

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATALIA BRASIL POSSELT COSTA

APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE GLIADINA PARA ESTABILIZAÇÃO DE
EMULSÕES ÁGUA EM ÁGUA
(HIDROXIPROPILMETILCELULOSE/AMILOPECTINA) POR EFEITO PICKERING

CURITIBA

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATALIA BRASIL POSSELT COSTA

APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE GLIADINA PARA ESTABILIZAÇÃO DE
EMULSÕES ÁGUA EM ÁGUA
(HIDROXIPROPILMETILCELULOSE/AMILOPECTINA) POR EFEITO PICKERING

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2024

Costa, Natalia Brasil Posselt

Aplicação de nanopartículas de gliadina para estabilização de emulsões água em água (hidroxipropilmetilcelulose/amilopectina) por efeito *Pickering* [recurso eletrônico] / Natalia Brasil Posselt Costa – Curitiba, 2024.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

1. Emulsões. 2. Água. 3. Amilopectina. 4. Gliadina. 5. Microscopia confocal.
6. Nanopartículas. I. Freitas, Rilton Alves de. II. Universidade Federal do Paraná.
III. Título.

CDD 615.19



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATALIA BRASIL POSSELT COSTA** intitulada: **Aplicação de nanopartículas de gliadina para estabilização de emulsões água em água (hidroxipropilmetilcelulose/amilopectina) por efeito Pickering**, sob orientação do Prof. Dr. RILTON ALVES DE FREITAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Julho de 2024.

Assinatura Eletrônica

27/07/2024 09:09:16.0

RILTON ALVES DE FREITAS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/07/2024 09:57:05.0

MARCEL HENRIQUE MARCONDES SARI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ -UFPR)

Assinatura Eletrônica

13/08/2024 16:06:11.0

MARIA ALICE WITT

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

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: 384133

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 384133

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, Dr. Rilton Alves de Freitas, por toda a supervisão e orientação durante os anos de mestrado. Escolher você como orientador foi, sem dúvida, uma das melhores decisões que tomei.

Aos meus pais, Carol e Fabiano, agradeço por todo o apoio, amor e dedicação que sempre tiveram comigo e com o Fa. O incentivo de vocês é a força que me motiva a ir mais longe.

Ao meu amor, Ranieri, sou imensamente grata pelos anos de companheirismo e dedicação. Amo poder compartilhar a vida com você.

Aos meus sogros, Silvania e Fernando, agradeço pelas conversas, conselhos e por todo o carinho. Vocês são minha segunda família e sou muito grata por tê-los em minha vida.

Ao meu grupo de pesquisa e aos amigos do Biopol, sem o apoio de vocês, não teria chegado até aqui. Um agradecimento especial às minhas amigas Natália e Joslaine. Obrigada por aprender errando comigo, meus dias com vocês são mais felizes.

Ao Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB-UFPR), ao Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas e ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência, pela ajuda nos experimentos.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por me acolherem e por serem minha segunda casa desde a graduação.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

As emulsões representam sistemas coloidais onde uma fase líquida é dispersa em outra, sendo ambas imiscíveis. Esses sistemas são amplamente utilizados em diversas indústrias. Na indústria alimentícia, por exemplo, encontram-se em produtos como maionese e leite. Já na indústria de cosméticos, são comuns em cremes e maquiagens. Um tipo específico de emulsão, ainda não comercializado, são as emulsões água-em-água (A/A), que consistem em dois polímeros solúveis em água que tendem à separação de fases quando misturados. As emulsões A/A mimetizam ambientes biológicos, apresentando, portanto, um potencial significativo para aplicações em cultivo celular 3D, biolubrificantes e separação de biomoléculas ou simplesmente na produção de emulsões livres de óleo. Ao contrário das emulsões convencionais, as emulsões A/A não podem ser estabilizadas por surfactantes devido à interface mais espessa e à baixa tensão interfacial desses sistemas. Uma alternativa promissora para impedir a separação de fases em emulsões A/A é a adsorção de partículas sólidas na interface líquido-líquido, resultando nas chamadas emulsões de Pickering. Neste contexto, buscando a formulação de emulsões estáveis, emulsões A/A foram preparadas pela mistura de dispersões dos polissacarídeos amilopectina (AMP) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), com diferentes concentrações de nanopartículas de gliadina (NPG) para a estabilização, variando de 0,05 a 1 % (m m⁻¹). Baseando-se no diagrama de fases da mistura AMP/HPMC, foram formuladas emulsões de AMP em HPMC com concentrações poliméricas de 1,26 % e 0,77 % (m m⁻¹), respectivamente, e de HPMC em AMP com concentrações de 4,62 % e 0,29 % (m m⁻¹), respectivamente. As diferentes emulsões preparadas foram caracterizadas de forma macroscópica e microscópica, através da microscopia confocal a laser. No Ponto 1, com HPMC como fase contínua, as NPG não foram capazes de estabilizar as emulsões por mais de 48 horas. No Ponto 2, com AMP como fase contínua, volumes emulsionados foram observados por até 35 dias de estabilização. Em ambos os pontos, o mecanismo de estabilização observado foi por efeito Pickering. As NPG utilizadas foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico e microscopia de força atômica, apresentando formato esférico e tamanho médio de 207,9 nm em pH 5. Esses resultados são pioneiros na utilização de NPG para a estabilização de emulsões A/A, destacando-se especialmente pelo emprego de polímeros de grau farmacêutico e a substituição de partículas de origem animal por vegetais. Este estudo abre novos caminhos para pesquisas adicionais visando aumentar ainda mais a estabilidade das emulsões formadas e potencialmente introduzir emulsões A/A no mercado.

Palavras-chave: *Pickering*; emulsão água-em-água; amilopectina; hidroxipropilmetilcelulose; gliadina; nanopartículas.

ABSTRACT

Emulsions represent colloidal systems where one liquid phase is dispersed within another, with both being immiscible. These systems are widely used in various industries. In the food industry, for example, they are found in products like mayonnaise and milk. In the cosmetics industry, they are common in creams and makeup. A specific type of emulsion, not yet commercialized, is water-in-water (W/W) emulsions, which consist of two water-soluble polymers that tend to separate phases when mixed. W/W emulsions mimic biological environments and therefore have significant potential for applications in 3D cell culture, biolubricants, biomolecule separation, or simply in the production of oil-free emulsions. Unlike conventional emulsions, W/W emulsions cannot be stabilized by surfactants due to the thicker interface and low interfacial tension of these systems. A promising alternative to prevent phase separation in W/W emulsions is the adsorption of solid particles at the liquid-liquid interface, resulting in so-called Pickering emulsions. In this context, aiming to formulate stable emulsions, W/W emulsions were prepared by mixing dispersions of the polysaccharides amylopectin (AMP) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) with different concentrations of gliadin nanoparticles (GNP), ranging from 0.05 to 1 % (m m^{-1}). Based on the phase diagram of the AMP/HPMC mixture, emulsions of AMP in HPMC were formulated with polymer concentrations of 1.26 % and 0.77 % (w w^{-1}), respectively, and HPMC in AMP with concentrations of 4.62 % and 0.29 % (w w^{-1}), respectively. The different emulsions prepared were characterized both macroscopically and microscopically using laser confocal microscopy. At Point 1, with HPMC as the continuous phase, the NPGs were unable to stabilize the emulsions for more than 48 hours. At Point 2, with AMP as the continuous phase, emulsified volumes were observed for up to 35 days of stabilization. In both points, the observed stabilization mechanism was via the Pickering effect. The GNPs used were characterized by dynamic light scattering and atomic force microscopy, exhibiting a spherical shape and an average size of 207.9 nm at pH 5. These results are pioneering in the use of NPGs for the stabilization of W/W emulsions, particularly noteworthy for the use of pharmaceutical-grade polymers and the replacement of animal-derived particles with plant-based ones. This study paves the way for further research aimed at enhancing the stability of the formed emulsions and potentially introducing W/W emulsions to the market.

Keywords: *Pickering*; water-in-water emulsion; amylopectin; hydroxypropyl methylcellulose; gliadin; nanoparticles.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS USADOS NA CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES.....	40
TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES HPMC, AMP E NPG USADAS NO PREPARO DAS EMULSÕES.	42
TABELA 3 - PARÂMETROS MACROMOLECULARES DA AMP PURIFICADA.....	46
TABELA 4 - PARÂMETROS MACROMOLECULARES DO HPMC.	47
TABELA 5 - DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E PDI DE NPG ANTES E APÓS ROTAIEVAPORAÇÃO, AS AMOSTRAS FORAM DILÚIDAS 1:100 EM ÁGUA, À 20 ± 5 °C. O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.	54

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TIPOS DE EMULSÕES CONVENCIONAIS (1a), NÃO CONVENCIONAIS (1b) E SEUS COMPONENTES (FASES DISPERSA E CONTÍNUA). 17
- FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS ASSOCIADOS À INSTABILIDADE DE EMULSÕES, SEPARANDO-OS EM GRAVITACIONAIS E TERMODINÂMICOS. ... 19
- FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE PARTÍCULA SÓLIDA NA INTERFACE ÓLEO-ÁGUA COM ÂNGULO DE CONTATO θ 21
- FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS DE ESTABILIZAÇÃO EM EMULSÕES DE PICKERING. SEPARANDO A ADSORÇÃO DE PARTÍCULAS NA INTERFACE EM FORMAÇÃO DE MONOCAMADA (4a), NÃO RECOBRIMENTO COMPLETO DA INTERFACE (4b E c), MÚLTIPLAS CAMADAS (4d), FORMAÇÃO DE REDE DE PARTÍCULAS (4e) E FORMAÇÃO DE PONTES DE PARTÍCULAS ENTRE GOTAS (4f). 22
- FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DIAGRAMA DE FASES BINÁRIO DE MISTURA POLIMÉRICA HIDROFÍLICA COM SEPARAÇÃO DE FASES SEGREGATIVA. 25
- FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA AMILOPECTINA. N É O NÚMERO DE UNIDADES REPETITIVAS. EM VERMELHO DESTACAM-SE AS LIGAÇÕES $\alpha 1 \rightarrow 4$ E $\alpha 1 \rightarrow 6$ 29
- FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MERO DO HPMC. ONDE N É O NÚMERO DE UNIDADES REPETITIVAS. EM VERMELHO DESTACA-SE A LIGAÇÃO $\beta 1 \rightarrow 4$ 30
- FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA α/β -, γ - E ω - GLIADINA. OS NÚMEROS NA PORÇÃO C-TERMINAL REPRESENTAM OS RESÍDUOS DE CISTEÍNA UNIDOS POR LIGAÇÕES DISSUFETO. . 31
- FIGURA 9 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA AMP PURIFICADA, USANDO FASE MÓVEL DE NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ COM $0,5 \text{ g L}^{-1}$ NaN_3 A UM FLUXO DE $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ A $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 45
- FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO DO HPMC, USANDO FASE MÓVEL DE

NaNO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ COM 0,5 g L ⁻¹ NaN ₃ A UM FLUXO DE 0,6 mL min ⁻¹ A 25 °C.	47
FIGURA 11 - APRESENTAÇÃO MACROSCÓPICA DA DISPERSÃO DE NPG À 1% (m m ⁻¹) NO PRIMEIRO DIA DE PREPARO (11a). EM 11b EVIDENCIA-SE O EFEITO TYNDALL SOBRE NPG DILUÍDA 1:100 EM ÁGUA.	48
FIGURA 12 - IMAGEM DE TOPOGRAFIA OBTIDA POR AFM, EM MODO DE CONTATO INTERMITENTE, DA NPG EM pH 5 EM SUPERFÍCIE DE MICA – 8X8 μM, SECA EM ESTUFA À 40 °C (a E b) E SOB FLUXO DE GÁS NITROGÊNIO (c E d).....	49
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DA NPG.....	50
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DETERMINAÇÃO POTENCIAL ZETA NO PLANO DE CISALHAMENTO.	51
FIGURA 15 - DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DA NPG EM SOLUÇÃO AQUOSA DE KCl 10 mmol L ⁻¹ PELA ADIÇÃO DE NaOH OU HCl 0,05 mol L ⁻¹ , À 20 ± 5 °C. O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.	52
FIGURA 16 - TITULAÇÃO DA NPG EM ÁGUA COM SOLUÇÃO AQUOSA DE KCl 0,1 mol L ⁻¹ , EM pH 5, À 20 ± 5 °C. O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.	53
FIGURA 17 - HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS POR INTENSIDADE ANTES DA CENTRIFUGAÇÃO EM VETORES DE BAIXO ÂNGULO. AS NPG FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA, pH 5 E À 20 ± 5 °C.....	52
FIGURA 18 - HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS POR INTENSIDADE APÓS CENTRIFUGAÇÃO A 4000 g POR 30 MINUTOS EM VETORES DE BAIXO ÂNGULO. AS NPG FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA, pH 5 E À 20 ± 5 °C.....	55
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NPG PELA DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E PDI AO LONGO DE 28 DIAS EM VETORES DE BAIXO ÂNGULO. AS NPG FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA, pH 5 E À 20 ± 5 °C.	56
FIGURA 20 - OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DA SUSPENSÃO DE NPG	

A 1 % (m m ⁻¹) EM ÁGUA EM FUNÇÃO DA MUDANÇA DE pH, À 20 ± 5 °C.....	57
FIGURA 21 - VARIAÇÃO DE TAMANHO E PDI DA NPG EM ÁGUA EM FUNÇÃO DA MUDANÇA DE pH, À 20 ± 5 °C. EM pH 6 O TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS EXCEDE O LIMITE DE DETERMINAÇÃO DO EQUIPAMENTO*. AS AMOSTRAS FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA E O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.	58
FIGURA 22 - PERFIS DE ELUIÇÃO DA FASE INFERIOR (a) E FASE SUPERIOR (b) DO TUBO 10 DO DIAGRAMA DE FASES AMP-HPMC.	59
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA ALTURA DAS FASES DA MISTURA AMP-HPMC.	60
FIGURA 24 - ACOMPANHAMENTO MACROSCÓPICO DA SEPARAÇÃO DE FASES EM 0 E 96 HORAS DAS MISTURAS DE AMP-HPMC EM TEMPERATURA AMBIENTE PARA CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES.	60
FIGURA 25 - DIAGRAMA DE FASES DA MISTURA POLÍMERICA DE AMP-HPMC APÓS 96 HORAS DE SEPARAÇÃO DE FASES. OS PONTOS 1 E 2 REPRESENTAM AS CONDIÇÕES DE PREPARO DAS EMULSÕES. EM VERDE ESTÁ MARCADA A AMP.	61
FIGURA 26 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS EMULSÕES NOS PONTOS 1 E 2 PREPARADAS NA AUSÊNCIA (a) E NA PRESENÇA DE AMP-FITC E RODAMINA (b).	63
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC NO PONTO 1, COM CONCENTRAÇÃO DE NPG DE 0 A 1 % (m m ⁻¹) SEM ALTERAÇÃO DO pH, À 20 ± 5 °C.	64
FIGURA 28 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 1, OBTIDAS APÓS 24 HORAS DE EMULSIFICAÇÃO, EM AUMENTO DE 20 E 60X (f), COM CONCENTRAÇÕES DE NPG DE 0, 0,05, 0,2, 0,5 E 1 % (m m ⁻¹). EM VERDE A AMP-FITC, EM VERMELHO AS NPG E EM PRETO O HPMC.	66
FIGURA 29 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 1, COM 0,5 % (m m ⁻¹) DE NPG APÓS 5 DIAS DE EMULSIFICAÇÃO, EM AUMENTO DE 20X. EM VERDE	

	A AMP-FITC, EM VERMELHO AS NPG E EM PRETO O HPMC.	67
FIGURA 30 - HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS (μm) DE EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 1, PARA AS CONCENTRAÇÕES DE NPG DE 0,05, 0,2, 0,5 E 1,0 % (m m^{-1}).....		68
FIGURA 31 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC PREPARADAS NO PONTO 1, NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPG, EM pH 5, 6 E 7, À 20 ± 5 °C.		69
FIGURA 32 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC NO PONTO 1, NA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPG E COM ADIÇÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE KCI 60 mmol L^{-1} , À 20 ± 5 °C, COM pH 5,5.....		71
FIGURA 33 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC NO PONTO 2, COM CONCENTRAÇÃO DE NPG DE 0 A 1 % (m m^{-1}) SEM ALTERAÇÃO DO pH, À 20 ± 5 °C.		72
FIGURA 34 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 2, OBTIDAS APÓS 24 HORAS DE EMULSIFICAÇÃO, EM AUMENTO DE 20X, COM CONCENTRAÇÕES DE NPG DE 0, 0,05, 0,2, 0,5 E 1 % (m m^{-1}). EM VERDE ESTÁ A AMP-FITC, EM VERMELHO AS NPG E EM PRETO O HPMC.		74
FIGURA 35 - HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS (μM) DE EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 2, PARA AS CONCENTRAÇÕES DE NPG DE 0,5 E 1,0 % (m m^{-1}).....		75
FIGURA 36 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC NO PONTO 2, NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPG, EM pH 5, 6 E 7, À 20 ± 5 °C.....		76
FIGURA 37 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE HPMC EM AMP NO PONTO 2, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPG E COM ADIÇÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE KCI 60 mmol L^{-1} , À 20 ± 5 °C, EM pH 5,5.....		78
FIGURA 38 - CURVA DE VISCOSIDADE DA AMP 10 % (m m^{-1}) E HPMC 2 % (m m^{-1}) PUROS E COM NPG 1 % (m m^{-1}) À 25 °C.....		79

FIGURA 39 - CURVAS DE AMPLITUDE PARA O HPMC 2 % (m m ⁻¹) E AMP 10 % (m m ⁻¹) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE NPG 1 % (m m ⁻¹) À 25 °C. AS REGIÕES EM CINZA REPRESENTAM A REGIÃO VISCOELÁSTICA LINEAR DETERMINADA PARA AS AMOSTRAS.	81
FIGURA 40 - RAMPA DE TEMPERATURA DO HPMC A 2 % (m m ⁻¹) NA AUSÊNCIA (a E b) E NA PRESENÇA DE NPG A 1 % (m m ⁻¹) (c E d). AS FIGURAS a E c REPRESENTAM AS CURVAS DE AQUECIMENTO E AS FIGURAS b E d REPRESENTAM AS CURVAS DE RESFRIAMENTO.	82
FIGURA 41 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA ANTES (a E c) DE DEPOIS (b E d) DAS RAMPAS DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO PARA O POLÍMERO HPMC 2 % (m m ⁻¹) EM ÁGUA (a E b) E NA PRESENÇA DE NPG A 1 % (m m ⁻¹) (c E d).....	84
FIGURA 42 - RAMPA DE TEMPERATURA DA AMP A 10 % (m m ⁻¹) NA AUSÊNCIA (a E b) E NA PRESENÇA DE NPG A 1 % (m m ⁻¹) (c E d). AS FIGURAS 33a E 33c REPRESENTAM AS CURVAS DE AQUECIMENTO E AS FIGURAS 33b E 33d REPRESENTAM AS CURVAS DE RESFRIAMENTO.	85
FIGURA 43 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA ANTES (a E c) E DEPOIS (b E d) DAS RAMPAS DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO PARA O POLÍMERO AMP 10 % (m m ⁻¹) EM ÁGUA (a E b) E NA PRESENÇA DE NPG A 1 % (m m ⁻¹) (c E d).	86
FIGURA 44 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PREFERÊNCIA DE MOLHABILIDADE DA NPG PELA FASE DISPERSA DE AMP.....	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	EMULSÕES	17
3.1.1	Emulsões água-em-água	23
3.2	POLÍMEROS	27
3.2.1	Amilopectina.....	28
3.2.2	Hidroxipropilmetilcelulose.....	29
3.2.3	Gliadina	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	MATERIAIS	35
4.2	EXTRAÇÃO DA GLIADINA	35
4.3	PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS.....	35
4.4	PREPARO DOS POLISSACARÍDEOS	36
4.4.1	HPMC	36
4.4.2	AMP	36
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	37
4.5.1	Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).....	37
4.5.1.1	Polissacarídeos em água ultrapura	37
4.5.1.2	Polissacarídeos após separação de fases	376
4.5.2	Caracterização das NPG.....	38
4.6	CONSTRUÇÃO DE DIAGRAMAS DE FASE	39
4.7	PREPARO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES	41
4.7.1	Preparo das emulsões.....	41
4.7.2	Avaliação macroscópica e microscópica	42
4.7.2.1	Avaliação da estabilidade por microscopia confocal	43
4.8	AVALIAÇÃO REOLÓGICA DA INTERAÇÃO POLÍMERO-NANOPARTÍCULA	43
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS PURIFICADOS	45
5.1.1	Caracterização da AMP	45
5.1.2	Caracterização do HPMC	46
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	47
5.2.1	Morfologia.....	48
5.2.2	Potencial zeta	50
5.2.3	Tamanho e Índice de Polidispersão	53
5.3	CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES	58
5.4	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DAS EMULSÕES	62
5.4.1	Influência da adição de fluoróforos sobre a separação de fases.....	62
5.4.2	Emulsões preparadas no Ponto 1 do Diagrama de fases	63
5.4.3	Emulsões preparadas no Ponto 2 do Diagrama de fases	71
5.5	AVALIAÇÃO REOLÓGICA DA INTERAÇÃO POLÍMERO-NANOPARTÍCULA	79
6	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICE 1.....	99

1 INTRODUÇÃO

As emulsões têm desempenhado um papel significativo ao longo da história da ciência e da indústria, representando sistemas coloidais nos quais gotículas líquidas e/ou cristais líquidos estão dispersos em outro líquido, sendo ambos imiscíveis. Desde os primeiros estudos sobre emulsificação até os avanços modernos em estabilização e formulação, esses sistemas complexos são essenciais em uma ampla gama de aplicações industriais, incluindo alimentos, cosméticos, farmacêuticos e agroindustriais.

Dentro da classificação das emulsões, destacam-se as emulsões água-em-água (A/A), que se distinguem pela presença de duas fases poliméricas aquosas imiscíveis. Esta categoria, considerada não convencional, apresenta propriedades únicas que a torna extremamente interessante para aplicações industriais. Além de serem biodegradáveis e biocompatíveis, as emulsões A/A são livres de óleo e surfactantes, oferecendo uma alternativa promissora aos sistemas convencionais.

Na indústria alimentícia, por exemplo, as emulsões A/A podem ser utilizadas como modificadores sensoriais, melhorando não apenas a textura e a estabilidade dos produtos, mas também sua aceitação pelo consumidor. Da mesma forma, no campo biomédico, essas emulsões representam uma ferramenta valiosa, servindo como matrizes para o cultivo celular 3D, onde proporcionam um ambiente compatível e eficiente para o crescimento celular, além de serem sistemas de encapsulação para agentes bioativos.

No entanto, a estabilização das emulsões A/A apresenta desafios significativos devido à sua interface mais espessa que em sistemas óleo-em-água, à baixa tensão interfacial, e praticamente a mesma constante dielétrica nas duas fases, o que impede sua estabilização por surfactantes convencionais. Uma solução para este problema é o uso de nanopartículas, que se adsorvem na interface líquido-líquido, criando uma barreira física que impede a coalescência das fases. Este fenômeno, conhecido como estabilização por efeito Pickering, tem sido amplamente estudado em emulsões óleo-em-água, destacando a necessidade de pesquisas adicionais relacionadas à estabilização de emulsões A/A.

Além dos desafios técnicos, é importante considerar o impacto ambiental e econômico das emulsões. À medida que a demanda por alternativas sustentáveis cresce, sistemas como as emulsões A/A ganham destaque devido à sua

biodegradabilidade e à redução do uso de óleo e substâncias químicas sintéticas, como surfactantes. Além disso, a maioria das pesquisas tem focado na utilização de proteínas de fonte animal (como proteínas do leite) para a estabilização de sistemas A/A, o que reforça a necessidade de pesquisas com nanopartículas de origem vegetal para estabilização de emulsões.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo investigar a capacidade das nanopartículas de proteína, especificamente a gliadina, na estabilização de emulsões A/A. O sistema de emulsão A/A será composto pelos biopolímeros amilopectina e hidroxipropilmetilcelulose. Até o momento, a capacidade de nanopartículas de gliadina promoverem estabilização foi reportada apenas para sistemas água-ar (espuma) e emulsões óleo-em-água, destacando a importância de pesquisas com emulsões do tipo A/A. Acredita-se que a natureza anfifílica e insolúvel em água da gliadina possa oferecer um potencial estabilizante significativo, proporcionando uma nova abordagem para o desenvolvimento de emulsões A/A estáveis, livres de surfactantes e de óleo.

Essa pesquisa não apenas contribuirá para o avanço do conhecimento científico sobre emulsões A/A, mas também abrirá novas possibilidades para aplicações industriais inovadoras e sustentáveis.

2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de nanopartículas de gliadina para estabilizar emulsões do tipo água-em-água, contendo amilopectina e hidroxipropilmetilcelulose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar nanopartículas de gliadina;
- Construir o diagrama de fases da mistura de polímeros amilopectina e hidroxipropilmetilcelulose;
- Analisar a estabilidade macroscópica e microscópica das emulsões formadas, na faixa de pH 5 a 7 e frente a adição de sal;
- Caracterizar o comportamento reológico dos polímeros na ausência e na presença de nanopartículas de gliadina.

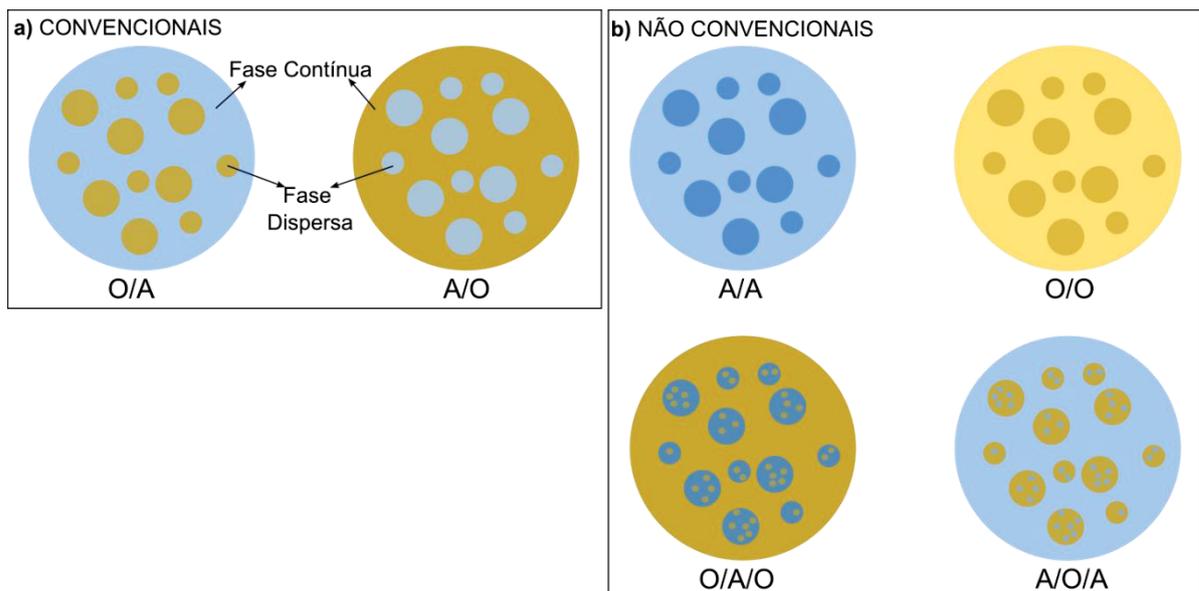
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EMULSÕES

Emulsões são descritas como sistemas coloidais em que uma fase líquida, ou um cristal líquido, está dispersa em outro líquido, sendo os dois líquidos imiscíveis, formando uma interface líquido-líquido (Schramm, 2005). Usualmente, o tamanho excede o limite coloidal (>1000 nm). Gotículas líquidas de uma fase representam a fase dispersa e estão inseridas na fase contínua do outro líquido, como representado na Figura 1a.

Usualmente, são classificadas quanto ao tipo de emulsão formada, sendo divididas em convencionais (Figura 1a) e não-convencionais (Figura 1b) (Hazt *et al.*, 2023). Considerando emulsões convencionais, dois tipos são mais comumente descritos: água-em-óleo (A/O) e óleo-em-água (O/A). Já para emulsões não convencionais, sistemas mais complexos são formados, encontrando emulsões óleo-em-óleo (O/O) e água-em-água (A/A), ou ainda emulsões múltiplas, como água-em-óleo-em-água (A/O/A) e óleo-em-água-em-óleo (O/A/O) (Silva; Loh, 2022).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TIPOS DE EMULSÕES CONVENCIONAIS (1a), NÃO CONVENCIONAIS (1b) E SEUS COMPONENTES (FASES DISPERSA E CONTÍNUA).



FONTE: O Autor (2024).

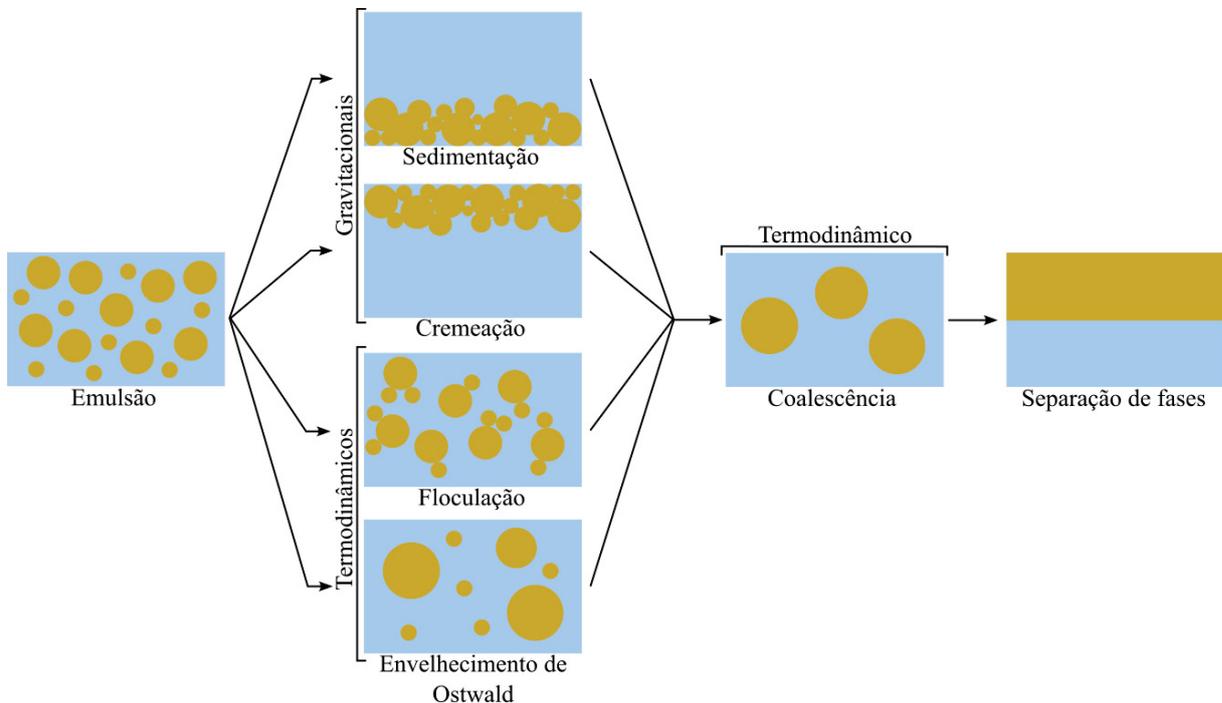
Quanto à estabilidade, emulsões são consideradas como dispersões termodinamicamente instáveis e sua instabilidade é relacionada a alguns fatores, como a diferença de densidade entre as fases ou à elevada tensão interfacial, que promovem a separação de fases, atingindo um estado energeticamente mais favorável (Cosgrove, 2010). Uma definição mais rigorosa sobre a estabilidade termodinâmica pode ser elucidada comparando a mudança de energia antes e depois da emulsificação, conforme equação 1.

$$\Delta G = \Delta A\gamma_{12} - T\Delta S \quad (1)$$

Para que uma emulsão seja considerada termodinamicamente estável, a energia livre de Gibbs (ΔG) deve ser negativa. O comportamento da energia livre da emulsão, para que sua formação seja espontânea, está associado à energia necessária para criar uma área de interface ($\Delta A\gamma_{12}$) e à entropia configuracional (ΔS), sob uma determinada temperatura (T). Quando energia é aplicada ao sistema, ocorre a emulsificação, resultando no aumento da área da interface, fazendo com que ΔG se torne positivo, ou seja instável termodinamicamente. Assim, as emulsões são mantidas em um estado chamado de meta-estabilidade, através de medidas para estabilizar as gotículas formadas através de uma estabilidade cinética, modulada por surfactantes moleculares, polímeros ou partículas. Na ausência de um estabilizante, as emulsões retornarão ao seu estado inicial, com a separação de fases. Nesta situação, o raio entre a fase dispersa e contínua tende ao infinito, promovendo a menor área de contato entre as fases, e conseqüentemente menor energia livre de Gibbs (McClements, 2015).

