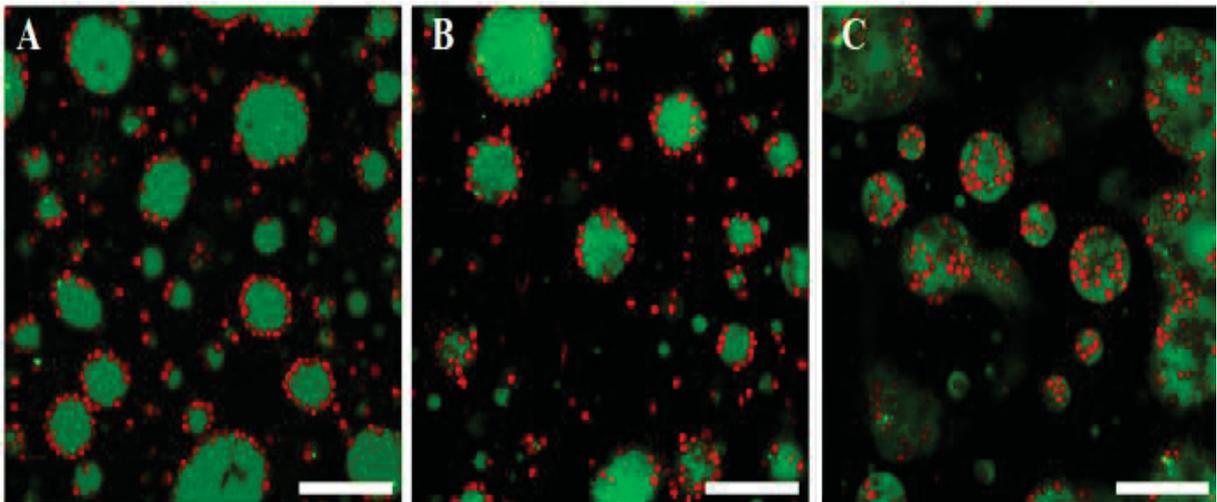
Quando expostas a soluções hipertônicas, as células sofrem encolhimento de até 60 % do seu volume inicial (KLIS et al., 2002). Esse fenômeno decorre da perda de água do interior de células de fungos, resultando em uma redução do volume.

FIGURA 21 - ÂNGULO DE CONTATO ENTRE A PARTÍCULAS DE LEVEDURA (EM VERMELHO), COM DIÂMETRO DE  $2,5 \mu\text{m}$  FORMANDO  $49^\circ$  (MÉDIA PARA  $N = 50$  PARTÍCULAS) ENTRE A INTERFACE DE AMILOPECTINA (EM VERDE) E XILOGLUCANA.



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 22 - MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA (VERDE) A 1,00 % EM XILOGLUCANA (PRETO) A 1,30 % NA PRESENÇA DE 2,00 % DE CÉLULAS DE *S. Cerevisiae* INATIVADAS (VERMELHO) SEM ADIÇÃO DE SAL (A), COM  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  (B) E  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  DE NaCl (C). BARRA DE ESCALA =  $50 \mu\text{m}$ .



FONTE: O autor (2023).

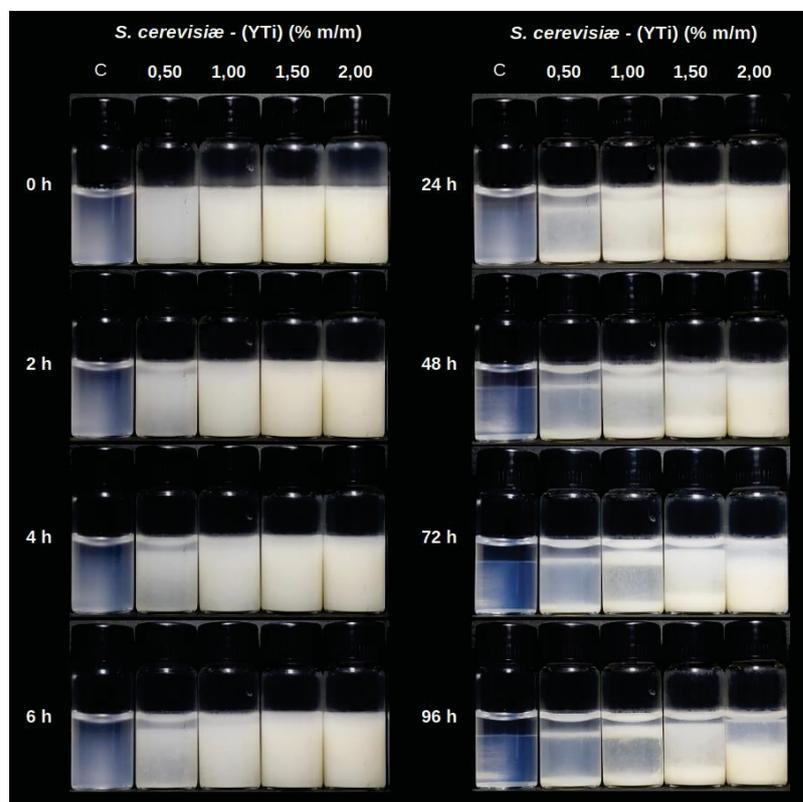
Com  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , embora as células também diminuam para  $4 \mu\text{m}$  ( $n = 50$ ), ao contrário do cenário anterior, elas migram majoritariamente para a fase de AMP (FIG 22C). A camada interna de  $\beta$ -glucana e quitina torna-se mais espessa, ao passo que as manoproteínas da camada externa se tornam mais compactas e densas (ENE et al., 2015). Como AMP ou XG não

possuem cargas tituláveis (FREITAS et al., 2016), a blindagem de cargas e mudança na conformação dos polissacarídeos da parede celular da levedura altera a interação destes com a AMP, resultando em maior interação e migração para a fase dispersa da emulsão.

Em resumo, foi possível utilizar leveduras na formação de emulsões de Pickering na ausência de sal. No entanto, com  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaCl, foi possível direcioná-las para a fase de AMP. Levando isso em consideração, o comportamento das células também foi avaliado em misturas onde a XG é a fase dispersa. Essas emulsões foram preparadas sem NaCl para avaliar o efeito das partículas na interface.

O comportamento macroscópico, de emulsões de XG em AMP pode ser observado na FIGURA 23. Nessa situação, a separação de fases iniciou-se a partir de 2 h, na ausência de partículas. Tal comportamento decorre do fato da AMP apresentar menor viscosidade se comparada a XG. Após 48 h notou-se, macroscopicamente, total separação de fases com uma pequena fração superior formada por XG, na ausência de partículas (Tubo C).

FIGURA 23 - COMPORTAMENTO MACROSCÓPICO DE EMULSÕES DE XILOGLUCANA (0,35 %) EM AMILOPECTINA (4,00 %), REPRESENTADO PELO PONTO B DESTACADO NO DIAGRAMA DE FASES, A 25 °C, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES CÉLULAS DE *S. Cerevisiae* INATIVADAS TERMICAMENTE.

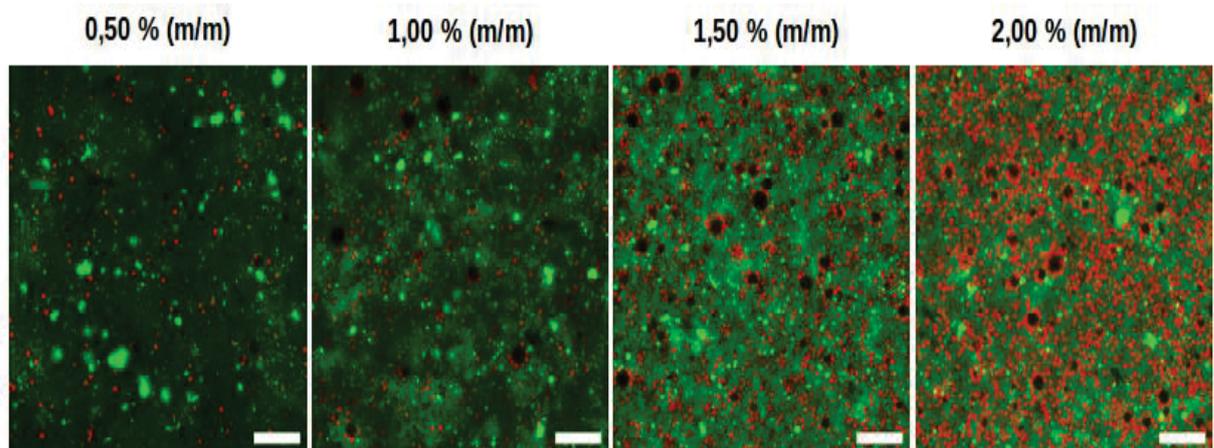


FONTE: O autor (2023).

Em concentrações menores de levedura, como 0,50 e 1,00 % (m/m), foi possível observar uma fração emulsionada na interface AMP-XG, a qual aumenta com o aumento de partículas. Concentrações de 1,50 a 2,00 % (m/m) são capazes de estabilizar as emulsões por até 48 h, após esse período as emulsões voltam a sedimentar.

A microscopia confocal evidencia partículas na interface, como esperado. Na ausência de NaCl as células localizam-se na interface entre AMP e XG, formando emulsões de Pickering, como ilustrado na FIGURA 24. O efeito da concentração também justifica a estabilidade observada macroscopicamente: quanto mais partículas, maior o recobrimento da interface evitando a coalescência.

FIGURA 24 - MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DE EMULSÕES DE XILOGLUCANA A 0,35 % (PRETO) EM 4,00 % DE AMILOPECTINA (VERDE) NA PRESENÇA DE 2,00 % DE CÉLULAS DE *S. Cerevisiae* INATIVADAS (VERMELHO) EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. BARRA DE ESCALA = 50  $\mu$ m.

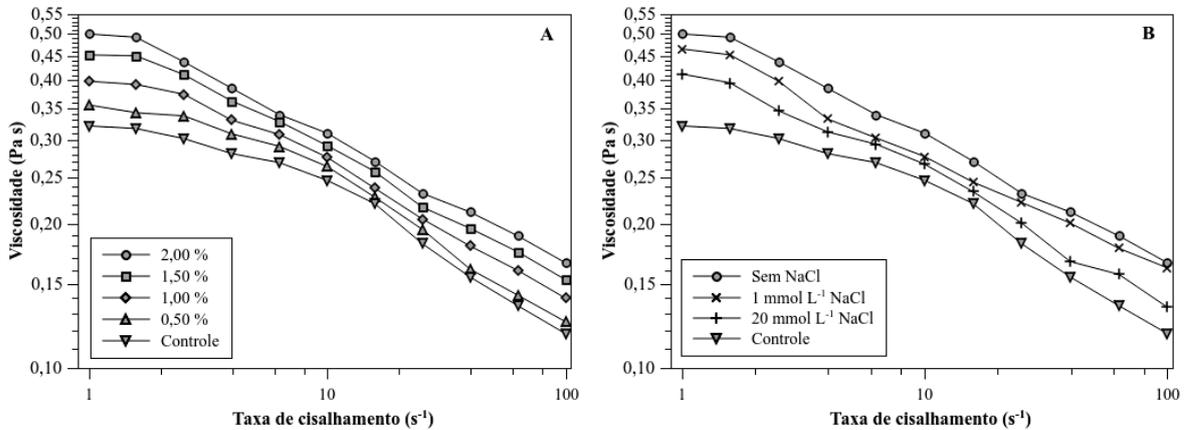


FONTE: O autor (2023).

Além dos ensaios microscópicos, a análise reológica das emulsões é fundamental para melhor compreensão de seu comportamento frente a adição de partículas. A FIGURA 25 mostra as curvas de fluxo de emulsões contendo AMP na fase dispersa (1,0% AMP em 1,3% XG), é possível observar comportamento pseudoplástico. Além disso, o aumento da concentração de partículas aumenta a viscosidade (FIG. 25A), um fenômeno que pode ser explicado por vários fatores, como a formação de uma rede entre as partículas que cria uma barreira na interface da fase contínua, tornando-as mais resistentes ao cisalhamento imposto (KATEPALLI et al., 2017).

Por outro lado, a adição de sal foi capaz de reduzir a viscosidade das emulsões, conforme ilustrado em FIG. 25B. De acordo com estudos de microscopia, a presença de 20 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl faz com que as leveduras interajam preferencialmente com a AMP, removendo a barreira de partículas na interface AMP-XG e diminuindo a resistência à coalescência e ao cisalhamento.

FIGURA 25 - CURVAS DE VISCOSIDADE PARA EMULSÕES DE AMILOPECTINA A 1,00 % EM XILOGLUCANA A 1,30 % (▽), E NA PRESENÇA DE CÉLULAS DE *S. Cerevisiae* (A) INATIVADAS COM 0,50 % (△), 1,00 % (◇), 1,50 % (□) E 2,00 % (○). O EFEITO DA ADIÇÃO DE NaCl NA VISCOSIDADE EM CONCENTRAÇÕES DE 1 (X) E 20 mmol L<sup>-1</sup> DE NaCl (+) TAMBÉM FOI AVALIADO NA PRESENÇA DE 2,00 % DE LEVEDURAS (B).



FONTE: O autor (2023).

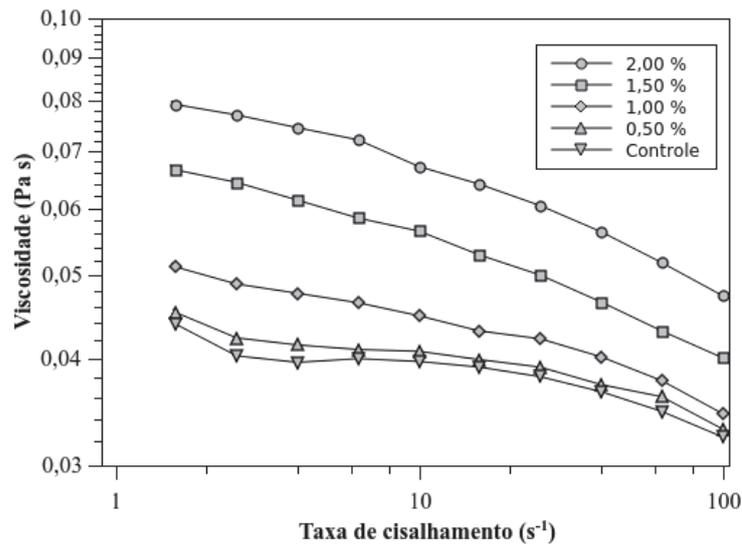
Os mesmos conceitos podem ser aplicados para emulsões onde a AMP é fase contínua. Da mesma forma, o aumento da viscosidade na presença de leveduras, demonstrado na FIGURA 26, sendo justificado pela presença de partículas na interface das gotículas de XG, aumentou a resistência ao fluxo.

É evidente que as leveduras, em emulsões onde a AMP é fase contínua ou dispersa, apresentam-se como potenciais partículas estabilizantes do sistema avaliado. Resultados muito satisfatórios foram observados ambos os casos. Vale ressaltar que poucos trabalhos na literatura utilizam leveduras para formação de emulsões de Pickering em sistemas convencionais de água e óleo (FIROOZMAND; ROUSSEAU, 2016; LU et al., 2019; MOREIRA et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 1970; WONGKONGKATEP et al., 2012; ZHU et al., 2014).

Pesquisas ainda mais escassas, utilizando microrganismos, são apresentadas para sistemas água-água, tornando o atual trabalho ainda mais relevante ao tema. Firoozmand e Rousseau (2016) exploraram leveduras em sistemas água-água, formados por gelatina e

maltodextrina, entretanto não com o objetivo de estabilização e sim de modificação reológica dos géis formados.

FIGURA 26 - CURVAS DE VISCOSIDADE PARA EMULSÕES DE XILOGLUCANA A 0,35 % EM 4,00 % DE AMILOPECTINA ( $\nabla$ ), NA PRESENÇA DE CÉLULAS DE *S. CEREVISIAE* INATIVADAS EM CONCENTRAÇÕES DE 0,50 % ( $\Delta$ ), 1,00 % ( $\diamond$ ), 1,50 % ( $\square$ ) E 2,00 % ( $\circ$ ).



FONTE: O autor (2023).

Os resultados apresentados neste estudo destacam a relevância das emulsões como veículos promissores para a aplicação em alimentos. A presença da xiloglucana (XG) com propriedades prebióticas (KULKARNI et al., 2017), aliada às características nutricionais das leveduras, como fonte de proteínas e  $\beta$ -glucanas, confere a essas emulsões um perfil nutricional e funcional único. Além disso, as emulsões A/A, por serem livres de óleo, oferecem uma alternativa interessante para a microcompartmentalização das leveduras, potencializando ainda mais seu uso em formulações alimentícias inovadoras e saudáveis.

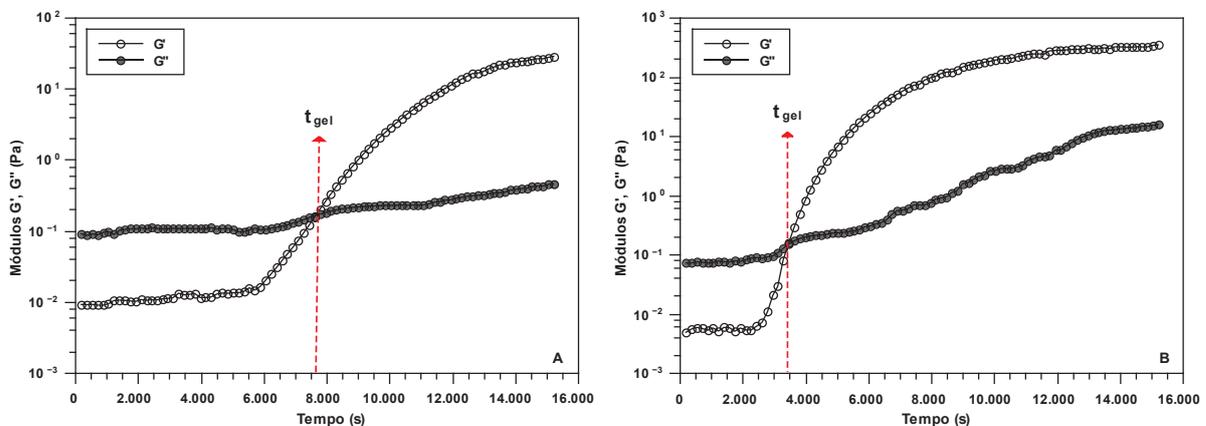
### 3.4 EMULSÕES ESTABILIZADAS POR GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Conforme mencionado previamente, a XG possui grupamentos galactose em sua estrutura, os quais influenciam sua hidrofiliidade (SAKAKIBARA et al., 2017). Sabe-se também que a enzima  $\beta$ -galactosidase é específica para a remoção desses grupamentos, alterando as propriedades do biopolímero e possibilitando sua gelificação. A remoção de

galactose altera a estrutura da XG, promovendo interações hidrofóbicas entre os segmentos da cadeia.

A suspensão de XG, com concentração de 1,30% (m/m), exibe um comportamento de líquido viscoelástico, no qual o módulo  $G''$  (perda) é superior ao  $G'$  (armazenamento). O processo de gelificação desse biopolímero pode ser acompanhado pela análise dos dois módulos ( $G'$  e  $G''$ ) na presença da enzima, ao longo do tempo. À medida que a enzima remove os grupamentos hidrofílicos, o polissacarídeo torna-se mais rígido. No ponto de cruzamento dos módulos, ou seja, quando  $G' = G''$ , a amostra atinge o estado gel, indicando o tempo necessário para a gelificação ( $t_{gel}$ ). À medida que o tempo avança, o módulo  $G'$  torna-se predominante, evidenciando uma estrutura mais rígida. A FIGURA 27 evidencia esse comportamento e destaca que a mudança de temperatura em 10 °C é capaz de dobrar o tempo necessário para gelificação (FIG. 27A e B).