Compreender os fenômenos relacionados à instabilidade de emulsões é de suma importância tanto na área acadêmica quanto na industrial, pois permite a formulação de soluções que retardem o tempo de separação de fases. Os processos de instabilidade podem ser divididos em gravitacionais, como cremação e sedimentação, e termodinâmicos, como floculação, envelhecimento de *Ostwald* e coalescência, conforme mostrado pela Figura 2.

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS ASSOCIADOS À INSTABILIDADE DE EMULSÕES, SEPARANDO-OS EM GRAVITACIONAIS E TERMODINÂMICOS.



FONTE: Adaptado de Silva; Loh (2022).

A cremação e sedimentação ocorrem devido a atuação de forças da gravidade agindo sobre as gotas. De maneira geral, quando a fase dispersa possui densidade menor que a fase contínua, ocorre o fenômeno de cremação, com as gotículas tendendo a se mover para a parte de cima do recipiente que contém a emulsão. Quando o inverso acontece e a fase dispersa possui densidade maior que a fase contínua, as gotas tendem a se mover a parte inferior do recipiente, em um processo conhecido como sedimentação (Silva; Loh, 2022).

O fenômeno de floculação ocorre quando duas ou mais gotículas se associam, mantendo, porém, suas características individuais da interface. Dois fatores principais podem estar relacionados com a floculação: colisão e interações intermoleculares atrativas entre as gotas. A colisão pode ser em decorrência do movimento Browniano, forças gravitacionais ou forças mecânicas (McClements, 2015).

Quando o tamanho das gotículas aumenta ao longo do tempo, sem que haja coalescência, estamos diante do processo de envelhecimento de *Ostwald*. Esse fenômeno se baseia na diferença de pressão existente na interface líquido-líquido.

Nesse contexto, devido à maior pressão presente nas gotículas menores, ocorre a migração dos constituintes dessas gotículas em direção às gotas maiores, buscando reduzir a energia livre total do sistema (Cosgrove, 2010).

Já a coalescência é um processo termodinamicamente espontâneo, e ocorre quando duas ou mais gotas se unem em uma única gotícula. Em situações em que não há estabilização da emulsão, a coalescência persistirá até a completa separação de fases dos líquidos (Tadros, 2009).

É possível formar emulsões que permanecem cineticamente estáveis, meta-estáveis, por longos períodos, variando de dias a anos, utilizando substâncias conhecidas como emulsificantes. Emulsificantes podem ser surfactantes, polímeros ou partículas, que serão adsorvidos na interface líquido-líquido. Os surfactantes não iônicos são responsáveis pela diminuição da tensão interfacial elevada de emulsões, que gira em torno de 30 mN m^{-1} para emulsões O/A de acordo com Esquena (2016), e por impedimento estérico, impedindo a coalescência das gotas. Adicionalmente, surfactantes iônicos estabilizam emulsões através de repulsão eletrostática (Schramm, 2014).

Quando partículas sólidas são adsorvidas na interface líquido-líquido, há um aumento na estabilidade cinética de emulsões, formam-se as chamadas emulsões de Pickering. O primeiro pesquisador a observar esse fenômeno foi Ramsden em 1904, quando descreveu a adsorção mecânica de agregados de proteínas em interfaces líquido-ar e líquido-líquido. No entanto, o mecanismo de estabilização ganhou maior notoriedade em 1907, com as pesquisas de Pickering, a quem é atribuída até hoje a estabilização por partículas sólidas (Binks; Horozov, 2006).

A adsorção de partículas sólidas na interface líquido-líquido requer a molhabilidade parcial da partícula pelas duas fases. Um parâmetro importante para determinar o tipo de emulsão que será formada é o ângulo de contato trifásico (θ), medido na superfície entre a partícula sólida e um dos líquidos (usualmente o mais polar) (Figura 3). Seguindo a regra de Finkle, em ângulos entre $0^\circ < \theta \leq 90^\circ$, a partícula prefere ser molhada pela fase aquosa, resultando na formação de emulsões do tipo O/A. Já para ângulos entre $90^\circ \leq \theta < 180^\circ$, formam-se emulsões A/O, devido à preferência da partícula pela fase oleosa (Chevalier; Bolzinger, 2013).

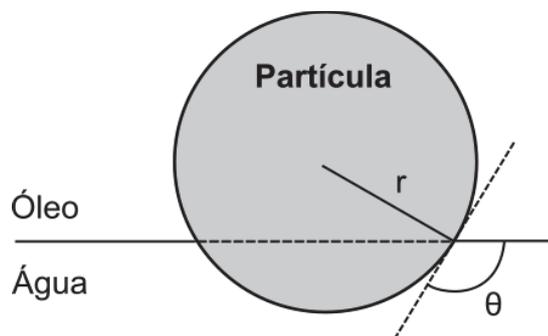
Outro parâmetro relevante para emulsões de Pickering é a energia de desorção das partículas da interface (ΔG_d), que representa a energia necessária para remover uma partícula esférica da interface líquido-líquido, mostrado na

Equação 2. ΔG_d está relacionado ao raio da partícula (r), ao ângulo de contato trifásico (θ) e a tensão interfacial entre as fases (γ).

Entende-se que a energia mínima necessária para remover uma partícula da interface aumenta de forma diretamente proporcional ao tamanho da partícula. Assim, devido à alta energia de dessorção, considera-se que a adsorção de partículas seja irreversível (Albert *et al.*, 2019). Para que uma partícula esteja fortemente adsorvida na interface líquida, a magnitude da variação da energia livre de dessorção deve ser significativamente superior à energia térmica ($\Delta G_d > kT$). Essa condição é facilmente satisfeita em emulsões O/A com partículas pequenas (na ordem nanométrica); no entanto, o mesmo não ocorre para emulsões A/A (Dickinson, 2019).

$$\Delta G_d = \pi r^2 \gamma (1 - |\cos \theta|)^2 \quad (2)$$

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE PARTÍCULA SÓLIDA NA INTERFACE ÓLEO-ÁGUA COM ÂNGULO DE CONTATO θ .



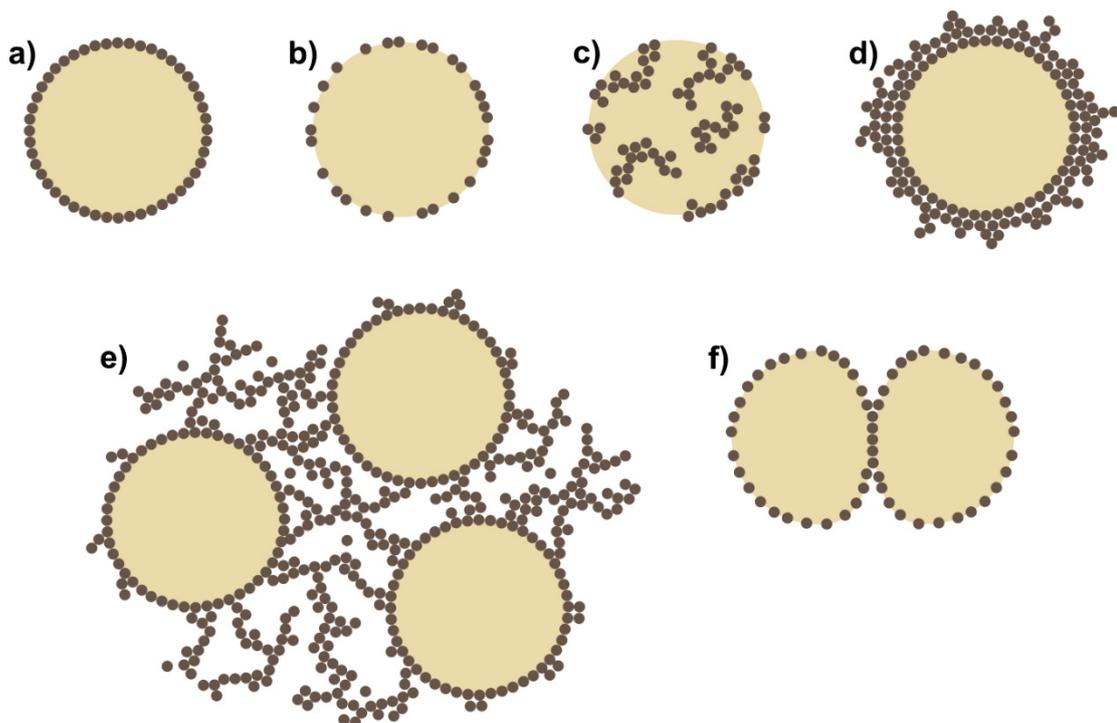
FONTE: Adaptado de Binks; Horozov (2006).

Diferentes tipos de partículas sólidas podem ser usadas na estabilização de emulsões de Pickering, e o mecanismo pelo qual se organizam na interface para promover estabilidade pode variar entre elas, conforme apresentado na Figura 4. Energeticamente falando, a organização de uma monocamada de partículas na interface (Figura 4a) é a situação mais favorável, pois diminui o contato entre as fases. No entanto, para partículas carregadas, as organizações mostradas nas Figuras 4b e 4c são mais comumente encontradas, devido à possível repulsão eletrostática entre as partículas. Esse tipo de organização promove a estabilização da emulsão devido à repulsão eletrostática entre as gotas, e permite a formação de

“pontes” entre gotículas (Figura 4f) sem que haja coalescência (Binks; Horozov, 2006).

Com excesso de partículas no sistema, a emulsão também pode passar a ser estabilizada por múltiplas camadas de partículas (Figura 4d) ou pela formação de redes de partículas na fase contínua (Figura 4e), podendo induzir a geleificação da fase. A geleificação da fase continua pode ser também um mecanismo de estabilização, pois diminui a movimentação das gotículas no meio, reduzindo a velocidade de coalescência (Aveyard; Binks; Clint, 2003).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS DE ESTABILIZAÇÃO EM EMULSÕES DE PICKERING. SEPARANDO A ADSORÇÃO DE PARTÍCULAS NA INTERFACE EM FORMAÇÃO DE MONOCAMADA (4a), NÃO RECOBRIMENTO COMPLETO DA INTERFACE (4b E c), MÚLTIPLAS CAMADAS (4d), FORMAÇÃO DE REDE DE PARTÍCULAS (4e) E FORMAÇÃO DE PONTES DE PARTÍCULAS ENTRE GOTAS (4f).



FONTE: Adaptado de Robin *et al.* (2022).

A morfologia das partículas também é um fator que deve ser levado em consideração na estabilização por efeito Pickering. Por exemplo, Pires *et al.* (2023) observou que a estabilização de emulsões A/A com nanocristais de celulose de diferentes morfologias ocorreu através da geleificação da fase contínua para nanocristais de celulose sulfatados, enquanto a estabilização por Pickering foi

observada para nanocristais de celulose fosfatados. Cabe ressaltar que no trabalho um ponto ainda mais importante que a morfologia das partículas, foi a cristalinidade das mesmas. Pires *et al.* (2023) também avaliou os alomorfos da celulose e seu impacto sobre a interação com as fases e o mecanismo de estabilização das emulsões. Observou que a celulose tipo I é muito mais hidrofílica que a celulose tipo II, que interagia e gelificava a fase contínua de xiloglucana. Enquanto a celulose tipo II promoveu a estabilização das emulsões por efeito Pickering.

O efeito da morfologia das partículas também foi avaliado por Hazt (2022), que utilizou microgéis e nanofibrilas de β -lactoglobulina na estabilização de emulsões de amilopectina e xiloglucana. Foi observado que a β -lactoglobulina em forma de nanofibrilas estabilizou a emulsão por efeito Pickering em uma faixa de pH maior e por um período mais longo.

Pensando na fonte de obtenção, partículas sólidas usadas no desenvolvimento de emulsões de Pickering podem ser divididas em duas categorias principais: partículas inorgânicas e orgânicas. Com relação às partículas inorgânicas, dois trabalhos do grupo BioPol destacam-se. Do Amaral *et al.* (2023), mostrou a formação de emulsões de Pickering entre o óleo de silicone e óleo de rícino, usando hidróxidos duplos lamelares para estabilização. Para o mesmo sistema de óleo, emulsões estáveis por mais que 30 dias foram formadas na presença de caulinita, revelando-se uma promissora partícula sustentável e ecológica (Sieben *et al.*, 2023).

Já partículas orgânicas incluem proteínas de origem animal, como a β -lactoglobulina (De Freitas *et al.*, 2016) ou de origem vegetal, como a gliadina (Xu *et al.*, 2022) e a zeína (De Folter; Van Ruijven; Velikov, 2012). Também fazem parte dessa classe os polissacarídeos, como a celulose (Pires *et al.*, 2023) e gorduras (Li *et al.*, 2020). As partículas orgânicas têm surgido como uma área de pesquisa interessante devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade e bioacessibilidade.

3.1.1 Emulsões água-em-água

Emulsões água-em-água (A/A) são sistemas bifásicos compostos por duas fases aquosas imiscíveis, formadas a partir de misturas de pelo menos duas moléculas solúveis em água, mas incompatíveis entre si quando em solução. A

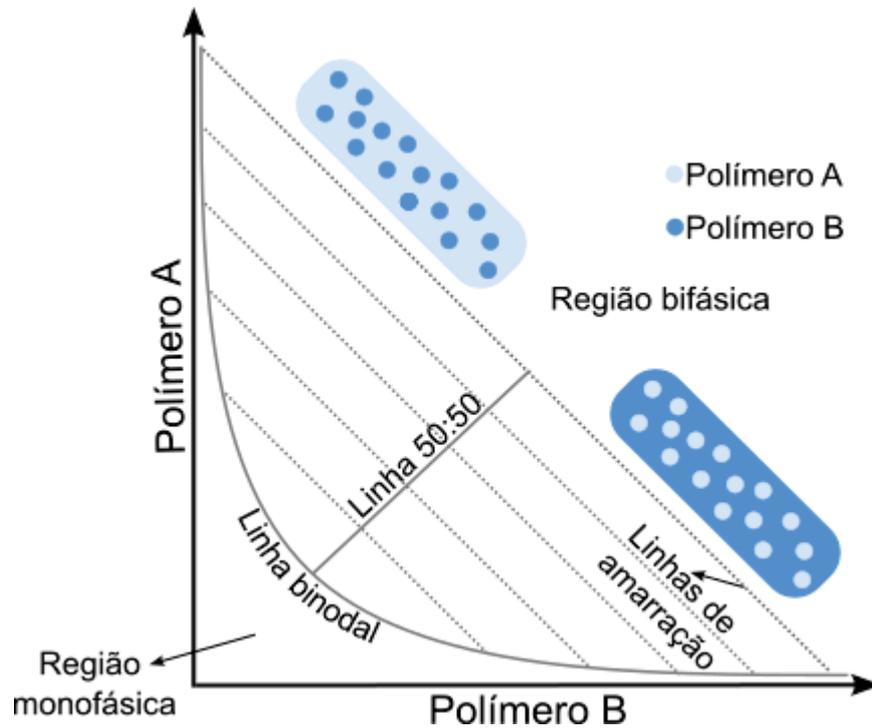
separação de fase de misturas aquosas pode ser encontrada em diferentes tipos de sistemas, como polímeros, polímeros e surfactantes, polímeros e eletrólitos e soluções de surfactantes. Emulsões A/A foram reportadas pela primeira vez em 1896, quando Beijerinck observou a formação de gotículas com a mistura de dispersões de amido e gelatina (Esquena, 2016).

A separação de fases em emulsões A/A ocorre principalmente devido à incompatibilidade termodinâmica na combinação de polímeros hidrofílicos. A separação de fases para esses sistemas pode ser associativa ou segregativa, dependendo da forma de interação entre os polímeros e do polímero com a água. A separação associativa ocorre quando há formação de uma fase rica em ambos os polímeros hidrofílicos, com sobrenadante com baixa quantidade residual dos polímeros. Por outro lado, na separação segregativa, a partir de uma concentração mínima, duas fases são formadas, sendo cada uma delas rica em um dos componentes (Brooks; Sharp; Fisher, 1985).

A condição de separação de fases também varia de acordo com as propriedades dos polímeros usados, como massa molar e conformação de molécula, outras variáveis referentes a solução também devem ser levadas em consideração como, pH, força iônica e temperatura (Capron; Costeux; Djabourov, 2001). O pH da solução regula a distribuição de cargas nas moléculas. De forma geral, quanto maior a carga líquida do polímero menor a tendência à separação de fases. A força iônica intervém na separação de fases ao blindar as interações repulsivas entre os polímeros carregados. A temperatura, por sua vez, influencia na qualidade do solvente, afetando o estado conformacional dos biopolímeros e o equilíbrio das forças intermoleculares (Dickinson, 2019).

A emulsão A/A será formada quando energia for aplicada ao sistema, como agitação mecânica, por exemplo. A fase com menor fração volumétrica se tornará a fase dispersa, enquanto a fase com maior fração volumétrica se tornará a fase contínua. Uma ferramenta essencial para o trabalho com emulsões A/A é a determinação do diagrama de fases (Figura 5). O diagrama de fases delimita as faixas de trabalho para uma mistura única de polímeros. Vale ressaltar que o diagrama de fases não é estabelecido universalmente e precisa ser reelaborado a cada nova condição experimental (Hatti-Kaul, 2000).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DIAGRAMA DE FASES BINÁRIO DE MISTURA POLIMÉRICA HIDROFÍLICA COM SEPARAÇÃO DE FASES SEGREGATIVA.



FONTE: Adaptado de Hazt (2022).

Duas regiões distintas podem ser encontradas na Figura 5: a região monofásica e a região bifásica, separadas pela linha binodal. Abaixo dessa linha, a concentração de polímeros não é suficiente para observar a separação macroscópica das fases. Um parâmetro importante quando se trabalha com emulsões A/A é a tensão interfacial, que pode ser modulada de acordo com a concentração de polímeros usada na mistura. No diagrama de fases, as linhas de amarração ou do inglês *tie-lines* (linhas pontilhadas) representam as fases em equilíbrio termodinâmico, com tensões interfaciais equivalentes ao longo da mesma linha de amarração. Dependendo da condição de trabalho, emulsões com o polímero A ou B como fase contínua podem ser formadas (Hatti-Kaul, 2000).

Quando nenhum mecanismo é utilizado para estabilizar cineticamente as emulsões A/A, a separação de fase ocorre dentro de poucas horas. Porém, a manutenção da metaestabilidade de emulsões A/A, ao contrário de emulsões O/A, não pode ser realizada por surfactantes moleculares, devido a dois fatores principais. O primeiro é a tensão interfacial extremamente baixa de sistemas aquosos bifásicos, usualmente abaixo de $10^{-2} \text{ mN m}^{-1}$, comparativamente muito mais baixa que a tensão de emulsões O/A (30 mN m^{-1}). A segunda, se deve a maior

espessura da interface, que impede a adsorção de moléculas pequenas (Esquena, 2016).

Nos últimos anos, a busca por mecanismos de estabilização de emulsões A/A tem atraído a atenção de pesquisadores. Uma abordagem para estabilizar esses sistemas é a utilização de partículas sólidas adsorvidas na interface líquido-líquido, como nas emulsões de Pickering. A estabilização de emulsões A/A, especialmente usando polímeros e partículas biocompatíveis que mimetizam sistemas biológicos, permite sua aplicação em formulações cosméticas, farmacêuticas e alimentícias.

Emulsões A/A de maltodextrina em hidroxipropilmetilcelulose, estabilizadas com celulose microcristalina, foram reportadas por Zhang *et al.* (2024). O sistema foi utilizado para dois fins: microcultivo e encapsulação de *Lactobacillus helveticus*. Resultados promissores foram encontrados, pois observou-se que o microrganismo não influenciou a estabilidade da emulsão ao longo do tempo e foi encapsulado com sucesso, preferindo a fase interna de maltodextrina. Resultados preliminares apontaram que emulsões A/A podem ser usadas futuramente para encapsulação e proteção de probióticos em alimentos.

Em alimentos, o baixo coeficiente de atrito de emulsões A/A, pode ser uma característica relevante no controle da sensação de algumas formulações alimentícias na boca. You, Murray e Sarkar (2023), estudaram as propriedades tribológicas e reológicas de emulsões de amido de milho gelatinizado e carragenana estabilizada com *whey protein*. Foram investigadas as características tribológicas e reológicas de emulsões contendo amido de milho gelatinizado e carragenana estabilizadas com proteína de soro de leite, demonstrando que a estabilização da emulsão A/A por meio de partículas de proteína de soro de leite influenciou a viscosidade aparente do sistema. Essa modificação pode estar diretamente associada à percepção oral da emulsão, especialmente durante as fases iniciais do processo de consumo.

O baixo coeficiente de fricção também é um parâmetro importante na área médica, especialmente para a locomoção diária, pois relaciona-se com a lubrificação de articulações. Posto isso, Wang *et al.* (2022), estudaram a aplicação de emulsões A/A como sistemas biolubrificantes. Em sua pesquisa, foi demonstrado que emulsões de dextrana e polietilenoglicol (PEG) estabilizada com nanofibrilas de colágeno podem ser uma ótima alternativa no tratamento de osteoartrite, como sistemas protetores atóxicos na lubrificação de articulações.

Além disso, emulsões livres de óleo têm atraído atenção em campos da biologia celular e biotecnologia, principalmente para isolar proteínas (Da Silva *et al.*, 2015), partículas de vírus (Ladd Effio *et al.*, 2015), anticorpos (Capela *et al.*, 2019) e hormônios (Li *et al.*, 2015). Foi relatado também o uso de sistemas A/A, na indústria farmacêutica, para a produção de coloidossomos, na liberação controlada de drogas (Poortinga, 2008).

Para formação das emulsões A/A são necessários polímeros hidrossolúveis para a composição das fases. Assim, será apresentada uma descrição sobre polímeros, principalmente os biopolímeros utilizados neste trabalho para composição das fases e da partícula sólida.

3.2 POLÍMEROS

Polímeros são macromoléculas formadas por longas cadeias de unidades repetitivas chamadas monômeros, que podem ser idênticos, formando homopolímeros, ou diferentes, resultando em copolímeros. Estas estruturas podem ser de origem natural, como a celulose, ou sintética, como o polietileno e o nylon. Polímeros naturais frequentemente consistem em mais de 10^6 monômeros, enquanto os polímeros sintéticos geralmente contêm até 10^5 monômeros. A diversidade na composição e na estrutura dos polímeros confere-lhes uma ampla gama de propriedades físicas e químicas, tornando-os materiais extremamente versáteis para inúmeras aplicações industriais e tecnológicas (Cosgrove, 2010).

Novas alternativas para o uso de polímeros sintéticos, especialmente os derivados do petróleo, têm sido intensamente pesquisadas devido aos significativos impactos ambientais associados a esses materiais, o que fundamenta a busca por sistemas verdes, biodegradáveis, seguros, biocompatíveis e provenientes de fontes renováveis. Uma classe de materiais que atende a essas características são os biopolímeros. Biopolímeros são uma classe de polímeros sintetizados por organismos vivos, como algas, plantas ou animais (Ilic-stojanovic; Nikolic; Cakic, 2023).

Três biopolímeros vegetais foram selecionados para integrar este estudo: a amilopectina e a hidroxipropilmetilcelulose, que atuam como componentes da emulsão água-em-água, e a gliadina, utilizada como fonte para a produção de nanopartículas estabilizadoras da emulsão.

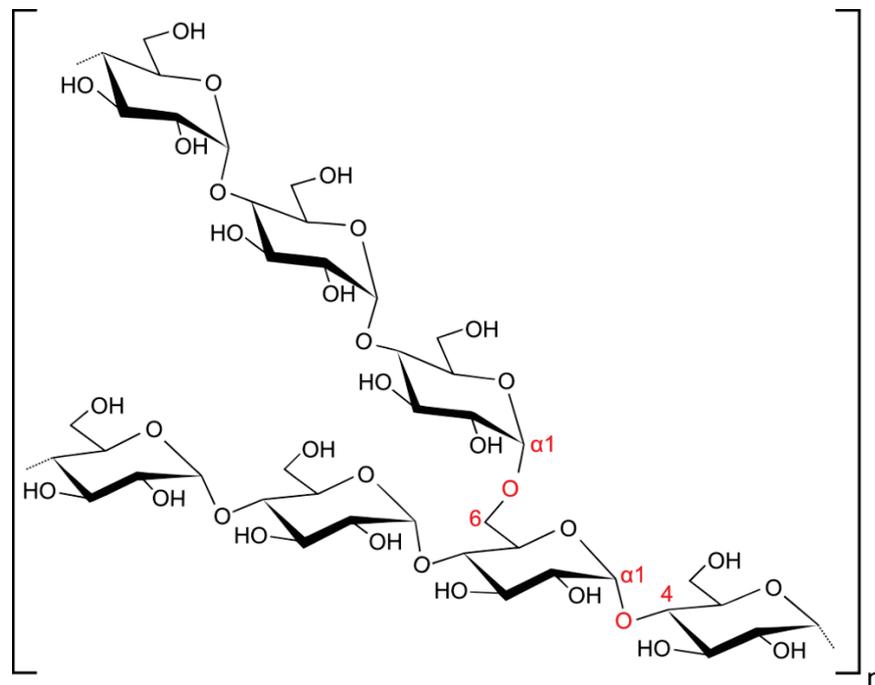
3.2.1 Amilopectina

O amido é o carboidrato de reserva mais abundante na Terra, sintetizado principalmente pelas plantas. Este material versátil é amplamente utilizado na indústria, especialmente na de alimentos, devido ao seu baixo custo, biodegradabilidade e propriedades atóxicas. Além disso, sua abundância é uma vantagem significativa, podendo ser extraído de diversas fontes, como milho, batata, arroz, soja, mandioca, entre outros. O amido tem atraído significativa atenção como uma nova fonte para a produção de bioplásticos. Além disso, polímeros derivados do amido estão sendo utilizados em implantes ortopédicos, substituições ósseas e liberação controlada de fármacos. No setor alimentício, seu uso está sendo investigado para a produção de embalagens biodegradáveis (Falua *et al.*, 2022).

O amido é composto por dois polímeros: amilopectina (AMP) e amilose. A proporção entre AMP e amilose varia entre as plantas, mas, em geral, a AMP está presente em maior quantidade. A AMP tem cadeia principal constituída por unidades de α -D-glucopiranosose, conectados por ligações 1 \rightarrow 4 e ligações 1 \rightarrow 6, que formam suas ramificações. Dois alomorfos principais foram reportados, tipo A e tipo B, além do alomorfo tipo C, formado a partir da junção dos alomorfos A e B (Apriyanto; Compart; Fettke, 2022). A estrutura da AMP pode ser vista na Figura 6.

O uso da AMP na sua forma nativa ou modificada foi relatado como agente floculante para remoção de carvão (Patra *et al.*, 2020), na encapsulação de curcumina (Zhu *et al.*, 2016) e como solidificante para contenção de derramamento de óleo em ambiente aquático (Motta; Stoyanov; Soares, 2019). Emulsões A/A com a presença de AMP em uma das fases foram relatadas por De Freitas *et al.* (2016), Machado *et al.* (2022), Meng, Nicol e Nicolai (2022), Hazt (2022), Pires *et al.* (2023), Moutkane, Benyahia e Nicolai (2023) e Chen *et al.* (2023).

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA AMILOPECTINA. N É O NÚMERO DE UNIDADES REPETITIVAS. EM VERMELHO DESTACAM-SE AS LIGAÇÕES $\alpha 1 \rightarrow 4$ E $\alpha 1 \rightarrow 6$.

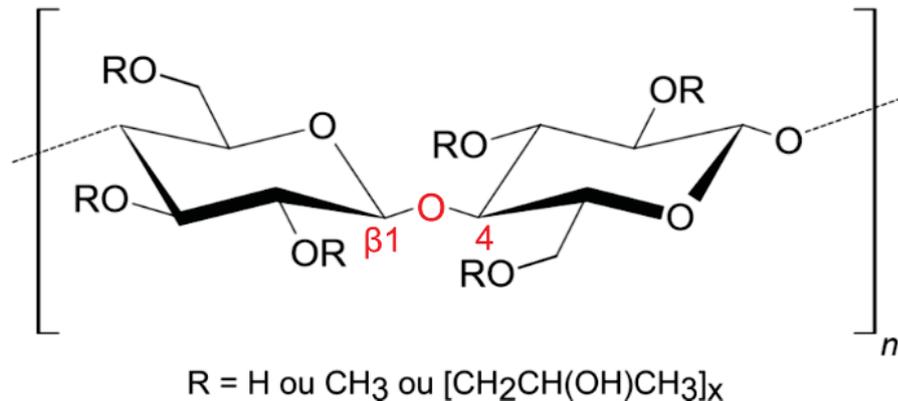


FONTE: Adaptado de Bergthaller; Hollmann (2014).

3.2.2 Hidroxipropilmetilcelulose

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), também conhecida como hipromelose, é um polímero semissintético derivado de celulose, composto por unidades de D-glucopiranosose, unidas por ligações $\beta (1 \rightarrow 4)$, parcialmente O-metilado (OCH_3) ou O-hidroxipropilado ($\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$). O HPMC está disponível comercialmente com diferentes razões de substituição, que conferem aos polímeros características distintas a respeito da solubilidade, temperatura de geleificação, grau de inchamento, difusão e taxa de liberação de drogas (Brady *et al.*, 2017). A estrutura do HPMC pode ser vista na Figura 7.

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MERO DO HPMC. ONDE N É O NÚMERO DE UNIDADES REPETITIVAS. EM VERMELHO DESTACA-SE A LIGAÇÃO $\beta 1 \rightarrow 4$.



FONTE: Adaptado de Bodvik *et al.* (2010).

O HPMC é caracterizado por ser um pó insípido e inodoro, solúvel em água. Sua solubilidade não é afetada pelo pH ou força iônica do meio, por ser um polímero não iônico. No entanto, sua solubilidade em água aumenta em baixas temperaturas e diminui sob aquecimento. Esse comportamento deve-se à formação de ligações de hidrogênio da água com os grupamentos hidroxipropílicos e espécies de *clusters* de água ao redor dos grupamentos metílicos hidrofóbicos. Com o aumento da temperatura, as ligações de hidrogênio são enfraquecidas e os *clusters* de água são quebrados, expondo os grupamentos metílicos ao meio, promovendo interações hidrofóbicas (Tundisi *et al.*, 2021).

Atualmente, o HPMC é amplamente utilizado na indústria, devido à sua excelente biocompatibilidade, degradabilidade, solubilidade em água e propriedades reológicas. Na indústria farmacêutica, é empregado em formulações oftálmicas, como sistemas de liberação de fármacos e como enxerto em tecidos (Hadinugroho *et al.*, 2023; Hwang *et al.*, 2023; Tundisi *et al.*, 2021).

Emulsões A/A usando como uma das fases o polímero HPMC foram relatadas por Esteghlal *et al.* (2016) e Zhang *et al.* (2024). Zhang *et al.* (2021), formulou emulsões de HPMC e dextrana estabilizadas com microgéis de β -lactoglobulina. Emulsões estáveis foram formadas em pH abaixo de 5 e na presença de até 300 mM de NaCl. Além disso, as emulsões não foram afetadas pelo aquecimento a 90°C.