FIGURA 27 - EVOLUÇÃO DOS MÓDULOS ELÁSTICO ( $G'$ , ○) E VISCOZO ( $G''$ , ●) EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA XILOGLUCANA A 1,30 % (M/M) NA PRESENÇA DE 1,90 U  $mg^{-1}$  DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE, EM pH 5,5 A 40 °C (A) E 50 °C (B). O TEMPO DE GELIFICAÇÃO É QUANTIFICADO QUANDO  $G' = G''$ . A SETA EM DESTAQUE MOSTRA O CRUZAMENTO DOS MÓDULOS, INDICANDO O TEMPO NECESSÁRIO PARA GELIFICAÇÃO ( $t_{gel}$ ).



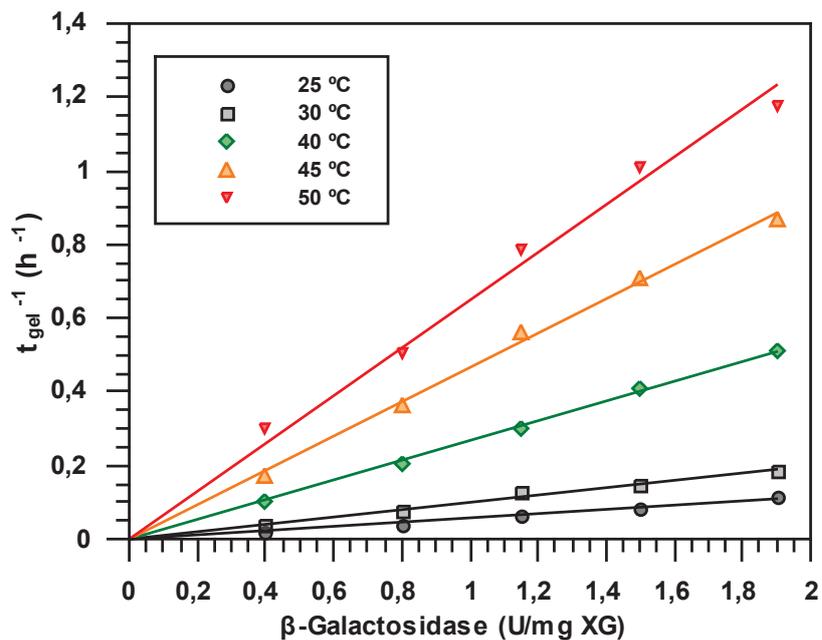
FONTE: O autor (2021).

No início do experimento, antes da gelificação, o comportamento da mistura de polímero e enzima se comporta como líquido viscoelástico, onde  $G'' > G'$ . Tal comportamento também foi observado por Sakakibara et al. (2017), porém com XG extraída de *Jatobá* (*Hymenaea sp.*).

Ao avaliar diferentes temperaturas e concentrações de enzima, é possível construir isotermas de gelificação linearizadas, como mostrado na FIGURA 28. Conforme esperado,

concentrações mais altas de enzima e temperaturas mais elevadas levam a uma gelificação mais rápida da XG. Os dados obtidos, juntamente com o gráfico da isoterma, são ferramentas valiosas para prever o tempo necessário para a gelificação da XG nas emulsões, o que influencia diretamente em sua microestrutura.

FIGURA 28 - ISOTERMAS DE GELIFICAÇÃO PARA XILOGLUCANA A 1,30 % (m/m), NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMA B-GALACTOSIDASE, EM pH 5,5. OS TEMPOS DE GELIFICAÇÃO ( $t_{gel}$ ) FORAM OBTIDOS A PARTIR DE DADOS REOLÓGICOS.



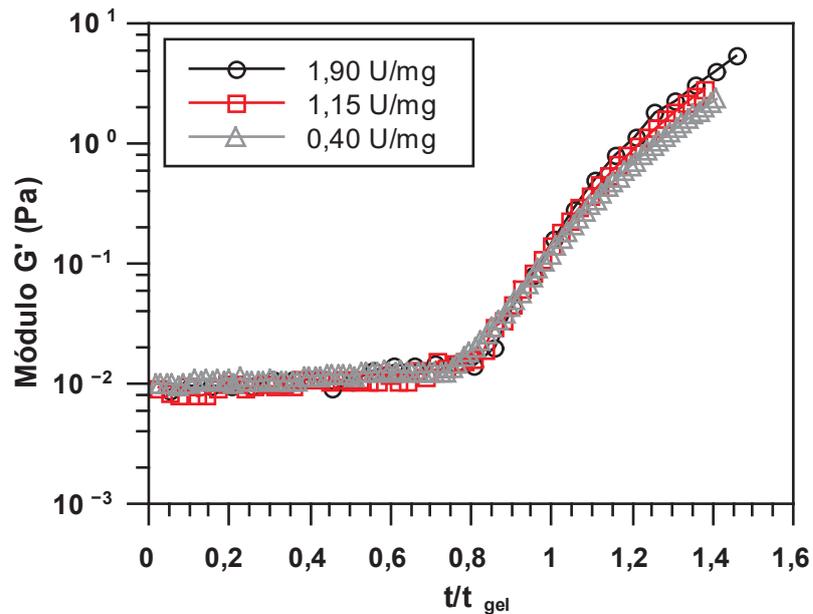
FONTE: O autor (2021).

Embora a concentração de enzima e temperatura sejam fatores cruciais no tempo de gelificação do biopolímero, o gel final mantém suas características, ou seja, alterações cinéticas não afetam a estrutura da rede gelificada formada. Isso pode ser comprovado através da construção de uma curva mestra, conforme ilustra a FIGURA 29.

A normalização do tempo de gelificação é necessária para permitir a comparação direta do comportamento do gel em diferentes condições experimentais, como temperatura e concentração de enzima. Normalizado, o tempo é expresso como fração do tempo total necessário para que o gel atinja suas propriedades finais. A sobreposição dos módulos  $G'$ , em diferentes condições de temperatura e concentração de enzima, mostra que a estrutura da rede

gelificada permanece inalterada, indicando as mesmas propriedades finais do gel, ou seja, apenas a cinética de gelificação é diferente durante sua formação.

FIGURA 29 - CURVA MESTRA DA SOBREPÓSICÃO DOS MÓDULOS VISCOSOS ( $G'$ ) PARA DIFERENTES GÉIS DE XILOGLUCANA A 1,30 % (M/M) FORMADOS A PARTIR DE GELIFICAÇÃO ENZIMÁTICA GERADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMA  $\beta$ -GALACTOSIDASE (0,4; 1,15 E 1,9 U  $\text{mg}^{-1}$ ), EM pH 5,5 EM 25 °C.



FONTE: O autor (2021).

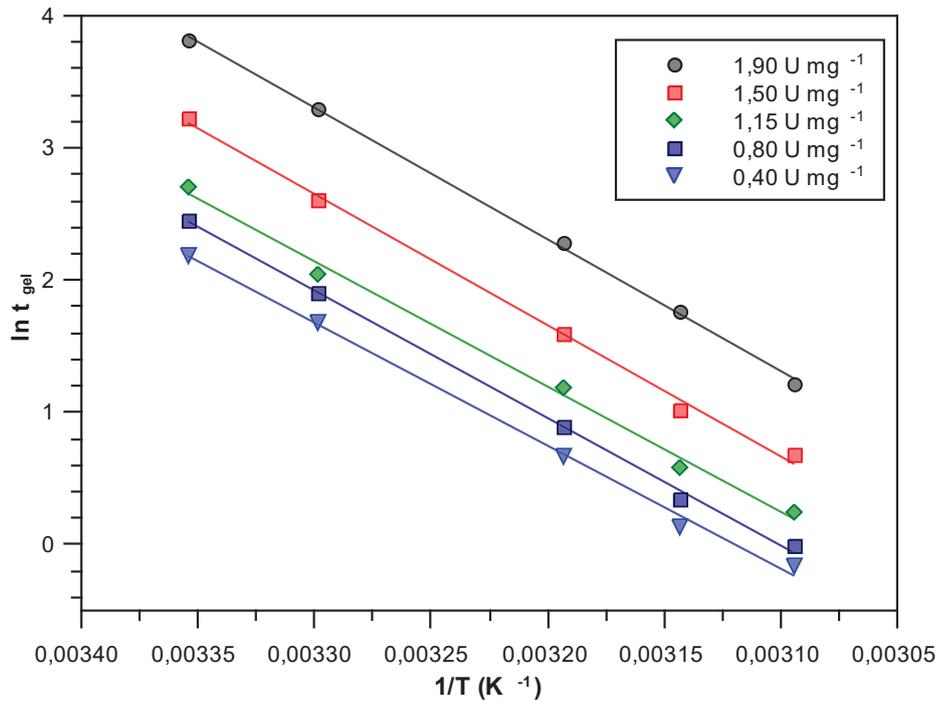
Outro parâmetro importante na formação dos géis é sua energia de ativação ( $E_a$ ), que pode ser definida como a energia mínima necessária para que ocorra a formação do gel a partir dos componentes do sistema. Ela pode ser quantificada de acordo com a equação de Arrhenius, que descreve a dependência da taxa de reação com a temperatura e energia de ativação.

O valor da  $E_a$  é determinado pelo coeficiente angular das retas apresentadas na FIGURA 30, resultando em um valor de  $81,5 \pm 3,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  para todas as concentrações de enzimas utilizadas. Esses resultados sugerem que a formação do gel não é influenciada pela concentração da enzima, mas sim por outros fatores, como a temperatura. Essa observação está em consonância com os dados obtidos na curva mestra (FIGURA 29).

Embora a energia de ativação ( $E_a$ ) seja a mesma para todas as concentrações de enzima, os valores do coeficiente linear ( $A$ ) são diferentes. O parâmetro  $A$  na equação de Arrhenius representa a frequência das colisões efetivas entre as moléculas reagentes em uma reação química. Isso indica que a eficiência das colisões entre as moléculas pode variar, mesmo quando

a energia de ativação e a dependência da temperatura são constantes. Por exemplo, concentrações mais altas de enzima resultam em maior colisão, acelerando a reação.

FIGURA 30 - LINEARIZAÇÕES DA EQUAÇÃO DE ARRHENIUS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO NECESSÁRIA PARA FORMAÇÃO DE GÉIS DE XILOGLUCANA UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE.



FONTE: O autor (2021).

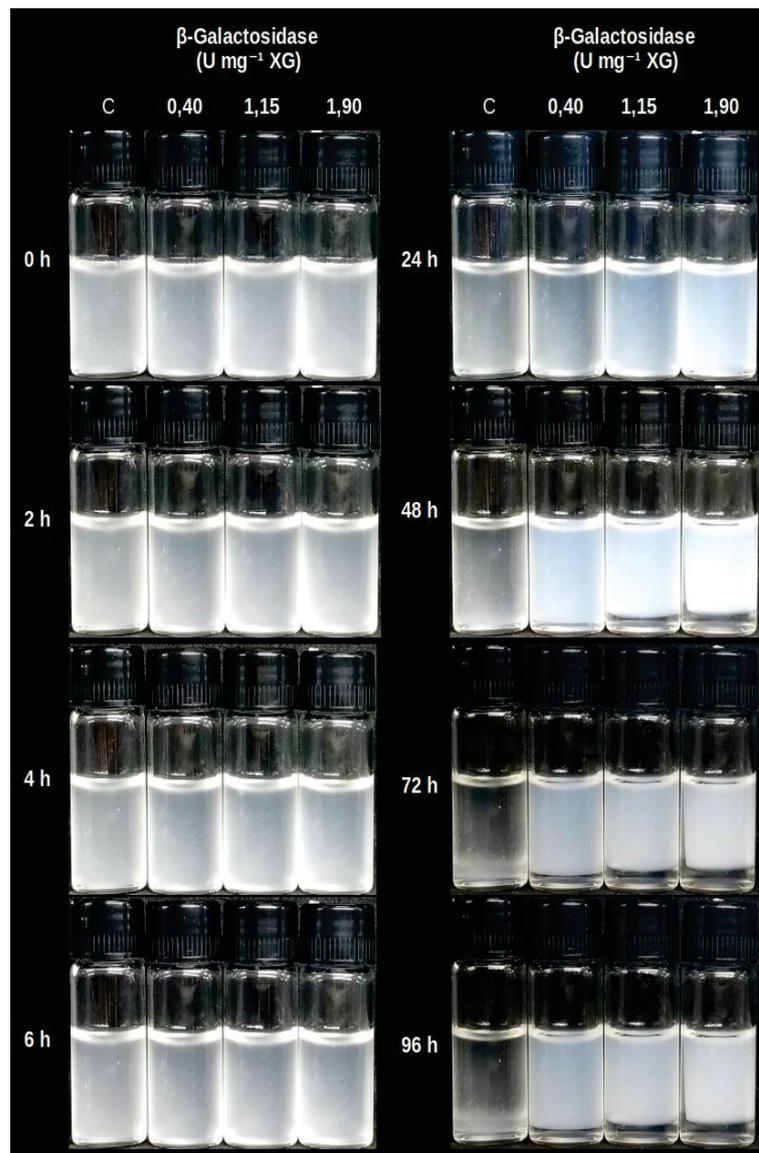
Considerando os resultados consistentes da  $E_a$  para a gelificação da XG em diferentes concentrações de enzima, é possível aplicar esses conceitos à gelificação de emulsões. Os ensaios de reologia, que são úteis para prever o tempo necessário para a formação do gel de XG, também podem ser aplicados às emulsões. Ao considerar a XG como fase contínua, torna-se possível determinar a concentração de enzima necessária para que o gel se forme antes da separação completa de fases. Isso não apenas influencia o tempo de formação do gel, mas também afeta diretamente o tamanho das gotículas de AMP dispersas no meio, o que contribui para modular a estrutura interna dos géis formados ou o tamanho das microesferas de XG quando ela compõe a fase dispersa do sistema.

Tendo isso em vista, inicialmente foi realizado o ensaio macroscópico, a 25 °C, nos pontos A, B e M do diagrama de fases, na presença de diferentes concentrações de enzima.

No ponto A do diagrama, a emulsão inicia sua separação de fases após 48 h, sendo completa após 72 h, na ausência de enzimas, conforme exibe a FIGURA 31. Em concentrações

menores de  $\beta$ -galactosidase, como  $0,40 \text{ U mg}^{-1}$ , o tempo de gelificação inicia-se após 46 h podendo ser reduzido para 9 h com  $1,90 \text{ U mg}^{-1}$  de enzima. O resultado macroscópico observado é compatível com o observado na cinética de gelificação, o gel formado estabiliza a emulsão evitando a coalescência da AMP.

FIGURA 31 - COMPORTAMENTO DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA (1,00 %) EM XILOGLUCANA (1,30 %) (PONTO A, DESTACADO NO DIAGRAMA DE FASES), A  $25^\circ\text{C}$ , COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE.

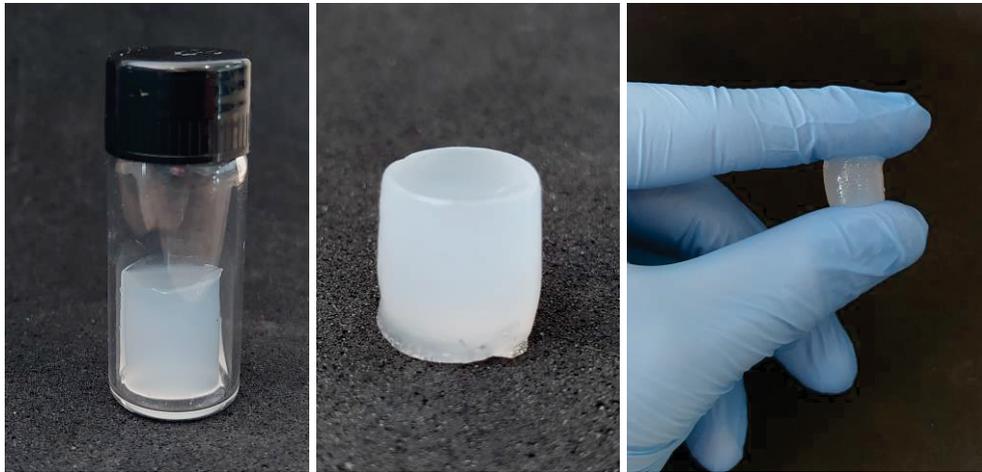


FONTE: O autor (2023).

Outra característica da emulsão gelificada é a capacidade de moldar sua morfologia macroscópica de acordo com o recipiente em que foi acondicionada, permitindo a criação de emulsões com diferentes formatos e alturas. Os géis formados também apresentam o efeito de

sinérese, ou seja, expulsão de água da matriz. Isso é compatível com a literatura (NISBET et al., 2006; YOSHIMURA; TAKAYA; NISHINARI, 1999), uma vez que a gelificação enzimática favorece interações hidrofóbicas entre as cadeias de XG (SAKAKIBARA et al., 2017). Após a remoção da água expulsa durante a sinérese, o gel pode ser facilmente manipulado, como mostrado na FIGURA 32. Conforme será demonstrado adiante, o efeito da sinérese não afeta a fase dispersa de AMP, que permanece integralmente na estrutura mesmo após a expulsão exclusiva da água.

FIGURA 32 - ASPECTO MACROSCÓPICO FINAL DA EMULSÃO GELIFICADA, COMPOSTA POR DE AMILOPECTINA (1,00 %) E XILOGLUCANA (1,30 %), APÓS 96 h.

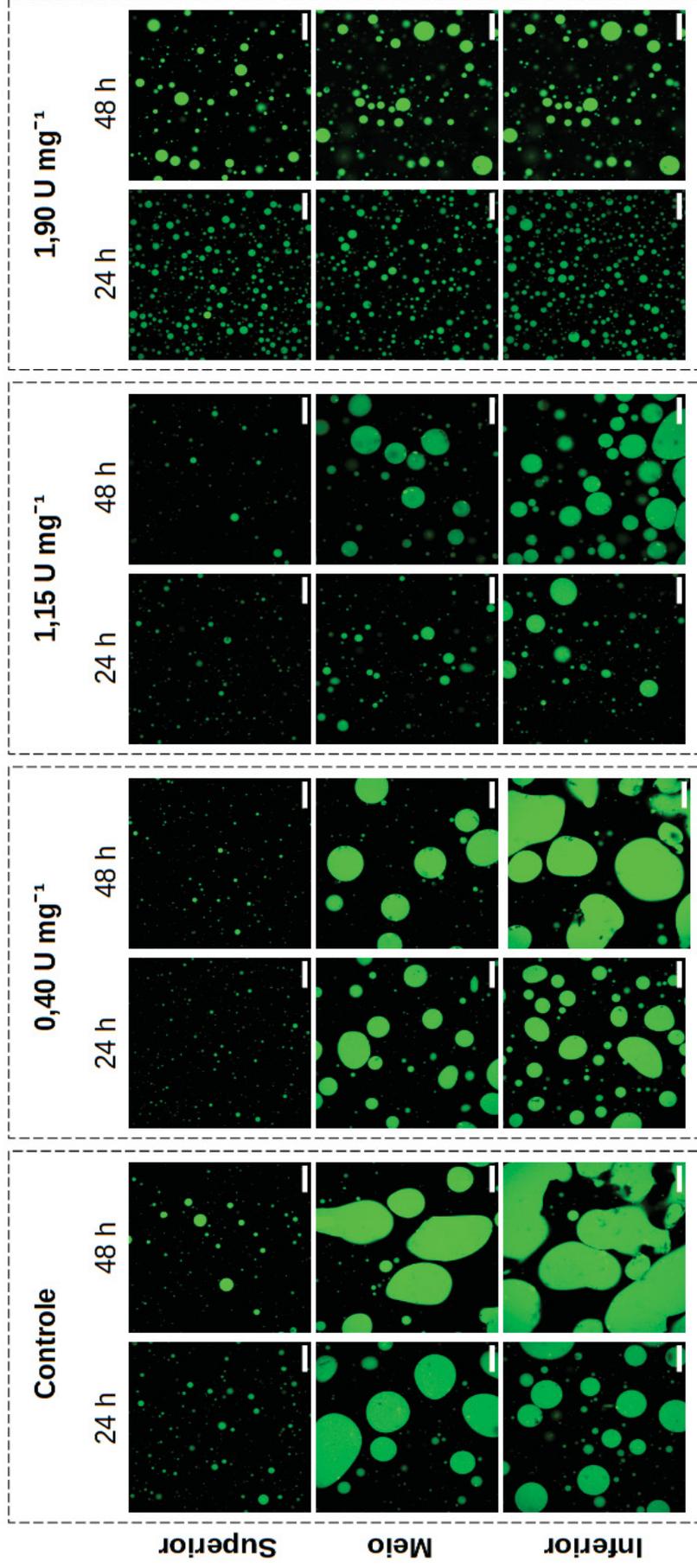


FONTE: O autor (2023).