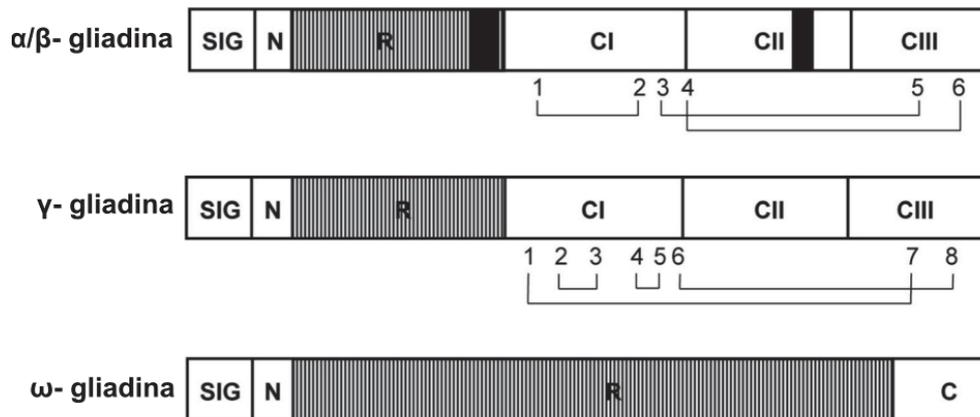
3.2.3 Gliadina

A gliadina, uma das proteínas constituintes do glúten, representa até 50% da sua composição total (Sapirstein; Fu, 1998). O glúten é formado durante o processamento da farinha de trigo, pela combinação das proteínas gliadina e glutenina com a água. Nas propriedades reológicas da massa de pão, atribui-se à gliadina a característica de conferir viscosidade, enquanto à glutenina se atribuem a elasticidade e a força (Barak; Mudgil; Khatkar, 2015).

A gliadina é composta por uma cadeia única, formada por polipeptídeos unidos por ligações peptídicas, que interagem por ligações dissulfeto, formando sua estrutura tridimensional. Em relação à sua estrutura primária, a gliadina consiste em um domínio central hidrofílico, composto por unidades repetitivas de aminoácidos. A unidade repetitiva é rica especialmente nos aminoácidos glutamina e prolina, o que faz com que a gliadina se encaixe na classe de proteínas denominadas prolaminas. Os dois domínios terminais, por sua vez, são caracterizados por altos níveis de aminoácidos hidrofóbicos (Thewissen *et al.*, 2011). De acordo com sua mobilidade eletroforética, pode ser dividida em três subfrações: α/β -, γ - e ω -, com tamanhos de 25-35 kg mol⁻¹, 35-40 kg mol⁻¹ e 55-70 kg mol⁻¹, respectivamente (Mehanna; Mneimneh, 2020; Voci; Fresta; Cosco, 2021).

As subfrações α/β e γ diferem da subfração ω principalmente pela presença de resíduos de cisteína na região C-terminal. Esses resíduos formam ligações dissulfeto, o que provavelmente lhes confere maior estabilidade (Urade; Sato; Sugiyama, 2018). A Figura 8 mostra uma representação esquemática das subfrações de gliadina, com os números representando os resíduos de cisteína unidos por ligações dissulfeto.

FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA α/β -, γ - E ω - GLIADINA. OS NÚMEROS NA PORÇÃO C-TERMINAL REPRESENTAM OS RESÍDUOS DE CISTEÍNA UNIDOS POR LIGAÇÕES DISSUFETO.



FONTE: Adaptado de Urade; Sato; Sugiyama (2018).

Quanto a sua solubilidade, a gliadina pode ser definida como uma proteína do trigo solúvel em soluções alcoólicas, geralmente acima de 70%, mas insolúvel em água e soluções salinas. Usualmente, sua solubilidade em solução alcoólica é usada para fazer a extração da gliadina da farinha de trigo, visto que a glutenina é solúvel em água. Porém, alguns autores relataram que obtiveram sucesso na extração da gliadina usando apenas uma solução aquosa de NaCl 0,5 M (Urade; Sato; Sugiyama, 2018). As propriedades estruturais da gliadina podem variar dependendo da variante de trigo, pH e protocolo de extração (Rani *et al.*, 2023).

As proteínas demonstram um elevado potencial de aplicação na indústria devido à sua baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, são facilmente extraídas e possuem um valor nutricional significativo (Niroula *et al.*, 2021). A gliadina, por possuir propriedades mucoadesivas, se torna uma grande aliada na liberação controlada de fármacos, podendo ser amplamente empregadas no desenvolvimento de produtos verdes (Arangoa *et al.*, 2000).

Graças à sua natureza anfifílica, a gliadina demonstra um comportamento intrínseco de auto-organização em solução. Por consequência, a técnica de nanoprecipitação emerge como a abordagem primordial na produção de nanopartículas de gliadina (NPG). No processo típico de nanoprecipitação, a gliadina é solubilizada em um bom solvente (usualmente etanol 70%) e é gotejada sobre um antisolvente, a água, em diferentes concentrações e velocidades de gotejamento. A

formação de nanopartículas ocorre quando o soluto entra em contato com o antisolvente (Li *et al.*, 2023).

Um dos primeiros trabalhos a relatar o uso de NPG para carreamento de fármacos foi o de Ezpeleta *et al.* (1996), que produziu nanopartículas em torno de 500 nm para a encapsulação de ácido trans-retinoico. Desde então, diversas outras moléculas foram encapsuladas, como β -caroteno (Cheng *et al.*, 2020), curcumina (Wang *et al.*, 2019), vitamina C (Voci *et al.*, 2022), amoxicilina (Umamaheshwari; Ramteke; Jain, 2004) e anfotericina B (Marcano *et al.*, 2024).

Além de seu uso na encapsulação de fármacos e ingredientes funcionais, as NPG têm sido amplamente investigadas na estabilização da interface água-ar para a formação de espumas. As espumas são componentes essenciais de muitos alimentos processados, como chantilly, mousses e cervejas. A estabilização desses sistemas por meio de partículas proteicas biodegradáveis e não tóxicas está se tornando uma área de pesquisa altamente promissora, principalmente devido à propriedade irreversível dessas proteínas de se adsorverem na interface, diminuindo a tensão superficial e aumentando a formação de espuma (Damodaran, 2005).

As propriedades de superfície e de formação de espumas com NPG dependem de condições ambientais como pH, temperatura e força iônica. Peng *et al.* (2017, 2018) demonstraram que a formação e a estabilidade de espumas produzidas com NPG ocorrem com concentrações extremamente baixas de partículas (1 mg mL^{-1}). Além disso, espumas mais estáveis foram formadas em pH próximo ao ponto isoelétrico da gliadina (5-5,8) e não foram afetadas pelo aumento da temperatura. A maior estabilidade de espumas formadas em pH 6 pode estar relacionada a formação de uma rede de proteínas conectadas por ligações dissulfeto na interface (Wouters; Joye; Delcour, 2020).

Por fim, a utilização de NPG também foi relatada na estabilização de emulsões do tipo O/A. Wang *et al.* (2020), observou que emulsões O/A estabilizadas com NPG são formadas a partir de baixas concentrações de partícula, mas são mais estáveis quando fabricadas com concentrações maiores de 2 % (m v^{-1}). Além disso, também foi relatado que a deaminação da gliadina em 5,7 % produziu emulsões mais estáveis por até 7 dias, provavelmente associada a maior hidrofobicidade de superfície da NPG causada pela deaminação. Outros autores também relataram a formação de emulsões O/A estáveis através da modificação ou associação de NPG com outras moléculas, como: quitosana (Li *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019), etil

celulose (Zhou *et al.*, 2023), polissacarídeo da soja (Shen *et al.*, 2022) e goma arábica (Ma *et al.*, 2020).

A estabilidade de emulsões A/A é um tema de interesse crescente devido às suas potenciais aplicações em uma variedade de campos, incluindo alimentos, cosméticos e farmacêutica. As emulsões A/A oferecem vantagens únicas, como a ausência de óleo, surfactantes e a capacidade de encapsular compostos de diferentes solubilidades. No entanto, a estabilidade dessas emulsões é frequentemente desafiadora devido à tendência de separarem fase rapidamente.

Por ser uma molécula anfifílica e insolúvel em água, acredita-se que as NPG possuem alto potencial estabilizante em emulsões de Pickering do tipo A/A, provavelmente devido a repulsão eletrostática ou estérica que ocorre entre as nanopartículas de gliadina. Até o momento, não foram encontradas pesquisas que relatassem a estabilização de emulsões A/A com NPG.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A gliadina foi extraída da farinha de glúten, obtida em comércio local, da marca Linea Verde Alimentos LTDA. O polímero HPMC, grau farmacêutico, utilizado foi fornecido pela empresa MCQuímica Importação e Exportação LTDA (São Paulo, Brasil) (Lote: 200641). A AMP (Lote: BCBV5057) e os fluoróforos rodamina b e isotiocianato de fluoresceína foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil). O solvente etanol (pureza 99% v v⁻¹) foi obtido da empresa da ilha (Almirante Tamandaré, Brasil). A água ultrapurificada com resistividade elétrica de 18,2 MΩ cm foi obtida por ultrapurificação em equipamento MilliQ® (Millipore, EUA).

4.2 EXTRAÇÃO DA GLIADINA

A metodologia de extração da gliadina foi adaptada de Van Den Broeck *et al.* (2009). Para tal, 100 g de farinha de glúten foi disperso em 500 mL de isopropanol 50 % (v v⁻¹). A mistura permaneceu sob agitação magnética à 700 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente (20 °C). A suspensão foi centrifugada (8500 rpm, por 20 minutos) e o sobrenadante recolhido.

O isopropanol foi removido por evaporação à 50 °C em equipamento CentriVap® e a gliadina foi liofilizada, em liofilizador Virtis modelo Advantage Plus, antes do uso. Por fim, o pó liofilizado foi pesado, resultando no rendimento de 26 % (m m⁻¹). O processo de retirada de isopropanol e liofilização foram realizados pelo Centro de Estudos em Biofarmácia (CEB-UFPR), do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

4.3 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas de gliadina (NPG) foram preparadas utilizando a técnica de nanoprecipitação, conforme descrito por Wouters; Joye; Delcour (2020), com algumas adaptações. Uma solução estoque de gliadina a 5 % (m v⁻¹) foi obtida pela

dispersão da gliadina liofilizada em etanol 70 % (v v⁻¹), agitando-se por 24 horas à temperatura ambiente.

Da solução estoque, 15 mL foram gotejados sobre 55 mL de água ultrapura em um período de 10 segundos, mantendo-se sob agitação magnética constante, a temperatura ambiente (20 °C). O pH da dispersão foi reduzido para 4 mediante adição de uma solução aquosa de HCl 0,1 mol L⁻¹, seguido da remoção do etanol por rotaevaporação a 55 °C.

Após a eliminação do etanol, o pH foi ajustado novamente para 5, desta vez utilizando uma solução aquosa de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Destaca-se que o ajuste de pH antes da rotaevaporação foi necessário devido à propensão da dispersão a precipitar e formar uma substância viscosa no fundo do balão quando em pH 5. A concentração final da dispersão de NPG foi calculada por gravimetria, experimento feito em triplicata, resultando na concentração média de $1,07 \pm 0,04$ % (m m⁻¹).

4.4 PREPARO DOS POLISSACARÍDEOS

4.4.1 HPMC

O polímero HPMC, grau farmacêutico, foi preparado em água ultrapura, em dispersões estoque com concentração de 2 % (m m⁻¹), na presença de 200 ppm de solução aquosa de azida sódica (NaN₃) como conservante. A dispersão permaneceu em agitação magnética por 24 horas a temperatura ambiente antes da sua utilização.

4.4.2 AMP

A AMP foi purificada pela dispersão em uma mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) e água na proporção de 95:5 (v v⁻¹), na concentração de 50 g L⁻¹ em agitação magnética por 48 h. Após centrifugação a 10⁴ g por 30 minutos e 20 °C, o polissacarídeo foi precipitado através da adição de 3 volumes de etanol a 99 % (v v⁻¹), sob agitação mecânica constante. A AMP purificada foi então filtrada sob vácuo, lavada com etanol 99 % (v v⁻¹), e depois acetona PA, para total remoção de água. Por fim, foi seca em estufa a vácuo a 40 °C.

Dispersões estoque de AMP purificada foram preparadas em água ultrapura, com concentração de 10 % ($m\ m^{-1}$), na presença de 200 ppm de NaN_3 como conservante. A dispersão permaneceu em agitação magnética por 24 horas a temperatura ambiente antes da sua utilização.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

4.5.1 Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

4.5.1.1 Polissacarídeos em água ultrapura

A caracterização dos polissacarídeos puros foram realizados pelo Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas, do Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná. Os polissacarídeos AMP e HPMC foram caracterizados por cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês *size exclusion chromatography* - SEC). Foi utilizado a técnica de espalhamento estático de luz laser multiângulo (LS - DSP-F, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, EUA) e detectores de índice de refração (RI - Waters 2410, Milford, MA, EUA). A cromatografia foi realizada em sistema Waters, contendo quatro colunas de permeação em gel embaladas com Ultrahidrogel® 2000, 500, 250 e 120, conectadas em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e $5 \times 10^3\ g\ mol^{-1}$, respectivamente.

O eluente usado foi uma solução aquosa de nitrato de sódio ($NaNO_3$) $0,1\ mol\ L^{-1}$ contendo $0,5\ g\ L^{-1}$ de NaN_3 na vazão de $0,6\ mL\ min^{-1}$ a $25\ ^\circ C$. As amostras foram previamente filtradas em membrana MF-Millipore de éster de celulose com poros de diâmetro de $0,22\ \mu m$. O volume de injeção foi de $100\ \mu L$ e as amostras foram preparadas na própria fase móvel em concentração de na concentração de $2\ mg\ mL^{-1}$.

Os valores da relação dn/dc foram usados conforme determinados em literatura. Para a amilopectina foi usado o valor de $0,146\ mL\ g^{-1}$ (Hatz, 2022) e para a hidroxipropilmetilcelulose foi usado o valor de $0,140\ mL\ g^{-1}$ (Li *et al.*, 2016). A normalização do equipamento foi realizada utilizando o método de multi-detectores (homopolímeros), com um padrão de poli(óxido de etileno) (PEO) de $M_w = 20\ kg\ mol^{-1}$.

¹, $\bar{D}=1.05$. Os perfis de eluição obtidos foram coletados e processados no *software* Wyatt Technology ASTRA (versão 4.70.07), para a obtenção dos valores de VE (volume de eluição), M_w (massa molar média-ponderal), M_n (massa molar média em número), \bar{D} (dispersão) e R_{gw} (raio de giro ponderal médio).

4.5.1.2 Polissacarídeos após separação de fases

Para confirmação da separação de fases completa, os polissacarídeos componentes da emulsão foram analisados por SEC. O sistema é composto por uma bomba de fluxo e um sistema desgaseificador (VE 7510 e VE 1122 – Viscotek, Reino Unido), coluna de polimetacrilato da Shodex OHpak SB-806HQ (limite de exclusão da coluna de 20.000.000 g mol⁻¹), acoplada a um aparelho Viscotek (VE 3210 UV/Vis) com detector de UV-Vis ajustado para 280 nm, detectores do índice de refração (RI), índice viscosimétrico (η) e espalhamento de luz a ângulos 7 e 90° (LALS e RALS).

Para tal, a fase móvel utilizada é composta por NaNO₃ a 0,1 mol L⁻¹ na presença de 0,02 % (m v⁻¹) de NaN₃, a um fluxo de 0,4 mL min⁻¹. Os polissacarídeos da emulsão foram diluídos a uma concentração de 1 mg mL⁻¹ na própria fase móvel, e filtrado em membrana MF-Millipore™ de éster de celulose com poros de diâmetro de 0,45 e 0,22 μ m. Foi utilizado um volume de injeção foi de 300 μ L com um loop de 100 μ L.

A calibração do equipamento foi realizada utilizando o método de multi-detectores (homopolímeros), com um padrão de poli(óxido de etileno) (PEO) de $M_w = 24$ kg mol⁻¹, $\bar{D}=1.05$, Viscotek PolyCAL™) e checada com dois outros padrões: PEO com $M_w = 236$ kg mol⁻¹ e 250 kg mol⁻¹, ambos da Viscotek PolyCAL™. Os perfis de eluição obtidos foram tratados no *software* OmniSEC (versão 5.10.461).

4.5.2 Caracterização das NPG

As nanopartículas produzidas foram caracterizadas quanto à sua morfologia através de microscopia de força atômica (MFA). Nela, 20 μ L da dispersão de partículas à 1,0 % (m v⁻¹), diluído 1:100 em água ultrapura, foi depositado no centro de substratos de mica recém clivada (2x2 cm). A mica foi seca por duas técnicas, a

fim de comparação: secagem em estufa a 40 °C *overnight* ou secagem por fluxo de nitrogênio, e as amostras não apresentaram diferenças quando aplicadas por qualquer uma das técnicas citadas.

As imagens foram obtidas em um microscópio de força atômica 5500 (N9410S) da Agilent Technologies, utilizando cantilever NSC15/AIBS, com constante de força de 40 N m⁻¹ e frequência de 320 KHz, no modo *tapping*. As imagens foram adquiridas utilizando o *software* Picoview 14 e tratadas no *software* Gwyddion 2.51 (Czech Metrology Institute).

O raio hidrodinâmico das partículas foi avaliado através de espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering* – DLS) em Zetasizer Nano Series ZS (ZEN3600 – Malvern Instruments and PANalytical), $\lambda = 632,8$ nm e fotodetectores a 13° e 173°. O experimento foi realizado em triplicata.

A determinação do ponto isoelétrico foi feita frente a caracterização do potencial zeta, utilizando o equipamento Stabino Particle Charge Mapping (PMX 400 – Particle Metrix) com eletrodo de pH (Malvern Instruments MV 114-SC SEN0106). Para tal, foi preparado uma dispersão aquosa de NPG à 0,1 % (m m⁻¹) em KCl 10 mmol L⁻¹, que foi titulada de pH 4 a 9,5 com soluções aquosas de NaOH ou HCl 0,05 mol L⁻¹ para ajuste do pH. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 CONSTRUÇÃO DE DIAGRAMAS DE FASE

A construção do diagrama de fases foi realizada para os materiais HPMC e AMP, seguindo metodologia semelhante à adotada por De Freitas *et al.* (2016) para a xiloglucana de Jatobá com AMP. A partir de dispersões estoque de 10 % (m m⁻¹) de AMP e 2 % (m m⁻¹) de HPMC, com 200 ppm de NaN₃, misturas com as concentrações apresentadas na Tabela 1 foram preparadas. Além disso, tubos adicionais foram preparados com quantidades crescentes de polímeros foram preparados para obtenção da linha binodal.

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS USADOS NA CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES.

Emulsão	AMP % (m m ⁻¹)	HPMC % (m m ⁻¹)
1	5,107	1,005
2	4,837	0,955
3	4,597	0,905
4	4,337	0,854
5	4,087	0,805
6	3,835	0,753
7	3,572	0,703
8	3,322	0,654
9	3,065	0,603
10	2,810	0,552
11	2,557	0,502
12	2,312	0,453
13	2,040	0,402
14	1,790	0,352
15	1,532	0,302
16	1,287	0,251
17	1,022	0,202
18	0,767	0,151
19	0,515	0,101
20	0,280	0,149

FONTE: O autor (2024).

Cada tubo foi misturado em vórtex (PhoenixTM AT56) por 1 minuto. Os tubos foram posicionados lado a lado para acompanhamento macroscópico da separação de fases. Após 96 horas, fotos de cada tubo foram tiradas e a altura das fases inferior e superior foram medidas utilizando *software* ImageJ.

A fim de confirmar a completa separação de fases, utilizando uma seringa com agulha, as fases superior e inferior do tubo 10 foram coletadas (através de diluição na fase móvel e quantificação por SEC – como descrito no item 4.4.1.2 – pág. 36).

Os cálculos de concentração foram realizados acompanhando a altura de separação de fases nos tubos, após conferir o perfil de eluição que cada uma das fases (superior e inferior) se encontra pura.

A densidade das dispersões estoque dos polímeros HPMC 2 % (m m^{-1}) e AMP 10 % (m m^{-1}) em água foi determinada em picnômetro de 1 mL a temperatura ambiente. O experimento foi feito em triplicata.

4.7 PREPARO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES

4.7.1 Preparo das emulsões

As emulsões foram preparadas em 2 diferentes pontos dos diagramas de fases construído, ou seja, com diferentes proporções de HMPC e AMP. Além dos polímeros, a fim de se evitar crescimento microbiano, as emulsões também continham 200 ppm de NaN_3 .

Os dois pontos para teste foram escolhidos conforme avaliação do diagrama de fases e seguem a linha de amarração construída a partir do tubo 10. O primeiro ponto (Ponto 1) continha as concentrações de 1,26 % (m m^{-1}) e 0,77 % (m m^{-1}) para AMP e HPMC, respectivamente. No segundo ponto (Ponto 2), os polímeros estavam nas concentrações de 4,62 % (m m^{-1}) e 0,29 % (m m^{-1}) para AMP e HPMC, respectivamente.

Mantendo a concentração dos polímeros constante e um volume final da emulsão de 4 mL, 8 tubos com concentrações de NPG de 0-1 % (m m^{-1}) foram preparados para cada ponto do diagrama de fases, conforme a Tabela 2 abaixo. Cada tubo foi agitado em vórtex durante 1 minuto e permaneceram em repouso sob superfície plana em temperatura ambiente para acompanhamento macroscópico da separação de fases.

TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES HPMC, AMP E NPG USADAS NO PREPARO DAS EMULSÕES.

Amostra	HPMC % (m m ⁻¹)	AMP % (m m ⁻¹)	NPG % (m m ⁻¹)
Branco 1	0,77	1,26	0
1.0,05	0,77	1,26	0,05
1.0,1	0,77	1,26	0,1
1.0,2	0,77	1,26	0,2
1.0,3	0,77	1,26	0,3
1.0,5	0,77	1,26	0,5
1.0,75	0,77	1,26	0,75
1.1,0	0,77	1,26	1,0
Branco 2	0,29	4,62	0
2.0,05	0,29	4,62	0,05
2.0,1	0,29	4,62	0,1
2.0,2	0,29	4,62	0,2
2.0,3	0,29	4,62	0,3
2.0,5	0,29	4,62	0,5
2.0,75	0,29	4,62	0,75
2.1,0	0,29	4,62	1,0

FONTE: O autor (2024).

4.7.2 Avaliação macroscópica e microscópica

Na avaliação macroscópica da estabilidade das emulsões, fotos foram tiradas em diferentes tempos (0, 1, 24 horas, 5, 15 e 35 dias).

Para a avaliação, por microscopia confocal, as nanopartículas foram marcadas com o corante fluorescente rodamina à 5 ppm para que a migração das partículas para a interface possa ser acompanhada e diferentes mecanismos de estabilização para partículas distintas possam ser observados.

A marcação química da AMP com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (AMP-FITC) também foi necessária para avaliação por microscopia confocal. Para essa marcação, a metodologia descrita por De Belder e Granath (1973) foi seguida. Nela, 1 g do polímero AMP foi dissolvido em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) na presença de 2 gotas de piridina. O isotiocianato de fluoresceína foi então adicionado (0,1 g), seguido pelo dilaurato de dibutilina (20 mg). A mistura foi aquecida a 95°C por 2 horas e precipitada em etanol 99 % (v v⁻¹). Posteriormente, o precipitado foi filtrado sob vácuo e lavado com etanol 99 % (v v⁻¹) e acetona PA, a fim de se

remover o corante livre. Por fim, foi seco em estufa a vácuo a 40°C, com rendimento de 0,9 g.

4.7.2.1 Avaliação da estabilidade por microscopia confocal

As partículas utilizadas nas emulsões foram as NPG, com concentrações de até 1,0 % (m m⁻¹) de partículas em relação à emulsão. Após 1 minuto de agitação em Vórtex, as emulsões fluorescentes foram transferidas para uma placa de cultura de célula, de fundo de vidro Greiner Bio-one para microscopia de varredura confocal a laser (*confocal laser scanning microscopy* – CLSM).

As análises de microscopia confocal foram realizadas no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência, da Universidade Federal do Paraná. Para tal, foi utilizado o microscópio Nikon Ti com comprimentos de onda de excitação de 488 nm, 561 nm e filtros de emissão de 525/50 nm, 595/50 nm, para o isotiocianato de fluoresceína e rodamina, respectivamente. As imagens foram obtidas em aumentos de 20x e 60x no *software* NIS-Elements Analysis 4.20 e processadas no Fiji (ImageJ).

O diâmetro de 100 gotículas de cada amostra analisada foi medido com o *software* Fiji (ImageJ). Considerando que o diâmetro das gotículas medido é uma variável contínua, para montagem do histograma de distribuição de frequência do diâmetro das gotículas, o número de classes (k) e a amplitude de classes (h) foi calculado conforme as Equações 3 e 4, respectivamente. Nas equações, n representa o número total de observações e α , a amplitude total das observações, definida como a diferença entre o maior e o menor valores observados.

$$k = 1 + 3,32 \log n \quad (3)$$

$$h = \frac{\alpha}{k} \quad (4)$$

4.8 AVALIAÇÃO REOLÓGICA DA INTERAÇÃO POLÍMERO-NANOPARTÍCULA

A caracterização reológica da interação dos polissacarídeos com as nanopartículas proteicas de gliadina foi realizada utilizando o equipamento reômetro

HR-10 Discovery Hybrid Rheometer, TA Instruments (New Castle, DE, USA). A geometria utilizada foi a geometria de cone (2°) e placa, com diâmetro de 40 mm, ângulo de $1,99639^\circ$ e *gap* de 300 μm . A fim de evitar evaporação foi utilizado o sistema de *solvent trap*.

Foram realizados experimentos dinâmico-oscilatórios e de viscosidade com os polissacarídeos na ausência e na presença de NPG. Para cada polímero, duas dispersões foram preparadas: em água e em NPG. Dispersões estoque de HPMC foram preparadas a 2 % (m m^{-1}) do polímero em água e outra em 1 % (m m^{-1}) de NPG. O mesmo foi realizado para a AMP, onde preparou-se dispersões estoque de 10 % (m m^{-1}) em água e outra em 1 % (m m^{-1}) de NPG.

Para determinação da região viscoelástica linear, a varredura de amplitude foi realizada em 25°C , com frequência constante (1 Hz) e tensão de cisalhamento de 0,01 a 100 Pa. Medições de viscosidade foram determinadas através de curvas de fluxo com taxas de cisalhamento de 1 a 1000 s^{-1} . A varredura de frequência em tensão dentro da faixa de viscoelasticidade linear foi realizada de 0,1 a 10 Hz. Além disso, experimentos de oscilação de temperatura foram realizados, dentro da região viscoelástica linear, à 1 Hz, com faixa de temperatura de $25\text{-}75^\circ\text{C}$, com incrementos de temperatura de $2,5^\circ\text{C min}^{-1}$.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados pertinentes foi feita utilizando o software Minitab[®] 19.1, aplicando ANOVA de um fator com o pós-teste de Tukey. Os resultados foram representados na forma de média \pm desvio padrão e foram realizados em triplicata. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

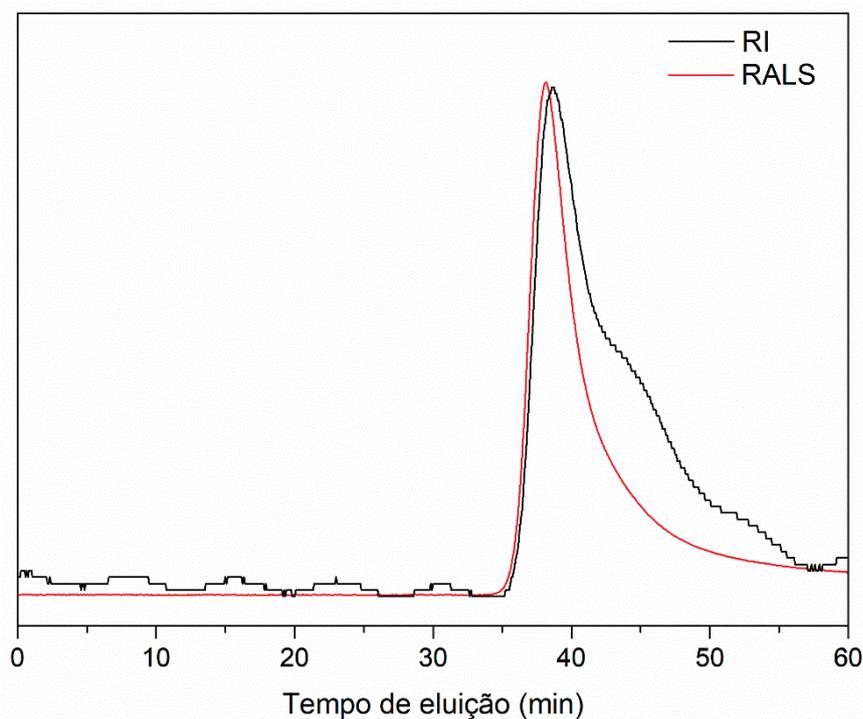
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS PURIFICADOS

5.1.1 Caracterização da AMP

Conforme argumentado por Hazt (2022), torna-se imprescindível purificar a AMP devido à presença de grânulos amido na amostra comercial, o qual poderia ocasionar interferências nos resultados subsequentes desta investigação. Dessa forma, foram adicionadas etapas de purificação da APM, conforme descritos no item 4.3.1.

O perfil de eluição da APM purificada pode ser observado na Figura 9.

FIGURA 9 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA AMP PURIFICADA, USANDO FASE MÓVEL DE NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ COM $0,5 \text{ g L}^{-1}$ NaN_3 A UM FLUXO DE $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ A $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



FONTE: O autor (2024).

A análise por SEC permitiu obter o perfil de distribuição molecular da AMP. Conforme relatado por Lin *et al.* (2019), a AMP é um polissacarídeo que apresenta polidispersão, sendo relatados a presença de AMP de cadeia ramificada curta e AMP de cadeia ramificada longa. Ainda, algumas AMP apresentam cadeias

ramificadas extralongas, similares à cadeia de amilose. Conforme determinado experimentalmente, a AMP purificada apresentou tempo de eluição entre 35 e 57 minutos, com pico único observado pelo detector RALS. No detector de RI também foi observado um pico único com formação de ombros a direita, provavelmente provenientes de porções da amostra de AMP de cadeia ramificada mais curta. O perfil de eluição da AMP foi compatível com os perfis de eluição de Kobayashi, Schwartz e Lineback (1985) e Zhu *et al.* (2020), para AMP extraída do amido de milho e do arroz, respectivamente. As massas molares, \bar{D} e o raio de giro ponderal médio (R_{gw}) são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - PARÂMETROS MACROMOLECULARES DA AMP PURIFICADA.

Parâmetros	AMP
$M_n / \text{g mol}^{-1}$	$1,80 \times 10^7$
$M_w / \text{g mol}^{-1}$	$1,99 \times 10^7$
$\bar{D} (M_w/M_n)$	$1,11 \pm 0,07$
R_{gw} / nm	87,2

FONTE: O autor (2024).

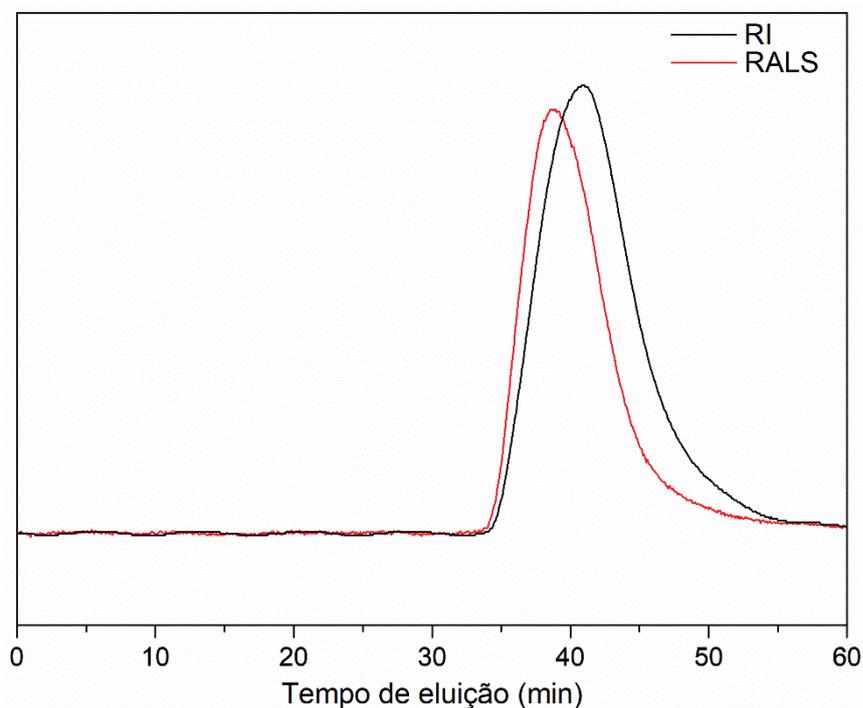
5.1.2 Caracterização do HPMC

A caracterização do HPMC por análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN) foi realizado pela Dra. Franciely Colodi. O HPMC utilizado neste trabalho apresentou grau de substituição total de 0,47, com porcentagem de substituição de 15,7 %. O grau de substituição por grupos metil foi de 0,35 e dos grupos hidroxipropil foi de 0,12. Os resultados detalhados encontram-se no Apêndice 1.