A análise da microestrutura das emulsões e géis no ponto A do diagrama, com e sem enzimas, está detalhada nas imagens de microscopia confocal, ilustradas na Figura 33. Nas imagens, é possível observar as mudanças no sistema após 24 e 48 horas de análise. Para avaliar a o gel ou a emulsão em sua totalidade as imagens foram registradas em diferentes alturas (planos focais), sendo superior, médio e inferior. É evidente que as frações superiores das emulsões apresentam gotículas de menor tamanho em comparação com a porção média e inferior, o que indica a sedimentação da AMP ao longo do tempo.

A gelificação da fase contínua permite a formação de um gel a partir da emulsão. O tamanho da gotícula da fase dispersa pode ser controlado de acordo com a cinética de

FIGURA 33 - MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA (VERDE) A 1,00 % EM XILOGLUCANA (PRETO) A 1,30 % NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE B-GALACTOSIDASE, EM 24 E 48 h APÓS A EMULSIFICAÇÃO. AS PORÇÕES SUPERIOR, MEIO E INFERIOR FAZEM REFERÊNCIA A ALTURA RELATIVA DA IMAGEM DE MICROSCOPIA (EIXO Z, CONFOCAL) COM A ALTURA DO TUBO DAS EMULSÕES, COMO ILUSTRADO NA FIG. 26. BARRA DE ESCALA = 100  $\mu\text{m}$ .

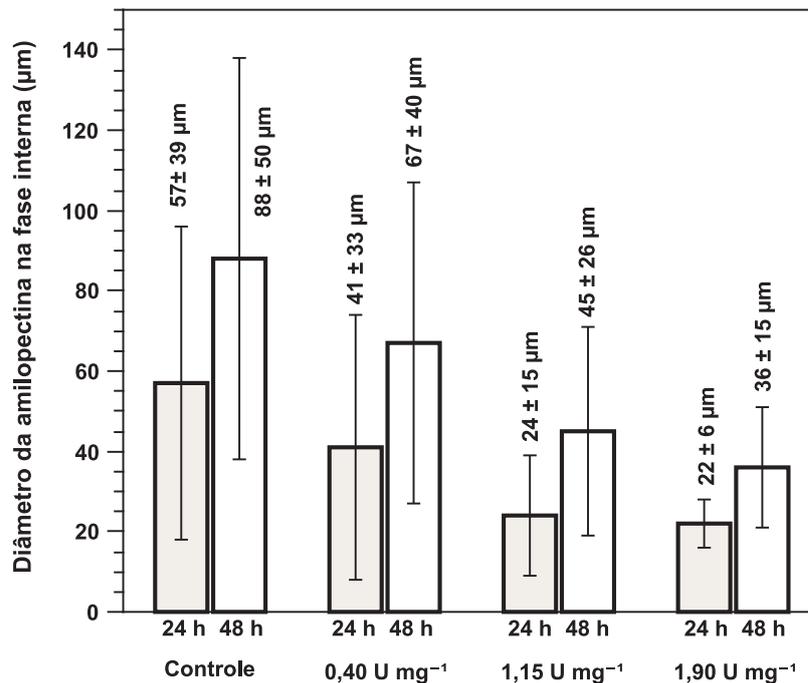


FONTE: O autor (2023).

gelificação, variando a temperatura, concentração dos polissacarídeos e enzima. O aumento da temperatura aumenta a velocidade da gelificação, entretanto também acelera a separação de fases.

A variação do diâmetro da fase dispersa ( $n = 100$  gotículas), composta por AMP, ao longo de 24 e 48 horas a  $25^{\circ}\text{C}$ , pode ser observada na FIGURA 34. Na ausência de enzimas, há maior variação do tamanho, destacando-se o grande desvio padrão que pode ser relacionado ao sistema não homogêneo, uma vez que está em processo de separação de fases. Com o aumento da concentração de enzima, o diâmetro diminui bem como seu desvio. Esse comportamento é esperado uma vez que durante a gelificação há o aumento da viscosidade da fase externa, limitando a movimentação das gotículas de AMP, o que evita a coalescência.

FIGURA 34 - VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS DE AMILOPECTINA, DISPERSAS A 1,00 % E XILOGLUCANA A 1,30 %. EM TODOS OS CASOS HÁ O AUMENTO DO DIÂMETRO ENTRE 24 E 48 h, ENTRETANTO, A VARIAÇÃO DE TAMANHO É MENOR DE ACORDO COM O AUMENTO NA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS ( $n = 100$  GOTÍCULAS).



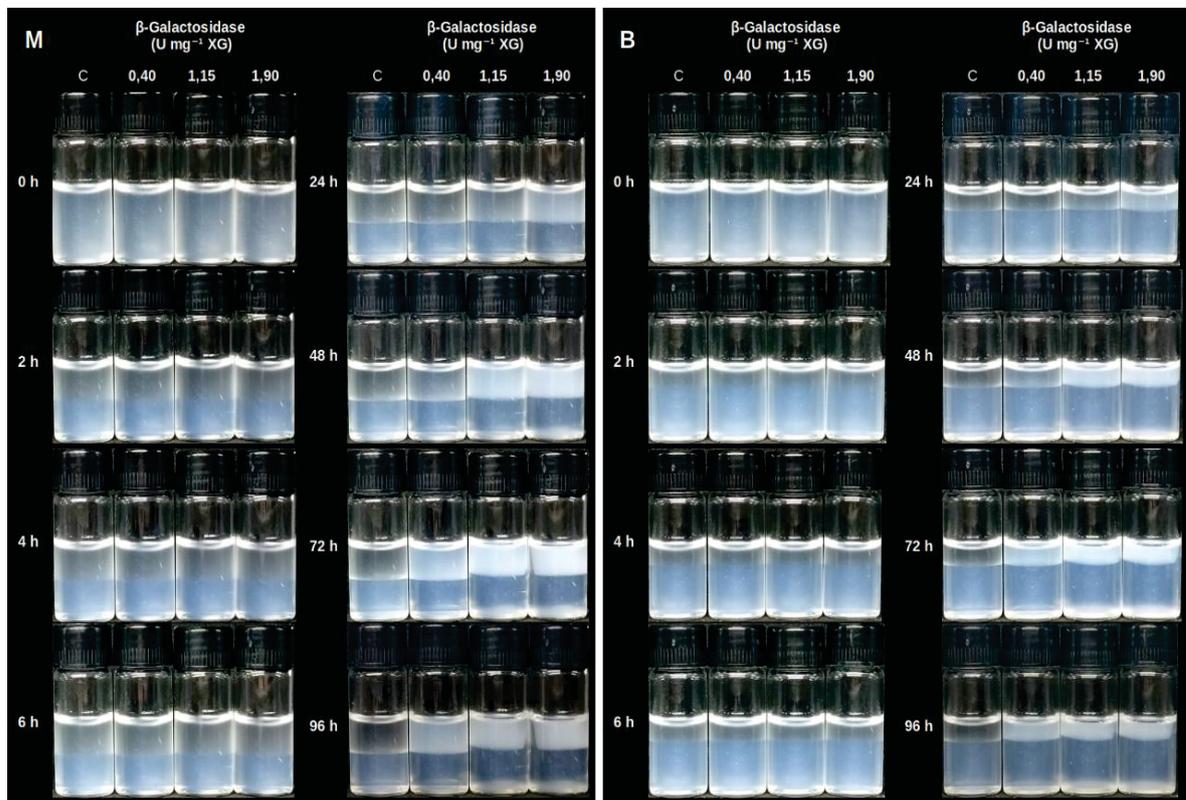
FONTE: O autor (2024).

Considerando o valor dos diâmetros, após 48 h, há diferença estatística entre o controle e as todas as concentrações de enzimas. Isso é indicado pelos valores de  $p$  baixos ( $p = 0,0002$  para  $0,40 \text{ U mg}^{-1}$ ,  $p = 0,0000$  para  $1,15 \text{ U mg}^{-1}$  e  $p = 0,0000$  para  $1,90 \text{ U mg}^{-1}$ ) considerando

um intervalo de confiança de 95 % no teste Tukey. Há diferença estatística, também, nas dimensões da fase dispersa ao comparar a menor concentração de 0,40 U mg<sup>-1</sup> de enzima com as concentrações mais elevadas de 1,15 e 1,90 U mg<sup>-1</sup> (p = 0,0001 e 0,0000, respectivamente). No entanto, não há diferença entre as dimensões da fase dispersa ao comparar as concentrações mais altas entre si (p = 0,2749).

O sistema AMP e XG também permite a formação de estruturas diferentes, de acordo com seu diagrama de fases. Mantendo-se na linha de amarração, por exemplo, a tensão interfacial é mantida. Além disso, emulsões bicontínuas, próximas da linha 50:50 e emulsões onde a XG compõe a fase dispersa, denominados, respectivamente, como pontos M e B do diagrama de fases. Essa flexibilidade do sistema permite a formulação de emulsões com diferentes propriedades. O ponto M consiste em 3,10% (m/m) de AMP e 0,65% (m/m) de XG, enquanto o ponto B é composto por 4,00% (m/m) de AMP e 0,35% (m/m) de XG. O comportamento macroscópico nesses pontos são semelhantes, como ilustra a FIGURA 35.