Conforme caracterização por SEC, o tempo de eluição para o HPMC está entre 35 e 55 minutos, conforme visualizado na Figura 10. Um pico único pode ser visto através dos detectores de RI e RALS, sugerindo a presença de uma única população homogênea de HPMC.

Na Tabela 4, encontram-se as informações macromoleculares do HPMC. A massa molar do HPMC foi de $4,79 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$. As informações macromoleculares do HPMC usado neste trabalho são comparáveis com outros HPMC comerciais encontrados (Jumel *et al.*, 1996; Keary, 2001; Li *et al.*, 2016; Schagerlof *et al.*, 2006).

FIGURA 10 – PERFIL DE ELUIÇÃO DO HPMC, USANDO FASE MÓVEL DE NaNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ COM $0,5 \text{ g L}^{-1}$ NaN_3 A UM FLUXO DE $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ A $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



FONTE: O autor (2024).

TABELA 4 - PARÂMETROS MACROMOLECULARES DO HPMC.

Parâmetros	HPMC
$M_n / \text{g mol}^{-1}$	$4,79 \times 10^5$
$M_w / \text{g mol}^{-1}$	$6,02 \times 10^5$
$\bar{D} (M_w/M_n)$	$1,47 \pm 0,12$
R_{gw} / nm	75,2

FONTE: O autor (2024).

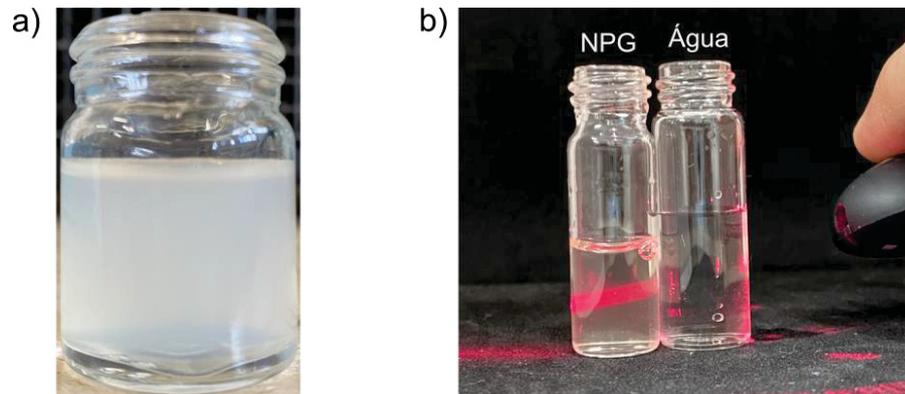
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

Macroscopicamente, a dispersão de NPG a 1 % (m m^{-1}) apresenta coloração branco-amarelada, opaca e homogênea. Mesmo após armazenamento, não houve mudança macroscópica na dispersão, indicando estabilidade das nanopartículas. A Figura 11a mostra a dispersão após o preparo.

Adicionalmente, um feixe de laser foi passado pela amostra, buscando evidenciar o efeito Tyndall, como observado na Figura 11b. A observação do efeito Tyndall em amostras indica a presença de dispersões coloidais. O efeito Tyndall é um fenômeno óptico provocado pela dispersão da luz em partículas coloidais,

permitindo a visualização do rastro visível do laser no interior do frasco que contém a amostra.

FIGURA 11 - APRESENTAÇÃO MACROSCÓPICA DA DISPERSÃO DE NPG À 1 % ($m m^{-1}$) NO PRIMEIRO DIA DE PREPARO (11a). EM 11b EVIDENCIA-SE O EFEITO TYNDALL SOBRE NPG DILUÍDA 1:100 EM ÁGUA.



FONTE: O autor (2024).

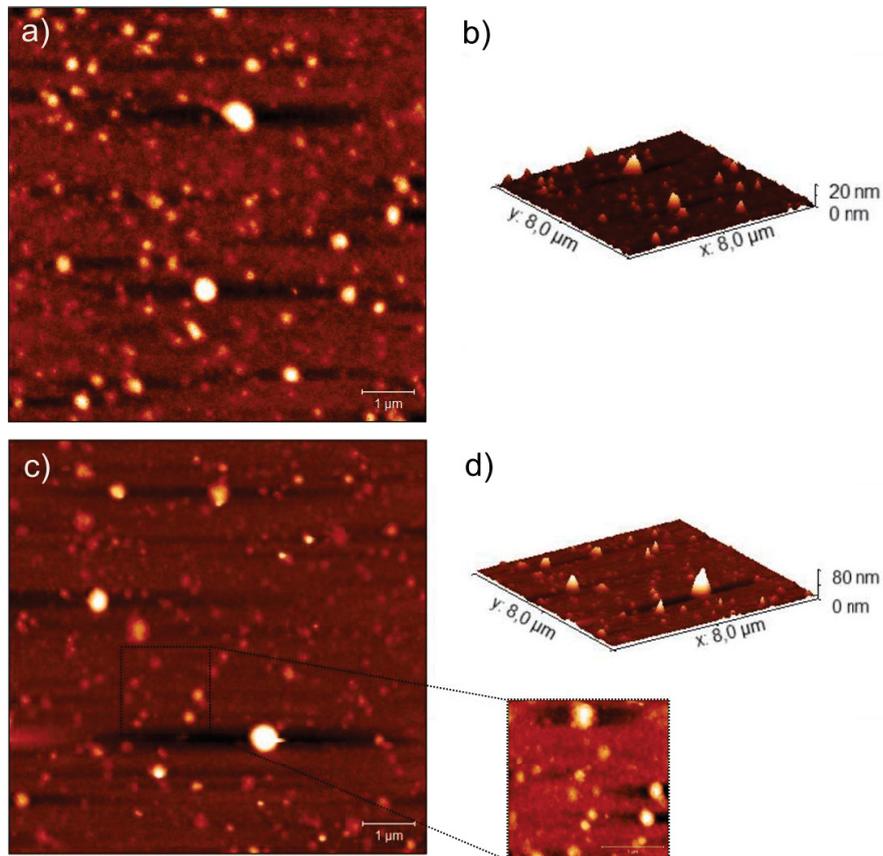
5.2.1 Morfologia

A técnica de AFM é de grande valia quando se deseja fazer a caracterização morfológica de partículas em escala nanométrica, pois fornece imagens topográficas de superfície, escaneando-a com uma *probe* (Krieg *et al.*, 2019).

A imagem topográfica das NPG em pH 5, obtida por microscopia de força atômica, pode ser visualizada na Figura 12. Nota-se que as NPG são partículas quase-esféricas e semelhantes entre si, com uma população homogênea. Nota-se também a presença de alguns aglomerados, tanto na Figura 12a quanto na Figura 12b, entre 300-600 nm.

A título de comparação, a secagem das nanopartículas sobre a superfície da mica se deu de duas formas, em estufa a 40 °C (Figuras 12a e 12b) e em fluxo de gás nitrogênio (Figura 12c e 12d).

FIGURA 12 - IMAGEM DE TOPOGRAFIA OBTIDA POR AFM, EM MODO DE CONTATO INTERMITENTE, DA NPG EM pH 5 EM SUPERFÍCIE DE MICA – 8X8 μM , SECA EM ESTUFA À 40 °C (a E b) E SOB FLUXO DE GÁS NITROGÊNIO (c E d).

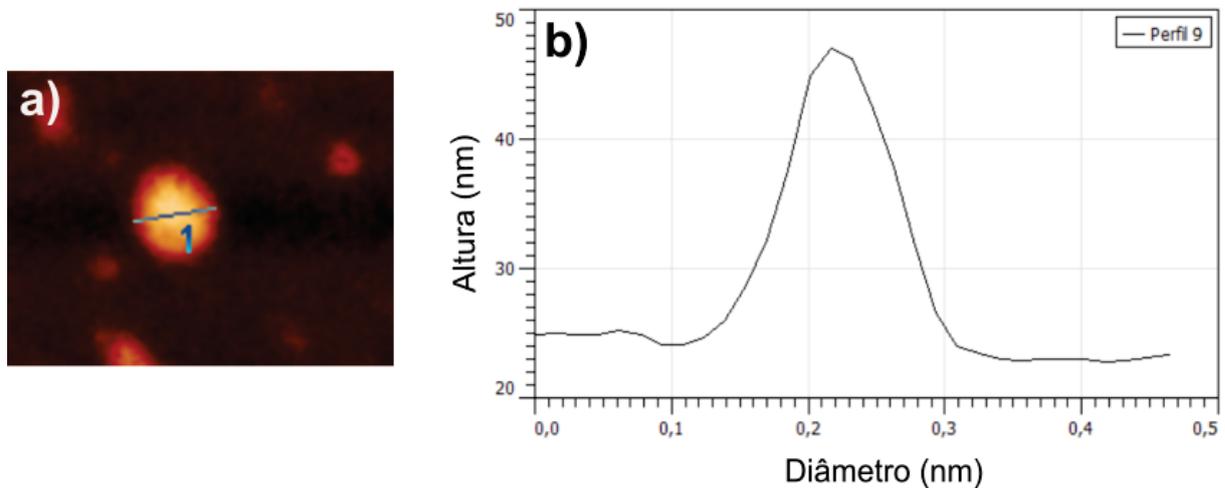


FONTE: O autor (2024).

Conforme visto acima, o método de secagem das partículas sobre a mica não influencia o resultado morfológico observado, uma vez que ambas as imagens apresentam partículas quase-esféricas, diferenciando-se apenas na altura da população de partículas. A presença de maiores aglomerados na Figura 12a é provavelmente causada pelo efeito da temperatura, uma vez que as NPG tendem a agregar quando expostas a temperaturas superiores a 40 °C, conforme relatado por Joye, Nelis e McClements (2015).

O diâmetro médio e a altura média das NPG também foram determinados, para as duas formas de secagem. Os valores foram extraídos, traçando uma linha pela nanopartícula de uma extremidade a outra (Figura 13a), através de perfis de altura e comprimento, conforme mostrado na Figura 13b. O número de NPG medido foi igual a 100 para cada método.

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DA NPG.



FONTE: O autor (2024).

O diâmetro médio das nanopartículas secas em estufa foi de $289,9 \pm 112,4$ nm, já para as nanopartículas secas por fluxo de gás nitrogênio foi de $231,3 \pm 66,2$ nm. Resultados semelhantes foram descritos por Wu *et al.* (2018), que no mesmo pH encontrou partículas esféricas e de diâmetro médio de 190 ± 18 nm, com altura de 45,3 nm. Com relação à altura, as nanopartículas tiveram altura média de $14,1 \pm 9,5$ nm para mica seca em estufa e $13,3 \pm 7,7$ nm para mica seca sob fluxo de gás nitrogênio.

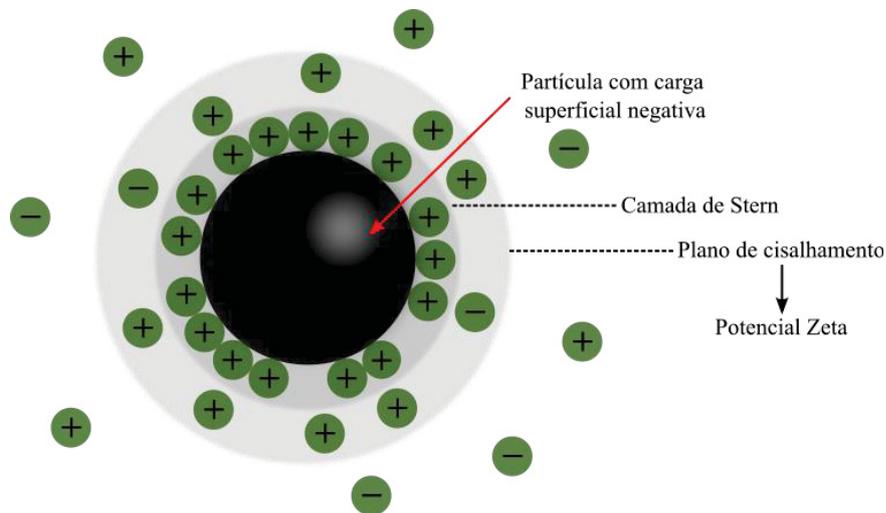
O fato das NPG não serem tão altas, quando comparado ao comprimento, pode ser explicado de 3 formas. A primeira é a atração das NPG com o substrato, que faz com que espalhem mais em sobre a mica. A segunda seria a possível perda de água das NPG devido ao processo de secagem e, por fim, o efeito de compressão da nanopartícula pela ponta do equipamento, que por serem partículas moles, acabam sendo “achatadas” durante a análise.

5.2.2 Potencial zeta

O potencial zeta é o potencial existente no plano hidrodinâmico de cisalhamento de uma partícula movendo-se sob um campo elétrico, medido na interface partícula-fluído (Figura 14). Para diversos autores, a determinação do potencial zeta em dispersões está intimamente relacionada a estabilidade coloidal. Valores de 0 a 10 mV indicam dispersões muito instáveis, 10 a 20 mV representam

dispersões relativamente estáveis, 20 a 30 mV indicam estabilidade moderada e valores superiores a 30 mV correspondem a dispersões muito estáveis. No entanto, a estabilidade coloidal depende da soma das forças atrativas de Van der Waals e das forças eletrostáticas repulsivas da dupla camada elétrica. Assim, entende-se que uma dispersão estável de nanopartículas pode ser formada mesmo com menores valores potencial zeta (Bhattacharjee, 2016).

FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DETERMINAÇÃO POTENCIAL ZETA NO PLANO DE CISCALHAMENTO.



FONTE: O autor (2024).

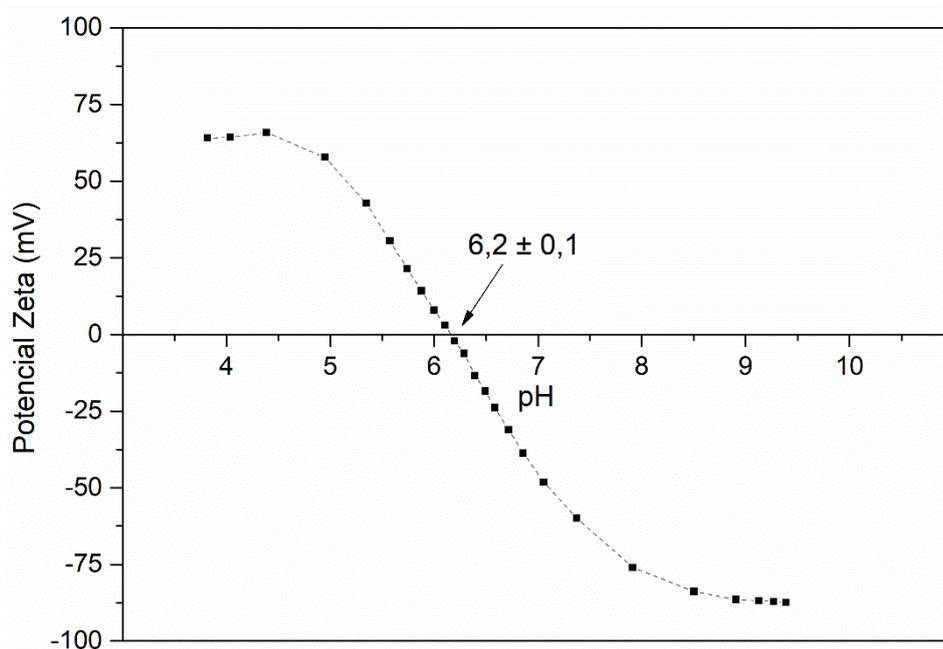
O ponto isoelétrico (PI) é o valor de pH na qual uma molécula possui carga líquida igual ou muito próxima a zero. Em dispersões com pH abaixo do PI, a superfície da proteína está carregada positivamente, enquanto acima do PI, está carregada negativamente, nessas condições forças repulsivas atuam sobre as moléculas, diminuindo sua agregação. No entanto, no PI as cargas negativas e positivas estão balanceadas e há predominância de forças atrativas, que tendem a causar agregação das proteínas (Novák; Havlíček, 2016).

O PI da nanopartícula foi determinado através da titulação de pH 4 a 9,5, utilizando soluções aquosas de NaOH ou HCl 0,05 mol L⁻¹ para ajuste do pH, no equipamento Stabino, pela conversão do potencial de fluxo em potencial zeta. Para conduzir o experimento, as nanopartículas foram previamente dispersas em uma solução aquosa de KCl 10 mmol L⁻¹, objetivando criar um *background* de

condutividade, além da padronização das dispersões, o que permite a comparação entre as diferentes triplicatas.

Os resultados, conforme representados no gráfico da Figura 15, indicam que a NPG exibiu um PI de $6,2 \pm 0,1$, semelhante ao PI obtivo para a gliadina extraída pelos protocolos de extração de Osborne (1924) e Joye, Nelis e McClements (2015), para gliadina extraída com etanol 70 % (v v⁻¹) e de Dupont *et al.* (2005), para a gliadina extraída com propanol. No entanto, difere dos valores de PI obtidos com os protocolos de extração de Weiss, Volgelmeierz e Gorg (1993) e Wallace *et al.* (1990), que fizeram a extração da gliadina com soluções de Tris-HCl e uma mistura de borato de sódio, lauril sulfato de sódio e mercaptoetanol, respectivamente. Segundo Rani *et al.* (2023), essa diferença nos PI pode ser atribuída às variações nas cepas de trigo utilizadas, mas principalmente, das diferenças nas técnicas de extração de gliadina da farinha de trigo empregadas.

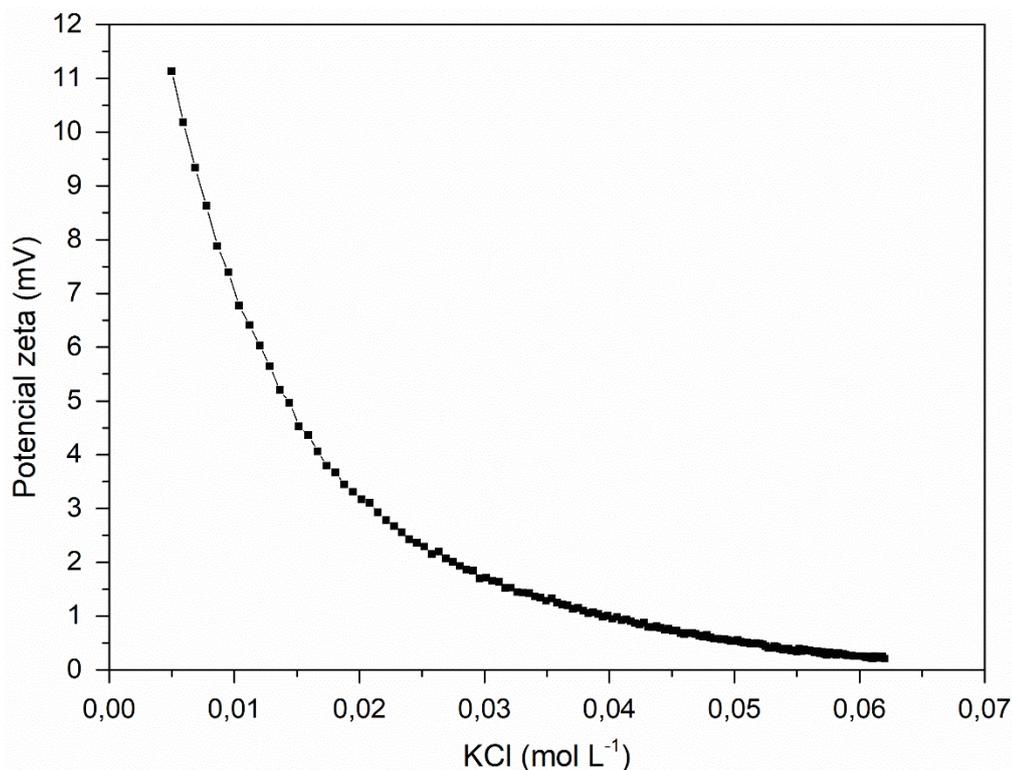
FIGURA 15 - DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO DA NPG EM SOLUÇÃO AQUOSA DE KCl 10 mmol L⁻¹ PELA ADIÇÃO DE NaOH OU HCl 0,05 mol L⁻¹, À 20 ± 5 °C. O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.



FONTE: O autor (2024).

Objetivando determinar a influência de sal sobre a nanopartícula, a titulação com uma solução aquosa de KCl 0,1 mol L⁻¹ também foi realizada, conforme apresentado no gráfico da Figura 16.

FIGURA 16 - TITULAÇÃO DA NPG EM ÁGUA COM SOLUÇÃO AQUOSA DE KCl 0,1 mol L⁻¹, EM pH 5, À 20 ± 5 °C. O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.



FONTE: O autor (2024).

Conforme ilustrado na Figura 16, a amostra em concentração de 0,02 mol L⁻¹ de KCl apresenta seu potencial zeta muito próximo de zero. Com o aumento das concentrações de sal, a dispersão de NPG perde estabilidade rapidamente, com a formação de agregados. A diminuição do potencial zeta com o aumento da concentração de sal é atribuída à capacidade do sal de blindar as cargas ao redor da NPG, reduzindo a repulsão eletrostática entre as partículas e, conseqüentemente, promovendo a agregação (Joye; Nelis; Mcclements, 2015).

5.2.3 Tamanho e Índice de Polidispersão

As análises de tamanho e índice de polidispersão (PDI – do inglês *polydispersity index*), em número e intensidade, foram feitas por determinação do diâmetro hidrodinâmico com vetores de baixo ângulo. Os resultados de tamanho e PDI podem ser visualizados abaixo.

As NPG foram produzidas através da técnica de nanoprecipitação e posteriormente rotaevaporadas para remoção do etanol residual. Para tal, o pH

precisou ser ajustado para 4, visto que, quando rotaevaporadas em pH 5, ocorria precipitação no balão, uma vez que, nesse pH, as NPG se encontravam mais próximas do PI, resultando em um maior tamanho esperado, o que justifica a aglomeração. Na Tabela 5 são apresentados os resultados referentes ao tamanho das NPG antes da alteração do pH, depois da alteração do pH para 4 e após rotaevaporação. A alteração no pH para 4 antes da rotaevaporação resultou na diminuição sutil no tamanho das nanopartículas, sem alteração no PDI. Após rotaevaporação, as nanopartículas mantiveram seu tamanho, ao mesmo tempo, aparentaram ter tamanho mais homogêneo, devido a observação da diminuição do PDI. Dessa forma, pode-se afirmar que a temperatura usada para remoção do etanol não teve influência sobre o aumento do tamanho das nanopartículas.

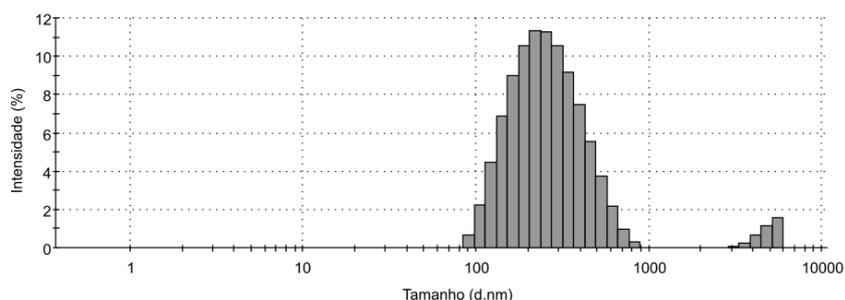
TABELA 5 - DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E PDI DE NPG ANTES E APÓS ROTAEVAPORAÇÃO, AS AMOSTRAS FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA, À 20 ± 5 °C. O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.

	Tamanho (d.nm)	PDI
Sem alteração do pH	$229,6 \pm 24,2$	$0,463 \pm 0,018$
pH alterado para 4	$186,3 \pm 77,6$	$0,473 \pm 0,027$
Após rotaevaporação (pH 4)	$189,1 \pm 11,2$	$0,378 \pm 0,009$

FONTE: O autor (2024).

Analisando a Figura 17, com o histograma de intensidade por tamanho de partícula, em pH 5 a NPG aparenta ter uma população polidispersa de nanopartículas, uma vez que é observado uma segunda população de até 5000 nm em 3% da amostra.

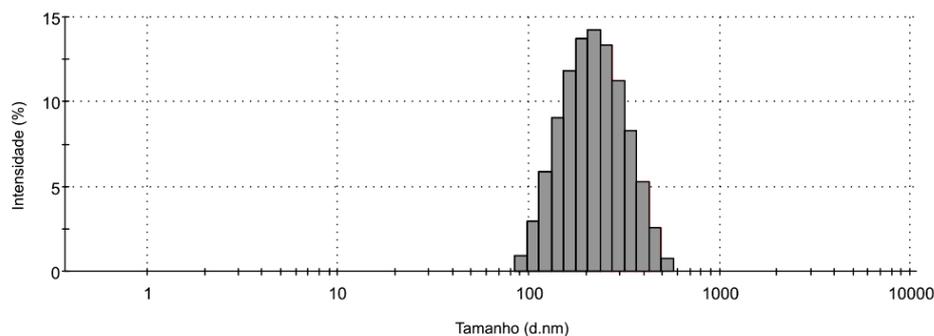
FIGURA 17 - HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS POR INTENSIDADE ANTES DA CENTRIFUGAÇÃO EM VETORES DE BAIXO ÂNGULO. AS NPG FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA, pH 5 E À 20 ± 5 °C.



FONTE: O autor (2024).

Com o objetivo de tornar a dispersão de partículas mais homogênea e eliminar partículas grandes, a dispersão de NPG foi submetida à centrifugação a 4000 g por 30 minutos. Esta etapa de centrifugação foi considerada essencial, pois acredita-se que o uso de nanopartículas homogêneas em termos de tamanho resultaria em uma melhor eficiência de adsorção na superfície das gotículas. Uma dispersão homogênea de partículas sólidas facilita a distribuição uniforme delas na interface líquido-líquido, estabilizando de forma mais eficaz a emulsão. Após centrifugação, o diâmetro médio das NPG foi de 202,5 nm com PDI de 0,120. A distribuição de partículas após centrifugação pode ser vista na Figura 18 abaixo.

FIGURA 18 - HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS POR INTENSIDADE APÓS CENTRIFUGAÇÃO A 4000 g POR 30 MINUTOS EM VETORES DE BAIXO ÂNGULO. AS NPG FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA, pH 5 E À 20 ± 5 °C.

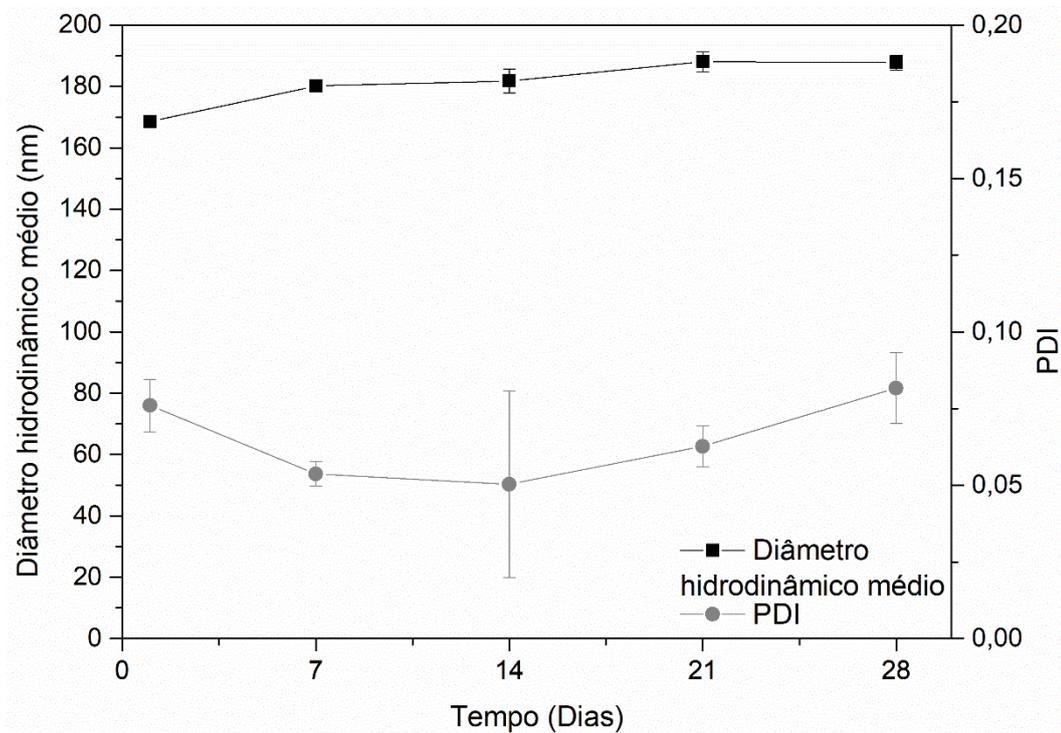


FONTE: O autor (2024).

O monitoramento do tamanho e do PDI das nanopartículas foi conduzido ao longo de 28 dias, com o objetivo de avaliar sua estabilidade. Os resultados estão apresentados na Figura 19. Durante esse período, a suspensão de NPG a 1 % ($m m^{-1}$) foi armazenada em refrigerador a 4 °C, com a finalidade de prevenir o crescimento microbiano, uma vez que não foi adicionado NaN_3 à suspensão.

As nanopartículas de NPG mantiveram-se estáveis ao longo do período avaliado, sem grandes alterações no tamanho e no PDI. A estabilidade da suspensão de NPG foi analisada apenas até o 28º dia, considerando que, por serem nanopartículas de proteína, o crescimento microbiano é favorecido na ausência de antimicrobianos. Adicionalmente, é relevante destacar que um novo lote de NPG foi produzida para cada experimento, com o intuito de minimizar ao máximo qualquer tipo de contaminação.

FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NPG PELA DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO E PDI AO LONGO DE 28 DIAS EM VETORES DE BAIXO ÂNGULO. AS NPG FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA, pH 5 E À 20 ± 5 °C.



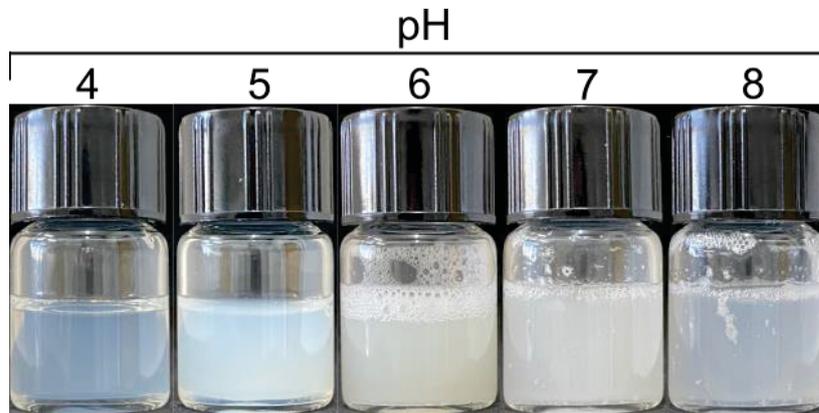
FONTE: O autor (2024).

Para avaliar o comportamento da NPG em função do pH, diferentes dispersões de nanopartículas foram preparadas, adicionando-se soluções aquosas de NaOH $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ou HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Objetivando eliminar a influência do tempo sobre a formação de nanopartículas, para cada pH uma nova dispersão foi preparada, onde uma quantidade suficiente de ácido ou base era adicionada para ir direto do pH em que a amostra estava (em torno de 5,5) até o pH desejado.

A observação macroscópica das mudanças visuais da NPG em função do pH pode ser vista na Figura 20. Inicialmente em pH 4, a dispersão de nanopartículas tem coloração mais transparente, sugerindo a formação de partículas menores. Pesquisas realizadas por Thweissen *et al.* (2011) indicam que a gliadina sofre hidrólise ácida em pH abaixo de 4, com isso acredita-se que a coloração mais clara também possa ser devido a dissolução da estrutura de algumas NPG devido ao pH. Com o aumento do pH, a dispersão fica cada vez mais opaca, com máximo em pH 6, onde a dispersão passa a ficar com coloração amarelada devido a formação de agregados visualizados macroscopicamente. Em pH 7 e 8, as dispersões tendem a

ficar mais transparentes, porém ainda há formação de agregados. Resultados macroscópicos semelhantes foram relatados por Peng *et al.* (2018).

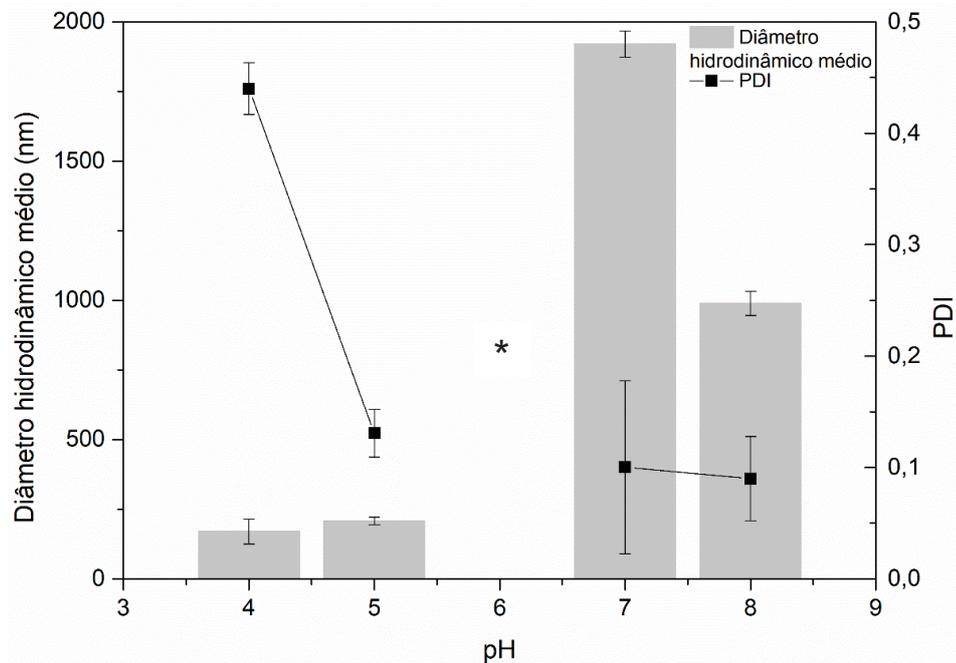
FIGURA 20 - OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA DA SUSPENSÃO DE NPG A 1 % (m m⁻¹) EM ÁGUA EM FUNÇÃO DA MUDANÇA DE pH, À 20 ± 5 °C.



FONTE: O autor (2024).

Os resultados da variação do diâmetro médio das NPG em função da alteração de pH pode ser visualizada na Figura 21. Os resultados de tamanho corroboram com àqueles do potencial zeta (item 5.2.2), onde em pH 6 a carga superficial da nanopartícula está muito próxima de zero, resultando na formação de agregados observados macroscopicamente. O tamanho das partículas não pôde ser determinado em pH 6, uma vez que excede o limite máximo de determinação de diâmetro hidrodinâmico do Zetasizer NanoSeries ZS. Ainda, vale ressaltar, que a linha que conecta os resultados de PDI é apenas uma guia para melhor visualização do gráfico e não representa tendência dos resultados.

FIGURA 21 - VARIAÇÃO DE TAMANHO E PDI DA NPG em água EM FUNÇÃO DA MUDANÇA DE pH, À 20 ± 5 °C. EM pH 6 O TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS EXCEDE O LIMITE DE DETERMINAÇÃO DO EQUIPAMENTO*. AS AMOSTRAS FORAM DILUÍDAS 1:100 EM ÁGUA E O EXPERIMENTO FOI REALIZADO EM TRIPLICATA.



FONTE: O autor (2024).

O fenômeno de agregação no PI pode ser explicado devido ao aumento de forças atrativas sobre forças repulsivas na superfície da nanopartícula. Além disso, em pH 6 os aminoácidos triptofano e glutamina, devido a formação de uma estrutura mais compactada de NPGs, estão menos disponíveis para formar ligações de hidrogênio com o solvente, diminuindo a estabilidade do sistema (Herrera; Veuthey; Dodero, 2016).

Em pH 4 e 5 as NPG atingiram tamanho de $169,4 \pm 44,6$ nm e $207,9 \pm 13,6$ nm, respectivamente. Já em pH 6, a agregação foi tão pronunciada no PI que as partículas fugiram do limite do equipamento. Após o PI, as partículas não são capazes de voltar ao seu estado inicial, formando agregados de tamanho 1920 ± 47 nm e $989,5 \pm 43,5$ nm para os pH 7 e 8, respectivamente.

5.3 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES

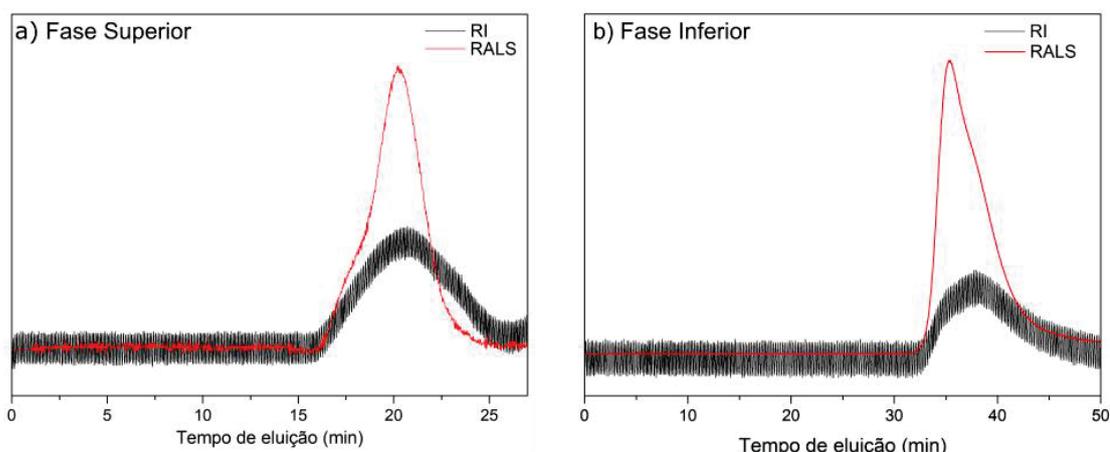
A construção do diagrama de fases é uma ferramenta indispensável ao trabalhar com misturas poliméricas que resultam na formação de emulsões água em água. As condições de separação de fases são influenciadas por propriedades

específicas dos polímeros utilizados, tais como massa molar, conformação molecular, concentração e pH, por exemplo. Portanto, o diagrama de fases é específico para cada sistema e deve ser cuidadosamente elaborado para refletir as variações inerentes ao sistema em estudo (Capron; Costeux; Djabourov, 2001).

Misturas de AMP e HPMC foram preparadas na ausência de nanopartículas, em concentrações de 0 a 10 % (m m^{-1}) e 0 a 2 % (m m^{-1}), respectivamente. Acima da concentração crítica de polímeros (0,64 % (m m^{-1}) e 0,11 % (m m^{-1}) de AMP e HPMC, respectivamente), foi observado a separação de fases da mistura. Macroscopicamente, a separação completa das fases na mistura de HPMC e AMP foi alcançada após 96 horas. A fim de confirmar a completa separação de fases, amostras das partes superior e inferior do tubo 10, preparado conforme item 4.5, foram coletadas e analisadas por cromatografia de exclusão de tamanho. Os perfis de eluição para cada porção podem ser vistos na Figura 22, com o gráfico na Figura 22a sendo a porção superior e na Figura 22b, a inferior.

Considerando a densidade dos polímeros, de $1,0206 \pm 0,001 \text{ g mL}^{-1}$ para a AMP e $1,0048 \pm 0,001 \text{ g mL}^{-1}$ para o HPMC conforme determinado experimentalmente, e que a separação de fases da mistura é segregativa, entende-se que a parte inferior dos tubos é composta por AMP e a parte superior é composta por HPMC.

FIGURA 22 - PERFIS DE ELUIÇÃO DA FASE INFERIOR (a) E FASE SUPERIOR (b) DO TUBO 10 DO DIAGRAMA DE FASES AMP-HPMC.

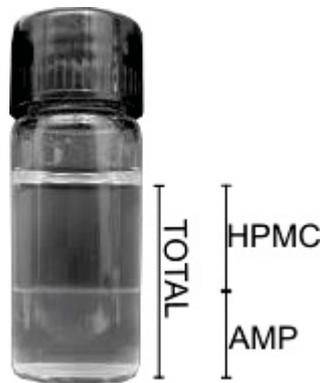


FONTE: O autor (2024).

Os perfis cromatográficos mostrados na Figura 22 são semelhantes aos perfis apresentados no item 5.1 para os polímeros puros, sugerindo a completa

separação de fases da mistura após 96 horas. No entanto, os tempos de eluição na Figura 22 diferem dos tempos de eluição dos polímeros puros (Figuras 9 e 10) devido ao uso de equipamentos diferentes nas análises, permitindo apenas a comparação das características dos picos das amostras. Após esse período, usando o *software* ImageJ, a altura total da mistura e a altura de cada uma das fases foi medida, conforme exemplo apresentado pela Figura 23.

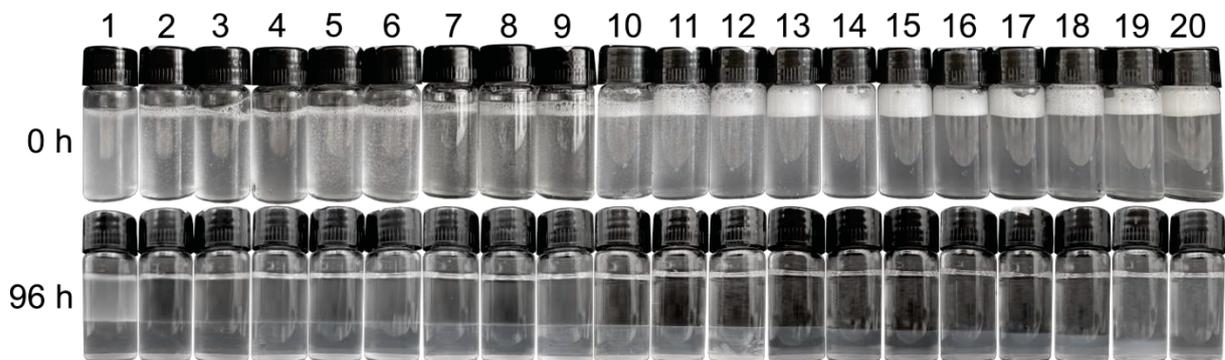
FIGURA 23 - REPRESENTAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA ALTURA DAS FASES DA MISTURA AMP-HPMC.



FONTE: O autor (2024).

O acompanhamento macroscópico da separação de fases das misturas pode ser visto na Figura 24.

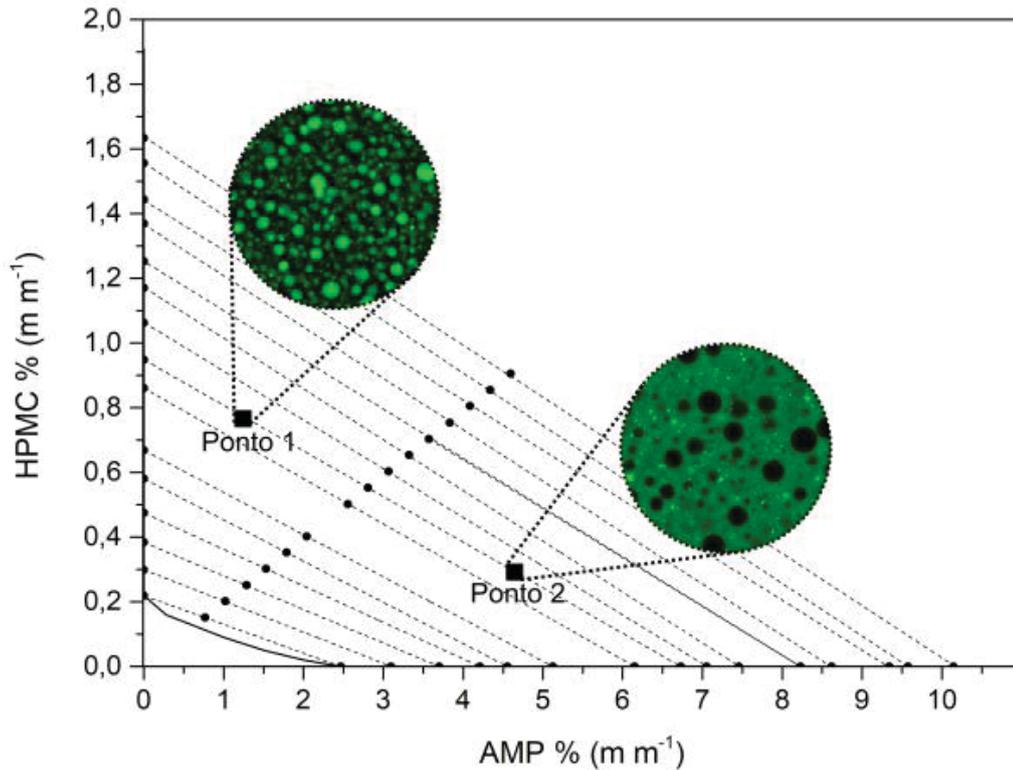
FIGURA 24 - ACOMPANHAMENTO MACROSCÓPICO DA SEPARAÇÃO DE FASES EM 0 E 96 HORAS DAS MISTURAS DE AMP-HPMC EM TEMPERATURA AMBIENTE PARA CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES.



FONTE: O autor (2024).

A partir das medidas determinadas pelas fotos dos tubos, foi possível plotar o gráfico do diagrama de fases para as misturas de polímeros AMP e HPMC, conforme representado na Figura 25.

FIGURA 25 - DIAGRAMA DE FASES DA MISTURA POLÍMERICA DE AMP-HPMC APÓS 96 HORAS DE SEPARAÇÃO DE FASES. OS PONTOS 1 E 2 REPRESENTAM AS CONDIÇÕES DE PREPARO DAS EMULSÕES. EM VERDE ESTÁ MARCADA A AMP.



FONTE: O autor (2024).

Ao analisar o diagrama de fases (Figura 25), considerando a ausência de estabilizantes no sistema, espera-se que a fase com a maior fração volumétrica atue como a fase contínua. A linha binodal (linha cheia), delimita a transição entre as regiões macroscopicamente monofásica e bifásica. A linha central, marcada por círculos, corresponde à condição 50:50, onde as frações volumétricas das duas fases são praticamente iguais. As linhas de amarração, ilustradas por linhas pontilhadas, indicam as fases em equilíbrio termodinâmico. Nessas condições, a tensão interfacial das emulsões é igual, quando preparadas ao longo da mesma linha de amarração (Esquena, 2016).

Considerando a porção do gráfico acima da linha 50:50 (a esquerda) a emulsão é composta pela AMP (em verde) como fase dispersa e por HPMC (em

preto) como fase contínua, já nos pontos abaixo da linha 50:50 (a direita) a emulsão é composta pelo HPMC (em preto) como fase dispersa e a AMP (em verde) como fase contínua. Resultados similares foram encontrados para a mistura de HPMC e AMP por Machado (2022), porém poucos pontos foram reportados, por isso a necessidade da construção de um diagrama de fases mais elaborado.

Para dar continuidade às emulsões, dois pontos do diagrama de fases foram escolhidos. O Ponto 1, que contém 1,26 % ($m\ m^{-1}$) de AMP e 0,77 % ($m\ m^{-1}$) de HPMC, e o Ponto 2, com 4,62 % ($m\ m^{-1}$) de AMP e 0,29 % ($m\ m^{-1}$) de HPMC. As emulsões com nanopartículas preparadas, conforme descrito pelo item 5.4, respeitaram as proporções de AMP e HPMC determinadas para os dois pontos.

5.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA DAS EMULSÕES

As emulsões dos pontos 1 e 2 foram preparadas sem modificação do pH, e em pH 5, 6 e 7, conforme descrito no item 4.7.1. Após preparo, as emulsões permaneceram sob superfície plana e fotos dos tubos foram tiradas ao longo do tempo, de 0 a 35 dias para acompanhamento macroscópico da separação de fases. Emulsões nos pontos 1 e 2 também foram preparadas com adição de solução aquosa de KCl 60 $mmol\ L^{-1}$.

Na microscopia confocal, foram analisadas as emulsões nos Pontos 1 e 2 sem alteração do pH das emulsões, com concentração intermediárias de NPG de 0, 0,2, 0,5 e 1,0 % ($m\ m^{-1}$).

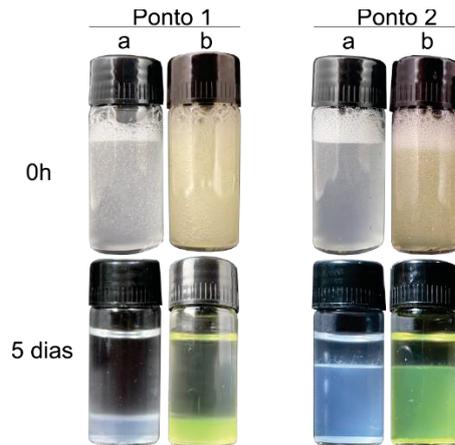
5.4.1 Influência da adição de fluoróforos sobre a separação de fases

Para avaliar a estabilidade microscópica da emulsão utilizando microscopia confocal, é necessário empregar uso de fluoróforos. No entanto, a utilização dessas substâncias pode interferir na separação de fases da emulsão, uma vez que os fluoróforos são adsorvidos na superfície das partículas ou alteraram quimicamente o polímero. Portanto, tornou-se essencial investigar se a presença de fluoróforos influencia a separação de fases na emulsão de AMP e HPMC.

O isotiocianato de fluoresceína foi usado para marcar quimicamente a AMP, formando AMP-FITC, com o objetivo de identificar qual polímero se comportaria

como fase contínua ou dispersa. Já as NPG foram marcadas com 5 ppm de rodamina pelo processo de adsorção física. A separação de fases macroscópica de emulsões preparadas na ausência e na presença de fluoróforos pode ser vista na Figura 26.

FIGURA 26 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS EMULSÕES NOS PONTOS 1 E 2 PREPARADAS NA AUSÊNCIA (a) E NA PRESENÇA DE AMP-FITC E RODAMINA (b).



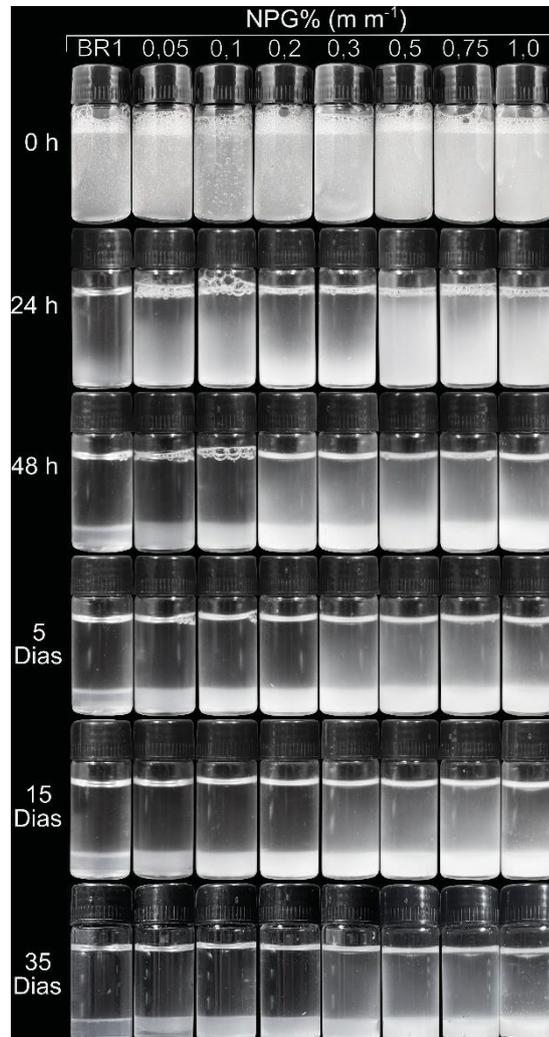
FONTE: O autor (2024).

A presença de 5 ppm de rodamina e de 10 % de AMP-FITC não afetou a separação de fases macroscopicamente, portanto essas quantidades de fluoróforos foram usadas para avaliar microscopicamente as emulsões formadas.

5.4.2 Emulsões preparadas no Ponto 1 do Diagrama de fases

Foi realizado o acompanhamento macroscópico da separação de fases das emulsões preparadas no Ponto 1, com concentrações de 1,26 % (m m^{-1}) e 0,77 % (m m^{-1}) para a AMP e HPMC, respectivamente. Além disso, não houve modificação do pH desses sistemas, que se encontra em torno de 5,5, e foram usadas concentrações de NPG variando de 0 a 1 % (m m^{-1}). O acompanhamento macroscópico da separação de fases pode ser visto na Figura 27.

FIGURA 27 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC NO PONTO 1, COM CONCENTRAÇÃO DE NPG DE 0 A 1 % (m m^{-1}) SEM ALTERAÇÃO DO pH, À $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$.



FONTE: O autor (2024).

Na amostra controle (BR1), em que não foi adicionado NPG, a separação de fases começa a ser notada em 24 horas, mas após 48 horas duas fases bem distintas podem ser observadas. Para todas as concentrações de nanopartícula, a separação de fases inicia-se após 24 horas, sendo um pouco mais notável em concentrações de NPG de 0,05 a 0,3 % (m m^{-1}). Após 48 horas todas as amostras já haviam separado fase. Para todas as amostras com NPG, após 48 horas, a fase inferior apresentava-se mais opaca quando em comparação ao branco, o que leva a acreditar que ainda existe alguma fração emulsionada, ainda que em baixa quantidade. Após 35 dias, observa-se a formação de uma 3^a fase no tubo de

concentração de 0,05 % ($m\ m^{-1}$), entre a fase inferior de superior do tubo, provavelmente como consequência da coalescência das gotículas da emulsão.

As emulsões, preparadas conforme os itens 4.7.1 e 4.7.2, foram avaliadas por microscopia confocal. Para tal, a AMP foi marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (em verde nas imagens) e as NPG foram marcadas com rodamina (em vermelho nas imagens). Todas as emulsões foram analisadas após 24 horas, exceto a emulsão controle (ausência de NPG) que foi analisado imediatamente (0 horas), pois, na ausência de NPG, a separação quase completa das fases podia ser observada em 24 horas.

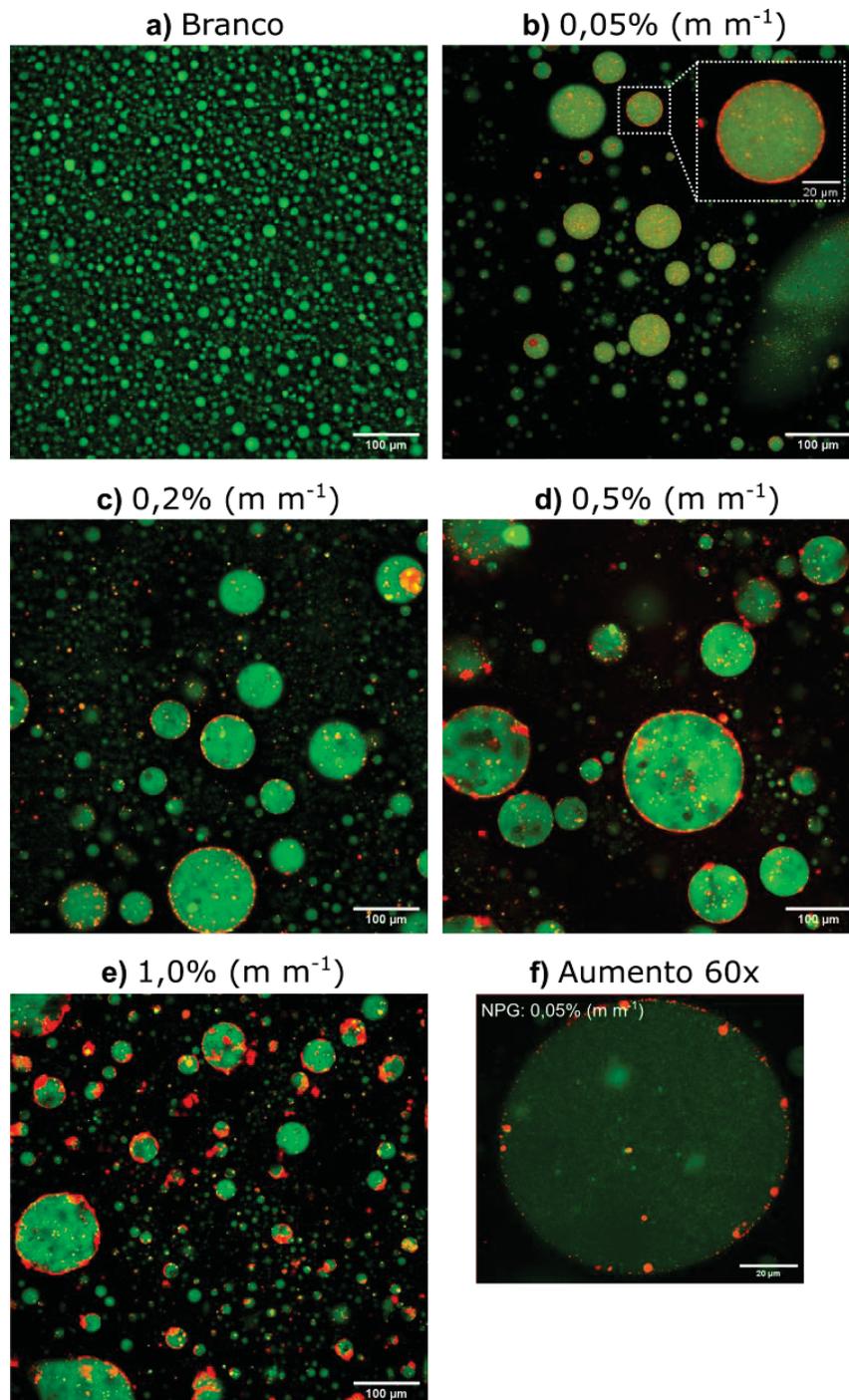
As imagens de microscopia estão apresentadas na Figura 28. Olhando a Figura 28a, percebe-se que emulsões do tipo AMP (em verde) como fase dispersa e HPMC (em preto) como fase contínua são formadas. As NPG, marcadas em vermelho, mostram que, para todas as concentrações de NPG, ocorre a adsorção de nanopartículas na interface AMP-HPMC, resultando na estabilização da emulsão através do mecanismo de Pickering.

Com relação às NPG, nota-se que nanopartículas esféricas são formadas em concentrações de 0,05 a 0,5 % ($m\ m^{-1}$). Ainda é possível perceber que com o aumento da concentração de nanopartículas, mais gotículas ficam recobertas de NPG. A partir da concentração de 0,5 % ($m\ m^{-1}$), a formação de agregados começa a ser vista. Fenômeno que se torna mais evidente com a elevação da concentração para 1 % ($m\ m^{-1}$), momento em que a morfologia das nanopartículas não pode mais ser distinguida. Entretanto, os agregados permanecem majoritariamente na interface AMP-HPMC.

Na Figura 28f, com aumento de 60x, observa-se que as NPG têm preferência pela fase de AMP, visto que as nanopartículas estão localizadas dentro das gotas, com apenas uma pequena porção de NPG adsorvida na interface. Resultados semelhantes foram encontrados por De Freitas *et al.* (2016) e Hazt (2022), que em emulsões de xiloglucana e amilopectina, a proteína β -lactoglobulina também preferiu permanecer na fase de AMP, quando em pH 5 a 7.

A preferência de molhabilidade das nanopartículas pela fase de AMP pode ser a razão pela qual uma melhor estabilização das emulsões não ocorreu, pois, emulsões mais estáveis tendem a se formar quando a partícula sólida tem preferência pela fase contínua. Essa afirmação será discutida a frente, com as emulsões preparadas no Ponto 2.

FIGURA 28 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 1, OBTIDAS APÓS 24 HORAS DE EMULSIFICAÇÃO, EM AUMENTO DE 20 E 60X (f), COM CONCENTRAÇÕES DE NPG DE 0, 0,05, 0,2, 0,5 E 1 % ($m m^{-1}$). EM VERDE A AMP-FITC, EM VERMELHO AS NPG E EM PRETO O HPMC.

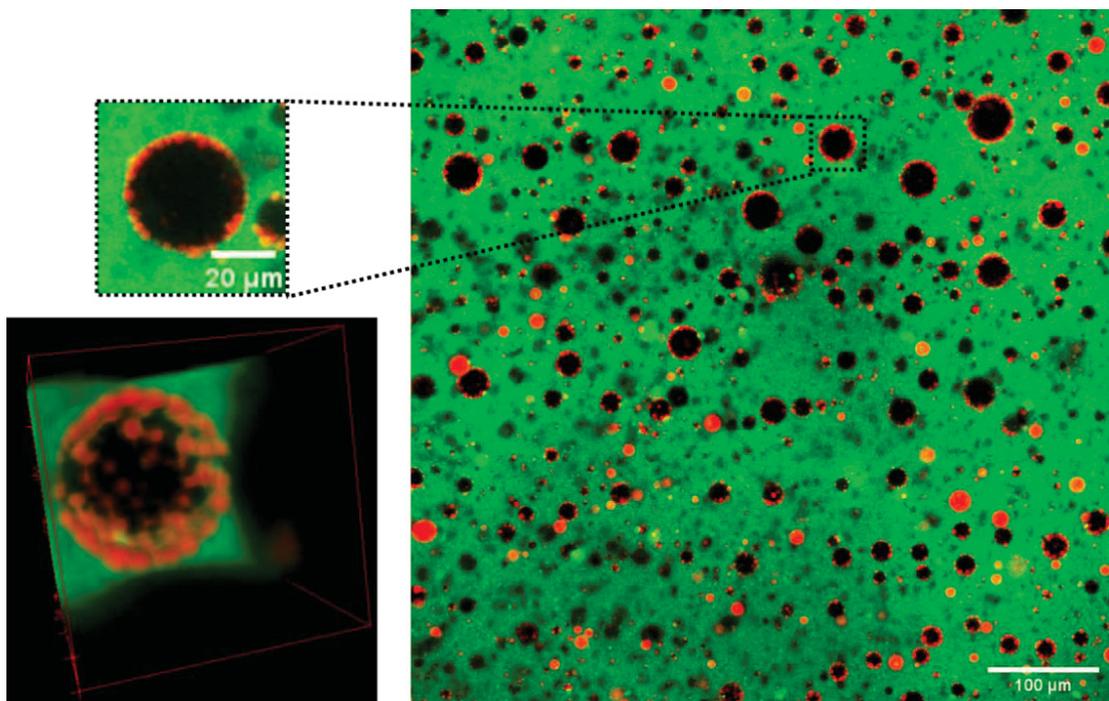


FONTE: O autor (2024).