FIGURA 35 - COMPORTAMENTO MACROSCÓPICO DE EMULSÕES BICONTÍNUAS FORMADAS POR AMILOPECTINA (3,10 %) EM XILOGLUCANA (0,65 %), REPRESENTADO PELO PONTO M, DESTACADO NO DIAGRAMA DE FASES, À ESQUERDA. E, NA DIREITA, EMULSÕES DE XILOGLUCANA (0,35 %) EM AMILOPECTINA (4,00 %), REPRESENTADO PELO PONTO B DO DIAGRAMA DE FASES. AMBAS AS IMAGENS FORAM REGISTRADAS A 25 °C, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE β-GALACTOSIDASE.



FONTE: O autor (2023).

Em ambos os casos, pontos M e B, a separação de fases ocorre mais rapidamente em comparação com o ponto A, devido à menor viscosidade da AMP, em maior quantidade no ponto M e atuando como fase contínua para o ponto B. Após 2 h da emulsificação, há separação dos componentes. A principal diferença entre os pontos é o volume de XG, na fração superior, presente em quantidades semelhantes ao volume de AMP no ponto M e em menor quantidade no ponto B.

Levando em consideração a cinética de gelificação, a concentração de  $1,90 \text{ U mg}^{-1}$  de  $\beta$ -galactosidase demanda cerca de 9 h, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  para gelificar a XG. Nesse caso, a separação de fases é mais rápida que a gelificação. Portanto, boa parte da XG é gelificada na fração superior das emulsões.

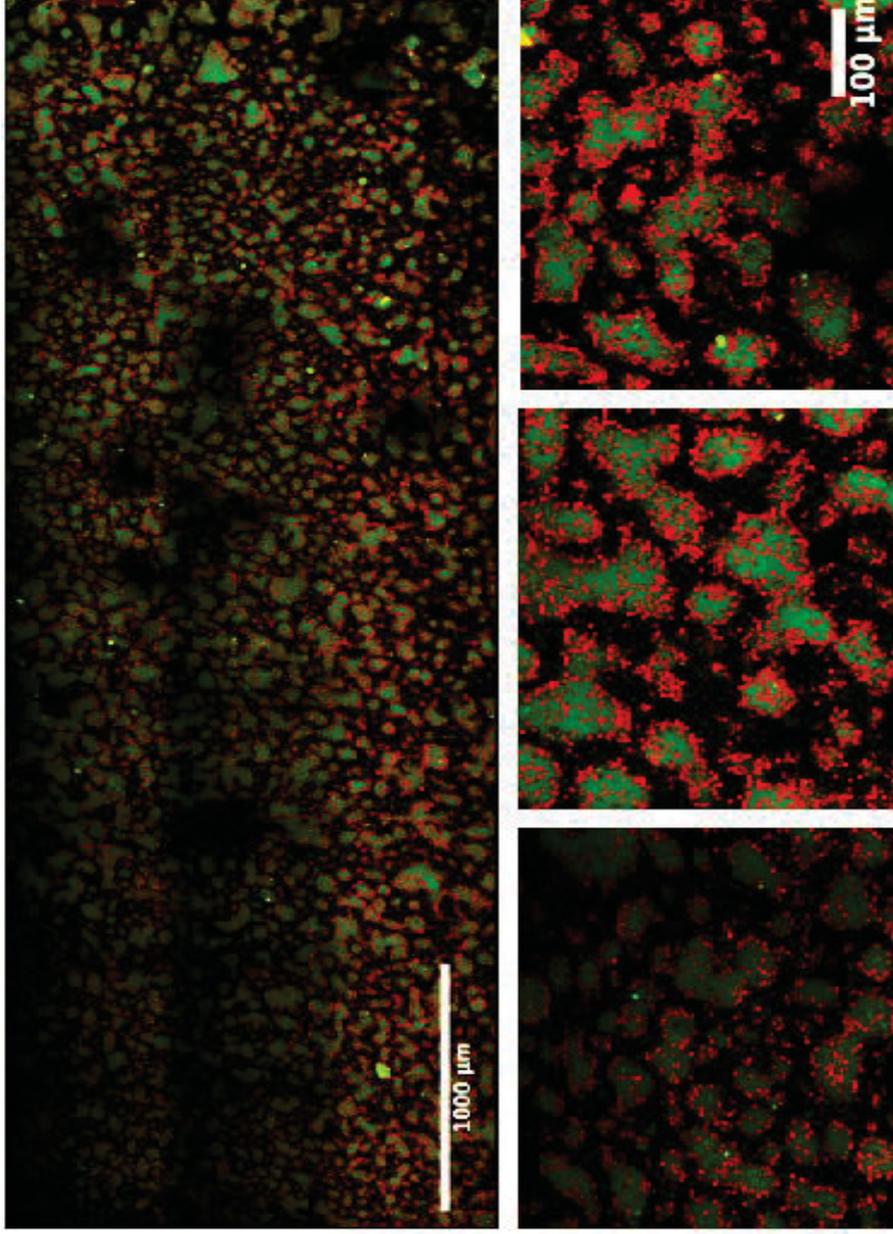
Os resultados obtidos nesta etapa são fundamentais para a compreensão e aplicação das emulsões gelificadas. No ponto A, onde XG é fase contínua, foi demonstrado que as emulsões podem ser gelificadas mantendo sua estrutura interna, com o tamanho das gotículas variando de acordo com a quantidade de enzima utilizada. Isso evidencia a possibilidade de controlar as propriedades das emulsões de acordo com a aplicação desejada, destacando a versatilidade e o potencial desses sistemas.

Nos pontos M e B, foi observado que a fase de XG, agora em menor quantidade, apresenta separação de fases antes da gelificação. Entretanto esse cenário pode ser alterado através da adição de partículas, como leveduras, atrasando a separação de fases.

Considerando o papel significativo das leveduras na estabilização das emulsões, sua utilização emerge como uma abordagem em destaque. Dada a interação preferencial das células de *S. cerevisiae* com AMP na presença de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de NaCl, elas podem ser retidas nessa fase, considerando a AMP como fase dispersa em uma matriz gelificada de XG. Para provar tal hipótese, a emulsão contendo  $1,00 \%$  (m/m) de AMP em  $1,30 \%$  (m/m) foi formada na presença de  $2,00 \%$  de levedura com  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ . A imagem de microscopia confocal, ilustrada na FIGURA 36, confirma a compartimentalização das células na matriz gelificada.

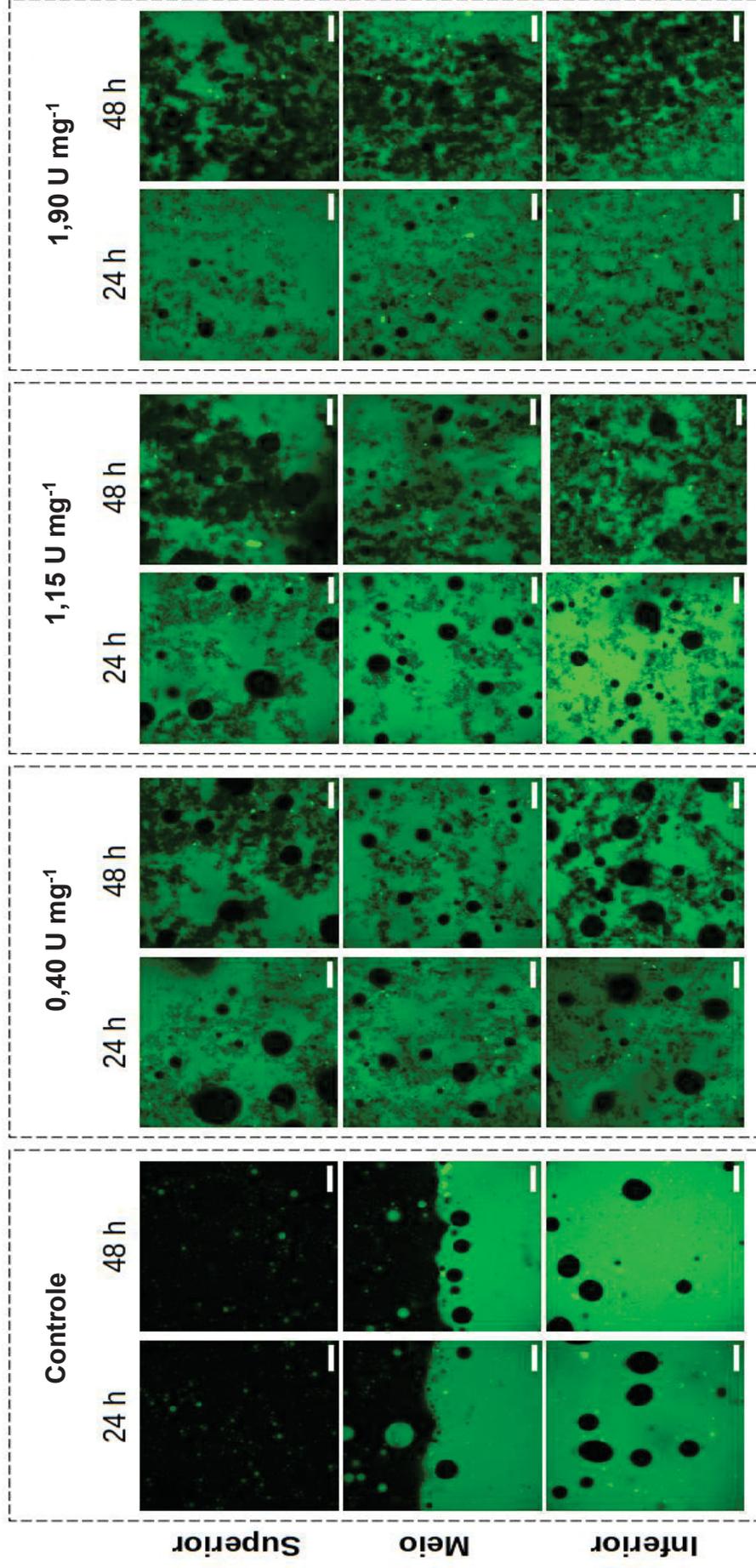
As leveduras também permitem o atraso da separação de fases quando a XG compõe a fase dispersa, como no ponto B, formando emulsões de Pickering. Isso permite, por exemplo, que a XG seja gelificada antes da separação de fase. Como resultado, podem ser obtidas microesferas de XG gelificadas, conforme ilustra a FIGURA 37. A concentração de enzimas governa o diâmetro das esferas ( $n = 75$  gotículas), conforme demonstra a FIGURA 38.