Para verificar a existência de emulsões formadas após 24 horas, mesmo que em baixa quantidade, a fase inferior da emulsão com 0,5 % ($m m^{-1}$) foi analisada por

microscopia confocal após 5 dias. Esta imagem microscópica pode ser vista na Figura 29. Com a separação de fases, a preferência da NPG pela fase de AMP faz com que as nanopartículas se concentrem na fase inferior de AMP do frasco. A partir desse momento, uma pequena parcela de HPMC ainda permanece emulsificada, ocorrendo uma inversão de fases, onde o HPMC passa a ser a fase dispersa e a AMP a fase contínua. Portanto, supõem-se que a pequena fração emulsificada vista na Figura 27 após 35 dias seria de uma emulsão de HPMC em AMP. Como agora, o volume que precisa ser emulsificado é menor em relação ao volume do tubo total, praticamente todas as gotas analisadas estão 100 % recobertas de nanopartículas. O recobrimento fica ainda mais evidente analisando a projeção 3D para uma das gotas da emulsão.

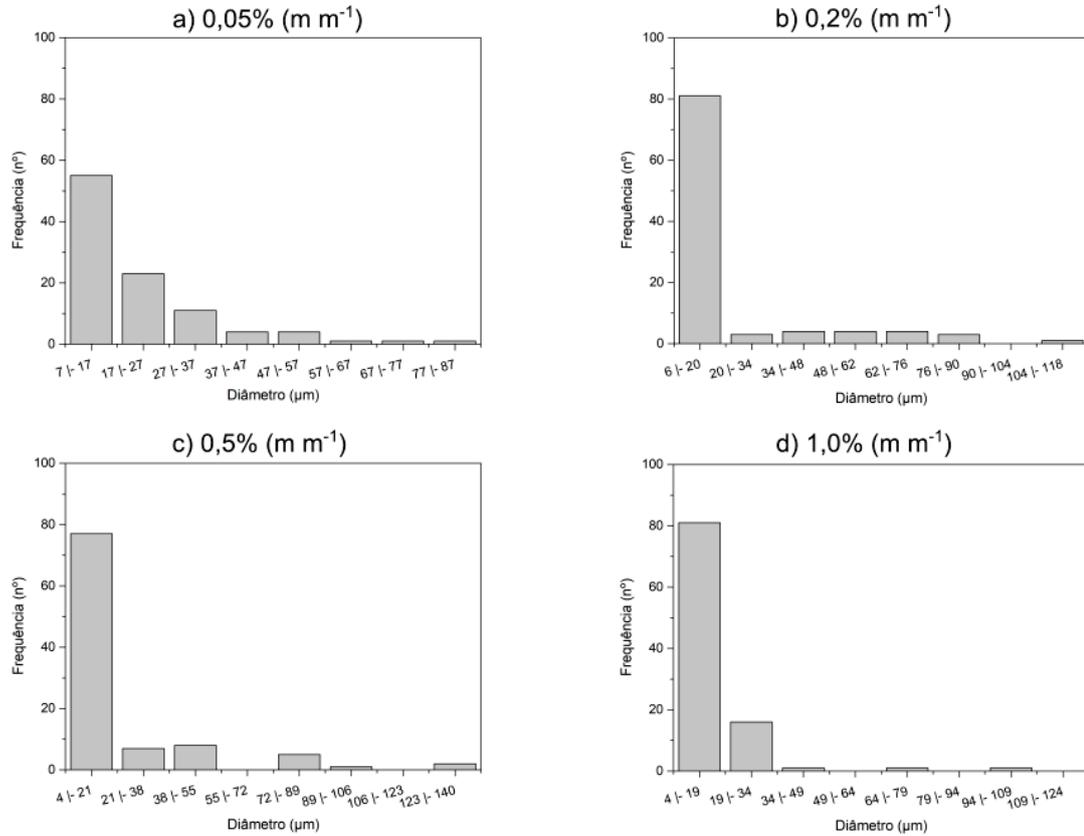
FIGURA 29 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 1, COM 0,5 % ($m m^{-1}$) DE NPG APÓS 5 DIAS DE EMULSIFICAÇÃO, EM AUMENTO DE 20X. EM VERDE A AMP-FITC, EM VERMELHO AS NPG E EM PRETO O HPMC.



FONTE: O autor (2024).

Para cada emulsão com nanopartículas, o diâmetro de 100 gotas foi medido. Os histogramas de frequência do diâmetro das gotículas das emulsões podem ser observados na Figura 30.

FIGURA 30 - HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS (μm) DE EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 1, PARA AS CONCENTRAÇÕES DE NPG DE 0,05, 0,2 0,5 E 1,0 % (m m^{-1}).



FONTE: O autor (2024).

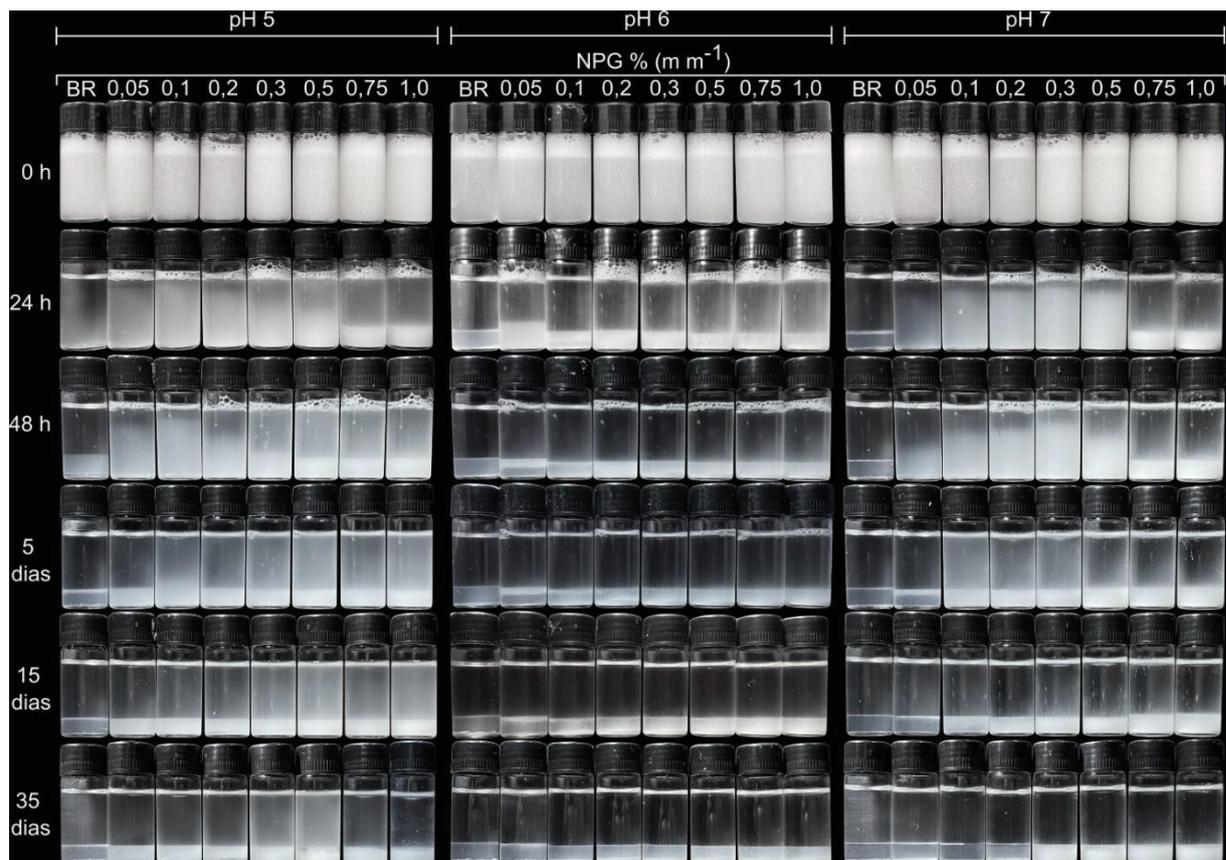
Legenda: O aumento na concentração de NPG nas emulsões não apresentou alterações significativas nos tamanhos de gotas medidos ($p > 0,05$).

Observa-se na Figura 30a que, ao utilizar a concentração de NPG de 0,05 % (m m^{-1}), aproximadamente 55 % das gotículas medidas apresentavam diâmetro de até 20 μm . Com o aumento da concentração para 0,2 % (m m^{-1}) (Figura 30b), essa proporção elevou-se para 80 % e permaneceu constante em concentrações superiores de NPG. A redução no tamanho das gotículas em função da concentração de NPG indica que a área das gotículas recobertas por NPG foi maior. Contudo, as concentrações utilizadas não foram suficientes para diminuir a coalescência das gotas, resultando em uma estabilidade da emulsão que não se manteve após 24 horas. Ressalta-se que não houve diferença estatística entre os tamanhos de gota observados para todas as concentrações de nanopartículas testadas ($p > 0,05$).

Para melhorar a estabilidade das emulsões preparadas no Ponto 1, o pH final das emulsões foi ajustado. Assim, emulsões foram preparadas com pH 5, 6 e 7. A hipótese é que a alteração do pH resulte em emulsões mais estáveis, dado que em pH 6 e 7 o diâmetro médio das nanopartículas é maior. Entende-se que, quanto maior o tamanho da partícula, maior será a energia de desorção necessária para remover a partícula da superfície da gota, conforme descrito pela Equação 2 no item 3.1 (pág 19).

O acompanhamento macroscópico da separação de fases das emulsões preparadas no ponto 1, com alteração do pH final para 5, 6 e 7 pode ser visto na Figura 31.

FIGURA 31 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC PREPARADAS NO PONTO 1, NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPG, EM pH 5, 6 E 7, À 20 ± 5 °C.



FONTE: O autor (2024).

Conforme observado na Figura 31, verificou-se que as emulsões preparadas apresentam uma sensibilidade significativa às variações de pH. Com relação a

amostra controle (BR), em pH 5, a separação de fases ocorreu apenas após 48 horas, diferentemente das amostras controle preparadas em pH 6 e 7, onde em 24 horas duas fases distintas podiam ser observadas. Esse comportamento sugere que as variações de pH influenciam significativamente a estabilidade da emulsão, provavelmente devido a mudanças nas interações entre os dois biopolímeros que compõem o sistema. Essa diferença na separação de fases pode ser explicada, em grande parte, pela influência do pH sobre o HPMC utilizado. A amostra comercial de HPMC empregada neste estudo apresenta uma modificação de superfície com grupamento glioxal. Na indústria, a modificação da superfície do HPMC com glioxal é utilizada para melhorar sua dispersão em água fria, evitando a dissolução imediata do polímero. Isso previne a formação de grumos em emulsões, por exemplo.

Sugere-se que, em pH 5, o polímero HPMC apresenta menor expansão de cadeia, por consequência o volume excluído é menor e os polímeros conseguem coexistir, retardando a separação de fases. Em pH 6 e 7, os grupamentos glioxal tendem a formar diol, com hidroxilas mais disponíveis para realização de interações de hidrogênio com a água, o que promove a separação de fases mais rápida, uma vez que os polímeros não estão mais interagindo entre si.

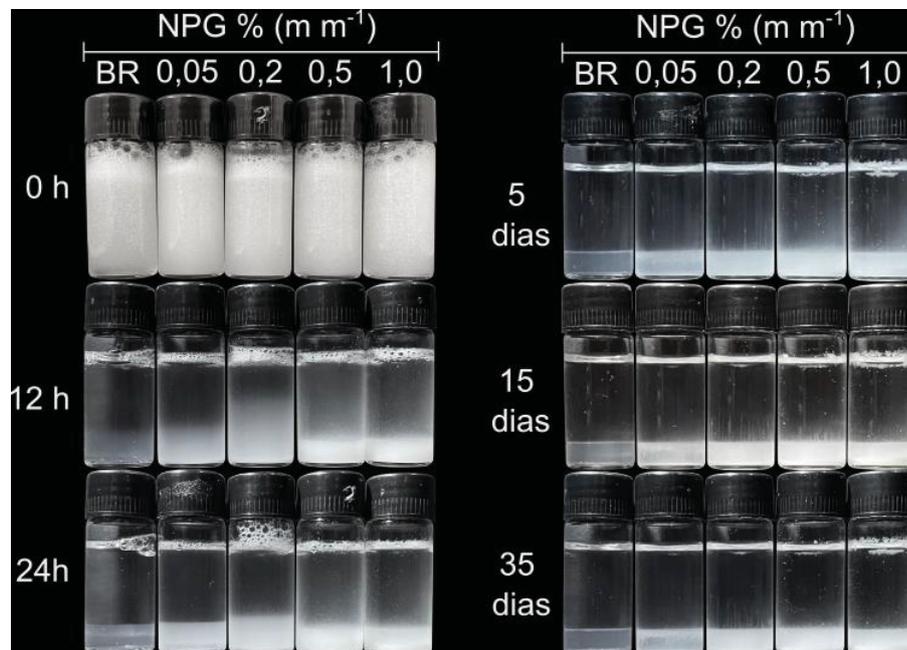
Em pH 6, após 24 horas todas as amostras com NPG já haviam separado fases. Vale lembrar que nesse pH, a carga superficial e torno das nanopartículas está muito próxima a zero, portanto as gotículas tendem a coalescer uma vez que não existe nenhuma forma de repulsão eletrostática que impeça sua aproximação. Outro ponto importante de ser destacado é que em pH 6 as nanopartículas sofrem forte agregação. Com nanopartículas pequenas, o movimento Browniano prevalece sobre a sedimentação devido a forças da gravidade, o que mantém as partículas dispersas no fluido. Com nanopartículas grandes, a força da gravidade supera a agitação térmica e as partículas tendem a sedimentar.

Após 48 horas, volumes emulsionados ainda podiam ser observados em pH 5 para concentrações de NPG de 0,05 a 0,2 % ($m\ m^{-1}$) e em pH 7 de 0,05 a 0,5 % ($m\ m^{-1}$). No entanto, a alteração do pH não foi suficiente para aumentar a estabilidade das emulsões, uma vez que após 5 dias, todas as emulsões preparadas em pH 5 e 7 haviam separado fases.

A estabilidade das emulsões também foi testada frente a adição de KCl 60 $mmol\ L^{-1}$. A concentração de KCl foi escolhida com base na Figura 16, do item 5.5.2 (pág 51). Os resultados encontram-se na Figura 32. Após 12 horas, a separação de

fases já podia ser observada para todas as concentrações de nanopartículas, sendo mais pronunciada em concentrações maiores de NPG de 0,5 e 1,0 % (m m^{-1}). Após 24 horas, a separação de fases completa pode ser vista em todos os tubos e em 5 dias, nota-se a formação de um sedimentado de nanopartículas ao fundo dos tubos, evidenciando a desestabilização das emulsões em todas as concentrações de NPG testadas.

FIGURA 32 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC NO PONTO 1, NA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPG E COM ADIÇÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE KCl 60 mmol L^{-1} , À $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$, COM pH 5,5.

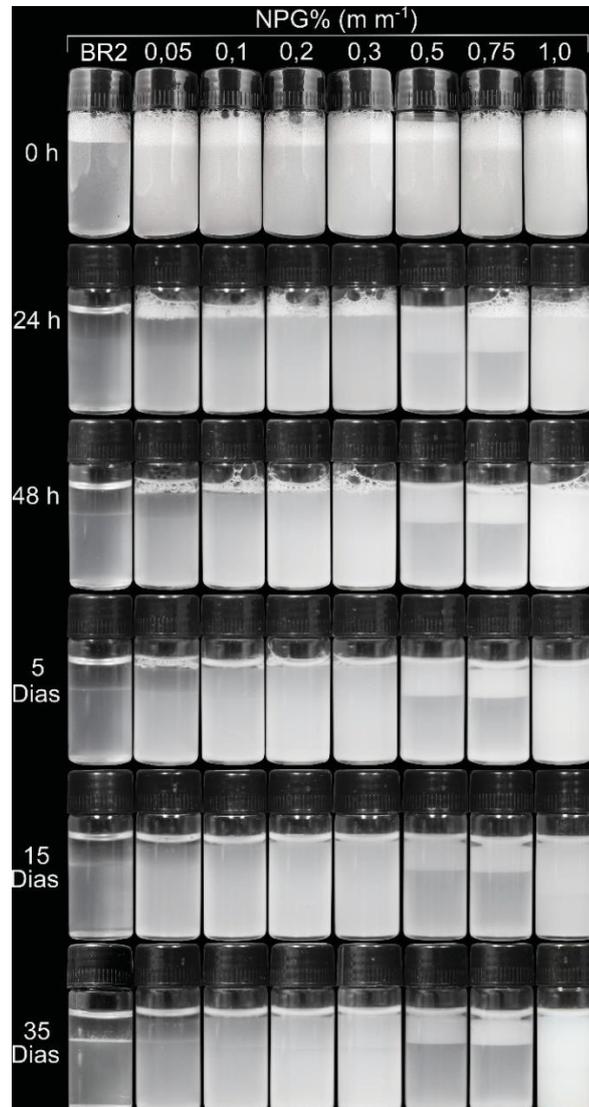


FONTE: O autor (2024).

5.4.3 Emulsões preparadas no Ponto 2 do Diagrama de fases

O acompanhamento macroscópico da separação de fases das emulsões preparadas no Ponto 2, com concentrações de 4,62 % (m m^{-1}) e 0,29 % (m m^{-1}) para a AMP e HPMC respectivamente, pode ser visto na Figura 33. Além disso, não houve modificação do pH desses sistemas, que gira em torno de 5,5 e, assim como no Ponto 1, foram usadas concentrações de NPG variando de 0 a 1% (m m^{-1}).

FIGURA 33 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC NO PONTO 2, COM CONCENTRAÇÃO DE NPG DE 0 A 1 % (m m^{-1}) SEM ALTERAÇÃO DO pH, À 20 ± 5 °C.



FONTE: O autor (2024).

A separação de fases na amostra controle (BR2), começa a ser notada após 24 horas após emulsificação. Até 15 dias é possível observar um pequeno volume emulsionado de aparência transparente na amostra controle, e em 35 dias a separação de fases completa pode ser vista. Após 24 horas, as emulsões preparadas com 0,05, 0,5 e 0,75 % (m m^{-1}) de NPG começam a apresentar separação de fases, porém toda a porção superior do tubo apresenta coloração opaca quando comparado a amostra controle.

Com 5 dias, a separação de fases começa a ser vista também nos tubos com 0,1 e 1,0 % (m m^{-1}) de NPG, o que fica mais evidente após 15 dias de

emulsificação, quando todos em todos os tubos já pode ser visto uma pequena fração da fase superior da mistura, rica em HPMC. Com 35 dias de emulsificação, a separação de fases já pode ser distinguida em todos os tubos, mas volumes emulsionados ainda podem ser observados para todas as concentrações de NPG.

As emulsões, preparadas conforme os itens 4.7.1 e 4.7.2, foram avaliadas microscopicamente por microscopia confocal. Para tal, a AMP foi marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e as NPG foram marcadas com rodamina. Todas as emulsões foram analisadas após 24 horas, exceto a emulsão controle (ausência de NPG) que foi analisado imediatamente (0 horas), pois, na ausência de NPG, já é possível observar separação das fases podia em 24 horas. As imagens de microscopia das emulsões estão na Figura 34.

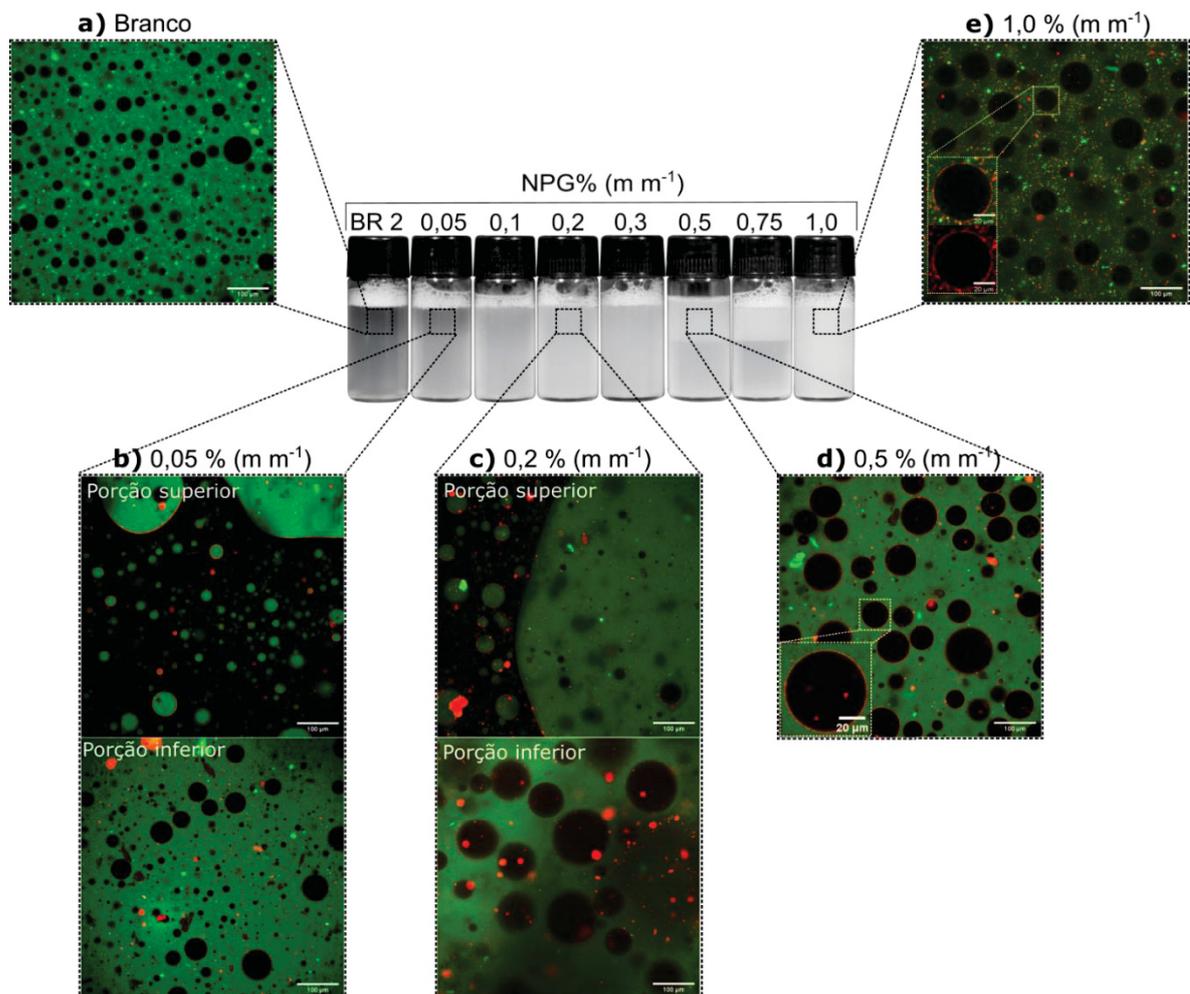
Inicialmente, na ausência de nanopartículas, percebe-se a formação de emulsões de HPMC (preto) como fase dispersa e AMP (verde) como fase contínua (Figura 34a). Com o uso da microscopia confocal, é possível adquirir imagens em diferentes planos da mesma amostra. Amostras com microestruturas distintas foram observadas em diferentes planos, permitindo a descrição de duas regiões distintas para a mesma amostra nas concentrações de 0,05 e 0,2 % (m m^{-1}) de NPG. Para os dois casos (Figuras 34b e c), são apresentadas emulsões parcialmente formadas por HPMC como fase contínua e AMP como fase dispersa. Nas porções inferiores das amostras, emulsões de AMP como fase dispersa e HPMC como fase contínua são mostradas. Possivelmente essas diferentes morfologias podem ser explicadas pela separação de fases das amostras, que já se inicia com 24 horas, uma vez que a concentração de nanopartícula usada não seja suficiente para emulsificar todo o volume de HPMC empregado.

Em concentrações maiores de NPG de 0,5 e 1,0 % (m m^{-1}), todas as porções das lâminas analisadas são formadas por emulsões de HPMC em AMP. Pela Figura 34d é possível notar que praticamente todas as gotas estão recobertas com nanopartículas. Na Figura 34e, nota-se que além das gotas estarem recobertas com nanopartículas, o excesso de NPG usado faz com que as nanopartículas que não foram adsorvidas na interface água-água, permaneçam livres na fase contínua.

No aumento mostrado na Figura 34e, é possível perceber que as NPG estão adsorvidas na interface da gota, mais voltadas para a fase contínua de AMP, por quem tem preferência. Como discutido anteriormente, emulsões A/A mais estáveis tendem a ser formadas quando as partículas são mais molhadas pela fase contínua.

Uma das principais diferenças entre a estabilização de emulsões O/A e A/A por partículas sólidas é que a formação de uma camada de partículas na interface água-água não aparenta ser o suficiente para inibir a coalescência. A estabilidade também pode estar relacionada ao biopolímero que forma a fase dispersa, mesmo quando a tensão interfacial é a mesma. Quando a partícula tem preferência pela fase contínua, ela se posiciona na interface, com maior orientação para fora da gota. Dessa forma, a repulsão estérica na superfície das gotas que colidem inicia-se mais cedo, reduzindo a coalescência (Gonzalez-Jordan; Nicolai; Benyahia, 2016, 2018; Meng; Nicolai, 2023).

FIGURA 34 - IMAGEM DE MICROSCOPIA CONFOCAL DAS EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 2, OBTIDAS APÓS 24 HORAS DE EMULSIFICAÇÃO, EM AUMENTO DE 20X, COM CONCENTRAÇÕES DE NPG DE 0, 0,05, 0,2, 0,5 E 1 % (m m^{-1}). EM VERDE ESTÁ A AMP-FITC, EM VERMELHO AS NPG E EM PRETO O HPMC.

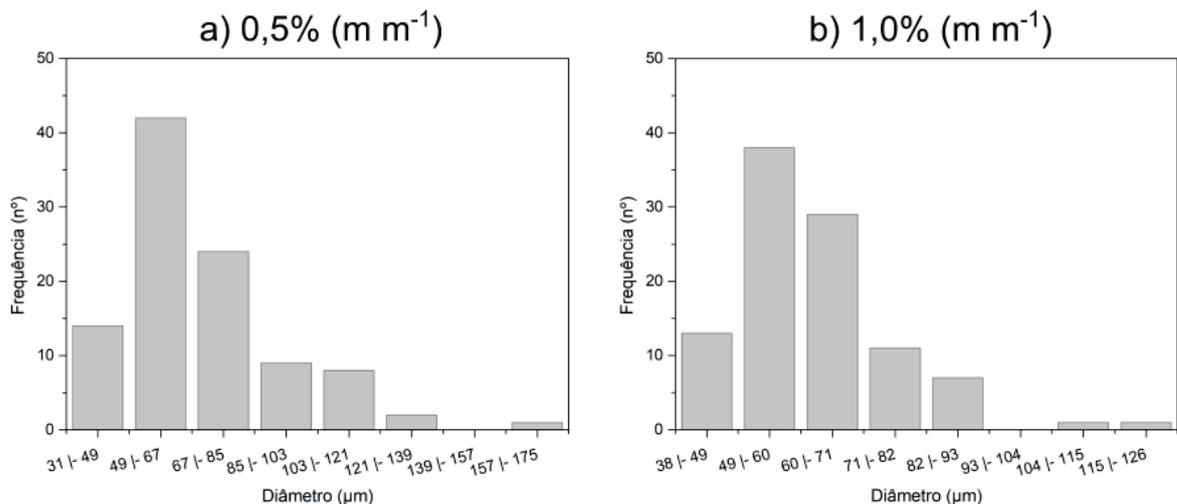


FONTE: O autor (2024).

A determinação do tamanho de gotículas foi realizada apenas para as emulsões preparadas com 0,5 e 1,0 % (m m^{-1}) de NPG, uma vez que nas condições com menor concentração de nanopartículas, duas emulsões com características distintas podiam ser observadas nas amostras, promovida pela coalescência das gotas. Da mesma forma que no Ponto 1, o diâmetro de 100 gotas foi medido e o resultado está apresentado na forma de histograma de frequências na Figura 35, elaborado conforme as Equações 3 e 4 descritas no item 4.7.2.1 (pág 41).

A primeira diferença que pode ser notada com as emulsões preparadas no Ponto 2 é o tamanho das gotas. Enquanto no Ponto 1, gotas de 4 μm podiam ser observadas, no Ponto 2 as emulsões apresentaram gotículas maiores, com o menor diâmetro sendo de 31 μm . Em emulsões preparadas com 0,5% (m m^{-1}), 80 % das gotas tinham diâmetro entre 31 e 85 μm . Dobrando a concentração de NPG na emulsão, cerca de 90 % das gotas apresentaram diâmetro de até 82 μm . Através dos dados analisados na Figura 35, percebe-se que com o aumento da concentração de NPG na emulsão houve uma diminuição significativa no tamanho das gotículas ($p < 0,05$). Esses dados corroboram as informações discutidas a respeito da Figura 34, que mostra que as gotículas estavam quase totalmente recobertas de NPG na concentração de 0,5 % (m m^{-1}) de NPG, havendo um melhor recobrimento com o aumento da concentração.

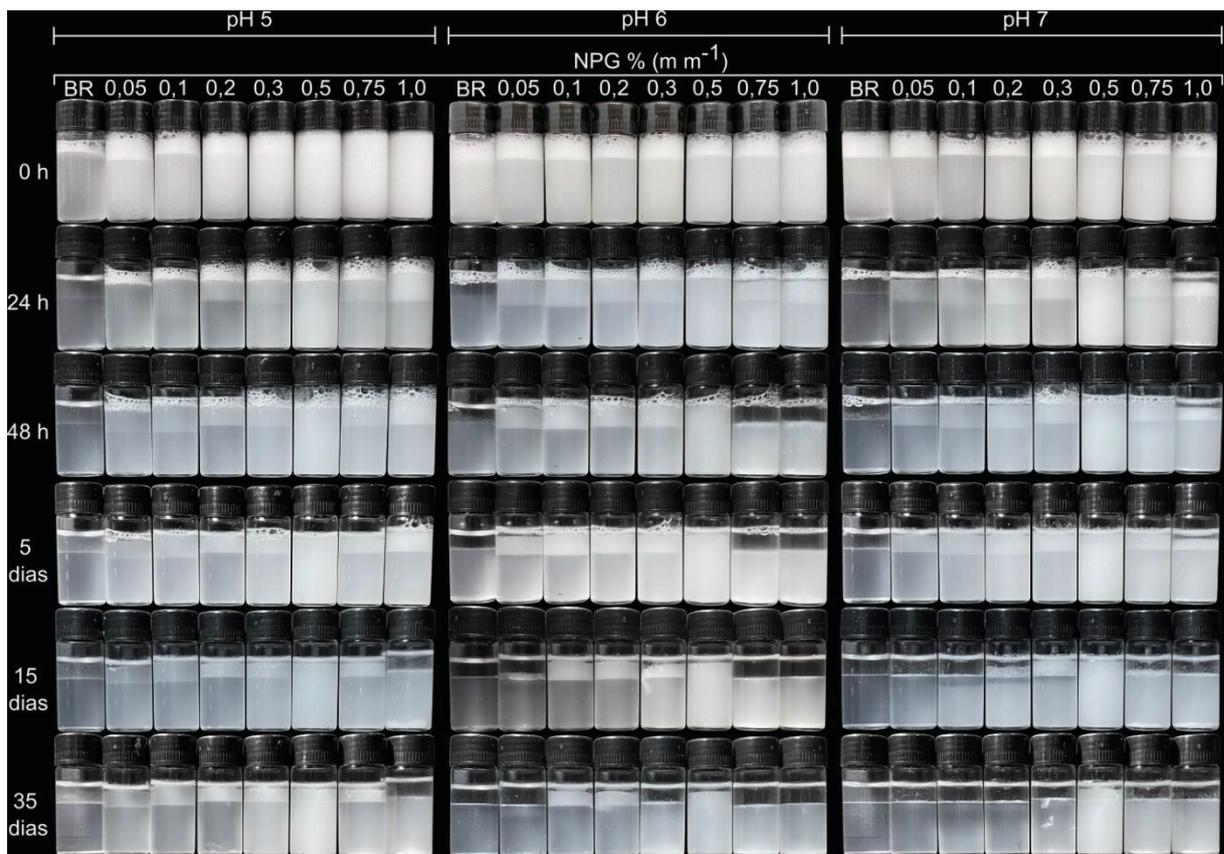
FIGURA 35 – HISTOGRAMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DO DIÂMETRO DAS GOTÍCULAS (μm) DE EMULSÕES PREPARADAS NO PONTO 2, PARA AS CONCENTRAÇÕES DE NPG DE 0,5 E 1,0 % (m m^{-1}).



FONTE: O autor (2024).

Visando aumentar a estabilidade dos sistemas do Ponto 2, emulsões em pH 5, 6 e 7 foram preparadas. O acompanhamento macroscópico da separação de fases das emulsões em até 35 dias em diferentes pH pode ser visualizada na Figura 36.

FIGURA 36 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE AMP EM HPMC NO PONTO 2, NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPG, EM pH 5, 6 E 7, À 20 ± 5 °C.



FONTE: O autor (2024).

Com 24 horas, as emulsões controle (BR) preparadas em todos os pH já haviam separado fases. Com relação a amostra controle preparada em pH 5, após 35 dias de emulsificação ainda é possível distinguir uma pequena fração emulsionada na porção superior do tubo. Ainda em pH 5, todas as amostras apresentaram separação de fases até 5 dias, mas ainda continham volume emulsionado na porção superior do tubo. O volume emulsionado permaneceu praticamente o mesmo após 15 e 35 dias, exceto para a emulsão com 1,0 % de NPG ($m m^{-1}$), que após 15 dias não apresentava nenhum volume emulsionado visto e foi observado a formação de sedimento no fundo do tubo.

Em pH 6, após 24 horas a separação de fases pode ser observada para as emulsões preparadas em todas as concentrações de NPG. Após 48 horas, as emulsões preparadas com 0,75 e 1,0 % (m m^{-1}) haviam separado fases completamente e um sedimento foi formado ao fundo do tubo. Após 15 dias, a emulsão preparada na menor concentração de NPG apresentava apenas um pequeno volume emulsionado e a separação de fases completa ocorreu com 35 dias. Após 35 dias, a emulsão preparada com 0,3 % (m m^{-1}) de NPG também não apresentava mais nenhum volume emulsionado, enquanto as emulsões com 0,1, 0,2 e 0,5 % (m m^{-1}) de NPG ainda continham pequeno volume emulsionado. A repetição do tubo 0,3 % (m m^{-1}) foi feita mais duas vezes buscando entender se houve erro no preparo de amostra, mas os resultados foram os mesmos.

Em pH 7, a separação de fases tem início após 24 horas, ficando mais pronunciada em 5 dias de emulsificação. Após 15 dias, praticamente todas as emulsões haviam separado fases completamente, exceto as amostras com concentrações de 0,2, 0,3 e 0,5 % (m m^{-1}) de NPG. Vale notar, que após 15 dias foi observado a formação de uma segunda fase opaca na porção inferior rica em AMP dos tubos, provavelmente em decorrência da sedimentação das NPG. Com 35 dias, o único tubo ainda com algum volume emulsionado era o tubo de 0,5 % (m m^{-1}).

Em todos os pH, as emulsões que apresentaram melhor estabilidade foram aquelas preparadas com concentração de NPG de 0,5 % (m m^{-1}). Acredita-se que a concentração de 0,5 % (m m^{-1}) as emulsões estão muito próximas da condição de coalescência limitada, onde as gotículas da fase dispersa apresentam tamanho homogêneo devido a cobertura total da interface (Albert *et al.*, 2019). O preparo de emulsões com concentrações intermediárias de NPG e a observação por microscopia confocal é necessário para comprovar a coalescência limitada.

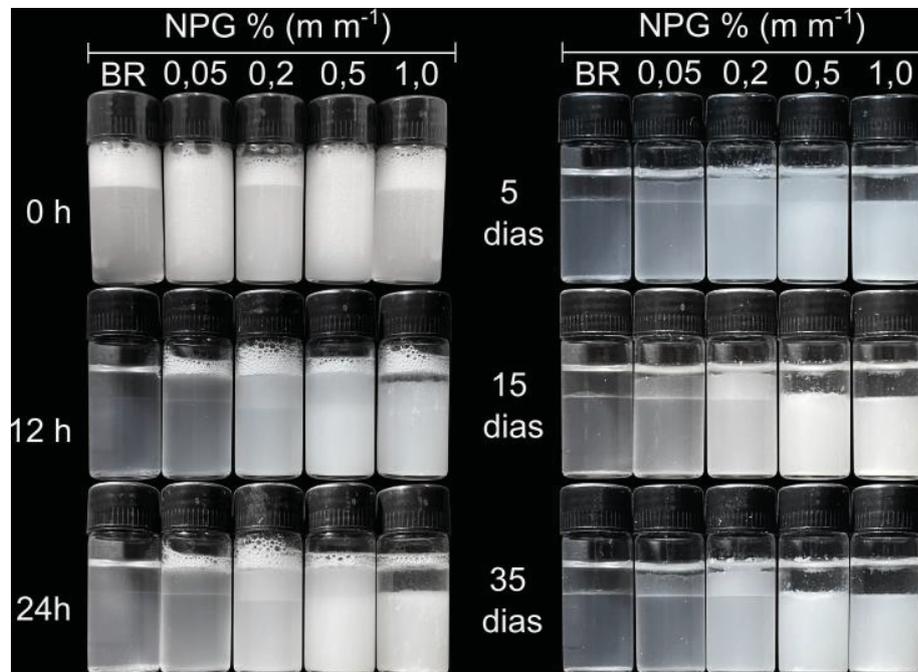
Como ocorreu com as emulsões preparadas no Ponto 1, esperava-se que as emulsões preparadas em pH 6 apresentassem maior instabilidade. Porém, o que foi visto foi maior instabilidade das emulsões preparadas em pH 7, enquanto em pH 6, 3 emulsões ainda apresentavam volume emulsionado após 35 dias de observação. Possivelmente a maior estabilidade atribuída ao pH 7 seja proveniente da dissolução facilitada do HPMC em condições alcalinas, o que promove aumento da viscosidade da fase dispersa e a separação de fases mais rapidamente.

De uma forma geral, entende-se que as emulsões preparadas no Ponto 2 são instáveis frente a alteração de pH para 6 e 7, mas ainda apresentam boa

estabilidade em pH 5. As emulsões preparadas sem modificação do pH apresentaram pH final em torno de 5,5, o que explica os resultados similares entre os dois experimentos.

A estabilidade das emulsões também foi testada frente a adição de solução aquosa de KCl 60 mmol L⁻¹ para emulsões de HPMC em AMP. A concentração de KCl foi escolhida com base na Figura 16, do item 5.5.2 (pág 51). Os resultados encontram-se na Figura 37.

FIGURA 37 - AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE EMULSÕES DE HPMC EM AMP NO PONTO 2, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NPG E COM ADIÇÃO DE SOLUÇÃO AQUOSA DE KCl 60 mmol L⁻¹, À 20 ± 5 °C, EM pH 5,5.



FONTE: O autor (2024).

Após 12 horas de emulsificação todos os tubos mostravam separação de fases, com a amostra controle (BR) com separação de fases bem delimitada. Com 24 horas, a emulsão com 1,0 % (m m⁻¹) de NPG apresentava separação de fases completa e início de formação de agregados ao fundo do tubo. Com 5 dias, volumes emulsionados na porção superior do tubo ainda podiam ser visualizados para as demais concentrações. Com 15 dias, a emulsão com 0,5 % (m m⁻¹) de NPG apresentou completa separação de fases, enquanto as emulsões com 0,05 e 0,2 % (m m⁻¹) de NPG ainda apresentavam volume emulsionado, mesmo após 35 dias de emulsificação. Quando comparada com as emulsões sem modificação do pH, a

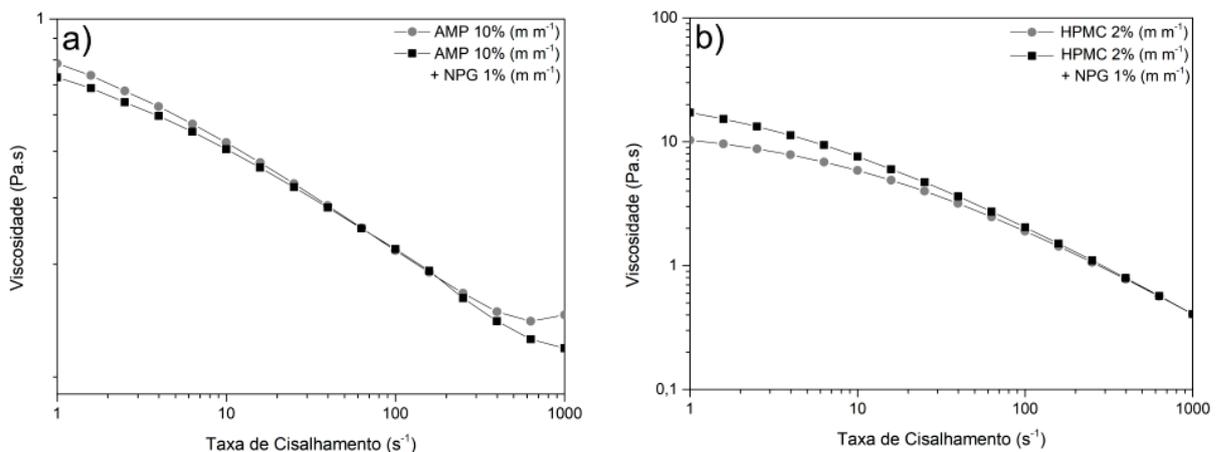
adição de KCl foi o suficiente para desestabilizar emulsões com concentrações de NPG a partir de 0,5 % (m m^{-1}) de nanopartículas.

5.5 AVALIAÇÃO REOLÓGICA DA INTERAÇÃO POLÍMERO-NANOPARTÍCULA

Buscando entender a preferência das NPG pela fase de AMP, experimentos de viscosidade, dinâmico-oscilatórios e de temperatura foram realizados para descrever o comportamento reológico dos polímeros puros e na presença de NPG. Sabendo que as suspensões de HPMC e AMP podem ter seu comportamento alterado na presença de nanopartículas, curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento foram avaliadas. As concentrações de polímeros usadas nos experimentos foram de 2 % (m m^{-1}) e 10 % (m m^{-1}) para o HPMC e AMP, respectivamente. Os polímeros foram avaliados na ausência e na presença de NPG 1 % (m m^{-1}). As concentrações de polímeros e nanopartícula foram escolhidas com base nas concentrações das dispersões estoque usadas no preparo das emulsões.

A curva de fluxo detalha as propriedades reológicas do material, especificamente a variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento. Essa análise é fundamental para a determinação do tipo de comportamento do fluido, categorizando-o como pseudoplástico, plástico, dilatante ou newtoniano (Stojkov *et al.*, 2021). As curvas de viscosidade encontram-se na Figura 38.

FIGURA 38 - CURVA DE VISCOSIDADE DA AMP 10 % (m m^{-1}) E HPMC 2 % (m m^{-1}) PUROS E COM NPG 1 % (m m^{-1}) À 25 °C.



FONTE: O autor (2024).

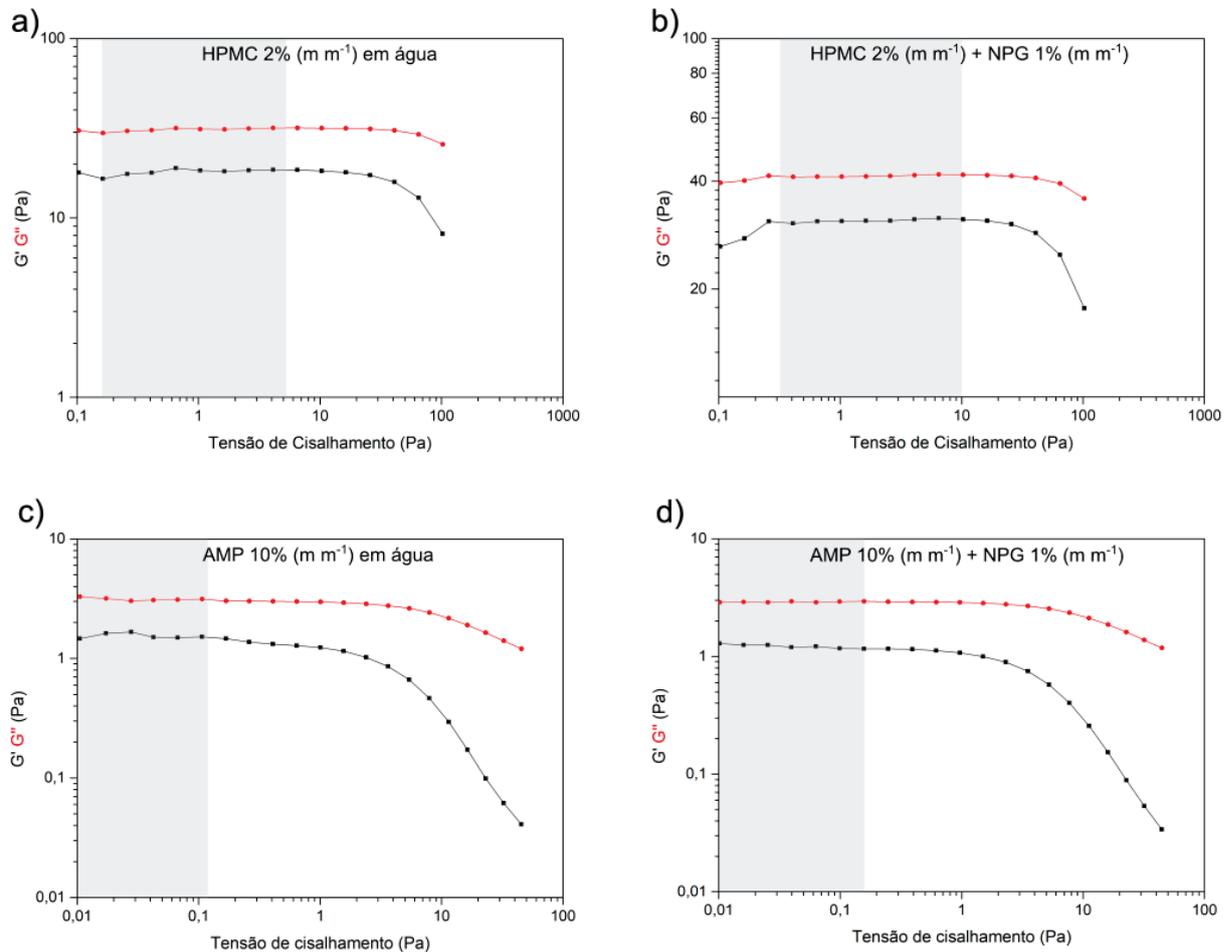
Tanto a AMP quanto o HPMC exibem comportamento pseudoplástico, com a viscosidade diminuindo em função da taxa de cisalhamento (Schramm, 2006). A AMP pura apresentou breve aumento da viscosidade em alta taxa de cisalhamento, que pode ser atribuída a associações intermoleculares induzidas por cisalhamento ou fluxo turbulento (ANG *et al.*, 2021). A adição de nanopartículas a 1 % (m m^{-1}) não foi suficiente para alterar a viscosidade da dispersão de AMP, porém em alto cisalhamento não foi observado aumento da viscosidade, provavelmente devido a interação entre NPG e AMP. No entanto, a dispersão de HPMC apresentou um leve aumento na viscosidade sob baixo cisalhamento com a adição de nanopartículas, podendo indicar algum tipo de interação entre partícula e amostra.

Em geral, dispersões poliméricas apresentam comportamento de viscosidade dependente da taxa de cisalhamento, comportando-se como fluidos não Newtonianos do tipo pseudoplástico. Em baixo cisalhamento, as cadeias poliméricas adotam conformação aleatória ou enovelada. Com o aumento da taxa de cisalhamento, a tensão aplicada sobre as cadeias poliméricas as torna mais retilíneas e alinhadas, com orientação do polímero na direção do fluxo (Ianniruberto, 2015).

Antes da realização dos experimentos subsequentes, foi determinada a região viscoelástica linear (RVL) para os polímeros HPMC e AMP, tanto na ausência quanto na presença de NPG. A determinação da RVL é realizada por meio da curva de amplitude, na qual os módulos elástico e viscoso são monitorados em relação à tensão de cisalhamento, sob uma frequência constante. A curva de amplitude serve como uma triagem para as amostras analisadas. Dentro da RVL, as tensões aplicadas não são suficientes para causar ruptura estrutural no polímero, preservando assim sua microestrutura. Desta forma, a RVL estabelece as condições sob as quais as análises podem ser realizadas sem comprometer a integridade da estrutura da amostra (Brummer, 2006).

Os gráficos de oscilação de amplitude estão apresentados na Figura 39.

FIGURA 39 - CURVAS DE AMPLITUDE PARA O HPMC 2 % (m m^{-1}) E AMP 10 % (m m^{-1}) NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE NPG 1 % (m m^{-1}) À 25 °C. AS REGIÕES EM CINZA REPRESENTAM A REGIÃO VISCOELÁSTICA LINEAR DETERMINADA PARA AS AMOSTRAS.



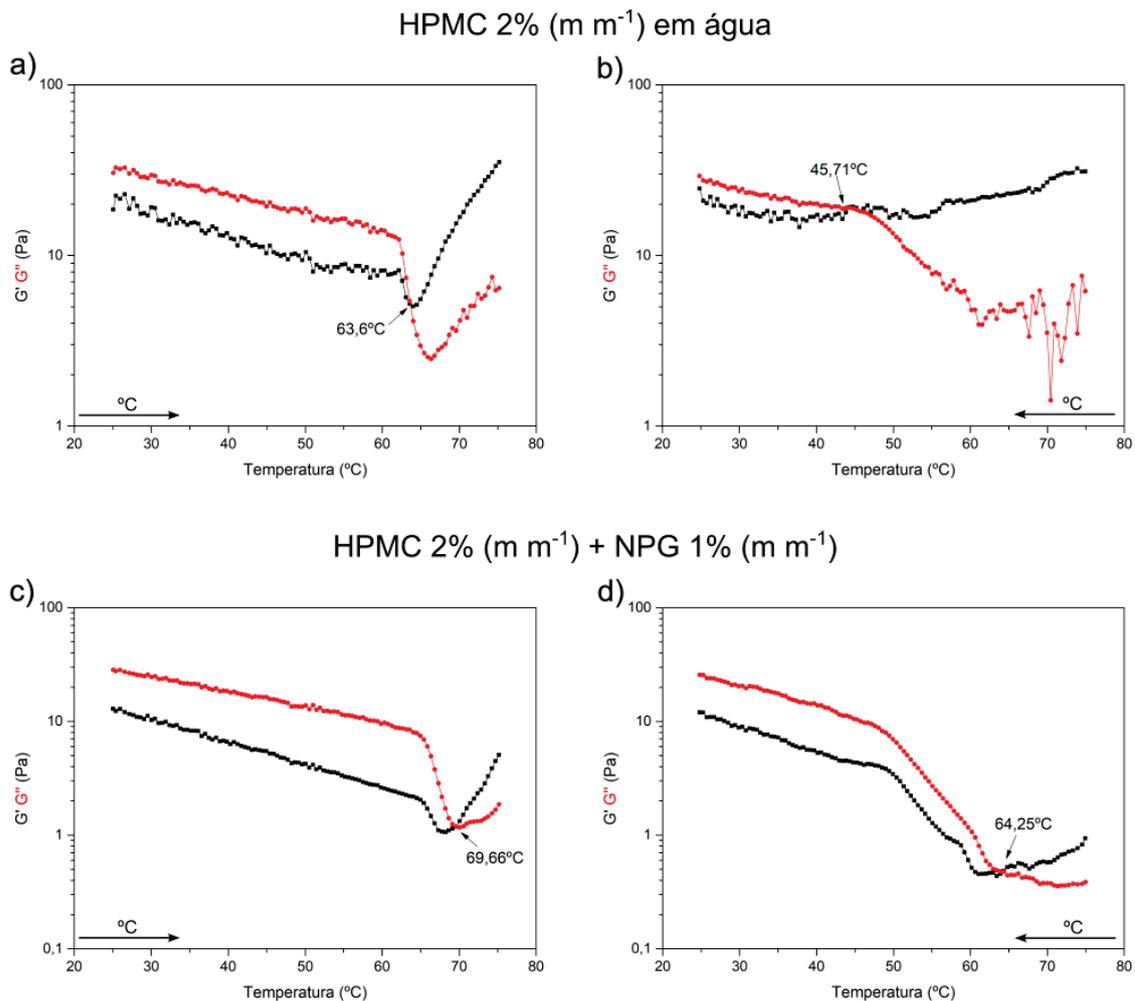
FONTE: O autor (2024).

Os próximos experimentos oscilatórios foram realizados dentro da RVL para todas as amostras. Foram feitos experimentos de variação de temperatura, com aquecimento seguido de resfriamento dos polímeros sozinhos e na presença de NPG. Para determinar a relaxação das cadeias, varreduras de frequência também foram feitas antes e após os ciclos de aquecimento e resfriamento.

A variação de temperatura é um teste de caracterização reológico que permite a avaliação da estrutura de polímeros sob determinada temperatura. O experimento é realizado em condições de cisalhamento e frequência constantes, visando apenas identificar a influência da temperatura na estrutura da amostra (Stojkov *et al.*, 2021).

Os ciclos de aquecimento e resfriamento para o HPMC podem ser visto na Figura 40.

FIGURA 40 - RAMPA DE TEMPERATURA DO HPMC A 2 % ($m m^{-1}$) NA AUSÊNCIA (a E b) E NA PRESENÇA DE NPG A 1 % ($m m^{-1}$) (c E d). AS FIGURAS a E c REPRESENTAM AS CURVAS DE AQUECIMENTO E AS FIGURAS b E d REPRESENTAM AS CURVAS DE RESFRIAMENTO.



FONTE: O autor (2024).

Como observado na Figura 40, em temperaturas mais baixas, G'' é maior que G' , indicando o comportamento de fluido viscoelástico das amostras. Com o aumento da temperatura (Figuras 40a e 40c), tanto G' quanto G'' tendem a diminuir até atingirem uma faixa de temperatura característica, onde ocorre uma queda abrupta de G'' e uma queda menos acentuada de G' . A partir desse ponto, as amostras apresentam G' maior que G'' , evidenciando a geleificação dos polímeros (Clark, 1991). A temperatura em que G' e G'' cruzam é denominada como

temperatura de geleificação, que foi de 63,6 °C para o HPMC em água. A temperatura de geleificação do HPMC na presença de nanopartículas foi de 69,6 °C, indicando que as NPG interagem com o HPMC majoritariamente através de interações hidrofóbicas, uma vez que em temperatura elevada interações por ligação de hidrogênio são prejudicadas.

Muito descrito na literatura, dispersões aquosas de HPMC tendem a formar géis reversíveis com o aumento da temperatura. O fenômeno de geleificação termoreversível pode ser explicado pelo aumento das interações hidrofóbicas em temperaturas elevadas, que prejudicam ligações de hidrogênio, além da exclusão da água de regiões altamente metoxiladas do polímero. O HPMC se torna mais hidrofóbico e a determinada temperatura, a associação hidrofóbica de grupamentos metoxilados favorece a formação de uma rede tridimensional, mostrando característica de geleificação (Sarkar, 1979; Silva *et al.*, 2008).

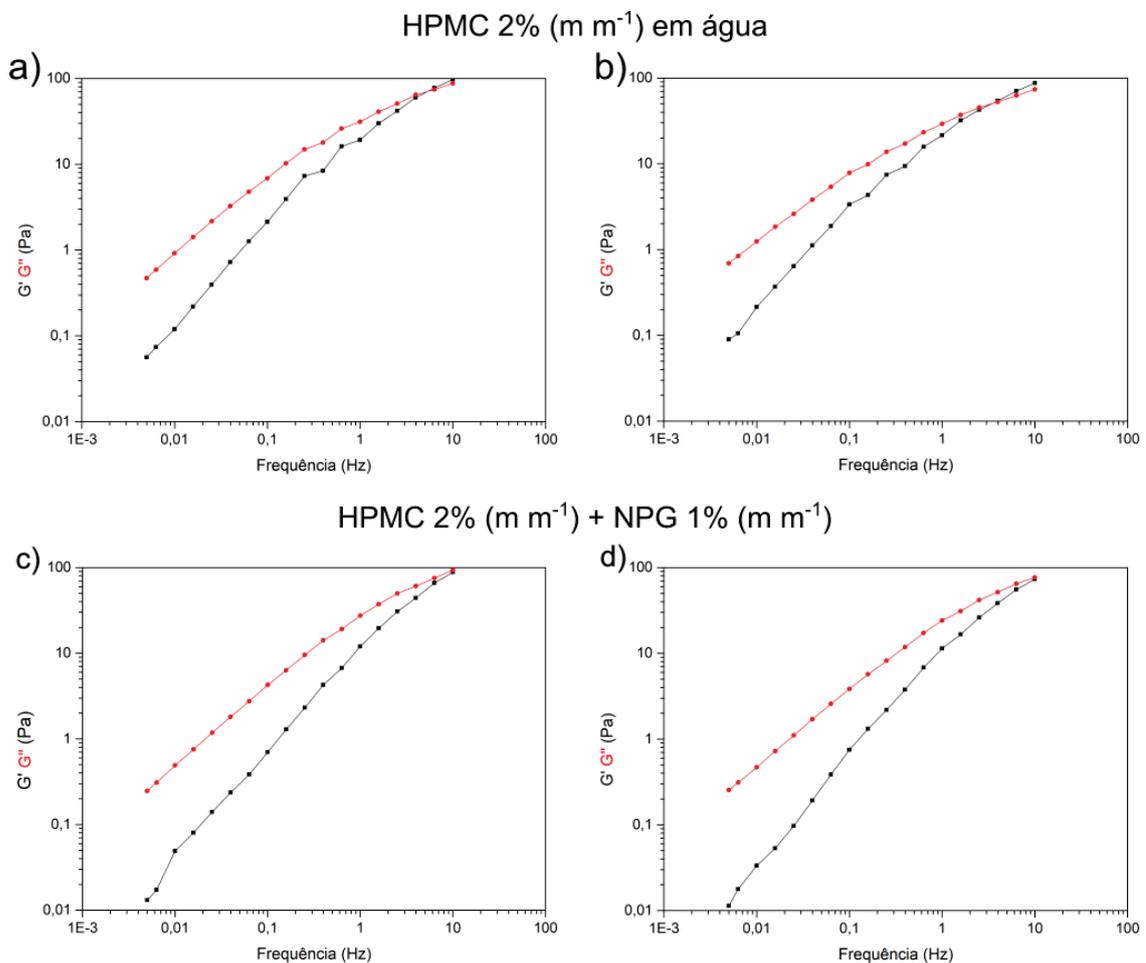
As interações hidrofóbicas das NPG com o HPMC ficam mais evidentes no ciclo de resfriamento (Figura 40b e 40d), uma vez que o HPMC puro volta ao seu estado viscoelástico original em 45,7°C e o HPMC na presença de NPG retorna já em 64,2 °C. Entende-se que, a realização de interações hidrofóbicas com a NPG prejudica a formação da rede polimérica do HPMC, por isso a temperatura de geleificação é um pouco mais elevada. Com o resfriamento, as interações entre o HPMC e a NPG são rapidamente desfeitas, fazendo com que o HPMC retorne a seu estado original.

A varredura de frequência, realizada dentro da região viscoelástica linear, para o HPMC em água e na presença de NPG encontra-se na Figura 41. Varreduras de frequência foram feitas sobre variação de frequência em amplitude e temperatura constantes. Em baixas frequências, tanto o HPMC em água, quanto na presença de NPG apresentam característica de fluido viscoelástico ($G'' > G'$). Conforme a frequência aumenta G' passa a dominar o sistema, até ser observado a intersecção entre os módulos, com $G' > G''$, onde uma rede polimérica é formada, demonstrando a geleificação da amostra (Ross-Murphy, 1994).

Para o HPMC em água, o tempo de relaxação da cadeia polimérica pôde ser calculado pela intersecção de G' e G'' , sendo equivalente a um sobre a frequência no ponto de intersecção. O tempo de relaxação do HPMC antes da variação de temperatura foi de 0,1855 s e após variação de temperatura foi de 0,2873 s. Após o tempo de relaxação, o HPMC em água toma forma de gel, evidenciado por $G' > G''$.

Para o HPMC na presença de NPG não foi possível determinar o tempo de relaxação, pois este se deslocou para frequências maiores, já que não houve interseção entre G' e G'' . Isso significa que o sistema formado possui um tempo de relaxação menor, que ocorre somente à alta frequência, e que a presença da NPG está afetando as redes transientes do polímero HPMC, também conhecidas como entrelaçamentos macromoleculares ou do inglês “entanglements”.

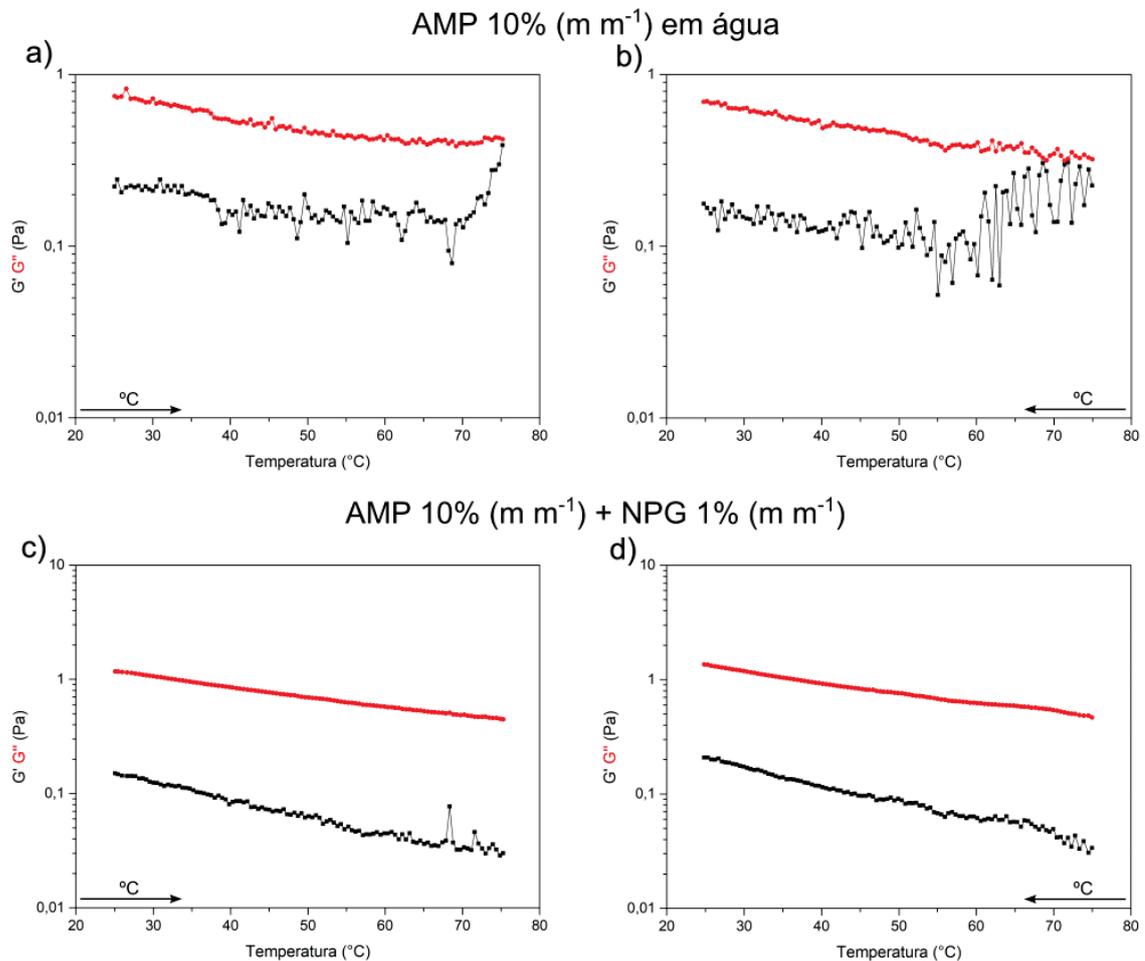
FIGURA 41 - VARREDURA DE FREQUÊNCIA ANTES (a E c) DE DEPOIS (b E d) DAS RAMPAS DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO PARA O POLÍMERO HPMC 2 % (m m⁻¹) EM ÁGUA (a E b) E NA PRESENÇA DE NPG A 1 % (m m⁻¹) (c E d).