FIGURA 36 - MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DE EMULSÕES DE AMILOPECTINA (VERDE) A 1,00 % EM XILOGLUCANA (PRETO) A 1,30 %, NA PRESENÇA DE 2,00 % DE CÉLULAS DE *S. Cerevisiae* INATIVADAS (VERMELHO), NA PRESENÇA DE 20 MMOL L<sup>-1</sup> DE NaCl, GELIFICADAS COM 1,90 U mg<sup>-1</sup> DE β-GALACTOSIDASE, EM 24 h. A IMAGEM SUPERIOR REPRESENTA O ESCANEAMENTO COMPLETO DA LÂMINA, SENDO A PARTE SUPERIOR À ESQUERDA, E INFERIOR À DIREITA. AS IMAGENS INFERIORES REPRESENTAM, RESPECTIVAMENTE, PARTE SUPERIOR, MÉDIA E INFERIOR EM MAIOR AUMENTO.



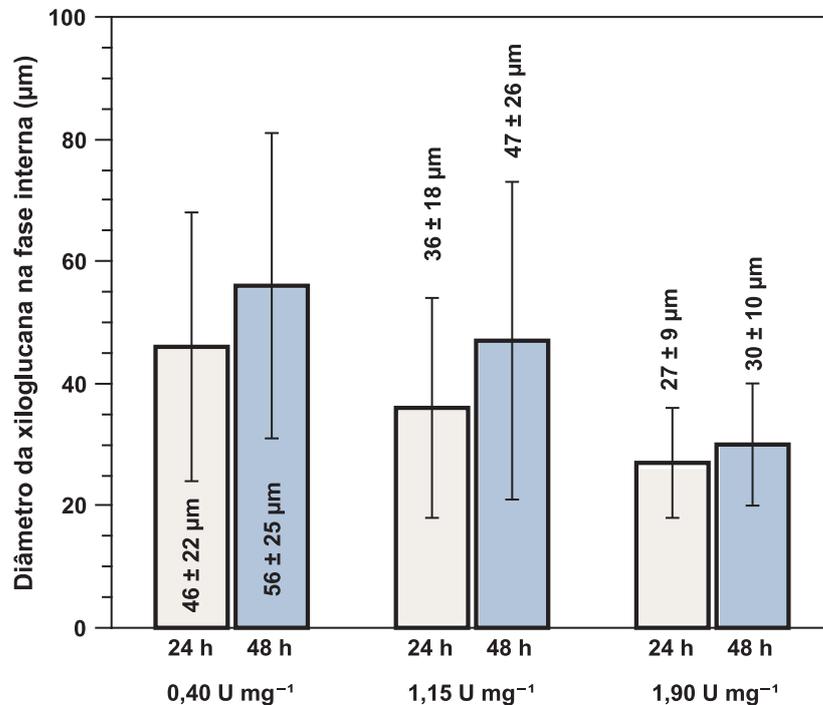
FONTE: O autor (2023).

FIGURA 37 - MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER DE EMULSÕES DE XILOGLUCANA (PRETO) A 0,35 % E AMILOPECTINA (VERDE) A 4,00 % NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE E 2,00 % DE LEVEDURAS INATIVADAS (SEM MARCAÇÃO), EM 24 E 48 h DE EMULSIFICAÇÃO. BARRA DE ESCALA = 100  $\mu$ m.



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 38 - VARIAÇÃO DO DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS DE XILOGLUCANA, DISPERSAS A 0,35 %, ESTABILIZADAS COM 2,00 % DE LEVEDURAS INATIVADAS, EM AMILOPECTINA A 4,00 %. COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE AS GOTÍCULAS DE XILOGLUCANA APRESENTAM MENOR VARIAÇÃO DE DIÂMETRO COM O TEMPO (n = 75 GOTÍCULAS).



FONTE: O autor (2023).

Os resultados do teste Tukey sugerem diferenças estatisticamente significativas nas dimensões da fase dispersa entre as diferentes concentrações de enzimas testadas, considerando intervalo de confiança de 95%. Comparando as concentrações, observou-se diferenças significativas entre 0,40 e 1,15  $U\ mg^{-1}$  ( $p = 0,0306$ ), entre 0,40 e 1,90  $U\ mg^{-1}$  ( $p = 0,0000$ ), bem como entre 1,15 e 1,90  $U\ mg^{-1}$  ( $p = 0,0000$ ).

## 4 CONCLUSÃO

A estabilização, via emulsões de Pickering, utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* se apresenta como um avanço significativo e inovador no campo de emulsões A/A. A utilização de matérias-primas de baixo custo, com técnicas rápidas e simples permite explorar emulsões com apelo “*all natural*” ou “*food grade*” uma vez que todos os componentes já são amplamente utilizados na indústria de alimentos e farmacêutica. A presença de pequenas quantidades de NaCl demonstrou ter um grande impacto nas emulsões, mostrando que a preferência pela fase de AMP torna-se maior o que permite sua compartimentalização.

A etapa de gelificação enzimática de XG demonstrou que os géis obtidos apresentam características reológicas semelhantes, porém sua cinética de formação é sensível à temperatura e concentração, o que impacta diretamente na microestrutura do gel formado a partir das emulsões A/A.

A associação entre leveduras e enzimas, na presença de sal, é capaz de criar géis contendo células de *S. cerevisiae* compartimentalizadas na fase dispersa de AMP, o que é interessante para alimentos uma vez que a XG apresenta propriedades prebióticas ao passo que as leveduras têm alto valor nutricional. Por fim, as emulsões de Pickering também atrasam a separação de fases enquanto a XG é fase dispersa, podendo ser gelificada em microesferas de diâmetro governado pela concentração de enzima.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH et al. Engineering Emulsion Gels as Functional Colloids Emphasizing Food Applications: A Review. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 890188, 17 maio 2022.
- APRIYANTO, A.; COMPART, J.; FETTKE, J. A review of starch, a unique biopolymer – Structure, metabolism and in planta modifications. **Plant Science**, v. 318, p. 111223, maio 2022.
- AYDIN, D.; KIZILEL, S. Water-in-Water Emulsion Based Synthesis of Hydrogel Nanospheres with Tunable Release Kinetics. v. 69, n. 7, 2017.
- AYED, E. B. et al. Water-In-Water Emulsion Gels Stabilized by Cellulose Nanocrystals. 2018.
- BALAKRISHNAN, G. et al. Particles Trapped at the Droplet Interface in Water-in-Water Emulsions. 2012.
- BAMIGBADE, G. B. et al. An Updated Review on Prebiotics: Insights on Potentials of Food Seeds Waste as Source of Potential Prebiotics. *Molecules*, v. 27, n. 18, p. 5947, 13 set. 2022.
- BERTOFT, E. On the Building Block and Backbone Concepts of Amylopectin Structure. **Cereal Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 294–311, jul. 2013.
- BINKS, B. P. Colloidal Particles at a Range of Fluid–Fluid Interfaces. **Langmuir**, v. 33, n. 28, p. 6947–6963, 18 jul. 2017.
- BINKS, B. P.; HOROZOV, T. S. **Colloidal particles at liquid interfaces**. [s.l.] Cambridge University Press, 2006.
- BOOSTANI, S. et al. The influence of emulsion parameters on physical stability and rheological properties of Pickering emulsions stabilized by hordein nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 101, n. November 2019, p. 105520, 2020.
- BRUN-GRAEPPPI, A. K. A. S. et al. Study on the sol–gel transition of xyloglucan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 555–562, 2010.
- CACACE, D. N. et al. Aqueous emulsion droplets stabilized by lipid vesicles as microcompartments for biomimetic mineralization. **Langmuir**, v. 31, n. 41, p. 11329–11338, 2015.
- CALABRESE, V. et al. Pickering emulsions stabilized by naturally derived or biodegradable particles. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 12, p. 83–90, ago. 2018.
- CELIK, S. B. et al. Fabrication of human keratinocyte cell clusters for skin graft applications by templating water-in-water Pickering emulsions. **Biomimetics**, v. 4, n. 3, p. 50, 2019.
- CHANG, Y. I.; CHANG, P. K. The role of hydration force on the stability of the suspension of *Saccharomyces cerevisiae* - Application of the extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 211, n. 1, p. 67–77, 2002.
- CHAO, Y.; SHUM, H. C. Emerging aqueous two-phase systems: from fundamentals of interfaces to biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, v. 49, n. 1, p. 114–142, 2020.

- CHAVEZ, C. M. et al. The cell morphological diversity of *Saccharomycotina* yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 24, p. foad055, 9 jan. 2024.
- CHEN, H. et al. Possible beneficial effects of xyloglucan from its degradation by gut microbiota. **Trends in Food Science & Technology**, v. 97, p. 65–75, mar. 2020.
- CHEN, Z. et al. Individual Surface-Engineered Microorganisms as Robust Pickering Interfacial Biocatalysts for Resistance-Minimized Phase-Transfer Bioconversion. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 16, p. 4904–4908, 13 abr. 2015.
- CHENG, J. et al. Xyloglucan affects gut-liver circulating bile acid metabolism to improve liver damage in mice fed with high-fat diet. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103651, jan. 2020.
- COSGROVE, T. **Colloid science: principles, methods and applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2010.
- DE BELDER, A. N.; GRANATH, K. Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 30, n. 2, p. 375–378, out. 1973.
- DING, P. et al. Interfacial Tension in Phase-Separated Gelatin/Dextran Aqueous Mixtures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 253, n. 2, p. 367–376, set. 2002.
- DUTTA, P.; GIRI, S.; GIRI, T. K. Xyloglucan as green renewable biopolymer used in drug delivery and tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 55–68, out. 2020.
- ENE, I. V. et al. Cell wall remodeling enzymes modulate fungal cell wall elasticity and osmotic stress resistance. **mBio**, v. 6, n. 4, p. 1–15, 2015.
- ESQUENA, J. Water-in-water (W/W) emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 25, p. 109–119, out. 2016.
- ESQUENA, J. Recent advances on water-in-water emulsions in segregative systems of two water-soluble polymers. **Current Opinion in Food Science**, v. 51, p. 101010, jun. 2023.
- ESQUENA-MORET, J. A Review of Xyloglucan: Self-Aggregation, Hydrogel Formation, Mucoadhesion and Uses in Medical Devices. **Macromol**, v. 2, n. 4, p. 562–590, 6 dez. 2022.
- FIROOZMAND, H.; ROUSSEAU, D. Food Hydrocolloids Tailoring the morphology and rheology of phase-separated biopolymer gels using microbial cells as structure modifiers. **Food hydrocolloids**, v. 42, p. 204–214, 2014.
- FIROOZMAND, H.; ROUSSEAU, D. Microbial cells as colloidal particles: Pickering oil-in-water emulsions stabilized by bacteria and yeast. **Food Research International**, v. 81, p. 66–73, 2016.
- FREITAS, R. A. D. et al. Stabilization of Water-in-Water Emulsions by Polysaccharide-Coated Protein Particles. 2016.
- GALICHET, A. et al. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: Study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, n. 2, p. 179–186, 2001.

HAJI, F. et al. Application of Pickering emulsions in probiotic encapsulation- A review. *Current Research in Food Science*, v. 5, n. June, p. 1603–1615, 2022.

HATTI-KAUL, R. **Aqueous two-phase systems: methods and protocols**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2008. v. 11

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual review of plant biology**, v. 40, n. 1, p. 139–168, 1989.

HAZT, B. et al. Effect of pH and protein particle shape on the stability of amylopectin–xyloglucan water-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 104, p. 105769, jul. 2020.

HAZT, B. et al. Unconventional and conventional Pickering emulsions: Perspectives and challenges in skin applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 636, p. 122817, 2023.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 11, n. 8, p. 506–514, ago. 2014.

HLIHOR, R. M. et al. Bioremediation of Cr(VI) polluted wastewaters by sorption on heat inactivated *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **International Journal of Environmental Research**, v. 7, n. 3, p. 581–594, 2013.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 18, dez. 2016.

KATEPALLI, H. et al. Microstructure and rheology of particle stabilized emulsions: Effects of particle shape and inter-particle interactions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 485, p. 11–17, jan. 2017.

KHANN, B. et al. Fabrication of Sacha Inchi Oil-Loaded Microcapsules Employing Natural-Templated *Lycopodium clavatum* Spores and Their Pressure-Stimuli Release Behavior. *ACS Omega*, v. 8, n. 23, p. 20937–20948, 13 jun. 2023.

KHEDR, A.; STRIOLO, A. Quantification of Ostwald Ripening in Emulsions via Coarse-Grained Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 15, n. 9, p. 5058–5068, 10 set. 2019.

KLIS, F. M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239–256, 2002.

KULKARNI, A. D. et al. Xyloglucan: A functional biomacromolecule for drug delivery applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 799–812, 2017.

KUMAR, S. et al. Metformin-loaded alginate nanoparticles as an effective antidiabetic agent for controlled drug release. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 143–150, 2017.

LÓPEZ-MALO, A.; GUERRERO, S.; ALZAMORA, S. M. *Saccharomyces cerevisiae* thermal inactivation kinetics combined with ultrasound. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 10, p. 1215–1217, 1999.

LU, T. et al. Interconnected superporous adsorbent prepared via yeast-based Pickering HIPes for high-efficiency adsorption of  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  and  $Sr^{2+}$ . **Chemical Engineering Journal**, v. 361, n. November 2018, p. 1411–1422, 2019.

MAHAJAN, H. S. et al. Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for nasal drug delivery. **Drug Delivery**, v. 19, n. 5, p. 270–276, 2012.

MARIYATE, J.; BERA, A. A critical review on selection of microemulsions or nanoemulsions for enhanced oil recovery. *Journal of Molecular Liquids*, v. 353, p. 118791, maio 2022.

MATALANIS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1865–1880, dez. 2011.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practices, and techniques**. [s.l.] CRC press, 2004.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 251, p. 55–79, 2018.

MOREIRA, T. C. P. et al. Stabilization mechanisms of oil-in-water emulsions by *Saccharomyces cerevisiae*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 399–405, 2016.

MORO CANTU-JUNGLES, T. et al. Soluble xyloglucan generates bigger bacterial community shifts than pectic polymers during in vitro fecal fermentation. *Carbohydrate Polymers*, v. 206, p. 389–395, fev. 2019.

MUNDARGI, R. C. et al. Lycopodium Spores: A Naturally Manufactured, Superrobust Biomaterial for Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*, v. 26, n. 4, p. 487–497, jan. 2016.

MURRAY, B. S.; PHISARNCHANANAN, N. Food Hydrocolloids Whey protein microgel particles as stabilizers of waxy corn starch þ locust bean gum water-in-water emulsions. **Food hydrocolloids**, v. 56, p. 161–169, 2016.

NEJADMANSOURI, M. et al. Promising application of probiotic microorganisms as Pickering emulsions stabilizers. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2023.

NARONG, P.; JAMES, A. E. Effect of pH on the  $\zeta$ -potential and turbidity of yeast suspensions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 274, n. 1–3, p. 130–137, 2006.

NICOLAI, T.; MURRAY, B. Food Hydrocolloids Particle stabilized water in water emulsions. **Food hydrocolloids**, v. 68, p. 157–163, 2017.

NISBET, D. R. et al. Morphology and gelation of thermosensitive xyloglucan hydrogels. *Biophysical Chemistry*, v. 121, n. 1, p. 14–20, abr. 2006.

- OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29, n. 2–3, p. 207–233, 1998.
- PARAPOULI, M. et al. **Saccharomyces cerevisiae and its industrial applications**. [s.l.: s.n.]. v. 6
- PARK, Y. B.; COSGROVE, D. J. Xyloglucan and its Interactions with Other Components of the Growing Cell Wall. *Plant and Cell Physiology*, v. 56, n. 2, p. 180–194. 2015
- PICHOT, R. et al. Particle-stabilized food emulsions. 2014.
- PICKERING, S. U. Emulsions. *Journal of Chemical Society*, v. 91, p. 2001–2021, 1907.
- PIRES, C. et al. Effect of sulfate-ester content and nanocellulose allomorph on stability of amylopectin-xyloglucan water-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 141, p. 108700, ago. 2023.
- RUAN, M. et al. Biomacromolecule based water-in-water Pickering emulsion: A fascinating artificial cell-like compartment for the encapsulation of *Lactobacillus plantarum*. **Food Bioscience**, v. 55, n. June, p. 102916, 2023.
- SAIFULLAH, MD.; AHSAN, A.; SHISHIR, M. R. I. Production, stability and application of micro- and nanoemulsion in food production and the food processing industry. *Em: Emulsions*. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 405–442.
- SAKAKIBARA, C. N. et al. Xyloglucan gelation induced by enzymatic degalactosylation; kinetics and the effect of the molar mass. **Carbohydrate polymers**, v. 174, p. 517–523, 2017.
- SAQIB, S. et al. Sources of  $\beta$ -galactosidase and its applications in food industry. **3 Biotech**, v. 7, p. 1–7, 2017.
- SCHRAMM, L. L. **Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2016.
- SCHULTINK, A. et al. Structural Diversity and Function of Xyloglucan Sidechain Substituents. *Plants*, v. 3, n. 4, p. 526–542, 13 nov. 2014.
- SHEKHAR, C. et al. Probing emulsion-gel transition in aqueous two-phase systems stabilized by charged nanoparticles: A simple pathway to fabricate water-in-water emulsion-filled gels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 670, p. 131474, ago. 2023.
- SMITH, A. M. The biosynthesis of starch granules. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 2, p. 335–341, 2001.
- SMITS, G. J. et al. Cell wall dynamics in yeast. **Current opinion in microbiology**, v. 2, n. 4, p. 348–352, 1999.
- SOTO-AGUILAR, D. et al. All-aqueous emulsions stabilized by sporopollenin exine capsules. **Food Hydrocolloids**, v. 148, p. 109447, mar. 2024.

SRIVASTAVA, S. P. et al. Physicochemical studies on the water-yeast cells-gas-oil system. **Journal of Applied Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 105–108, 1970.

TADROS, T. F. **Emulsions: Formation, stability, industrial applications**. [s.l.] Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2016.

VIS, M.; ERNÉ, B. H.; TROMP, R. H. Chemical physics of water–water interfaces. **Biointerphases**, v. 11, n. 1, p. 018904, 1 mar. 2016.

WONGKONGKATEP, P. et al. Bacteria interface pickering emulsions stabilized by self-assembled bacteria-chitosan network. **Langmuir**, v. 28, n. 13, p. 5729–5736, 2012.

WU, B. et al. Attractive Pickering Emulsion Gels. **Advanced Materials**, v. 33, n. 33, p. 2102362, ago. 2021.

XIE, H. et al. Interfacial biocatalysis in bacteria-stabilized Pickering emulsions for microbial transformation of hydrophobic chemicals. **Catalysis Science & Technology**, v. 11, n. 8, p. 2816–2826, 2021.

YAMATOYA, K. et al. Effects of xyloglucan with the partial removal of galactose on plasma lipid concentration. *Journal of Functional Foods*, v. 3, n. 4, p. 275–279, out. 2011.

YAMMINE, M. et al. Reliable Approach for Pure Yeast Cell Wall Protein Isolation from *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells. **ACS Omega**, 2022.

YOSHIMURA, M.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Effects of xyloglucan on the gelatinization and retrogradation of corn starch as studied by rheology and differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids*, v. 13, n. 2, p. 101–111, mar. 1999.

ZHOU, C. et al. Water-in-water emulsion stabilized by cellulose nanocrystals and their high enrichment effect on probiotic bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 633, p. 254–264, 2023.

ZHU, W. et al. Magnetic molecularly imprinted microspheres via yeast stabilized Pickering emulsion polymerization for selective recognition of  $\lambda$ -cyhalothrin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 453, n. 1, p. 27–36, 2014.