FONTE: O autor (2024).

A curva de temperatura e a curva de frequência também foram realizadas para a AMP 10 % (m m⁻¹) em água e na presença de NPG 1 % (m m⁻¹). Os resultados podem ser encontrados nas Figuras 42 e 43.

FIGURA 42 - RAMPA DE TEMPERATURA DA AMP A 10% (m m^{-1}) NA AUSÊNCIA (a e b) E NA PRESENÇA DE NPG A 1% (m m^{-1}) (c e d). AS FIGURAS 33a E 33c REPRESENTAM AS CURVAS DE AQUECIMENTO E AS FIGURAS 33b E 33d REPRESENTAM AS CURVAS DE RESFRIAMENTO.



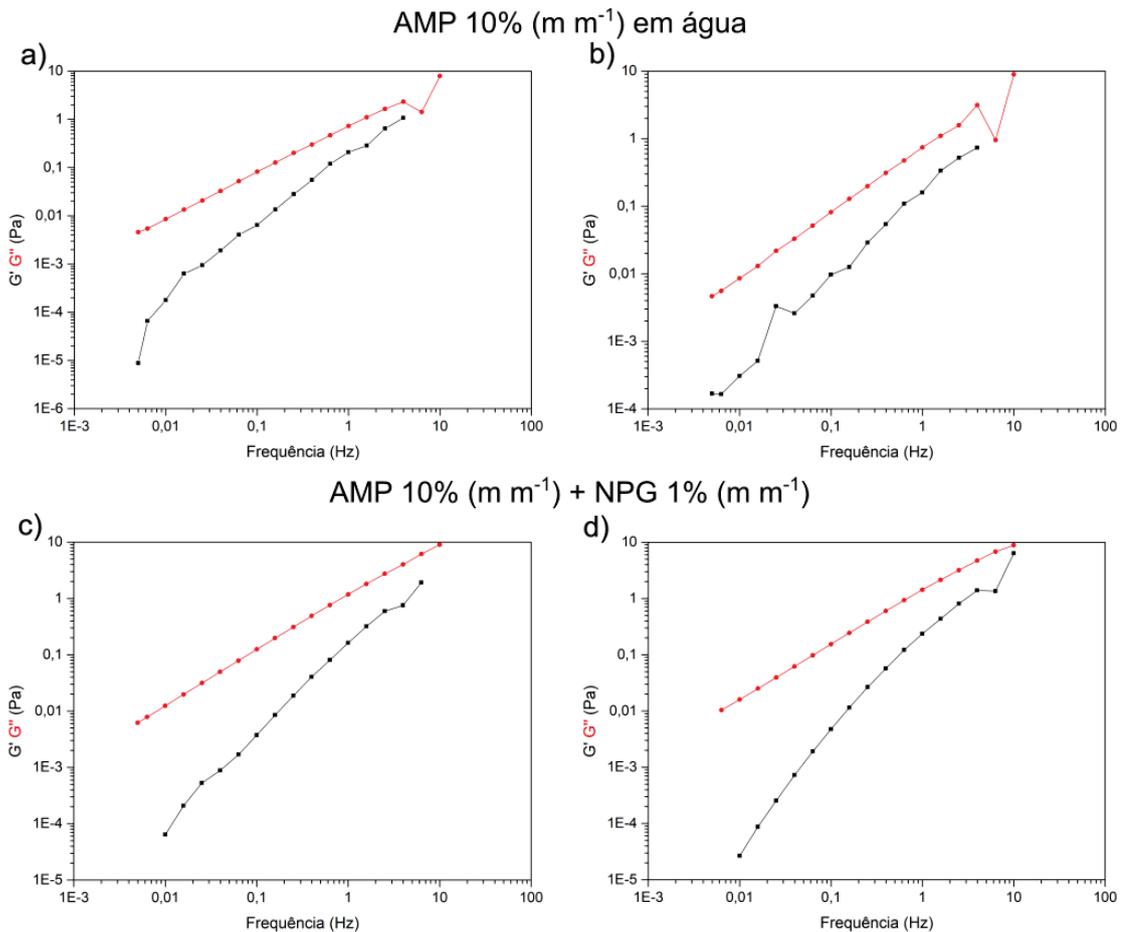
FONTE: O autor (2024).

Durante toda rampa de aquecimento e resfriamento, as amostras de AMP pura e na presença de NPG apresentaram comportamento fluido viscoelástico, evidenciado por $G'' > G'$. Não foi observado uma diferença tão pronunciada entre a amostra pura e a amostra na presença de nanopartículas. Em altas temperaturas foi observado um início de geleificação a aproximadamente $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ na amostra sem a presença de nanopartículas (Figura 42a e 42b), sugerindo que há uma interação hidrofóbica entre as cadeias laterais da amilopectina que foi afetada pela presença de NPG, uma vez que o início de geleificação não foi observado para amostras com NPG.

Três hipóteses podem ser sugeridas para explicar o início do processo de geleificação da AMP. Primeiramente, o amido residual, não removido

completamente durante o processo de purificação, pode estar gelificando a 60 °C. No entanto, seria esperado um aumento logarítmico nos módulos elástico e viscoso, já que a viscosidade do sistema também aumenta com o aumento da temperatura (Ang *et al.*, 2021). Em segundo lugar, a presença de NPG aumenta a pressão osmótica do sistema, resultando em uma menor pressão de vapor. Porém, durante a evaporação, também é esperado um aumento nos dois módulos. Além disso, foi utilizado um sistema de *solvent trap* para evitar a evaporação durante o aquecimento. Por fim, a hipótese mais plausível é que com o aumento da temperatura, as cadeias mais longas da AMP interagem por meio de interações hidrofóbicas com as NPG, o que atrasa ou impede o processo de geleificação, tornando-o menos pronunciado em comparação com a AMP pura.

FIGURA 43 - VAREDA DE FREQUÊNCIA ANTES (a E c) E DEPOIS (b E d) DAS RAMPAS DE AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO PARA O POLÍMERO AMP 10% (m m^{-1}) EM ÁGUA (a E b) E NA PRESENÇA DE NPG A 1% (m m^{-1}) (c E d).



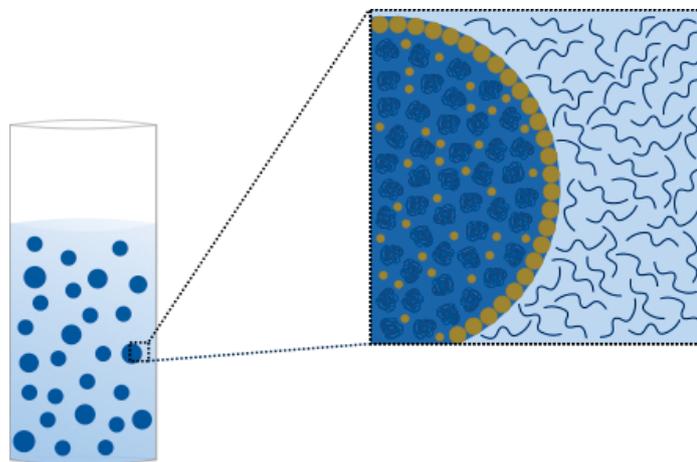
FONTE: O autor (2024).

Conforme observado na Figura 43, durante toda a variação de frequência, tanto a AMP pura quanto a AMP na presença de NPG apresentam $G'' > G'$, comportando-se como fluido viscoelástico. Não foi notado um *crossover* entre G' e G'' para nenhuma das amostras, evidenciando que não houve geleificação do polímero.

Se, através dos resultados reológicos apresentados, a presença de NPG aparenta afetar mais o HPMC, por que as nanopartículas se encontram com maior molhabilidade pela AMP? O fenômeno pode ser explicado pelo maior volume excluído do HPMC. O volume excluído é caracterizado pela tendência de uma molécula em excluir todas as outras moléculas do volume que ela ocupa, sendo resultado da repulsão entre as moléculas do polímero devido a requisitos espaciais (Lucas; Soares; Monteiro, 2001).

Quando disperso em água, as cadeias de HPMC existem na forma linear emaranhada. Já a AMP, quando em água, encontra-se na forma ramificada, como pequenos agregados. Com a adição de NPG, como o volume excluído de HPMC é maior, as NPG tendem a migrar para a fase rica em AMP, possivelmente explicando a maior molhabilidade das nanopartículas por essa fase. Além disso, através dos resultados reológicos apresentados, sugere-se que a temperatura ambiente, as interações hidrofóbicas do HPMC com a NPG são diminuídas, fazendo com que as nanopartículas migrem para a fase rica em AMP. A representação esquemática da preferência de molhabilidade da NPG pela AMP pode ser vista na Figura 44.

FIGURA 44 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PREFERÊNCIA DE MOLHABILIDADE DA NPG PELA FASE DISPERSA DE AMP.



FONTE: O autor (2024).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou o mecanismo de estabilização de emulsões água-em-água utilizando nanopartículas de gliadina. As nanopartículas foram sintetizadas por meio da técnica de nanoprecipitação, resultando em partículas esféricas com diâmetro médio de 207,9 nm em pH 5, mantendo-se estáveis ao longo de 28 dias. As emulsões foram preparadas com os polissacarídeos amilopectina e hidroxipropilmetilcelulose em dois pontos distintos do diagrama de fases, variando-se as concentrações de NPG para avaliar a estabilização do sistema. A microscopia confocal confirmou o mecanismo de estabilização por Pickering para ambos os pontos observados.

Para as emulsões de AMP em HPMC, nenhuma das concentrações de NPG foi suficiente para estabilizar a emulsão por mais de 48 horas. No entanto, observou-se uma pequena fração emulsionada com inversão de fases até 35 dias. Em aumento de 60x, notou-se a preferência de molhabilidade das NPG pela fase de AMP. No Ponto 2, onde emulsões de HPMC em AMP foram formadas, verificou-se a estabilidade das emulsões por até 35 dias em todos os pH testados. A concentração de NPG de 0,5% (m m^{-1}) demonstrou a melhor estabilização, atingindo quase a total cobertura da interface líquido-líquido, com pH 5 apresentando as emulsões mais estáveis ao longo de 35 dias.

Os experimentos reológicos sugerem que as NPG preferem a fase de AMP, uma vez que, em temperatura ambiente, as interações hidrofóbicas entre NPG e HPMC são reduzidas, favorecendo a migração das nanopartículas para a fase de AMP devido ao volume excluído do polímero.

Esses resultados são pioneiros na utilização de NPG para a estabilização de emulsões A/A, especialmente pelo emprego de polímeros de grau farmacêutico e a substituição de partículas de origem animal por vegetais. Este estudo abre novos caminhos para pesquisas adicionais e exploração de diferentes possibilidades. Recomenda-se a adição de um terceiro biopolímero às emulsões, visando modificar a molhabilidade das NPG e, possivelmente, melhorar a estabilidade do sistema. Outras estratégias para aumentar a estabilidade das emulsões incluem a modificação da superfície das NPG por *crosslinking* enzimático, deaminação da gliadina ou associação das NPG com outros polímeros.

A exploração desses novos métodos e a compreensão mais aprofundada das interações entre NPG e polissacarídeos poderão contribuir significativamente para avanços nas indústrias alimentícia e farmacêutica, oferecendo soluções inovadoras e sustentáveis para a estabilização de emulsões.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, C. et al. Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 309, p. 302–332, 10 set. 2019.
- ANG, C. L. et al. Rheological characterization of a physically-modified waxy potato starch: Investigation of its shear-thickening mechanism. **Food Hydrocolloids**, v. 120, 1 nov. 2021.
- APRIYANTO, A.; COMPART, J.; FETTKE, J. A review of starch, a unique biopolymer - Structure, metabolism and in planta modifications. **Plant science: an international journal of experimental plant biology**, v. 318, 1 maio 2022.
- ARANGO, M. A. et al. Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 333–341, 11 out. 2000.
- AVEYARD, R.; BINKS, B. P.; CLINT, J. H. Emulsions stabilised solely by colloidal particles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100, p. 503–546, 2003.
- BARAK, S.; MUDGIL, D.; KHATKAR, B. S. Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 357–368, 23 fev. 2015.
- BERGTHALLER, W.; HOLLMANN, J. Starch☆. Em: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Alemanha: Elsevier, 2014. v. 2, p. 579-612.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 10 ago. 2016.
- BINKS, B. P.; HOROZOV, T. S. **Colloidal particles at liquid interfaces**. 1ª ed. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2006.
- BODVIK, R. et al. Aggregation and network formation of aqueous methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 354, n. 1–3, p. 162–171, 5 fev. 2010.
- BRADY, J. et al. Polymer properties and characterization. Em: **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. United States: Elsevier Inc., 2017. v. 2, p. 181–223.
- BROOKS, D. E.; SHARP, K. A.; FISHER, D. Theoretical Aspects of Partitioning. Em: WALTER, H.; BROOKS, D. E.; FISHER, D. (Eds.). **Partitioning in Aqueous Two-Phase System**. Cambridge: Academic Press, 1985. p. 11–84.

BRUMMER, R. **Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions**. 1 ed. Berlin: Springer, 2006.

CAPELA, E. V. et al. Sustainable strategies based on glycine-betaine analogue ionic liquids for the recovery of monoclonal antibodies from cell culture supernatants. **Green Chemistry**, v. 21, n. 20, p. 5671–5682, 2019.

CAPRON, I.; COSTEUX, S.; DJABOUROV, M. Water in water emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solutions. **Rheologica Acta**, v. 40, p. 441–456, 2001.

CHEN, J. et al. Effect of adding gelatin on the stability of water in water emulsions formed by mixtures of amylopectin and guar gum. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 232, 113593, 2023.

CHENG, C. et al. Gliadin nanoparticles Pickering emulgels for β -carotene delivery: Effect of particle concentration on the stability and bioaccessibility. **Molecules**, v. 25, n. 18, 1 set. 2020.

CHEVALIER, Y.; BOLZINGER, M. A. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 439, p. 23–34, 20 dez. 2013.

CLARK, A. H. Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels. Em: DICKINSON, E. (Ed.). **Food Polymers, Gels and Colloids**. 1. ed. England: Woodhead Publishing, 1991. p. 322–338.

COSGROVE, T. **Colloid Science Principles, methods and applications**. 2. ed. Bristol: Wiley, 2010.

DA SILVA, N. R. et al. Analysis of partitioning of organic compounds and proteins in aqueous polyethylene glycol-sodium sulfate aqueous two-phase systems in terms of solute-solvent interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1415, p. 1–10, 9 out. 2015.

DAMODARAN, S. Protein Stabilization of Emulsions and Foams. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 3, p. 54–66, 2005.

DE BELDER, A. N.; GRANATH, K. Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans. **Carbohydrate Research**, v. 30, n. 2, p. 375-378, out. 1973.

DE FOLTER, J. W. J.; VAN RUIJVEN, M. W. M.; VELIKOV, K. P. Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein †. **Soft Matter**, v. 8, n. 25, p. 6807-6815, 23 maio 2012.

DE FREITAS, R. A. et al. Stabilization of Water-in-Water Emulsions by Polysaccharide-Coated Protein Particles. **Langmuir**, v. 32, n. 5, p. 1227–1232, 9 fev. 2016.

DICKINSON, E. Particle-based stabilization of water-in-water emulsions containing mixed biopolymers. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, p. 31–40, 1 jan. 2019.

DO AMARAL, L. F. M. et al. Oil-in-oil Pickering emulsions stabilized by shigaite-like layered double hydroxide particles. **Applied Clay Science**, v. 238, 15 jun. 2023.

DUPONT, F. M. et al. Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenins, and other proteins from small samples of wheat flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1575–1584, 9 mar. 2005.

ESQUENA, J. Water-in-water (W/W) emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 25, p. 109–119, 1 out. 2016.

ESTEGHLAL, S. et al. Gelatin-hydroxypropyl methylcellulose water-in-water emulsions as a new bio-based packaging material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 242–249, 1 maio 2016.

EZPELETA, I. et al. Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 131, n. 2, p. 191–200, 19 abr. 1996.

FALUA, K. J. et al. Valorization of Starch to Biobased Materials: A Review. **Polymers**, v. 14, n. 11, 2215, 1 jun. 2022.

GONZALEZ-JORDAN, A.; NICOLAI, T.; BENYAHIA, L. Influence of the Protein Particle Morphology and Partitioning on the Behavior of Particle-Stabilized Water-in-Water Emulsions. **Langmuir**, v. 32, n. 28, p. 7189–7197, 19 jul. 2016.

GONZALEZ-JORDAN, A.; NICOLAI, T.; BENYAHIA, L. Enhancement of the particle stabilization of water-in-water emulsions by modulating the phase preference of the particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 530, p. 505–510, 15 nov. 2018.

HADINUGROHO, W. et al. Hydroxypropyl Methylcellulose as Hydrogel Matrix and Citric Acid-Locust Bean Gum as Negative Matrix for Controlled Release Tablet. **ACS Omega**, v. 8, n. 8, p. 7767–7778, 28 fev. 2023.

HATTI-KAUL, R. **Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols**. Totowa: Humana Press, 2000.

HAZT, B. **Effect of pH and beta-lactoglobulin particle morphology on the stabilization of amylopectin and xyloglucan emulsions**. 91 f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, Curitiba, 2022.

HAZT, B. et al. Unconventional and conventional Pickering emulsions: Perspectives and challenges in skin applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 636, 5 abr. 2023.

HERRERA, M. G.; VEUTHEY, T. V.; DODERO, V. I. Self-organization of gliadin in aqueous media under physiological digestive pHs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 565–575, 1 maio 2016.

HWANG, S. H. et al. Effect of Porcine- and Bovine-Derived Xenografts with Hydroxypropyl Methylcellulose for Bone Formation in Rabbit Calvaria Defects. **Materials**, v. 16, n. 5, 1 mar. 2023.

IANNIRUBERTO, G. Introduction on Polymer Rheology. Em: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Italy: Elsevier, 2015.

ILIĆ-STOJANOVIĆ, S.; NIKOLIĆ, L.; CAKIĆ, S. A Review of Patents and Innovative Biopolymer-Based Hydrogels. **Gels**, v. 9, n. 7, 1 jul. 2023.

JOYE, I. J.; NELIS, V. A.; MCCLEMENTS, D. J. Gliadin-based nanoparticles: Fabrication and stability of food-grade colloidal delivery systems. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 86–93, 1 fev. 2015.

JUMEL, K. et al. Molar mass and viscometric characterisation of hydroxypropylmethyl cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 105–109, 1996.

KEARY, C. M. Characterization of METHOCEL cellulose ethers by aqueous SEC with multiple detectors. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 293–303, 2001.

KOBAYASHI, S.; SCHWARTZ, S. J.; LINEBACK, D. R. Rapid Analysis of starch, amylose and amylopectin by high-performance size-exclusion chromatography*. **Journal of Chromatography**, v. 319, p. 205-214, 1985.

KRIEG, M. et al. Atomic force microscopy-based mechanobiology. **Nature Reviews Physics**, v. 1, p. 41-57, 1 jan. 2019.

LADD EFFIO, C. et al. Downstream processing of virus-like particles: single-stage and multi-stage aqueous two-phase extraction. **Journal of chromatography. A**, v. 1383, p. 35–46, 27 fev. 2015.

LI, G. et al. Interfacial Crystallization of Diacylglycerols Rich in Medium- and Long-Chain Fatty Acids in Water-in-Oil Emulsions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, n. 8, 1 ago. 2020.

LI, M. F. et al. The formation and characterization of antioxidant pickering emulsions: Effect of the interactions between gliadin and chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 482–489, 1 maio 2019.

LI, N. et al. Determination of steroid hormones in milk using aqueous two-phase extraction coupled to liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 7, p. 2514-2522, 26 jan. 2015.

LI, S. Q. et al. Gliadin-based nanoparticles used for pickering stabilization: Current status and future perspective. **Food Hydrocolloids**, v. 145, 1 dez. 2023.

LI, Y. et al. Size-exclusion chromatography of ultrahigh molecular weight methylcellulose ethers and hydroxypropyl methylcellulose ethers for reliable molecular weight distribution characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 138, p. 290–300, 15 mar. 2016.

LIN, L. et al. Effects of molecular compositions on crystalline structure and functional properties of rice starches with different amylopectin extra-long chains. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 137–145, 1 mar. 2019.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. 1 ed. E-Papers, 2001.

MA, L. et al. One-step preparation of high internal phase emulsions using natural edible Pickering stabilizers: Gliadin nanoparticles/gum Arabic. **Food Hydrocolloids**, v. 100, 1 mar. 2020.

MACHADO, J. P. E. **Exploring the microstructure of water in water emulsions with protein particles: the effect of changing the pH, the temperature, and adding polysaccharides**. 100 f. Tese (Doutorado em Química) — Universidade Federal do Paraná e Le Mans Université, Curitiba e Le Mans, 2022.

MACHADO, J. P. E. et al. Stabilization of amylopectin-pullulan water in water emulsions by Interacting protein particles. **Food Hydrocolloids**, v. 124, 1 mar. 2022.

MARCANO, R. G. V. et al. Mitigating amphotericin B cytotoxicity through gliadin-casein nanoparticles: Insights into synthesis, optimization, characterization, in vitro release and cytotoxicity evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 260, 1 mar. 2024.

MCCLEMENTS, D. J. **Food emulsions: principles, practices, and techniques**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.

MEHANNA, M. M.; MNEIMNEH, A. T. Updated but not outdated “Gliadin”: A plant protein in advanced pharmaceutical nanotechnologies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 587, 25 set. 2020.

MENG, Y.; NICOL, E.; NICOLAI, T. Exploiting multiple phase separation to stabilize water in water emulsions and form stable microcapsules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 617, p. 65-72, 1 jul. 2022.

MENG, Y.; NICOLAI, T. The effect of the contact angle on particle stabilization and bridging in water-in-water emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 638, p. 506–512, 15 maio 2023.

MOTTA, F. L.; STOYANOV, S. R.; SOARES, J. B. P. Development and application of an amylopectin-graft-poly(methyl acrylate) solidifier for rapid and efficient containment and recovery of heavy oil spills in aqueous environments. **Chemosphere**, v. 236, 1 dez. 2019.

MOUTKANE, M.; BENYAHIA, L.; NICOLAI, T. Stable protein microcapsules by crosslinking protein particles in water in water emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 656, 5 jan. 2023.

NIROULA, A. et al. Biomolecule-based pickering food emulsions: Intrinsic components of food matrix, recent trends and prospects. **Food Hydrocolloids**, v. 112, 1 mar. 2021.

NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. Protein Extraction and Precipitation. Em: CIBOROWSKI, P.; SILBERRING, J. **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads**. 2 ed. Elsevier Inc., 2016. p. 51–62.

OSBORNE, T. B. The vegetable proteins. 2 ed. London: Longmans Green and Co., 1924.

PATRA, A. S. et al. Cationically functionalized amylopectin as an efficient flocculant for treatment of coal suspension. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 586, 5 fev. 2020.

PENG, D. et al. Adsorption and Distribution of Edible Gliadin Nanoparticles at the Air/Water Interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 11, p. 2454–2460, 22 mar. 2017.

PENG, D. et al. Foaming and surface properties of gliadin nanoparticles: Influence of pH and heating temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 107–116, 1 abr. 2018.

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, 1 ago. 2023.

POORTINGA, A. T. Microcapsules from self-assembled colloidal particles using aqueous phase-separated polymer solutions. **Langmuir**, v. 24, n. 5, p. 1644–1647, 4 mar. 2008.

RANI, M. et al. Functional and structural properties of gliadin as influenced by pH, extraction protocols, and wheat cultivars. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 234, 15 abr. 2023.

ROBIN, B. et al. Pickering emulsions: History and fundamentals. Em: WYPYCH, F.; DE FREITAS, R. A. **Developments in Clay Science**. Elsevier B.V., 2022. v. 10, p. 61–85.

ROSS-MURPHY, S. B. Rheological Methods. Em: **Physical techniques for the study of food biopolymers**. 1 ed. London: Blackie cademic & Professional, 1994.

SAPIRSTEIN, H. D.; FU, B. X. Intercultivar Variation in the Quantity of Monomeric Proteins, Soluble and Insoluble Glutenin, and Residue Protein in Wheat Flour and Relationships to Breadmaking Quality. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 500–507, 1998.

SARKAR, N. Thermal Gelation Properties of Methyl and Hydroxypropyl Methylcellulose*. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 24, n. 4, p. 1073–1087, 1979.

SCHAGERLÖF, H. et al. Substituent distribution and clouding behavior of hydroxypropyl methyl cellulose analyzed using enzymatic degradation. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 12, p. 3474–3481, dez. 2006.

SCHRAMM, G. L. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. 1 ed. Artliber editora LTDA, 2006.

SCHRAMM, L. L. **Emulsions, foams, and suspensions: fundamentals and applications**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

SCHRAMM, L. L. **Emulsions, Foams, Suspensions, and Aerosols: Microscience and Applications**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2014.

SHEN, C. et al. Pickering emulsion stabilized by gliadin/soybean polysaccharide composite colloidal nanoparticle: Physicochemical properties and its application on washing of fresh-cut cabbage. **Food Research International**, v. 161, 1 nov. 2022.

SIEBEN, P G. et al. Oil-in-Oil Pickering emulsions stabilized with kaolinite. *Journal of Molecular Liquids*, v. 385, 1 set. 2023.

SILVA, C. E. P.; LOH, W. Fundamentals of emulsion formation and stability. Em: WYPYCH, F.; DE FREITAS, R. A. **Developments in Clay Science**. Elsevier B.V., 2022. v. 10, p. 37–59.

SILVA, S. M. C. et al. Aggregation and gelation in hydroxypropylmethyl cellulose aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 327, n. 2, p. 333–340, 15 nov. 2008.

STOJKOV, G. et al. Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. **Gels**, v. 7, n. 4, 1 dez. 2021.

TADROS, T. F. **Emulsion Science and Technology**. 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.

THEWISSEN, B. G. et al. Foaming properties of Wheat Gliadin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1370–1375, 23 fev. 2011.

TUNDISI, L. L. et al. Hydroxypropyl methylcellulose: Physicochemical properties and ocular drug delivery formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 159, 1 abr. 2021.

UMAMAHESHWARI, R. B.; RAMTEKE, S.; JAIN, N. K. Anti-Helicobacter Pylori Effect of Mucoadhesive Nanoparticles Bearing Amoxicillin in Experimental Gerbils Model. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 2, p. 60-68, 2004.

- URADE, R.; SATO, N.; SUGIYAMA, M. Gliadins from wheat grain: an overview, from primary structure to nanostructures of aggregates. **Biophysical Reviews**, v. 10, p. 435-443, 1 abr. 2018.
- VAN DEN BROECK, H. C. et al. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 10, p. 975–982, 1 abr. 2009.
- VOCI, S. et al. Ascorbic acid-loaded gliadin nanoparticles as a novel nutraceutical formulation. **Food Research International**, v. 161, 1 nov. 2022.
- VOCI, S.; FRESTA, M.; COSCO, D. Gliadins as versatile biomaterials for drug delivery applications. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 329, p. 385–400, 10 jan. 2021.
- WALLACE, J. C. et al. New Methods for Extraction and Quantitation of Zeins Reveal a High Content of γ -Zein in Modified opaque-2 Maize. **Plant Physiology**, v. 92, p. 191–196, 1990.
- WANG, Y. et al. Impact of deamidation on gliadin-based nanoparticle formation and curcumin encapsulation. **Journal of Food Engineering**, v. 260, p. 30–39, 1 nov. 2019.
- WANG, Y. et al. Improving stability of gliadin-based Pickering emulsions by deamidation. **Journal of Food Engineering**, v. 271, 1 abr. 2020.
- WANG, Y. et al. Water-in-Water Emulsions, Ultralow Interfacial Tension, and Biolubrication. **CCS Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 2102–2114, 1 jun. 2022.
- WEISS', W.; VOGELMEIERZ, C.; GORG', A. Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma. **Electrophoresis**, v. 14, n. 8, p. 805-816, ago. 1993.
- WOUTERS, A. G. B.; JOYE, I. J.; DELCOUR, J. A. Understanding the air-water interfacial behavior of suspensions of wheat gliadin nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 102, 1 maio 2020.
- WU, W. et al. Improving the stability of wheat gliadin nanoparticles – Effect of gum arabic addition. **Food Hydrocolloids**, v. 80, p. 78–87, 1 jul. 2018.
- XU, W. et al. Ethanol-tolerant pickering emulsion stabilized by gliadin nanoparticles. **LWT – Food Science and Technology**, v. 162, 1 jun. 2022.
- YOU, K. M.; MURRAY, B. S.; SARKAR, A. Tribology and rheology of water-in-water emulsions stabilized by whey protein microgels. **Food Hydrocolloids**, v. 134, 1 jan. 2023.

ZHANG, J. et al. Microgel-Stabilized Hydroxypropyl Methylcellulose and Dextran Water-in-Water Emulsion: Influence of pH, Ionic Strength, and Temperature. **Langmuir**, v. 37, n. 18, p. 5617–5626, 11 maio 2021.

ZHANG, J. et al. Water-in-water Pickering emulsion: A fascinating microculture apparatus for embedding and cultivation of *Lactobacillus helveticus*. **Food Hydrocolloids**, v. 147, 2024.

ZHOU, F. Z. et al. Fabrication and Characterization of Novel Water-Insoluble Protein Porous Materials Derived from Pickering High Internal-Phase Emulsions Stabilized by Gliadin-Chitosan-Complex Particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 12, p. 3423–3431, 27 mar. 2019.

ZHOU, F. Z. et al. Pickering water in oil emulsions prepared from biocompatible gliadin/ethyl cellulose complex particles. **Food Hydrocolloids**, v. 134, 1 jan. 2023.

ZHU, J. et al. Synthesis and characterization of enzymatically cross-linked feruloyl amylopectin for curcumin encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 126–132, 1 abr. 2016.

ZHU, J. et al. New insights into amylose and amylopectin biosynthesis in rice endosperm. **Carbohydrate Polymers**, v. 230, 15 fev. 2020.

APÊNDICE 1

Caracterização do HPMC por Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os experimentos de RMN foram realizados pela Dr. Franciely Grose Colodi, do Grupo BioPol, e os resultados estão descritos em artigo ainda em processo de publicação.

O HPMC foi analisado por RMN (^1H , ^{13}C , HSQC). A amostra foi solubilizada a 10 g L^{-1} para os espectros de ^1H e HSQC e a 30 g L^{-1} para o espectro de ^{13}C , utilizando D_2O a 99% e acetona como padrão interno (que apresenta deslocamentos químicos em 2,224 e 30,45 ppm, para ^1H e ^{13}C , respectivamente). Foi utilizado o equipamento Bruker AVANCE III 600 com campo magnético de 14,095 Tesla (600 MHz) para a obtenção de espectros mono e bidimensionais das amostras. Para o espectro de ^1H foram obtidos 32 scans com intervalo entre os scans de 1 s, de forma a tornar a análise quantitativa.

Pela região anomérica do espectro de HSQC, foi possível identificar correlações em 101,5/5,56 e 102,1/4,49 ppm referentes aos C1/H1 das unidades de β -D-glucose unidas por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4. Foram identificados deslocamentos químicos de substituintes metílicos em três possíveis posições, O2 (58,4/4,42 ppm), O6 (55,5/3,38 ppm) e O3 (57,3/3,49 ppm). Além disso, a presença de hidroxila no grupo hidroxipropil pode levar a polimerização dos substituintes durante a síntese dos derivados de HPMC. Dessa forma, grupos metileno em C6/H6 não substituídos foram identificados em 60,0/4,00; 3,80 ppm e grupos substituídos em 70,2/3,78; 3,74 ppm. Também foram atribuídos grupos metileno internos e externos dos substituintes hidroxietil em 76,1/3,51; 3,49 e 66,3/3,52; 3,45, respectivamente. A determinação do grau de substituição do HPMC também foi determinada, resultando em grau de substituição total de 0,47, com porcentagem de substituição de 15,7%. O grau de substituição por grupos metil foi de 0,35 e dos grupos hidroxipropil foi de 0,12. A razão entre os graus de substituição por grupos metil e hidroxipropil foi de 2,9.